



FURG

Tese de Doutorado

**Desenvolvimento e Validação de Métodos
Cromatográficos acoplados à Espectrometria de Massas
para Determinação de Resíduos em Amostras de Peixes**

Lenise Guimarães de Oliveira

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2019

Desenvolvimento e Validação de Métodos Cromatográficos acoplados à Espectrometria de Massas para Determinação de Resíduos em Amostras de Peixes

por

LENISE GUIMARÃES DE OLIVEIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (FURG, RS), como requisito parcial para obtenção do título de DOUTOR EM QUÍMICA.

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2019

Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Escola de Química e Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Defesa de Tese de Doutorado


**Desenvolvimento e Validação de Métodos Cromatográficos
acoplados à Espectrometria de Massas para Determinação
de Resíduos em Amostras de Peixes**

elaborada por

LENISE GUIMARÃES DE OLIVEIRA

Como requisito parcial para a obtenção do título de
Doutor em Química Tecnológica e Ambiental
Área de concentração Química Analítica

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves (FURG)
(Presidente – Orientador)



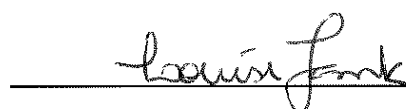
Prof. Dr. Renato Zanella (UFSM)



Prof. Dr^a. Liziara da Costa Cabrera (UFFS)



Prof. Dr. Manoel Leonardo Martins (FURG)



Dr^a. Louise Jank (MAPA)

Rio Grande, 13 de Fevereiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente ao meu orientador, Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves, que sempre acreditou em mim e aceitou todas as minhas idéias para a execução deste trabalho, além de permitir que eu me ausentasse por mais de um ano para realizar o doutorado sanduíche na Irlanda. Serei eternamente grata pelo que fizeste e faz por mim e pela tua amizade!

Ao Prof. Dr. Osmar D. Prestes que fez o contato com o Dr. Martin Danaher para que eu pudesse relizar o Doutorado Sanduíche. Muito obrigada!

Ao Dr. Martin Danaher por me aceitar em seu laboratório e por prover toda a estrutura e conhecimento para o desenvolvimento de parte deste trabalho. Muito obrigada pela atenção e por permitir que meu sonho se tornasse realidade!

Aos membros da banca de qualificação e de defesa pelas excelentes contribuições e comentários realizados para enriquecer este trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande, instituição na qual sou colaboradora e aluna, agradeço pela oportunidade e pela flexibilidade que permitiu a realização do doutorado.

Às minhas colegas de trabalho, Márcia H. S. Kurz, Marcia V. Silveira e Clarissa H. Rosa, por me apoiarem no período que estava fazendo as disciplinas e principalmente no período que me afastei da FURG como servidora. Obrigada pelo companheirismo, pelo espírito de equipe e pela amizade!

Gostaria de agradecer especialmente à Márcia H. S. Kurz, que além de uma colega de trabalho, é minha comadre e amiga. Muito obrigada Marcinha por estar sempre ao meu lado, participando das minhas atividades, me incentivando, e me auxiliando. Mas saiba que jamais deixará de ser minha revisora oficial!

À minha família, que está ao meu lado em todos os momentos e que me apoia incondicionalmente. Pai e mãe, vocês são a razão de tudo! E se hoje sentem orgulho de me ver conquistando mais este título, saibam que estão sentindo o que sinto todos os dias por ser filha de vocês! Vocês são especiais! Amo vocês!

Aos meus afilhados, Eduardo, Luca, Miguel e Júlia, vocês são os presentes mais especiais que já recebi. E foi a parte mais difícil de estar longe por tanto tempo. A dinda ama vocês!

Gostaria de fazer um agradecimento especial ao Moisés, meu noivo, meu amigo e meu parceiro. Tu foste essencial para que eu conseguisse superar todas as dificuldades e desafios que encontramos durante o intercâmbio e durante meu doutorado. Mais uma vez crescemos juntos! Muito obrigada por tudo!

Aos amigos que conheci nesta caminhada e que foram muitos. Aos amigos do LARCO, que me acompanharam durante esta caminhada de laboratório, tornando meus dias mais leves. Agradeço especialmente ao IC Marlon Guimarães que me auxiliou nos experimentos e que sempre esteve pronto para ajudar no desenvolvimento deste trabalho. E também ao Prof. Dr. Manoel L. Martins pelo auxílio nas atividades do laboratório, pelos ensinamentos e por todos os “consertos” realizados no GC-MS. Aos meus amigos do TEAGASC, um agradecimento especial pelo carinho, pela atenção e pelo apoio. Pelos cafés, almoços, pela yoga, pelas “*pints*”, enfim, pelos momentos em que cada um de vocês me mostrou um pouco de si e da sua cultura. Eu aprendi muito com vocês! À minha família de Dublin: Aline, Cris, Tiago, Steven e a Natália. Sinto saudades da nossa convivência e acredito que isso é sinal do quão especial vocês se tornaram pra mim. Obrigada!

A essa energia maior que eu chamo de Deus, por me dar força e, principalmente, esperança de que este dia chegaria da melhor maneira possível. Por permitir estar aqui, por guiar meus caminhos e por colocar pessoas incríveis na minha vida. Sou grata por tudo que tenho e que conquistei!

Enfim, nunca imaginei que um doutorado poderia me proporcionar experiências tão incríveis quanto as que viví. Foi, sem dúvida, a minha melhor experiência de vida até este dia de hoje. Aprendi muito mais que desenvolver e validar as técnicas que venho estudando desde o mestrado, aprendi sobre a vida e sobre mim mesma. Mas tenho certeza que nada disso teria acontecido se eu não tivesse o apoio e o carinho destas pessoas.

Por isso, mais uma vez, muito obrigada a todos!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	x
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 <i>Produção e consumo de peixe</i>	<i>4</i>
2.2 <i>Controle de doenças em aquicultura</i>	<i>4</i>
2.3 <i>Propriedades físico-químicas, utilização e toxicidade dos compostos em estudo .</i>	<i>5</i>
2.3.1 Piretróides	5
2.3.2 Organofosforados.....	8
2.3.3 Benzoiluréis.....	9
2.4 <i>Transporte e incidência dos resíduos e contaminantes no meio ambiente.....</i>	<i>10</i>
2.5 <i>Limites máximos de resíduos para amostras de peixes</i>	<i>13</i>
2.6 <i>Métodos de preparo de amostra para determinação de resíduos</i>	<i>14</i>
2.6.1 <i>Extração e clean-up</i>	<i>14</i>
2.6.2 <i>Características das matrizes em estudo</i>	<i>19</i>
2.6.3 <i>Características e escolha dos sorventes pra remoção de interferentes da matriz</i>	<i>20</i>
2.7 <i>Planejamento de experimentos</i>	<i>22</i>
2.8 <i>Análise cromatográfica acoplada à espectrometria de massas para determinação de resíduos.....</i>	<i>25</i>

<i>2.9 Métodos empregados na determinação dos compostos em estudo em tecidos de peixes</i>	27
<i>2.10 Validação de métodos analíticos</i>	31
2.10.1 SANTE/11813/2017	32
2.10.2 Decisão 2002/657/CE	34
2.10.3 Extensão de escopo	37
2.10.4 Incerteza das medições	38
3. CAPÍTULO 1 – ARTIGO I	40
4. CAPÍTULO 2 – ARTIGO II	94
5. CONCLUSÕES	130
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura básica das piretrinas.	6
Figura 2. Estrutura da aletrina (a), deltametrina (b) e fenvalerato (c).	6
Figura 3. Estrutura em triângulo usada para modelamento de misturas para três componentes (x_1 , x_2 e x_3).	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Matriz experimental codificada para planejamento de misturas para três compostos.....25

Tabela 2. Métodos analíticos descritos para determinação de piretróides, piretrinas, benzoiluréias e organofosforados em tecidos de peixes e alimentos com alto teor de gordura.....28

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. ANOVA, análise de variância, do inglês *analysis of variance*
2. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária
3. APCI, ionização química em pressão atmosférica, do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*
4. C₁₈, octadecilsilano
5. C₈, octilsilano
6. CC α , limite de decisão
7. CC β , capacidade de detecção
8. CI, ionização química, do inglês *chemical ionisation*
9. CV%, coeficiente de variação
10. CVMP, Comitê para Medicamentos de Uso Veterinário, do inglês *Committee for Medicinal Products for Veterinary Use*
11. DAD, detecção por arranjo de diodos, do inglês *diode array detector*
12. DDT, diclorodifeniltricloroetano
13. DLLME, microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction*
14. d-SPE, extração em fase sólida dispersiva, do inglês *dispersive solid phase extraction*
15. ECD, detecção por captura de elétrons, do inglês *electron capture detection*
16. EI, ionização por impacto de elétrons, do inglês *electron ionization*
17. EPMAR, relatório público europeu de avaliação de LMR, do inglês *european public MRL assessment report*
18. ESI, ionização por eletronebulização, do inglês *electrospray ionization*
19. EU, União Europeia, do inglês *European Union*

20. FAO, Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
21. GC, cromatografia gasosa, do inglês *gas chromatography*
22. IDA, ingestão diária aceitável
23. IN, instrução normativa
24. K_{ow} , coeficiente de partição octanol/água, do inglês *octanol/water partition coefficient*
25. LANAGRO-RS, Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul
26. LARCO, Laboratório de Análises de Resíduos e Contaminantes
27. LC, cromatografia líquida, do inglês *liquid chromatography*
28. LC_{50} , concentração letal, do inglês *lethal concentration*
29. LC-MS/MS, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, do inglês *liquid chromatography – tandem mass spectrometry*
30. LMR, limite máximo de resíduos
31. LOD, limite de detecção, do inglês *limit of detection*
32. LOQ, limite de quantificação, do inglês *limit of quantification*
33. MAE, extração assistida por micro-ondas, do inglês, *microwave-assisted extraction*
34. MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
35. MERCOSUL, Mercado Comum do Sul
36. MRM, monitoramento de reações múltiplas, do inglês *multiple reaction monitoring*
37. MS, espectrometria de massas, do inglês *mass spectrometry*
38. MS/MS, espectrometria de massas em série, do inglês *tandem mass spectrometry*
39. MSPD, dispersão da matriz em fase sólida, do inglês *matrix solid-phase dispersion*
40. OIE, Organização Mundial da Saúde Animal, do inglês *World Organisation for Animal Health*
41. OMC, Organização Mundial do Comércio

42. PARA, Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
43. PCA, 4-cloroanilina
44. PLE, extração com líquido pressurizado, do inglês *pressurized-liquid extraction*
45. PNCRC, Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
46. PSA, amina primária secundária, do inglês *primary secondary amine*
47. QuEChERS, rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro, do inglês *quick, easy, cheap, effective, rugged, safe*
48. RL, limite de quantificação prático, do inglês *reporting limit*
49. RSD%, desvio padrão relativo, do inglês *relative standard deviation*
50. RSD_r, desvio padrão relativo da repetibilidade, do inglês *relative standard deviation of repeatability*
51. RSD_{WR}, desvio padrão relativo da reprodutibilidade intralaboratorial, do inglês *relative standard deviation of within-lab-reproducibility*
52. SEM, erro padrão da média, do inglês *standard error of the mean*
53. SFE, extração com fluido supercrítico, do inglês *supercritical fluid extraction*
54. SIM, monitoramento seletivo de íons, do inglês *selected ion monitoring*
55. SiTi 4% C₁₈, sílica de alta pureza dopada com Titânio com 4% de C₁₈ na formulação
56. SiTi, sílica de alta pureza dopada com Titânio
57. SPE, extração em fase sólida, do inglês *solid phase extraction*
58. SPME, microextração em fase sólida, do inglês *solid-phase microextraction*
59. SRM, monitoramento seletivo de reações, do inglês *selected reacton monitoring*
60. Teagasc, Instituto responsável pelo desenvolvimento de alimentos e agricultura na Irlanda, do inglês *Agriculture and Food Development Authority*
61. UPLC, cromatografia líquida de ultra performance, do inglês *ultra performance liquid chromatography*

62. US EPA, Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês *United States Environmental Protection Agency*
63. WHO, Organização Mundial da Saúde, do inglês *World Health Organization*
64. WL_r , repetibilidade intralaboratorial, do inglês *within-laboratory repeatability*
65. WL_R , reprodutibilidade intralaboratorial, do inglês *within-laboratory reproducibility*
66. Z-Sep, mistura de dois sorventes: sílica revestida com dióxido de zircônio (ZrO_2) e C_{18} , na proporção de 2:5.
67. Z-Sep+, consiste em C_{18} e sílica revestida com dióxido de zircônio (ZrO_2) conectados na mesma partícula de sílica

RESUMO

Título: Desenvolvimento e Validação de Métodos Cromatográficos acoplados à Espectrometria de Massas para Determinação de Resíduos em Amostras de Peixes

Autor: Lenise Guimarães de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves

Este trabalho consiste no desenvolvimento de dois métodos para a determinação de resíduos em tecidos de peixes usando QuEChERS modificado e métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. O capítulo 1 refere-se ao método de extração usando sistema de vibração para a determinação de antiparasitários por LC-MS/MS. O método cromatográfico foi otimizado e foram investigados os efeitos de diferentes sorventes para a remoção de interferentes presentes nos extratos das matrizes de salmão, truta e *seabass* na etapa de *clean-up*. Três métodos foram comparados e o melhor foi usado para a etapa de validação em tecido de salmão. A veracidade e a precisão variaram entre 87 - 121% e 4,1 - 23,7%, respectivamente, para a maioria dos compostos. O método permite a extração e análise de 36 amostras em 9 horas por um único analista. O capítulo 2 refere-se ao método para determinação de piretróides em tecidos de peixes comumente consumidos na região Sul do Brasil usando GC-MS. O efeito da precipitação à baixa temperatura e de diferentes sorventes na remoção de interferentes da matriz foram avaliados na etapa de *clean-up*. A proporção dos sorventes C₁₈, PSA e Z-Sep+ foi otimizada usando planejamento experimental. O método foi validado em tecidos de traíra e a ampliação de escopo da matriz foi executada para tecidos de tilápia e tainha. As recuperações variaram entre 71 – 107%, 67 – 110% e 63 – 129% para traíra, tilápia e tainha, respectivamente, com RSD% ≤ 21,5%. Os métodos apresentaram limites de quantificação na faixa de 2 a 10 µg kg⁻¹ para todos os compostos. Esses limites são inferiores ao limite máximo de resíduo estabelecido para cada composto, podendo ser utilizados pelos órgãos regulatórios para o monitoramento da presença de resíduos em amostras de pescado. A aplicabilidade do método foi avaliada através de análises de amostras reais, onde resíduos de alguns compostos foram encontrados.

ABSTRACT

Title: Development and Validation of a Chromatographic Method coupled with Mass Spectrometry for Residues Determination in Fish Samples

Author: Lenise Guimarães de Oliveira

Advisor: Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves

The development of two methods for residues determination in fish tissues using modified QuEChERS technique and chromatography coupled with mass spectrometry was described. The chapter 1 refers to a method using vibration extraction for determination of antiparasitics by LC-MS/MS. The chromatographic method was optimized. The effect of different sorbents was investigated regarding co-extractives removal from extracts of salmon, trout and seabass matrices in clean-up step. Three methods were compared and the best was used for validation step in salmon tissue. The trueness and precision ranged from 87 – 121% and 4.1 – 23.7%, respectively, for the major part of the compounds. The developed method allows the extraction and analysis of 36 samples in 9 hours by one analyst. The chapter 2 refers to a method for determination of pyrethroids residues in fish tissues commonly consumed in Southern of Brazil using GC-MS. The effect of precipitation at low temperature and different sorbents was evaluated for co-extractives removal in clean-up step. The proportion of the sorbents C₁₈, PSA and Z-Sep+ was optimized through experimental design. The method was validated in trahira tissue and a scope extension was performed for tilapia and tainha tissues. The recoveries ranged from 71 – 107%, 67 – 110% and 63 – 129% for trahira, tilapia and tainha, respectively, and RSD% ≤ 21.5%. The methods demonstrated limits of quantification ranging from 2 a 10 µg kg⁻¹ for all compounds. These limits were below the established maximum residue limit for each compound. Therefore, they could be used by regulatory agencies for monitoring the presence of these residues in fish samples. The applicability of these methods was assessed by analysis of real samples where residues were detected.

1. INTRODUÇÃO

Piretróides são compostos sintéticos derivados das piretrinas muito utilizados no combate a insetos em diversas culturas. Além disso, são empregados no controle de ectoparasitas na produção de alimentos de origem animal e no controle de pragas (mosquitos). Também são usados em produtos de *Pet Shop*, jardinagem e de cuidado pessoal (no combate a piolhos e como repelente). Estes compostos são muito utilizados no controle de doenças ocasionados pelos ectoparasitas conhecidos como piolhos do mar em aquicultura. Azametifós (organofosforado) e diflubenzurom (benzoiluréia) também são indicados para este fim na produção de pescado.

Devido ao uso extensivo, resíduos destes compostos vem sendo encontrados em diversas amostras, sejam elas amostras ambientais (água e sedimento), amostras de alimentos (chás e pescado), ou amostras biológicas diversas (leite materno e tecidos de golfinhos).

Os ambientes aquáticos estão sujeitos a descargas diretas ou indiretas destes compostos, tanto em regiões urbanas e industriais, quanto em regiões agrícolas. No ambiente aquático estes contaminantes podem se acumular nas partículas em suspensão, no sedimento e nos organismos vivos. Os peixes podem acumular os compostos através das guelras, pela alimentação ou através de teias alimentares (biomagnificação). Por este motivo, também podem ser utilizados como indicador de contaminação ambiental. Estes compostos apresentam elevada toxicidade aos organismos aquáticos não-alvo, como por exemplo, os crustáceos.

A exposição dos seres humanos pode se dar através de contato indireto ou através da alimentação. Para proteger a saúde dos consumidores, limites máximos de resíduos são estabelecidos através de órgãos nacionais e internacionais. Neste contexto, o desenvolvimento de metodologias de determinação de resíduos é crucial para o controle e monitoramento destes compostos nos alimentos disponíveis ao consumidor. O desenvolvimento de um método de preparo de amostra com base nas características dos compostos e da matriz em estudo, a escolha do método de detecção e a etapa de validação do método analítico são muito importantes para a obtenção de resultados confiáveis.

Desta forma, este trabalho visa desenvolver e validar métodos analíticos capazes de quantificar resíduos de diferentes classes (piretróides, benzoiluréia e organofosforado) em tecidos de diferentes peixes usando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas. Durante o desenvolvimento destes métodos foram investigados os melhores procedimentos e condições a serem utilizados a fim de permitir: 1) a extração eficiente dos compostos presentes na matriz, 2) a remoção dos componentes da matriz (gordura, proteína e corantes) que podem interferir nos resultados das análises, 3) a quantificação inequívoca dos resíduos em baixas concentrações considerando os valores de LMR (limite máximo de resíduo) para cada analito de interesse, 4) preparo de amostra simultâneo para um grande número de amostras e 5) a utilização dos métodos em rotina.

Após a revisão da literatura, este trabalho foi dividido em dois capítulos, que correspondem aos artigos científicos produzidos. O capítulo 1 refere-se ao artigo que descreve os estudos desenvolvidos durante o doutorado sanduíche no exterior junto ao laboratório de resíduos do Teagasc e que foi submetido à revista *Journal of Chromatography A*. O capítulo 2 corresponde ao artigo que descreve os estudos desenvolvidos junto ao Laboratório de Análise de Resíduos e Contaminantes – LARCO da FURG e que foi submetido à revista *Food Chemistry*. As normas adotadas para organização e formatação dos artigos são aquelas estabelecidas pelas revistas às quais foram submetidas.

Capítulo 1 – Artigo I

Título: Vibration extraction QuEChERS for analysis of antiparasitic agents in fish by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

Palavras-chave: *antiparasitic, fish, LC-MS/MS, dispersive-SPE, vibration extraction*

Autores: Lenise Guimarães de Oliveira, Mary Moloney, Abilasha Ramkumar, Márcia Helena Scherer Kurz, Fábio Ferreira Gonçalves, Osmar Damian Prestes, Martin Danaher

Capítulo 2 – Artigo II

Título: Development and validation of a method for the analysis of pyrethroid residues in fish using GC-MS

Palavras Chave: *pyrethroids; fish; GC-MS; dispersive-SPE; mixture design*

Autores: Lenise Guimarães de OLIVEIRA, Márcia Helena Scherer KURZ, Marlon Cezar Maciel GUIMARÃES, Manoel Leonardo MARTINS, Osmar Damian PRESTES, Renato ZANELLA, Joaquim Neves da Silva RIBEIRO and Fábio Ferreira GONÇALVES

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Produção e consumo de peixe

A produção global de pescado no ano de 2016 foi de aproximadamente 171 milhões de toneladas, movimentando cerca de 362 bilhões de dólares. A aquicultura corresponde a 47% do total produzido, movimentando 232 bilhões de dólares. Nos últimos seis anos a produção de peixe por captura vem se mantendo em torno de 90 milhões de toneladas/ano. No ano de 2016, cerca de 90% da produção global de pescado foi destinada ao consumo humano. O consumo, per capita, de pescado era de 9,0 kg em 1961, passando a 20,2 kg em 2015, o que representa um crescimento de 1,5% ao ano. Em 2016, este setor gerou cerca de 60 milhões de empregos, sendo 85% destes na Ásia, 10% na África e 4% na América Latina e Caribe (FAO, 2018a).

Segundo dados de 2012, a produção brasileira de pescado foi de aproximadamente um milhão de toneladas, 62% oriunda da pesca por captura e 38% da aquicultura. As regiões Nordeste (29%) e Sul (22%) foram responsáveis por cerca de metade da produção nacional. As principais espécies cultivadas na região Sul, Sudeste e Nordeste são carpa, tilápia, truta, camarão marinho e moluscos bivalves. Segundo o plano de desenvolvimento da aquicultura brasileira, a meta para 2020 é de atingir a produção de dois milhões de toneladas via aquicultura, sendo 87,5% correspondente a produção de peixes (MPA, 2015).

A aquicultura é um dos setores da produção de alimentos que mais cresce no mundo. Entretanto, o surto de doenças é considerado uma restrição para o desenvolvimento deste setor, causando grandes perdas econômicas por ano no mundo todo (KUMAR; ROY, 2017).

2.2 Controle de doenças em aquicultura

A fim de garantir a elevada produtividade, o uso de diversas substâncias tais como antimicrobianos, agrotóxicos, hormônios, anestésicos, vitaminas e minerais vem

sendo adotado em aquicultura para prevenir ou combater a ocorrência de doenças (KUMAR; ROY, 2017).

Na Europa, uma grande variedade de produtos químicos é utilizada na aquicultura marinha, sendo estes classificados como desinfetantes, agentes antivegetativos e medicamentos veterinários. Dentre os medicamentos veterinários utilizados na produção de peixes (incluindo truta, salmão e *sea bass*) estão os antibióticos, anestésicos, ectoparasiticidas e endoparasiticidas (COSTELLO, 2001).

O piolho do mar (*sea lice*) é o ectoparasita mais comum em aquicultura (COSTELLO, 2001). Estes ectoparasitas podem ocasionar lesões na pele do peixe, deixando-os vulneráveis a infecções. A suscetibilidade a ectoparasitas e a ocorrência de doenças na produção intensiva de salmão, por exemplo, ocasiona diminuição da produção e consequentes perdas econômicas (TUCCA *et al.*, 2014). A incidência pode ser maior em locais de criação de peixes em que a qualidade da água é baixa e o espaço físico é limitado (LANGFORD, 2014). Para evitar e combater surtos de doenças, ocasionados por piolhos do mar, um grande número de medicamentos veterinários é utilizado. Dentre elas estão: azametifós, peróxido de hidrogênio, ivermectina, emamectina, cipermetrina, deltametrina, teflubenzurom e diflubenzurom (COSTELLO, 2001).

Estes compostos diferem significativamente entre si no que diz respeito as suas propriedades físico-químicas, toxicidade e comportamento no meio ambiente. Além disso, a maioria destes compostos é indicada para uso em diferentes setores da produção de alimentos, além da aquicultura, como é o caso dos piretróides.

2.3 Propriedades físico-químicas, utilização e toxicidade dos compostos em estudo

2.3.1 Piretróides

Os primeiros piretróides usados para o controle de insetos foram as piretrinas naturais chamadas piretrina I e II, cinerina I e II e jasmolina I e II, produzidas naturalmente por espécies de crisântemos como a *Chrysanthemum cinerariaefolium*. As piretrinas não eram efetivas para uso em cultivo devido à rápida degradação pela ação da luz (ELLIOTT *et al.*, 1978). Em 1949, a aletrina foi o primeiro piretróide

sintético produzido. Este composto apresentou melhor ação quando comparado aos compostos naturais existentes e ao DDT (diclorodifeniltricloroetano). Os compostos resmetrina, bioresmetrina, tetrametrina e fenotrina, apesar de mais efetivos, ainda apresentavam instabilidade à luz. Permetrina e fenvalerato foram produzidos entre 1972 e 1973 e apresentaram melhor estabilidade à luz, sendo efetivas de 4 até 7 dias após aplicação. A partir de 1980, os piretróides bifentrina, cialotrina, ciflutrina, cipermetrina e deltametrina foram sintetizados. Estes são menos voláteis que os anteriores, são menos instáveis à luz e efetivos por mais de 10 dias após aplicação (BBSRC, 2018).

A estrutura básica das piretrinas é composta por um ciclopropano carboxílico ligado a um álcool aromático através de uma ligação éster, conforme demonstrado na Figura 1. A aletrina foi sintetizada com base nesta estrutura, entretanto a cadeia lateral de pentadienil foi substituída por uma porção isostérica para melhorar a estabilidade fotoquímica (piretróides do tipo I). Para melhorar a atividade inseticida, um grupo ciano foi adicionado à estrutura dos piretróides, como é possível observar na ciflutrina, acrinatrina, deltametrina, λ -cialotrina, entre outros (piretróides do tipo II). Fenvalerato e esfenvalerato não apresentam o ciclopropano em sua estrutura, entretanto o grupo ciano garante a atividade inseticida (ELLIOTT *et al.*, 1978). Desta forma, os piretróides foram sintetizados através de sucessivas substituições dentro da estrutura das piretrinas para conservar as propriedades estereoquímicas e físicas (SODERLUND *et al.*, 2002; SCHLEIER *et al.*, 2011).

Figura 1. Estrutura básica das piretrinas.

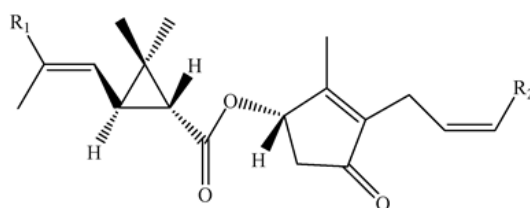
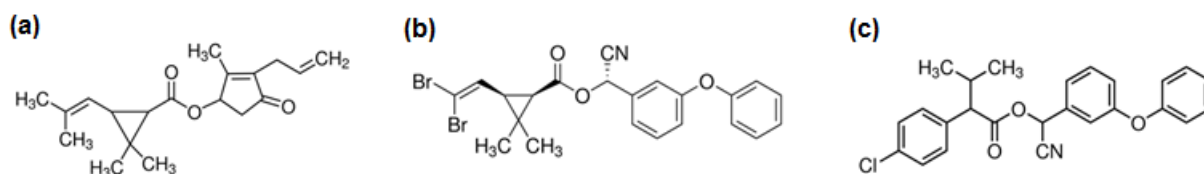


Figura 2. Estrutura da aletrina (a), deltametrina (b) e fenvalerato (c).



Os piretróides apresentam diversos grupos estruturais apresentando centros quirais em sua estrutura (de 2 a 3), e por isso, podem apresentar de 2 a 4 diastereoisômeros e 4 a 8 enantiômeros (BARR *et al.*, 2010). São voláteis e apresentam coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow}$) que varia de 5 a 8, portanto, são contaminantes orgânicos hidrofóbicos com baixa solubilidade em água (TUCK *et al.*, 2018; TUCCA *et al.*, 2014; ALONSO *et al.*, 2012; CORCELLAS *et al.*, 2012; FEO *et al.*, 2010). O mecanismo de ação das piretrinas e piretróides é complexo e torna-se ainda mais complicado quando utilizado associado aos organofosforados, já que estes inibem o metabolismo dos piretróides. Os maiores efeitos são observados pela inibição dos canais de sódio causando desordem nas células nervosas e musculares (BRADBERRY *et al.*, 2005).

Esses compostos são, provavelmente, o maior e mais amplo grupo de agrotóxicos utilizados atualmente (KAY; MACNEIL; WANG, 2016). Devido sua eficiência e versatilidade, são usados tanto como agrotóxicos quanto como medicamentos veterinários. No Brasil são autorizados para controle de insetos no cultivo de cebola, feijão, milho, laranja, mandioca, tomate, alface, arroz, batata, repolho, mamão, uva, banana, pepino, maçã e abobrinha (ANVISA, 2018). Também são autorizados para uso como antiparasitários na produção de bovinos, equinos, suínos, e peixes (PNCRC, 2018). São também usados como inseticidas no controle de doenças transmitidas por insetos, como malária, dengue, leishmaniose e tifo (ALONSO *et al.*, 2012), empregados em produtos de uso doméstico, produtos de jardinagem, produtos de cuidado pessoal (controle de piolhos), produtos de *Pet Shop* (shampoo anti-pulga, controle da sarna), entre outras aplicações (ANADÓN *et al.*, 2009; CORCELLAS *et al.*, 2015; CORCELLAS *et al.*, 2012).

Inicialmente considerava-se que os piretróides apresentavam uma baixa toxicidade porque seriam facilmente convertidos por hidrólise (em mamíferos) ou por metabolismo oxidativo (em peixes), em metabólitos não tóxicos, tais como ácido fenoxibenzóico (ALONSO *et al.*, 2012; CORCELLAS *et al.*, 2012). Entretanto, estudos indicam que piretróides são tóxicos aos peixes, tanto de água salgada quanto de água doce (ALONSO *et al.*, 2012; FEO *et al.*, 2010), e ocasionam efeitos adversos ao ambiente aquático em longo prazo (ZHAO, 2014). Organismos não-alvo como

crustáceos (camarão, caranguejo e lagosta) também são afetados (LANGFORD *et al.*, 2014; CORCELLAS *et al.*, 2012).

Estudos apontam que a baixa exposição de seres humanos e mamíferos a estes compostos pode ocasionar sintomas neurotóxicos, como tremores (ALBERT; POMBO-VILLAR, 1997). A exposição crônica pode desenvolver sintomas como dor de cabeça, náusea e tontura. A exposição em longo prazo também pode ocasionar danos no baço e gânglios linfáticos aumentando o risco de desenvolvimento de câncer. Alguns destes compostos podem apresentar toxicidade ao sistema imunológico (WU; MIAO, FAN, 2011) e endócrino (MNIF *et al.*, 2011). Segundo Koureas *et al.* (2012) a exposição à piretróides está associada com efeitos adversos ao sistema reprodutivo (KOUREAS *et al.*, 2012). Radwan *et al.* (2015) relacionou a presença de metabólitos de piretróides na urina de pacientes com a ocorrência de alteração cromossômica em espermatozóides (aneuploidia). A presença de metabólitos de piretróides também está associada ao aumento do risco de tumor no cérebro (CHEN *et al.*, 2016) e leucemia em crianças (DING *et al.*, 2012), além de problema cardíaco (HAN *et al.*, 2017).

2.3.2 Organofosforados

Os organofosforados são compostos sintéticos amplamente usados na produção agrícola, principalmente após a proibição dos organoclorados (SUN *et al.*, 2011; HE *et al.*, 2009). Azametifós é um organotiofosfato heterocíclico que age como inseticida com ação neurotóxica através da inibição da acetilcolinesterase (CANTY *et al.*, 2007). Apresenta log K_{ow} de 1,5 e baixa volatilidade (PPDB, 2018; PUBCHEM, 2018). Na agricultura, é usado no controle de pragas, e em medicina veterinária para o controle de doenças que ocorrem na piscicultura (piolhos do mar) (HE *et al.*, 2009; RAJENDRAN, 1994; NAYLOR *et al.*, 2000).

Azametifós apresenta risco baixo ou moderado devido à baixa persistência no ambiente aquático que é de 8,9 dias (tempo de meia vida) (SEPA, 1997; ERNST *et al.*, 2001). Segundo a Agência Europeia de Medicamentos, através do relatório EPMAR (do inglês, *European Public MRL Assessment Report*) (2012), foram observadas baixas concentrações dos resíduos de azametifós em músculo e pele de peixe após 1h da aplicação do tratamento. Segundo o relatório, este nível de contaminação não

apresenta risco à saúde humana. Apesar de não apresentar toxicidade aguda para organismos bivalves, foi letal para crustáceos (lagostas e camarão) quando estes foram expostos na concentração recomendada de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (BURRIDGE et al., 1999). A toxicidade de azametifós é dependente do estágio de vida dos organismos não-alvo (BURRIDGE et al., 2000).

2.3.3 Benzoiluréias

Diflubenzurom é um derivado da benzoilfenilureia e age como um potente inseticida interferindo na síntese da quitina e controlando insetos e crustáceos em estágios imaturos. Possui $\log K_{ow}$ de 3,6 e baixa solubilidade em água (PPDB, 2018; PubChem, 2018). Este composto é eficiente no controle dos ectoparasitas *Lernaea cyprinacea* e *Dolops carvalhoi* em peixes (MARTINS et al., 2004; SCHALCH et al. 2005). Por este motivo é usado na produção de pescado, inclusive no Brasil (LAGFORD et al., 2014; MABILIA; DE SOUZA, 2006; MADUENHO et al., 2008). Também é usado para o cultivo de cítricos, algodão, cogumelos, plantas ornamentais, árvores, bovinos e no controle de larvas de mosquitos em água parada (EPA, 1997). No Brasil, diflubenzurom é recomendado para o cultivo de laranja, tomate, milho, mandioca e arroz (PARA, 2018).

Estudos indicam que o diflubenzurom apresenta concentração letal (LC_{50}) para peixes de 127 mg L^{-1} considerando 96 h de exposição, o que caracteriza baixa toxicidade (EPA, 2009). Entretanto, o peixe pode acumular o diflubenzurom presente na água mais de 160 vezes (EISLER et al., 1992). Além disso, é degradado por hidrólise e por fotodegradação produzindo metabólitos tóxicos. Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (2009) (US EPA, do inglês *United States Environmental Protection Agency*) o metabólito 4-cloroanilina (PCA) apresenta maior toxicidade aos peixes, com LC_{50} variando de 2 a 23 mg L^{-1} . Os metabólitos 2,6-ácido diflubenzóico e 4-clorofenilurea apresentam toxicidade similar ao diflubenzurom (LC_{50} entre 70 e 100 mg L^{-1}). Conforme a EPA, não existem evidências de efeitos tóxicos por diflubenzurom em humanos, entretanto o metabólito PCA apresenta potencial efeito carcinogênico (EPA, 1997).

Em 2008, a Comissão Europeia incluiu o diflubenzurom na lista de produtos fitofarmacêuticos disponíveis no mercado. Segundo o Regulamento de Execução (UE) Nº 855 (2017), desde a inclusão, foi iniciado um estudo quanto à relevância toxicológica do metabólito PCA. Conforme o regulamento, devido às propriedades genotóxicas e cancerígenas da PCA e a ausência de um limite de exposição aceitável, a partir de 2017, o uso de diflubenzurom está autorizado apenas em culturas não comestíveis, evitando a exposição dos consumidores à PCA. Até o dado momento, não são monitorados resíduos de metabólitos de diflubenzurom.

2.4 Transporte e incidência dos resíduos e contaminantes no meio ambiente

Devido à administração variada e ao uso decorrente em diferentes setores o transporte global dos resíduos e contaminantes no meio ambiente é impossível de ser determinado e é dependente de diversos fatores, podendo ocorrer através de diversas formas (geralmente associadas). É um processo complexo em que resíduos são encontrados em regiões em que jamais foram aplicados (TANG *et al.*, 2018). Os ambientes aquáticos, por exemplo, podem ser contaminados por diversas vias, seja ela por deposição atmosférica, escoamento de rios, descargas de tratamento de águas, entre outros (ALONSO *et al.*, 2012; TANG *et al.*, 2018). Também pode ocorrer contaminação pela lixiviação dos compostos pela chuva e transporte através do solo atingindo águas subterrâneas além dos ambientes aquáticos (GONG, 2013).

A exposição dos peixes pode ocorrer devido à contaminação do ambiente aquático ou através de aplicação direta dos compostos, como no caso dos locais de cultivo de peixes (LANGFORD *et al.*, 2014). A absorção se dá através das guelras, devido ao caráter lipofílico dos compostos, pela alimentação ou através da cadeia alimentar (LANGFORD *et al.*, 2014; ALONSO *et al.*, 2012). Os piretróides deltametrina e cipermetrina são usados como tratamento tópico e são aplicados diretamente nos tanques de cultivo. Devido à forma de aplicação, os organismos não-alvo (na maioria crustáceos) também podem ser afetados (LANGFORD *et al.*, 2014). Mesmo sendo diluídos no ambiente aquático os mesmos tendem a ser absorvidos por partículas em suspensão ou a se depositar nos sedimentos. Devido suas características hidrofóbicas, pode ocorrer o aumento do tempo de meia vida de 5 dias para mais de 80 dias

(TUCCA *et al.*, 2014; ALONSO *et al.*, 2012; FEO *et al.*, 2010; HAYA *et al.*, 2005; LANGFORD *et al.*, 2014).

Azametifós também é indicado para uso tópico em peixes apesar de apresentar potencial toxicidade aos ecossistemas aquáticos e aos organismos não-alvo (DAVIES *et al.*, 2001). Diflubenzurom é administrado via ração sendo aplicado diretamente nos tanques de cultivo de peixes. Estima-se que cerca de 10% da dose administrada é absorvida pelo peixe e os 90% restantes são excretados. Além disso, cerca de 5 a 15% da ração administrada não é consumida, permanecendo no ambiente e contribuindo, inclusive, com a carga orgânica (CHEN; BEVERIDGE; TELFER, 1999; LANGFORD *et al.*, 2014).

A exposição dos seres humanos aos resíduos também pode se dar de diferentes formas sendo influenciada por diversos fatores. Esses fatores são inicialmente a idade do indivíduo e a sua localização, ou seja, se está próximo de regiões agrícolas ou de regiões urbanas onde estes produtos são aplicados para controle de pragas. Ela pode ocorrer através do consumo de alimentos contaminados, uso de inseticidas domésticos, entre outros (YE, *et al.*, 2015; DING, *et al.*, 2012).

O sucesso quanto ao uso de piretróides se dá devido à sua alta eficiência, fácil degradação e, portanto, baixa persistência no meio ambiente, que se estima ser entre 12 e 197 dias (HOU *et al.*, 2014; CORCELLAS *et al.*, 2012; FEO *et al.*, 2010). Entretanto, resíduos destes compostos estão sendo encontrados em amostras ambientais, tais como a água e sedimentos (FEO *et al.*, 2010), algas marinhas (GARCÍA-RODRIGUEZ *et al.*, 2012), alimentos de origem animal como carne bovina, carne de frango, ovos, peixe e leite (DALLEGRAVE, *et al.* 2016; CORCELLAS *et al.*, 2015), chás (HOU *et al.*, 2014), mamíferos (golfinhos) (ALONSO *et al.*, 2012) e em leite materno (CORCELLAS *et al.*, 2012).

Resíduos de piretróides foram encontrados em amostras de fígado, leite e placenta de mamíferos marinhos (golfinhos) da costa brasileira, próximo aos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul. Permetrina foi o composto mais encontrado dentre os piretróides analisados, contribuindo com 55% dos resultados. A concentração total de piretróides em amostras de fígado de golfinhos adultos e jovens foi de 7,05 e 68,4 ng g⁻¹, respectivamente. Nas amostras de leite e placenta foram encontradas

concentrações que variaram de 2,53 a 4,77 ng g⁻¹ e de 331 a 1812 ng g⁻¹, respectivamente (ALONSO *et al.*, 2012).

Corcellas *et al.* (2015) apresentaram estudos de bioacumulação de piretróides em peixes. As amostras foram coletadas em 4 bacias de rios, na Espanha, sendo que um dos pontos de coleta corresponde à água para abastecimento. Foram detectados piretróides em todas as amostras coletadas, em concentrações que variaram de 12 a 4938 ng g⁻¹, sendo as maiores concentrações observadas em amostra de truta coletada no reservatório (4938 ng g⁻¹) e de carpa (1508 ng g⁻¹).

Dallegrove *et al.* (2016) desenvolveu método para determinação de resíduos de 17 piretróides em gordura de alimentos de origem animal, sendo eles carne bovina, carne de frango, ovos, peixe e leite. As amostras foram fornecidas pelo Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul (LANAGRO-RS) e foram coletadas aleatoriamente por fiscais federais em empresas registradas no Ministério da Agricultura e controladas pelo Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC). Todas as amostras foram positivas para ao menos um dos piretróides analisados com fração mássica variando entre 0,03 e 74,2 ng g⁻¹ de gordura animal. Nas amostras de peixes foram encontrados resíduos de bifentrina, cialotrina e cipermetrina com concentrações variando de 0,4 a 26,1 ng g⁻¹.

Conforme estudo descrito por Langford *et al.* (2014), amostras ambientais de peixes e de crustáceos foram coletadas em regiões próximas a cinco aquiculturas localizadas na Costa da Noruega. O objetivo deste estudo foi verificar o impacto ocasionado no ambiente marinho e no cultivo de camarão e bacalhau devido ao tratamento para piolhos do mar. A concentração de diflubenzurom em amostras de sedimento e água oriundas de dois pontos de coleta variou de 5,9 a 136,6 ng g⁻¹ e de 13,1 a 295,2 ng L⁻¹, respectivamente. As amostras de camarão e mexilhão azul oriundas de um dos pontos de coleta apresentaram concentrações que variaram de 0,5 a 10 ng g⁻¹ e 2,7 a 22 ng g⁻¹, respectivamente. As maiores concentrações foram observadas nas amostras de caranguejo variando entre 180,9 a 537,9 ng g⁻¹. Não foram encontrados resíduos de diflubenzurom em amostras de bacalhau (LANGFORD *et al.*, 2014).

A presença destes resíduos em amostras de peixes confirma a necessidade de estabelecer e monitorar os LMR através de programas de monitoramento, a fim de garantir a segurança alimentar e proteger a saúde do consumidor.

2.5 Limites máximos de resíduos para amostras de peixes

Limite máximo de resíduo é definido como a concentração máxima de resíduo que não causaria risco à saúde humana, considerando a Ingestão Diária Aceitável (IDA) do composto (PASCHOAL et al., 2008).

Atualmente, no Brasil, existem dois programas atuando no monitoramento de resíduos e contaminantes em alimentos: o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), coordenado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), coordenado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (MAPA, 2018; ANVISA, 2018).

O PNCRC monitora a presença e os níveis de resíduos e contaminantes de produtos de uso veterinário, agrotóxicos ou afins e de contaminantes químicos (aflatoxinas, metais pesados, contaminantes inorgânicos, entre outros), potencialmente nocivos à saúde do consumidor em alimentos de origem animal e vegetal (MAPA, 2018). O programa PARA tem como objetivo avaliar continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal disponíveis ao consumidor (ANVISA, 2018). O principal objetivo destes programas consiste em verificar a qualidade, segurança e inocuidade dos alimentos, tanto de origem vegetal quanto de origem animal, disponíveis ao consumidor, para que sejam, inclusive, equivalentes aos requisitos sanitários estabelecidos internacionalmente pelo Mercado Comum do Sul (MERCOSUL), CODEX Alimentarius, Organização Mundial do Comércio (OMC) e órgãos auxiliares como a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE) e Organização Mundial da Saúde (WHO) (ANVISA, 2018; MAPA, 2018).

Os programas de monitoramento brasileiros publicam a programação de análises que serão realizadas e os LMR dos diversos compostos que serão monitorados bem como os resultados das análises realizadas no ano anterior (ANVISA, 2018; MAPA, 2018). Conforme o PNCRC através da Instrução Normativa nº 20 (2018),

quarenta e cinco amostras de pescado de cultivo (músculo) foram analisadas para monitoramento dos resíduos de aletrina, bifentrina, ciflutrina, cipermetrina, deltametrina, diflubenzurom, fempropatrina, fentoato, fenvalerato, lambda cialotrina, permetrina e prometrina considerando um LMR de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, exceto para deltametrina (30 $\mu\text{g kg}^{-1}$), no ano de 2018.

A Comunidade Européia possui limites estabelecidos conforme o Regulamento nº 37 (2010) e monitora os resíduos de cipermetrina (50 $\mu\text{g kg}^{-1}$) para peixes da família *salmonidae*, e deltametrina (10 $\mu\text{g kg}^{-1}$) em músculo e pele de peixes em proporção natural. Diflubenzurom apresentava limite estabelecido de 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para peixes da família *salmonidae* (REGULAMENTO, 2010). Porém, conforme Regulamento de Execução (UE) Nº 855 (2017), não é mais permitido o uso deste composto em produtos para consumo devido ao metabólito tóxico 4-cloroanilina. Por este motivo, o Comitê para Medicamentos de Uso Veterinário (CVMP, do inglês *Committee for Medicinal Products for Veterinary Use*) (2018) sugeriu a alteração do LMR de diflubenzurom do Regulamento nº 37 (2010) para 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Para que os limites estabelecidos sejam monitorados pelos programas de monitoramento é necessário que estejam disponíveis metodologias analíticas capazes de: detectar baixas concentrações (considerando o LMR de cada composto) em matrizes complexas, analisar um grande número de amostras de rotina simultaneamente e ser compatível com os equipamentos disponíveis a um custo adequado. Neste sentido, um grande número de métodos vem sendo desenvolvidos para suprir esta demanda crescente (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

2.6 Métodos de preparo de amostra para determinação de resíduos

2.6.1 Extração e *clean-up*

O desenvolvimento do procedimento de preparo de amostra é etapa crucial em um processo de desenvolvimento de um método analítico (KINSELLA et al., 2009; BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015). Segundo Kinsella *et al.* (2009), o preparo da amostra corresponde ao processo de extração dos resíduos químicos presentes em uma amostra e a subsequente purificação do extrato, a fim de isolar os resíduos de interesse e remover os interferentes da matriz que podem afetar os sistemas de

detecção. Portanto, os objetivos de um método de preparo de amostra são: isolar os compostos de interesse (na etapa de extração) e remover os interferentes presentes na matriz (na etapa de *clean-up*) (PRESTES *et al.*, 2013).

Os diferentes processos realizados durante a extração dos resíduos podem afetar a estabilidade dos analitos e a eficiência do procedimento de extração. A escolha do melhor procedimento de *clean-up* é etapa crucial no desenvolvimento de um método de preparo de amostras, pois, além de reduzir interferentes da matriz, evita a contaminação dos equipamentos de detecção tornando o método mais sensível e robusto (SANTE, 2017).

Inúmeros métodos de preparo de amostras para determinação de resíduos em diversas matrizes usando sistemas de detecção por espectrometria de massas estão disponíveis na literatura. Dentre eles estão: extração líquido-líquido, QuEChERS (do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*), MSPD (do inglês, *matrix solid-phase dispersion*), SPE (do inglês, *solid phase extraction*), SPME (do inglês, *solid-phase microextraction*), PLE (do inglês, *pressurized-liquid extraction*), MAE (do inglês, *microwave-assisted extraction*), DLLME (do inglês, *dispersive liquid-liquid microextraction*), SFE (do inglês, *supercritical fluid extraction*), dentre outros (LAMBROPOULOU; ALBANIS, 2007; KINSELLA *et al.*, 2009; BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

O método de dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) pode ser vantajoso para determinação de resíduos, pois permite a extração dos analitos e a execução do *clean-up* em uma única etapa (KINSELLA *et al.*, 2009). Esta técnica consiste, basicamente, em misturar a amostra com um suporte sólido até completa homogeneização, transferir a mistura para uma coluna e eluir os analitos com solvente orgânico (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

Na etapa de extração por MSPD a mistura amostra-suporte é homogeneizada com auxílio de pistilo e almofariz de vidro (KINSELLA *et al.*, 2009). A mistura é então empacotada em coluna de vidro ou de polietileno contendo lã de vidro ou papel-filtro. Caso seja necessário realizar uma maior limpeza do extrato, um sorvente pode ser adicionado à coluna MSPD (co-coluna). O eluente (solvente orgânico) é adicionado com o objetivo de solubilizar os analitos retirando-os da coluna. Após eluição, o extrato

pode ser submetido à etapa de concentração e injetado no sistema cromatográfico. O tempo total para o preparo de uma amostra é de aproximadamente 40 min (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

Para garantir a eficiência da MSPD alguns parâmetros devem ser definidos, dentre eles: a) escolha e quantidade de suporte sólido dispersante, b) homogeneização, c) escolha e quantidade de adsorvente para co-coluna, d) escolha e volume do solvente de eluição (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

A escolha do suporte sólido e do solvente de eluição adequados é fundamental para que a técnica seja eficiente e seletiva. Dentre os suportes mais utilizados estão: C₁₈, sílica, alumina, cianopropil e florisil. A quantidade do suporte varia de acordo com a quantidade e característica física da amostra (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015). Geralmente a proporção amostra-suporte varia de 1:1 a 1:4 (KINSELLA *et al.*, 2009). Para amostras que contêm alto teor de água também é recomendado o uso de sais secantes, como sulfato de sódio anidro ou sílica (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

Para a homogeneização da amostra deve ser estabelecido o tempo de contato da mistura amostra-suporte e a intensidade de homogeneização. No caso de existir a necessidade da adição de um adsorvente (co-coluna), o mesmo pode ser escolhido com base nas análises cromatográficas ou optando por um adsorvente com polaridade diferente daquele utilizado como suporte sólido (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

A escolha do solvente de eluição deve estar baseada nas características dos analitos presentes na amostra, principalmente com relação à polaridade, além de serem compatíveis com o sistema de detecção. N-hexano, acetato de etila, acetonitrila, metanol, diclorometano e acetona são alguns dos solventes utilizados. Esta técnica permite que dois ou mais solventes possam ser eluídos em sequência. O volume de eluição é dependente de vários fatores, como solubilidade e concentração do analito, da amostra e do dispersante, forças de interação entre analito e a matriz-suporte, presença de co-coluna, dentre outros. Entretanto, a utilização de menores quantidades de solvente é preferida (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

Apesar de apresentar importantes vantagens como, por exemplo: realizar extração e *clean-up* em uma única etapa, ser aplicável para diversos tipos de resíduos, não necessitar de etapa de precipitação de proteínas e de centrifugação, esta técnica não é muito aplicada em análises de rotina em programas de monitoramento de resíduos (LAMBROPOULOU; ALBANIS, 2007; KINSELLA et al., 2009).

Outro método muito utilizado para determinação de diferentes resíduos em diferentes matrizes é o método QuEChERS. Por definição, QuEChERS (do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) é um método rápido, fácil de ser executado, barato, efetivo, robusto e seguro. É um método versátil e que possibilita a determinação de várias amostras em um mesmo lote de análises, bem como o uso subsequente de diferentes técnicas de detecção (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015). Foi desenvolvido por Anastassiades *et al.* (2003) e consiste basicamente em três etapas: extração, partição e *clean-up*.

Na etapa de extração do método QuEChERS original são usados 10 g de amostra e 10 mL de acetonitrila (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). A acetonitrila é um solvente que apresenta como principais vantagens a extração de compostos com diferentes polaridades e a extração de menor quantidade de coextrativos presentes naturalmente nas amostras como, gorduras e pigmentos (LEHOTAY et al., 2001).

A etapa de partição do método QuEChERS original é realizada através de adição de sais (1 g de NaCl e 4 g de MgSO₄). Estes promovem o efeito *salting out*, diminuindo a solubilidade dos compostos polares na fase aquosa e a quantidade de água na fase orgânica. O sal secante (MgSO₄) promove, ainda, a remoção de água através de processo exotérmico (40 a 45 °C). O aumento da temperatura auxilia na extração, principalmente de compostos apolares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009).

O *clean-up* das amostras é realizado através da extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês *dispersive solid phase extraction*). A d-SPE consiste basicamente em: 1) adição de sorvente (ou sorventes) e sal secante (MgSO₄) ao extrato obtido após os procedimentos de extração e partição, 2) agitação da amostra para completa homogeneização e 3) centrifugação para separação do extrato. A proporção entre o sorvente e o sal secante com relação ao volume de extrato usado no

método QuEChERS original foi de 25 mg de PSA e 150 mg de $MgSO_4$ para cada 1 mL de extrato (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

A d-SPE apresenta como principais vantagens o baixo custo, quando comparado às técnicas tradicionais disponíveis, e versatilidade, permitindo a utilização de diferentes sorventes em diferentes combinações e quantidades (PRESTES *et al.*, 2013; CABRERA *et al.*, 2012), além de ser um procedimento rápido e fácil de ser aplicado em métodos de rotina.

Uma alternativa interessante e viável de *clean-up* admitida pelo método QuEChERS consiste na limpeza do extrato através do congelamento da amostra à baixa temperatura. O congelamento do extrato reduz consideravelmente a presença de coextrativos lipídicos e outros compostos que apresentam baixa solubilidade em acetonitrila através de precipitação (QuEChERS, 2018a).

A agitação das amostras no método QuEChERS pode ser realizada manualmente ou usando disruptor, turrax, blender, entre outros. As separações matriz/extrato ou sorvente/extrato são realizadas através de centrifugação. O uso de medidores auxilia no preparo das porções de sais e sorventes utilizados na execução do método (QuEChERS, 2018b). A utilização dos recursos acima citados permite que o método QuEChERS seja facilmente executado na maioria dos laboratórios, inclusive aqueles com poucos recursos.

Nos casos em que se faz necessário atingir baixos limites de detecção dos compostos, a etapa de concentração da amostra através de evaporação do extrato também pode ser aplicada (PRESTES *et al.*, 2013), consistindo um dos métodos mais comuns descritos na literatura. A evaporação dos extratos pode ocasionar precipitação dos componentes da matriz e, em alguns casos, dos próprios compostos. Por este motivo, as temperaturas utilizadas devem ser as mais baixas possíveis. O uso de gás nitrogênio deve ser preferido ao uso de ar comprimido para evitar mecanismos oxidativos e introdução de água ou contaminantes no sistema (SANTE, 2017).

Para determinação de piretróides em alimentos de origem animal, a escolha do método de preparo de amostras geralmente está baseada nas características da matriz (LEDOUX, 2011). Os métodos de preparo de amostras em gordura animal geralmente envolvem extração líquido-líquido, extração por soxhlet, através do derretimento da

amostra para coleta e análise da gordura líquida (TUCK *et al.*, 2018), além de dispersão da matriz em fase sólida (MOLONEY *et al.*, 2018). As amostras de tecidos (rim, fígado e músculo) geralmente são extraídas usando solvente orgânico e dispersão por vortex, blender ou agitação manual. Para leite a utilização de extração líquido-líquido é a mais comum, entretanto outras técnicas como a dispersão da matriz sólida e QuEChERS também são utilizadas com o objetivo de facilitar a precipitação de proteínas presentes na matriz. Novos métodos, como por exemplo, microextração magnética por líquido iônico duplamente ligado (IL-DMME, do inglês, *ionic liquid-linked dual magnetic micro-extraction*) e microextração em fase sólida (SPME, do inglês, *solid phase microextraction*), também foram empregados para determinação destes compostos em diferentes matrizes (TUCK *et al.*, 2018). Portanto, conhecer a matriz de estudo também é um parâmetro importante a ser observado, pois determinará o melhor método de preparo de amostras a ser empregado.

2.6.2 Características das matrizes em estudo

Efeitos de matriz causados por constituintes naturais presentes nas amostras são muito frequentes e podem ocasionar supressão ou ganho de sinal nas respostas dos sistemas de detecção. A técnica de *clean-up*, por exemplo, deve ser desenvolvida considerando as características físico-químicas dos analitos (polaridade, solubilidade, entre outros) e dos componentes da matriz (teor de água, gordura, proteínas, pigmentos, entre outros) (SANTE, 2017).

A composição da matriz de diferentes espécies de peixes pode variar significativamente e é dependente de fatores como: espécie, idade, peso, habitat, tipo de alimentação, época da captura, entre outros. De uma forma geral, a composição dos peixes apresenta cerca de 60 a 90% de água, 8 a 23% de proteína e 0,5 a 25% de lipídios (ANDRADE; BISPO; DRUZIAN *et al.*, 2009).

A traíra (*Hoplias malabaricus*) é um peixe carnívoro de água doce. Habita águas paradas e se reproduz em água quente. Sua composição centesimal varia consideravelmente de acordo com o tipo de alimentação e idade. A traíra adulta apresenta aproximadamente 79% de água, 15% de proteína e 5% de lipídios (TORRES *et al.*, 2012).

A tilápia é um dos peixes mais cultivados no mundo e inclusive no Brasil, onde se adaptou facilmente em águas doces (açudes) (VILA NOVA; GODOY; ALDRIGUE, 2005). A composição centesimal de filés de tilápia é de cerca de 78% de água, 20% de proteína e 1,7% de lipídios (USDA, 2018a).

A tainha é encontrada em ambiente marinho, estuários e lagunas. Alimenta-se de detritos e de matéria orgânica, pois são herbívoras (OKAMOTO; SAMPAIO; MAÇADA, 2006). A tainha apresenta teor de água de aproximadamente 76%, 20% de proteína e 4% de lipídios (ANDRADE; BISPO; DRUZIAN, 2009).

O *seabass* (*Dicentrarchus labrax*) foi a primeira espécie marinha não pertencente à espécie *Salmonidae* a ser cultivada e comercializada na Europa. Atualmente tem relevante importância comercial na região Mediterrânea, sendo produzida na Grécia, Turquia, Itália, Espanha, Croácia e Egito (FAO, 2018b). Esta espécie de peixe apresenta na sua composição centesimal aproximadamente 78% de água, 18% de proteína e apenas 2% de lipídios (USDA, 2018b).

Salmão e truta são peixes da família *Salmonidae*. A produção de truta tem crescido exponencialmente desde 1950, especialmente na Europa e recentemente no Chile (FAO, 2018c). Mais de 90% do salmão disponível no mercado atualmente é cultivado. Dentre os maiores produtores encontram-se o Chile e alguns países da Europa (FAO, 2018d). Apesar de apresentarem teores semelhantes de água (70%) e de proteínas (20%), o salmão apresenta teor de lipídios (6%) superior à truta (3%) (USDA, 2018c; USDA, 2018d). Além disso, ambos apresentam os corantes astaxantina e cantaxantina adicionados nas rações para garantir o critério de qualidade referente à cor exigido pelo consumidor (FOLKESTAD *et al.*, 2008; BUTTLE *et al.*, 2001).

Esses interferentes presentes naturalmente na matriz podem ser removidos, total ou parcialmente, na etapa de *clean up*. Atualmente, um grande número de sorventes está disponível comercialmente para esse fim.

2.6.3 Características e escolha dos sorventes pra remoção de interferentes da matriz

A escolha do sorvente usado para o *clean-up* das amostras está diretamente relacionada com as características da matriz e dos compostos a serem analisados (CABRERA *et al.*, 2012).

A amina primária e secundária (PSA, do inglês *primary secondary amine*) possui uma estrutura bidentada composta por grupos amino primário e secundário. Esses grupos agem através de troca iônica, pontes de hidrogênio ou interações dipolo-dipolo. Desta forma o sorvente PSA apresenta elevado efeito quelante, capaz de reter ácidos graxos livres, ácidos orgânicos, açúcares, e outros compostos polares como pigmentos (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015; KURZ *et al.*, 2018). O PSA foi o sorvente usado no método QuEChERS original e a associação do mesmo com outros sorventes também foi sugerida através das modificações do método (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

O octadecilsilano (C_{18}) remove com elevada eficiência compostos apolares, como substâncias graxas e lipídios, sendo recomendado para matrizes que apresentam teor de gordura superior a 2% (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015; KINSELA *et al.*, 2009). A interação entre os compostos apolares e o sorvente se dá através de forças de Van der Waals (CHROMACADEMY, 2018). A utilização de C_{18} ou a combinação C_{18} /PSA pode ser usada para tornar o método mais efetivo na remoção de gordura (KINSELA *et al.*, 2009).

O Celite 545 é um sorvente de baixo custo, quando comparado ao C_{18} e PSA. É indicado para remoção de gordura, proteínas e fosfolipídios (OLIVEIRA *et al.*, 2017). O celite é um produto obtido de diatomáceas (terra diatomácea) composto por dióxido de silício (cerca de 87 a 91%), alumina e óxido férrico. Apresenta grande área superficial, elevada porosidade e baixa densidade. Possui fraca capacidade de adsorção apesar de excelente poder de absorção, devido sua estrutura macro porosa (AL-DEGS *et al.*, 2001; TSAI *et al.*, 2006).

O sorvente florisil (silicato de magnésio ativado) é capaz de reter lipídios não polares, corantes, aminas, hidroxilas e carbonilas através de mecanismos polares de interação como pontes de hidrogênio, dipolo-dipolo e interações não covalentes envolvendo sistemas pi (KURZ *et al.*, 2018; CARRO *et al.*, 2017).

O sorvente SiTi consiste em sílica de alta pureza dopada com titânio e apresenta retenção seletiva de fosfolipídios. A sílica dopada apresenta melhor estabilidade química e robustez quando comparada a sílicas convencionais ou materiais híbridos de sílica (onde o metal é ligado à sílica pura). Por este motivo, tem sido usada para o

preparo de amostras biológicas em etapa anterior à análise por cromatografia líquida. Já o sorvente SiTi 4% C₁₈ apresenta 4% de C₁₈ em sua formulação e demonstrou melhores resultados na remoção de interferentes presentes em fígado de ovinos na análise de anti-helmínticos quando comparado ao C₁₈ (GLANTREO, 2018).

O sorvente Z-Sep consiste em uma mistura entre dois sorventes: sílica revestida com dióxido de zircônio (ZrO₂) e C₁₈, na proporção de 2:5. Por outro lado, o Z-Sep Plus (Z-Sep+) consiste em C₁₈ e ZrO₂ conectados na mesma partícula de sílica. O C₁₈ retém lipídios através de interação hidrofílica enquanto que a zircônia age como um ácido de Lewis, atraindo compostos com grupos doadores de elétrons. Ambos são recomendados para remoção de lipídios, fosfolipídios, pigmentos e proteínas (MORENO-GONZÁLEZ *et al.*, 2014; RAJSKI *et al.*, 2013).

A escolha e a quantidade de um sorvente ou de uma mistura de sorventes a serem usados em um procedimento de preparo de amostras devem ser definidas durante o desenvolvimento e otimização do método. Na d-SPE, por exemplo, é possível combinar diferentes sorventes para suprir as necessidades exigidas pelo tipo de matriz, de analitos e de equipamento utilizado. Neste contexto, o uso de planejamento de experimentos é uma ferramenta que pode auxiliar no processo de otimização do método (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

2.7 Planejamento de experimentos

A otimização do procedimento de preparo de amostras é etapa crucial no desenvolvimento de um método analítico para a obtenção de resultados confiáveis e ótimos. O resultado ótimo é a resposta que se deseja atingir usando o planejamento de experimentos (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015). No caso de um procedimento de extração, por exemplo, um resultado ótimo poderia ser a faixa de recuperação desejável (70 – 120%), quantidade de interferentes removidos, intensidade do sinal do equipamento para um dado composto, entre outros.

A otimização de um método ou procedimento geralmente é realizada por tentativa e erro ou por otimização univariada. No método de tentativa e erro as diferentes condições são testadas aleatoriamente até que se obtenha o resultado ótimo. Na otimização univariada, uma variável é testada enquanto que as demais são mantidas constantes. Estes tipos de otimização geralmente exigem um grande número

de experimentos e não fornece informações quanto à interação entre as diferentes variáveis otimizadas (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

A otimização multivariada permite a realização de um conjunto de experimentos considerando mais de uma variável e diferentes combinações de níveis. Desta forma é possível conhecer o sistema de forma mais abrangente, pois as variáveis são alteradas simultaneamente e em um menor número de experimentos (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

Esta ferramenta estatística pode servir como método de triagem, ou seja, para selecionar quais variáveis são significativas ou relevantes para a obtenção do resultado ótimo. Também pode ser usada para uma otimização mais aprofundada, neste caso compreenderia a escolha dos níveis ou limites usados considerando as possibilidades experimentais (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

O modelamento de misturas é um planejamento experimental que pode ser usado para misturas com vários componentes, mas é muito eficiente para sistemas compostos por três componentes (FERREIRA *et al.*, 2007). Este modelo é importante uma vez que permite a validação de modelo linear, quadrático e especial cúbico. O modelo especial cúbico apresenta 7 termos, conforme demonstrado na Equação 1 abaixo:

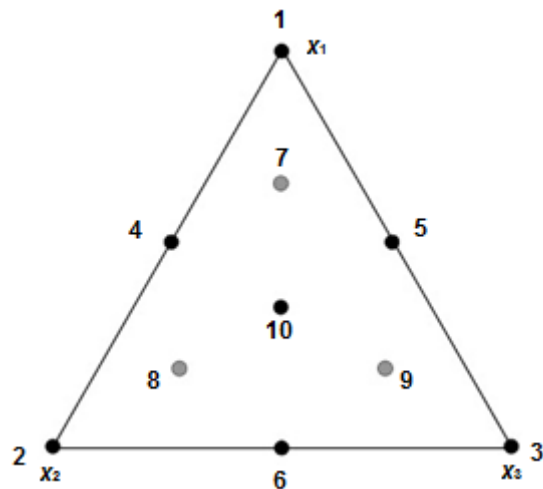
$$\text{Equação 1 } \hat{y} = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3$$

Onde x representa o componente e b é a resposta obtida pelo componente puro, ou pela interação de dois ou dos três componentes.

Os primeiros três termos representam o modelo linear, que demonstra a interação de cada componente sem observar os efeitos de interação entre os mesmos. Os três termos seguintes correspondem aos efeitos de interações entre dois componentes (sinergismo ou antagonismo) que somados aos termos lineares correspondem ao modelo quadrático. O último termo da equação é correspondente aos efeitos de interações dos três componentes da mistura (FERREIRA *et al.*, 2007).

Este modelo é explicado considerando a estrutura de um triângulo composto por 10 pontos (equivalente a 10 experimentos), conforme demonstrado na Figura 3.

Figura 3. Estrutura em triângulo usada para modelamento de misturas para três componentes (x_1 , x_2 e x_3).



Adaptado de: FERREIRA *et al.*, 2007

Cada vértice do triângulo corresponde ao componente puro ou a uma mistura de componentes. Em alguns casos, não é interessante ou é impossível investigar o componente puro, ou seja, investigar o efeito de um componente na ausência de outros dois (em casos de mistura ternária). Nestes casos é preciso determinar, por exemplo, a quantidade mínima e máxima a ser utilizada para cada componente estudado. A quantidade mínima será codificada na matriz de planejamento como 0 e a quantidade máxima como 1, conforme observado na Tabela 1. Os experimentos 1, 2 e 3 (apresentados na Tabela 1), correspondem aos três pontos localizados em cada vértice do triângulo (conforme demonstrado na Figura 3), e, portanto, à utilização de quantidade máxima de um dos componentes e as quantidades mínimas dos outros dois (FERREIRA *et al.*, 2007).

Já os experimentos 4, 5 e 6 correspondem aos pontos localizados entre cada vértice do triângulo. Nestes experimentos é utilizada a combinação de dois componentes em quantidades correspondentes à metade da quantidade de sorvente, codificadas na matriz experimental como 1/2, e a quantidade mínima do terceiro componente, codificada como 0 (FERREIRA *et al.*, 2007).

Tabela 1. Matriz experimental codificada para planejamento de misturas para três compostos.

Experimento	x_1	x_2	x_3
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	1/2	1/2	0
5	1/2	0	1/2
6	0	1/2	1/2
7	2/3	1/6	1/6
8	1/6	2/3	1/6
9	1/6	1/6	2/3
10	1/3	1/3	1/3

Os experimentos 7, 8 e 9 são realizados através da combinação de 2/3 de um componente e 1/6 de outros dois, e correspondem aos pontos axiais do triângulo (ilustrados em cinza). Já o ponto central do triângulo consiste na combinação de 1/3 de cada componente e corresponde ao experimento 10 da matriz de planejamento (FERREIRA *et al.*, 2007).

A significância de um modelo, seja ele qual for, deve ser avaliada através da análise de variância (ANOVA). O coeficiente de determinação (R^2) e a análise por teste-F, considerando um dado nível de confiança, devem ser avaliados. Os componentes e os efeitos de interações entre os mesmos só são considerados significativos quando os valores de p forem inferiores a 0,05, no caso do nível de significância ser 95% (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

2.8 Análise cromatográfica acoplada à espectrometria de massas para determinação de resíduos

A cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*) e a cromatografia gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*), acopladas a sistemas de detecção como

o arranjo de diodos (DAD, *diode array detector*) ou por captura de elétrons (ECD, *electron capture detection*), são menos utilizadas para análises de resíduos devido as suas limitações. Estas técnicas não permitem a identificação inequívoca dos analitos e por este motivo devem ser usadas em conjunto com sistemas de detecção mais específicos (SANTE, 2017).

Os sistemas de LC e GC acoplados à espectrometria de massas permitem a determinação de inúmeros compostos concomitantemente, com incremento na seletividade e sensibilidade quando comparados aos demais sistemas de detecção. A eficiência analítica, elevada robustez e menor tempo para desenvolvimento de métodos tornam estes sistemas vantajosos apesar do alto custo de aquisição e manutenção (PRESTES *et al.*, 2009).

Os analitos altamente polares, de alto ponto de ebulição e com vários substituintes em sua estrutura, tendem a responder melhor na LC com fase reversa devido a sua solubilidade em fases móveis aquosas assim como por sua interação com as fases estacionárias mais utilizadas, tais como C₁₈ e C₈, levando a maior eficiência e resoluções cromatográficas. Por outro lado, analitos com menor ponto de ebulição e apolares, são facilmente transferidos para coluna cromatográfica após volatilização no injetor de um cromatógrafo a gás. Com isso, o emprego de aquecimento controlado levará a alta eficiência e resolução cromatográfica, permitindo a separação de centenas de analitos em única corrida (CHIARADIA *et al.*, 2008).

A identificação e quantificação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos geralmente são realizadas usando a GC e LC, acopladas a espectrômetros de massas (SANTE, 2017). Entretanto, a GC exige procedimentos de preparo de amostra mais complexos para proteger a vida útil das colunas cromatográficas, bem como a manutenção da fonte (TUCK, *et al.*, 2018).

Diferentes sistemas de detecção por espectrometria de massas podem ser utilizados, como os sistemas com um quadrupolo (MS, do inglês *mass spectrometer*), triplo quadrupolo (MS/MS), *ion trap*, por tempo de voo ou *orbitrap*. Diferentes tipos de técnicas de ionização também são admitidos como a ionização por impacto de elétrons (EI, do inglês *electron ionization*), ionização química (CI, do inglês *chemical ionization*), APCI (do inglês, *atmospheric pressure chemical ionization*) ou ESI (do inglês,

electrospray ionization). Diferentes sistemas de aquisição como o modo *full scan*, monitoramento seletivo de íons (SIM, do inglês *selected ion monitoring*) e monitoramento seletivo de reações (SRM, do inglês *selected reacton monitoring*) também podem ser usados (SANTE, 2017). A escolha do melhor procedimento para preparo das amostras e do sistema de detecção para análise de resíduos em matrizes complexas determinará a eficiência do método analítico.

2.9 Métodos empregados na determinação dos compostos em estudo em tecidos de peixes

A separação dos resíduos presentes nos alimentos de origem animal é dificultada devido à complexidade de matrizes biológicas, e particularmente, devido à presença de lipídios (WANG *et al.*, 2011; LEDOUX, 2011). Diferentes técnicas de preparo de amostra são utilizadas com o objetivo de obter elevada recuperação para a maioria dos compostos e serem compatíveis aos sistemas de detecção escolhidos, proporcionando bons resultados de validação dos métodos. A Tabela 2 apresenta alguns dos métodos disponíveis na literatura considerando as técnicas de preparo de amostras, os sistemas de detecção utilizados e os resultados de validação para determinação de piretrinas, piretróides, benzoiluréis e organofosforados em tecidos de peixes.

A GC é a técnica mais usada para análise de piretrinas e piretróides, pois estas substâncias são facilmente volatilizadas permitindo a análise direta, sem a necessidade de derivatização (TUCK, *et al.*, 2018). Os piretróides que apresentam grupos nitrila ou halogênios na sua estrutura podem ser analisados pela técnica de detecção ECD, proporcionando sensibilidade ao método. Entretanto, baixa sensibilidade é observada para aqueles compostos como a fenotrina, resmetrina e tetrametrina, pois não apresentam grupo nitrila ou o halogênio em suas estruturas (TUCK, *et al.*, 2018).

A utilização de GC acoplado a detectores por espectrometria de massas é o sistema mais utilizado para a análise de piretróides em diversas matrizes, pois permite a detecção dos resíduos em matrizes complexas e em baixas concentrações. A ionização por impacto de elétrons (EI) é a técnica de ionização geralmente usada nestes casos, devido a sua ampla aplicação em diversas classes de resíduos (TUCK, *et al.*, 2018).

Tabela 2. Métodos analíticos descritos para determinação de piretróides, piretrinas, benzoiluréias e organofosforados em tecidos de peixes e alimentos com alto teor de gordura.

Analitos (classe)	Matriz	Extração	Clean-up (sorvente)	Deteccção	Recuperação	Limites	Referência
14 (PIR)	Alimentos	QuEChERS acetato	d-SPE	UPLC-MS/MS	70 – 120%	LOQ - 10 µg kg ⁻¹	(CHUNG; LAM, 2012)
6 (PIRs)	(frutos do mar)	modificado	Amostras > 2% gordura – PSA e C ₁₈				
1 (BENZ)			Amostras < 2% de gordura e incolor – PSA				
			Amostras < 2% de gordura e coloridas (carotenóides ou clorofila) – PSA e GCB				
6 (PIR)	Peixe	QuEChERS modificado Isopropanol:Água (80:20, v/v)	d-SPE PSA	GC-ECD	81,1 – 108%	LOD – 8 a 14 µg kg ⁻¹ LOQ – não foi citado	(JIA <i>et al.</i> , 2012)
2 (PIR)	Peixes	QuEChERS acetato	d-SPE	GC-MS	70 – 115% (salmão)	LOD – menor que 1 ng g ⁻¹ (salmão)	(RAWN; JUDGE; ROSCOE, 2010)
6 (PIRs)	(12 tipos, incluindo tilápia, truta e salmão)	modificado	C ₁₈ e PSA			LOQ – 3,85 a 4,13 ng g ⁻¹ (salmão)	
Multi	Peixes (jundiá,	QuEChERS acetato	d-SPE	GC-MS/MS	73,6 a 98,9%	LOD – 0,3 a 3 µg kg ⁻¹	(MUNARETTO <i>et al.</i> ,

2 (PIR)	tilápia e panga)	modificado	PSA e C ₁₈			LOQ – 1 a 10 µg kg ⁻¹	2013)
Multi 4 (PIR)	Bagre	QuEChERS modificado	d-SPE Z-Sep	GC-MS/MS	71 a 116%	LOQ – 1 ng g ⁻¹	(SAPOZHNIKOVA; LEHOTAY, 2013)
Multi 13 (PIR)	Peixes com alto teor de gordura	Água Acetonitrila (1% ácido acético) Hexano (partição)	Congelamento a baixa temperatura (-20 °C) d-SPE 1ª) CaCl ₂ 2ª) PSA + C ₁₈ + florisil	GC-MS/MS	65 a 119%	LOD – 1 a 4 µg kg ⁻¹ LOQ – 2 a 13 µg kg ⁻¹	(CHATTERJEE et al., 2016)
4 (PIR)	Fish (carpa, truta)	Hexano: diclorometano (2:1)	SPE Cartucho (Alumina e C ₁₈)	GC-MS/MS	Média 79% DELTA - 53%	LOD – 0,03 a 0,46 ng g ⁻¹ LOQ 0,1 a 1,54 ng g ⁻¹	CORCELLAS; ELJARRAT; BARCELÓ, 2015)
17 (PIR)	Gordura de alimentos de origem animal (incluindo peixe)	Hexano: diclorometano (2:1)	SPE Cartucho (Alumina e C ₁₈)	GC-MS/MS	Média 73 a 85%, exceto para transflutrina (41%).	LOD – 0.002 a 6.43 ng g ⁻¹ de lipídio LOQ – 0.006 a 21.4 ng g ⁻¹ de lipídio (As amostras de peixe apresentaram maiores valores de LOD e LOQ)	(DALLEGRAVE et al., 2016)
18 (PIR) 1 (PIRs)	Gordura animal	Acetonitrila	MSPD modificado - florisil d-SPE – Z-Sep + e PSA	LC-MS/MS	Veracidade 84 a 143%	Precisão – 3.9 a 29%	(MOLONEY et al., 2018)

	(bovino, ovino, porcino, de aves)						
Multi AZA	Peixes (incluindo tilápia, truta e salmão) e crustáceos	Acetato de etila Acetonitrila e Hexano (partição)	SPE Cartucho Bond Elut-C ₁₈	LC-MS/MS	60 a 74% Média de 84% para salmão	LOD 0,01 a 2 µg kg ⁻¹	(RAWN <i>et al.</i> , 2009)
DIFLU	Tilápia	Metanol	SPE Cartucho C ₁₈	HPLC-DAD LC-MS/MS (confirmação)	96.8 a 101.1%	LOD – 32 µg kg ⁻¹ LOQ – 110 µg kg ⁻¹	(LUVIZOTTO-SANTOS; CORDEIRO; VIEIRA, 2009)
Multi AZA DIFLU	Peixes e crustáceos (incluindo salmão)	Acetonitrila (0,5% ácido acético)	MSPD – sulfato de sódio anidro e C ₁₈ SPE – sílica gel	LC-MS/MS	83.8 a 97.2%	LOD – 1,5 µg kg ⁻¹ LOQ – 4,7 a 5,0 µg kg ⁻¹	(CARRO <i>et al.</i> , 2012)
Multi DIFLU 2 (PIR)	Amostras ambientais, crustáceos e bacalhau	Metanol/acetona (50/50) Extração líquido-líquido com heptano (DIFLU – bacalhau)	SPE Oasis HLB e Oasis MAX (DIFLU – bacalhau)	LC-MS/MS (DIFLU – bacalhau) GC-ECD (PIR)	98 A 131% (DIFLU – bacalhau) (DIFLU – bacalhau)	LOD – 5 a 15 ng g ⁻¹ (DIFLU – bacalhau)	(LANGFORD <i>et al.</i> , 2014)

PIR – piretróides; PIRs – piretrinas; BENZ – benzoiluréia; AZA – azametifós; DIFLU – diflubenzurom; GCB – carbono grafitizado (do inglês, *graphitized carbon black*); Multi – método multiresíduo; DELTA – deltametrina.

A utilização de LC para determinação de piretróides é pouco descrita na literatura. Entretanto, apresenta como vantagens o uso de métodos de preparo de amostras menos complexos e melhor sensibilidade para aqueles compostos menos voláteis, como a flumetrina (TUCK, *et al.*, 2018). Estudos indicam que a tralometrina, que é um metabólito da deltametrina, pode ser convertida a deltametrina pela eliminação de brometo no injetor do sistema GC-MS. Entretanto, tralometrina e deltametrina podem ser seletivamente analisadas por LC-MS/MS (VALVERDE *et al.*, 2001).

Organofosforados geralmente são analisados por GC acoplado à espectrometria de massas. Porém, azametifós é um organofosforado altamente polar e que apresenta baixa volatilidade. Por isso, a LC acoplada a detectores MS/MS com ionização ESI é o sistema mais utilizado para obtenção de melhor sensibilidade e seletividade (GARCÍA-VALCÁRCEL; TADEO, 2009). Benzoiluréias geralmente são analisadas por LC devido a elevada polaridade e baixa volatilidade. São frequentemente analisadas usando técnicas de detecção por espectrometria de massas e em métodos multiresíduos (BRUTTI; BLASCO; PICÓ, 2010).

Métodos analíticos que utilizam cromatografia líquida acoplada a espectrômetros de massas, por exemplo, são notoriamente complexos, não só pelo instrumento em si, mas principalmente porque geralmente são aplicados em matrizes complexas. Quanto maior a complexidade do método, maior a necessidade de validação do mesmo. O método de validação é, portanto, muito importante e indispensável para garantir que os resultados analíticos são confiáveis (KRUIVE *et al.*, 2015).

2.10 Validação de métodos analíticos

Além da necessidade de validação dos métodos analíticos para garantir a confiabilidade dos resultados, os laboratórios estão sendo submetidos a um maior número de regulações e normas que exigem a realização da validação dos métodos (KRUIVE *et al.*, 2015). Devido à importância de um procedimento de validação, um grande número de guias de validação vem sendo elaborados. Estes podem ser de natureza universal ou específica, ou seja, para uma determinada área. Os diferentes guias estabelecem parâmetros de validação que podem ser compatíveis entre si, entretanto podem divergir em alguns detalhes, metodologias, terminologias e critérios de aceitação. Estas

divergências podem levar a enganos quanto à interpretação dos parâmetros e até mesmo dos cálculos a serem realizados (KRUIVE *et al.*, 2015).

Atualmente, os guias de validação mais citados em publicações referentes ao desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos para análise de resíduos e contaminantes em matrizes de alimentos são: SANTE/11813/2017 e a Decisão 2002/657/CE, ambas elaboradas pela Comunidade Europeia. No Brasil, a ANVISA através da RDC Nº 166, de 24 de Julho de 2017, o INMETRO através da DOQ-CGCRE-008 – Rev. 07 – Jul/18, e o MAPA através do Manual de Garantia da Qualidade Analítica para Resíduos e Contaminantes em Alimentos (MAPA, 2011) também possuem os seus guias de validação para métodos analíticos.

Os parâmetros descritos pela Decisão 2002/657/CE contemplam a maioria daqueles descritos pelos guias citados acima, com exceção do efeito de matriz, limite de quantificação e limite de detecção. Este guia apresenta critérios de desempenho mais rígidos quando comparado aos demais como, por exemplo, o número de repetições dos ensaios em condições de repetibilidade. Além disso, determina os parâmetros $CC\alpha$ e $CC\beta$, que também são descritos no Manual de Garantia da qualidade do MAPA. Cabe salientar que dentre os guias elaborados no Brasil, o guia do MAPA é aquele que contempla o maior número de parâmetros e com critérios muito semelhantes aos descritos pela Decisão 2002/657/CE.

Neste trabalho serão descritos detalhadamente os parâmetros e critérios estabelecidos pelos guias SANTE/11813/2017 e Decisão 2002/657/CE, já que são os mais usados, são reconhecidos internacionalmente e foram utilizados para validação dos métodos desenvolvidos nesse trabalho.

2.10.1 SANTE/11813/2017

A Comunidade Europeia elaborou um guia de validação que é destinado aos laboratórios envolvidos no controle de resíduos de pesticidas nos alimentos e rações em toda a União Europeia. Recentemente foi publicada a atualização deste documento guia para controle de qualidade analítica e procedimentos de validação para resíduos de agrotóxicos e análises em alimentos e ração – SANTE/11813/2017. Através deste guia

pretende-se normalizar os resultados obtidos de diferentes laboratórios, garantir a qualidade, rastreabilidade e precisão dos métodos, evitar falsos positivos e negativos e possibilitar a implementação de sistemas de garantia da qualidade como a ISO/IEC 17025 (SANTE, 2017).

Conforme a SANTE, os parâmetros e critérios a serem observados durante a validação interna de métodos analíticos quantitativos são: a sensibilidade/ linearidade, efeito de matriz, limite de quantificação (LOQ, do inglês, *limite of quantification*), especificidade, veracidade (através da recuperação), precisão (repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial), robustez, razão entre os íons monitorados e tempo de retenção (SANTE, 2017).

O número de íons a serem monitorados é dependente do tipo de sistema de espectrometria de massas utilizado. No caso de GC-MS, devem ser monitorados três íons no modo de aquisição *full scan*, ou por monitoramento seletivo de íons (SIM, do inglês *select ion monitoring*). O desvio padrão relativo (RSD%) da razão entre os íons obtidos nas análises das amostras não deve exceder $\pm 30\%$ da média obtida pelos padrões de calibração. A variação do tempo de retenção do composto em extrato não deve exceder $\pm 0,1$ min do tempo de retenção do composto em solvente (SANTE, 2017).

A linearidade/sensibilidade do método deve ser verificada através da curva de calibração que deve, preferencialmente, ser preparada contendo três ou mais níveis de concentração. A concentração mais baixa deve ser igual ou inferior ao limite de quantificação prático (RL, do inglês *reporting limit*). O RL corresponde ao menor nível em que resíduos serão reportados como números absolutos e deve ser igual ou superior ao LOQ do método. O LOQ do método corresponde à menor concentração em que os critérios de precisão e veracidade são atendidos. A concentração calculada em cada nível da curva de calibração não deve exceder 20% da concentração verdadeira (SANTE, 2017).

O estudo de efeito de matriz deve ser realizado através da comparação entre a resposta dos padrões analíticos em solvente e a resposta dos padrões analíticos no extrato da amostra. No caso de supressão ou ganho de sinal maior de 20%, a curva de calibração deve ser realizada considerando o efeito de matriz, como por exemplo, através

do uso de extrato da matriz branco fortificado. A especificidade do método deve ser avaliada considerando a análise do reagente branco e de matriz branco. O reagente branco corresponde à análise sem a presença da matriz (que pode ser substituída por água), apenas com solventes e reagentes. A resposta do composto presente na matriz branco ou no reagente branco não deve exceder 30% do valor do RL (SANTE, 2017).

A recuperação deve ser mensurada, se possível, em todos os lotes de análises. Os resultados de recuperação serão usados para determinar a veracidade do método e a precisão RSD_r (repetibilidade). Um mínimo de cinco amostras brancas devem ser fortificadas em pelo menos dois níveis. Um nível deve corresponder à concentração do LOQ ou RL e o outro nível entre 2 a 10 vezes o LOQ ou LMR. A média da recuperação deve variar entre 70 e 120% (veracidade) e o $RSD\%$ deve ser menor que 20% para cada nível testado. Recuperação acima ou abaixo desta faixa só são aceitáveis se os desvios observados forem inferiores a 20%, entretanto, não deve ser inferior a 30% ou superior a 140%. Nestes casos, um método de correção da recuperação deve ser aplicado (SANTE, 2017).

A reprodutibilidade intralaboratorial e a robustez do método devem ser mensuradas no decorrer das análises de rotina, “*on-going validation*”, e o RSD_{WR} não deve exceder 20%. Neste caso, amostras podem ser fortificadas nos mesmos níveis selecionados para determinação da recuperação e do RSD_r e mensuradas junto às análises de rotina. Após cinco determinações, o RSD_{WR} e a recuperação média podem ser determinados (SANTE, 2017).

2.10.2 Decisão 2002/657/CE

A Comunidade Europeia estabeleceu em 2002 parâmetros de validação, critérios de desempenho e interpretação dos resultados de métodos analíticos através do guia 2002/657/CE. A confiabilidade, comparabilidade e rastreabilidade dos resultados analíticos só podem ser garantidas através de sistemas de qualidade e na utilização de métodos validados que atendem os parâmetros estabelecidos (CD, 2002). Assim como a SANTE (2017), o guia é destinado principalmente aos laboratórios envolvidos com controle oficial de resíduos na União Europeia (CD, 2002) e àqueles envolvidos em controle oficial de resíduos em países dos quais a União Europeia importa produtos.

Conforme o guia 2002/657/CE da Comunidade Européia a LC e a GC acopladas à espectrometria de massas são adequadas para métodos de confirmação de resíduos ou contaminantes orgânicos que devem ser quantificados através de três ou quatro pontos de identificação (íons). Além disso, devem ser observadas as tolerâncias máximas permitidas para as intensidades dos íons monitorados de acordo com a técnica de espectrometria de massas selecionada. Os seguintes critérios de desempenho são requeridos para um método quantitativo através de validação interna: seletividade/especificidade, curva de calibração, veracidade/recuperação, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial), aplicabilidade/robustez, estabilidade, limite de detecção e decisão ($CC\beta$ e $CC\alpha$).

A especificidade/seletividade do método deve ser verificada através da análise de no mínimo 20 amostras de matriz branca, nas quais devem ser monitoradas a presença ou ausência de interferências na zona de eluição dos compostos (CD, 2002). A curva de calibração usada para quantificação deve possuir pelo menos 5 níveis (incluindo o zero), e deve conter o intervalo de trabalho, além de indicar a equação da reta obtida bem como o coeficiente de correlação (CD, 2002).

A exatidão do método deve ser verificada através da veracidade e da precisão. A veracidade deve ser mensurada através da análise de materiais de referência ou, na ausência deste, através da recuperação de quantidades conhecidas das substâncias a analisar adicionadas em uma amostra branco da matriz. Os intervalos aceitáveis para materiais de referência não devem ultrapassar o limite de $\pm 10\%$. Para amostras fortificadas os intervalos aceitáveis são dependentes da concentração analisada (fração mássica). Para concentrações inferiores ou iguais a $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ a veracidade deve variar entre 50 e 120%. Para concentrações superiores a $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ e inferiores a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ a veracidade deve variar de 70 a 110%, e, para concentrações iguais ou superiores a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ a veracidade deve variar entre 80 e 110% (CD, 2002).

A recuperação deve ser mensurada através da fortificação de pelo menos 18 amostras brancas, divididas em três grupos de seis alíquotas, fortificadas nas concentrações correspondentes a 0,5, 1,0 e 1,5 vezes o LMR para o dado composto. A concentração de cada amostra, a veracidade (100 vezes o teor medido dividido pelo nível

de fortificação) e o coeficiente de variação (CV%) devem ser determinados considerando os seis resultados de cada nível avaliado (CD, 2002).

A precisão deve ser avaliada através da repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial. A repetibilidade (WL_r , do inglês *within-laboratory repeatability*) deve ser verificada através da análise das 18 amostras divididas em três níveis, conforme descrito anteriormente. A concentração de cada amostra, a concentração média, o desvio padrão e o CV% devem ser mensurados. O procedimento deve ser repetido no mínimo três vezes pelo mesmo analista. A concentração média e o CV% das três análises devem ser calculados (CD, 2002).

Na reprodutibilidade intralaboratorial (WL_R , do inglês *within-laboratory reproducibility*) deve-se analisar as 18 amostras (matrizes idênticas ou diferentes), conforme realizado durante o estudo de repetibilidade, porém por pelo menos mais dois analistas, em condições de variabilidade conhecidas e controladas (lotes diferentes de reagentes, solventes, temperatura ambiente, instrumentação). Deve-se calcular a concentração média, desvio padrão e CV% das amostras analisadas nos três dias (CD, 2002).

O CV% em condições de repetibilidade não deve exceder a metade ou dois terços dos valores obtidos pela equação de Horwitz (Equação 2). Já o CV% da reprodutibilidade intralaboratorial não deve exceder os valores obtidos pela equação. Entretanto, a equação fornece valores inaceitáveis para frações mássicas inferiores a $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, devendo ser admitido CV% mais baixo possível (CD, 2002).

$$\text{Equação 2} \quad CV = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

O $CC\alpha$ e $CC\beta$ para substâncias com LMR definido podem ser calculados através da curva de calibração, conforme ISO 11843. Neste caso, utiliza-se 20 amostras fortificadas em torno do LMR (em passos equidistantes), podendo ser aquelas analisadas no estudo de reprodutibilidade. O limite de decisão ($\alpha = 5\%$) corresponde à concentração no LMR mais 1,64 vezes o desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial. Já a capacidade de detecção corresponde ao teor médio medido no limite de decisão mais 1,64 vezes o desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial (CD, 2002).

A aplicabilidade/robustez deve ser mensurada através de pequenas variações como, idade dos reagentes, solventes, padrões, diferentes analistas, temperatura, extratos da amostra, entre outros. As variações não devem influenciar significativamente nos resultados das medições. A robustez também pode ser verificada através de grandes alterações como, espécies diferentes, matrizes diferentes, entre outros. A estabilidade dos compostos em determinadas condições de armazenamento e durante a análise, tanto em solvente quanto em matriz, é um importante parâmetro a ser avaliado, pois pode influenciar nos resultados do método (CD, 2002).

2.10.3 Extensão de escopo

A extensão de escopo consiste em incluir novos analitos ou nova matriz no escopo de um método analítico já validado. Entende-se por nova matriz tecidos diferentes de uma mesma espécie (fígado e rim bovino), tecido de diferentes espécies (rim bovino e suíno) ou tecidos diferentes de espécies diferentes (rim bovino e fígado suíno) (MAPA, 2011). Conforme a SANTE/11813/2017, a extensão de escopo de novas matrizes é uma forma pragmática de validação da aplicabilidade do método para matrizes do mesmo grupo como: amostras com alto teor de açúcar e baixo teor de água (mel, uvas passas, damasco e ameixas secas, omeletes de frutas), produtos a base de leite (leite de diferentes espécies, queijo, iogurte, cremes), carnes e frutos do mar (carne bovina, suína, equina, músculo de frango, pato, peru, fígado, rim, bacalhau, salmão, truta), dentre outros.

De acordo com a SANTE/11813/2017, a inclusão de novos analitos ou de novas matrizes deve ser realizada considerando os mesmos parâmetros e critérios descritos pela norma para a validação de um método. Entretanto, uma alternativa a este procedimento seria a validação no decorrer das análises de rotina, "*on-going validation*". Por exemplo, através de análise de amostras fortificadas em duas concentrações, no LOQ do método e um nível mais elevado, para determinação da recuperação e ocorrência de interferências nos tempos de retenção dos analitos. Após cinco determinações, a recuperação e a reprodutibilidade podem ser determinadas seguindo os critérios de aceitação determinados pela norma (SANTE, 2017).

O manual de garantia da qualidade analítica elaborado pelo MAPA (2011) também prevê a utilização da ampliação de escopo para novos analitos e novas matrizes. Neste

caso, devem ser realizados os estudos de linearidade, seletividade/efeito matriz, veracidade/recuperação e precisão. A avaliação da repetibilidade pode ser realizada em apenas um dia, reduzindo significativamente o número de experimentos. Os resultados devem comprovar que a inclusão de um novo analito ou de uma nova matriz não altera o desempenho geral do método.

2.10.4 Incerteza das medições

A incerteza é um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando (EURACHEM/ CITAC, 2012). A ISO/IEC 17025 preconiza que a incerteza de uma medição analítica seja avaliada ou que pelo menos seus principais componentes sejam estimados (MAPA, 2011).

Várias são as fontes de incerteza na execução de um método analítico e podem ter origem: na amostragem (contaminação, procedimento adotado, diferenças entre amostras), nas condições de estocagem (tempo, temperatura, umidade), na instrumentação (precisão de balanças, pipetas, termômetros), na pureza dos reagentes, nos operadores (interpretação de resultados, erro de leitura de menisco), além de muitos outros (EURACHEM/ CITAC, 2012).

Vários documentos guias são recomendados para estimativa da incerteza dos resultados, dentre eles: Eurachem (2012), Nordtest (2004), Eurolab (2007), e Codex CAC/GI 59-2006 (2006).

Conforme o guia EURACHEM/CITAC (2012), a incerteza da medição pode ser determinada, dentre inúmeras formas, pela incerteza das recuperações. Neste caso, a incerteza é calculada através dos resultados de análises de amostras de controle de qualidade fortificadas em duplicata, em 10 repetições, e que foram submetidas a todo o procedimento analítico, incluindo todos os componentes de incerteza associados ao método.

As 10 médias das duplicatas de recuperação obtidas pelas 10 repetições, devem ser usadas para calcular a média geral das recuperações (%) e o desvio padrão da repetibilidade (RSD%). O erro padrão da média das recuperações (SEM%, do inglês

standard error of the mean), obtido através da Equação 3 descrita abaixo, é a incerteza em recuperação do método (EURACHEM/ CITAC, 2012).

$$\text{Equação 3 } SEM\% = [\Sigma (\text{media da duplicata} - \text{media geral})^2 \div (n - 1)]^{0.5} \div n^{0.5}$$

A incerteza combinada será determinada pela combinação de dois componentes: o desvio padrão da repetibilidade (RSD%) e o erro padrão da média (SEM%), conforme equação 4 descrita abaixo (EURACHEM/ CITAC, 2012).

$$\text{Equação 4 } \text{Incerteza combinada} = [(RSD\%)^2 + (SEM\%)^2]^{0.5}$$

A incerteza expandida é equivalente a duas vezes a incerteza combinada, conforme Equação 5 (EURACHEM/ CITAC, 2012).

$$\text{Equação 5 } \text{Incerteza expandida} = [(RSD\%)^2 + (SEM\%)^2]^{0.5} \times 2$$

3. CAPÍTULO 1 – ARTIGO I

Vibration extraction QuEChERS for analysis of antiparasitic agents in fish by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

Lenise Guimarães de Oliveira^{a,b}, Abilasha Ramkumar^a, Mary Moloney^a, Márcia Helena Scherer Kurz^b, Fábio Ferreira Gonçalves^b, Osmar Damian Prestes^c, Martin Danaher^b

^a Food Safety Department, Teagasc Food Research Centre, Ashtown, Dublin 15, Ireland

^b Laboratory for Analysis of Residues and Contaminants (LARCO), Post-graduate Program in Technological and Environmental Chemistry, Chemistry and Food School, Federal University of Rio Grande, RS, 95500-000, Santo Antônio da Patrulha - RS, Brazil

^c Laboratory of Pesticides Residue Analysis (LARP), Chemistry Department, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria - RS, Brazil

Correspondence:

Universidade Federal do Rio Grande – FURG. Bairro Cidade Alta, Rua Barão do Caí 125, CEP 95500-000, Santo Antônio da Patrulha, RS, Brasil.

email: leniseoliveira@furg.br; +55 (51) 36627805

Abstract

A method was developed for the analysis of 22 antiparasitic residues, belonging to the benzoylurea, organophosphate, pyrimidamine, pyrethrin, and pyrethroid classes in salmon. Samples were extracted with an acetonitrile-water extraction solvent using a vibrational shaking apparatus with a ceramic homogeniser. Post-extraction, the acetonitrile extracts were purified by incubating at low temperature (-20°, 1 h) to remove fat followed by dispersive-SPE using Z-Sep+ and PSA sorbents. Validation was performed following 2002/657/EC and SANTE/11813/2017 guidelines. The trueness of the method ranged from 87 to 121% and precision from 4.1 to 23.7%, with the exception of cyphenothrin, dicyclanil and azamethiphos. The developed method is particularly advantageous because the use of a vibrational shaker allows unattended extraction of samples and eliminates a laborious tissue disruption step which improves sample throughput in the laboratory. The sample preparation can be performed in 5 hours for 36 samples.

Keywords: antiparasitic drug residues, fish, LC-MS/MS, dispersive-SPE, vibrational extraction.

1. Introduction

Aquaculture has grown continuously and significantly in the last decades, contributing to global seafood production [1]. According to the International Salmon Farmers Association (ISFA) [2], the world's salmon farmers produce 2.5 million tonnes of salmon annually contributing with 132,600 jobs and \$15.4 billion (USD) global annual production. However, the incidences of sea lice

(ecto-parasites) have been a serious problem for salmon aquaculture industries that if left untreated would result in significant fish losses. Sea lice control requires good husbandry and often treatment with therapeutic agents such as avermectins, pyrethroids, hydrogen peroxide and organophosphates. Some of these treatments can lead to the sea lice resistance and negatively affect non-target organisms (especially crustaceans) present in the environment [3]. Also, some substances not approved in aquaculture may be abused because of the lack of effective products. Azamethiphos (organophosphate), cypermethrin and deltamethrin (pyrethroids) are licensed for sea lice treatment and administered by bath techniques, diflubenzuron and teflubenzuron (benzoylureas) by in-feed additives [3, 4]. Dicyclanil (pyrimidinamine) is used to combat insects in sheep [5] and has no aquatic uses. However, it could potentially enter surface water during or after application [6] and represent risk to aquatic environment [7].

Pyrethroids are more effective than organochlorines and organophosphates against a wide spectrum of pests [8]. However, they are very toxic for aquatic organisms [9] and more toxic for insects than mammals [10]. Pyrethroids can produce neurotoxic symptoms e.g. tremors [11] and chronic intoxication (headaches, dizziness and nausea) in mammals and humans. Long-term exposure can also increase the risk of cancer, affect the immune [12], endocrine and adversely reproductive systems [13]. Azamethiphos presents low to moderate toxicity due the low persistence [14] and is considered safe for mammals [15]. Also, the toxicity to bivalves (scallops and clams) was not acutely at concentrations of 0.1 mg L^{-1} but lethal to crustaceans (lobsters and shrimp) [16]. Diflubenzuron present low toxicity to mammals, fish and birds [17].

The European Union (EU) has established the maximum residues limits (MRL) for veterinary drugs in animal food to protect the health of consumers. However, according to the Commission Regulation (EU) 37/2010 [18], limits have only been established for a few pesticides in fish, namely, deltamethrin at $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ in fin fish; cypermethrin at $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, teflubenzuron at $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ and diflubenzuron at $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ in salmonidae species. Azamethiphos is allowed for salmonidae species with no MRL is required.

There has been increased interest in the analysis of antiparasitic agents in fish in recent years in order to improve the safety of aquaculture products and monitoring environmental contamination. As a result, analytical methodology has improved in terms of sensitivity, precision and indeed analyte coverage. Gas chromatography is the most widely used technique for analysing pyrethroids and pyrethrins in fish [10]. Bordet et al. [19] validated a method for the analysis of 34 compounds, including six pyrethroids using GC-ECD as the detection method in different matrices, including fish. Jia et al. [20] also developed an extraction method with isopropanol, instead of acetonitrile, in a QuEChERS-based method to denature proteins from fish, using GC-ECD as the detection method. The application of QuEChERS for the analysis of two pyrethroids and three pyrethrins in fish tissues using GC-MS was also described by Rawn et al. [21]. Multi-residue methods have been developed for the analysis of a large number of compounds, including some pyrethroids, using GC-MS [22] and GC-MS/MS [23, 24] in fish samples. In the last 20 years, few methods have been developed for the analysis of pyrethroids by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and most

are applied for the analysis of fruits and vegetables [25, 26, 27, 28, 29]. Chung and Lam [30] developed a method for the analysis of 15 pyrethroids and two metabolites of dithiocarbamates in foods using LC-MS/MS. The authors reported that LC was more favorable than GC due to better sensitivity and flexibility for pyrethroid analysis [30]. An analytical method for screening and confirmation of multi-class veterinary drug residues in flatfish, shrimp and eel using UHPLC-MS/MS was reported by Kim et al. [31]. However, the results of the quantitative method validation were not satisfactory for all pyrethroids in flatfish, and some pyrethroids in shrimp and eel.

The main objective of this current research was to develop and validate a high-throughput, accurate, robust and reproducible method for the analysis of antiparasitic residues in salmon using a vibrational shaker and QuEChERS-based extraction, followed by detection using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. The vibrational shaking apparatus allows unattended processing of 36 samples at the same time under strong and continuous agitation. The reduced time and significant improvement of the reproducibility of the sample preparation are the most advantages when compared with QuEChERS-based whereby each sample is homogenized using a probe blender, shaken by hand and then vortexed. The research also aimed to investigate the suitability of different sorbents for selective isolate of the target analytes from fish extracts of sea bass, trout and salmon. In addition, the suitability of different column chemistries, particle sizes and dimensions were evaluated based on impact on chromatographic selectivity and run time.

2. Experimental

2.1 Reagents and materials

Super Purity Solvent, SpS™ acetonitrile (MeCN), methanol (MeOH), and propan-2-ol were purchased from Romil Pure Chemistry (Cambridge, UK), ethylene glycol (EG), purum ≥98% (GC), dimethyl-sulphoxide (DMSO), puriss p.a. dried <0.02% water and ammonium formate for mass spectrometry ≥ 99.0% from Sigma Aldrich (Dublin, Ireland) and ethanol Emprove from Merck (Darmstadt, Germany). Ultra-pure water (18.2 MΩ cm⁻¹) was generated in-house using a purification system Millipore (Cork, Ireland).

Sorbents SiTi (4%) and SiTi (4%) C₁₈ were supplied from Glantreo (Cork, Ireland), C₁₈ and magnesium sulphate from UCT (Wexford, Ireland), Z-Sep, Z-Sep+, Florisil® 60-100 mesh and PSA from Sigma-Aldrich (Dublin, Ireland), and sodium chloride (99.5%) from Applichem. Florisil® was deactivated, following a procedure described by Moloney et al. [32], by heating overnight in a furnace (Carbolite, Sheffield, UK) at 550 °C, prior to analysis, and storing in a desiccator until cool. Water (15 mL) was gradually added to 85 g of florisil and mixed manually to avoid clumping. Florisil® was shaken on a horizontal shaker table (Gerhardt, Königswinter, Germany).

A range of different columns were evaluated during method development including Eclipse Plus RRHD analytical column (2.1 x 50 mm) packed with C₁₈, 1.8 µm; Waters Acquity BEH analytical column (3.1 x 50 mm) packed with C₈, 1.7 µm; Zorbax Eclipse Plus 1.8 µm analytical column (3.0 x 100 mm) packed with Phenyl-Hexyl, were all sourced from Waters (Dublin, Ireland) and Speed

Core Diphenyl 2.6 μm analytical column (2.1 x 100 mm) from Fortis Technologies Ltd. (Neston, UK).

2.2 Analytical standards and internal standards

Analytical standards, with high purity, of allethrin, azamethiphos, β -cyfluthrin, λ -cyhalothrin, cyphenothrin, deltamethrin, dicyclanil, fenvalerate, flumethrin, permethrin, phenothrin, resmethrin, τ -fluvalinate, tetramethrin and tralomethrin were purchased from Sigma-Aldrich (Dublin, Ireland). Acrinathrin, bifenthrin, cypermethrin, diflubenzuron, fenpropathrin, flucythrinate, phentoate, pyrethrins, solution of trans-cypermethrin-D6 and trans-cyfluthrin-D6 (0.1 mg mL^{-1}) were supplied from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany). Deltamethrin-D5, bifenthrin-D5 and fenvalerate-D5 were obtained from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada).

Individual stock standard solutions at 2 mg mL^{-1} , except diflubenzuron at 5 mg mL^{-1} , were prepared for acrinathrin, allethrin, cypermethrin, deltamethrin, fenvalerate, permethrin, pyrethrins, resmethrin and tralomethrin in ethanol. Azamethiphos, λ -cyhalothrin, cyphenothrin, dicyclanil, fenpropathrin, flucythrinate, flumethrin, phenothrin, phentoate, τ -fluvalinate and tetramethrin were prepared in methanol. Bifenthrin, β -cyfluthrin and diflubenzuron standards were dissolved in DMSO. Four working standards (WS) were diluted from stock standards solutions described above and named as WS A, WS B, WS C, WS D. The WS A and WS B, containing 10 analytes each one, were prepared by dilution of 0.5 mL of each standard solution to a 10 mL volumetric flask with acetonitrile. The WS C, containing only cypermethrin, was prepared by dilution

of 2.5 mL from standard solution to a 10 mL volumetric flask with acetonitrile. The WS D was the stock standard solution of diflubenzuron at 5 mg mL⁻¹ in DMSO. Tralomethrin was not included in any WS solution and it will be discussed later in *Tralomethrin and Deltamethrin* section (3.5). The calibration solutions containing all analytes were prepared by dilution of working standards in acetonitrile at 5.5 (Cal 6), 4.5 (Cal 5), 3.5 (Cal 4), 2.5 (Cal 3), 1.5 (Cal 2) and 0.5 (Cal 1) µg mL⁻¹ (cypermethrin), 110 (Cal 6), 90 (Cal 5), 70 (Cal 4), 50 (Cal 3), 30 (Cal 2) and 10 (Cal 1) µg mL⁻¹ (diflubenzuron), 1.1 (Cal 6), 0.9 (Cal 5), 0.7 (Cal 4), 0.5 (Cal 3), 0.3 (Cal 2) and 0.1 (Cal 1) µg mL⁻¹ (for all other analytes). These correspond to concentrations of 10 to 110 µg kg⁻¹ (cypermethrin), 200 to 2200 µg kg⁻¹ (diflubenzuron), and 2 to 22 µg kg⁻¹ (for all other analytes) in fortified matrix (100 µL) prior to extraction (extracted matrix calibration). Two separate standard solutions were prepared for method validation studies for cypermethrin (1.25 and 3.75 µg mL⁻¹), diflubenzuron (25 and 75 µg mL⁻¹) and other analytes (0.25 and 0.75 µg mL⁻¹). These two calibrants and the calibrant 3 (Cal 3) were used to fortify samples (100 µL) at 0.5, 1.0 and 1.5 x of the validation level (VL) during the validation procedure. Only deltamethrin (10 µg kg⁻¹ in fin fish), cypermethrin (50 µg kg⁻¹ in salmonidae) and diflubenzuron (1000 µg kg⁻¹ in salmonidae) have maximum residue limits (MRL) listed for salmon by the Commission Regulation 37/2010 [18]. In these cases, those levels were applied. For the others compounds, the VL of 10 µg kg⁻¹ was used, which is based on the default pesticide MRL of 10 µg kg⁻¹.

A stock internal standard solution of deltamethrin-D5 (0.1 mg mL^{-1}) and fenvalerate-D5 (0.2 mg mL^{-1}) was prepared in ethanol. Bifenthrin-D5 was prepared (0.1 mg mL^{-1}) with DMSO. Cyfluthrin-D6 and cypermethrin-D6 were supplied as a solution of 0.1 mg mL^{-1} in acetonitrile and acetone, respectively. A working internal standard solution (IS) with all deuterated standards was prepared in acetonitrile ($0.5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), except for fenvalerate-D5 ($2.0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$). All samples (extracted matrix calibration, validation levels, recovery samples and negative controls) were fortified with $200 \text{ } \mu\text{L}$ of IS before beginning the extraction procedure, which were allowed to stand for 15 min. All solutions were stored in the dark at -20°C in amber vials.

2.3 LC-MS/MS method conditions

The chromatographic method described by Moloney et al. [32] was initially used. However, different columns were tested to reduce the chromatographic time without affecting quality. The final chromatographic separation was developed on an Eclipse Plus RRHD analytical column ($2.1 \times 50 \text{ mm}$) packed with C_{18} , $1.8 \text{ } \mu\text{m}$ (Agilent Technologies, Santa Clara, California, U.S.A) maintained at a temperature of 50°C . A binary gradient was used to separate analytes, comprising of mobile phase A (5 mM ammonium formate) and mobile phase B (5 mM formate in MeOH) (80:20, v/v). The gradient profile was as follows: (1) 0 min, 95% A, (2) 1 min, 40% A, (3) 1.5 – 3.0 min, 20% A, (4) 4 min, 0% A, (5) 4.8 – 6.0 min – 95% A and (6) 6.0 – 7.0 min 95% A. The mobile phase was pumped at a flow rate of 0.5 mL min^{-1} using an Agilent 1290 Infinity UHPLC system. The UHPLC autosampler was rinsed with MeOH:propan-2-ol (80:20, v/v). The injection volume was $5 \text{ } \mu\text{L}$ of purified sample extract.

The analytes were detected using an Agilent 6460, triple quadrupole mass spectrometer equipped with Jet Stream electrospray ionisation, operating in positive mode. The capillary voltage was set at 5.0 kV, nebulizer at 50 psi and gas flow at 8 L min⁻¹. The desolvation and source temperatures were set at 250^o C. The UHPLC-MS/MS system was controlled by MassHunter software.

The MS conditions were previously described [32], except for azamethiphos, dicyclanil, diflubenzuron, phentoate and cyfluthrin-D6. However, the conditions for these compounds were determined with the same approach. The parameters were as follows:

Table 1

2.4 Control samples

According to SANTE/11813/2017 [33], only samples presenting compound areas lower than 30% of the first point the calibration curve can be used as control samples. Twenty four blank samples of salmon were used during the validation procedure. The samples consisted of muscle and fish skin, in their natural proportion [18]. Representative salmon samples (at least 100 g) were purchased from different fish markets in Ireland from different farms. Using a clean chopping board and a scalpel, the skin was cut into small pieces. The skin and muscle was then homogenised using a robot coupe R3-3000 (Burgandi, France).

Analyte recoveries were evaluated by spiking negative sample extracts post-extraction (50 µL) in two levels (Cal 2, n = 2 and Cal 5, n = 2). The recoveries

were calculated by comparing the area counts of the fortified negative samples prior to extraction (Cal 2 and Cal 5) with spiked negative sample extracts.

2.5 Sample preparation

Salmon sample ($5 \text{ g} \pm 0.05 \text{ g}$) was weighed into 50 mL polypropylene tubes and was fortified with 200 μL of IS, which was allowed to stand for 15 min. A ceramic homogeniser N° 59829313 Agilent (Santa Clara, USA), Milli-Q water (5 mL) and acetonitrile (12 mL) were added in each tube. The tubes were subjected to vibrational shaking (700 rpm) over 8 minutes using a Merris minimix (Galway, Ireland). Following extraction, NaCl (1 g) was added to the tubes and the samples were mixed using a Gerhardt horizontal shaking apparatus (Königswinter, Germany) (200 oscillations min^{-1} , 5 min). To each tube, MgSO_4 (4 g) was added and they were shaken in the vibrational shaker for 5 min. Following this, the mixture was centrifuged using a Hettich Rotanta 460 R centrifuge (Kirchlengern, Germany) (3500 rpm, 12 min, 4 °C). The samples were placed in the freezer (-20 °C), for 1 hour. The supernatant was poured into a 15 mL polypropylene tube containing Z-Sep+ (500 mg) and placed in a multi-tube vortexer (Glas-Col, Terre Haute, USA) (1 min, 50 rpm). The extract and sorbent were poured into a 50 mL polypropylene tube containing PSA ($125 \pm 2 \text{ mg}$) and MgSO_4 ($1.5 \text{ g} \pm 50 \text{ mg}$). Samples were mixed using a multi-vortex (50 rpm, 1 min) and centrifuged (2500 rpm, 10 min, 4 °C). An aliquot of 6 mL was transferred into a 15 mL polypropylene tube containing 250 μL of ethylene glycol (except for recovery samples = 200 μL). The samples were placed in a Turbovap LV evaporator (Caliper Life Sciences, Runcorn, UK) at 45 °C under nitrogen flow until only the ethylene glycol aliquot remained. All extracts were

vortexed using the Fisher Scientific FB 15012 Top Mix vortex (Dublin, Ireland) before being filtered through 0.2 μm PTFE 13 mm Econofilter filters (Agilent, Santa Clara, USA). Extracts were transferred to into glass vials and injected onto the UHPLC-MS/MS system.

2.6 Method validation

The method was validated in accordance with the parameters and performance criteria outlined in the Commission Decision 2002/657/EC [34] and SANTE/11813/2017 [33]. Each batch analysed during the validation was composed of 12 control samples, comprising of six calibration curve levels, two negative controls and four recovery samples. The calibration curve was prepared using a matrix blank spiked before extraction in six equidistant levels from 2.0 to 22 $\mu\text{g kg}^{-1}$, except for cypermethrin from 10 to 110 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and diflubenzuron from 200 to 2200 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The linearity was checked in WLR and WLR study ($n = 6$). The recovery was checked in ten batches and samples were spiked after extraction in duplicate and in two levels, low and high, ($n = 20$). The low level was the same concentration as the second point of calibration curve and the high level as the fifth point of the calibration curve.

Selectivity was verified through analysis of twenty blank samples and checked through monitoring of interferences in the UHPLC-MS/MS traces from the matrix in the same retention time of the analytes. The selectivity was also evaluated by analysing individual standard solutions at 220 $\mu\text{g L}^{-1}$ in ethylene glycol to verify cross-talk interferences.

The matrix effect was determined through analysis of 20 different blank samples spiked post-extraction at high level (at the same concentration as the fifth point of the calibration curve) and IS. The matrix effect was calculated comparing the signal obtained with the signal from standard solution at the same concentration.

The within laboratory repeatability (WL_r) validation study was conducted by the same analyst on three separate days. One each day, two different salmon blank samples were used, one for matrix-matched calibrants and recoveries, and the other one for validation levels. Within laboratory reproducibility (WL_R) was carried out by three different analysts on three separate days. One blank salmon sample was used to prepare extracted matrix-matched calibrants and recoveries, and 24 different salmon blank for validation levels. Trueness and precision were calculated through WL_r and WL_R study whereby 24 blank samples were fortified at three different concentrations that were 0.5 (n=8), 1.0 (n=8) and 1.5 (n =8) times the validation level (VL). $CC\alpha$ and $CC\beta$ were measured from WL_R study as defined in 2002/657/EC [34]. The concentrations that presented higher standard deviation in each VL from different analysts were used. The uncertainty (n = 20) was measured using the results of recovery from 10 batches on 10 different days in low (n = 2) and high level (n = 2) at 6 and 18 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively, except for cypermethrin (30 and 90 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and diflubenzuron (600 and 1800 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

2.7 Standard Stability

The standard stability was evaluated in solvent and in matrix extracts. The fresh working standards in solvent at the same concentration as the last calibration point were compared with working standards prepared 5 and 19 months previously and kept stored in amber vials at -20°C. A batch of extracted salmon samples spiked with standards during the validation study (calibration curve, recoveries and 0.5, 1.0 and 1.5 x VL), were analysed on the same day of the sample preparation and kept at 5°C in cold room. After six days the extract samples were reanalysed and results were compared. The percentage difference of concentration was calculated for standard solutions and for sample extracts.

3. Results and discussion

3.1 Development of chromatography conditions

The objective of chromatographic method development was to develop an improved faster LC-MS/MS separation based on previous work [32]. This previously published method provided good separation of pyrethroid and pyrethrin analytes but required a 22 min injection cycle time. This longer chromatographic run time was because the column flow rate was limited to 0.3 mL min⁻¹ due to the need to include methanol as the organic modifier to improve MS detection. Generally, for this number of compounds it desirable to have chromatographic runs times of 12 minute or less. Chung and Lam [30] reported that 15 pyrethroids and two metabolites of dithiocarbamates could be analysed in a 5 min UPLC-MS/MS run. This method used an isocratic separation with a mobile phase of 5 mM ammonium formate in MeOH:H₂O (85:15, v/v) and a C₁₈

BEH column 1.7 μm (100 \times 2.1 mm). The fifteen compounds analysed by Chung and Lam [30] have log Kow values ranging between 4 (cinerin II) and 7.7 (τ -fluvalinate). In this work, the log Kow values ranged between 0.6 (dicyclanil) and 7.7 (τ -fluvalinate) [35]. Consequently, a gradient separation was required to separate both polar and non-polar analytes in a reasonably short run time.

In the current work we set out to evaluate the impact of column chemistries, particle size and column dimensions on chromatographic analysis. The best separation was observed using the column Waters Acquity BEH analytical column, 22 min, which incorporated 15 min for the elution of the 23 analytes, and 7 minutes for equilibration. The pyrethroids allethrin, cyphenothrin, permethrin, phenothrin, resmethrin, tetramethrin and tralomethrin were eluted as two peaks well resolved. Meanwhile, cyfluthrin, cypermethrin and flumethrin showed two peaks but not resolved. It was found that the 23 analytes could be eluted from the Eclipse Plus C₁₈ (2.1 \times 50 mm) column in a 7 min run time. However, only cyphenothrin and permethrin isomer peaks were well resolved. However, this does not present a problem for quantitation because both isomers generally are summed by integration as one, in accordance with Commission Regulation 37/2010 [18] for cypermethrin. The chromatographic separation of isomers is not a required parameter considering that pyrethroid isomers do not have different toxicity levels [30]. Two additional columns were also evaluated, namely, a Zorbax Eclipse Plus Phenyl-Hexyl 1.8 μm (3.0 \times 100 mm) and a Speed Core Diphenyl 2.6 μm (2.1 \times 100 mm), which allowed analysis in 10 min and 7.5 min, respectively. However, both of these columns demonstrated less sensitivity when areas and signal/noise ratio were compared.

Consequently, the Eclipse Plus C₁₈ column was selected because it reduced the analysis time by 14 min for each sample, which results in 8 h time-saving for a batch of 36 samples and 200 mL less of mobile phases. The UHPLC-MS/MS trace using Eclipse Plus C₁₈ RRDH 1.8 μm (2.1 x 50 mm) for salmon sample fortified with all compounds at a concentration of 22 μg kg⁻¹, except for cypermethrin and deltamethrin (110 and 2200 μg kg⁻¹) are showed in Fig. 1.

Fig. 1

3.2 Development of sample preparation procedure

The analysis of residues in fish is challenging because of the fatty composition of this sample matrix and presents different challenges compared to other food sample types. Therefore, extraction and clean-up steps need to be carefully developed to reduce interferences, which can affect both the identification and quantitation of target analytes. The choice of the sample preparation procedure, mainly the clean-up step, and the chromatographic conditions can be optimised to negate sample matrix effects which can cause ion suppression/enhancement [36].

The selective isolation of analytes of interest from the matrix is an important step in residue analysis in food. However, to develop a sensitive and selective method it is important to know the composition of the matrix and the physico-chemical properties of the target compounds [37]. Several methods have been developed to isolate pyrethroids residues from the possible interferences from fish matrix. Different sorbent materials in d-SPE clean-up format have been employed, including PSA [20], Z-Sep [38] and a combination of the sorbents

C₁₈/PSA [21, 24]. Chung and Lam [30] reported methodology based on a combination of C₁₈/PSA d-SPE for isolating pyrethroid residues from food, including seafood for samples with fatty content higher than 2% and PSA for samples with lower than 2%. The use of a combination of PSA/graphitized carbon black (GCB) was also used for samples with lower than 2% of fatty content and provided the added benefit of removing of sample pigment. Other groups have reported the use of solvent extraction [4] followed by more complicated gel permeation chromatography (GPC) [39] or solid phase extraction clean-ups [40, 41] for isolating pyrethroid residues from fish samples. Chatterjee et al. [23] developed a solvent extraction using acetonitrile followed by three phase partition with hexane and two d-SPE steps with CaCl₂ and a combination of PSA/Florisil/C₁₈.

In the current work, two sample preparation protocols were developed to isolate pyrethroids, pyrethrin, benzoylurea, pyrimidamine and organophosphate from salmon samples and the efficiency of different sorbent materials was verified in three fish species: salmon, trout and sea bass. Salmon was used as a validation matrix due the complexity of the matrix and importance of production nowadays. All protocols and clean-up procedures are described in supplementary material.

A modified QuEChERS procedure based on the method described by Whelan et al. [42] was initially adapted for the extraction of target analytes. In this method protocol (Protocol A) a ceramic homogenizer was added to the tube containing the sample and the extraction solvent. The fish samples were disrupted using a vibrational shaking apparatus for 8 min. This system is

particularly advantageous because it allows the unattended extraction of 36 samples simultaneously. It represents around one hour less when compared with the original procedure generally applied in QuEChERS, whereby each sample is homogenized using a probe blender, shaken by hand and then vortexed. The vibrational extraction system is shown in supplementary material (Fig. A). Following centrifugation, sample extracts were separated into four phases. The four phases consisting of a bottom layer of salts and matrix, an aqueous phase, a layer of lipid layer and pigments and a top phase containing the solvent extracts still containing pigments as showed in Fig. 2 (a). The samples were subjected to low temperature treatment for one hour at -20°C freezer in a laboratory freezer to remove the lipids as shown in Fig. 2 (b). This low temperature fat precipitation protocol has been successfully applied as cheap clean-up for removal of lipids [43, 44].

Fig. 2

Considering the complex composition of the matrix, a separate experiment was carried out to evaluate six different sorbent chemistries (PSA, C_{18} , Z-Sep, Z-Sep+, SiTi, SiTi 4% C_{18}) and a combination of Z-Sep+/PSA for co-extractive removal from extracts of trout, sea bass and salmon in dispersive-SPE. The extracts were evaporated and the remainder was weighed and compared with a quality control sample (without d-SPE procedure) to evaluate the efficiency of each clean-up (gravimetric analysis).

Fig. 3

The Fig. 3 shows the results of efficiency from different sorbents to remove co-extractives. The RSD% from three replicates ($n=3$) were less than 7% for all sorbents and are represented through errors bars. When comparing the efficiency of each sorbent in different fish, it was shown that each sorbent behaved removed similar amounts of matrix co-extractives for sea bass and trout but some were more effective for salmon as shown in Fig. 3. When comparing the efficiency between different sorbents, Z-Sep+ was most effective for co-extractives from the matrix extracts (around 80%) followed by PSA (around 60%). The efficiency of Z-Sep+ to remove the pigments presented in sea bass, trout and salmon was verified through visual evaluation as shown in Fig. 4. The difference between samples of trout after the clean-up procedure (samples 4, 5 and 6) and salmon (7, 8 and 9) when compared with the quality control samples (no clean-up for trout or salmon samples) without clean-up procedure. The sorbent Z-Sep+ appeared also most completely remove the pigment present in the matrix extract before d-SPE as shown in Fig. 5 (a) and (b). The sorbents SiTi (4%) C₁₈, C₁₈ and Z-Sep had similar efficiency (less than 50%). The combination of Z-Sep+ and PSA demonstrated similar results as Z-Sep+. Two tests were carried out with fortified samples of salmon at $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($n=2$), extracted using protocol A, to verify sensitivity of the method. The first test using Z-Sep+ (0.5 g) and MgSO₄ (1.5 g) in d-SPE and the second test using a combination of Z-Sep+ (0.5 g), PSA (0.125 g) and MgSO₄ (1.5 g). Results from experiments showed that a combination of Z-Sep+ and PSA provided best overall results.

Fig. 4

Fig. 5**3.3 Evaluation of modified matrix solid phase dispersion protocol**

A modified matrix solid phase dispersion procedure based on the method described by Moloney et al. [32] was initially adapted for the extraction of target analytes. In this protocol deactivated florisil was used in modified MSPD (Protocol B) where the clean-up and extraction are carried at the same time to matrix co-extractives. The efficiency of this extraction procedure was enhanced through the use of the vibrational shaking apparatus (with ceramic homogenizer pellets), which was used in both the extraction and salting out steps to improve the throughput. It was estimated time could be reduced by at least one hour compared to the manual MSPD procedure, where the sample is blended with the sorbent manually using a spatula prior solvent extraction. The clean-up efficiency of the florisil protocol was evaluated for sea bass, trout and salmon samples through gravimetric analysis showing it reduced salmon matrix extractives by 30%. Consequently, the florisil MSPD procedure was combined with the PSA/Z-Sep+ d-SPE clean-up.

3.4 Comparison of different sample preparation protocols

Protocol A and B were compared showing similar results were achieved for recovery at low and high level (at 10 and 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$), linearity, relative standard deviation (%) and trueness (%) during repeatability study (n=20), as shown in Table 2. Only deltamethrin, tralomethrin and azamethiphos had different performance and will be discussed later. The linearity was verified in 8 levels of a calibration curve at 2.5, 5, 10, 15, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The linearity range

was satisfactory from 2.5 to 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ with R^2 higher than 0.99 in both methods. Recovery values ranged between 60 and 95% and 62 and 106% at low and high level in the protocol A, 63 to 96% and 63 to 102% in the protocol B. The repeatability study demonstrated results of relative standard deviation ranged from 2.4 to 7.5% in protocol A and from 1.9 to 7.0% in protocol B. The trueness ranged between 88 and 108% and 95 and 108% for protocol A and B, respectively.

The method described by Moloney et al. [32] (protocol C), currently in use for routine analysis in animal fat in the laboratory, was applied for salmon to compare the results with the protocol A and B. Similar results were achieved with recoveries ranging between 74 and 105% (low level) and 67 to 112% (high level), trueness between 88 and 112% and precision from 3.4 to 11.5%. Azamethiphos presented recoveries below 50% in all protocols (A, B and C), but the results of trueness and precision ranged between 106 and 113% and 4.3 to 10.3%, respectively. However, if the areas of each compound are compared, protocols A and B demonstrated a significant increase in sensitivity of the method due the inclusion of a concentration step (10 times). Also, the protocol C needs to be executed in two days due to the manual MSPD and freezing time which requires at least 4 hours, while protocol A and B can be performed in one day, using unattended vibrational extraction. All relevant data and procedures are presented in supplementary material. Consequently, sample preparation protocol A was chosen for the isolation of antiparasitic agents from fish samples. The choice was based on the improvement of the method using vibrational extraction apparatus, followed by a freezing out and

dispersive-SPE steps. The method permits the analysis of 36 samples in 9 h comprising 5 h of sample preparation and 4 h of UHPLC-MS/MS analyses using Eclipse Plus C₁₈ analytical column (7 min run time). As already mentioned, the use of vibrational shaking apparatus in sample preparation and one hour freezing step instead of the use of deactivated florisil, improves precision of the method, reduces extraction time and costs.

Table 2

3.5 Tralomethrin and Deltamethrin

Tralomethrin presented low recoveries, below 6%, and deltamethrin recoveries above 130% in all protocols. According to previous literature, tralomethrin is a mix of two diastereoisomers which can be partially converted to deltamethrin by elimination of bromine [25]. Deltamethrin is, therefore, a primary metabolite of tralomethrin [45]. A number of experiments were designed to verify that tralomethrin converts to deltamethrin. Firstly, standard solutions from each compound at a concentration of 100 µg L⁻¹ were injected individually to check interferences between compounds in the LC-MS/MS analysis. A small amount of deltamethrin was found in a new standard solution of tralomethrin prepared from the powder on the same day (around 2%). Two different source temperatures (200 and 250 °C) was applied to check if the conversion was occurring during analysis. However, it did not change this percentage indicating that 2% of deltamethrin is normally present in tralomethrin standard.

The degradation of tralomethrin during the sample preparation procedure was also investigated through spiking matrix samples and reagents blanks with only

tralomethrin at $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ at the start of sample preparation protocol A. These experiments showed that tralomethrin converted to deltamethrin in both cases. However, tralomethrin presented values nine times lower and deltamethrin five times higher in presence of the matrix. According to previous studies, tralomethrin can be converted rapidly in aqueous medium, through chemical and photochemical degradation and hydrolysis [46]. In protocol A, 5 mL of H_2O were added. However, in protocol B, H_2O was not added and the results of recovery had the same profile. Still, fish has around 70% of H_2O in their composition and seems to be quantity sufficient enough to promote the conversion. Moloney et al. [32] determined tralomethrin and deltamethrin in animal fat samples and no cross-talk interference was observed, probably due to an absence of water in the procedure and matrix. When the same sample preparation and conditions in the same instrument were applied (protocol C), the recovery for deltamethrin was 189% at low level and 157% at high level. Tralomethrin areas were below the first point of the calibration curve when fortified at 10 and $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. These results lead to the conclusion that the fish matrix promotes the conversion of tralomethrin to deltamethrin during sample preparation, probably due to the high content of H_2O in their composition. Tralomethrin was not considered during validation procedure because there is not limit for this compound in fish. Also, if used in fish farms as an antiparasitic, tralomethrin will be quickly converted in deltamethrin, due to degradation mechanisms described before.

3.6 Method performance

3.6.1 Selectivity and Matrix Effect

Selectivity of the method was the first evaluated parameter. Through selectivity is possible improve sample preparation method, chromatography conditions or change MS/MS conditions before method validation process. Fortunately, no cross talk interferences in the UHPLC-MS/MS traces were observed through inspection of chromatograms of analytes and internal standards in solvent at a concentration of $220 \mu\text{g L}^{-1}$ individually. No matrix interference peaks were observed at the same retention time of the analytes when 20 different blank salmon samples from different sources were analysed.

Matrix effect can affect accuracy and precision in LC-MS/MS analysis. Ion suppression was observed for all compounds when compared 20 different spiked extracts of blank salmon samples and spiked solvent sample at the same concentration. The greatest amount of ion suppression was observed for flumethrin (80%). β -cyfluthrin, permethrin, cyphenothrin, acrinathrin, τ -fluvalinate, resmethrin and bifenthrin, where the ion suppression ranged between 70 and 78%. A major part of the compounds showed ion suppression lower than 61%. The lowest effects were observed for azamethiphos and tetramethrin (14 and 23%, respectively) as shown in Table 3.

Table 3

The choice of internal standard for each compound was achieved considering the lowest relative standard deviation of the results using the response (ratio between compound area and IS area). Allethrin, azamethiphos, dicyclanil and tetramethrin demonstrated RSD values of $\leq 11.2\%$ without internal standard, therefore no internal standard was used. Diflubenzuron presented RSD 21.1%

without IS and any internal standard improved the precision. Fenvalerate, cypermethrin, pyrethrins and phentoate had RSD% increased using internal standard (1.8, 3.7, 4.9 and 8% higher) but still less than 20%. The results for these compounds were monitored during validation and the use of internal standards demonstrated improvement of accuracy and precision. With the exception of azamethiphos, the RSD% for all compounds was lower than 19.2%.

3.6.2 Linearity, recovery and measurement uncertainty

The calibrations curves were fortified at 2, 6, 10, 14, 18 e 22 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for the majority of the compounds, except cypermethrin (10, 20, 50, 70, 90 and 110 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and diflubenzuron (200, 600, 1000, 1400, 1800, 2200 $\mu\text{g kg}^{-1}$). The linearity measured as R^2 was greater than 0.99, except for λ -cyalothrin ($R^2 \geq 0.9893$). The Table 4 shows the R^2 achieved for each analyte during validation. Diflubenzuron required a quadratic fit ranged between 200 and 2200 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The signal-to-noise of the first point the calibration curve (2.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, except for cypermethrin 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and diflubenzuron 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$) were monitored during validation procedure and the S/N values were greater than 10 for all transitions.

The recoveries shown in Table 3 were obtained on 10 different days in duplicate and using 10 different blank samples, including the results achieved through WL_R study carried by three different analysts. The results ranged between 76 and 108% at low level and between 71 and 112% at high level, except for phenothrin (57% in both levels) and bifenthrin (63 and 60%). The relative standard deviation between recoveries from 10 different days ranged from 3.4

and 16.5%. As already mentioned the recoveries for azamethiphos were 21 and 22% and the RSD of 53 and 55% at low and high level, respectively. Recoveries results were also used to measure the uncertainty of the method. The percentage recoveries from 10 different days in two levels were used for measurement of expanded uncertainty by ANOVA approach. The uncertainty were 83.4 and 280.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for diflubenzuron and 2.19 and 4.23 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for cypermethrin at low and high level, respectively. For all others analytes ranged from 0.33 and 1.11 $\mu\text{g kg}^{-1}$ at low level and between 0.93 and 2.40 $\mu\text{g kg}^{-1}$ at high level.

3.6.3 *Trueness, precision, Cca and CC β*

The trueness and precision were determined during within-laboratory repeatability (WL_r) and within-laboratory reproducibility (WL_R). The trueness of the method ranged from 87 to 110% in WL_r and from 92 to 110% in WL_R for a majority of the compounds as shown in Table 4. Trueness was greater than 110% for dicyclanil (from 115 – 133% in WL_R), diflubenzuron (118% in WL_r and 112% in WL_R), λ -cyalothrin (114% in WL_r and from 114 to 121% in WL_R) and azamethiphos (122% in WL_r and from 141 and 180% in WL_R). The precision of the method, through RSD%, demonstrates variation from 4.1 to 20.2% in WL_r for all compounds and from 4.1 to 19.6% in WL_R for a major part of the compounds. During WL_R study the analytes acrinathrin (22.2% at 0.5 x VL and 23.7% at 1.5 x VL), λ -cyalothrin (21.1% at 0.5 VL), dicyclanil (21.7% at 0.5 VL) and cyphenothrin (34.0, 30.9 and 29.8%) presented RSD's greatest than 20%. According to 2002/657/EC [34], the equation of Horwitz would present unacceptably high RSDs for mass fraction less than 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Therefore, the

RSD needs to be as low as possible. The RSD for diflubenzuron in WL_R study was 22.9% at $1500 \mu\text{g kg}^{-1}$, but should be less than 16% according to 2002/657/EC [34]. The highest trueness and lowest precision were achieved for azamethiphos comprising 122% in WL_r , 180% and 141% in WL_R , and RSD's from 38.5 to 55.3, respectively. Therefore, satisfactory precision and accuracy was achieved for all analytes, with the exception of azamethiphos, considering that: WL_r was carried out using two different blank samples (one for matrix calibrants and recoveries and another for validation levels) and WL_R study was carried out using one blank sample for matrix calibrants and recoveries and 24 different blank samples for validation levels by 3 analysts. According to Commission Regulation 37/2010 [18], azamethiphos can be used as an antiparasitic for *salmonidae* species but the limits is not required. Hence, this method can be suggested as a screening method for azamethiphos due validation results and the lack of MLR.

CC_α and CC_β values ranged from 10.2 to $14.0 \mu\text{g kg}^{-1}$ and 12.1 to $25.4 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectively, for analytes whose VL was $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. The CC_α and CC_β were 58 and $74 \mu\text{g kg}^{-1}$ for Cypermethrin (VL at $50 \mu\text{g kg}^{-1}$) and 1498 and $2614 \mu\text{g kg}^{-1}$ for diflubenzuron (VL at $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Table 4

Chung and Lam [30] developed and validated a method for determination of 15 pyrethroids and two metabolites of dithiocarbamates by UPLC-MS/MS in different foods such as fruits, vegetables, eggs, meat, poultry, oils, seafood, etc. The average recoveries were from 70 – 110%, and CVs were between 10 –

15%. Kim et al. [31] developed an analytical method for fast screening and confirmatory of 28 multi-class veterinary drug residues, including pyrethroids (pyrethrins I and II, Cinerin I and II, Jasmolin I and II), in flat fish, shrimp and eel by LC-MS/MS. However the quantitative method was not available for all pyrethroids in flatfish, Jasmolin I in shrimp and pirethrin I and Jasmolin I in eel. As mentioned before, Moloney et al. [32] developed a method for the analysis of 18 pyrethroids and one pyrethrin in animal fat using UHPLC-MS/MS. The linearity was satisfactory with R^2 higher than 0.99, trueness ranged from 84 to 143% and precision from 3.9 and 23%, with the exception of fenvalerate (26.5%) and tralomethrin (28.4%).

The method described here was shown to be satisfactory for the most of pyrethroids analysed, using LC-MS/MS. When compared with the methods described previously, this method showed greater accuracy, sensitivity and precision. The use of a large number of different blank samples during validation method also provided high robustness.

3.7 Standard Stability

The results of the standard stability in acetonitrile (WS A, B, C and D) under storage conditions described previously, demonstrated that the analytes were stable for at least 19 months, presenting percentage difference of areas ranging from 3.2 to 12.9% after 5 months and from 3.4 to 13.1% after 19 months of storage. The percentage difference from stability in extracts of salmon samples were less than 19.2% when the results from the first day and after six days of the sample preparation under storage conditions were compared. The stability

of the analytes in extract is important information, especially when the method will be used in routine analysis. In this case, the samples can be extracted few days before chromatographic analysis, allowing better management of instrument use and resources without loss of precision and accuracy.

3.8 Application

Thirty samples (including 4 organic salmon) were purchased from fish markets in Ireland. All salmon used was from farms in different countries. Of this total, 24 samples presented residues with areas below 30% of the first point of the calibration curve and were used as blank samples, according to SANTE/11813/2017 [33]. Deltamethrin and cypermethrin were the most abundant compound detected in the samples, including in an organic salmon sample (deltamethrin). However, only one sample showed a concentration of $2.54 \mu\text{g kg}^{-1}$ for deltamethrin and the others were below than LOQ of the method.

4. Conclusions

A high throughput method has been developed for the analysis of 22 antiparasitics in salmon, including pyrethroids, pyrethrins, benzoylureas, pyrimidamine and organophosphates, by UHPLC-MS/MS, comprising of sample preparation and analysis in only 9 hours. The use of automatic vibration extraction allowed for the analysis of at least 36 samples in 5 hours of sample preparation, increasing precision and reproducibility of the method in less time and therefore, lower cost. Also, this work produces information about the effect of different sorbents for interference removal in salmon, trout and sea bass. The

clean-up procedure, using a combination of sorbents Z-Sep+ and PSA and a freezing step, efficiently isolated the analytes and removed the interferences from the matrix. The improvement of the chromatographic conditions and the optimization using different columns significantly reduces the run time (approximately 4 hours of analysis for 36 samples), and consequently lowers instrumentation usage time (important for routine analysis) and lessens solvent waste. The method performance demonstrated satisfactory sensitivity, accuracy and precision with the exception of azamethiphos, recommended here as a screening method due the validation results and lack of a MRL. Therefore, it could be used as an analytical tool by regulatory agencies for monitoring the presence of these residues in salmon samples. The method described seems to be the first method successfully validated for the analysis of antiparasitics in salmon by LC-MS/MS. Further research should be carried out for matrix scope extension for the analysis of different fish samples using the method proposed.

Acknowledgement

This research was funded by CAPES - PDSE scholarship program - grant n° 88881.134557/2016-01 and all the instrumentation and facilities by Teagasc Food Research Centre - Ireland.

1 **References**

- 2 [1] Nadarajah, S., & Flaaten, O. (2017). Global aquaculture growth and
3 institutional quality. *Mar. Policy*, *84*, 142-151.
- 4 [2] ISFA (International Salmon Farmers Association). Salmon farming
5 sustaining communities and feeding the world. [https://www.ifa.ie/wp-](https://www.ifa.ie/wp-content/uploads/2018/06/ISFA-Report-2018-web.pdf)
6 [content/uploads/2018/06/ISFA-Report-2018-web.pdf](https://www.ifa.ie/wp-content/uploads/2018/06/ISFA-Report-2018-web.pdf), 2018 (accessed 28
7 December 2018).
- 8 [3] Burridge, L., Weis, J. S., Cabello, F., Pizarro, J., & Bostick, K. (2010).
9 Chemical use in salmon aquaculture: a review of current practices and possible
10 environmental effects. *Aquaculture*, *306* (1-4), 7-23.
- 11 [4] Langford, K. H., Øxnevad, S., Schøyen, M., & Thomas, K. V. (2014). Do
12 antiparasitic medicines used in aquaculture pose a risk to the Norwegian
13 aquatic environment?. *Environ. Sci. Technol.*, *48* (14), 7774-7780.
- 14 [5] Fodey, T. L., Thompson, C. S., Traynor, I. M., Barnes, P., Kennedy, D. G., &
15 Crooks, S. R. (2015). Immunochemical Techniques for the Detection of the
16 Parasiticide Dicyclanil in Ovine Tissue. *Food Anal. Methods*, *8* (2), 438-445.
- 17 [6] Goutailler, G., Guillard, C., Faure, R., & Païssé, O. (2002). Degradation
18 pathway of dicyclanil in water in the presence of titanium dioxide. Comparison
19 with photolysis. *J. Agric. Food Chem.*, *50* (18), 5115-5120.
- 20 [7] Montforts, M. H. M. M., Van Rijswick, H. F. M. W., & de Haes, H. U. (2004).
21 Legal constraints in EU product labelling to mitigate the environmental risk of
22 veterinary medicines at use. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, *40* (3), 327-335.

- 23 [8] Aznar, R., Albero, B., Sánchez-Brunete, C., Miguel, E., Martín-Girela, I., &
24 Tadeo, J. L. (2017). Simultaneous determination of multiclass emerging
25 contaminants in aquatic plants by ultrasound-assisted matrix solid-phase
26 dispersion and GC-MS. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 24 (9), 7911-7920.
- 27 [9] Tang, W., Wang, D., Wang, J., Wu, Z., Li, L., Huang, M., ... & Yan, D.
28 (2018). Pyrethroid pesticide residues in the global environment: An
29 overview. *Chemosphere*, 191, 990-1007.
- 30 [10] Tuck, S., Furey, A., Crooks, S., & Danaher, M. (2018). A review of
31 methodology for the analysis of pyrethrin and pyrethroid residues in food of
32 animal origin. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk*
33 *Assess.*, 35 (5), 911-940.
- 34 [11] Enz, A., & Pombo-Villar, E. (1997). Class II pyrethroids: noninhibitors
35 calcineurin. *Biochem. Pharmacol.*, 54 (2), 321-323.
- 36 [12] Wu Y., Miao H, Fan S. Separation of chiral pyrethroids pesticide sans
37 application in pharmacokinetics research and human exposure assessment, in:
38 Stoytcheva M., (Ed.). Pesticides in the modern world – effects of pesticides
39 exposure. Rijeka: In Tech; p. 139 – 166.
40 [http://www.intechopen.com/books/pesticides-in-the-modern-world-effects-of-](http://www.intechopen.com/books/pesticides-in-the-modern-world-effects-of-pesticides-exposure/separation-of-chiral-pyrethroid-pesticides-and-application-in-pharmacokinetics-research-and-human-ex)
41 [pesticides-exposure/separation-of-chiral-pyrethroid-pesticides-and-application-](http://www.intechopen.com/books/pesticides-in-the-modern-world-effects-of-pesticides-exposure/separation-of-chiral-pyrethroid-pesticides-and-application-in-pharmacokinetics-research-and-human-ex)
42 [in-pharmacokinetics-research-and-human-ex](http://www.intechopen.com/books/pesticides-in-the-modern-world-effects-of-pesticides-exposure/separation-of-chiral-pyrethroid-pesticides-and-application-in-pharmacokinetics-research-and-human-ex), 2011 (accessed 28 December
43 2018).

- 44 [13] Mnif, W., Hassine, A. I. H., Bouaziz, A., Bartegi, A., Thomas, O., & Roig, B.
45 (2011). Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. *Int. J. Environ. Res.*
46 *Public Health*, 8 (6), 2265-2303.
- 47 [14] SEPA (Scottish Environmental Protection Agency). Sea lice treatment
48 chemicals for cage fish farms: provisional environmental quality standards for
49 azamethiphos. [https://www.sepa.org.uk/media/60020/policy_17-sea-lice-](https://www.sepa.org.uk/media/60020/policy_17-sea-lice-treatment-chemicals-for-cage-fish-farms.pdf)
50 [treatment-chemicals-for-cage-fish-farms.pdf](https://www.sepa.org.uk/media/60020/policy_17-sea-lice-treatment-chemicals-for-cage-fish-farms.pdf), 1998 (accessed 28 December
51 2018).
- 52 [15] Haya, K., Burridge, L. E., & Chang, B. D. (2001). Environmental impact of
53 chemical wastes produced by the salmon aquaculture industry. *ICES J. Mar.*
54 *Sci.*, 58 (2), 492-496.
- 55 [16] Burridge, L. E., Haya, K., Zitko, V., & Waddy, S. (1999). The lethality of
56 Salmosan (Azamethiphos) to American lobster (*Homarus americanus*) larvae,
57 postlarvae, and adults. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 43 (2), 165-169.
- 58 [17] Rodriguez, E., Barrio, R. J., Goicolea, A., & de Balugera, Z. G. (1999).
59 Determination of diflubenzuron and its main metabolites in forestry matrices by
60 liquid chromatography with on-line diode-array and electrochemical
61 detection. *Anal. Chim. Acta*, 384 (1), 63-70.
- 62 [18] Commission Regulation (EU) No 27/2010 of 22 December 2009 on
63 pharmacologically active substances and their classification regarding
64 maximum residue limits in foodstuffs of animal origin, *Off. J. Eur. Commun.*, L15
65 (2010), 1-72.

- 66 [19] Bordet, F., Inthavong, D., & Fremy, J. M. (2002). Interlaboratory study of a
67 multiresidue gas chromatographic method for determination of organochlorine
68 and pyrethroid pesticides and polychlorobiphenyls in milk, fish, eggs, and beef
69 fat. *J. AOAC Int.*, 85 (6), 1398-1409.
- 70 [20] Jia, F., Wang, W., Wang, J., Yin, J., Liu, Y., & Liu, Z. (2012). New strategy
71 to enhance the extraction efficiency of pyrethroid pesticides in fish samples
72 using a modified QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)
73 method. *Anal. Methods*, 4 (2), 449-453.
- 74 [21] Rawn, D. F., Judge, J., & Roscoe, V. (2010). Application of the QuEChERS
75 method for the analysis of pyrethrins and pyrethroids in fish tissues. *Anal.*
76 *Bioanal. Chem.*, 397 (6), 2525-2531.
- 77 [22] Chen, S., Yu, X., He, X., Xie, D., Fan, Y., & Peng, J. (2009). Simplified
78 pesticide multiresidues analysis in fish by low-temperature cleanup and solid-
79 phase extraction coupled with gas chromatography/mass spectrometry. *Food*
80 *Chem.*, 113 (4), 1297-1300.
- 81 [23] Chatterjee, N. S., Utture, S., Banerjee, K., Shabeer, T. A., Kamble, N.,
82 Mathew, S., & Kumar, K. A. (2016). Multiresidue analysis of multiclass
83 pesticides and polyaromatic hydrocarbons in fatty fish by gas chromatography
84 tandem mass spectrometry and evaluation of matrix effect. *Food Chem.*, 196, 1-
85 8.
- 86 [24] Munaretto, J. S., Ferronato, G., Ribeiro, L. C., Martins, M. L., Adaime, M.
87 B., & Zanella, R. (2013). Development of a multiresidue method for the

- 88 determination of endocrine disrupters in fish fillet using gas chromatography–
89 triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Talanta*, 116, 827-834.
- 90 [25] Valverde, A., Aguilera, A., Rodriguez, M., & Boulaid, M. (2002). What are
91 we determining using gas chromatographic multiresidue methods: tralomethrin
92 or deltamethrin?. *J. Chromatogr. A*, 943 (1), 101-111.
- 93 [26] Soler, C., Manes, J., & Picó, Y. (2004). Liquid chromatography–
94 electrospray quadrupole ion-trap mass spectrometry of nine pesticides in
95 fruits. *J. Chromatogr. A*, 1048 (1), 41-49.
- 96 [27] Martínez, D. B., Vázquez, P. P., Galera, M. M., & García, M. G. (2006).
97 Determination of pyrethroid insecticides in vegetables with liquid
98 chromatography using detection by electrospray mass
99 spectrometry. *Chromatographia*, 63 (9-10), 487-491.
- 100 [28] Chen, T., & Chen, G. (2007). Identification and quantitation of pyrethroid
101 pesticide residues in vegetables by solid-phase extraction and liquid
102 chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *RCM*, 21
103 (12), 1848-1854.
- 104 [29] Carneiro, R. P., Oliveira, F. A., Madureira, F. D., Silva, G., de Souza, W. R.,
105 & Lopes, R. P. (2013). Development and method validation for determination of
106 128 pesticides in bananas by modified QuEChERS and UHPLC–MS/MS
107 analysis. *Food Control*, 33 (2), 413-423.
- 108 [30] Chung, S. W., & Lam, C. H. (2012). Development and validation of a
109 method for determination of residues of 15 pyrethroids and two metabolites of

- 110 dithiocarbamates in foods by ultra-performance liquid chromatography–tandem
111 mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 403 (3), 885-896.
- 112 [31] Kim, J., Suh, J. H., Cho, H. D., Kang, W., Choi, Y. S., & Han, S. B. (2016).
113 Analytical method for fast screening and confirmation of multi-class veterinary
114 drug residues in fish and shrimp by LC-MS/MS. *Food Addit. Contam. Part A*
115 *Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, 33 (3), 420-432.
- 116 [32] Moloney, M., Tuck, S., Ramkumar, A., Furey, A., & Danaher, M. (2018).
117 Determination of pyrethrin and pyrethroid residues in animal fat using liquid
118 chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr.*
119 *B*, 1077, 60-70.
- 120 [33] European Commission (2017) SANTE/11813/2017. Guidance document on
121 analytical quality control and method validation procedures for pesticides
122 residues analysis in food and feed. *European Commission Directorate-General*
123 *for Health and Food Safety*.
- 124 [34] 2002/657/EC. Commission Decision of 12th August 2002 implementing
125 Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods
126 and the interpretation of results, *Off. J. Eur. Commun.* L221 (2002), 1-36.
- 127 [35] PubChem Compound. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>, 2018
128 (accessed 28 December 2018).
- 129 [36] Gosetti, F., Mazzucco, E., Zampieri, D., & Gennaro, M. C. (2010). Signal
130 suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem
131 mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1217 (25), 3929-3937.

- 132 [37] Kinsella, B., O'Mahony, J., Malone, E., Moloney, M., Cantwell, H., Furey,
133 A., & Danaher, M. (2009). Current trends in sample preparation for growth
134 promoter and veterinary drug residue analysis. *J. Chromatogr. A*, 1216 (46),
135 7977-8015.
- 136 [38] Sapozhnikova, Y., & Lehotay, S. J. (2013). Multi-class, multi-residue
137 analysis of pesticides, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic
138 hydrocarbons, polybrominated diphenyl ethers and novel flame retardants in
139 fish using fast, low-pressure gas chromatography–tandem mass
140 spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 758, 80-92.
- 141 [39] Jabeen, F., Chaudhry, A. S., Manzoor, S., & Shaheen, T. (2015).
142 Examining pyrethroids, carbamates and neonicotenoids in fish, water and
143 sediments from the Indus River for potential health risks. *Environ. Monit.*
144 *Assess.*, 187 (2), 29.
- 145 [40] Corcellas, C., Eljarrat, E., & Barceló, D. (2015). First report of pyrethroid
146 bioaccumulation in wild river fish: a case study in Iberian river basins
147 (Spain). *Environ. Int.*, 75, 110-116.
- 148 [41] Dallegrove, A., Pizzolato, T. M., Barreto, F., Eljarrat, E., & Barceló, D.
149 (2016). Methodology for trace analysis of 17 pyrethroids and chlorpyrifos in
150 foodstuff by gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal.*
151 *Chem.*, 408 (27), 7689-7697.
- 152 [42] Whelan, M., Kinsella, B., Furey, A., Moloney, M., Cantwell, H., Lehotay, S.
153 J., & Danaher, M. (2010). Determination of anthelmintic drug residues in milk

- 154 using ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry
155 with rapid polarity switching. *J. Chromatogr. A*, 1217 (27), 4612-4622.
- 156 [43] Rübensam, G., Barreto, F., Hoff, R. B., & Pizzolato, T. M. (2013).
157 Determination of avermectin and milbemycin residues in bovine muscle by
158 liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection
159 using solvent extraction and low temperature cleanup. *Food Control*, 29 (1), 55-
160 60.
- 161 [44] Xie, J., Peng, T., Zhu, A., He, J., Chang, Q., Hu, X., ... & Li, J. (2015). Multi-
162 residue analysis of veterinary drugs, pesticides and mycotoxins in dairy
163 products by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using low-
164 temperature cleanup and solid phase extraction. *J. Chromatogr. B*, 1002, 19-29.
- 165 [45] *Pesticide Regulation, California Department of Pesticides Regulation.*
166 *Active ingredient: deltamethrin and tralomethrin human health risk and*
167 *assessment and mitigation documents and activities.*
168 *[https://www.cdpr.ca.gov/docs/whs/active_ingredient/deltamethrin_tralomethrin.h](https://www.cdpr.ca.gov/docs/whs/active_ingredient/deltamethrin_tralomethrin.htm)*
169 *tm, 2018 (accessed 28 December 2018).*
- 170 [46] Mao, J., Erstfeld, K. M., & Fackler, P. H. (1993). Simultaneous
171 determination of tralomethrin, deltamethrin, and related compounds by HPLC
172 with radiometric detection. *J. Agric. Food Chem.*, 41 (4), 596-601.
- 173 [47] de Queiroz Andrade, G., da Silva Bispo, E., & Druzian, J. I. (2009).
174 Avaliação da qualidade nutricional em espécies de pescado mais produzidas
175 no Estado da Bahia. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 29 (4).

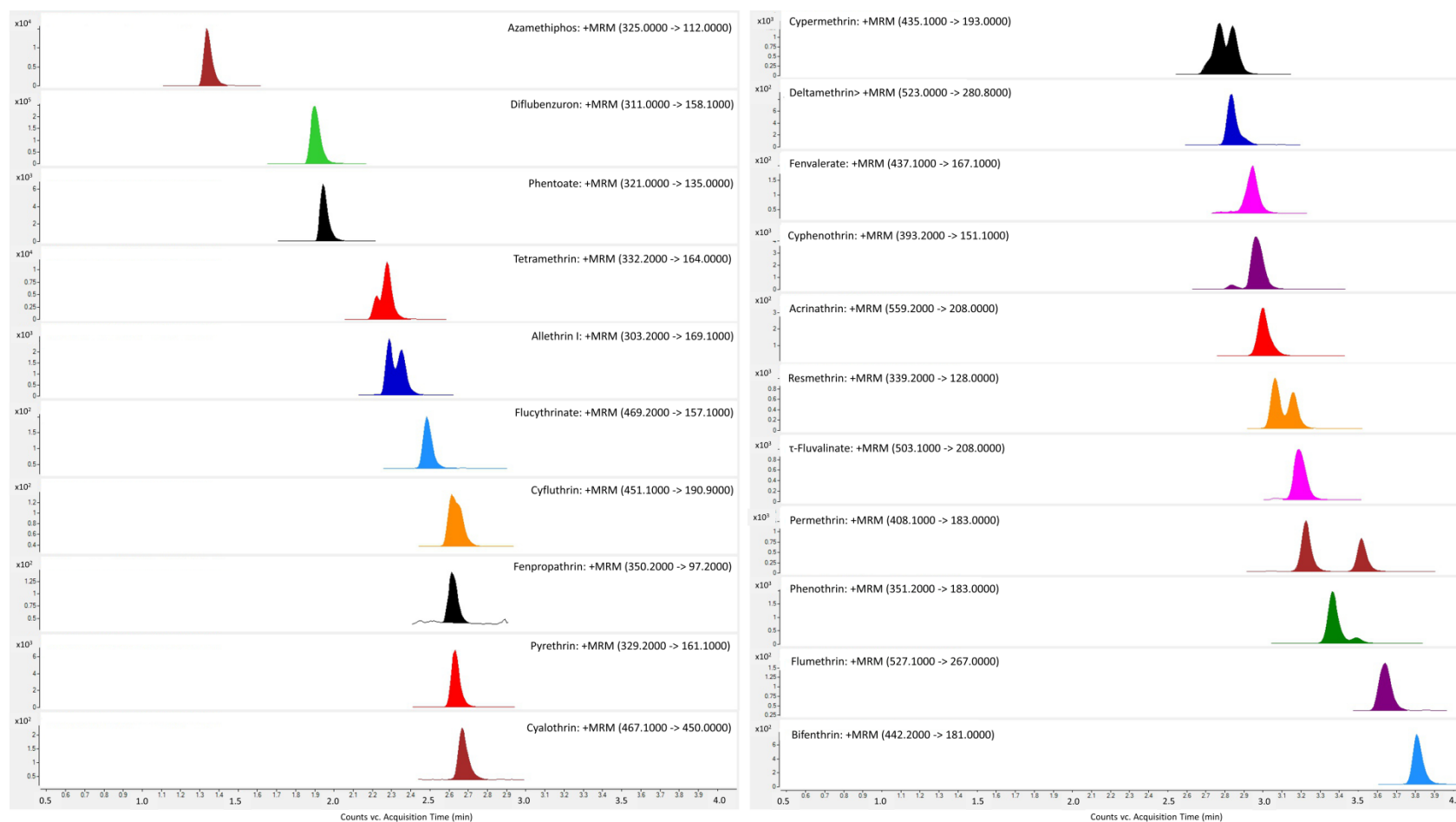


Fig. 1. UHPLC-MS/MS trace using Eclipse Plus C₁₈ RRDH 1.8 μm (2.1 \times 50 mm) for salmon sample fortified at a concentration of 22 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of each analyte, except for cypermethrin at 110 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and diflubenzuron at 2200 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

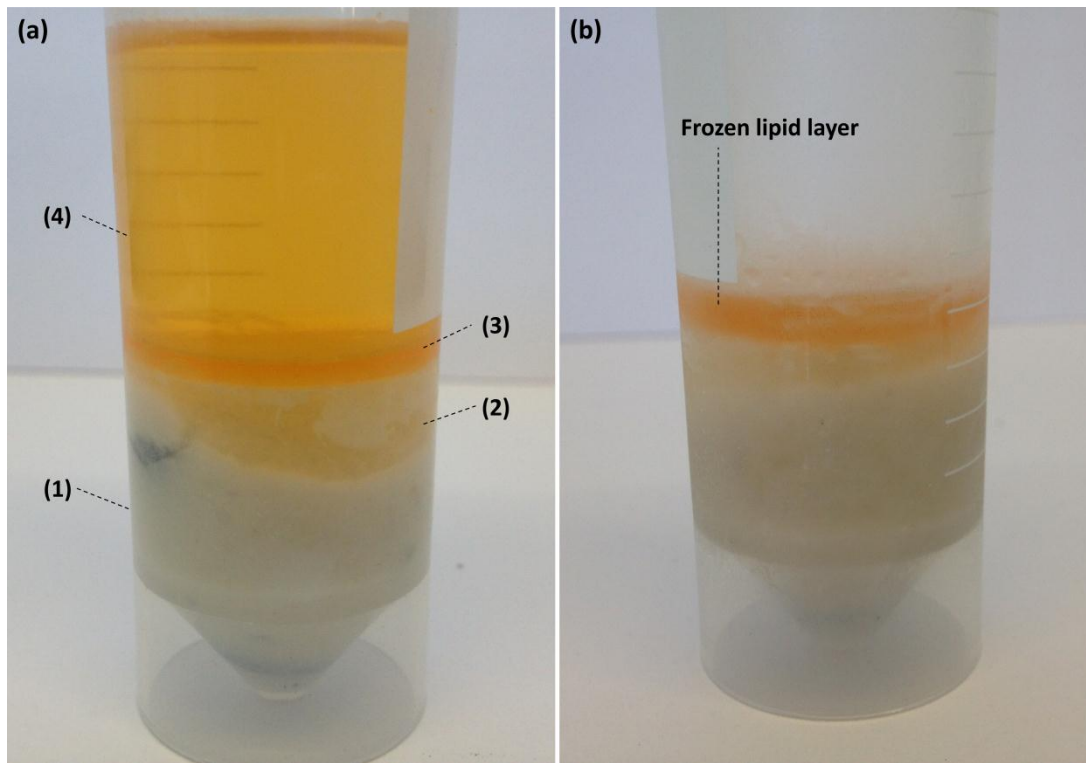


Fig. 2. Four phases formed after extraction and salting out procedures (a) and frozen lipid layer not transferred with extract (b) in protocol A.

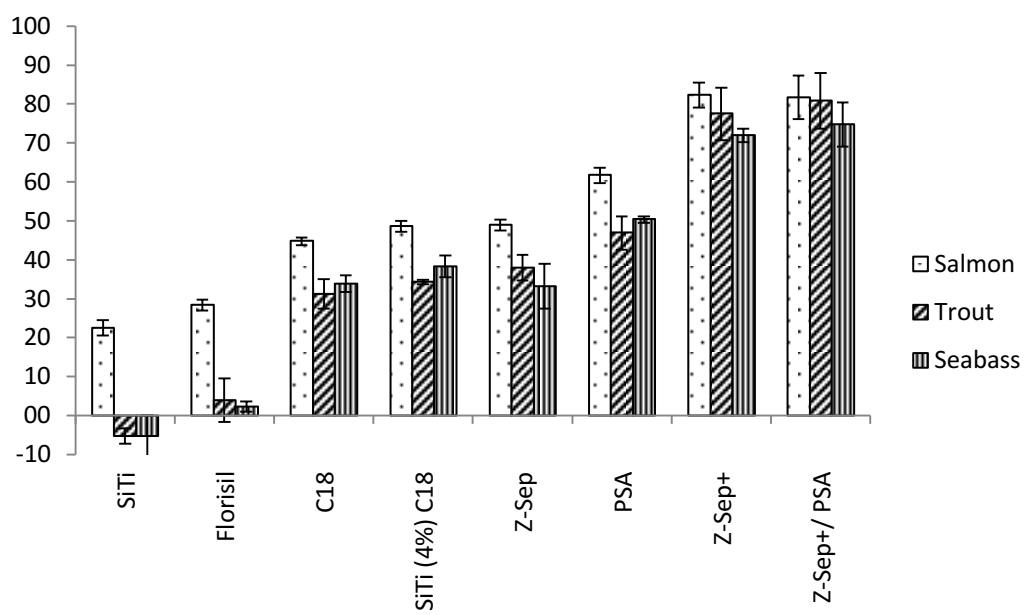


Fig. 3. Co-extractive removal efficiency (%) for different sorbents of sea bass, trout and salmon extracts.

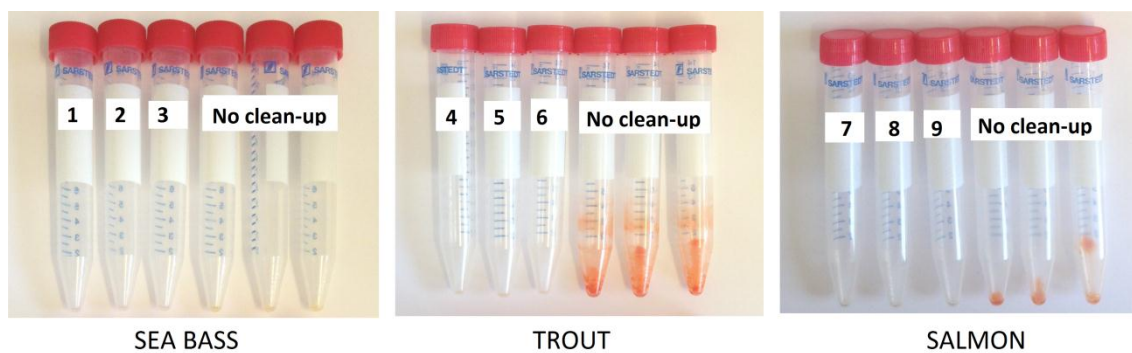


Fig. 4. Efficiency in co-extractive removal using Z-Sep+ in dispersive-SPE for sea bass, trout and salmon extracts in dispersive-SPE.

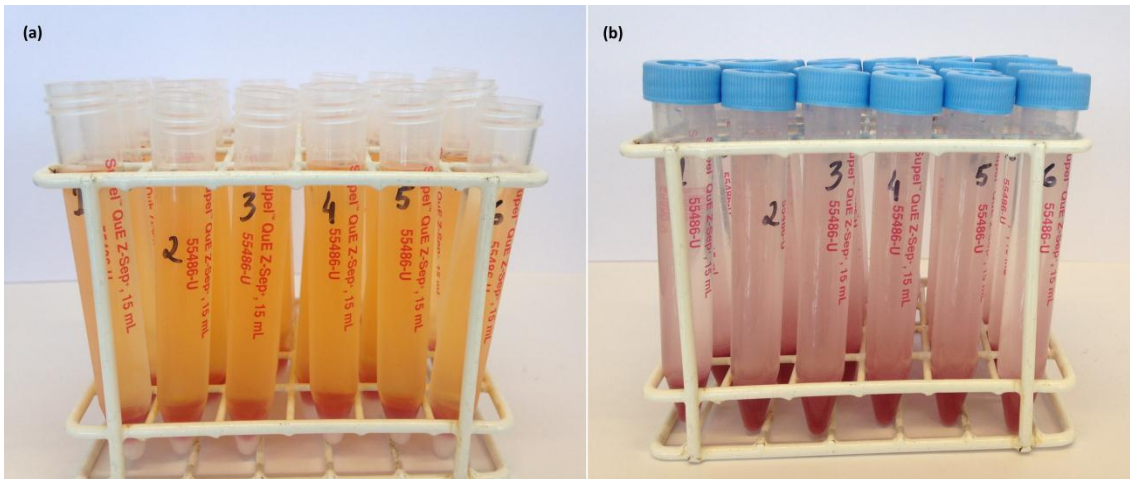


Fig. 5. Dispersive-SPE for salmon extracts using Z-Sep+ in protocol A. (a) extract transferred into Z-Sep+ tubes (b) extracts after multi-tube vortexer 1 min in Z-Sep+ tubes.

Table 1

UHPLC-MS/MS conditions for target analytes.

Analyte	Transition (m/z)		R _t (min) ^a	Fragmentor (V)	CE (eV) ^b	CA(V) ^c
Acrinathrin	559.2	208.0	2.99	79	9	4
	559.2	181.0			41	
Allethrin I	303.2	169.1	2.37	67	5	4
	303.2	135.1			9	
	303.2	93.1			9	
Azamethiphos	327.0	114.0	1.36	94	41	4
	325.0	182.9			9	
	325.0	112.0			37	
Bifenthrin	442.2	181.0	3.87	94	9	4
	440.2	181.1			9	
	440.2	166.1			45	
β-Cyfluthrin	453.1	192.9	2.69	67	9	4
	451.1	190.9			9	
λ-Cyhalothrin	469.1	227.0	2.70	99	9	4
	467.1	450.0			5	
	467.1	225.0			9	
Cypermethrin	435.1	193.0	2.85	79	9	4
	433.1	191.0			9	
Cyphenothrin	393.2	151.1	3.03	73	9	4
	393.2	123.1			21	
Deltamethrin	525.0	282.9	2.90	117	13	4
	523.0	280.8			13	
Dicyclanil	191.1	163.1	0.73	76	17	4
	191.1	150.1			17	
	191.1	109.1			25	
Diflubenzuron	311.0	158.1	1.91	76	9	7
	311.0	141.0			33	
Fenpropathrin	350.2	125.1	2.65	67	9	4
	350.2	97.2			33	
Fenvalerate	439.1	168.9	2.89	79	9	4
	437.1	167.1			13	
Flucythrinate	469.2	412.1	2.51	76	9	4
	469.2	157.1			50	
Flumethrin	527.1	267.0	3.65	114	9	4
	527.1	239.0			21	
Permethrin	410.1	183.0	3.40	73	17	4
	408.1	355.1			5	
	408.1	183.0			13	
Phenothrin	351.2	249.1	3.44	81	13	4
	351.2	183.0			13	
	351.2	153.1			49	
Phenthoate	321.0	246.9	1.96	67	5	4
	321.0	163.0			5	
	321.0	135.0			17	
Pyrethrin I,II	329.2	161.1	2.66	67	5	4

	329.2	143.1			13	
	329.2	105.1			33	
Resmethrin	339.2	171.0	3.05	111	9	4
	339.2	143.1			21	
	339.2	128.0			45	
τ -Fluvalinate	503.1	208.0	3.26	67	9	4
	503.1	181.0			25	
Tetramethrin	332.2	164.0	2.30	67	21	4
	332.2	135.1			13	
Tralomethrin	684.9	442.6	3.40	79	13	4
	682.9	440.6			13	
Bifenthrin-D5	445.3	186.0	3.85	108	9	7
Cyfluthrin-D6	457.2	197.0	2.65	88	9	7
Cypermethrin-D6	439.2	197.0	2.77	114	9	7
Deltamethrin-D5	528.1	280.8	2.90	108	13	7
Fenvalerate-D5	442.3	167.1	2.89	99	13	7

^a R_t - retention time, ^b CE - collision energy, ^c CA - cell acelerator.

Table 2

Results of recoveries in low ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$, $n=2$) and high level ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$, $n=2$), trueness and RSD% ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$, $n = 20$) for protocols A, B and C.

	Protocol A			Protocol B			Protocol C [32]		
	Recoveries (%)		Trueness% (RSD%)	Recoveries (%)		Trueness% (RSD%)	Recoveries (%)		Trueness% (RSD%)
	Low	High		Low	High		Low	High	
	$10 \mu\text{g kg}^{-1}$	$50 \mu\text{g kg}^{-1}$	$50 \mu\text{g kg}^{-1}$ (n=20)	$10 \mu\text{g kg}^{-1}$	$50 \mu\text{g kg}^{-1}$	$50 \mu\text{g kg}^{-1}$ (n=20)	$10 \mu\text{g kg}^{-1}$	$50 \mu\text{g kg}^{-1}$	$50 \mu\text{g kg}^{-1}$ (n=20)
Acrinathrin	74	84	94 (6.2)	84	79	106 (5.4)	102	112	97 (3.8)
Alethrin	80	86	97 (3.5)	78	88	96 (2.6)	85	84	99 (4.5)
Azamethiphos	39	49	108 (4.3)	23	27	113 (10.3)	33	32	106 (7.4)
Bifenthrin	63	62	98 (2.5)	64	63	100 (1.9)	97	77	97 (3.4)
λ -Cyalothrin	74	85	104 (5.1)	85	79	97 (4.4)	105	82	91 (7.2)
B-Cyfluthrin	87	83	100 (3.9)	96	86	99 (4.0)	92	79	99 (9.8)
Cypermethrin	83	89	88 (2.5)	93	81	105 (4.1)	104	86	96 (7.1)
Cyphenothrin	69	80	104 (5.1)	75	72	103 (3.8)	92	82	99 (7.5)
Deltamethrin	137	136	101 (3.8)	130	135	101 (3.6)	189	157	99 (5.1)
Dicyclanil	77	93	93 (2.4)	69	89	95 (6.0)	74	70	112 (6.4)
Diflubenzuron	95	106	91 (4.7)	91	102	101 (6.8)	99	98	94 (5.1)
Fenpropathrin	79	87	98 (4.3)	81	81	105 (5.4)	95	98	92 (4.8)
Fenvalerate	82	84	102 (6.3)	81	81	100 (3.7)	78	85	97 (5.3)
Flucythrinate	91	97	95 (3.1)	91	88	101 (4.9)	104	84	100 (4.7)
Flumethrin	76	78	91 (7.5)	76	76	95 (6.9)	99	87	88 (11.5)
Permethrin	63	71	101 (5.1)	65	66	106 (3.7)	89	78	94 (5.5)
Phenothrin	60	65	96 (3.5)	63	63	100 (5.6)	84	67	91 (6.1)
Phentoate	88	103	89 (4.1)	88	97	99 (6.7)	100	86	99 (5.4)
Pyrethrin	75	84	104 (5.0)	82	78	108 (7.0)	98	82	99 (4.6)
Resmethrin	71	78	90 (2.4)	75	76	96 (3.4)	86	74	97 (5.4)
τ -Fluvalinate	78	86	92 (2.8)	76	77	97 (4.5)	84	81	84 (6.7)
Tetramethrin	82	94	91 (4.0)	82	85	98 (3.4)	90	78	101 (5.3)
Tralomethrin	5.0	6.0	135 (18.4)	1.6	1.6	104 (38.8)	-	-	-

Table 3

Results of recovery, relative standard deviation and uncertainty in low and high level (n = 20) and matrix effect data (positive values indicate ion suppression, n=20).

Analyte	Levels		Recoveries		Uncertainty		Matrix effect High (%)	RSD (%) High		IS
	Low	High	Low	High	Low	High		No IS	IS	
	$\mu\text{g kg}^{-1}$		Average% (RSD%)		$\mu\text{g kg}^{-1}$					
Acrinathrin	6.0	18.0	78 (11.8)	73 (12.2)	1.0	1.9	74	11.8	10.9	Fenva-d5
Allethrin I	6.0	18.0	80 (7.7)	76 (5.9)	0.62	1.2	47	11.2		No IS used
Azamethiphos	6.0	18.0	21 (53)	22 (55)	0.44	1.4	14	5.1		No IS used
Bifenthrin	6.0	18.0	63 (9.7)	60 (9.5)	0.33	0.93	71	28.4	13.4	Bife-d5
B-Cyfluthrin	6.0	18.0	87 (6.8)	88 (9.3)	0.72	2.4	78	28.2	15.0	Cyflu-d6
λ -Cyhalothrin	6.0	18.0	76 (10.6)	76 (9.5)	0.59	1.2	47	12.7	7.0	Cyper-d6
Cyphenothrin	6.0	18.0	77 (12.4)	71 (9.5)	1.1	1.5	75	9.9	3.1	Cyflu-d6
Cypermethrin	30.0	90	76 (7.9)	76 (7.5)	2.2	4.2	61	13.6	17.3	Cyper-d6
Deltamethrin	6.0	18.0	86 (8.4)	83 (5.2)	0.63	1.3	59	27.2	9.8	Delta-d5
Dicyclanil	6.0	18.0	82 (6.8)	87 (8.5)	0.71	1.27	51	7.9	-	No IS used
Diflubenzuron	600	1800	88 (7.4)	96 (16.5)	83	281	48	21.1	-	No IS used
Fenpropathrin	6.0	18.0	87 (4.9)	87 (9.5)	0.51	1.6	44	10.5	10.0	Fenva-d5
Fenvalerate	6.0	18.0	81 (6.9)	80 (9.0)	0.83	1.9	38	11.2	13.0	Fenva-d5
Flucythrinate	6.0	18.0	96 (3.6)	95 (5.0)	0.57	1.0	50	16.8	13.7	Delta-d5
Flumethrin	6.0	18.0	90 (13.0)	81 (11.5)	0.92	2.3	80	20.3	11.5	Bife-d5
Permethrin	6.0	18.0	86 (8.8)	81 (7.6)	0.57	1.8	77	20.5	13.3	Bife-d5
Phenothrin	6.0	18.0	57 (10.2)	57 (10.0)	0.38	1.1	49	16.7	10.8	Fenva-d5
Phenthoate	6.0	18.0	108 (3.4)	112 (8.9)	1.1	2.2	41	10.2	18.2	Delta-d5
Pyrethrin I,II	6.0	18.0	85 (8.8)	85 (10.2)	0.54	1.6	44	10.4	15.3	Fenva-d5
Resmethrin	6.0	18.0	83 (8.3)	78 (7.4)	0.54	1.2	71	22.3	13.0	Bife-d5
τ -Fluvalinate	6.0	18.0	82 (9.6)	83 (8.7)	0.59	1.5	73	27.1	19.2	Cyflu-d6
Tetramethrin	6.0	18.0	81 (6.9)	82 (6.6)	0.72	1.4	23	8.0	-	No IS used

IS = internal Standard

Table 4

Within-laboratory repeatability (WL_r) and within-laboratory reproducibility (WL_R) validation results. $CC\alpha$, $CC\beta$ and linearity data (lower value obtained during validation procedure).

Analyte	Validation Level (VL) $\mu\text{g kg}^{-1}$	WL_r (n=8)			WL_R (n=8)			(n=24)		(n = 6)
		Trueness% (RSD%)			Trueness% (RSD%)			$CC\alpha$	$CC\beta$	Linearity
		0.5 x VL	1.0 x VL	1.5 x VL	0.5 x VL	1.0 x VL	1.5 x VL	$\mu\text{g kg}^{-1}$		R^2
Acrinathrin	10	88 (10.9)	91 (7.2)	95 (10.6)	94 (22.2)	98 (18.2)	101 (23.7)	13.4	21.8	0.9927
Allethrin I	10	108 (10.3)	103 (7.9)	105 (9.7)	95 (9.3)	110 (11.5)	95 (19.6)	12.9	19.2	0.9948
Azamethiphos	10	107 (17.3)	109 (7.2)	122 (10.0)	180 (55.3)	108 (44.1)	141 (38.5)	13.0	29.0	0.9904
Bifenthrin	10	94 (14.7)	93 (12.8)	92 (12.4)	103 (15.0)	102 (6.5)	101 (4.1)	11.1	12.2	0.9989
β -Cyfluthrin	10	104 (7.0)	99 (8.9)	99 (6.1)	100 (9.8)	102 (6.0)	99 (4.6)	11.0	12.1	0.9903
λ -Cyhalothrin	10	107 (6.0)	106 (7.5)	114 (9.9)	117 (21.1)	121 (13.7)	114 (15.5)	13.1	17.0	0.9893
Cyphenothrin	10	89 (14.2)	89 (13.8)	97 (12.1)	106 (34.0)	100 (30.9)	108 (29.8)	13.8	25.4	0.9939
Cypermethrin	50	93 (4.5)	97 (5.0)	93 (7.7)	103 (9.6)	103 (11.1)	100 (11.9)	58	74	0.9932
Deltamethrin	10	103 (4.9)	103 (5.0)	101 (7.4)	98 (11.5)	107 (6.5)	102 (5.7)	11.5	12.7	0.9909
Dicyclanil	10	133 (9.9)	125 (6.6)	115 (5.7)	92 (21.7)	102 (16.2)	103 (15.9)	12.6	16.6	0.9961
Diflubenzuron	1000	118 (11.9)	108 (9.9)	109 (17.2)	112 (16.7)	112 (16.4)	100 (22.9)	1498	2614	0.9939*
Fenpropathrin	10	103 (8.1)	102 (9.4)	103 (7.1)	96 (12.7)	101 (9.0)	100 (6.4)	10.9	12.3	0.9943
Fenvalerate	10	93 (7.9)	102 (6.4)	103 (7.8)	108 (13.6)	103 (8.8)	103 (9.1)	11.0	13.1	0.9918
Flucythrinate	10	102 (11.2)	98 (10.5)	94 (9.7)	106 (5.9)	95 (9.2)	101 (9.3)	10.5	12.4	0.9949
Flumethrin	10	95 (10.4)	88 (8.4)	89 (9.9)	110 (9.6)	94 (12.5)	92 (14.7)	12.0	16.3	0.9917
Permethrin	10	107 (7.1)	97 (6.9)	102 (7.6)	104 (13.7)	97 (12.8)	94 (10.1)	13.3	16.3	0.9926
Phenothrin	10	96 (9.6)	99 (5.1)	98 (4.1)	92 (12.7)	99 (9.8)	96 (9.1)	12.0	14.1	0.9939
Phenthoate	10	101 (20.2)	99 (14.6)	100 (13.4)	114 (15.5)	96 (12.0)	100 (10.8)	10.2	12.6	0.9922
Pyrethrin I,II	10	106 (6.2)	102 (11.6)	103 (8.4)	99 (12.0)	103 (10.2)	100 (6.6)	11.1	12.5	0.9955
Resmethrin	10	94 (9.0)	88 (5.5)	87 (8.7)	97 (15.4)	97 (14.7)	93 (12.6)	14.0	17.7	0.9941
τ -Fluvalinate	10	108 (12.6)	102 (12.1)	101 (9.8)	96 (15.1)	99 (14.2)	96 (12.9)	12.7	16.2	0.9954
Tetramethrin	10	110 (11.3)	102 (10.5)	103 (12.4)	99 (11.7)	107 (9.1)	98 (12.5)	12.4	15.5	0.9942

WL_r (Within-Laboratory repeatability): 3 runs on 3 different days by one analyst.

WL_R (Within-laboratory reproducibility): 3 runs on 3 different days by three different analysts. * R^2 for diflubenzuron using quadratic mode.

Supplementary material

Vibration extraction QuEChERS for analysis of antiparasitic agents in fish by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

Lenise Guimarães de Oliveira^{a,b}, Abilasha Ramkumar^a, Mary Moloney^a, Márcia Helena Scherer Kurz^b, Fábio Ferreira Gonçalves^b, Osmar Damian Prestes^c, Martin Danaher^b

^a Food Safety Department, Teagasc Food Research Centre, Ashtown, Dublin 15, Ireland

^b Laboratory for Analysis of Residues and Contaminants (LARCO), Post-graduate Program in Technological and Environmental Chemistry, Chemistry and Food School, Federal University of Rio Grande, RS, 95500-000, Santo Antônio da Patrulha - RS, Brazil

^c Laboratory of Pesticides Residue Analysis (LARP), Chemistry Department, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria - RS, Brazil

Correspondence:

Universidade Federal do Rio Grande – FURG. Bairro Cidade Alta, Rua Barão do Caí 125, CEP 95500-000, Santo Antônio da Patrulha, RS, Brasil.

email: leniseoliveira@furg.br; +55 (51) 36627805

S1 Development of sample preparation procedure

S1.1 Vibrational shaking system

A vibrational shaking apparatus comprising by a ceramic homogeniser and minimix (vibrational shaking system) were used in sample preparation procedure. The samples (36) were placed in test tube racks (n=3) and submitted to unattended extraction. This system allows the extraction of 36 samples at the same time under strong and continuous agitation (fixed in 700 rpm). The shaking time can be adjusted to give the desired extraction efficiency. The Fig. A shows the vibrational system used in sample preparation protocols.



Fig. A. Vibrational extraction system used for unattended extraction. (1) operating light, (2, 3 and 4) shaking speeds, (5) start/stop and (6) emergency stop.

S1.2 Challenges in clean-up procedure

Given fish tissues are primarily composed of water, proteins and lipids [47], different sorbents were tested to determine the effect of each one during the clean-up step to

remove matrix interferences (co-extractives). The procedures described below were carried with three species of fish: sea bass, trout and salmon. Evaluation of efficiency using different sorbents in clean-up procedure was achieved using weighing the amount of matrix extracted (gravimetric analysis) and visual inspection of the dryness extract colour. A similar approach was taken by Sapozhnikova and Lehotay [38] to determine the efficiency of C₁₈/PSA, Z-Sep and Z-Sep+ in dispersive-SPE for catfish samples.

Samples (5 g) were extracted using acetonitrile (10 mL) and water (5 mL). A salting out procedure using NaCl (1 g) and MgSO₄ (4 g) was performed and, after centrifugation (3500 rpm, 12 min), each fish extract were pooled separately into a beaker to guarantee that each sample had the same content of co-extractives to dispersive-SPE. Dispersive-SPE was carried with an aliquot of extract (10 mL), sorbent (0.5 g) and MgSO₄ (1.5 g). The sorbents tested were: primary secondary amine (PSA), C₁₈, Z-Sep, Z-Sep+, SiTi, SiTi (4%) C₁₈, a combination of Z-Sep + (0.5 g) and PSA (0.125 g). After a multi-tube vortexer (1 min), samples were centrifuged (2500 rpm, 10 min) and evaporated (6 mL, 45 °C) under N₂ flow until dryness.

The efficiency of Florisil® sorbent was verified through modified matrix solid phase dispersion. The extraction was carried using an aliquot of sample (5 g), acetonitrile (12 mL) and deactivated florisil® (5 g) without water addition. After salting out procedure (1 g of NaCl and 4 g of MgSO₄) and centrifugation (3500 rpm, 12 min) samples were evaporated. The dispersive-SPE was not applied in this approach.

A vibrational shaking apparatus comprising by a ceramic homogeniser and minimix was used after extraction (8 min) and salting out (5 min) to avoid manually process.

A quality control sample (no clean-up, n=3) was also carried out for each fish without clean-up step for determination of efficiency of removal. Each sorbent was tested in triplicate (n=3). The average weight, RSD% were measured. The efficiency of removal was calculated according equations 1 and 2 below:

Equation 1

$$Removal (g) = final\ weight\ average_{without\ clean-up\ step} - final\ weight\ average_{with\ clean-up\ step}$$

Equation 2

$$Efficiency (\%) = \frac{removal}{final\ weight_{without\ clean-up\ step}} \times 100$$

S1.3 Challenges in extraction procedure

Considering the most relevant sorbents, two different protocols were suggested (here called protocol A and B) and carried only for salmon (validation matrix). The protocol A is basically a modified Quechers based on the method described by Whelan et al. [42] and protocol B a modified matrix solid phase dispersion based on the method described by Moloney et al. [32]. The proposed protocols were focused on reducing time of analysis, increasing sensitivity and making the method easier to execute.

The extraction and salting out procedure in protocol A and B are quite similar with those described in challenges in clean-up procedure, with the exception of the portion of MgSO₄ in protocol B (1 g). The freezing out step (- 20 °C, 1h) was included only in protocol A and an aliquot of 250 µL of ethylene glycol was used as a solvent for analysis by UHPLC-MS/MS in both procedures. The protocols A and B are represented in detail in Fig. B.

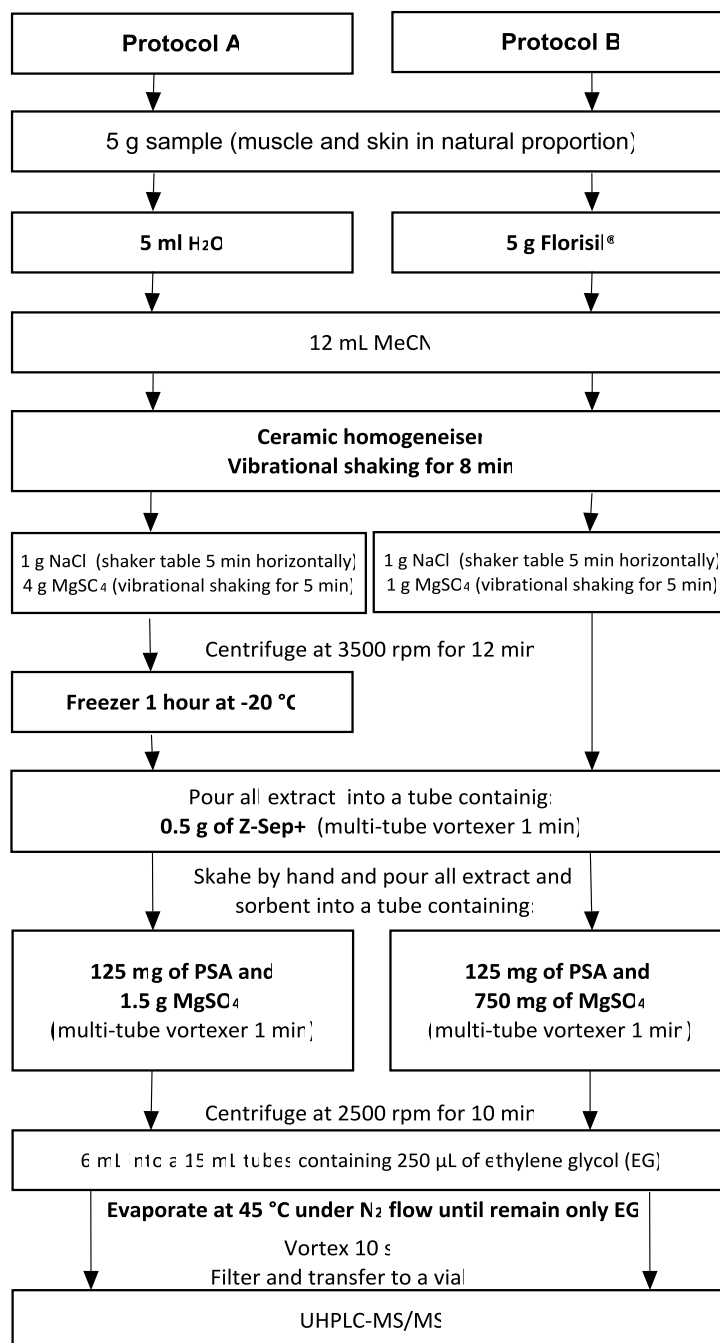


Fig. B. Representation of extraction protocol A and B for salmon samples.

The results of both methods were compared between them and with the current method used in the laboratory for analysis of pyrethroids and pyrethrins in animal fat, described by Moloney et al. [32], but applied in salmon samples (here called protocol C). In protocol C an aliquot of 1 g of sample was blended with deactivated florisil using a

stainless spatula manually until the formation of a free flowing powder. After adding 20 mL of acetonitrile, samples were placed horizontally in a shaker table at 80 oscillations min^{-1} for 5 min. After centrifugation (3500 rpm, 10 min, 4°C), samples were placed in a freezer and kept overnight. The supernatant was poured into a tube containing 0.5 g of Z-Sep+ and 0.125 g of PSA. An aliquot of 10 mL was transferred after centrifugation into a 15 mL tubes containing 0.5 mL of ethylene glycol and concentrated in a turbovap under flow of N_2 until only ethylene glycol remained. Samples were vortexed, filtered and injected into UHPLC-MS/MS system.

Linearity was measured using 8 concentration levels, from 2.5 to 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, precision and trueness at a concentration of 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=20) and recovery at low and high levels (10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectively, n=2). The most relevant method was selected for validation in salmon samples.

4. CAPÍTULO 2 – ARTIGO II

Development and validation of a method for the analysis of pyrethroid residues in fish using GC-MS

Lenise Guimarães de OLIVEIRA*^a, Márcia Helena Scherer KURZ^a, Marlon Cezar Maciel GUIMARÃES^a, Manoel Leonardo MARTINS^a, Osmar Damian PRESTES^b, Renato ZANELLA^b, Joaquim Neves da Silva RIBEIRO^c and Fábio Ferreira GONÇALVES^a

^aLaboratory of Analysis of Residues and Contaminants (LARCO), Post-graduate Program in Technological and Environmental Chemistry, Chemistry and Food School, Federal University of Rio Grande, RS, 95500-000, Santo Antônio da Patrulha - RS, Brazil

^bLaboratory of Pesticides Residue Analysis (LARP), Chemistry Department, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria - RS, Brazil

^cCenter for Coastal, Limnological and Marine Studies, Federal University of Rio Grande do Sul, 95625-000, Imbé – RS, Brazil

*email: leniseoliveira@furg.br; +55 (51) 36627805

Abstract

A method was developed and validated for the analysis of eighteen pyrethroids in fish using a modified version of the QuEChERS method. Samples were extracted with acetonitrile and Ultra-Turrax, followed by a salting out procedure using sodium chloride and magnesium sulphate. A clean-up procedure was performed by freezing samples overnight followed by dispersive solid phase extraction (d-SPE). The combination of C₁₈, PSA and Z-Sep+ was optimized using a mixture design approach. After concentration, the samples were analysed using gas chromatography mass spectrometry. The method was validated using trahira samples according to the 2002/657/EC and SANTE/11813/2017 guidelines. A scope extension was performed for tilapia and tainha samples. Recoveries ranged from 71.4 to 106.6% for trahira, 67 – 110% for tilapia and 63 – 129% for tainha samples. This study also produced information about the effects of different sorbents, C₁₈, PSA, florisil, celite and Z-Sep+ for co-extractive removal. The method was successfully applied to fourteen real samples from Southern Brazil.

Keywords: pyrethroids; fish; GC-MS; dispersive-SPE; mixture design.

1. Introduction

The use of pyrethroids is widespread worldwide in different sectors (Corcellas, Eljarrat & Barceló, 2015). Despite the low persistence of pyrethroids in the environment (90 days), a large number of papers have described presence of residues in different matrices, such as water, sediment (Feo, Ginebreda, Eljarrat & Barceló, 2010), seaweeds (García-Rodríguez, Cela-Torrijos, Lorenzo-Ferreira & Carro-Díaz, 2012), tea (Hou, Zheng, Zhang, Ma, Ling & Zhao, 2014), marine mammals (dolphins) (Alonso et al., 2012), breast milk (Corcellas et al., 2012), foodstuff (beef, chicken, eggs, fish and milk)

(Dallegrave, Pizzolato, Barreto, Eljarrat & Barceló, 2016) and fish (Corcellas et al., 2015).

Pyrethroids are used in agriculture and non-agricultural pest control, including fish farms, in veterinary medicine (against lice and scabies), as domestic pesticides and the control of mosquitos in urban areas, as well as in personal care products (shampoo and mosquito repellent perfume) (Langford, Øxnevad, Schøyen & Thomas, 2014; Corcellas et al., 2015; Tang et al., 2018). The residues enter the aquatic environmental by rain scouring and soil percolation (Tang et al., 2018) or through intentional application in fish farms (Langford et al., 2014). Due their hydrophobic characteristics, these pesticides are present in sediments, suspended particles and aquatic organisms. Fish exposure occurs through gill sorption or food webs (Alonso et al., 2012). These pesticides also enter the human body through different ways that are influenced by age, location (agricultural or non-agricultural areas), food consumption and food chains (Tang et al., 2018; Ye, Beach, Martin & Senthilselvan, 2015).

Pyrethroid pesticide residues are very toxic to aquatic organisms, particularly arthropods and fish. They should be safe for mammals due to the conversion to non-toxic metabolites (Tang et al., 2018; Alonso et al., 2012). However, low-dose and long-term exposure exerts toxic effects on the nervous, immune, cardiovascular and genetic systems (Ma, 2009). Pyrethroid exposure is also related to adverse effects on the male reproductive system (Koureas, Tsakalof, Tsatsakis & Hadjichristodoulou, 2012), sperm aneuploidy (Radwan et al., 2015), an increased risk of childhood brain tumours (Chen et al., 2016), childhood acute lymphocytic leukaemia (Ding et al., 2012) and coronary disease (Han et al., 2017).

Maximum limits of residues in food have been established to protect the health of human consumers. In Brazil, the Secretary of Animal and Plant Health of the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply annually publishes the sampling plan and the reference limits for the National Residue & Contaminants Control Plan – NRCCP. The limit for pyrethroids (allethrin, bifenthrin, cifluthrin, cypermethrin, fenpropathrin, phentoate, fenvalerate, λ -cyalothrin, permethrin and promethrin) in farmed fish established in 2018 was $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Only deltamethrin presented a limit value of $30 \mu\text{g kg}^{-1}$, which was 3 times higher than established limit in the European Union (Normative Instruction No 20, 2018; Regulation (EU) No 37/2010).

The QuEChERS (“quick, easy, cheap, effective, rugged and safe”) procedure has been applied in a significant number of samples, analytes and instruments, providing high recoveries. This technique permits the analysis of a large number of samples and pesticides in basically 3 steps: extraction, salting out and clean-up (QuEChERS, 2018). A modified QuEChERS method has been reported for analyses of pyrethroids in fish using C_{18} , PSA and Z-Sep as sorbents in dispersive-SPE (Sapozhnikova & Lehotay, 2013; Munaretto, Ferronato, Ribeiro, Martins, Adaime & Zanella, 2013; Rawn, Judge & Roscoe, 2010). Gas chromatography is generally used to analyse pyrethroids in different matrices due their volatile properties. Electron-capture detection (ECD) and mass spectrometry are commonly used detectors (Tuck, Furey, Crooks & Danaher, 2018).

The goal of this study was to develop and validate a precise, reproducible and robust method for the analysis of eighteen pyrethroid residues in fish samples that are commonly consumed in the State of Rio Grande do Sul: trahira (*Hoplias malabaricus*), tainha (*Mugil cephalus*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*). A modified QuEChERS

method was optimized to obtain information about the effects of low temperature and different sorbents used in dispersive-SPE as clean-up procedures for fish samples. The optimization of a ternary combination of sorbents using mixture design was described and successfully applied as a tool to optimize the sample preparation procedure. We specifically focused on sample preparation to achieve low concentrations of the pyrethroids, due the low limits established for fish in Brazil and Europe.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals and Apparatus

LC-grade acetonitrile (MeCN) and the C₁₈, PSA and Z-Sep+ sorbents were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Celite was supplied by Synth (Brazil), magnesium sulphate by Alphatec (Brazil) and sodium chloride by J.T. Baker (USA). Florisil 60–100 mesh was sourced from J.T. Baker (USA) and deactivated at 675°C. Ultra-pure water (18.2 MΩ cm⁻¹) was generated in house using a Millipore purification system (Germany). An Ultra-Turrax (IKA, Germany), vortex model QL-901 (Biomixer, Brazil), ATX224 precision analytical balance (Shimadzu, Japan), orbital shaker table (Oxylab, Brazil), NT-825 centrifuge (Nova Técnica, Brazil), TecVapTE-0194 sample concentrator (Tecnal, Brazil) coupled with nebulizer as an air source (Nevoni, Brazil), high speed centrifuge (Nova optical systems, Brazil) and Walita food processor (Philips, Brazil) were used in the present study.

Chromatographic separations were performed using a Perkin Elmer Clarus 680 GC system (Perkin Elmer, USA) with a VF-5-MS capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm – 5% phenyl 95% dimethylpolysiloxane) (Agilent, USA). The chromatography system was coupled to a Clarus 600 T quadrupole mass spectrometer (Perkin Elmer, USA) operating in selected ion recording (SIR) mode. The injection volume was 3 μL of

purified sample extract. The injector operated in splitless mode programmed at 100 °C (hold for 0.15 min), ramped to 280 °C at a rate of 200 °C min⁻¹ (hold for 18.9 min), and ramped to 300 °C at a rate of 20 °C min⁻¹ (hold for 4.1 min). The oven temperature program was set to an initial temperature of 100 °C (1 min hold), ramped to 150 °C at a rate of 8.3 °C min⁻¹, then ramped to 280 °C at a rate of 20 °C min⁻¹ (5 min hold), and ramped to 300 °C at a rate of 20 °C min⁻¹ (hold for 5.48 min), resulting in a runtime of 25 min. The GC inlet line temperature was set to 300 °C, the electron impact ionization (EI) was achieved at 70 eV and the ion source temperature was set to 250 °C. Helium, purity > 99.999% (Air products, Brazil), was used as the carrier gas at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The SIR mode using three transitions for each compound with a dwell time of 0.020 ms was divided into 11 time windows guided by the individual retention times, as shown in Table 1. The acquisition mode was set from 10 min to 18.9 min. A full scan in *m/z* range from 50 to 600 Da was used for the identification of possible interferences from the matrix extract. The acquisition mode was set from 5 min to 20 min. The data were acquired by Turbo Mass software version 5.4.2.1617.

Table 1

2.2 Standard preparation and calibration

Highly pure analytical standards of allethrin, bifenthrin, cyfluthrin, cypermethrin, λ -cyhalothrin, deltamethrin, etophenprox, esfenvalerate, fenvalerate, fenpropathrin, cis-permethrin, trans-permethrin, phenothrin, phentoate, τ -fluvalinate, tefluthrin, tetramethrin and transfluthrin were obtained from Dr.Ehrenstorfer (GmbH, Germany). Triphenyl phosphate was purchased from Sigma-Aldrich (USA) and was used to spike samples as an internal standard (IS) for some analytes prior to analysis using GC-MS.

Individual stock standard solutions were prepared at a concentration of 1 mg mL^{-1} using acetonitrile as a solvent. A working standard solution (WS A) containing all analytes was prepared from stock standard solutions at 10 mg L^{-1} . A second working standard solution (WS B) was prepared by diluting WS A to 1 mg L^{-1} . WS B was used to prepare the matrix-matched calibrants spiked after extraction in concentrations ranging from 5 to $100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$. WS A and B were also used to spike samples before extraction during validation study at concentrations of 5, $10 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ (WS B) and $75 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ (WS A). Both WS solutions were prepared in acetonitrile and stored in amber vials at -20°C .

2.3 Development of sample preparation

QuEChERS was used as a basis for this study due to the versatility of this method (QuEChERS, 2018). Because the fish matrix is mainly composed of lipids, proteins and water (USDA, 2018), low temperature (freezing) and dispersive-SPE were optimized for the clean-up procedure.

The extraction was performed using 10 g of tilapia (skin and muscle in natural proportions) and 10 mL of acetonitrile in 50 mL polypropylene tubes and then processed using Ultra-Turrax. Samples were placed horizontally on a shaker table and incubated at 180 rpm for 20 min. The salting out procedure was performed using 4 g of MgSO_4 and 1 g of NaCl. Samples were placed in a vortex for 30 s and submitted to centrifugation at 5000 rpm for 5 min. The extraction and salting out procedures described here were applied to all samples during sample preparation optimization steps.

2.3.1 Clean-up procedure using a low temperature

After completing the extraction and salting out procedures described above, the extracts were poured into a beaker for homogenization and low temperature optimization. A 1

mL aliquot of homogenized extracts was transferred to a 1.5 mL Eppendorf tube that had been previously weighed. Samples were incubated at a low temperature (-20°C) for 1, 2 or 12 hours. After freezing, samples were centrifuged in a high speed centrifuge at 10000 rpm for 15 min. An aliquot of each sample was transferred to a vial and injected into the GC-MS system. The Eppendorf tube containing the matrix precipitate and solvent was incubated in a fume hood for 2 days at ambient temperature to ensure that all solvent had evaporated. The Eppendorf tubes containing only the matrix precipitate were weighed. The experiment was performed in triplicate ($n=3$), where 3 samples were spiked at a concentration of $100\ \mu\text{g}\ \text{kg}^{-1}$ before freezing (designated R samples) and 3 samples were spiked after freezing and prior to analysis (TS). An aliquot of the spiked samples was injected into the instrument in SIR mode. Recoveries were measured dividing the R areas by TS areas and multiplying the value by 100. The relative standard deviation (RSD%) was measured for R samples. A blank sample (without fortification) was also submitted to low temperature optimization. The matrix precipitate was measured by subtracting the weight of the empty Eppendorf from the weight of the Eppendorf tube containing the matrix precipitate.

2.3.2 Dispersive-SPE clean-up procedure

After the extraction and salting out procedures described above (2.3), the extracts were poured into a beaker for homogenization and used for dispersive-SPE clean-up. Different sorbents were tested in the clean-up procedure using dispersive-SPE (d-SPE). The sorbents used were: C_{18} , PSA, Florisil, Celite and Z-Sep+. A 500 μL aliquot of homogenized extracts was transferred to a 1.5 mL Eppendorf tube containing 25 mg of sorbent and 75 mg of MgSO_4 for the d-SPE procedure. Samples were placed in a vortex for 30 s and submitted to centrifugation at 10000 rpm for 15 min. An aliquot was

transferred to a vial and analysed using GC-MS in SIR mode. This approach was applied for each sorbent. The experiment was performed in triplicate ($n=3$), where 3 samples were spiked at a concentration of $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ before dispersive-SPE (designated R samples) and 3 samples were spiked after dispersive-SPE and prior to analysis (TS) for the measurement of recoveries $[(R/TS)*100]$ and precision (R samples). A blank sample (without fortification) was also extracted using each sorbent and injected in scan mode for identification by NIST 2008 mass spectral library search and chromatograms comparisons through peak shapes, signal intensity and peak area of fatty acid and cholesterol.

Based on the results from preliminary experiments, a combination of three sorbents was also tested: C_{18} , PSA and Z-Sep+. The approach described above was used; and three different combinations were tested. Combination 1 comprised 25 mg of PSA, 25 mg of C_{18} and 75 mg of MgSO_4 . Combination 2 contained 20 mg of PSA, 20 mg of C_{18} , 10 mg of Z-Sep+ and 75 mg of MgSO_4 . Combination 3 comprised 25 mg of C_{18} , 15 mg of PSA, 10 mg of Z-Sep+ and 75 mg of MgSO_4 . Recoveries, RSD% and fatty acid and cholesterol levels were measured and identified as described above.

2.3.3 Validation matrix

The same sample extraction and salting out procedures were applied to tilapia and trahira samples (described in 2.3). After centrifugation, samples were transferred to 15 mL polypropylene tubes and incubated overnight at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Samples were centrifuged at 5000 rpm for 15 min, 3 mL of the extract were transferred to a 15 mL polypropylene tube containing 200 mg each of C_{18} and PSA, 100 mg of Z-Sep+ and 450 mg of MgSO_4 . Samples were placed in a vortex for 30 s and centrifuged at 5000 rpm for 15 min. A 1 mL aliquot was transferred to a 50 mL polypropylene tube and concentrated at $45 \text{ }^\circ\text{C}$

under gentle air flow until complete dryness was achieved. Samples were reconstituted with 300 μL of acetonitrile and were injected into the GC-MS system. The sorbents proportions used in this experiment was based in the previous results but used 10 times higher due the volume used in d-SPE and concentration step. The experiment was conducted in triplicate ($n=3$), where 3 samples were spiked at a concentration of $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ before extraction (R samples) and 3 samples were spiked after extraction and prior to analysis (TS samples). Recoveries and RSD% were measured. A blank sample was also extracted and injected in scan mode for identification of fatty acid and cholesterol.

2.3.4 Optimization of dispersive-SPE by mixture design experiment

A mixture design experiment was used to define the best proportions of the combination of C_{18} , PSA and Z-Sep+ sorbents to remove interferences from the matrix and provide high recoveries. The mixture design experiment can be used for any number of components, but it is particularly useful for ternary studies (Ferreira et al., 2007). This model is designed using a triangle composed of 10 points (equivalent to 10 experiments), as shown in Figure 1. Each point at the vertex of the triangle represents a pure component or mixture of the components and was determined by experiments 1, 2, and 3 shown in Table 2. In these cases, the maximum proportion of one sorbent (400 mg) and the minimum proportions of the other two sorbents (100 mg) were used. Experiments 4, 5 and 6 were performed using 250 mg of a binary combination and a minimum concentration of the third sorbent (100 mg). These three points are represented by the centre points on each leg of the triangle. Experiments 7, 8 and 9 corresponded to the axial points of the triangle and were conducted using 2/3 proportions of one sorbent and 1/6 proportions of the other two sorbents. Experiment 10

represented the centre of the triangle and was achieved using 200 mg of each sorbent (1:1:1).

Table 2

The optimization of the sorbent combinations was achieved using results from the recovery experiment and the peak areas of the sources of interferences (sum of fatty acids and cholesterol) from the extract of trahira samples. The main objective was to determine the proportion at which the recoveries ranged from 70 to 120% for the majority of compounds and smaller areas were observed for the interfering compounds. A scale ranging from 0 to 10 was generated to process recovery data. Recoveries less than 75% and greater than 125% were set to scores less than 5. Recoveries ranging from 75 to 120% were set to a score greater than 6, and a score of 10 represented recoveries ranging from 95 to 100%. The quality of the quadratic or special cubic model was determined by calculating R^2 and performing an F-test. The factor and combinations were considered significant if p values were lower than 0.05. The F-test results for each compound were compared with tabulated F values at a 95% confidence level.

The mixture design required 10 experiments and each was performed as follows: one sample was spiked at a concentration of $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ before extraction (R sample), one sample spiked after extraction (TS sample), both of which were used for the measurement of recoveries, and a blank sample was used to identify sources of interference from the matrix extract. The procedure required 30 samples that were randomly divided into 10 experiments. An aliquot of each sample was injected in triplicate into the GC-MS system in SIR mode. A blank sample was injected in scan mode for identification of fatty acid and cholesterol.

2.4 Method performance

2.4.1 Samples and sample preparation

Samples of trahira were purchased from fish farms and a supermarket from southern Brazil. At least 100 g of fish fillets containing skin (previously cut in small pieces) and muscle in natural proportions were chopped using a food processor. An aliquot of 10 g \pm 0.10 g was weighted into a 50 mL polypropylene tube and frozen until further analyses. Samples were removed from the freezer at least 2 hours before extraction to ensure that they were completely thawed.

A 10 mL aliquot of acetonitrile was added to a 50 mL polypropylene tube containing 10 g of sample. Samples were processed using an Ultra-turrax until they were completely homogenized. Samples were placed horizontally on a shaker table and incubated at 180 rpm for 20 min. The salting out procedure was performed using 4 g of MgSO₄ and 1 g of NaCl, and then samples were placed in a vortex for 30 s. After centrifugation at 5000 rpm for 5 min, all supernatant was transferred to a 15 mL polypropylene tube and incubated at -20 °C in a freezer overnight. Samples were centrifuged at 5000 rpm for 15 min, and 3 mL of the extract was transferred to a 15 mL polypropylene tube containing 230 mg of C₁₈, 184 mg of PSA, 184 mg of Z-Sep+ and 450 mg of MgSO₄. Samples were placed in a vortex for 30 s and centrifuged at 5000 rpm for 15 min. A 1 mL aliquot of the extract was transferred to a 50 mL polypropylene tube and placed in a sample concentrator under gentle air flow at 45 °C until complete dryness was achieved. Samples were reconstituted with 300 μ L of acetonitrile, placed in a vortex and transferred into a vial for the injection of the extract into the GC-MS system.

2.4.2 Method Validation

The method was validated in accordance with the parameters and performance criteria outlined in SANTE/11813/2017 and Commission Decision (EC) No 657/2002. The selectivity of the method was verified by monitoring interference in the GC-MS traces from the matrix with the same retention time as the analytes using 17 different blank samples of trahira. A reagent blank was also analysed in each validation batch. The matrix effect was verified by comparing matrix-matched standards (from the calibration curve) and solvent standards, all of which were spiked prior to analysis at concentrations equivalent to 5, 10 and 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The matrix effect was determined by subtracting the areas of peaks from fortified extracts from the areas of peaks from the fortified solvent at the same concentration. The result was divided by the areas of peaks from the fortified solvent and multiplied by 100. Positive results indicated an enhanced ion signal and negative results indicated ion signal suppression.

Each batch analysed during the validation procedure comprised 25 samples. Eight samples were used for calibration curve divided into six levels of 5, 10, 25, 50, 75 and 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ using an extract of matrix blank spiked after extraction. The second and fifth concentrations of the calibration curve (10 and 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$) were analysed in duplicate and used for recovery measurements. Fifteen samples divided into three different levels (n=5) at 5, 10 and 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and spiked before extraction were used for precision, trueness and recovery (at 10 and 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$) measurements. One negative control (blank sample) and one reagent blank were also extracted. The linearity of the calibration curve was measured by calculating R^2 and considering a deviation $\leq 20\%$ of the back-calculated concentration from true concentration. The recovery was measured by dividing the areas (or the ratio of analytes areas by IS areas) of the samples spiked before extraction (n=5) by samples spiked after extraction (n=2) multiplied by 100 at two

levels: 10 and 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Precision was measured by calculating RSD% from 15 samples divided into three levels ($n=5$) as described above, during within laboratory repeatability (RSD_r) and within laboratory reproducibility (RSD_{WR}) measurements. The RSD_r measurement was performed by an analyst in 2 batches (two different days). The RSD_{WR} assessment was performed by two different analysts on two different days. Trueness was also evaluated during RSD_r and RSD_{WR} procedures.

2.4.3 Extension of the scope: new matrices

The scope extension was performed for samples from two different fish: tilapia and tainha. The scope extension for each fish was achieved by analysing 25 samples, as described above, on a different day. Linearity, matrix effect, recovery, trueness and precision were measured using the same approach described above.

3. Results and discussion

3.1 Clean-up procedure using a low temperature

The recoveries revealed that the freezing procedure at a low temperature did not affect the stability of the analytes remaining in the extract after the precipitation of lipids and proteins. The recoveries obtained at 1, 2 and 12h ranged from 89 to 101%, 91 to 107% and 85 to 104%, respectively. The relative standard deviation was less than 20% for all experiments. The average weight of matrix precipitation after freezing for 1, 2, and 12 h was 0.67 mg, 1.15 mg and 1.20 mg, respectively. Considering the recovery results and the precipitation from the matrix, two hours of freezing was satisfactory. However, considering the whole procedure, the sample preparation would be impossible to prepare in one day. Therefore, the freezing procedure was performed for 12 h (overnight).

Similar results were achieved by Chen et al. (2016) in a multiresidue method for the analysis of fish samples using a low temperature and solid-phase extraction as clean-up procedure. The extracts of samples were incubated at -24°C in a freezer for 20 min. Precipitated lipids were separated from the extract by filtration. According the authors, the tested pesticides were soluble even in cold acetonitrile. The procedure was repeated to increase the extraction. Satisfactory recoveries (90.2 to 113.7%) and precision (6.0 to 10.0%) were achieved. However, the LOD of the method for deltamethrin was $20\ \mu\text{g kg}^{-1}$, which is higher than value established in Regulation (EU) No 37/2010.

3.2 Dispersive-SPE clean-up procedure

The dispersive clean-up procedure was initially performed with 5 different sorbents. The relative standard deviation was less than 20% for all sorbents. Florisil was the unique sorbent that produced unsatisfactory recoveries ranging from 50 to 131%. The recoveries obtained using C_{18} , PSA and celite ranged from 76 to 107% and Z-Sep+ presented recoveries ranging from 62 to 76%. However, the scan chromatogram of a blank sample using Z-Sep+ displayed significantly greater removal of fatty acids (between 11 to 15 min) and cholesterol (19.7 min) compared with other sorbents, as shown in Figure 2. C_{18} was efficient for cholesterol removal and PSA for fatty acid removal. Considering the low recoveries of Z-Sep+, we suggested a combination of PSA (fatty acid removal) and C_{18} (cholesterol removal) that included Z-Sep+ (fatty acids and cholesterol) in a lower proportion. Recoveries using only a combination of 25 mg of C_{18} and 25 mg of PSA ranged from 88 to 112%, using a combination of 20 mg of C_{18} , 20 mg of PSA and 10 mg of Z-Sep+ ranged from 76 to 108% and a combination of 25 mg of C_{18} , 15 mg of PSA and 10 mg of Z-Sep+ ranged from 112 to 136%. The

chromatograms shown in Figure 2 also revealed improved removal of interferences when Z-Sep+ was used. Thus these results indicate that C₁₈, PSA and Z-Sep+ should be used in combination for adequate clean-up of extracts.

Fig 1. Reconstructed chromatogram in scan mode for identification of fatty acids (11 to 15 min) and cholesterol (around 19.7 min) by NIST 2008 mass spectral library search in blank tilapia samples using celite, florisil, C₁₈, PSA, Z-Sep+, combination 1 (25 mg C₁₈ and 25 mg PSA), combination 2 (20 mg C₁₈ and 20 mg PSA and 10 mg Z-Sep+) and combination 3 (25 mg C₁₈, 15 mg PSA and 10 mg Z-Sep+) as a sorbent in optimization of dispersive-SPE cleanup procedure.

The sorbent C₁₈ is recommended for fatty acids, cholesterol and lipophilic compounds (Kinsella et al., 2009; Sapozhnikova et al., 2013). PSA is generally used to remove polar compounds, such as organic acids, fatty acids (with hydrogen bonding properties), polar pigments, carbohydrates and sugars (Anastassiades, Lehotay, Stajnbaher & Schenck, 2003). A combination of C₁₈ and PSA has already been reported for the analysis of pyrethroids in fish using gas chromatography. Rawn et al. (2010) developed a method for the analysis of pyrethroids and pyrethrins in fish, including tilapia. A combination of C₁₈ (50 mg) and PSA (50 mg) was used in dispersive-SPE with 1 mL of extract. Munaretto et al. (2013) developed a multiresidue method for fish fillets. Good recoveries (75.9 - 98.9%) and precision (3.8 - 19.1%) for bifenthrin and cis and trans-permethrin were achieved with matrix effect ranging from 22.5 to 35.9%. Chung and Lam (2012) also developed a method for analysing pyrethroids and metabolites of dithiocarbamates using a combination of C₁₈ and PSA for different food samples with a fat content greater than 2%. Sapozhnikova et al. (2013) developed a dispersive-SPE procedure using a combination of C₁₈ and PSA, Z-Sep and Z-Sep+. The combination of

C₁₈/PSA achieved the best removal of co-extractives; however, Z-Sep yielded a lower background level in the scan chromatogram. Moloney, Tuck, Ramkumar, Furey and Danaher (2018) published a method for the analysis of pyrethroids and pyrethrins in fat and achieved satisfactory results using a combination of PSA and Z-Sep+. During dispersive-SPE optimization, the use of C₈, C₁₈, NH₂, florisil, PSA, PSA/C₁₈, Z-Sep and Z-Sep+ was compared.

Considering the previous results and cited references, the required amounts of C₁₈, PSA and Z-Sep+ for 3 mL fish extract clean-up through for dispersive-SPE was investigated by mixture design experiment and described in 3.4 section.

3.3 Validation matrix

Before executing mixture design optimization, two different fish samples (tilapia and trahira) were used to verify the efficiency of the procedure. The recoveries for tilapia samples ranged from 77 to 120% and from 84 to 112% for trahira. A comparison of the scan chromatograms revealed a higher concentration of cholesterol (19.7 min) in tilapia samples. However, trahira samples presented greater interferences from the fatty acids, which elute from 11 to 15 min, the same retention time as most of the compounds. Therefore, trahira samples were chosen for the mixture design experiment.

3.4 Optimization of dispersive-SPE by mixture design experiment

Tefluthrin, allethrin, tetramethrin, phenothrin, cis-permethrin, trans-permethrin, and etofenprox were analysed using the quadratic model and exhibited R² values ranging from 0.7192 to 0.9064 and F-test results that were 4.7 and 17.8 times higher than tabulated F values. Transfluthrin, phentoate, cyfluthrin, τ-fluvalinate, deltamethrin and λ-cyhalothrin were analysed using the special cubic model. The R² values ranged from 0.6999 to 0.8525, with F-test results that were 3.5 and 8.8 times higher than tabulated F

values. The mixture design not explained the response behaviour for cypermethrin, fenvalerate, esfenvalerate and fenpropathrin using quadratic and cubic models. All parameters were measured using software Statistic version 10.

The response surfaces exhibited higher recoveries when C₁₈ was used in higher proportions, followed by PSA and Z-Sep+. It can be verified through analysis of cyfluthrin (A) and deltamethrin (B), as shown in Figure 1, where the red colour (high recoveries) was located between the centre point (1:1:1) and axial point, near to the C₁₈ maximum. Tetramethrin, cis-permethrin and etofenprox exhibited better recoveries with the minimum proportion of Z-Sep+, as shown in Figure 1 for cis-permethrin (C). In these cases, the red colour is located close to the centre point in the leg of the triangle, which represents the same proportions of C₁₈ and PSA and the minimum proportion of Z-Sep+. The response surface for interferences from the matrix (D) indicated that the lowest concentrations of interfering compounds were achieved when the three sorbents were used in the same proportions (centroid point). The highest concentrations for interferences were achieved when maximum of PSA and minimum of C₁₈ and Z-Sep+ were used probably because PSA is not efficient for lipids removal. After considering the best proportion for each analyte and the average between the same sorbent for different analytes, the final proportion was near to the 2/3 for C₁₈, 1/6 for PSA and 1/6 for Z-Sep+ and the centroid point. The proportion of sorbents was calculated by best fit model using scale attributes and was set to 230 mg of C₁₈, 184 mg of PSA and 184 mg of Z-Sep+.

Fig 2. Mixture design achieved using C₁₈, PSA and Z-Sep+ during dispersive-SPE step in extracts of trahira samples considering 95% of confidence level. Special cubic model

was applied for cyfluthrin (A), deltamethrin (B) and interferences from the matrix (fatty acids and cholesterol) (D). Quadratic model was applied for cis-permethrin (C).

3.5 Method performance

3.5.1 Selectivity, matrix effect and linearity

No matrix interferences were observed at the same retention time as the analytes in an analysis of 17 different blank trahira samples and a reagent blank in all validation batches. Matrix effects were analysed at three levels (5, 10 and 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and enhanced ion signals were observed for all compounds, except for fenpropathrin, in which the ion signal suppression ranged from -3 to -35%. The smallest effects were achieved for transfluthrin and tefluthrin which ranged from 44 to 72% and 56 to 88%, respectively. Because the matrix effect was greater than 20% for all analytes, the calibration curve was constructed using matrix-matched standards. Linearity was verified in all batches by calculating R^2 , which was greater than 0.98, and through the deviation of the back calculation, which was $\leq \pm 20\%$ of the true concentration.

3.5.2 Recovery, precision and trueness

The recoveries of trahira samples were assessed at low and high level using RSD_r and RSD_{wR} assays. RSD_r study recoveries ranged from 81.4 to 106.6% and 71.4 to 88.7% at 10 and 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. Trueness and precision were determined by analysing 15 samples at three levels: 5, 10 and 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ($n=5$). The trueness ranged from 75 and 112% for RSD_r and from 75 to 120% for RSD_{wR} , with $\text{RSD}\%$ ranging from 3.8 - 20.3%, except for tefluthrin (22.8% at 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$), and between 3.7 - 18.3%, except for tefluthrin (21.2% at 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$), respectively, as shown in Table 3. Considering the trueness and precision results, the LOQ of the method was 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$, except for tefluthrin (10 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

During the validation procedure, the use of an internal standard was verified for all analytes. Tefluthrin and transfluthrin produced unsatisfactory results when the ratio between analyte areas and IS areas was used. This discrepancy was explained by matrix effect results revealing different influences of the matrices for these compounds compared to others, probably because these compound eluted at 10.75 and 11.25 min, respectively (before the elution of most fatty acids). The measurement of validation parameters was calculated using the IS for all analytes, except for tefluthrin and transfluthrin.

Table 3

3.5.3 Extension of the scope of the method: new matrices

No matrix interferences were observed at the same retention time as the analytes in analyses of blank tilapia, blank tainha and reagent blank samples. The matrix effect study revealed ion enhancement for all analytes in tainha and tilapia extracts when we compared the areas from solvent standards and matrix-matched standards. When we compared the matrix effects between fish samples, the tilapia extract showed lower matrix effects ranging from 1 to 176%. Tainha and trahira extracts exhibited higher matrix effects, particularly for cypermethrin, fenvalerate, esfenvalerate, cyfluthrin, deltamethrin, τ -fluvalinate and λ -cyalothrin. Only phentoate displayed a higher matrix effect in trahira samples than in tainha samples. Due to the matrix effect, calibration curves were prepared using matrix-matched calibrants at six levels. The R^2 value was greater than 0.98 and the deviation of the back calculation was $\leq \pm 20\%$ of the true concentration. Recoveries ranged from 72 to 109% at $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ and from 67 to 110% at $75 \mu\text{g kg}^{-1}$ in tilapia samples. Recoveries for tainha samples ranged from 74 to 129% at

10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and from 63 to 128% at 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$, except for cypermethrin (153% at 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

The trueness and precision ranged from 70 to 119% and from 2.0 to 21.5%, respectively, in tilapia samples analysed at three levels (5, 10 and 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Only phenothrin yielded unsatisfactory results for trueness (24%) and precision (62.2%) at 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The trueness at 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ was 59% with an RSD of 6%. Considering the results for trueness and the precision, the LOQ for tilapia samples was 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$, except for phenothrin (10 $\mu\text{g kg}^{-1}$). According to SANTE, the trueness must range from 70 to 120%. However, when the value is outside this range, it can be accepted if it is consistent, achieving an RSD $\leq 20\%$ and trueness that is no less than 30% or greater than 140%. In these cases, the recovery must be corrected during routine analysis.

Results for the trueness and precision of tainha samples were unsatisfactory for cypermethrin, fenprothrin, phenothrin, and λ -cyalothrin at 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$. In these cases, the LOQ was set to 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. With the exception of these analytes, the precision and trueness ranged from 61 to 126% and 1.6 to 18.2%, respectively. The results for tainha samples were worse than other fish samples, probably due the higher contents of lipids, which are approximately 2.5 times higher than tilapia samples (Andrade, Bispo & Druzian, 2009; USDA, 2018).

3.5.4 Comparison with other published methods

Similar results were described by Rawn et al. (2010), who used the QuEChERS method to analyse pyrethrins I and II, cypermethrin and deltamethrin in different fish samples using gas chromatography. A 5 g aliquot of samples was submitted to extraction with 5 mL of 1% glacial acetic acid in MeCN, and a salting out procedure was performed with 2 g of MgSO_4 and 0.5 g sodium acetate. Dispersive-SPE was performed using 1 mL of

the extract, 50 mg each of C₁₈ and PSA and 150 mg of MgSO₄. Recoveries for salmon samples ranged from 70 to 115% and precision ranged from 2.5 to 14%. However, recoveries (from 89 to 274%) for salmon, crab, marlin, shrimp and tilapia calculated using the calibration curve for salmon were higher than those achieved for salmon, Arctic char, trout, mussels and oyster. When higher levels of recoveries were removed, the calculated recoveries ranged from 105 to 115%.

Chatterjee et al. (2016) developed a method for the analysis of multiple classes of pesticides in fatty fish using GC-MS/MS. Twelve pyrethroids were analysed using fish meat (5 g), distilled water (5 mL), acetonitrile, and 1% acid acetic (15 mL), followed by three-phase partitioning with hexane (2 mL). After the addition of MgSO₄ (6 g) and sodium acetate (1.5 g), the extract (1.5 mL of organic layer) was submitted to two-stage dispersive solid phase extraction. The first stage used CaCl₂ (100 mg) and MgSO₄ (150 mg), and the second stage used PSA (50 mg), florisil (50 mg), C₁₈ (150 mg) and MgSO₄ (150 mg). Recoveries for pyrethroids ranged from 65 to 119% and precision ranged from 1 to 9%. Chen et al. (2009) also developed a multiresidue method, including deltamethrin, for analysing fish samples using low-temperature clean-up and solid phase extraction followed by GC-MS. The extraction was performed using 10 g of sample and 20 mL of MeCN. Solid phase extraction was performed using 39 mL of acetonitrile-toluene (3:1) for each sample in the clean-up procedure and the eluate was evaporated and dissolved in hexane (1mL). The LOD for deltamethrin was set to 20 µg kg⁻¹, recoveries ranged from 78.7 to 113.7% and precision was less than 10% at 20, 50 and 100 µg kg⁻¹.

Sapozhnikova et al. (2013) developed a multi-class, multiresidue analytical method using GC-MS/MS, including bifenthrin, cis and trans-permethrin and deltamethrin. The

extraction was based on the QuEChERS method using catfish muscle (10 g) and MeCN (10 mL), followed by a salting out procedure using MgSO_4 (4 g) and NaCl (1 g). Dispersive-SPE was performed using 1 mL of the extract, 50 mg of Z-Sep and 150 mg of MgSO_4 . Recoveries and precision were measured ($n = 5$) and ranged from 71 to 116% and from 3 to 19%, respectively, for pyrethroids at 1, 5, 50 and 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Munaretto et al. (2013) developed a multiresidue GC-MS/MS method to analyse bifenthrin, cis and trans-permethrin levels in fish fillets using a modified QuEChERS method. The factorial design was performed to optimize the proportion between water and NaCl used in the method. Dispersive-SPE was employed for clean-up procedure using 3 mL of the extract, C_{18} (375 mg), PSA (75 mg) and MgSO_4 (450 mg). Recoveries ranged from 73.6 to 98.9% and precision ranged from 3.8 to 19.1%.

The method developed and validated in the present study produced satisfactory results for 3 different fish (tainha, tilapia and trahira) with different compositions of fatty acids and cholesterol. The extraction method was developed based on a modified QuEChERS method using easy and commonly applied procedures and only acetonitrile as a solvent. Standard extraction and salting out steps were performed in all experiments. After the optimization of the low temperature clean-up procedure, the choice of the sorbents was an important task, considering the complexity of the matrix and the physical and chemical characteristics of the analytes. The mixture design experiment was a robust tool to achieve the best proportions of three different sorbents to produce optimal recoveries and co-extractive removal. The use of GC-MS was not an impediment to achieve satisfactory sensitivity of the method compared with GC-MS/MS results described in previous studies. The validation performance revealed that the

method can be used for different fish and 18 pyrethroids with excellent trueness and precision.

3.6 Method application

Fourteen samples comprising 5 trahira samples, 4 tilapia samples and 5 tainha samples were analysed using the validated method. Three tainha samples and two trahira samples were acquired through Center for Coastal, Limnological and Marine Studies of the Federal University of Rio Grande do Sul (CECLIMAR/UFRGS) in partnership with the fishermen from Hydrographical Basin of the River Tramandaí. The others samples were acquired from a market, all from the Southern of Brazil. Residues of bifenthrin and fenpropathrin were detected in three tainha samples. The concentration of bifenthrin was 8.0 and 8.8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and fenpropathrin was 45.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Only one trahira sample contained residue of bifenthrin at a concentration of 57 $\mu\text{g kg}^{-1}$. All positive samples were those from Hydrographical Basin of the River Tramandaí. Two of them demonstrated concentration above the limits established by legislation in Brazil (10 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Pyrethroid residues were below than LOQ of the method in all tilapia samples.

4. Conclusion

A method was developed and validated for the analysis of 18 pyrethroid residues in trahira samples using modified QuEChERS procedure and GC-MS. An extension scope of the matrix was applied to tainha and tilapia samples. The effects of low temperature and 5 different sorbents were investigated and used as clean-up procedures for fish extracts. The use of a mixture design allowed us to choose the best proportions of C₁₈, PSA and Z-Spe+ in dispersive-SPE clean-up procedure. During the development of the method, we produced information about the profiles of trahira, tainha and tilapia matrices. The method exhibited a satisfactory LOQ, sensitivity, accuracy and precision

for three fish species commonly consumed in Southern Brazil (trahira, tainha and tilapia). Further searches are needed to determine the concentrations of pyrethroid residues in environmental samples of fish from southern Brazil.

Acknowledgements

This research was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development – CNPq, Federal University of Rio Grande – FURG and CAPES - PDSE scholarship program - grant n° 88881.134557/2016-01, and the Program to Support the Publication of Academic Production/PROPESP/FURG/2018.

Declaration of Interest

Declarations of interest: none.

References

- Alonso, M. B., Feo, M. L., Corcellas, C., Vidal, L. G., Bertozzi, C. P., Marigo, J., Secchi, E. R., Bassoi, M., Azevedo, A. F., Dorneles, P. R., Torres, J. P. Lailson-Brito, J., Malm, O., Eljarrat, E., Barceló, D. (2012). Pyrethroids: A new threat to marine mammals? *Environment International*, 47, 99-106. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.06.010>.
- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Ntajanbaber, D., Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC international*, 86, 412-431.
- Andrade, G. de Q., Bispo, E. da S., Druzian, J. I. (2009). Avaliação da qualidade nutricional em espécies de pescado mais produzidas no Estado da Bahia. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29, 721-729. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612009000400004>.

Chatterjee, N. S., Utture, S., Banerjee, K., Shabeer, T. A., Kamble, N., Mathew, S., Kumar, K. A. (2016). Multiresidue analysis of multiclass pesticides and polyaromatic hydrocarbons in fatty fish by gas chromatography tandem mass spectrometry and evaluation of matrix effect. *Food chemistry*, 196, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.014>.

Chen, S., Gu, S., Wang, Y., Yao, Y.L., Wang, G.Q., Jin, Y., Wu, Y.M. (2016). Exposure to pyrethroid pesticides and the risk of childhood brain tumors in East China. *Environmental Pollution*, 218, 1128-1134. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.066>

Chen, S., Yu, X., He, X., Xie, D., Fan, Y., Peng, J. (2009). Simplified pesticide multiresidues analysis in fish by low-temperature cleanup and solid-phase extraction coupled with gas chromatography/mass spectrometry. *Food Chemistry*, 113, 1297-1300. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.045>

Chung, S. W., Lam, C. H. (2012). Development and validation of a method for determination of residues of 15 pyrethroids and two metabolites of dithiocarbamates in foods by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403, 885-896. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5882-1>

Comission Decision (EC) N° 657/2002 of 12 August 2002 of implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002D0657&from=EN>.

Corcellas, C., Feo, M. L., Torres, J. P., Malm, O., Ocampo-Duque, W., Eljarrat, E. Barceló, D. (2012). Pyrethroids in human breast milk: occurrence and nursing daily

intake estimation. *Environment International*, 47, 17-22.

<https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.05.007>.

Corcellas, C., Eljarrat, E., Barceló, D. (2015). First report of pyrethroid bioaccumulation in wild river fish: A case study in Iberian river basins (Spain). *Environment International*, 75, 110-116. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.11.007>.

Dallegrave, A., Pizzolato, T. M., Barreto, F., Eljarrat, E., Barceló, D. (2016). Methodology for trace analysis of 17 pyrethroids and chlorpyrifos in foodstuff by gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408, 7689-7697. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9865-5>.

Ding, G.D., Shi, R., Gao, Y., Zhang, Y., Kamijima, M., Sakai, K., Wang, G.Q., Feng, C., Tian, Y. (2012). Pyrethroid pesticide exposure and risk of childhood acute lymphocytic leukemia in Shanghai. *Environmental Science & Technology*, 46, 13480-13487. <https://doi.org/10.1021/es303362a>.

Feo, M. L., Ginebreda, A., Eljarrat, E., Barceló, D. (2010). Presence of pyrethroid pesticides in water and sediments of Ebro River Delta. *Journal of Hydrology*, 393, 156-162. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2010.08.012>.

Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., da Silva, E. G. P., dos Santos, W. N. L., Quintella, C. M., David, J. M., de Andrade, J. B., Breikreitz, M. C., Jardim, I. C. S. F., Neto, B. B. (2007). Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *Journal of Chromatography A*, 1158, 2-14. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.051>.

García-Rodríguez, D., Cela-Torrijos, R., Lorenzo-Ferreira, R. A., Carro-Díaz, A. M. (2012). Analysis of pesticide residues in seaweeds using matrix solid-phase dispersion

and gas chromatography–mass spectrometry detection. *Food Chemistry*, 135, 259-267. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.088>.

Han, J. J., Zhou, L. Q., Luo, M., Liang, Y. R., Zhao, W. T., Wang, P., Zhou, Z. Q., Liu, D. H. (2017). Nonoccupational exposure to pyrethroids and risk of coronary heart disease in the Chinese population. *Environmental Science & Technology*, 51, 664-670. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05639>.

Hou, X., Zheng, X., Zhang, C., Ma, X., Ling, Q., Zhao, L. (2014). Ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction based on the solidification of a floating organic droplet followed by gas chromatography for the determination of eight pyrethroid pesticides in tea samples. *Journal of Chromatography B*, 969, 123-127. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.08.010>.

Kinsella, B., O'Mahony, J., Malone, E., Moloney, M., Cantwell, H., Furey, A., Danaher, M. (2009). Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. *Journal of Chromatography A*, 1216, 7977-8015. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.005>.

Koureas, M., Tsakalof, A., Tsatsakis, A., Hadjichristodoulou, C. (2012). Systematic review of biomonitoring studies to determine the association between exposure to organophosphorus and pyrethroid insecticides and human health outcomes. *Toxicology Letters*, 210, 155-168. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.10.007>.

Langford, K. H., Øxnevad, S., Schøyen, M., Thomas, K. V. (2014). Do antiparasitic medicines used in aquaculture pose a risk to the Norwegian aquatic environment? *Environmental Science & Technology*, 48, 7774-7780. <https://doi.org/10.1021/es5005329>.

Ma, X. (2009). Research progress on analytical technique of pyrethroid pesticide residue. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 28, 13775-13777.

Moloney, M., Tuck, S., Ramkumar, A., Furey, A., Danaher, M. (2018). Determination of pyrethrin and pyrethroid residues in animal fat using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1077, 60-70. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.12.022>.

Munaretto, J. S., Ferronato, G., Ribeiro, L. C., Martins, M. L., Adaime, M. B., Zanella, R. (2013). Development of a multiresidue method for the determination of endocrine disrupters in fish fillet using gas chromatography–triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Talanta*, 116, 827-834. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.07.047>.

Normative Instruction N° 20 of July 2018 on sampling plan and the reference limits for the National Plan for the Control of Residues in Animal Products – PNCRC. <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/PlanoAmostragemPNCRC2018INIngles.pdf>.

QuEChERS. Method. Reality. Clean-up options. (2018). <http://quechers.cvua-stuttgart.de/> Accessed 14 September 2018.

Radwan, M., Jurewicz, J., Wielgomas, B., Piskunowicz, M., Sobala, W., Radwan, P., Jakubowski, L., Hawuła, W., Hanke, W. (2015). The association between environmental exposure to pyrethroids and sperm aneuploidy. *Chemosphere*, 128, 42-48. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.12.077>.

Rawn, D. F. K., Judge, J., Roscoe, V. (2010). Application of the QuEChERS method for the analysis of pyrethrins and pyrethroids in fish tissues. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 2525-2531. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3786-5>.

Regulation (EU) N° 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuff of animal origin. https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf.

SANTE/11813/2017. (2018). Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf.

Sapozhnikova, Y., Lehotay, S. J. (2013). Multi-class, multi-residue analysis of pesticides, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, polybrominated diphenyl ethers and novel flame retardants in fish using fast, low-pressure gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 758, 80-92. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.10.034>.

Tang, W., Wang, D., Wang, J., Wu, Z., Li, L., Huang, M., Xu, S., Yan, D. (2017). Pyrethroid pesticide residues in the global environment: An overview. *Chemosphere*, 191, 990-1007. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.115>.

Tuck, S., Furey, A., Crooks, S., Danaher, M. (2018). A review of methodology for the analysis of pyrethrin and pyrethroid residues in food of animal origin. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35, 911-940. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1420919>.

USDA. (2018). National Nutrient Database of Standard Reference Legacy Release. <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/15261?fgcd=&manu=&format=Abridged&count=&max=25&offset=&sort=default&order=asc&qlookup=tilapia&ds=&qt=&qp=&qa=&qn=&q=&ing=/> Accessed 14 of September 2018.

Ye, M., Beach, J., Martin, J. W., Senthilselvan, A. (2015). Associations between dietary factors and urinary concentrations of organophosphate and pyrethroid metabolites in a Canadian general population. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 218, 616-626. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2015.06.006>.

Table 1

Selected ions, retention time, window for GC-MS determination and log K_{ow} of pyrethroids and internal standard (IS).

Analyte	Quantified ion (<i>m/z</i>)	Confirm ion (<i>m/z</i>)	RT ^a (min)	Window	log K_{ow} ^b
Allethrin	123	107/79	12.13	2	4.96
Bifenthrin	181	166/165	13.87	4	6.60
Cyfluthrin	206	226/165	15.56/15.65/15.71/15.75	8	6.00
Cypermethrin	163	181/208	15.90/16.00/16.07/16.12	9	5.55
Deltamethrin	181	253/251	17.82/18.16	11	4.60
Esfenvalerato	225	181/419	17.29	10	6.24
Etofenprox	163	135/376	16.27	9	6.90
Fenpropathrin	181	97/265	13.99	5	6.04
Fenvalerato	225	181/419	17.00	10	5.01
Permethrin (cis)	183	163/184	15.10	7	6.10
Permethrin (trans)	183	163/184	15.21	7	6.10
Phenothrin	123	183/81	14.15/14.21	5	6.01
Phenthoate	274	247/121	12.18	2	3.69
Tefluthrin	177	197/141	10.75	1	6.40
Tetramethrin	164	123/165	13.92	4	4.60
Transfluthrin	163	165/127	11.26	1	5.46
λ -cyalothrin	181	208/197	14.34/14.46	6	6.80
τ -fluvalinate	250	252/181	17.13/17.22	10	7.02
Triphenyl Phosphate	326	325/327	13.63	3	4.60

(a) RT - Retention Time

(b) Log K_{ow} source: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/atoz.htm> and <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

Table 2

Mixture design proportions applied for optimization of a sorbent combination of C₁₈, PSA and Z-Sep+ during dispersive-SPE cleanup procedure.

Experiment	X_1	X_2	X_3	C ₁₈ (mg)	PSA (mg)	Z-Sep+ (mg)
1	1.000000	0.000000	0.000000	400	100	100
2	0.000000	1.000000	0.000000	100	400	100
3	0.000000	0.000000	1.000000	100	100	400
4	0.500000	0.500000	0.000000	250	250	100
5	0.500000	0.000000	0.500000	250	100	250
6	0.000000	0.500000	0.500000	100	250	250
7	0.666667	0.166667	0.166667	300	150	150
8	0.166667	0.666667	0.166667	150	300	150
9	0.166667	0.166667	0.666667	150	150	300
10	0.333333	0.333333	0.333333	200	200	200

Table 3

Results of precision and trueness during repeatability study – RSD_r (for analysis of trahira, tilapia and tainha) and within-laboratory reproducibility study – RSD_{wR} (for analysis of trahira samples).

	RSD _r - Trahira			RSD _{wR} - Trahira			RSD _r - Tilapia			RSD _r - Tainha		
	Trueness % (RSD %)			Trueness % (RSD %)			Trueness % (RSD %)			Trueness % (RSD %)		
	5 µg kg ⁻¹	10 µg kg ⁻¹	75 µg kg ⁻¹	5 µg kg ⁻¹	10 µg kg ⁻¹	75 µg kg ⁻¹	5 µg kg ⁻¹	10 µg kg ⁻¹	75 µg kg ⁻¹	5 µg kg ⁻¹	10 µg kg ⁻¹	75 µg kg ⁻¹
Alletrin	109.4 (15.4)	95.4 (12.2)	84 (10.5)	106 (15.6)	95 (10.9)	89 (13.5)	96 (10.7)	99 (10.4)	83 (6.9)	90 (17.5)	83 (9.2)	74 (4.3)
Bifenthrin	90.5 (8.2)	83.8 (4.9)	75.7 (8.5)	93 (16.5)	85 (6.1)	77 (10.8)	70 (20.4)	74 (11.8)	75 (3.0)	106 (10.8)	79 (1.6)	65 (4.3)
Cyfluthrin	109 (16.3)	95.7 (11.7)	88.5 (8.6)	98 (14.5)	101 (13.2)	96 (12.3)	106 (18.1)	108 (12.5)	80 (8.8)	108 (13.8)	92 (11.9)	95 (10.1)
Cypermethrin	87.7 (15.7)	91.2 (9.1)	85 (6.4)	84 (17.0)	87 (10.2)	83 (5.4)	119 (8.3)	114 (14.4)	87 (8.5)	98 (26.4)	97 (13.4)	96 (11.1)
Deltamethrin	110.3 (7.7)	82.1 (11.6)	84 (9.5)	104 (11.2)	82 (10.7)	92 (9.0)	83 (11.9)	93 (19.5)	106 (9.3)	61 (19.3)	87 (14.6)	91 (14.1)
Esfenvalerate	112.2 (14.1)	88 (11.0)	85.2 (7.1)	120 (8.6)	98 (15.8)	92 (9.6)	101 (12.4)	90 (18.2)	93 (9.3)	107 (7.5)	110 (8.0)	96 (13.1)
Etofenprox	87.5 (19.4)	84.9 (10.6)	77.2 (8.2)	106 (18.3)	84 (9.4)	82 (11.7)	93 (10.7)	85 (8.0)	76 (2.5)	107 (13.6)	81 (4.3)	66 (5.0)
Fenpropathrin	93.6 (20.3)	88.3 (12.7)	87.7 (10.7)	75 (14.1)	87 (14.3)	86 (12.3)	98 (5.9)	100 (6.4)	89 (3.0)	134 (32.2)	87 (8.2)	84 (6.1)
Fenvalerate	99.2 (13.4)	87.5 (10.6)	83.8 (6.4)	109 (10.7)	98 (16.5)	94 (12.6)	115 (8.4)	99 (17.4)	84 (9.4)	136 (5.8)	105 (16.2)	83 (6.9)
Permethrin (cis)	106 (6.4)	91 (4.0)	74.6 (9.2)	100 (11.3)	89 (4.5)	78 (12.0)	86 (10.5)	80 (7.1)	73 (2.0)	101 (13.7)	75 (3.2)	63 (4.9)
Permethrin (trans)	107.7 (6.7)	92.8 (3.8)	77 (8.8)	105 (10.9)	91 (3.7)	81 (11.6)	76 (12.9)	77 (9.7)	76 (2.0)	120 (13.5)	87 (2.9)	65 (4.5)
Phenothrin	87.2 (13.4)	88.6 (16.7)	76.2 (9.6)	101 (12.1)	91 (15.4)	79 (12.1)	24 (62.2)	59 (6.0)	81 (5.4)	123 (23.0)	79 (5.1)	62 (4.1)
Phenthoate	88.4 (16.2)	90.6 (16.1)	84.2 (9.4)	94 (16.5)	97 (9.0)	96 (12.3)	100 (7.5)	93 (2.9)	85 (4.7)	95 (3.7)	97 (3.5)	86 (1.9)
Tefluthrin	83.1 (22.8)	87.4 (8.7)	75.7 (14.1)	87 (21.2)	100 (16.8)	81 (11.1)	72 (13.0)	73(19.9)	77 (5.6)	83 (18.1)	84 (12.9)	80 (4.5)
Tetramethrin	110.4 (6.6)	95.8 (5.0)	84.8 (6.6)	101 (9.5)	93 (4.3)	87 (11.2)	83 (14.9)	89 (3.1)	88 (4.3)	126 (16.4)	98 (4.5)	86 (4.1)
Transfluthrin	88.6 (13.8)	86.9 (8.5)	80.7 (9.8)	98 (17.2)	96 (13.8)	86 (7.0)	97 (8.9)	80 (16.0)	78 (7.6)	71 (10.6)	73 (7.8)	84 (4.7)
λ-cialothrin	106.3 (5.1)	98.7 (5.0)	86.4 (6.2)	99 (9.7)	96 (6.6)	92 (12.1)	96 (10.3)	104 (8.1)	87 (6.2)	58 (33.7)	79 (12.7)	89 (8.8)
τ-Fluvalinate	102.7 (15.0)	90.7 (13.9)	87.2 (11.4)	91 (16.8)	93 (15.9)	94 (10.3)	94 (17.5)	97 (21.5)	89 (12.4)	126 (3.0)	126 (8.4)	97 (18.2)

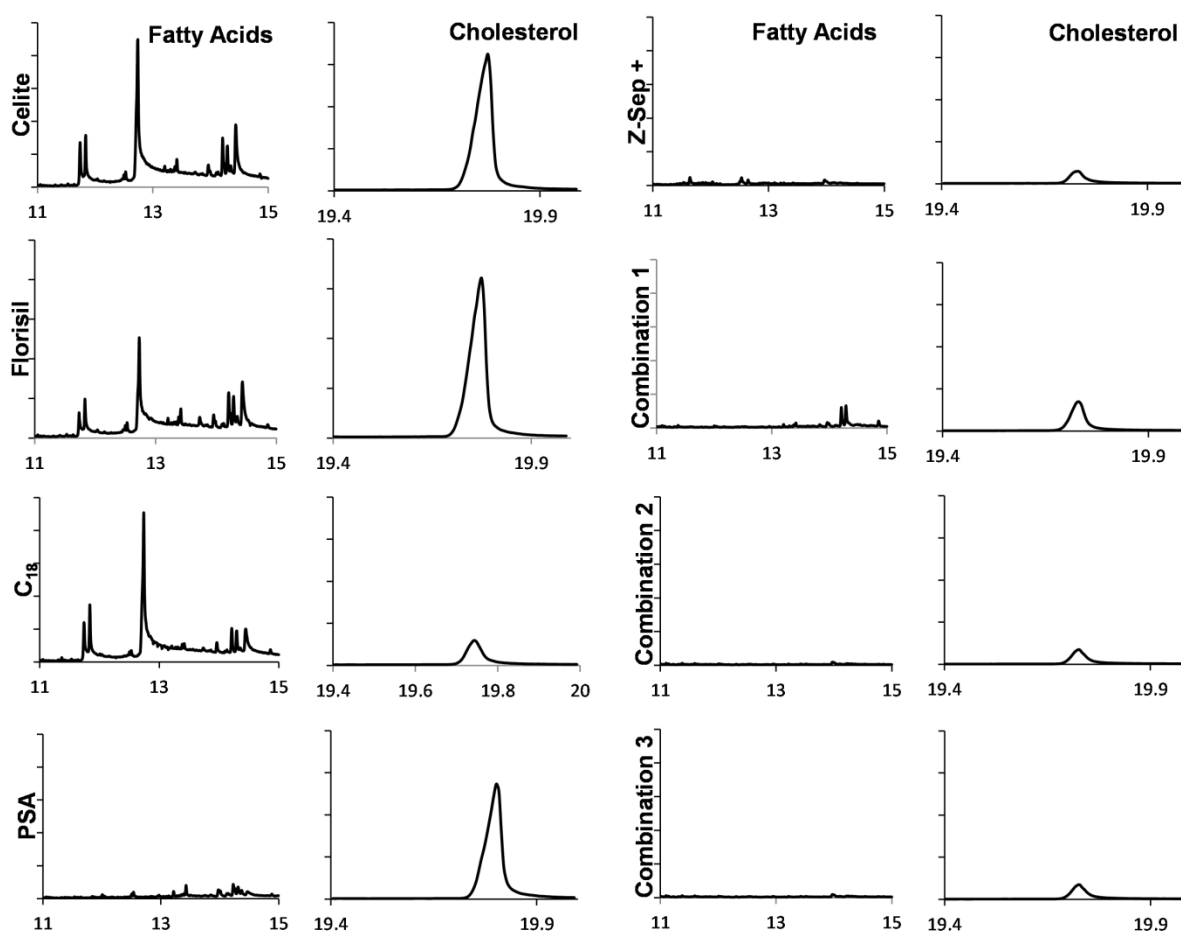


Fig 1. Reconstructed chromatogram in scan mode for identification of fatty acids (11 to 15 min) and cholesterol (around 19.7 min) by NIST 2008 mass spectral library search in blank tilapia samples using celite, florisil, C₁₈, PSA, Z-Sep+, combination 1 (25 mg C₁₈ and 25 mg PSA), combination 2 (20 mg C₁₈ and 20 mg PSA and 10 mg Z-Sep+) and combination 3 (25 mg C₁₈, 15 mg PSA and 10 mg Z-Sep+) as a sorbent in optimization of dispersive-SPE cleanup procedure.

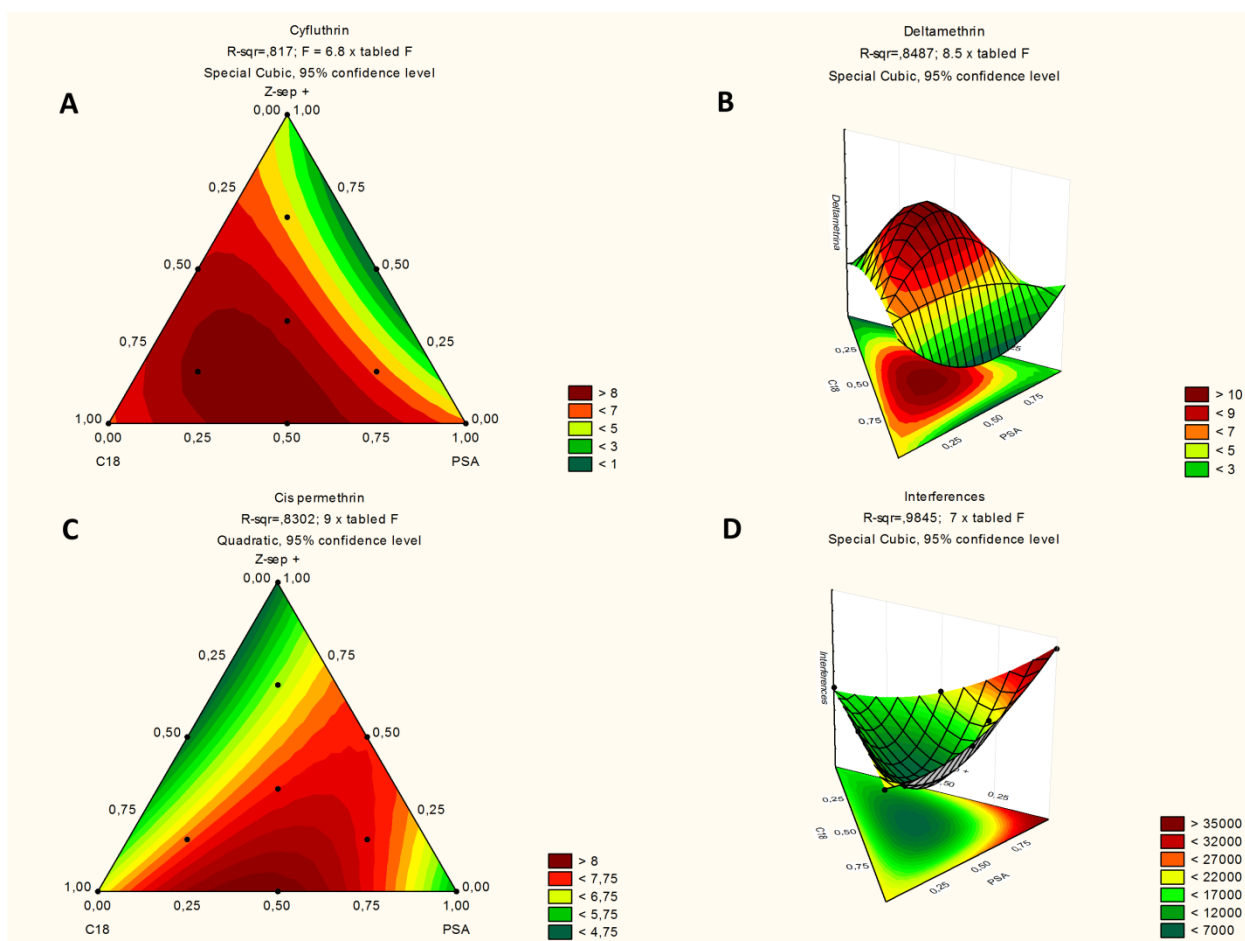


Fig 2. Mixture design achieved using C₁₈, PSA and Z-Sep+ during dispersive-SPE step in extracts of trahira samples considering 95% of confidence level. Special cubic model was applied for cyfluthrin (A), deltamethrin (B) and interferences from the matrix (fatty acids and cholesterol) (D). Quadratic model was applied for cis-permethrin (C).

5. CONCLUSÕES

O principal desafio deste trabalho foi desenvolver métodos analíticos capazes de quantificar concentrações baixas dos compostos (considerando o LMR de cada composto) em matrizes de diferentes espécies de peixe. Devido à complexidade das matrizes foi dada relevante atenção aos procedimentos de *clean-up* com o objetivo de proporcionar a remoção de coextrativos, naturalmente presentes nestas matrizes, mantendo elevada recuperação dos compostos.

O efeito de diversos sorventes para a remoção dos coextrativos da matriz (proteínas, gorduras, e corantes) em amostras de tilápia, traíra, tainha, salmão, truta e *seabass* foram avaliados. Os sorventes C₁₈, PSA e principalmente Z-Sep+ apresentaram melhor eficiência na remoção destes interferentes. O congelamento a baixa temperatura foi investigado e também utilizado no procedimento de *clean-up* dos métodos. Este procedimento foi eficiente na precipitação e congelamento de lipídios e de compostos pouco solúveis em acetonitrila sem afetar a estabilidade dos compostos no solvente de extração.

No método desenvolvido junto ao Teagasc para determinação de piretróides, benzoiluréias e organofosforados (artigo I, descrito no capítulo 1), destaca-se a utilização de cerâmica homogeneizadora associada ao sistema de agitação Minimix, a otimização do método cromatográfico e a utilização da cromatografia líquida na determinação de piretróides. O procedimento de extração realizado através do sistema de agitação proposto (cerâmica e minimix) permitiu a extração de 36 amostras simultaneamente, melhorando a reprodutibilidade do método e reduzindo consideravelmente o tempo de análise. A otimização da cromatografia líquida também permitiu reduzir o tempo de análise, comparado ao método proposto inicialmente e que estava em corrente uso no laboratório. O uso da cromatografia líquida foi eficiente para separação e quantificação dos compostos, inclusive piretróides, que usualmente são analisados via cromatografia gasosa. Considerando o tempo necessário para a extração das amostras e análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, foi possível analisar 36 amostras em um total de 9 h, tempo interessante

para laboratórios que possuem vários métodos de rotina com poucos equipamentos à disposição.

Os resultados de validação demonstram que o método é robusto, sensível e preciso para os compostos em matriz de salmão, com a exceção de azametifós. Neste caso o método foi sugerido como *screening* considerando que não existe LMR estabelecido para este composto em matrizes de peixes.

Não foi possível analisar tralometrina através do método proposto, devido à conversão deste composto em deltametrina, provavelmente durante o procedimento de extração. Devido à alteração do limite máximo de resíduo para diflubenzurom, seria necessário revalidar o método para este composto considerando o novo limite estabelecido. Quanto às perspectivas futuras, a extensão de escopo da matriz poderia ser realizada para permitir a determinação destes compostos em outras espécies de peixes.

No método desenvolvido no LARCO (artigo II, descrito no capítulo 2), destaca-se o uso de planejamento de misturas como ferramenta para otimização do procedimento de dispersão em fase sólida usando uma mistura de três sorventes (C₁₈, PSA e Z-Sep+). Através do planejamento foi possível escolher a melhor proporção da mistura para garantir adequada recuperação dos compostos e remoção de interferentes. Também se destaca a validação e extensão de escopo para espécies de peixes bastante consumidas e comercializadas no Sul do Brasil (traíra, tilápia e tainha).

O método desenvolvido é de fácil aplicação permitindo a análise de várias amostras em um mesmo dia. Além disso, apresentou sensibilidade suficiente para atingir limites de quantificação iguais ou inferiores ao LMR dos compostos. O procedimento de validação demonstrou que o mesmo é robusto e preciso.

A aplicação do método em amostras reais comprovou a presença de resíduos de piretróides em amostras de traíra e tainha oriundas da Bacia do Rio Tramandaí. Por este motivo o método será utilizado para monitoramento de amostras desta Bacia em parceria com o CECLIMAR – UFRGS (Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul) que realizará as coletas das amostras. A parceria LARCO - CECLIMAR foi feita durante o doutorado com o objetivo de avaliar a situação da Bacia através de análises de água, sedimento e peixes.

Através do desenvolvimento dos métodos foi possível contribuir com informações relevantes à comunidade científica através dos artigos aqui apresentados e daqueles que serão produzidos através da aplicação dos métodos. Também contribuiu para a formação de alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado que participaram deste trabalho durante as pesquisas realizadas no LARCO. A realização do projeto junto ao laboratório de resíduos do Teagasc, que é a autoridade Irlandesa para desenvolvimento agrícola e das indústrias alimentícias, a qual está ligada ao Ministério da Agricultura, Alimentos e da Marinha deste País, proporcionou intercâmbio de conhecimento e de informações na área de determinação de resíduos de contaminantes em alimentos para a Universidade Federal do Rio Grande – FURG, para o Programa de Pós Graduação em Química Tecnológica e Ambiental – PPGQTA e seus grupos de pesquisa, para o LARCO e para a aluna de doutorado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) Disponível em: <<http://www.abnt.org.br/noticias/5694-publicada-a-versao-abnt-nbr-iso-17025>> Acesso em: 10 jan. 2018.

ALBERT, E.; POMBO-VILLAR, E. Class II pyrethroids: noninhibitors calcineurin. **Biochemical pharmacology**, v. 54, n. 2, p. 321-323, 1997.

AL-DEGS, Y.; KHRAISHEH, M. A.; TUTUNJI, M. F. Sorption of lead ions on diatomite and manganese oxides modified diatomite. **Water Research**, v. 35, n. 15, p. 3724-3728, 2001.

ALONSO, M. B. et al. Pyrethroids: A new threat to marine mammals?. **Environment International**, v. 47, p. 99-106, 2012.

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; MARTÍNEZ, M. A. Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, v. 182, n. 1, p. 7-20, 2009.

ANASTASSIADES, M. et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412-431, 2003.

ANDRADE, G. Q.; BISPO, E. S.; DRUZIAN, J. I. Avaliação da qualidade nutricional em espécies de pescado mais produzidas no Estado da Bahia. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 721 – 726, 2009.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>> Acesso em: 22 out. 2018.

BARR, D. B. et al. Urinary concentrations of metabolites of pyrethroid insecticides in the general US population: National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2002. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 6, p. 742-748, 2010.

BBSRC (Bioscience for the future) Disponível em: <<https://bbsrc.ukri.org/documents/pyrethroid-timeline-pdf/>> Acesso em: 19 set. 2018.

BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2015. p.19 – 27; 230 - 243.

BRADBERRY, S. M. et al. Poisoning due to pyrethroids. **Toxicological Reviews**, v. 24, n. 2, p. 93-106, 2005.

BRUTTI, M.; BLASCO, C.; PICÓ, Y. Determination of benzoylurea insecticides in food by pressurized liquid extraction and LC-MS. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 1, p. 1-10, 2010.

BURRIDGE, L. E. et al. The lethality of anti-sea lice formulations Salmosan®(Azamethiphos) and Excis®(Cypermethrin) to stage IV and adult lobsters (*Homarus americanus*) during repeated short-term exposures. **Aquaculture**, v. 182, n. 1-2, p. 27-35, 2000.

BURRIDGE, L. E. et al. The lethality of Salmosan (Azamethiphos) to American lobster (*Homarus americanus*) larvae, postlarvae, and adults. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 43, n. 2, p. 165-169, 1999.

BURRIDGE, L. E. et al. The lethality of Salmosan (Azamethiphos) to American lobster (*Homarus americanus*) larvae, postlarvae, and adults. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 43, n. 2, p. 165-169, 1999.

BUTTLE, L. G.; CRAMPTON, V. O.; WILLIAMS, P. D. The effect of feed pigment type on flesh pigment deposition and colour in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Aquaculture Research**, v. 32, n. 2, p. 103-111, 2001.

CABRERA, L. C. et al. Extração em fase sólida dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 227-240, 2012.

CANTY, M. N. et al. Sublethal impact of short term exposure to the organophosphate pesticide azamethiphos in the marine mollusc *Mytilus edulis*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 54, n. 4, p. 396-402, 2007.

CARRO, N. et al. Optimization of a method based on micro-matrix solid-phase dispersion (micro-MSPD) for the determination of PCBs in mussel samples. **Analytical Chemistry Research**, v. 11, p. 1-8, 2017.

CD, COMMISSION DECISION. **Implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results - 2002/657/EC**. Official Journal of the European Communities, 2002.

CHATTERJEE, N. S. et al. Multiresidue analysis of multiclass pesticides and polyaromatic hydrocarbons in fatty fish by gas chromatography tandem mass spectrometry and evaluation of matrix effect. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1-8, 2016.

CHEN, S. et al. Exposure to pyrethroid pesticides and the risk of childhood brain tumors in East China. **Environmental Pollution**, v. 218, p. 1128 - 1134, 2016.

CHEN, Y. S.; BEVERIDGE, M. C.; TELFER, T. C. Physical characteristics of commercial pelleted Atlantic salmon feeds and consideration of implications for modeling of waste dispersion through sedimentation. **Aquaculture International**, v. 7, n. 2, p. 89-100, 1999.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CHROMACADEMY (LC GC's CHROMacademy) Disponível em <<https://www.chromacademy.com/chromatography-SPE-Mechanisms.html>> Acesso em: 01 out. 2018.

CHUNG, S. W.; LAM, C. H. Development and validation of a method for determination of residues of 15 pyrethroids and two metabolites of dithiocarbamates in foods by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 403, p. 885-896, 2012.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, CAC/GL 59-2006. **Guidelines on Estimation of Uncertainty of Results**. Roma, 2006. Disponível em: <www.codexalimentarius.net/download/standards/10692/cxg_059e.pdf> Acesso em: 14 jan. 2019.

Comitê para Medicamentos de Uso Veterinário. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Summary_of_opinion/2018/03/WC500245927.pdf> Acesso em: 19 set. 2018.

CORCELLAS, C., et al. Pyrethroids in human breast milk: occurrence and nursing daily intake estimation. **Environment International**, v. 47, p.17-22, 2012.

CORCELLAS, C.; ELJARRAT, E.; BARCELÓ, D. First report of pyrethroid bioaccumulation in wild river fish: A case study in Iberian river basins (Spain). **Environment International**, v. 75, p. 110-116, 2015.

COSTELLO, M. J. et al. The control of chemicals used in aquaculture in Europe. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 17, n. 4, p. 173-180, 2001.

DALLEGRAVE, A. et al. Methodology for trace analysis of 17 pyrethroids and chlorpyrifos in foodstuff by gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 27, p. 7689-7697, 2016.

DAVIES, I. M. et al. Targeted environmental monitoring for the effects of medicines used to treat sea-lice infestation on farmed fish. **ICES Journal of Marine Science**, v. 58, n. 2, p. 477-485, 2001.

DING, G.D. et al. Pyrethroid pesticide exposure and risk of childhood acute lymphocytic leukemia in Shanghai. **Environmental Science & Technology**, v. 46, p. 13480-13487, 2012.

DOQ-CGCRE-008 – Rev. 07 – Jul/18. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO, 2017. Disponível em: file: <http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrganismo=CalibEnsaio> Acesso em: 10 Jan. 2019.

EISLER, R. **Diflubenzuron Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review**. Patuxent Wildlife Research Center Laurel MD, 1992.

ELLIOTT, M. et al. Insecticidal activity of the pyrethrins and related compounds. Part XI. Relative potencies of isomeric cyano-substituted 3-phenoxybenzyl esters. **Pesticide Science**, v. 9, n. 2, p. 112-116, 1978.

EPA, United States Environmental Protection Agency. **Pesticide registration: diflubenzuron**, 1997. Disponível em: <https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-108201_1-Aug-97.pdf> Acesso em: 19 set. 2018.

EPA, United States Environmental Protection Agency. **Risks of Diflubenzuron Use to Federally Threatened California Red-legged Frog (*Rana aurora draytonii*)**, 2009. Disponível em: <<https://www3.epa.gov/pesticides/endanger/litstatus/effects/redleg-frog/diflubenzuron/analysis.pdf>> Acesso em: 19 set. 2018.

EPMAR. **European public MRL assessment report**, 2012. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2012/06/WC500128440.pdf> Acesso em: 19 set. 2018.

ERNST, W. et al. Dispersion and toxicity to non-target aquatic organisms of pesticides used to treat sea lice on salmon in net pen enclosures. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, n. 6, p. 432-443, 2001.

EURACHEM / CITAC Guide, **Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**. 3^a Ed., 2012. Disponível em: <https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf> Acesso em: 14 jan. 2019.

EUROLAB, Technical Report 1/2007, **Measurement uncertainty revised: alternative approaches to uncertainty evaluation**. Paris, 2007. Disponível em: <<http://www.eurolab.org/documents/1-2007.pdf>> Acesso em: 14 jan. 2019.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) The State of World Fisheries and Aquaculture. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/i9540en/I9540EN.pdf>> Acesso em: 28 nov. 2018a.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) Fisheries and Aquaculture Department. Cultured Aquatic Species Information Programme. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Dicentrarchus_labrax/en> Acesso em: 01 out. 2018b.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) Fisheries and Aquaculture Department. Cultured Aquatic Species Information Programme. Disponível

em: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/en> Acesso em: 01 out. 2018c.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) Fisheries and Aquaculture Department. Cultured Aquatic Species Information Programme. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Salmo_salar/en> Acesso em: 01 out. 2018d.

FEO, M. L. et al. Presence of pyrethroid pesticides in water and sediments of Ebro River Delta. **Journal of Hydrology**, v. 393, n. 3, p. 156-162, 2010.

FERREIRA, S. L. C. et al. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1-2, p. 2-14, 2007.

FOLKESTAD, A. et al. Rapid and non-invasive measurements of fat and pigment concentrations in live and slaughtered Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, v. 280, n. 1-4, p. 129-135, 2008.

GARCÍA-RODRÍGUEZ, D. et al. Analysis of pesticide residues in seaweeds using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography–mass spectrometry detection. **Food Chemistry**, v. 135, n. 1, p. 259-267, 2012.

GLANTREO. End use applications for Mesoporous Silica. Disponível em: <<http://www.glantreo.com/application-areas/end-use-applications-mesoporous-silica/>> Acesso em: 01 out. 2018

GONG, D.C. **Pyrethroids Pesticides Residues and Their Behavior in a Multimediu Environment of Liangtan River Basin**. Master thesis - Chongqing Univ, Chongqing, 2013.

HAN, J. J. et al. Nonoccupational exposure to pyrethroids and risk of coronary heart disease in the Chinese population. **Environmental Science & Technology**, v. 51, p. 664-670, 2017.

HAYA, K. et al. A review and assessment of environmental risk of chemicals used for the treatment of sea lice infestations of cultured salmon. In: **Environmental effects of marine finfish aquaculture**. Berlin: Springer, 2005. p. 305-340.

HE, L. et al. Ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction followed high-performance liquid chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in water sample. **Analytica Chimica Acta**, v. 655, n. 1-2, p. 52-59, 2009.

HOU, X., et al. Ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction based on the solidification of a floating organic droplet followed by gas chromatography for the determination of eight pyrethroid pesticides in tea samples. **Journal of Chromatography B**, v. 969, p. 123-127, 2014.

JIA, F. et al. New strategy to enhance the extraction efficiency of pyrethroid pesticides in fish samples using a modified QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) method. **Analytical Methods**, v. 4, n. 2, p. 449-453, 2012.

KAY, J. F.; MACNEIL, J. D.; WANG, J. **Chemical analysis of non-antimicrobial veterinary drug residues in food**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2016. p. 387.

KINSELLA, B. et al. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 46, p. 7977-8015, 2009.

KOUREAS, M. et al. Systematic review of biomonitoring studies to determine the association between exposure to organophosphorus and pyrethroid insecticides and human health outcomes. **Toxicology Letters**, v. 210, p. 155-168, 2012.

KRUVE, A., et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. **Analytica Chimica Acta**, v. 870, p. 29-44, 2015.

KUMAR V.; ROY. S. Aquaculture drugs: Sources, active Ingredients, Pharmaceutic Preparations and Methods of Administration. **Journal of Aquaculture Research & Development**, v. 8, n. 9, p. 1-13, 2017.

KURZ, M. H. et al. Clean-up Procedure Development and Method Validation for Pesticide Residues Analysis in Carrots. **Food Analytical Methods**, p. 1-11, 2018.

LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography–mass spectrometry-based techniques: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 6, p. 1663-1683, 2007.

LANGFORD, K. H. et al. Do antiparasitic medicines used in aquaculture pose a risk to the Norwegian aquatic environment?. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 14, p. 7774-7780, 2014.

LEDOUX, M. Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 8, p. 1021-1036, 2011.

LEHOTAY, S. J. et al. (2001). Analysis of pesticide residues in eggs by direct sample introduction/gas chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4589-4596.

LUVIZOTTO-SANTOS, R.; CORDEIRO, P. J. M.; VIEIRA, E. M. Analysis of diflubenzuron in tilapia filet by HPLC-DAD. **Journal of Chromatographic Science**, v. 47, n. 9, p. 785-788, 2009.

MA, X. Research progress on analytical technique of pyrethroid pesticide residue. **Journal of Anhui Agricultural Sciences**, v. 37, n. 28, p. 13775-13777, 2009.

MABILIA, R. G.; DE SOUZA, S. M. G. Efeito do tratamento com diflubenzuron na hematologia de jundiás, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae) infestados por *Lernaea cyprinacea* (Copepoda) em banhos de imersão de 24 horas. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 28, n. 2, p. 159-163, 2006.

MADUENHO, L. P.; MARTINEZ, C. B. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 148, n. 3, p. 265-272, 2008.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em: 19 set. 2018.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) **Manual de garantia da qualidade analítica – resíduos e contaminantes em alimentos**. Brasília, 1ª Ed., 2011. Disponível em: <file:///C:/Users/Lenise/Downloads/Manual-de-Garantia-Analitica-ilovepdf-compressed-ilovepdf-compressed.pdf> Acesso em: 10 Jan. 2019.

MARTINS, M. L. Cuidados básicos e alternativas no tratamento de enfermidades de peixes na aqüicultura brasileira. **Sanidade de Organismos Aquáticos**, p. 355-368, 2004.

TORRES, L. M. M. et al. Composição em ácidos graxos de traíra (*Hoplias malabaricus*) e pintadinho (sem classificação) provenientes da Região Sul do Rio Grande do Sul e Índia Morta no Uruguai. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 3, p. 1047-1058, 2012.

MNIF, W. et al. Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, n. 6, p. 2265-2303, 2011.

MOLONEY, M. et al. Determination of pyrethrin and pyrethroid residues in animal fat using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1077, p. 60-70, 2018.

MORENO-GONZÁLEZ, D. et al. Determination of carbamates in edible vegetable oils by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a new clean-up based on zirconia for QuEChERS methodology. **Talanta**, v. 128, p. 299-304, 2014.

MPA (Ministério da Pesca e Aquicultura) Plano de Desenvolvimento da Aquicultura Brasileira – 2015/2020. Brasília, DF, 2015. Disponível em: <http://seafoodbrasil.com.br/wp-content/uploads/2015/09/Plano_de_Developolvimento_da_Aquicultura-2015-2020.pdf> Acesso em: 28 nov. 2018.

MUNARETTO, J. S. et al. Development of a multiresidue method for the determination of endocrine disrupters in fish fillet using gas chromatography–triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 116, p. 827-834, 2013.

NAYLOR, R. L. et al. Effect of aquaculture on world fish supplies. **Nature**, v. 405, p. 1017-1024, 2000.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. Porto Alegre: Bookman Editora, 2010. p. 215-251.

NORDTEST Report TR 537, **Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories**. Espoo, 2^a ed., 2004.

OKAMOTO, M. H.; de SAMPAIO, L. A. N.; MAÇADA, A. P. Efeito da temperatura sobre o crescimento e a sobrevivência de juvenis da tainha *Mugil platanus* Günther, 1880. **Atlântica**, Rio Grande, v. 28, n. 1, p. 61-66, 2006.

OLIVEIRA, L. G. et al. Desenvolvimento de procedimento de extração para análise de sedativos e β -bloqueadores em rim suíno. **Quimica Nova**, v. 37, n. 8, p. 1342-1350, 2014.

PASCHOAL, J. A. R. et al. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Quimica Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.

PNCRC (Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes) **Instrução Normativa N° 20 of July 2018 on sampling plan and the reference limits for the National Plan for the Control of Residues in Animal Products – PNCRC**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/PlanoAmostragemPNCRC2018INIngles.pdf>.> Acesso em: 01 out. 2018.

PPDB (Pesticides Properties DataBase). University of Hertfordshire. Disponível em: <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/48.htm>> Acesso em 01 out. 2018.

PRESTES, O. D. et al. QuEChERS–um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Quimica Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

PRESTES, Osmar D. et al. O estado da arte na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal empregando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas. **Quimica Nova**, v. 36, n. 5, p. 697-710, 2013.

PUBCHEM. (Open Chemistry DataBase) Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acesso em: 19 set. 2018.

QUECHERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) Disponível em: <http://quechers.cvua-stuttgart.de/pdf/cleanup.pdf>> Acesso em: 01 out. 2018a.

QUECHERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) Disponível em: <http://quechers.cvua-stuttgart.de/pdf/reality.pdf>> Acesso em: 01 out. 2018b.

RADWAN, M. et al. The association between environmental exposure to pyrethroids and sperm aneuploidy. **Chemosphere**, v. 128, p. 42-48, 2015.

RAJENDRAN, S. Psocids in stored food commodities and their control. **Pestology**, v. 18, n. 4, p. 14-18, 1994.

RAJSKI, Ł. et al. Determination of pesticide residues in high oil vegetal commodities by using various multi-residue methods and clean-ups followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1304, p. 109-120, 2013.

RAWN, D. F. et al. Analysis of fin and non- fin fish products for azamethiphos and dichlorvos residues from the Canadian retail market. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 44, n. 8, p. 1510-1516, 2009.

RAWN, D. F. K.; JUDGE, J.; ROSCOE, V. Application of the QuEChERS method for the analysis of pyrethrins and pyrethroids in fish tissues. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, p. 2525-2531, 2010.

RDC, RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA Nº 166, de 24 de Julho de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, 2017. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>> Acesso em: 10 jan. 2019.

REGULAMENTO DE EXECUÇÃO (UE) Nº 2017/855. **Altera o Regulamento de Execução (UE) Nº 540/2011 no que se refere às condições de aprovação da substância ativa diflubenzuron.** 2017. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R0855&from=EN>> Acesso em: 19 set. 2019.

REGULAMENTO. **COMMISSION REGULATION (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin.** 2010. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010R0037&from=EN>> Acesso em: 19 set. 2018.

SANTE/11813/2017 2017. **Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed.** 2017. Disponível em:

<https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf> Acesso em: 20 set. 2018.

SAPOZHNIKOVA, Y.; LEHOTAY, S. J. Multi-class, multi-residue analysis of pesticides, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, polybrominated diphenyl ethers and novel flame retardants in fish using fast, low-pressure gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 758, p. 80-92, 2013.

SCHALCH, S. H. C. et al. Diflubenzuron effectiveness in *Dolops carvalhoi* (Crustacea: Branchiura) control in juveniles pacus *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) naturally infected. **Acta Scientiarum**, v. 27, p. 297-302, 2005.

SCHLEIER, J. J.; PETERSON, R. K. D. Pyrethrins and Pyrethroid Insecticides. In: **Green Trends in Insect Control**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2011. p. 94 - 131.

SEPA, Scottish Environmental Protection Agency. Policy no 17. **Cage Fish Farms: Sea Lice Treatment Chemicals, Risk Assessment of Azamethiphos**. Version 1, 1997. Disponível em: <https://www.sepa.org.uk/media/60020/policy_17-sea-lice-treatment-chemicals-for-cage-fish-farms.pdf> Acesso em: 16 out. 2018.

SODERLUND, D. M. et al. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v. 171, n. 1, p. 3-59, 2002.

SUN, X. et al. Hollow fiber liquid-phase microextraction as clean-up step for the determination of organophosphorus pesticides residues in fish tissue by gas chromatography coupled with mass spectrometry. **Marine Pollution Bulletin**, v. 63, n. 5-12, p. 102-107, 2011.

TANG, W. et al. Pyrethroid pesticide residues in the global environment: An overview. **Chemosphere**, v. 191, p. 990-1007, 2018.

TSAI, W. T.; LAI, C. W.; HSIEN, K. J. Characterization and adsorption properties of diatomaceous earth modified by hydrofluoric acid etching. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 297, n. 2, p. 749-54, 2006.

TUCCA, F. et al. Toxic effects of antiparasitic pesticides used by the salmon industry in the marine amphipod *Monocorophium insidiosum*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 67, n. 2, p. 139-148, 2014.

TUCK, S. et al. A review of methodology for the analysis of pyrethrin and pyrethroid residues in food of animal origin. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 35, n. 5 p. 911-940, 2018.

USDA (United States Department Agriculture) Disponível em: <<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/15261>> Acesso em: 01 out. 2018a.

USDA (United States Department Agriculture) Disponível em: <<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/15091>> Acesso em: 01 out. 2018b.

USDA (United States Department Agriculture) Disponível em: <<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/15240>> Acesso em: 01 out. 2018c.

USDA (United States Department Agriculture) Disponível em: <<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/15236>> Acesso em: 01 Out. 2018d.

Valverde, A. et al. What are we determining using gas chromatographic multiresidue methods: tralomethrin or deltamethrin?. **Journal of Chromatography A**, v. 943, n. 1, p. 101-111, 2002.

VILA NOVA, C. M. V. M.; Godoy, H. T.; ALDRIGUE, M. L. Composição química, teor de colesterol e caracterização dos lipídios totais de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e pargo (*Lutjanus purpureus*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, 2005.

WANG, F. et al. Multi-residue method for the confirmation of four avermectin residues in food products of animal origin by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Additives and Contaminants**, v. 28, n. 5, p. 627-639, 2011.

WU Y.; MIAO H.; FAN S. Separation of chiral pyrethroids pesticide sans application in pharmacokinetics research and human exposure assessment. In: **Pesticides in the Modern World – Effects of Pesticides Exposure**. Rijeka: In Tech, 2011. p. 139 – 166. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/pesticides-in-the-modern-world-effects-of-pesticides-exposure/separation-of-chiral-pyrethroid-pesticides-and-application-in-pharmacokinetics-research-and-human-ex>; Acesso em: 23 out. 2018.

YE, M. et al. Associations between dietary factors and urinary concentrations of organophosphate and pyrethroid metabolites in a Canadian general population. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 218, p. 616-626, 2015.

ZHAO, L.N. Residue and Risk Assessment of 7 Kinds of Pyrethroids in Water Environment in the Pearl River Delta. Master thesis- Shanghai Ocean University, Shanghai, 2014.