

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“Fluoroquinolonas em amostras aquosas ambientais e em
teleósteos: quantificação, avaliação de toxicidade e
ensaios de biotransformação.”**

Marina Denadai

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de
concentração: QUÍMICA.

Orientadora: Dra Quezia Bezerra Cass

Co-orientadora: Dra Marisa Narciso Fernandes

* bolsista FAPESP (2010/19000-2)

São Carlos - SP

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D391f Denadai, Marina
Fluoroquinolonas em amostras aquosas ambientais e em teleósteos : quantificação, avaliação de toxicidade e ensaios de biotransformação / Marina Denadai. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
135 p.

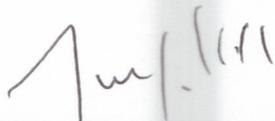
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Fluoroquinolonas. 2. Amostras ambientais aquosas. 3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. 4. Estresse oxidativo. 5. Biotransformação. I. Título.



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Marina Denadai, realizada em 27/11/2015:



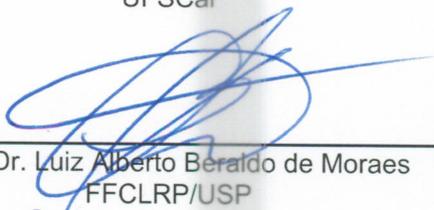
Prof. Dra. Quezia Bezerra Cass
UFSCar



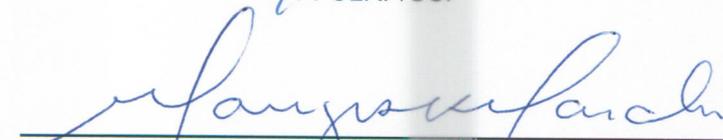
Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto
IQSC/USP



Prof. Dra. Fernanda Dias de Moraes
UFSCar



Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes
FFCLRP/USP



Prof. Dr. Mary Resa Rodrigues de Marchi
UNESP

“Ainda que chegues a viver 100 anos,
nunca deixes de aprender.”

Provérbio russo

Dedico esta tese...
à minha mãe Neuza,
ao meu irmão Murilo,
e ao meu pai Jovino (*in memoriam*).

Agradecimentos

Antes de tudo agradeço a Deus, por manter minha fé, pelo dom da capacidade, perseverança e vida.

À minha família, o alicerce da minha vida. Agradeço a compreensão, apoio, incentivo e a positividade em todos os momentos.

Agradeço à professora Dra. Quezia Bezerra Cass pela orientação, pela paciência, pela confiança, pela oportunidade... Enfim, por toda a jornada. Foi um prazer fazer parte de sua equipe. Obrigada.

À professora Dra. Marisa Narciso Fernandes, do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, pela coorientação e por toda a ajuda e ensinamentos com os ensaios de estresse oxidativo.

Ao professor Dr. Bryan William Brooks, por sua supervisão durante meu período nos Estados Unidos, pela confiança, pelo aprendizado e pela oportunidade.

À professora Dra. Regina Vincenzi Oliveira, por me acolher no grupo durante a iniciação científica, e por todo o ensinamento, confiança e liberdade, contribuindo muito para o meu aprendizado e minha paixão por cromatografia líquida.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de Doutorado Direto concedida (processo 2010/19000-2) e pela Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior - BEPE (processo 2013/15860-5).

Aos docentes e ao corpo técnico do Departamento de Química da UFSCar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFSCar e às suas secretárias.

Aos docentes e ao corpo técnico da Baylor University, Waco – Texas.

Ao Alexandre Cruz pela amizade, conselhos e ensinamentos, mas principalmente pela disponibilidade no reparo dos equipamentos.

Aos amigos feitos durante toda a minha jornada no grupo CLAE/SEPARARE: Katia Roberta Anacleto Belaz, Fernando Gonçalves de Almeida, Kenia Lourenço Vanzolini, Tiago de Campos Lourenço, Marcela Cristina de Moraes, Vinícius Carvalho, Thais Castral, Bruna Netto, Franciane Moura, Juliana Cristina Barreiro, Bianca Rebelo Lopes Simões, Samelyn Martins, Paulo Cesar Lima Nogueira, Ricardo da Fontoura Sprenger, Gabriel dos Santos

Scatena, Amanda Jordano Aquino, Adriana Sales, Joel Alvin Jr., Paulo Roberto Adalberto, Josiane Oliveira Cardoso, Welma Beatriz Costa, Izadora Furlani, João Marcos Batista Jr., Bruno Amaral, Marili Villa Nova Rodrigues e Guilherme Rebelo. A todos vocês, que contribuíram muito para o meu amadurecimento pessoal e científico, seja na ajuda com os experimentos, seja nas discussões (científicas, filosóficas, culturais, políticas e futebolísticas), seja nas risadas na hora do café ou simplesmente pela amizade. Vocês são sensacionais!

À banca examinadora desta tese: Prof. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi, Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto, Dra. Fernanda Dias de Moraes e Prof. Dr. Luis Alberto Beraldo de Moraes, pelas contribuições e correções que enriqueceram este trabalho e a minha formação.

Aos professores Dr. Romeu Cardoso Rocha-Filho e Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza, juntamente com suas respectivas equipes, pela confiança e por abrirem as portas de seus laboratórios para a utilização de equipamentos.

À Serviço Autônomo de Água e Esgoto de São Carlos, pela doação das amostras da estação de tratamento de esgoto.

À Lila, da Fazenda Recanto Feliz, pela gentileza e por permitir a coleta de água da nascente do Rio Monjolinho.

Aos amigos e colegas do “Brooks Team” (Baylor University – Texas): Jone Corrales, Gavin Saari, Kristin Connors, Bekah Burket, Lauren Kristofco, Casan Scott, Sam Haddad, Bowen Du, Spencer Williams, Matt Garbarino, Baylor Steele e Bryan Yates. Foi um prazer conhecê-los e conviver com todos vocês durante os 8 meses em que estive nos Estados Unidos. Agradeço especialmente meu amigo Gavin e sua esposa Kady, por toda ajuda, amizade, cervejas e risadas no Melody Ranch.

Aos colegas do Laboratório de Zoologia e Bioquímica Comparativa – LZBC da UFSCar, em especial à Driele Tavares, pela amizade, carinho, apoio, conselhos e por toda a ajuda com os experimentos e discussões sobre estresse oxidativo.

Ao “Seu” Ângelo pela ajuda com o transporte dos peixes, e ao Nathan Martins e Ricardo Sprengher, por alimentarem meus peixinhos durante os finais de semana em que estive ausente.

Ao Ademir Sertori, pela gentileza e disponibilidade em consertar as vidrarias, e ao Edilson de Almeida, por toda a ajuda com as peças da empacotadora e colunas cromatográficas.

Aos meus amigos da turma de Química Licenciatura 2006: Camila Gushi, João Guilherme de Moraes Pontes, Ricardo dos Santos, Katia Carnier, José Américo Brito, João Cesar Boschetti, Rafael Vieira, Claudio Souza, Minayana Giacometti e Renata Gallo, pela companhia, amizade, carinho e incentivo.

Aos meus grandes amigos Guilherme Rodrigo da Silva, Laura Cesarini, Henrique Favarom Barbosa e Giovani Ambrizzi por toda a amizade, pelo apoio, carinho e alegria em todos os momentos de minha vida.

Aos amigos Fer Almeida (24), Stanley Rodrigues e Renato Teiji, pela amizade durante todos estes anos em São Carlos, incentivo, conselhos, entusiasmo e momentos de descontração.

À Dra. Neila Cassiano, por toda ajuda científica, moral e espiritual. Obrigada pelas conversas e pelo seu ombro amigo nos momentos de desabafo da minha vida pessoal.

À Sebastiana Maria Ribeiro (Bá) e Sebastião Tirador, pela amizade, apoio, incentivo, conselhos, enfim... Por cuidarem de mim com muito carinho enquanto estive em São Carlos. E claro, às terapêuticas aulas de inglês.

À Vanessa Domingues, pela amizade, cumplicidade, carinho e companhia por mais de 17 anos. Sem dúvida minha melhor amiga e minha irmã de coração.

Ao meu querido irmão Murilo, pelo apoio, carinho, conselhos, cumplicidade e principalmente por segurar as pontas enquanto estive ausente. À minha cunhada Marina, pela amizade, apoio, carinho e por cuidar de meu irmão.

À Punky pelo amor incondicional, companhia e por me proporcionar muitas alegrias.

Aos amigos feitos na pós-graduação durante as disciplinas e nos churrascos de defesas.

A todos que de alguma forma, estiveram presente ao meu lado e contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1: FQs encontradas no meio ambiente e os modos de preparo de amostras.....	12
TABELA 1.2: Características físico-químicas das FQs selecionadas	21
TABELA 1.3: Parâmetros de operação da fonte de ionização	27
TABELA 1.4: Parâmetros do espectrômetro de massas para a obtenção dos íons fragmentos de cada antibiótico	36
TABELA 1.5: Parâmetros de linearidade, limite de detecção e quantificação do método	37
TABELA 1.6: Precisão e Exatidão intra e inter-lotes	39
TABELA 1.7: Estabilidade de auto-injetor (Tempo zero, 24 e 48 horas)	39
TABELA 1.8: Eficiência de extração obtida para os controles de qualidade para cada antibiótico	40
TABELA 1.9: Valores de CV para o efeito de matriz	41
TABELA 1.10: Características físico-químicas das amostras aquáticas coletadas na área de estudo	41
TABELA 1.11: Eficiência de extração obtida para as amostras controle de qualidade para a CIP (n=3)	45
TABELA 1.12: Precisão e exatidão intra e inter-lotes do método.....	47
TABELA 1.13: Estabilidade de auto-injetor (Tempo zero, 24 e 48 horas).....	48
TABELA 1.14: Valores de CV para o efeito de matriz	48
TABELA 2.1: Respostas das atividades para os sistemas SOD (U SOD mg proteína ⁻¹), para as concentrações de GSH (µmol GSH.mg proteína ⁻¹), para as atividades da GST (µmol CDNB min ⁻¹ mg proteína ⁻¹), da GPx (µmol NADPH min ⁻¹ .mg proteína ⁻¹) e da concentração de LPO (µmol CHP.mg proteína ⁻¹) em músculo de tilápias expostas ao CIP em 7 e 14 dias. * Indica diferença estatística (P>0,05) em relação ao controle. Valores representados por média ± desvio padrão dos indivíduos (n=10 para cada grupo)	71
TABELA 3.1: Linearidade, precisão, exatidão, recuperação e LQ do método analítico	82
TABELA 3.2: Valores de massa exata, fórmula molecular e precisão dos fármacos analisados	82
TABELA 3.3: Valores de massa exata, precisão e fórmula molecular dos metabólitos encontrados para o PRO	94

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1: Possível rota de fármacos no meio ambiente. (Adaptado de BILA 2003)	3
FIGURA 1.2: Percentual de municípios com rede coletora de esgoto, segundo as Grandes Regiões - 2000/2008 (Fonte: IBGE, Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2000/2008)	4
FIGURA 1.3: Disposição de resíduos perigosos e esgoto não tratado sobre áreas de recarga de aquíferos - 2000/2008 (Fonte: IBGE, Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2000/2008)	5
FIGURA 1.4: Ácido Nalidíxico, Quinolona e Fluoroquinolona: estrutura geral	7
FIGURA 1.5: Estrutura dos antibióticos selecionados para estudo	8
FIGURA 1.6: Esquema do mecanismo de exclusão das fases RAM-BSA (Adaptado de MULLETT 2007)	9
FIGURA 1.7: Experimentos realizados pelo analisador do tipo QqQ (Adaptado de Hocart 2010)	15
FIGURA 1.8: Etapas de preparação da coluna RAM-BSA	19
FIGURA 1.9: Esquema de imobilização da BSA	20
FIGURA 1.10 Perfil de exclusão. Amostra: água da nascente do Rio Monjolinho. Fase móvel: água ultrapura (100%); fase estacionária: coluna RAM-C ₈ -BSA (0,21 x 5 cm); comprimento de onda: 254 nm; volume injetado: 500 µL; vazão: 0,3 ml min ⁻¹	22
FIGURA 1.11: Esquema dos parâmetros avaliados no desenvolvimento de métodos por LC-MS	23
FIGURA 1.12: Esquema do posicionamento das válvulas do auto-injetor (Inicial)..25	
FIGURA 1.13: Esquema do posicionamento das válvulas do auto-injetor (Atual)..25	
FIGURA 1.14: Condições cromatográficas utilizadas para a exclusão das macromoléculas e eluição dos analitos na coluna RAM-C ₈ -BSA (5,0 x 0,21 cm d.i). Vazão: 0,5 mL/min. Fase móvel: A (água ultrapura 100%), B (gradiente convexo de 0-90% de ACN), C (ACN:água ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fórmico 90:10 v/v) e D (água ultrapura 100%).....	26
FIGURA 1.15: Cromatogramas dos antibióticos utilizando coluna RAM-C ₈ -BSA (5,0 x 0,21 cm) e condições cromatográficas descritas na FIGURA 1.14	26
FIGURA 1.16: Espectros de massa da NOR em experimento de varredura de íons produto, com diferentes energias de colisão. Condições cromatográficas da FIGURA 1.14	28
FIGURA 1.17: Proposta para fragmentação do íon [M+H] do NOR.....	29
FIGURA 1.18: Espectros de massa da CIP em experimento de varredura de íons produto, variando-se a voltagem da energia de colisão. Condições cromatográficas da FIGURA 1.14 (Página 26).....	30
FIGURA 1.19: Proposta para fragmentação do íon [M+H] da CIP.....	31

FIGURA 1.20: Espectros de massa da ENR em experimento de varredura de íons produto variando-se a voltagem da energia de colisão. Condições cromatográficas da FIGURA 1.14 (Página 26).....	32
FIGURA 1.21: Espectros de massa da OFL em experimento de varredura de íons produto, variando-se a voltagem da energia de colisão. Condições cromatográficas da FIGURA 1.14 (Página 26).....	33
FIGURA 1.22: Espectros de massa da GEM em experimento de varredura de íons produto, variando-se a voltagem da energia de colisão. Condições cromatográficas da FIGURA 1.14 (Página 26).....	34
FIGURA 1.23: Espectros de massa do MOX em experimento de varredura de íons produto variando-se a voltagem da energia de colisão. Condições cromatográficas da FIGURA 1.14 (Página 26).....	35
FIGURA 1.24: Curva de calibração para o fármaco CIP	37
FIGURA 1.25: Cromatogramas de SRM (Monitoramento do íon de quantificação) da NOR. Amostras: CQB preparada em água da nascente do Rio Monjolinho e branco. Condições cromatográficas descritas na FIGURA 1.14 (Página 26).....	38
FIGURA 1.26: Mapa da área de estudo (modificado do Google Maps). Pontos de coleta: 1 – Nascente; 2 – UFSCar; 3 – Universidade de São Paulo; 4 – Antiga usina da Companhia Paulista de Força e Luz	42
FIGURA 1.27: Cromatogramas de SRM das transições de quantificação e confirmação do CIP e NOR. Amostra: efluente da ETE de São Carlos. Condições cromatográficas descritas na FIGURA 1.14 (Página 26).....	43
FIGURA 1.28: Cromatograma extraído de SRM da CIP (Monitoramento do íon m/z 288), após extração em músculo de tilápia. Condições cromatográficas descritas na FIGURA 1.14 (Página 26).....	45
FIGURA 1.29: Curva de calibração para o fármaco CIP	46
FIGURA 1.30: Cromatogramas SRM (Monitoramento do íon de quantificação) da CIP. Amostras: CQM e branco. Condições cromatográficas descritas na FIGURA 1.14 (Página 26).....	47
FIGURA 1.31: Cromatogramas extraídos de MRM (Monitoramento do íon 288 e 314). Amostra: músculo de tilápia exposta ao CIP ($5,0 \mu\text{g L}^{-1}$) por 7 dias. Condições cromatográficas descritas na FIGURA 1.14 (Página 26).....	49
FIGURA 2.1: Esquema representando o sistema antioxidante, enzimático e não enzimático em célula de mamífero. Adaptado de FANG e colaboradores	56
FIGURA 2.2: Atividade da SOD em 7 e 14 dias de exposição ao CIP no fígado de tilápia (<i>O. niloticus</i>) do grupo controle (C) e grupos expostos a 0,5, 1,0 e $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$. * Indica diferença estatística ($P > 0,05$) em relação ao controle. Valores médios e desvio padrão: 7 dias (Controle = $12,7 \pm 2,92$; $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ = $13,1 \pm 3,88$; $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ = $7,04 \pm 1,55$; $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ = $8,85 \pm 1,9$), 14 dias (Controle = $14,7 \pm 3,9$; $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ = $16,9 \pm 1,42$; $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ = $7,65 \pm 0,889$; $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ = $6,27 \pm 0,926$)	60
FIGURA 2.3: Atividade específica da CAT, em 7 e 14 dias de exposição ao CIP no fígado de tilápia (<i>O. niloticus</i>) do grupo controle (C) e grupos expostos a 0,5, 1,0 e $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$. * Indica diferença estatística ($P > 0,05$) em relação ao controle. Valores médios e desvio padrão: 7 dias (Controle = $0,510 \pm 0,0891$; $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ = $0,530 \pm$	

0,197; 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $0,914 \pm 0,291$; 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $0,667 \pm 0,195$), 14 dias (Controle = $0,0555 \pm 0,0160$; 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $0,0456 \pm 0,0131$; 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $0,0965 \pm 0,0217$; 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $0,114 \pm 0,0268$)61

FIGURA 2.4: Atividade da GST em 7 e 14 dias de exposição ao CIP no fígado de tilápia (*O. niloticus*) do grupo controle (C) e grupos expostos a 0,5, 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. * Indica diferença estatística ($P>0,05$) em relação ao controle. Valores médios e desvio padrão: 7 dias (Controle = $13,5 \pm 4,63$; 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $12,7 \pm 5,52$; 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $16,7 \pm 6,9$; 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $13,2 \pm 5,63$), 14 dias (Controle = $7,04 \pm 4,60$; 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $8,31 \pm 2,037$; 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $16,6 \pm 9,60$; 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $19,1 \pm 4,88$)62

FIGURA 2.5: da GPx em 7 e 14 dias de exposição ao CIP no fígado de tilápia (*O. niloticus*) do grupo controle (C) e grupos expostos a 0,5, 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. * Indica diferença estatística ($P>0,05$) em relação ao controle. Valores médios e desvio padrão: 7 dias (Controle = $9,25 \pm 8,39$; 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $5,94 \pm 4,04$; 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $13,3 \pm 4,96$; 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $20,2 \pm 11,1$), 14 dias (Controle = $5,46 \pm 1,93$; 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $7,50 \pm 5,03$; 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $11,2 \pm 7,25$; 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $16,1 \pm 9,50$)63

FIGURA 2.6: Concentração de GSH, em 7 e 14 dias de exposição ao CIP no fígado de tilápia (*O. niloticus*) do grupo controle (C) e grupos expostos a 0,5, 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. * Indica diferença estatística ($P>0,05$) em relação ao controle. Valores médios e desvio padrão: 7 dias (Controle = $11,4 \pm 5,58$; 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $5,97 \pm 1,65$; 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $19,5 \pm 6,79$; 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $17,2 \pm 6,97$), 14 dias (Controle = $8,08 \pm 2,87$; 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $6,27 \pm 1,36$; 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $14,3 \pm 5,28$; 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $13,5 \pm 4,51$)64

FIGURA 2.7: Concentração de hidroperóxido de cumeno (CHP) na peroxidação lipídica (LPO) em fígado de tilápia (*O. niloticus*), em 7 e 14 dias de exposição ao CIP do grupo controle (C) e grupos expostos a 0,5, 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. * Indica diferença estatística ($P>0,05$) em relação ao controle. Valores médios e desvio padrão: 7 dias (Controle = $0,00185 \pm 0,0007059$; 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $0,00162 \pm 0,000815$; 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $0,0015 \pm 0,000530$; 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $0,00112 \pm 0,000640$), 14 dias (Controle = $0,0200 \pm 0,00667$; 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $0,0155 \pm 0,00723$; 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $0,0162 \pm 0,00517$; 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $0,0270 \pm 0,0116$)65

FIGURA 2.8. Atividade específica da CAT em brânquias de tilápia (*O. niloticus*) sem exposição (controle) e expostos por 7 dias à diferentes concentrações de CIP (0,5, 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Valores médios e desvio padrão: 7 dias (Controle = $13,0 \pm 2,88$; 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $11,7 \pm 3,87$; 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $11,6 \pm 3,74$; 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $9,17 \pm 3,13$), 14 dias (Controle = $11,3 \pm 3,13$; 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $10,6 \pm 4,06$; 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $10,3 \pm 2,91$; 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $12,3 \pm 2,44$)66

FIGURA 2.9: Atividade da SOD em brânquias de tilápia (*O. niloticus*) sem exposição (controle) e expostos por 7 dias à diferentes concentrações de CIP (0,5, 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). * Indica diferença estatística ($P>0,05$) em relação ao controle. Valores médios e desvio padrão: 7 dias (Controle = $10,4 \pm 5,00$; 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $20,6 \pm 6,97$; 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $20,7 \pm 6,21$; 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $14,5 \pm 8,58$), 14 dias (Controle = $32,0 \pm 13,3$; 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $38,5 \pm 5,89$; 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $38,9 \pm 8,27$; 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $39,5 \pm 11,8$)67

FIGURA 2.10: Concentração de GSH e atividade da GPx, em 7 e 14 dias de exposição ao CIP na brânquia de tilápia (*O. niloticus*) do grupo controle (C) e grupos expostos a 0,5, 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. * Indica diferença estatística ($P>0,05$) em relação ao controle. Valores médios e desvio padrão para GSH: 7 dias (Controle = $140 \pm 59,0$; 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $109 \pm 56,7$; 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $60,4 \pm 22,1$; 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $71,1 \pm 43,3$), 14 dias (Controle = $90,1 \pm 45,0$; 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $160 \pm 50,1$; 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $160 \pm 47,4$; 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $158 \pm 38,2$). Valores médios e desvio padrão para GPx: 7 dias

(Controle = $9,57 \pm 2,18$; $0,5 \mu\text{g L}^{-1} = 10,0 \pm 1,80$; $1,0 \mu\text{g L}^{-1} = 11,4 \pm 3,99$; $5,0 \mu\text{g L}^{-1} = 12,7 \pm 1,88$), 14 dias (Controle = $11,7 \pm 3,50$; $0,5 \mu\text{g L}^{-1} = 8,51 \pm 3,07$; $1,0 \mu\text{g L}^{-1} = 8,28 \pm 3,40$; $5,0 \mu\text{g L}^{-1} = 6,25 \pm 1,61$)68

FIGURA 2.11: Atividade da GST em 7 e 14 dias de exposição ao CIP na brânquia de tilápia (*O. niloticus*) do grupo controle (C) e grupos expostos a 0,5, 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. * Indica diferença estatística ($P > 0,05$) em relação ao controle. Valores médios e desvio padrão: 7 dias (Controle = $20,0 \pm 3,90$; $0,5 \mu\text{g L}^{-1} = 33,9 \pm 4,81$; $1,0 \mu\text{g L}^{-1} = 24,9 \pm 3,61$; $5,0 \mu\text{g L}^{-1} = 23,1 \pm 3,46$), 14 dias (Controle = $23,0 \pm 4,51$; $0,5 \mu\text{g L}^{-1} = 31,9 \pm 8,24$; $1,0 \mu\text{g L}^{-1} = 28,4 \pm 5,66$; $5,0 \mu\text{g L}^{-1} = 33,3 \pm 5,85$)69

FIGURA 2.12: Peroxidação lipídica (LPO) em 7 e 14 dias de exposição ao CIP na brânquia de tilápia (*O. niloticus*) do grupo controle (C) e grupos expostos a 0,5, 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. * Indica diferença estatística ($P > 0,05$) em relação ao controle. Valores médios e desvio padrão: 7 dias (Controle = $0,0010 \pm 0,000562$; $0,5 \mu\text{g L}^{-1} = 0,00172 \pm 0,000907$; $1,0 \mu\text{g L}^{-1} = 0,00223 \pm 0,000673$; $5,0 \mu\text{g L}^{-1} = 0,00191 \pm 0,000828$), 14 dias (Controle = $0,00175 \pm 0,000472$; $0,5 \mu\text{g L}^{-1} = 0,00234 \pm 0,000760$; $1,0 \mu\text{g L}^{-1} = 0,00214 \pm 0,000830$; $5,0 \mu\text{g L}^{-1} = 0,00154 \pm 0,000512$)70

FIGURA 2.13: Atividade AChE, em 7 e 14 dias de exposição ao CIP no músculo de tilápia (*O. niloticus*) do grupo controle (C) e grupos expostos a 0,5, 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. * Indica diferença estatística ($P > 0,05$) em relação ao controle. Valores médios e desvio padrão: 7 dias (Controle = $8,88 \pm 2,84$; $0,5 \mu\text{g L}^{-1} = 9,65 \pm 2,50$; $1,0 \mu\text{g L}^{-1} = 5,52 \pm 1,30$; $5,0 \mu\text{g L}^{-1} = 7,98 \pm 3,32$), 14 dias (Controle = $7,99 \pm 2,10$; $0,5 \mu\text{g L}^{-1} = 5,67 \pm 2,83$; $1,0 \mu\text{g L}^{-1} = 5,41 \pm 4,58$; $5,0 \mu\text{g L}^{-1} = 5,17 \pm 2,20$)72

FIGURA 3.1: Esquema do analisador de massas do tipo Orbitrap, modelo LTQ Orbitrap XL – Thermo Fisher (Adaptada de MAKAROV, 2006)76

FIGURA 3.2: Estrutura dos fármacos utilizados em pisciculturas selecionados para o estudo de biotransformação *in vitro*.....79

FIGURA 3.3: Depleção da concentração do propranolol em fração S9 de fígado de truta (*O. mykiss*). Vermelho: S9 inativa; preto: S9 ativa (n=2 para cada medida)...82

FIGURA 3.4: Depleção da concentração do diclofenaco em fração S9 de fígado de truta (*O. mykiss*). Vermelho: S9 inativa; preto: S9 ativa (n=2 para cada medida)...83

FIGURA 3.5: Depleção da concentração do enrofloxacino em fração S9 de fígado de truta (*O. mykiss*). Vermelho: S9 inativa; preto: S9 ativa (n=2 para cada medida).....84

FIGURA 3.6: Depleção da concentração do florfenicol em fração S9 de fígado de truta (*O. mykiss*). Vermelho: S9 inativa; preto: S9 ativa (n=2 para cada medida).....85

FIGURA 3.7: Depleção da concentração da sulfadimetoxina em fração S9 de fígado de truta (*O. mykiss*). Vermelho: S9 inativa; preto: S9 ativa (n=2 para cada medida).....86

FIGURA 3.8: Depleção da concentração da oxitetraciclina em fração S9 de fígado de truta (*O. mykiss*). Vermelho: S9 inativa; preto: S9 ativa (n=2 para cada medida).....87

FIGURA 3.9: Depleção da concentração da trimetoprima em fração S9 de fígado de truta (*O. mykiss*). Vermelho: S9 inativa; preto: S9 ativa (n=2 para cada medida).....88

FIGURA 3.10: Rota proposta para a biotransformação in vitro do PRO por frações S9 de fígado de truta	91
FIGURA 3.11: Cromatogramas representativos do 4'-OHPRO (Tempo de retenção: 5,92 min), 4'-Glu-OHPRO (Tempo de retenção: 8,86 min) e NDI-PRO (Tempo de retenção: 6,78 min)	92
FIGURA 3.12: Espectro de MS ⁿ 4'-OHPRO (<i>m/z</i> 276.1595) no tempo de incubação de 180 min	93
FIGURA 3.13: Espectro de MS ⁿ do 4'- Glu-OHPRO (<i>m/z</i> 452,19138) no tempo de incubação de 180 min	93
FIGURA 3.14: Espectro de MS ⁿ do NDI-PRO (<i>m/z</i> 218,11763) no tempo de incubação de 180 min	94

RESUMO

FLUOROQUINOLONAS EM AMOSTRAS AQUOSAS E EM TELEÓSTEOS: QUANTIFICAÇÃO, AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE E ENSAIOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO

A presença de fármacos no meio ambiente é uma importante questão na avaliação de impactos ambientais. As fluoroquinolonas (FQs) representam uma classe de compostos amplamente utilizada na medicina humana e veterinária, e seu aporte no ambiente é contínuo e ausente de monitoramento. Diante deste panorama, é importante a avaliação dos níveis destes compostos, bem como o impacto toxicológico em organismos aquáticos. O presente trabalho discute o desenvolvimento e validação de métodos analíticos, por injeção direta de amostras usando a cromatografia líquida hifenada ao espectrômetro de massas, para a determinação multiresidual de FQs, em efluentes do município de São Carlos – SP, e para ensaios de toxicidade do ciprofloxacino (CIP) em peixes. Para o monitoramento em efluentes, seis FQs foram avaliadas: CIP, gemifloxacino, moxifloxacino, ofloxacino, enrofloxacino, e norfloxacino (NOR). As FQs não foram encontradas nos 4 pontos de coleta ao longo do Monjolinho, mas em amostras de influente da estação de tratamento de esgoto de São Carlos foram quantificadas a CIP (195 ng L^{-1}) e a NOR (270 ng L^{-1}). Foram feitos ensaios de estresse oxidativo, por avaliação de sistemas enzimáticos e não enzimáticos em espécie *O. niloticus*, expostos ao CIP em diferentes concentrações ($0,5$, $1,0$ e $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$) em períodos de 7 e 14 dias. Estes ensaios bioquímicos demonstraram que o organismo do peixe não foi capaz de realizar a detoxificação, evidenciado pelos danos severos ocorridos à níveis celulares, principalmente nas brânquias e fígado. Frações S9 de fígado de trutas (*O. mykiss*) foram utilizadas a fim de avaliar a biotransformação e o potencial bioacumulativo de alguns fármacos comumente utilizados em pisciculturas. Os resultados obtidos com o modelo *in vitro* corroboram para o entendimento das similaridades e diferenças entre as espécies de peixes, e também para a avaliação do impacto ambiental causado por estes compostos presentes no meio ambiente.

ABSTRACT

FLUOROQUINOLONES IN AQUEOUS SAMPLES AND TELEOST: QUANTIFICATION, TOXICITY ASSESSMENT AND BIOTRANSFORMATION ASSAYS

The presence of drugs in the environment is an important issue in environmental risk assessment. The fluoroquinolones represent a class of compounds widely used in human and veterinary medicine, and its apport in the environment is continuous and lacking of monitoring. In this scope, it is important to evaluate the levels of these compounds in the environment and their toxicological impact on aquatic organisms. The present study discuss the development and validation of analytical methods for direct injection of samples using liquid chromatography coupled to mass spectrometry for multiresidual determination of fluoroquinolones in effluents of São Carlos – SP, and toxicity tests of ciprofloxacin (CIP) on fish. For monitoring of effluent samples, six fluoroquinolones were evaluated: CIP, gemifloxacin, moxifloxacin, ofloxacin, enrofloxacin, and norfloxacin (NOR). In effluent samples from wastewater treatment plant, CIP and NOR were quantified at concentrations of 195 ng L⁻¹ and 270 ng L⁻¹, respectively. Toxicity studies of CIP in species of *O. niloticus* exposed to different concentrations (0.5, 1.0 and 5.0 µg L⁻¹) for periods of 7 and 14 days were evaluated by enzymatic and non-enzymatic systems. The biochemical assays demonstrated that fishes were not able to perform the detoxification, which was evidenced by the severe damage in their cells, especially on the gills and liver of the fishes. *In vitro* studies were carried out in species of *O. mykiss*, evaluating the biotransformation and bioaccumulative potential of some drugs commonly used in fish farms, including fluoroquinolones. The results using this *in vitro* model corroborate to the understanding of similarities and differences among different species of fish, as well as the assessment of environmental impact due to these compounds present in the environment.

Sumário

DETERMINAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS FLUOROQUINOLÔNICOS EM AMOSTRAS AMBIENTAIS AQUÁTICAS E EM MÚSCULO DE TILÁPIA	1
1.1 INTRODUÇÃO.....	2
FÁRMACOS EM MEIO AMBIENTE	2
FLUOROQUINOLONAS	6
INJEÇÃO DIRETA DE AMOSTRAS	9
ESPECTROMETRIA DE MASSAS	13
ACUMULAÇÃO DE FÁRMACOS EM ORGANISMOS AQUÁTICOS	16
1.2 OBJETIVOS	17
OBJETIVOS GERAIS	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
PREPARO DA COLUNA RAM-BSA	18
ANÁLISE DO TEMPO DE EXCLUSÃO DOS INTERFERENTES DA MATRIZ E RETENÇÃO DAS FQS PELA COLUNA RAM-BSA	21
DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA ANÁLISE DOS ANTIBIÓTICOS SELECIONADOS	23
ESPECTROMETRIA DE MASSAS: AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE IONIZAÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS.....	27
VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	36
APLICAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DAS SEIS FLUOROQUINOLONAS EM AMOSTRAS AMBIENTAIS	42
DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE EXTRAÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DE CIPROFLOXACINO EM MÚSCULO DE TILÁPIAS	44
VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE CIPROFLOXACINO EM MÚSCULO DE TILÁPIA	46
APLICAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO PARA DETERMINAÇÃO DE CIPROFLOXACINO EM MÚSCULO DE TILÁPIA	49
1.4 CONCLUSÕES.....	51
EFEITO DA EXPOSIÇÃO AOCIPROFLOXACINO EM FÍGADO, BRÂNQUIA E MÚSCULO DE TILÁPIA (O. NILOTICUS)	53
2.1 INTRODUÇÃO.....	54
BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E ESTRESSE OXIDANTE.....	54
A TILÁPIA DO NILO	59
CIPROFLOXACINO NO MEIO AMBIENTE.....	59
2.1 OBJETIVOS.....	60
OBJETIVOS GERAIS	60

OBJETIVOS ESPECÍFICOS	60
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
2.3.1 ALTERAÇÕES NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE EM TECIDO HEPÁTICO DE TILÁPIA (<i>O. NILOTICUS</i>)	60
SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE SOD-CAT	61
SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE GPX, GSH E GST	63
NÍVEIS DE HIDROPERÓXIDO DE CUMENO NA LIPOPEROXIDAÇÃO	65
2.3.2 ALTERAÇÕES NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE EM TECIDO BRANQUIAL DE TILÁPIA (<i>O. NILOTICUS</i>)	66
SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE SOD-CAT	67
SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE GPX, GSH E GST	68
NÍVEIS DE HIDROPERÓXIDO DE CUMENO NA LIPOPEROXIDAÇÃO	70
2.3.3 ALTERAÇÕES NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E NA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE EM TECIDO MUSCULAR DE TILÁPIA (<i>O. NILOTICUS</i>)	71
ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE	72
2.4 CONCLUSÕES	73
ENSAIOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO <i>IN VITRO</i> UTILIZANDO FRAÇÕES S9 DE FÍGADO DE TRUTA (<i>O. MYKISS</i>)	75
3.1 INTRODUÇÃO	76
ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO	76
BIOTRANSFORMAÇÃO <i>IN VITRO</i> EM ORGANISMOS AQUÁTICOS	78
FÁRMACOS NA AQUICULTURA	79
3.1 OBJETIVOS	81
OBJETIVOS GERAIS	81
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	81
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
3.3.1 VERIFICAÇÃO DO MÉTODO DE LC-MS/MS	81
3.3.2 INCUBAÇÕES DAS FRAÇÕES S9	83
PROPRANOLOL E DICLOFENACO	83
ENROFLOXACINO	85
FLORFENICOL	86
SULFADIMETOXINA	87
OXITETRACICLINA	88
TRIMETOPRIMA	89
ENSAIOS DE TOXICIDADE <i>IN VITRO</i> : PERSPECTIVAS	91
3.3.3 PRODUTOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO: DCF E PRO	92
3.4 CONCLUSÕES	96
CONSIDERAÇÕES FINAIS	98

EXPERIMENTAL	101
5.1 GENERALIDADES	102
5.2 PREPARO DA COLUNA RAM-BSA	103
5.3 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	103
5.4 ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS AMBIENTAIS	104
5.5 SISTEMA LC-MS	104
5.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DAS FQS EM EFLUENTES	105
5.7 ANIMAIS	108
5.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	108
5.9 COLETA DAS AMOSTRAS TECIDUAIS	109
5.10 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE CIP EM MÚSCULO DE TILÁPIA	109
5.11 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	112
5.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES	113
5.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	115
5.14 ENSAIOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO IN VITRO UTILIZANDO FRAÇÕES S9 DE FÍGADO DE TRUTA	116
5.15 TRATAMENTO DOS DADOS	117
REFERÊNCIAS	119
ANEXO	135

Capítulo 1

**Determinação de antibióticos
fluoroquinolônicos em amostras
ambientais aquáticas e em músculo de
tilápia**

Determinação de antibióticos fluoroquinolônicos em amostras ambientais aquáticas e em músculo de tilápia

1.1 Introdução

Fármacos no meio ambiente

Até o início da década de 90, os poluentes orgânicos persistentes e metais pesados eram os principais focos de monitoramento por programas relacionados ao meio ambiente. Nos dias de hoje, estes compostos já podem ser considerados menos relevantes, uma vez que suas emissões têm sido reduzidas através da adoção de medidas para eliminação das fontes de poluição¹.

Nos últimos anos, o foco da preocupação de agências ambientais e de saúde encontra-se em compostos ainda chamados de emergentes, os quais incluem surfactantes, fármacos e produtos de higiene pessoal. Tais compostos são introduzidos ao meio ambiente principalmente em decorrência da ação humana, e estudos recentes mostram a ocorrência ambiental destes especialmente em corpos hídricos²⁻⁵.

No mercado global, existem hoje mais de 3000 substâncias utilizadas como medicamentos. Um fármaco *blockbuster*, com vendas anuais superiores a US\$ 1 bilhão, pode ser um indicativo de seu aporte no meio ambiente, em larga escala. Antidepressivos, anti-ulcerativos, antibióticos, redutores lipídicos e anti-histamínicos são campeões de vendas em todo o mundo e, conseqüentemente, são poluidores ambientais em potencial⁶⁻⁸. Muitos destes fármacos, quando administrados, são totalmente absorvidos tornando-os inativos. Porém outros, os quais podem ser de uso externo ou que não são totalmente absorvidos, podem ser excretados em sua forma ativa, atingindo assim os sistemas hídricos^{9,10}.

Ao atingir a estação de tratamento de esgoto (ETE), o fármaco pode ser mineralizado a gás carbônico e água, pode passar por um processo metabólico ou ser parcialmente degradado, ou ainda resistir aos processos convencionais de tratamento de esgoto, sendo persistentes ao meio ambiente¹¹. Alguns fármacos também podem ser absorvidos pelo lodo do fundo dos tanques de decantação nas ETE e, assim, contaminar o ambiente terrestre quando este sedimento for utilizado como fertilizante

agrícola. Outra maneira de contaminação dos solos é a através das fezes de animais aos quais foram administrados fármacos¹². Devido ao processo de escoamento superficial e/ou percolação vertical, estes fármacos podem atingir as águas subterrâneas e também podem ser carregados pela chuva (lixiviação), sendo despejados em águas superficiais¹³. A FIGURA 1.1 mostra possíveis fontes e caminhos para os fármacos descartados no meio ambiente.

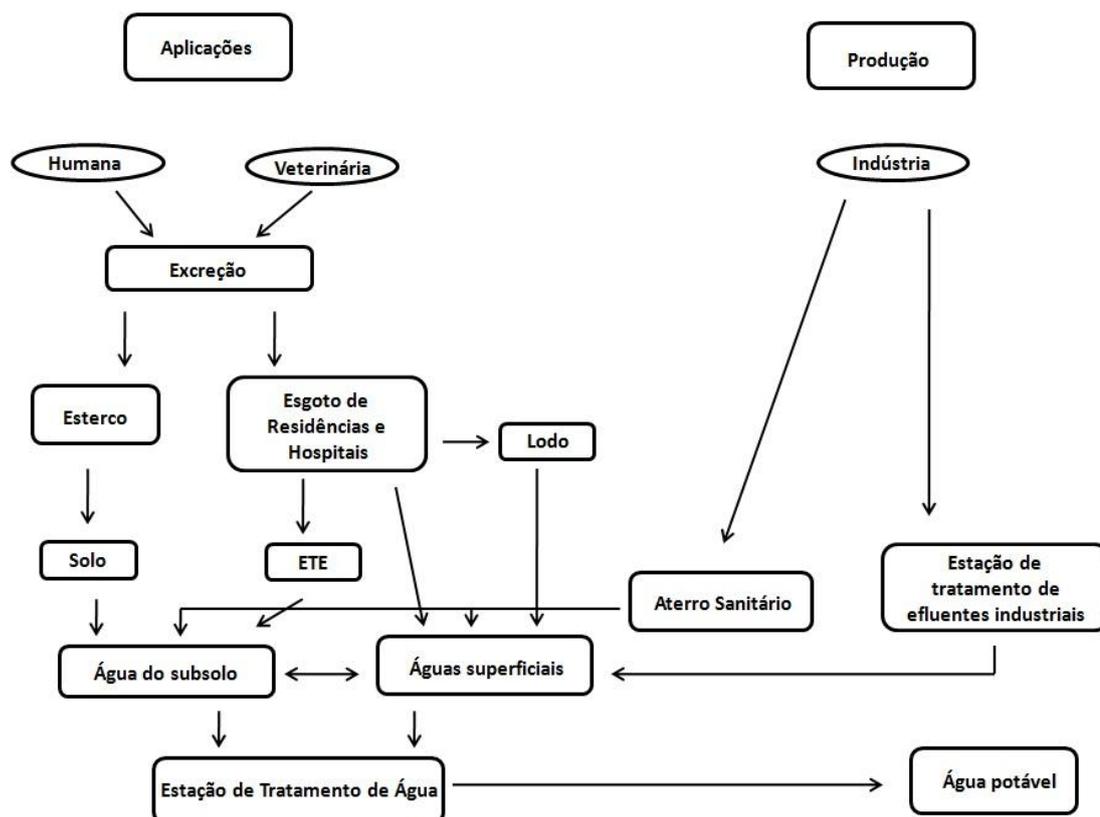


FIGURA 1.1: Possível rota de fármacos no meio ambiente. (Adaptado de BILA 2003).

Diante disso, pesquisas têm revelado que muitos fármacos não são completamente removidos durante o tratamento de esgoto convencional, e suas ocorrências tem sido notificadas em efluentes de estação de tratamento de esgoto (ETE), rios, lagos, e mais recentemente em lençóis freáticos^{9,14-16}. A persistência destes compostos nos sistemas hídricos ainda é pouco conhecida¹⁷, e poucos estudos têm sido realizados para águas naturais¹⁸.

Uma vez no ambiente, o destino dos fármacos depende de suas características estruturais e propriedades físico-químicas, como fotossensibilidade, biodegradabilidade, lipofilicidade¹⁹. LAM e MABURY²⁰ estudaram a fotodegradação

dos fármacos atorvastatina (antilipêmico), carbamazepina (anticonvulsante), levofloxacino e sulfametoxazol (antibióticos) e sugeriram que reações de fototransformação constituem um importante fator de limitação da persistência destes fármacos em águas superficiais. Existem diversos mecanismos que limitam a persistência de fármacos em ambientes aquáticos, no entanto, o aporte deste tipo de contaminante é constante, o que confere caráter de pseudo-persistência¹⁹.

É importante ressaltar que existem muitos países, incluindo o Brasil, em que o sistema de saneamento básico e a rede de esgoto são muito precários, sendo que em algumas vezes estes são inexistentes. No Brasil, segundo a Pesquisa Nacional de Saneamento - PNSB 2008, pouco mais da metade dos municípios brasileiros (55,2%) apresentaram serviço de esgotamento sanitário por rede coletora (FIGURA 1.2).

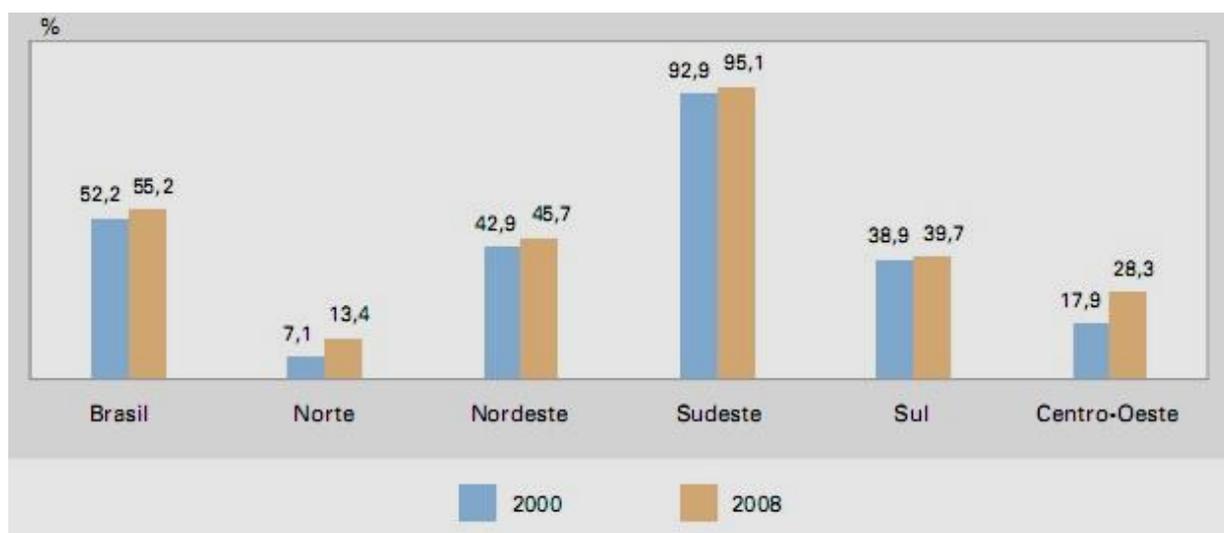


FIGURA 1.2: Percentual de municípios com rede coletora de esgoto, segundo as Grandes Regiões - 2000/2008 (Fonte: IBGE, Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2000/2008)

Em 2008, somente a Região Sudeste registrou uma elevada percentagem de municípios com rede coletora de esgoto (95,1%). Em todas as demais regiões, menos da metade dos municípios a possuíam. Diversos problemas ambientais estão associados à precariedade ou ausência de rede de esgoto, porém o mais preocupante é a contaminação das fontes de água potável, como reservatórios subterrâneos e mananciais. A FIGURA 1.3 mostra um retrato da ameaça de contaminação dos principais sistemas aquíferos do Brasil, segundo dados de 2008.

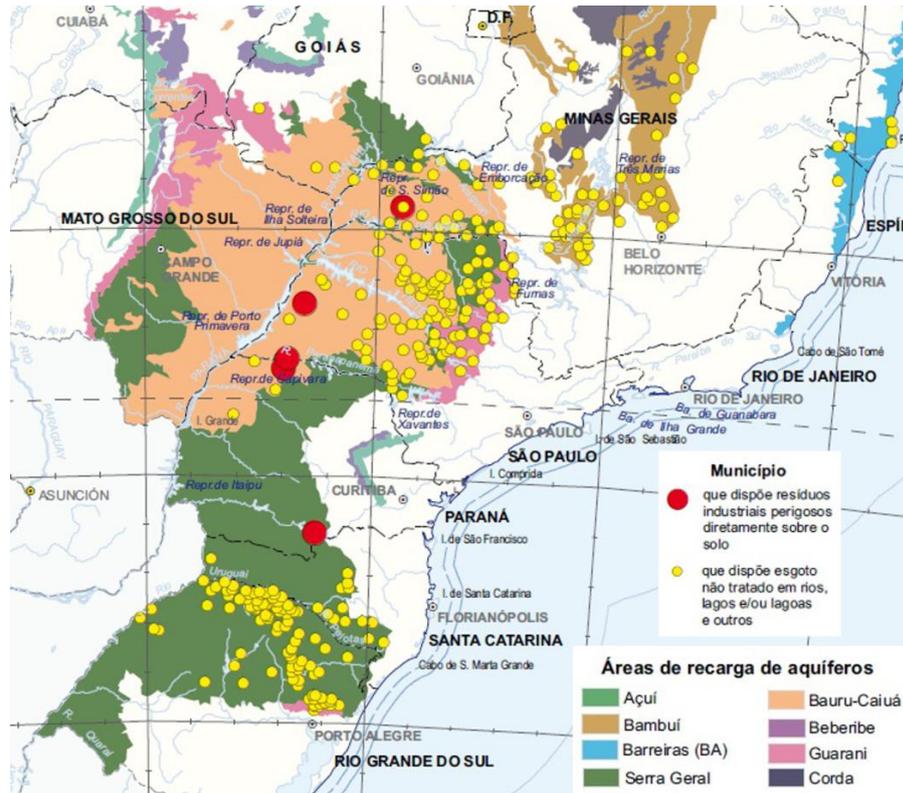


FIGURA 1.3: Disposição de resíduos perigosos e esgoto não tratado sobre áreas de recarga de aquíferos - 2000/2008 (Fonte: IBGE, Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2000/2008)

Desta forma, o lançamento de esgoto doméstico in natura nos corpos hídricos é um grande problema público, e o principal fator que compromete a qualidade das águas utilizadas tanto para o abastecimento público como para a irrigação e recreação.

Apesar de os fármacos serem detectados no ambiente em baixas concentrações ($\text{ng} - \mu\text{g L}^{-1}$), este quadro gera grande preocupação. Efeitos de toxicidade costumam ser observados somente em concentrações acima de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ²¹. É importante salientar que os bioensaios de toxicidade focam efeitos agudos, porém os organismos aquáticos são expostos a baixas concentrações de forma contínua e, assim, efeitos crônicos são também possíveis¹⁹. Estes últimos são mais escassamente avaliados, pois requerem prazos longos para constatação da toxicidade crônica.

Vários trabalhos têm investigado os níveis de produtos farmacêuticos em águas residuais e em matrizes aquosas e sólidas^{4,22-26}. A classe terapêutica referente aos antibióticos encontra-se entre as mais estudadas, uma vez que é amplamente empregada no tratamento de doenças tanto em humanos como em animais¹³, e a sua emissão no ambiente pode levar a um aumento na ocorrência de

bactérias resistentes^{1,27-30}. Particularmente no Brasil, estudos envolvendo a análise de águas na região da cidade de Campinas (SP), incluindo águas de mananciais e potáveis, identificaram e quantificaram, em elevadas concentrações, hormônios, analgésicos, antiinflamatórios e antibióticos³¹.

A remoção incompleta de fármacos durante o aporte no ambiente pode comprometer a qualidade dos recursos hídricos. Sendo assim, estudos devem ser realizados a fim de permitir a quantificação e o monitoramento destes em sua forma ativa, bem como dos produtos provenientes de processos metabólicos.

Fluoroquinolonas

Quinolonas compreendem um grande e crescente grupo de agentes antibacterianos sintéticos³². Na década de 80, após intensas pesquisas realizadas a partir das primeiras quinolonas, foram originadas as quinolonas de segunda geração, denominadas fluoroquinolonas.

Quimicamente, as fluoroquinolonas diferem das anteriores por possuírem a combinação de um átomo de flúor na posição 6 da estrutura da quinolona e um grupo piperazinil na posição 7 (FIGURA 1.4). Esta combinação levou a um maior espectro de ação e a um aumento da capacidade de penetração na parede bacteriana levando a uma melhor atividade contra bactérias Gram-negativas, passando a abranger algumas espécies Gram-positivas. Desta forma, melhor perfil farmacocinético foi atingido, chegando a ter uma atividade antibacteriana 1.000 vezes superior à observada pelo ácido nalidíxico, seu antecessor. Isso levou também ao aumento na absorção por via oral, distribuição tecidual e estabilidade metabólica³²⁻³⁵.

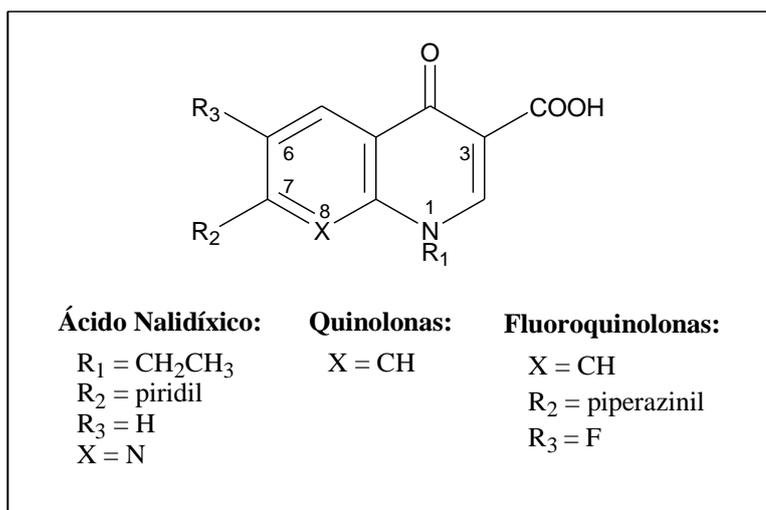


FIGURA 1.4: Ácido Nalidíxico, Quinolona e Fluoroquinolona: estrutura geral.

As fluoroquinolonas atuam interferindo na replicação e transcrição da célula bacteriana, desabilitando duas enzimas importantes neste processo, a topoisomerase II (DNA girase), e a topoisomerase IV^{32,35,36}. A DNA girase é essencial para iniciar o processo de replicação, e a topoisomerase IV é responsável por remover a interligação entre os cromossomos, permitindo a separação para duas células, finalizando a etapa^{32,36,37}. As fluoroquinolonas interagem com estas enzimas formando um complexo, criando uma nova conformação que resulta na inibição da atividade enzimática bacteriana normal. Desta forma, este complexo bloqueia o processo de replicação, inibindo a síntese do DNA da bactéria, culminando com a morte da célula^{32,36,37}.

As fluoroquinolonas são bons modelos de antibióticos para se avaliar o impacto no ambiente⁶, pois são usadas para diversos tratamentos clínicos, o que a torna a quarta classe mais utilizada na medicina³⁸. Trabalhos reportados mostram que alguns antibióticos desta classe, como ciprofloxacino e levofloxacino, têm sido detectados em águas de esgotos e de rios, na concentração de ng L⁻¹ a µg L⁻¹^{16,38,39}. Estes fármacos são resistentes à degradação microbiana, e podem persistir no ambiente aquático⁴⁰. O aporte das fluoroquinolonas no ambiente aquático ocorre principalmente como consequência do tratamento inadequado dos produtos de excreção humanos e animais. Portanto, se faz necessário o desenvolvimento de métodos analíticos simples e sensíveis que possibilitem determinar os níveis de ocorrência destes fármacos e possibilitem alta frequência analítica para o monitoramento dos mesmos⁴⁰.

Os fármacos selecionados (FIGURA 1.5) para este estudo foram seis, dos quais gemifloxacino, moxifloxacino e ofloxacino são de uso humano, enrofloxacino é de uso veterinário, e ciprofloxacino e norfloxacino são de ambos os usos.

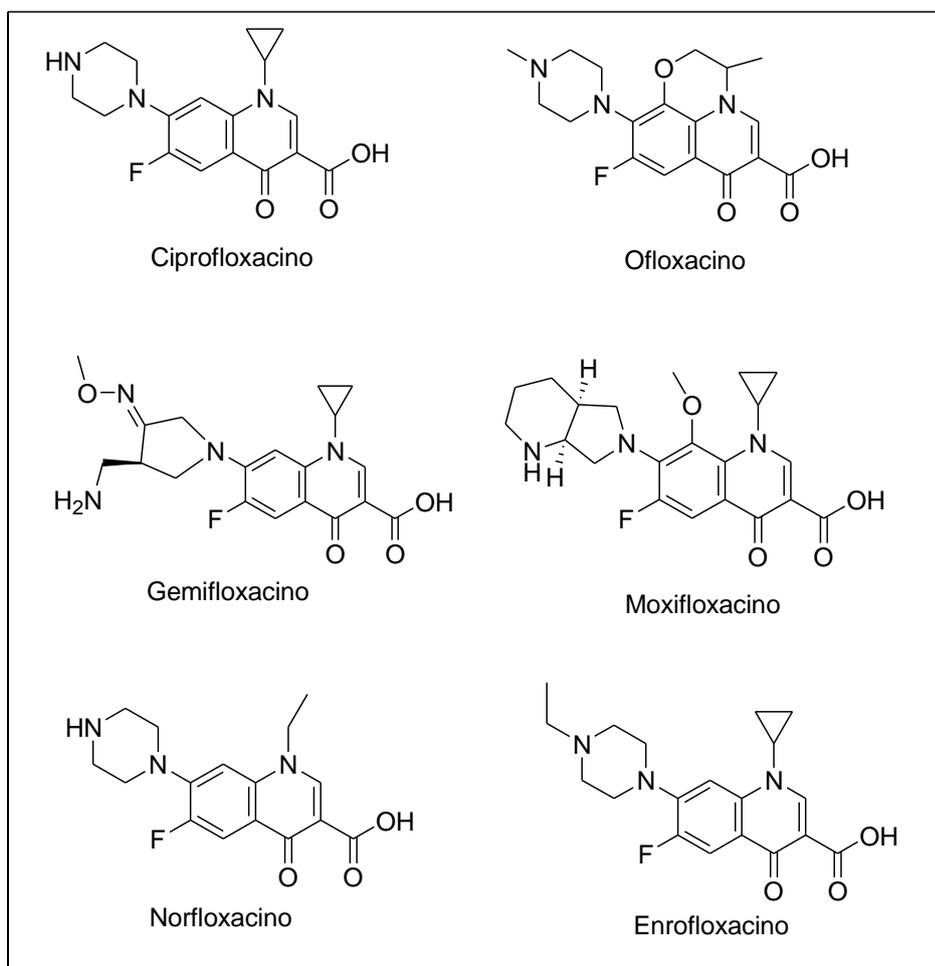


FIGURA 1.5: Estrutura dos antibióticos selecionados para estudo.

Dos antibióticos de uso humano, o ciprofloxacino é o mais utilizado. Este fármaco é amplamente eficaz em infecções do trato urinário, respiratório e gastrointestinal, além de infecções de pele, ossos e articulações. Gemifloxacino é indicado apenas para tratamento de doenças respiratórias. O moxifloxacino, além de ser indicado no tratamento de infecções respiratórias e de pele, também é utilizado no tratamento de infecções intra-abdominais e abscessos³⁵.

As fluoroquinolonas de uso veterinário enrofloxacino e norfloxacino possuem grande espectro de atuação contra uma gama enorme de bactérias. Estes medicamentos são administrados a fim de prevenir patologias ou como agentes

terapêuticos. Desta maneira, a seleção destes fármacos se justifica uma vez que a cidade de São Carlos apresenta intensa atividade pecuária na produção de leite, frango e carne bovina.

Injeção direta de amostras

Embora as análises por LC-MS/MS possam ser cada vez mais seletivas e sensíveis, mesmo com matrizes complexas como fluidos biológicos ou ambientais, o preparo da amostra ainda é um requisito essencial durante o desenvolvimento do método⁴¹⁻⁴³.

A investigação do efeito de matriz (EM), onde se avalia os efeitos na ionização dos analitos alvos causados por coeluição de compostos presentes na matriz, é um importante parâmetro a ser avaliado em LC-MS⁴⁴⁻⁴⁶. Estes compostos podem interferir na supressão ou aumento da resposta do sinal, alterando-se a reprodutibilidade, a linearidade e a exatidão do método. Desta forma, estratégias adequadas para o tratamento de amostras complexas devem ser adotadas, a fim de proporcionar a extração do analito de interesse a partir da matriz com altos níveis de recuperação e, principalmente, produzir amostras livre de interferentes⁴⁷.

O uso de colunas de fases de acesso restrito (RAM) têm se destacado nos últimos anos⁴⁸. Estas fases permitem o uso de injeções diretas e repetidas de matrizes complexas (ex: plasma, urina, leite, águas, etc) nos sistemas de LC. Nessas fases, a superfície externa da sílica é hidrofílica, enquanto os analitos são retidos nos poros das partículas por diferentes interações (FIGURA 1.6).

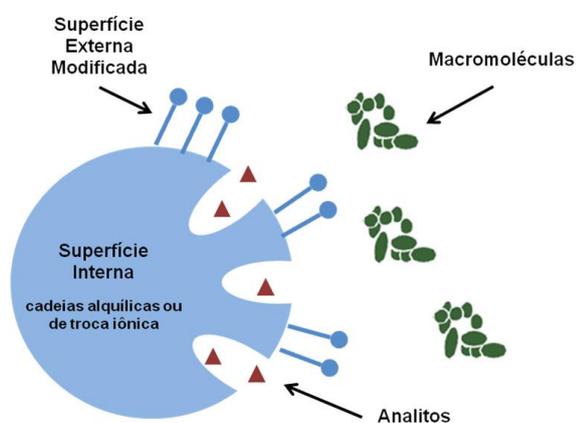


FIGURA 1.6: Esquema do mecanismo de exclusão das fases RAM-BSA (Adaptado de MULLETT 2007⁴⁹).

As fases de acesso restrito possuem uma barreira de difusão física e outra química, para produzir uma cromatografia de superfície discriminante. As macromoléculas podem ser excluídas por uma barreira física que está relacionada ao diâmetro do poro e/ou por uma barreira de difusão química, criada por uma rede de proteínas ou polímeros na superfície externa da partícula. Associando a barreira de difusão química e a barreira de difusão física (microporos), apenas as pequenas moléculas são capazes de acessar o interior dos poros. Assim, as fases do tipo RAM combinam os princípios da cromatografia de exclusão, afinidade, reverso, troca iônica, dentre outros^{47,48}.

As colunas RAM podem ser utilizadas tanto no modo unidimensional quanto no multidimensional⁵⁰. No modo unidimensional, a coluna é utilizada simultaneamente para a exclusão e separação dos compostos. Durante a etapa de extração, os analitos são retidos enquanto as macromoléculas são eluídas no volume morto da coluna. Em seguida, os analitos são eluídos da RAM para o detector⁵⁰.

Entretanto, as fases de acesso restrito apresentam baixa seletividade^{48,50}, com baixa eficiência cromatográfica. Para contornar esta limitação, pode-se fazer o uso de uma coluna analítica de maior eficiência e seletividade em uma segunda dimensão. Um sistema cromatográfico multidimensional (2D LC) pode ser definido como um conjunto de dois ou mais sistemas cromatográficos, os quais devem apresentar diferentes seletividades para a separação dos componentes de uma dada amostra a ser analisada. Desta forma, os mecanismos envolvidos na separação dos compostos em cada dimensão devem ser distintos, e proporcionar um ganho de seletividade⁵¹.

Em injeção direta de amostra, 2D LC tem sido realizada principalmente no modo *heart-cutting*. Nesse modo, na primeira dimensão há o fracionamento da amostra e apenas a fração selecionada é transferida para segunda dimensão⁵². Este modo tem sido amplamente utilizado para quantificação de fármacos e metabólitos em fluidos biológicos ou matrizes ambientais^{53,54}.

O sistema 2D LC no modo *heart-cutting* pode ser operado tanto on-line quanto off-line. A designação on-line refere-se a arranjos de operação onde a amostra é injetada na primeira coluna e em seguida é transferida para a segunda coluna, através de um sistema de comutação de colunas^{11,55}.

A grande vantagem da cromatografia em 2D é que a capacidade de separação em cada dimensão pode ser multiplicada, o que habilita a resolução de

amostras complexas. Entretanto, é importante ressaltar que o acoplamento de colunas em LC não é simples, uma vez que nem sempre é possível obter completa ortogonalidade necessária para o aumento da capacidade de pico⁵⁵. Um sistema é considerado ortogonal se a retenção dos analitos nas diferentes dimensões forem estatisticamente independentes. A ortogonalidade do sistema é uma característica muito importante para alcançar bons resultados na separação dos constituintes presentes numa dada amostra, e quanto mais ortogonal for o sistema, maior é capacidade de pico⁵².

Um maior grau de independência estatística é alcançado quando os mecanismos de retenção e separação cromatográficas forem totalmente diferentes nas duas dimensões. No entanto, a ortogonalidade não depende somente da diferença de seletividade entre dois modos de eluição, mas também da retenção relativa dos analitos nos dois sistemas. Desta forma, a ortogonalidade pode ser alcançada utilizando-se o mesmo modo de eluição. A miscibilidade das fases móveis, juntamente com as diferentes forças necessárias em cada dimensão, por exemplo, representam uma desvantagem na busca por condições ortogonais de separação, podendo dificultar o desenvolvimento de um método em multidimensional⁵⁵⁻⁵⁷.

Amostras ambientais aquáticas, como águas superficiais e efluentes, possuem um elevado teor de matéria orgânica, conhecidas como substâncias húmicas. Tais substâncias são formadas pela transformação de biomoléculas durante o processo de decomposição de resíduos vegetais e animais presentes no ambiente. Uma vez que estes compostos possuem natureza complexa, eles se apresentam como misturas heterogêneas de moléculas dispersas com elevada massa molecular⁵⁸.

O uso de colunas RAM tem demonstrado elevada eficiência na remoção de substâncias húmicas, proporcionando um aumento de eficiência, seletividade e sensibilidade do método, em detecção por espectrometria de massas⁴³. A TABELA 1.1 mostra trabalhos publicados nos últimos 5 anos (2010-2015) sobre análise multiresidual de fluoroquinolonas em amostras ambientais, ressaltando os tipos de tratamento de amostras adotados e a quantidade de matriz aquosa necessária para a determinação desta classe de compostos.

TABELA 1.1: Fluoroquinolonas encontradas no meio ambiente e os modos de preparo de amostras.

FQs	Faixa de concentração (ng L ⁻¹)	Amostra	Volume de amostra	Preparo de amostra	Referência
CIP OFL	4,7 – 8372,9 60,9 – 14377,8	Hospital; ETE (influyente/efluente)	50-250 mL	Off line SPE	59
CIP	8,1 – 1300,2	ETE (influyente/efluente)	50-100 mL	Off line SPE	60
CIP	146 - 422	ETE (influyente/efluente)	2.5 mL	Off line SPE	61
CIP ENR NOR	20,0 – 2745 18,0 – 248,7 30,2 – 442,8	Amostras de rio		Off line SPE	62
CIP ENR NOR	ND 90,6 – 200 ND	Tanque de peixes; águas subterrâneas; lagoa	50 mL	Liofilização e filtração (0,22 µM)	63
CIP NOR OFL	97,65 – 3072,7 33,5 – 1283,8 18,4 – 984,8	Influyente da ETE	8 mL	On line SPE	64
CIP ENR NOR OFL	2,6 – 37 ND – 4,4 ND – 33 ND - 510	Rios e estuários	500 mL	Off line SPE	65
CIP NOR OFL	ND – 10,5 ND – 10,6 ND	Água superficial e amostras da ETE (efluente)	100 mL	Off line SPE	66
CIP OFL	ND-252 ND-309	Água potável; rio; mar; ETE (influyente/efluente)	25-500 mL	Off line SPE	67
CIP ENR NOR	10000 – 49000 ND 104 – 69800	Hospital; ETE (influyente/efluente)	200 mL	Off line SPE	68
CIP ENR MOX NOR OFL	740-2292 70-220 205-540 54-310 400-925	Águas superficiais; ETE (efluente)	100 mL	Off line SPE	69
CIP	<4 <6	ETE (influyente/efluente)	50-100 mL	Off line SPE; filtração (0,22 µM)	70
CIP NOR OFL	697,2 – 2433,7 740,6 – 1121,2 407,7 – 925,6	Esgoto municipal (Influyente/efluente)	500 mL	Off line SPE	71
CIP ENR NOR OFL	3,5 – 135 < LOQ 17 – 75 2,3 - 231	Rio	1,8 mL	SPE (On/Off line)	72
CIP NOR ENR	ND - 3500 ND 1060 – 84200	Esgoto (efluente)	100 mL	Off line SPE	73
CIP	< LOQ	Esgoto (efluente)	1 mL	On line SPE	74
CIP NOR	ND – 119 ND - 51	Águas superficiais	1 L	Off line SPE	31

ND: Não detectado.

Da TABELA 1.1 é possível observar que o tratamento de amostra off-line, utilizando cartuchos de extração em fase sólida é o mais utilizado para amostras ambientais aquáticas. Além disso, este procedimento requer uma etapa de pré-concentração da amostra, utilizando grandes volumes da matriz aquática para a quantificação do composto alvo. Desta forma, a geração de resíduos em larga escala, principalmente resíduos sólidos decorrentes do uso de cartuchos de extração e frascos para o armazenamento das amostras representa um agravante para o meio ambiente. O emprego da coluna RAM-BSA em sistemas de LC-MS é um atrativo para a análise de efluentes, devido a sua boa eficiência em promover o clean-up da amostra, juntamente com a alta sensibilidade e seletividade do detector, o que exclui a etapa de pré-concentração da amostra.

Tais vantagens estão, além disso, em sintonia com o que preconiza os princípios básicos da química analítica verde, uma vez que não há descarte de solventes e cartuchos para o meio ambiente. Esta ideia de sustentabilidade é, sem dúvida, uma tendência a ser seguida na conduta química.

Espectrometria de massas

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica que vem sendo amplamente explorada em análises de matrizes complexas. Com as vantagens de ser uma técnica sensível, altamente seletiva e proporcionar baixíssimos limites de quantificação, esta é sem dúvida a melhor ferramenta para a determinação de compostos em amostras ambientais⁷⁵.

O acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas (LC-MS) representa um avanço científico, uma vez que une a capacidade de separação de diversas classes de compostos por cromatografia, com a diferenciação destes por suas massas, alcançada com o uso do MS. Com o desenvolvimento de técnicas de ionização à pressão atmosférica, foi possível eliminar problemas de interface, tais como, vaporização da fase móvel vinda do LC, baixa volatilidade e sensibilidade à altas temperaturas dos compostos separados cromatograficamente⁷⁶.

As fontes de ionização à pressão atmosférica (API) – ESI (*electrospray ionisation*) e APCI (*atmospheric pressure chemical ionisation*) – permitem com que os analitos sejam ionizados de diferentes modos, além de possibilitarem a análise de compostos de todas as faixas de polaridade, o que é um atrativo para a análise de

fármacos e metabólitos. Atualmente, a ionização por ESI é a mais utilizada, com as vantagens de analisar compostos de baixa e elevada massa molecular a níveis traço.

O mecanismo de ionização por ESI, geralmente aceito, consiste na ionização das moléculas presentes na fase líquida (vinda do sistema LC) através da aplicação de um potencial elétrico. Esta fase líquida passa por um capilar sob alta voltagem e à pressão atmosférica, e em sua saída são formadas pequenas gotas altamente carregadas (*spray*) as quais, são dessolvatadas com o auxílio de um gás de fluxo contínuo (geralmente N₂), na medida em que se deslocam. À medida que o solvente evapora o campo interno das gotas aumenta e, quando este chega a valores críticos ocorre uma explosão coulômbica, ou seja, os íons são emitidos e depois são focalizados para o analisador de massa⁷⁷.

Na espectrometria de massas sequencial (MS/MS) vários analisadores podem ser combinados em série. Estes arranjos permitem obter um espectro dos fragmentos de um íon selecionado no primeiro analisador. A fragmentação de íons pode ser estendida em multiestágios, MSⁿ, com o uso de analisadores do tipo ciclotron ou armadilha de íons. Com estas técnicas, informações sobre a estrutura dos íons individuais podem ser obtidas e, conseqüentemente, uma descrição estrutural mais detalhada da molécula precursora destes íons pode ser feita.

Para a quantificação de compostos em matrizes complexas utilizando LC-MS é possível reconhecer que os analisadores do tipo triplo quadrupolo (QqQ), o *ion trap* (IT) e o *time-of-flight* (Tof) tem sido os mais empregados⁷⁷⁻⁷⁹. O analisador do tipo QqQ é utilizado em numerosas aplicações⁸⁰, principalmente para a determinação de compostos em matrizes ambientais. Esta popularidade se deve a capacidade deste instrumento em gerar dados quantitativos de excelente qualidade, uma vez que pode realizar experimentos importantes como, SRM (*selected reaction monitoring*), perda neutra (*neutral loss*), varredura de íons produtos (*product ion scan*) e varredura de íons precursores (*precursor ion scan*)^{79,81} (FIGURA 1.7).

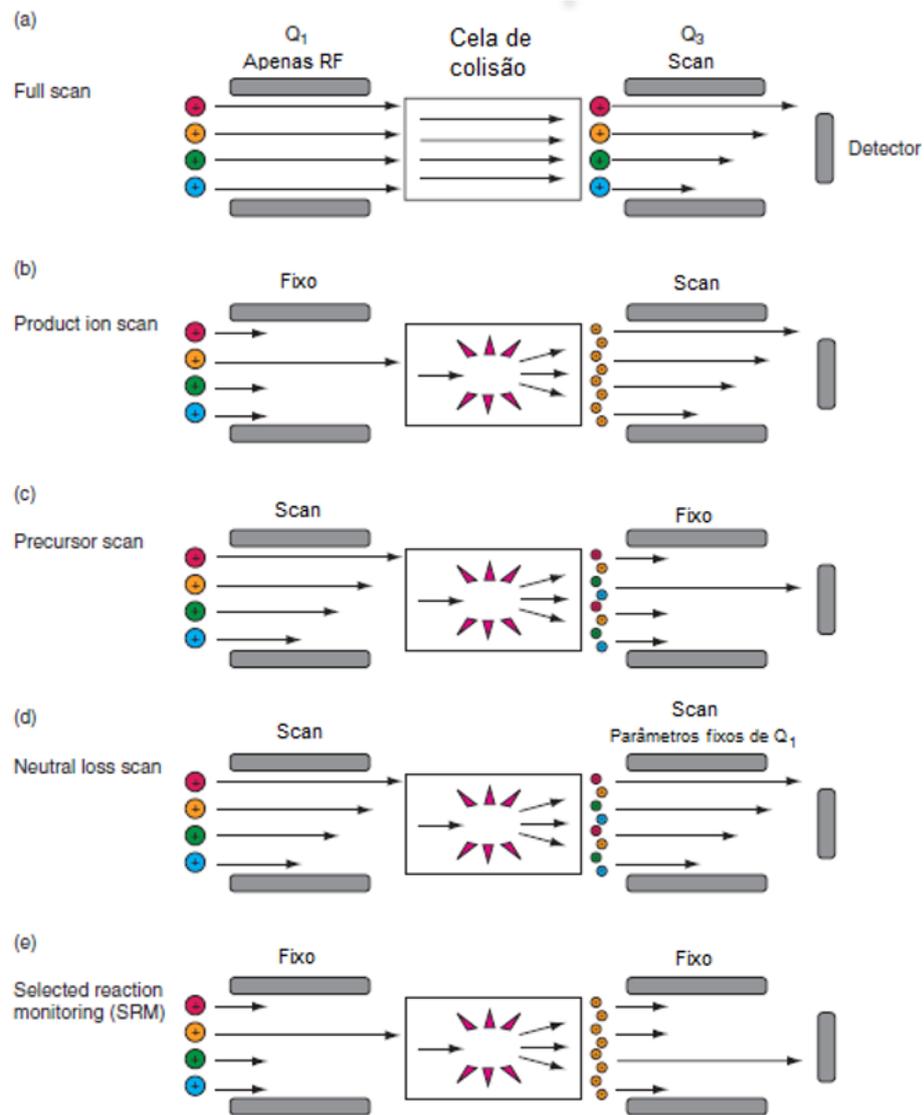


FIGURA 1.7: Experimentos realizados pelo analisador do tipo QqQ (Adaptado de HOCART 2010⁸²).

Para análises quantitativas, o modo SRM é preferido, pois proporciona mais seletividade e detectabilidade⁸³. Neste experimento cada um dos três quadrupolos tem uma função, o primeiro quadrupolo (Q₁) é usado para fazer a seleção do íon precursor; no segundo quadrupolo (Q₂), conhecido como cela de colisão, um ou mais íons fragmento específicos são produzidos através da colisão do íon precursor selecionado com um gás inerte (argônio, hélio ou nitrogênio); e no terceiro quadrupolo (Q₃) ocorre seleção de um dos íons fragmento gerados em Q₂, enquanto este íon fragmento é reconhecido pelo detector outro íon fragmento é gerado em Q₂ e posteriormente filtrado por Q₃. Resumidamente, em SRM Q₁ e Q₃

tem a função de filtrar os íons selecionados enquanto Q2 trabalha como cela de colisão.

Os avanços obtidos com a LC-MS devido ao desenvolvimento das fontes API, permitiram o seu emprego tanto para a quantificação quanto para a elucidação estrutural. Entretanto, apesar da elevada sensibilidade e seletividade inerente à técnica, o uso das fontes ESI e APCI tornam as análises suscetíveis ao chamado EM causado pela coeluição de compostos presentes na amostra. A adsorção acumulativa ou a precipitação de proteínas e/ou outras macromoléculas que compõe as matrizes em estudos pode ocasionar a perda de sensibilidade do MS ou levar ao entupimento do sistema cromatográfico ou das colunas levando à perda de eficiência^{84,85}. Sendo assim, para se obter resultados confiáveis e reproduzíveis em LC-MS, deve ser feito um pré-tratamento eficiente da amostra para que os interferentes sejam removidos e os analitos pré-concentrados.

Acumulação de fármacos em organismos aquáticos

Recentemente, estudos reportados mostram que a exposição ao meio ambiente a diversos tipos de compostos podem resultar em um acúmulo destes nos tecidos de organismos aquáticos³. Fármacos e produtos de higiene pessoal são grandes exemplos deste tipo de contaminante ambiental, os quais podem atingir os sistemas hídricos, uma vez que podem ser excretados tanto em sua forma ativa como sofrer algum tipo de biotransformação. Desta forma, estudos sobre o comportamento destes compostos, principalmente fármacos e seus metabólitos, em ambientes aquáticos é de extrema importância.

A bioacumulação de fármacos e/ou metabólitos em organismos aquáticos tem atraído atenção de estudos toxicológicos⁸⁶. Resíduos de xenobióticos em tecidos de organismos aquáticos, como peixes, podem ter a sua concentração elevada a várias ordens de grandeza quando comparados à concentração encontrada em águas superficiais. Em um estudo realizado por BRODIN e colaboradores⁸⁷, a concentração do psicofármaco oxazepam encontrada no tecido dos peixes ($3,6 \mu\text{g g}^{-1}$) foi seis vezes maior do que a concentração encontrada no ambiente ($0,58 \mu\text{g L}^{-1}$). Estudos realizados em peixes em cativeiro mostraram que a bioacumulação do oxazepam foi similar ao que foi encontrado anteriormente em peixes nativos. Além disso, foi possível observar alterações no comportamento e padrão de alimentação

dos peixes em virtude da exposição ao fármaco. Desta forma, mesmo em baixas concentrações no ambiente, os fármacos representam níveis de contaminação relevantes para o ecossistema aquático.

Em outro estudo, VALENTI e colaboradores⁸⁸ avaliaram os efeitos da exposição de peixes da espécie *Pimephales promelas* ao fármaco sertralina, e verificaram que a concentração acumulada no plasma era excedente à dosagem terapêutica de uso humano. Uma vez que estudos anteriores demonstraram que a atividade inibidora do transporte de serotonina em peixes é homóloga à atividade inibidora em seres humanos⁸⁹, foi possível identificar riscos relativos aos produtos farmacêuticos. Conseqüentemente, as concentrações encontradas no plasma foram associadas às mudanças no comportamento típico desta espécie de peixe, ocasionando implicações diretas para a sobrevivência e adequação da espécie ao ambiente aquático⁸⁸.

No que diz respeito aos antibióticos, poucas evidências existem sobre os efeitos adversos das concentrações ambientais encontradas em organismos aquáticos. Na aquicultura, por exemplo, onde grande parte das doenças é causada por agentes infecciosos, o uso de antibióticos é realizado com frequência. A exposição a estes compostos em concentrações sub-letais pode levar ao aparecimento de resistência, quer em bactérias comensais do intestino humano, quer em bactérias dos peixes e aquáticas, com possível disseminação de genes de resistência em diversas populações bacterianas⁹⁰.

Para o desenvolvimento da aquicultura sustentável e ecologicamente correta é importante ressaltar a necessidade da prática de um manejo racional. O efetivo monitoramento e acompanhamento das condições do ambiente aquático e suas características e respostas em relação às funções naturais e influências antrópicas no sistema auxiliarão a validação para a regulamentação de empreendimentos aquícolas, de acordo com as leis em vigor.

1.2 Objetivos

Objetivo geral

Desenvolvimento, validação e aplicação de método de cromatografia líquida multidimensional para a determinação multiresidual de antibióticos

fluoroquinolônicos em duas matrizes: efluentes ambientais e tecido muscular de peixes da espécie *Oreochromis niloticus*.

Objetivos específicos

Desenvolvimento e validação de um método por LC-MS/MS, para a análise dos antibióticos selecionados, utilizando injeção direta de amostras nativas;

Desenvolvimento e validação de um método por LC-MS/MS para a quantificação de ciprofloxacino em músculo de tilápia (*O. niloticus*).

1.3 Resultados e discussão

Preparo da coluna RAM-BSA

As colunas de acesso restrito recobertas com albumina sérica bovina (RAM-BSA) mostraram excelentes resultados para trabalhos realizados no nosso grupo de pesquisa com acoplamento das colunas RAM-BSA tanto com colunas analíticas aquirais^{91,92} quanto colunas analíticas quirais^{41,43,93}.

No presente trabalho foram selecionadas as colunas RAM-BSA, devido à grande disponibilidade comercial da albumina sérica bovina, seu baixo custo e principalmente, devido às suas propriedades físico-químicas, as quais permitem a utilização dessas colunas em várias condições cromatográficas no modo reverso de eluição, o que é uma vantagem quando se trabalha com injeção direta de amostras complexas, principalmente águas.

A coluna RAM-BSA foi preparada em três etapas (FIGURA 1.8) de acordo com protocolo estabelecido por MENEZES e FÉLIX⁹⁴ e adaptado no grupo para colunas com pequenos diâmetros internos⁹⁵.

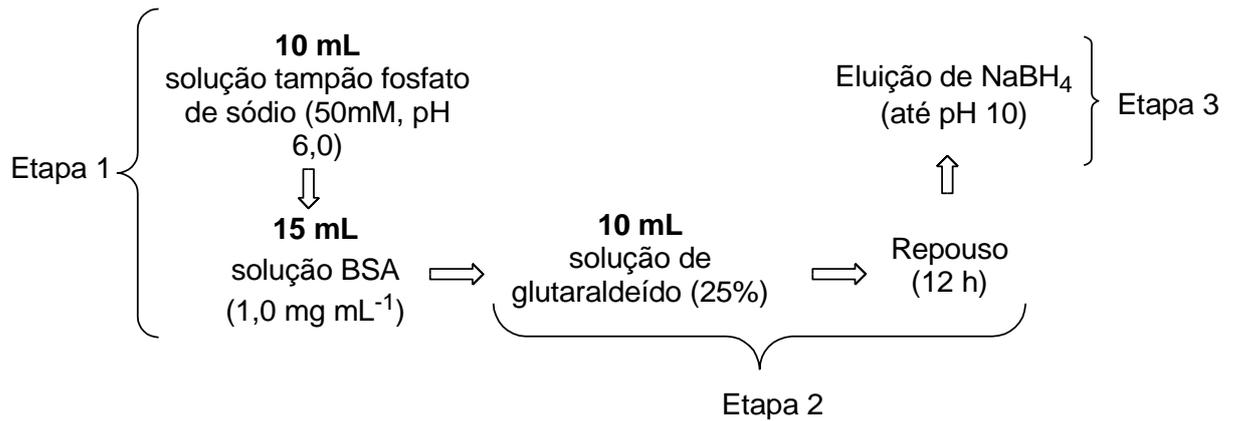
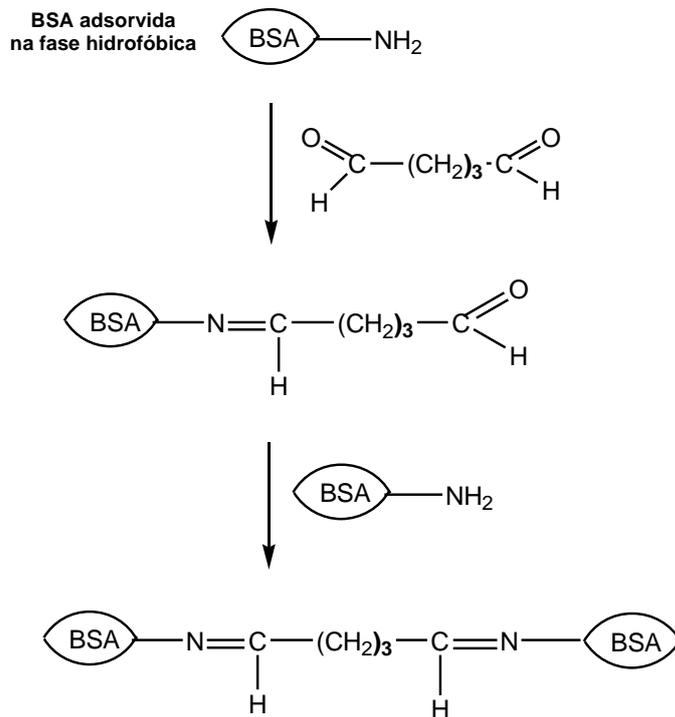


FIGURA 1.8: Etapas de preparação da coluna RAM-BSA.

A imobilização da BSA ao suporte é feita por cromatografia frontal, em que a BSA é intercruzada após à adsorção, formando bases de Schiff. A reação dos grupos amins livres da albumina com o glutaraldeído ocasiona a formação de iminas, que resulta na formação de ligações entrecruzadas entre albumina sérica bovina e o glutaraldeído. Logo após, para se evitar eventual hidrólise da dupla ligação da base de Schiff, prevenindo também a reação de grupos aldeídos residuais com analitos na coluna cromatográfica, esses grupos foram reduzidos com uma solução de boroidreto de sódio. A reação de intercruzamento da proteína com o glutaraldeído, com posterior redução com o boroidreto de sódio, promove também uma maior estabilidade e durabilidade das colunas RAM (FIGURA 1.9).

1) Intercruzamento da BSA com glutaraldeído 25%



2) Redução das bases de Schiff e de grupos aldeído residuais com NaBH_4

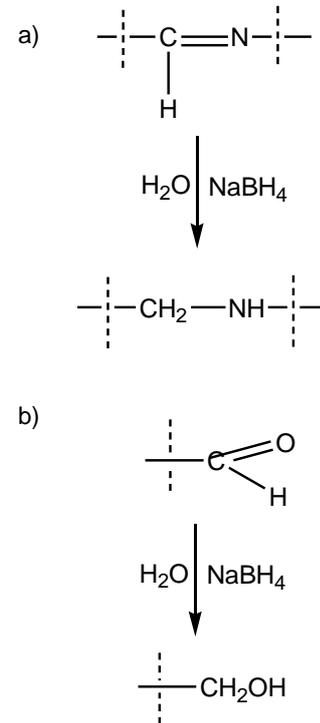


FIGURA 1.9: Esquema de imobilização da BSA.

A eficiência da exclusão de macromoléculas com o uso de colunas RAM-BSA alquílicas é bem consolidada para matrizes como ovo, plasma (humano e bovino) e leite (bovino e humano)^{92,93,95,96}. Também já é bem estabelecido por trabalho desenvolvido no nosso grupo o poder de exclusão das substâncias húmicas pelas colunas RAM-BSA^{43,97}. De acordo com resultados obtidos no grupo, o percentual de exclusão de substância húmicas pela coluna RAM- C_8 -BSA foi de 61,4% para água do rio Monjolinho. A faixa de massa molecular das substâncias húmicas excluídas foi da ordem de 18000 Da⁴³. Baseado nos estudos desenvolvidos para os fármacos omeprazol, lanzoprasol e pantoprazol, que puderam ser quantificados com o uso de 1mL de amostra de águas nativas por injeção^{43,97}, foram conduzidos ensaios com os antibióticos selecionados a fim de analisar a retenção destes na coluna RAM- C_8 -BSA.

Análise do tempo de exclusão dos interferentes da matriz a retenção das FQs pela coluna RAM-BSA

Inicialmente é necessário o ajuste da retenção dos compostos de interesse, considerando a escolha da melhor coluna extratora a ser empregada, além das composições e pH das fases móveis, de acordo com as propriedades físico-químicas dos analitos (Tabela 1.2). Durante muitos anos, o comportamento de compostos ionizáveis tem sido estudado em LC utilizando-se o modo reverso de eluição. No entanto, a maioria dos compostos orgânicos de interesse (fármacos e metabólitos) apresentam funções ácidas e básicas em suas estruturas, que por sua vez influenciam drasticamente a retenção.

TABELA 1.2: Características físico-químicas das FQs selecionadas.

FQ	Fórmula Química	Peso molecular (g/mol)	pKa^a	Solubilidade em água^b (mg/mL)
CIP	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	331,3415	5,76 8,68	1,35
NOR	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃	319,3308	5,77 8,22	1,01
ENR	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃	359,3946	6,43 7,74	146
MOX	C ₂₁ H ₂₄ FN ₃ O ₄	401,4314	5,69 9,42	0,168
OFL	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄	361,3675	5,45 6,20	28,3
GEM	C ₁₈ H ₂₀ FN ₅ O ₄	389,3809	5,53 9,53	0,21

^a QIANG e ADAMS (2004)⁹⁸

^b WISHART *et al* (2006)⁹⁹

Em eluição no modo reverso, quanto maior a hidrofobicidade de um composto, maior será seu fator de retenção (k), e quando este apresenta substituintes básicos ou ácidos, estes sofrem ionização, tornando o composto muito mais hidrofílico e, conseqüentemente, reduzindo seu fator de retenção. Deste modo, quando o pH da fase móvel aumenta, a retenção de um analito básico aumenta e de um analito ácido diminui.

Antes de verificar a retenção dos antibióticos selecionados pela fase RAM, é necessário que seja determinado o tempo de exclusão dos interferentes da matriz. Esta determinação é feita através da injeção direta da matriz na coluna RAM.

De modo geral, usa-se uma fase móvel fraca para que a exclusão das macromoléculas seja feita enquanto os analitos de interesse são enriquecidos no topo da coluna. Já foi demonstrada, no nosso grupo, a capacidade das colunas RAM-BSA de excluirmos as substâncias húmicas utilizando-se água ultrapura como fase móvel^{43,97}. A FIGURA 1.10 mostra o cromatograma referente ao perfil de exclusão das substâncias húmicas presente na água da nascente do Rio Monjolinho, utilizando-se a coluna RAM-C₈-BSA (5,0 x 0,21 cm).

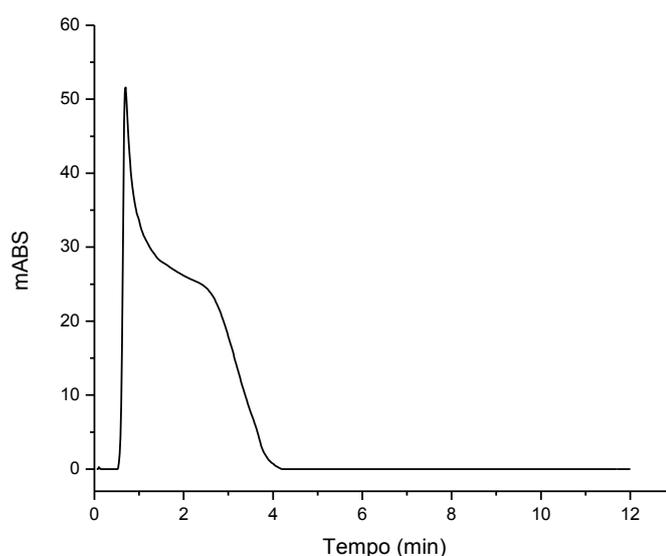


FIGURA 1.10: Perfil de exclusão. Amostra: água da nascente do Rio Monjolinho. Fase móvel: água ultrapura (100%); fase estacionária: coluna RAM-C₈-BSA (0,21 x 5 cm); comprimento de onda: 254 nm; volume injetado: 500 µL; vazão: 0,5 mL min⁻¹.

A análise do cromatograma da FIGURA 1.10 mostra que o tempo de exclusão das substâncias húmicas, presentes na matriz, é em torno de 4 minutos. Determinado este parâmetro, avaliou-se o perfil de retenção dos seis antibióticos selecionados na coluna RAM-C₈-BSA preparada. Inicialmente somente água foi usada como fase móvel. Desta forma, os compostos de interesses deveriam apresentar uma retenção superior a 4 minutos, pois este foi o tempo determinado para a exclusão das substâncias húmicas.

Para este estudo, foi utilizado o detector de ultravioleta (UV), uma vez que não havia necessidade de se utilizar o espectrômetro de massas, minimizando custos operacionais. Nas condições avaliadas, dentre os 6 fármacos, o ciprofloxacino foi o que apresentou a menor retenção. Todos os outros antibióticos apresentaram

retenção superiores a 30 minutos. Assim, a adição de solvente orgânico pode ser utilizada para diminuir a retenção dos analitos.

Desenvolvimento do método cromatográfico para análise dos antibióticos selecionados

Em análises de amostras ambientais, a extração em fase sólida é a técnica mais utilizada para a limpeza da amostra e pré-concentração dos analitos. Entretanto, esta técnica apresenta alguns inconvenientes, como o uso de grandes quantidades de solvente orgânico, além de utilizar grandes volumes de amostra ambiental (de 200 mL a 2 L de matriz por amostra) e cartuchos de extração^{43,100}, gerando grande quantidade de resíduos.

A utilização da coluna RAM-BSA é um grande atrativo comparado aos métodos convencionais de preparo de amostras, pois possibilita a injeção da matriz ambiental diretamente no sistema cromatográfico com volumes de injeção de 500 µL a 1000 µL sem pré-concentração. Neste estudo, foi selecionado o volume de 500 µL para dar continuidade ao desenvolvimento do método analítico.

Para se determinar as condições de análise em injeção direta de amostras faz-se necessário a delimitação de parâmetros (FIGURA 1.11) que incluem desde a determinação do volume necessário de amostra injetada até os tempos de exclusão e eluição dos analitos.

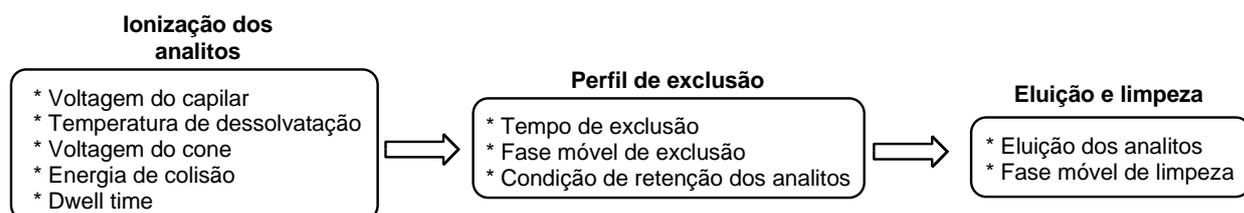


FIGURA 1.11: Esquema dos parâmetros avaliados no desenvolvimento de métodos por LC-MS.

No que diz respeito à cromatografia, um aspecto muito comum é a questão do efeito memória, em que o analito de interesse aparece em injeções de amostra “branco”. Se esse efeito for muito pronunciado, a repetibilidade do método pode ser seriamente comprometida.

De acordo com o European Medicines Guideline (EMA)¹⁰¹, o efeito memória deve ser avaliado injetando-se amostras brancas, ou seja, matriz sem a presença dos analitos, após a injeção da amostra de maior concentração do analito. O efeito memória na amostra branca não deve ser maior que 20% do limite de quantificação do método, sendo este valor calculado comparando-se os valores das áreas das bandas dos analitos nestas duas circunstâncias.

Durante o desenvolvimento do método, o efeito memória foi observado, em limites maiores do que o permitido pelo guia EMA. Após vários experimentos e comprovação de que a aparição das bandas dos analitos em amostras brancas era devido ao efeito memória, e não a contaminação, diversas análises foram realizadas a fim de se observar a origem do problema. Na tentativa de solucionar este obstáculo, algumas alternativas foram avaliadas.

Inicialmente investigou-se a composição dos solventes do sistema de lavagem da seringa e da alça de injeção (loop) do auto-injetor. Verificou-se que a utilização de metanol (100%) como solvente (1) e água ultrapura (5% de metanol) como solvente (2) proporcionaram uma diminuição do efeito memória.

Outro fator avaliado foi o tempo de limpeza da coluna RAM após a eluição dos analitos. Melhor resultado foi obtido utilizando-se acetonitrila: água (0,1% ácido fórmico) (90:10 v/v) durante 8,5 minutos. Esta condição proporcionou uma boa limpeza da coluna e diminuição do efeito em estudo

O último parâmetro avaliado foi o volume injetado no sistema cromatográfico e a configuração do auto-injetor. O modelo do auto-injetor utilizado neste trabalho (2777 Sample Manager – Waters[®]) é configurado para um máximo de volume de injeção igual a 5,0mL. O sistema é composto por três válvulas, sendo uma do tipo Valco[™] para injeção, e duas do tipo Everflow[™] para o acoplamento de colunas (FIGURA 1.12). As válvulas do tipo Everflow[™] (2 e 3) são típicas de sistemas de UHPLC, e possuem diâmetro interno menor quando comparada com válvulas utilizadas em HPLC. Desta forma, o risco de acúmulo de resíduos provenientes da matriz é grande devido ao menor diâmetro interno da tubulação do equipamento.

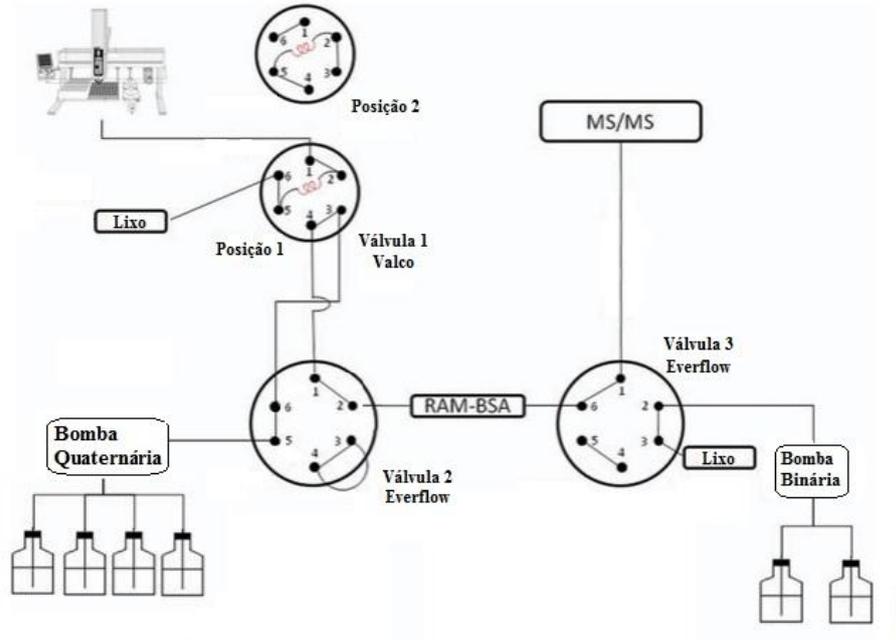


FIGURA 1.12: Esquema do posicionamento das válvulas do auto-injetor (Inicial).

As condições descritas foram avaliadas com o auto-injetor operando na configuração ilustrada na FIGURA 1.12. Dando continuidade as avaliações para solucionar o problema do efeito memória, o auto-injetor foi reconfigurado, com a retirada das válvulas 2 e 3. A nova configuração (FIGURA 1.13), utilizando somente a válvula 1, solucionou o problema.

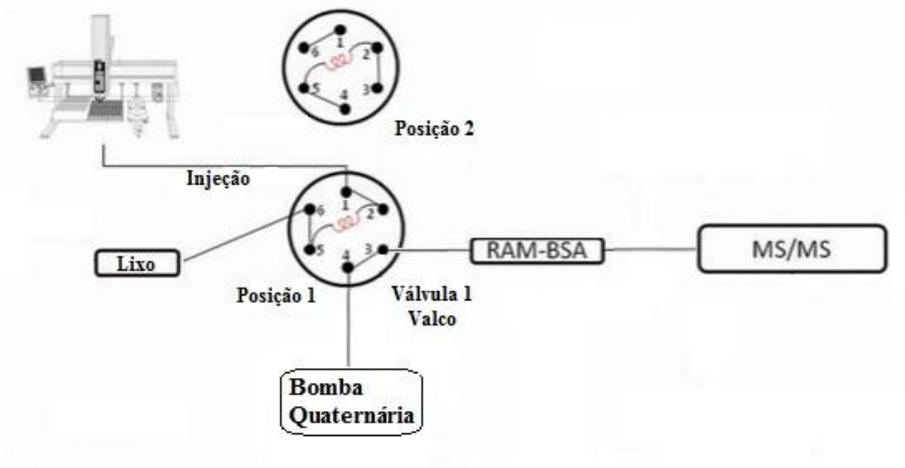


FIGURA 1.13: Esquema do posicionamento das válvulas do auto-injetor (Atual).

Para avaliar o volume de amostra a ser injetada, diferentes volumes foram investigados (500 e 1000 μL), sendo selecionado o volume de 500 μL , uma vez que este proporcionou limites de quantificação adequados e um efeito de matriz menos pronunciado. Assim, o método cromatográfico foi estabelecido, como mostra a FIGURA 1.14, e o perfil cromatográfico obtido é mostrado na FIGURA 1.15.

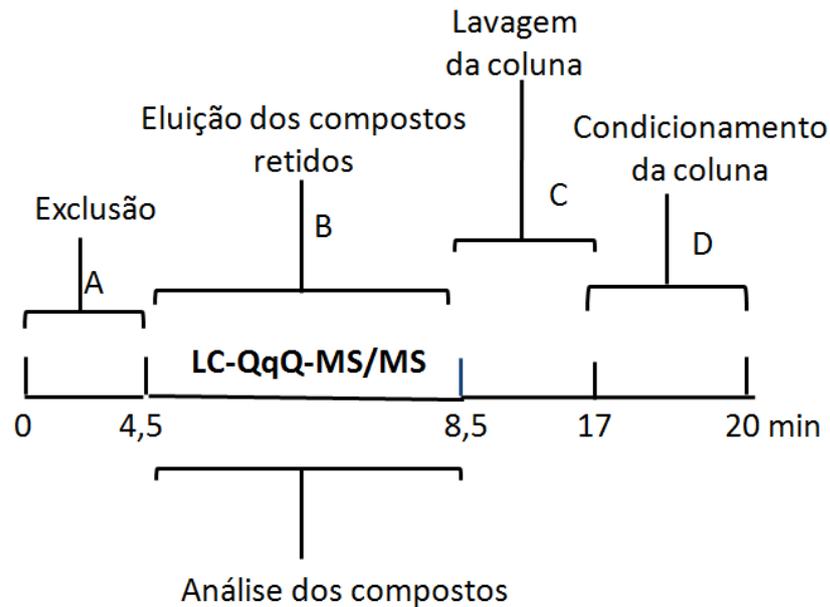


FIGURA 1.14: Condições cromatográficas utilizadas para a exclusão das macromoléculas e eluição dos analitos na coluna RAM-C₈-BSA (5,0 x 0,21 cm d.i). Vazão: 0,5 mL/min. Fase móvel: A (água ultrapura 100%), B (gradiente convexo de 0-90% de ACN), C (ACN:água ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fórmico 90:10 v/v) e D (água ultrapura 100%).

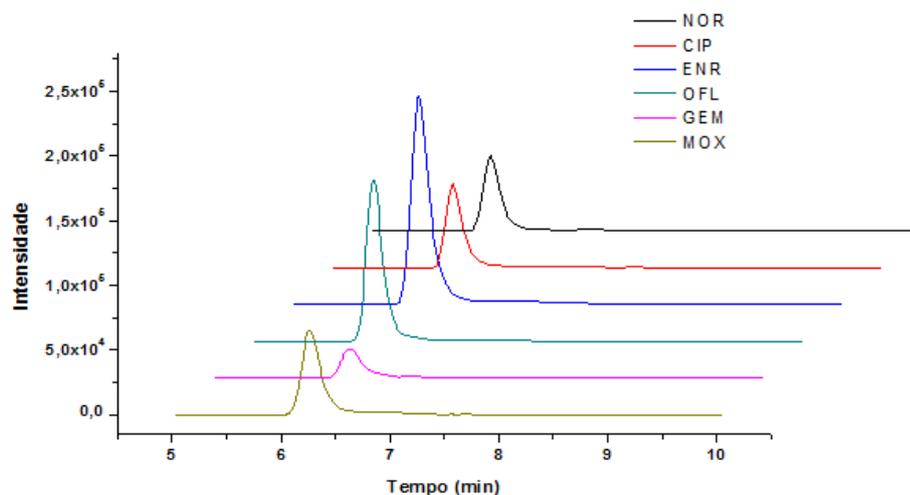


FIGURA 1.15: Cromatogramas de SRM dos antibióticos utilizando coluna RAM-C₈-BSA (5,0 x 0,21 cm). Amostra: mistura das FQs preparadas em água da nascente do Rio Monjolinho (100 ng L^{-1}). Condições cromatográficas descritas na FIGURA 1.14. Volume injetado: 500 μL .

Os cromatogramas apresentados na FIGURA 1.15 mostram bandas simétricas, com tempo de retenção baixo e superior ao tempo necessário para exclusão das substâncias húmicas. Com as condições cromatográficas definidas para os antibióticos selecionados, as condições de fragmentação foram avaliadas.

Espectrometria de massas: avaliação das condições de ionização dos antibióticos

Embora tenha ocorrido a coeluição das seis FQs, devido a baixa seletividade da coluna RAM-BSA, a utilização do MS com analisador de triplo quadrupolo permite a seletividade necessária para a quantificação, quando este é operado em modo SRM.

Para este trabalho, utilizou-se um espectrômetro de massas Xevo TQ-MS (Waters Corporation), com analisador do tipo triplo-quadrupolo e fonte de ionização do tipo eletrospray (z-spray®), selecionado no modo positivo durante as análises. As condições de operação da fonte de ionização foram ajustadas manualmente, sendo listadas na TABELA 1.3.

TABELA 1.3: Parâmetros de operação da fonte de ionização electrospray do espectrômetro de massa.

Parâmetros	Valores
Voltagem do capilar (kV)	2,00
Temperatura de desolvatação (°C)	600
Vazão do gás (desolvatação) (L/Hr)	800
Vazão do gás (cone) (L/hr)	20
Vazão do gás de colisão (mL/min)	0,15

Para análises em modo SRM, os guias de validação para métodos por LC-MS preconizam que pelo menos duas transições sejam monitoradas, uma de quantificação e outra de confirmação¹⁰¹.

Uma vez que o objetivo do presente projeto é a identificação multiresidual das FQs, a avaliação das condições de ionização dos antibióticos na presença da matriz é de extrema importância. Para esta otimização, foram realizados experimentos de varredura de íons produto. As condições de colisão dos íons são controladas principalmente pela energia de colisão, a qual influencia na velocidade com que os íons entram na câmara (*collision cell*). Quando se aplica uma baixa

energia, as reações de fragmentação levam à perda de fragmentos neutros (H_2O , $MeOH$, CO , CO_2 , etc.), dependendo da natureza do íon precursor. Aplicando-se energias mais elevadas, as reações de fragmentação podem levar à quebra das moléculas em posições características, mas também podem ocasionar fragmentações em sequência¹⁰².

Para avaliar as condições de ionização, a mistura dos seis fármacos solubilizados na água da nascente do Rio Monjolinho (500 ng L^{-1}), foi injetada ($500\mu\text{L}$) diretamente no sistema cromatográfico, de acordo com as condições cromatográficas descritas na FIGURA 1.14.

A influência da energia de colisão na fragmentação do íon molecular protonado foi avaliada mantendo-se os demais parâmetros do espectrômetro de massas constantes e aplicando-se valores de 20, 25, 30 e 40 eV para a energia de colisão.

A FIGURA 1.16 ilustra os espectros obtidos para o NOR.

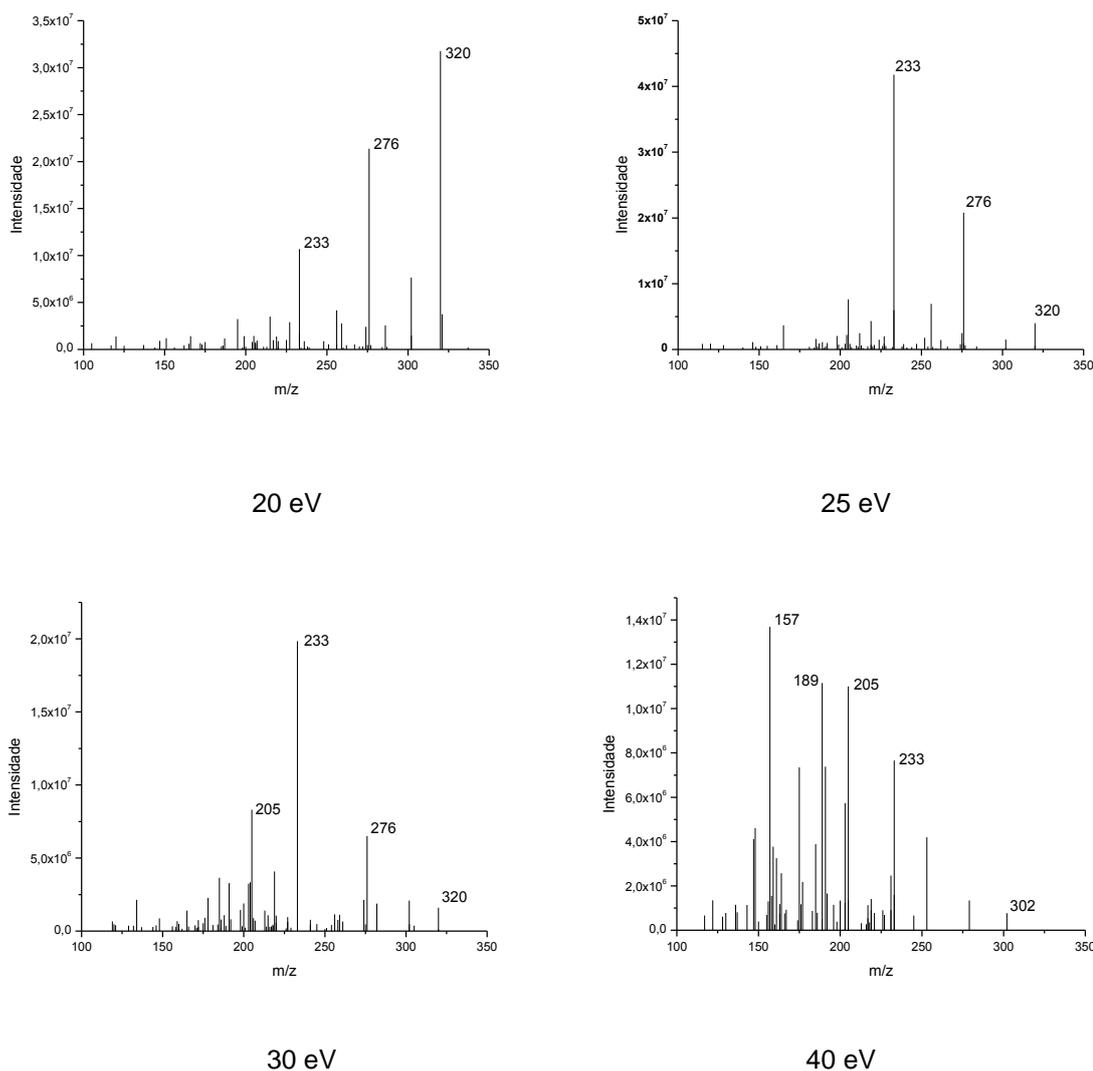


FIGURA 1.16: Espectros de massa do NOR em experimento de varredura de íons produto, utilizando diferentes energias de colisão. Condições cromatográficas da FIGURA 1.14. Volume de injeção: 500 μ L.

De acordo com os espectros relacionados na FIGURA 1.16, nota-se que dependendo da energia de colisão aplicada, a formação de um ou outro íon produto é favorecida. Estudos por LC-MS para identificação e quantificação da NOR em diversas matrizes complexas geralmente monitoram os íons de relação massa/carga (m/z) 276 e 233¹⁰³. A análise dos espectros da FIGURA 1.15 mostra que aplicando-se energias de colisão entre 20 eV e 30 eV, a formação destes dois íons é favorecida. Estudos deste antibiótico por LC-MS propõem que estes íons produtos são provenientes da perda de um grupo $-\text{CO}_2$ (m/z 276) e $-\text{CO}_2$ seguida da ruptura do anel piperazínico, ($-\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$) (m/z 233)¹⁰⁴ (FIGURA 1.17).

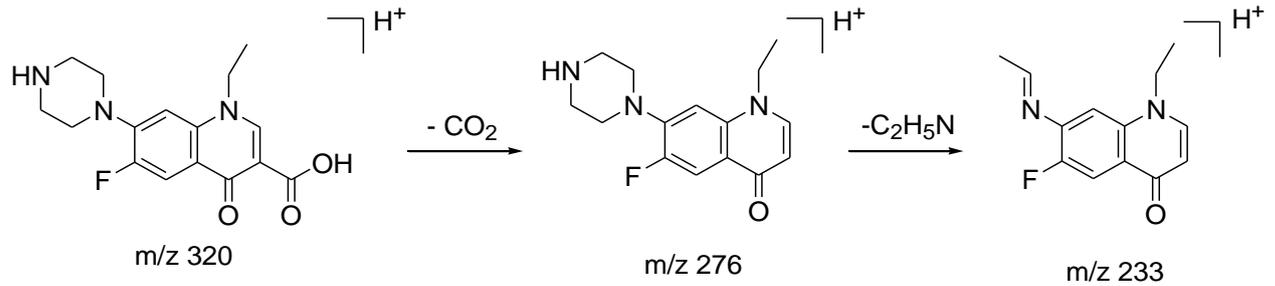


FIGURA 1.17: Proposta para fragmentação do íon [M+H] do NOR.

Para o fármaco CIP, os espectros são mostrados na FIGURA 1.18.

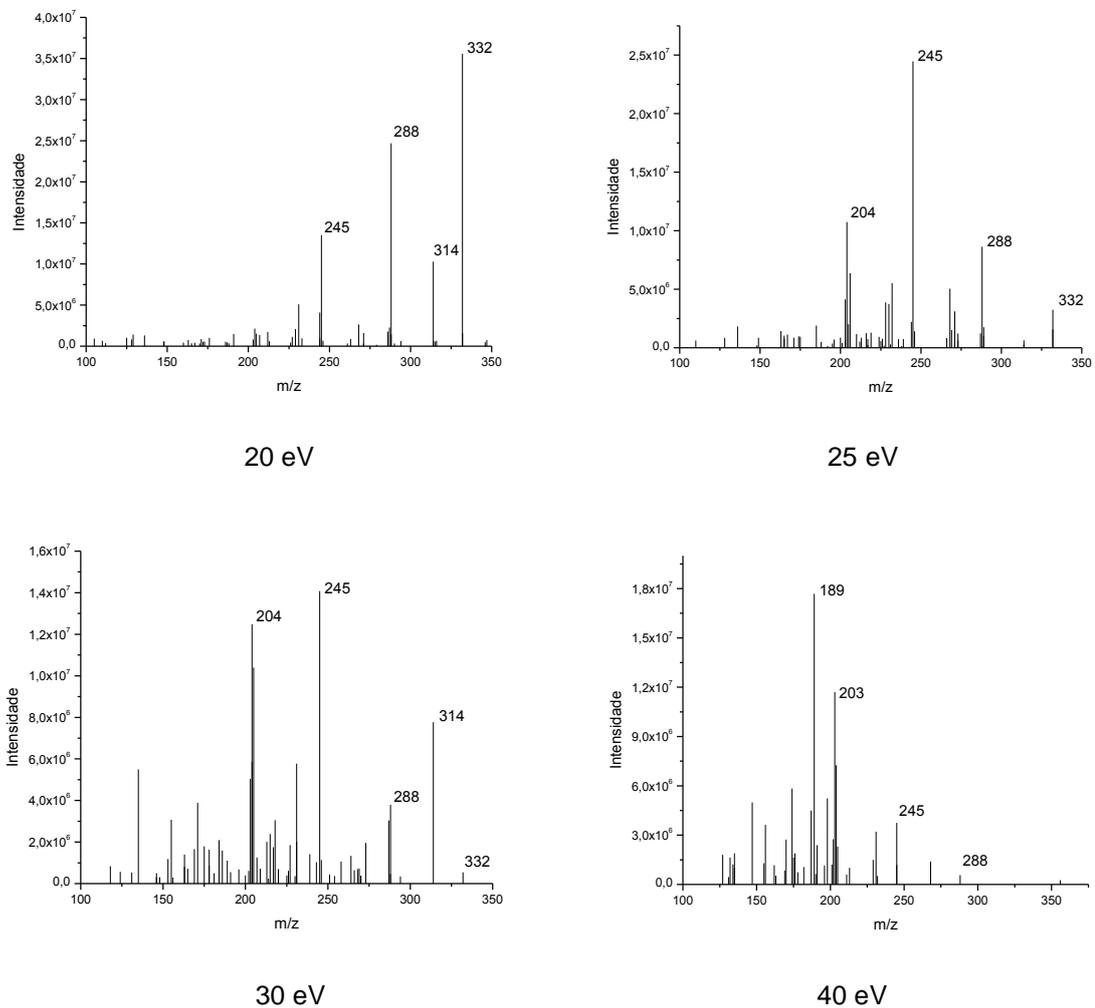


FIGURA 1.18: Espectros de massa do CIP em experimento de varredura de íons produto, variando-se a voltagem da energia de colisão. Condições cromatográficas da FIGURA 1.14. Volume de injeção: 500 μ L.

No caso da CIP, os íons comumente monitorados são os de m/z 314 e m/z 288¹⁰⁵. A formação destes íons é favorável com aplicação de energia de colisão

entre 20 e 25 eV, (FIGURA 1.18). O íon m/z 314 é proveniente da perda de $-H_2O$ e o m/z 288 da perda de $-CO_2$ ^{104,106} (FIGURA 1.19).

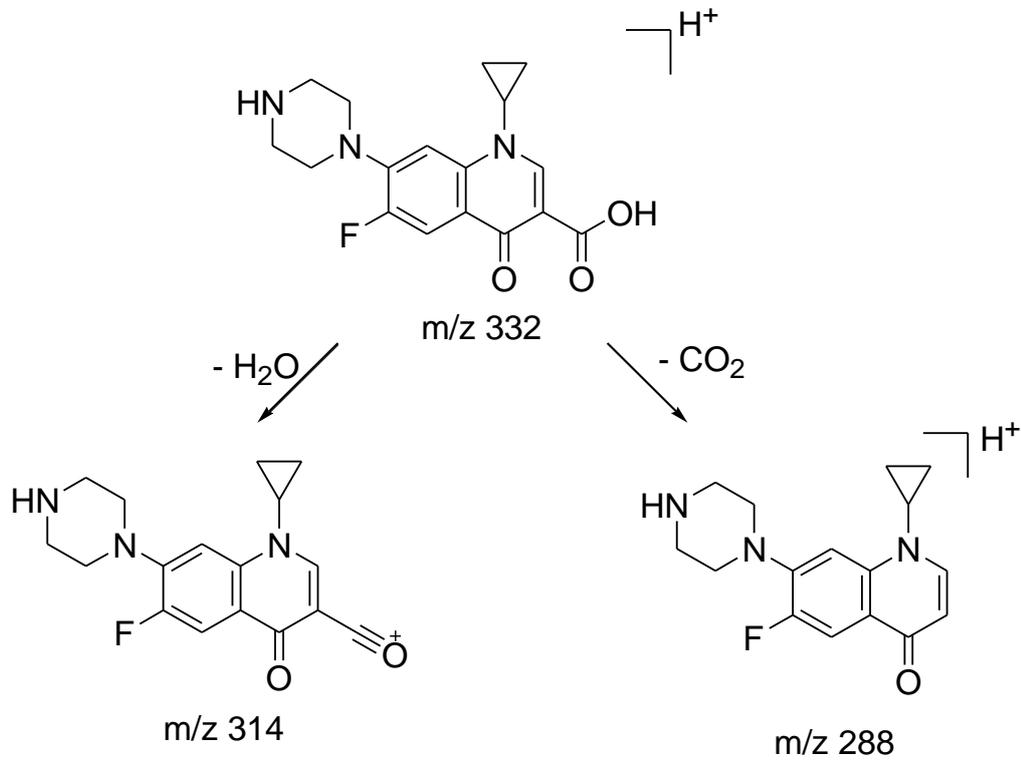


FIGURA 1.19: Proposta para fragmentação do íon [M+H] do CIP.

Para o antibiótico ENR, os espectros são os mostrados na FIGURA 1.20.

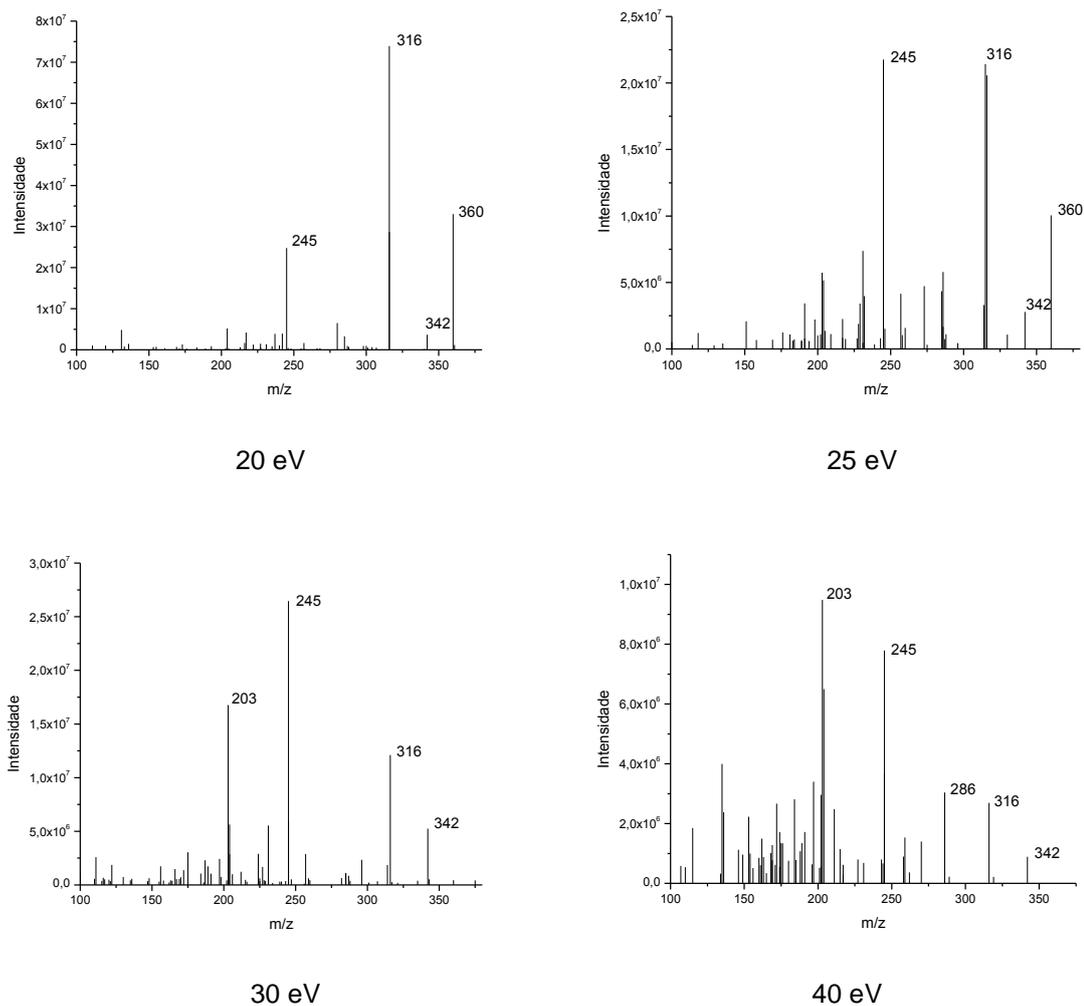


FIGURA 1.20: Espectros de massa do ENR em experimento de varredura de íons produto variando-se a voltagem da energia de colisão. Condições cromatográficas da FIGURA 1.14. Volume de injeção: 500 μ L.

Para o ENR, em análises por LC-MS, os íons de m/z 342, m/z 316 e m/z 245 são os comumente monitorados¹⁰⁷. A formação destes íons é favorável com aplicação de energia de colisão entre 20 e 25 eV (FIGURA 1.19). No presente método, foram selecionados para o monitoramento os íons m/z 316 ($MH^+ - CO_2$) e m/z 342 ($MH^+ - H_2O$). O padrão de fragmentação da molécula do ENR protonada é semelhante aos do CIP e NOR, assim como para as demais fluoroquinolonas analisadas¹⁰⁶.

A FIGURA 1.21, ilustra os espectros para OFL. Para esse antibiótico os principais íons monitorados são os de m/z 318 e m/z 261¹⁰⁵.

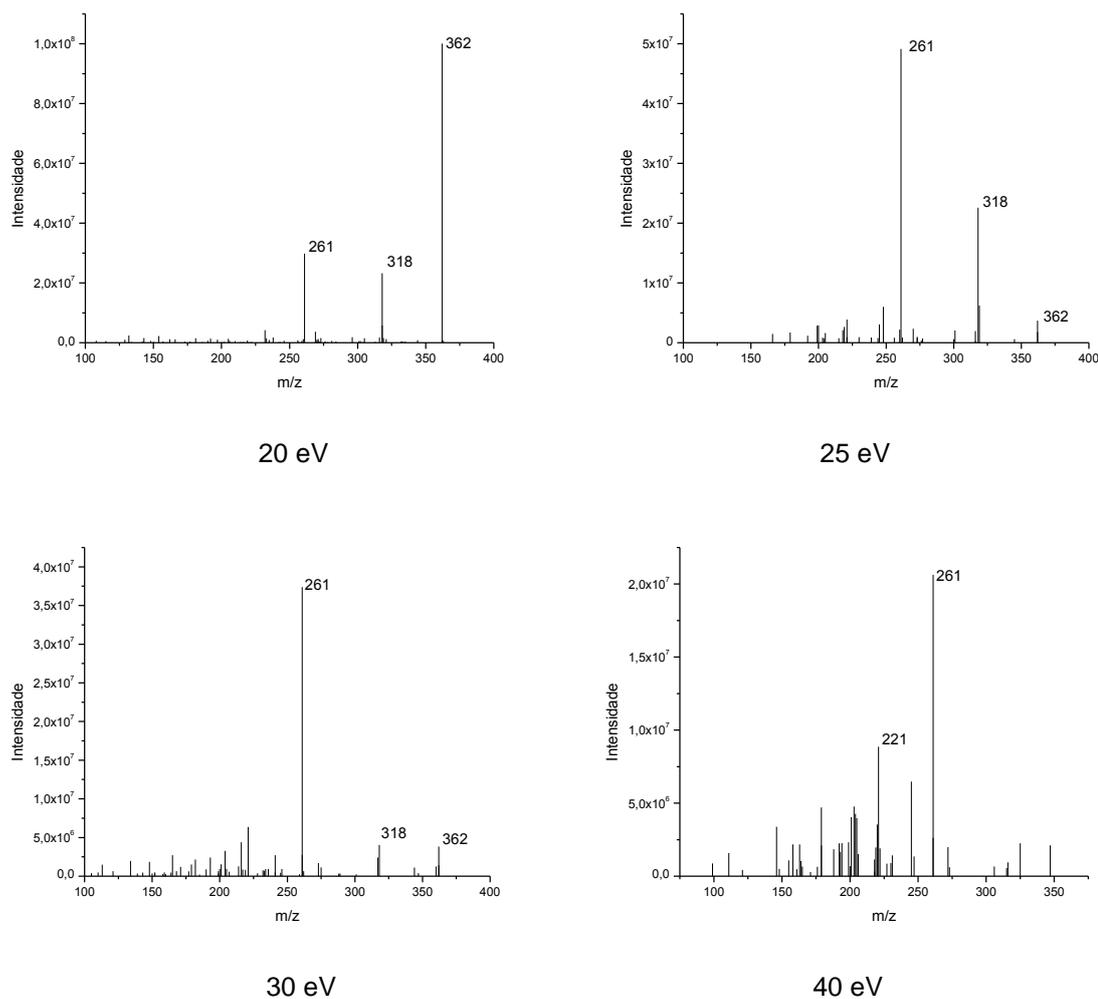


FIGURA 1.21: Espectros de massa do OFL em experimento de varredura de íons produto, variando-se a voltagem da energia de colisão. Condições cromatográficas da FIGURA 1.14 (Página 26). Volume de injeção: 500 μ L.

A formação destes dois íons ocorre com maior facilidade quando uma energia de colisão entre 20 e 25 eV é aplicada. O fragmento m/z 318 é proveniente da perda de um grupo $-\text{CO}_2$, e o m/z 261 é produto da perda de um grupo $-\text{CO}_2$ seguido da ruptura do anel piperazínico¹⁰⁶.

A FIGURA 1.22 mostra os espectros obtidos para o GEM, os íons de m/z 372 ($\text{MH}^+ - \text{H}_2\text{O}$) e m/z 313 são formados sob uma energia de colisão entre 25 e 30 eV.

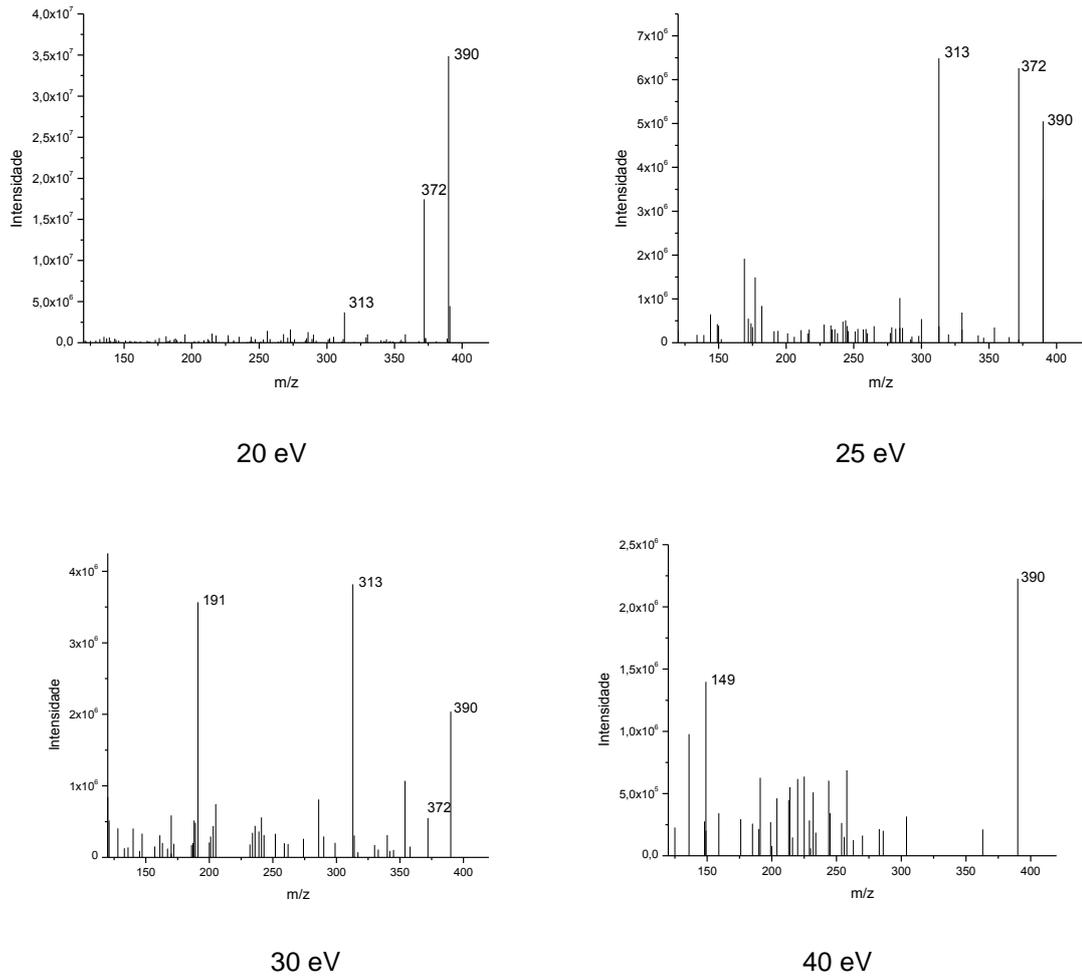


FIGURA 1.22: Espectros de massa do GEM em experimento de varredura de íons produto variando-se a voltagem da energia de colisão. Condições cromatográficas da FIGURA 1.14. Volume de injeção: 500 μL .

No caso da MOX, os íons monitorados são os de m/z 384 ($\text{MH}^+ - \text{H}_2\text{O}$) e m/z 358 ($\text{MH}^+ - \text{CO}_2$)¹⁰⁶, os quais são mais facilmente formados quando uma energia de colisão entre 20 e 25 eV é aplicada, como mostra a FIGURA 1.23.

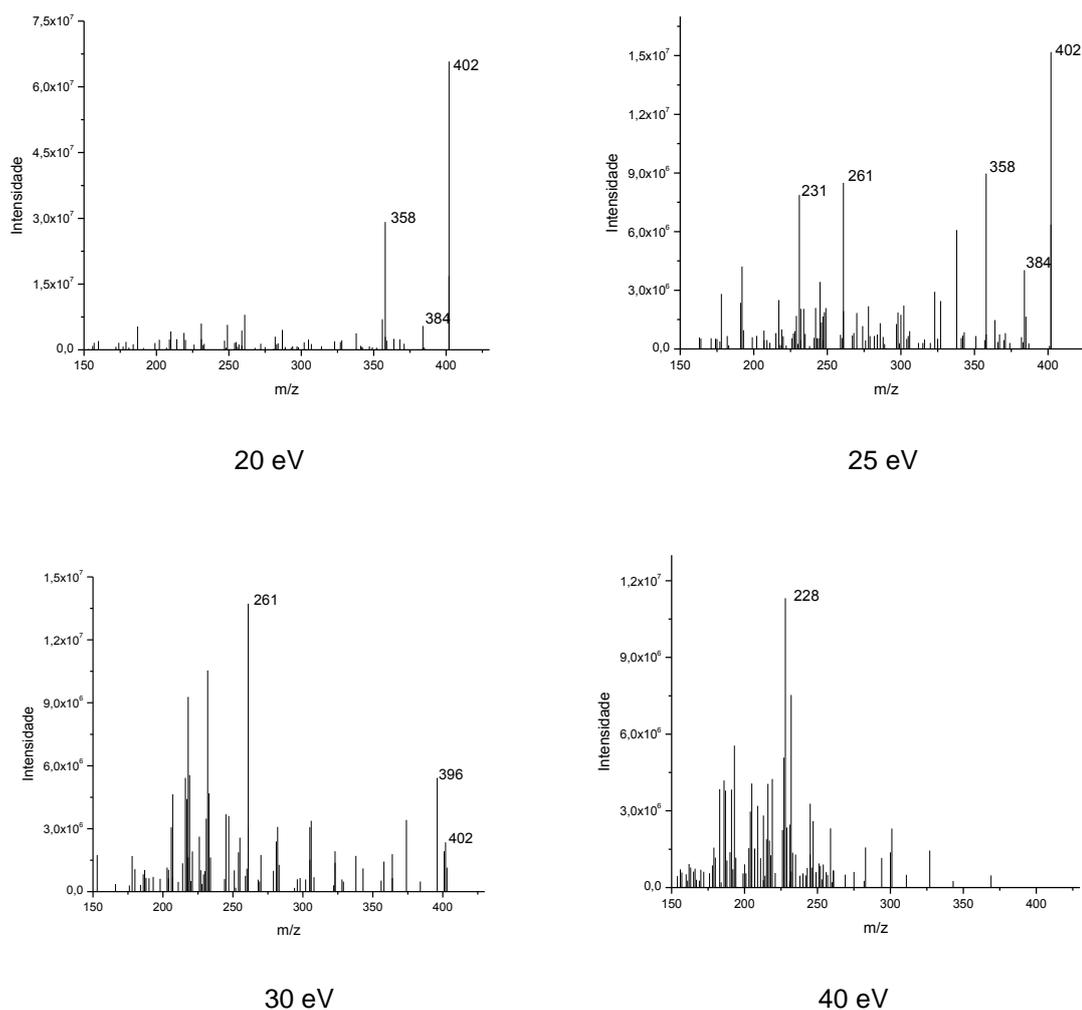


FIGURA 1.23: Espectros de massa do MOX em experimento de varredura de íons produto, variando-se a voltagem da energia de colisão. Condições cromatográficas da FIGURA 1.14. Volume de injeção: 500 μ L.

De forma geral, para esta classe de antibióticos, observou-se que as reações de fragmentação geralmente levaram à perda das moléculas neutras CO_2 e H_2O , principalmente quando em condições de colisão mais brandas. Em condições enérgicas, com energias de colisão mais altas, as reações de fragmentação foram conduzidas de forma descontrolada, gerando diversos íons produto de menor sensibilidade e seletividade para o monitoramento.

De forma resumida, a TABELA 1.4 mostra as condições de fragmentação para a análise dos seis antibióticos por SRM.

TABELA 1.4: Parâmetros do espectrômetro de massas para a obtenção dos íons fragmento de cada antibiótico.

FQs	Precursor [M+H] ⁺	Fragmentos m/z	Cone (V)	Energia de colisão (eV)
NOR	320	320 → 233* (MH ⁺ - CO ₂ -C ₂ H ₅ N)	20	22
		320 → 276 (MH ⁺ - CO ₂)	25	22
CIP	332	332 → 288* (MH ⁺ - CO ₂)	25	20
		332 → 314 (MH ⁺ - H ₂ O)	20	20
ENR	360	360 → 316* (MH ⁺ - CO ₂) 360 → 342 (MH ⁺ - H ₂ O)	25	20
OFL	362	362 → 261 362 → 318* (MH ⁺ - CO ₂)	20	30 20
GEM	390	390 → 313* 390 → 372 (MH ⁺ - H ₂ O)	20 25	28 20
		402 → 358* (MH ⁺ -CO ₂) 402 → 384 (MH ⁺ - H ₂ O)	25	20

*Transição de quantificação.

Finalizada a seleção das condições de ionização, o método foi validado.

Validação do método analítico

As curvas analíticas foram obtidas através de regressão linear, uma vez que este modelo matemático foi o que proporcionou melhor precisão e exatidão. As equações da curva, o coeficiente de correlação, LQ e LD estão apresentados na TABELA 1.5. A FIGURA 1.24 mostra a curva analítica obtida para o fármaco CIP. Os procedimentos de preparo das soluções e curvas de calibração estão detalhados no capítulo 5.

TABELA 1.5: Parâmetros de linearidade, limite de detecção e quantificação do método.

FQ	Faixa (ng L ⁻¹)	Equação de Calibração	r ²	LD (ng L ⁻¹)	LQ (ng L ⁻¹)
NOR	20 – 800	y = 8,45816x – 124,74063	0,995	10,5	20,0
CIP	20 – 800	y = 8,17752x – 144,3444	0,998	10,9	20,0
ENR	20 – 800	y = 16,7446x – 133,98815	0,992	5,3	20,0
OFL	20 – 800	y = 11,38038x – 23,88101	0,993	7,8	20,0
GEM	150 - 850	y = 2,80494x – 147,0952	0,990	31,8	150,0
MOX	20 – 800	y = 7,66339x – 146,38914	0,994	11,6	20,0

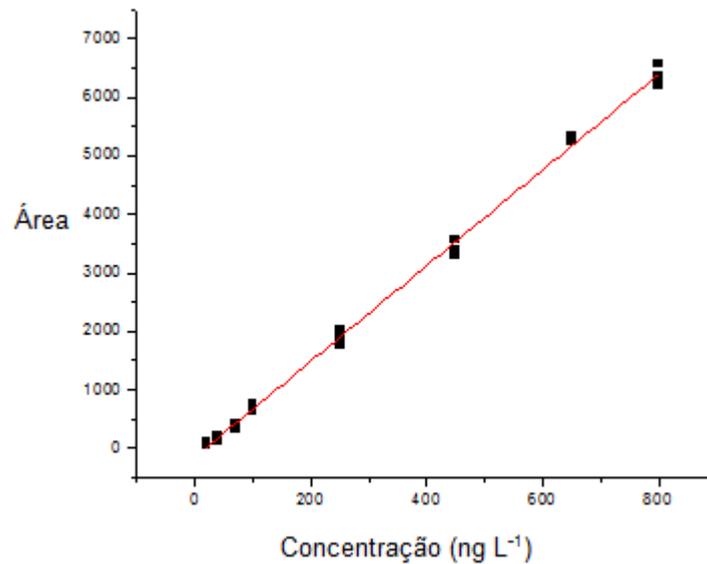


FIGURA 1.24: Curva de calibração para o fármaco CIP.

Os resultados mostram que as curvas obtidas foram lineares e com coeficiente de correlação (r^2) superior a 0,99. Os valores dos coeficientes de variação entre as replicatas para cada nível da curva foram inferiores à 15%, e a exatidão esteve dentro do intervalo de 15%. Todos os valores obtidos estão dentro dos critérios estabelecidos pelo protocolo adotado¹⁰¹ para a validação do método.

Com relação à seletividade, parâmetro que garante que a identificação do analito de interesse não está sendo afetada pela presença de outros compostos não monitorados, o método foi avaliado utilizando-se seis amostras provenientes da nascente do Rio Monjolinho, coletadas em 6 dias diferentes. Os cromatogramas ilustrados na FIGURA 1.25 para amostra controle de qualidade baixo (CQB) da NOR e uma amostra de água da nascente exemplifica a seletividade obtida para no método para os seis antibióticos.

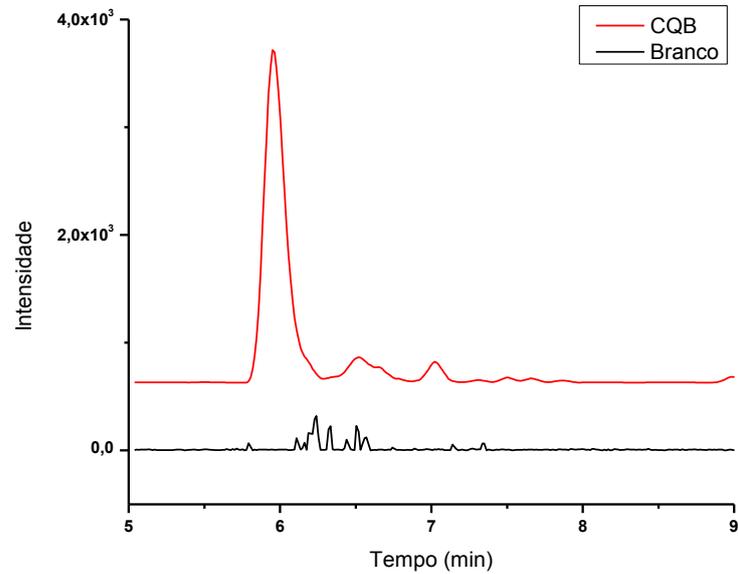


FIGURA 1.25: Cromatogramas de SRM (Monitoramento do íon de quantificação) do NOR. Amostras: CQB preparado em água da nascente do Rio Monjolinho e branco. Condições cromatográficas descritas na FIGURA 1.14. Volume injetado: 500 μ L.

A precisão e exatidão inter e intra lotes foram avaliadas através da análise das quintuplicatas dos três controles de qualidade. A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV) entre as replicatas, e a exatidão foi avaliada, como porcentagem, e comparadas com os valores entre as concentrações encontradas e as nominais para cada analito. Os valores de precisão e exatidão inter e intra-lotes são dados na TABELA 1.6:

TABELA 1.6: Precisão e Exatidão intra e inter-lotes.

FQ	ng L ⁻¹	1º Lote		2º Lote		3º Lote		Média (n=15)	
		Exatidão (%)	CV (n=3)						
			(%)		(%)		(%)		(%)
NOR	60	114	14	91,4	3	96,9	4	106	11
	350	97,1	14	89,7	2	91,6	2	88,1	2
	700	108	8	87,5	3	89,2	3	92,5	4
CIP	60	113	2	104	5	101	7	102	14
	350	102	12	90	5	102	3	94	10
	700	92,4	14	87,8	1	99,5	6	101	1
ENR	60	98,1	8	90,6	9	104	10	98	3
	350	93,6	13	88,5	7	94,5	9	90,3	1
	700	95	7	89,6	8	89,4	5	96,1	8
OFL	60	91,3	6	93,7	5	95,4	3	90,8	1
	350	89,8	4	86,7	4	95	3	82,2	4
	700	91,5	12	87,2	7	88,8	7	93,1	7
MOX	60	99,5	12	95,6	8	92,7	4	99,5	2
	350	97,3	13	89,4	8	93,5	2	89,5	7
	700	99,7	15	83,4	5	90,7	3	92,3	2
GEM	300	116	5	113	3	115	6	106	14
	500	106	14	112	6	103	9	109	8
	700	92,8	15	100	7	105	12	108	6

Da TABELA 1.6 pode-se observar que todos os resultados obtidos foram satisfatórios, atendendo aos limites estabelecidos para a validação do método.

A estabilidade de curta duração do método foi avaliada pela precisão das análises realizadas em tempo zero, 24 e 48 horas após o preparo das amostras (TABELA 1.7).

TABELA 1.7: Estabilidade de auto-injetor (Tempo zero, 24 e 48 horas).

Amostra	NOR	CIP	ENR	OFL	GEM	MOX
	CV (n=3)					
QB	5,2	6,5	6,3	14,9	10,0	13,6
QA	13,1	7,6	7,3	7,8	6,1	14,2

Observando-se a TABELA 1.7, pode-se notar que os antibióticos apresentaram valores de precisão dentro limite de aceitação (15%) por até 48 horas, o que os torna estáveis na matriz por este período.

Os percentuais de eficiência de extração do método, ou recuperação, foram calculados comparando-se os resultados obtidos para as soluções controle, preparadas em água da nascente do Rio Monjolinho, com os obtidos com as soluções controle preparadas em água ultrapura. A TABELA 1.8 mostra os resultados obtidos para cada antibiótico.

TABELA 1.8: Eficiência de extração obtida para os controles de qualidade para cada antibiótico. n=3 para cada concentração avaliada.

FQ	Concentração (ng L ⁻¹)	Eficiência de extração (%)
NOR	60	93
	350	88
	700	96
CIP	60	89
	350	92
	700	88
ENR	60	96
	350	96
	700	95
OFL	60	112
	350	93
	700	89
GEM	300	101
	500	104
	700	83
MOX	60	103
	350	79
	700	93

Os valores de eficiência de extração obtidos, menor de 79,5% para MOX e o maior de 104% para GEM atestam a eficiência da extração pela RAM-BSA utilizada.

A investigação do efeito de matriz durante a validação de um método analítico é um requisito primordial na quantificação de pequenas moléculas em matrizes complexas^{45,108}. Os mecanismos que provocam estes efeitos não são totalmente elucidados, no entanto acredita-se que os compostos interferentes que coeluem com os analitos possivelmente competem entre si pelas cargas disponíveis e pelo acesso à superfície das gotículas de gás emitido para a ionização¹⁰⁸.

Dentre os guias de validação existentes, a EMA apresenta uma abordagem particular para a avaliação do efeito de matriz para métodos por injeção direta de amostras. Segundo a EMA¹⁰¹, o efeito de matriz pode ser avaliado utilizando-se pelo menos seis amostras da matriz, de diferentes procedências (lotes). No caso da matriz ambiental analisada neste estudo, considerou-se utilizar amostras de água de diferentes pontos de coleta ao longo do Rio Monjolinho. Desta forma, foram coletadas amostras de água nos pontos 2, 3 e 4 (Ver capítulo 5 – Experimental), em dois dias aleatórios, num total de 6 amostras diferentes. O efeito de matriz foi calculado através das áreas das bandas dos analitos na presença da matriz. O coeficiente de variação (CV) entre os 6 lotes não deve ser maior que 15%, sendo utilizadas as amostras controles de qualidade baixo e alto durante a avaliação. A TABELA 1.9 mostra os resultados obtidos para cada antibiótico.

TABELA 1.9: Valores de CV para Efeito de Matriz.

FQs	Amostra	CV (%) (n=6)
NOR	QB	14
	QA	12
CIP	QB	12
	QA	9
ENR	QB	13
	QA	14
OFL	QB	14
	QA	8
MOX	QB	14
	QA	11
GEM	QB	11
	QA	11

Os valores obtidos de CV (TABELA 1.9) para os diferentes lotes das amostras analisadas inferem que a exclusão dos interferentes da matriz pela coluna RAM-C₈-BSA é eficiente e não comprometem a eficiência de ionização dos antibióticos em análise. Os valores de CV obtidos estão abaixo dos valores preconizados pelo guia de validação adotado.

Aplicação do método para determinação das seis fluoroquinolonas em amostras ambientais

O método foi aplicado em amostras de efluentes do rio Monjolinho situadas no município de São Carlos (FIGURA 1.26), bem como em amostras de influente e efluente da Estação de Tratamento de Esgoto do município de São Carlos, para identificação simultânea das seis FQs selecionadas.

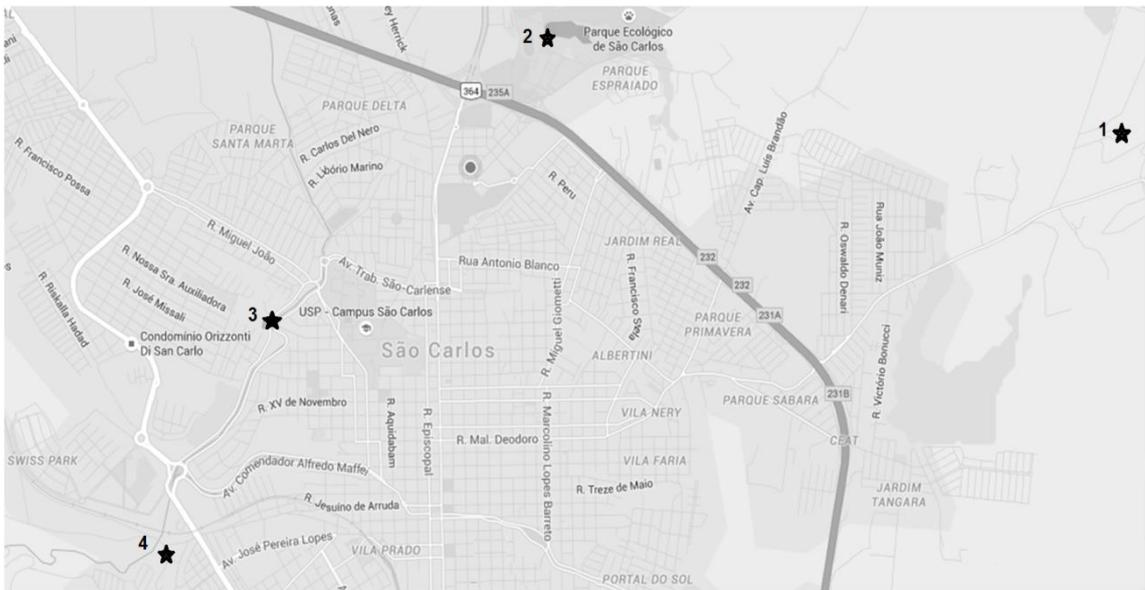


FIGURA 1.26: Mapa da área de estudo (modificado do Google Maps). Pontos de coleta: 1 – Nascente; 2 – UFSCar; 3 – Universidade de São Paulo; 4 – Antiga usina da Companhia Paulista de Força e Luz. (Fonte: Google maps)

As características físico-químicas das amostras coletadas nos diferentes pontos estão listados na Tabela 1.10.

TABELA 1.10: Características físico-químicas das amostras aquáticas coletadas na área de estudo.

Amostra	Condutividade (S cm ⁻¹)	pH	TOC (mg L ⁻¹)	TC (mg L ⁻¹)	IC (mg L ⁻¹)
Nascente	2,62E-05	5,7	2	10	7
ETE (Entrada)	6,95E-04	8,0	40	77	37
ETE (Entrada)	6,59E-04	7,6	1137	1100	37
ETE (Saída)	6,11E-07	8,1	55	68	12
ETE (Saída)	1,11E-03	7,8	708	771	62
Ponto 2	4,16E-05	7,2	1116	1124	8
Ponto 3	1,01E-04	7,7	449	459	11

Legenda: TOC = carbono orgânico total; TC = carbono total; IC = carbono inorgânico.

Apenas os fármacos ciprofloxacino e norfloxacino foram encontrados em concentrações acima do limite de quantificação nas amostras de água proveniente da entrada da estação de tratamento de água e esgoto do município de São Carlos (influyente) da ETE da cidade de São Carlos. O perfil cromatográfico desta amostra é mostrado na FIGURA 1.27.

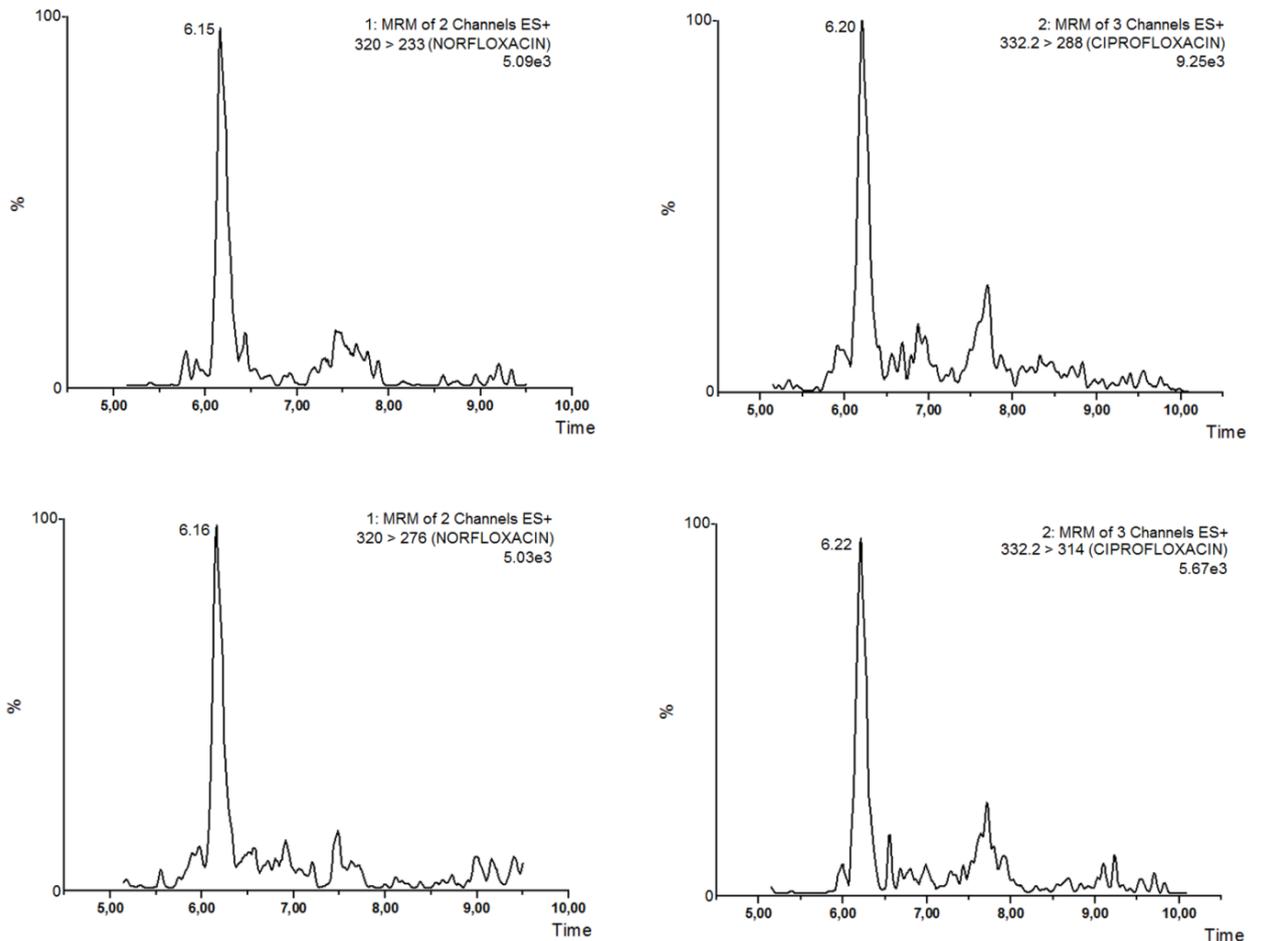


FIGURA 1.27: Cromatogramas de SRM das transições de quantificação e confirmação do CIP e NOR. Amostra: influente da ETE de São Carlos. Volume injetado: 500 μ L. Condições cromatográficas descritas na FIGURA 1.14 (Página 26).

As concentrações encontradas foram 195 ng L^{-1} para o CIP e 270 ng L^{-1} para o NOR. Nas demais localidades, nenhum dos antibióticos do estudo foi detectado.

Desenvolvimento de um método de extração para quantificação de ciprofloxacino em músculo de tilápias

O CIP vem sendo quantificado em águas residuais e efluentes em concentrações na ordem de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$, e essa faixa pode variar de $0,5 \text{ ng L}^{-1}$ até $89 \mu\text{g L}^{-1}$. Uma vez que neste estudo o CIP tenha sido detectado e quantificado na amostra de água proveniente da entrada da estação de tratamento de água e esgoto do município de São Carlos, este foi selecionado para avaliação do potencial bioacumulativo em tilápias (*O. niloticus*). Embora a concentração encontrada para o CIP em amostra de influente da ETE de São Carlos tenha sido de 195 ng L^{-1} , optou-se em estudar os efeitos bioacumulativos deste fármaco em concentrações encontradas em panorama mundial. Desta forma, selecionaram-se três concentrações: $0,5$, $1,0$ e $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$, a serem avaliadas em diferentes tempos de exposição (7 e 14 dias). O delineamento experimental, bem como a descrição da extração e preparo das amostras encontram-se no Capítulo 5.

Em matrizes biológicas, a precipitação de proteínas é um dos procedimentos mais utilizados para o tratamento da amostra. Esta técnica caracteriza-se pelo uso de solventes orgânicos apropriados, seguida de centrifugação ou simples diluição da amostra. No entanto, os agentes de precipitação podem levar ao ganho ou supressão de ionização no MS, tornando-se um inconveniente no que diz respeito ao efeito de matriz. Ademais, a extração muitas vezes ocasiona uma diminuição dos níveis de recuperação do analito de interesse, o que é uma desvantagem⁴⁹.

O uso de colunas RAM-BSA em uma ou duas dimensões já foi bem estabelecido em nosso grupo para quantificação de uma variedade de fármacos em diversas matrizes biológicas⁹⁵. E nesse contexto, o método de separação desenvolvido para quantificação desse antibiótico em amostras ambientais aquáticas foi adaptado para quantificação em tecido do peixe.

Como dito anteriormente, as condições de análise em injeção direta de amostras requerem avaliações, que incluem desde o volume necessário de amostra injetada até os tempos de exclusão das macromoléculas e os tempos de retenção dos analitos. Além disso, a matriz biológica, neste caso, tecido muscular, deve ser cuidadosamente avaliada quanto às condições de extração com solvente.

Alguns solventes foram inicialmente avaliados para a extração do ciprofloxacino do músculo do peixe: acetonitrila, metanol e acetato de etila. Estes

solventes foram selecionados de acordo com as características físico-químicas do antibiótico (Tabela 1.2) selecionado, bem como em artigos da literatura¹¹⁰⁻¹¹³.

Após as extrações com os três solventes selecionados, as amostras ressuspensas não estavam totalmente solubilizadas, pois a solução tornava-se levemente turva com a adição de água. O fato desta imiscibilidade em meio aquoso impossibilitou a injeção direta da amostra no LC. Uma vez que o músculo de tilápia possui lipídios em sua composição, concluiu-se que os solventes utilizados estavam extraíndo estes compostos, além do antibiótico de interesse. Desta forma, outra abordagem foi adotada para a extração. A abordagem selecionada fez o uso de água ultrapura, uma vez que proporcionou uma boa extração do antibiótico, com níveis de recuperação satisfatórios (TABELA 1.11). A utilização da coluna RAM-C₈-BSA foi importante para a exclusão de macromoléculas interferentes, e manteve perfil cromatográfico semelhante para a eluição da CIP em amostras ambientais (FIGURA 1.28).

TABELA 1.11: Recuperação obtida para as amostras controle de qualidade para o CIP (n=3).

Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recuperação (%)
0,006	75
0,08	70
0,086	73

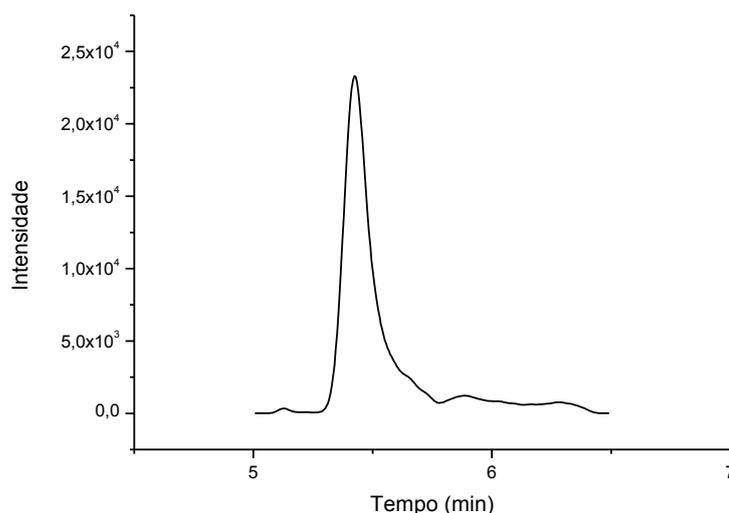


FIGURA 1.28: Cromatograma extraído de SRM do CIP (Monitoramento do íon m/z 288), após extração em músculo de tilápia. Volume injetado: 100 μL . Condições cromatográficas descritas na FIGURA 1.14 (Página 26).

O cromatograma do CIP em músculo de tilápia apresentado na FIGURA 1.28 mostra banda bem definida e com tempo de retenção baixo, mas superior ao tempo necessário para exclusão dos interferentes desta matriz. Com as condições cromatográficas definidas, seguiu-se com a validação do método analítico.

Validação do método analítico para determinação de ciprofloxacino em músculo de tilápia

A curva analítica (FIGURA 1.29) foi obtida através de regressão polinomial quadrática (equação $y = 130,6 + 13723 x + 60442 x^2$) pelo método dos mínimos quadrados, com coeficiente de correlação (r^2) de 0,997. A faixa de concentração foi de 0,002 a 0,14 $\mu\text{g g}^{-1}$, com limites de detecção e quantificação de 0,05 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

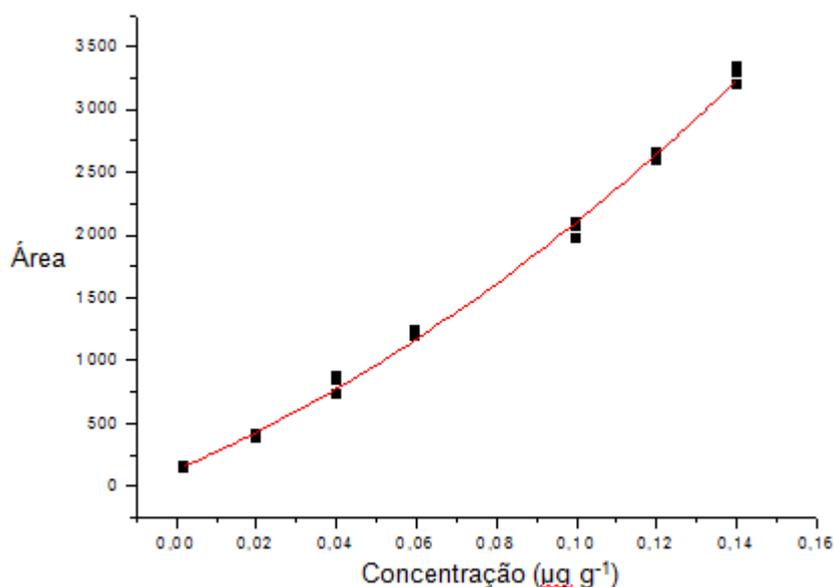


FIGURA 1.29: Curva de calibração para o fármaco CIP.

O resultado mostra que a curva obtida foi polinomial, do tipo parábola. Todos os valores obtidos estão dentro dos critérios estabelecidos pelo protocolo adotado para a validação do método.

O método obteve boa seletividade, uma vez que na região de eluição da CIP não houve presença significativa de interferentes. O perfil de seletividade do

método pode ser exemplificado na FIGURA 1.30, comparando-se a banda cromatográfica da amostra controle de qualidade médio e o perfil de eluição da amostra branco.

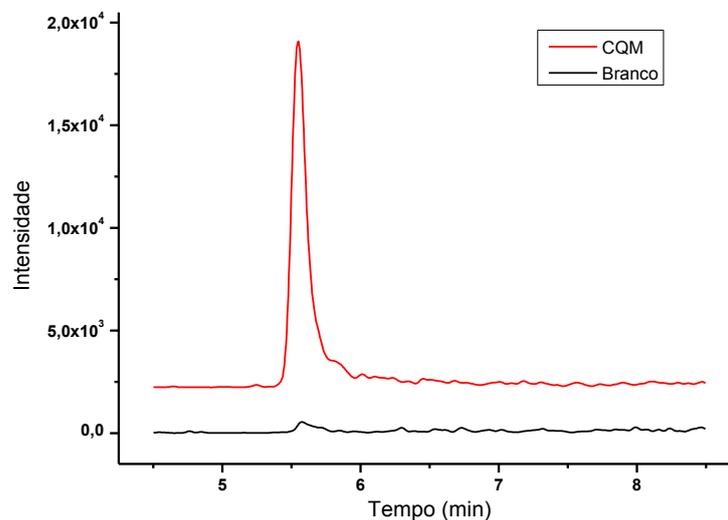


FIGURA 1.30: Cromatogramas SRM (Monitoramento do íon de quantificação) do CIP. Amostras: CQM e branco. Volume injetado: 100 μ L. Condições cromatográficas descritas na FIGURA 1.14 (Página 26).

A FIGURA 1.30 mostra que não há compostos interferentes na região de eluição do CIP, demonstrando que a exclusão das proteínas provenientes do tecido do peixe foi novamente realizada com eficiência pela coluna RAM-C₈-BSA.

Os valores de precisão e exatidão inter e intra-lotes são dados na TABELA 1.12, mostrando que os resultados obtidos estão de acordo com o que preconiza o guia de validação adotado¹⁰¹.

TABELA 1.12: Precisão e exatidão inter e intra-lotes do método.

Antibiótico	$\mu\text{g g}^{-1}$	1º Lote		2º Lote		3º Lote		Média (n=15)	
		Exatidão (%)	CV (%)						
CIP	0,006	115	1,9	102	4,0	92	3,8	107	3,2
	0,08	114	8,1	92	8,4	91,6	9,0	92	8,5
	0,086	113	5,8	94	9,2	107	3,5	92,5	6,2

Com relação à estabilidade em tempo zero, 24 e 48 horas após o preparo das amostras, a TABELA 1.13 mostra que os valores de precisão estão dentro limite de aceitação por até 48 horas.

TABELA 1.13: Estabilidade de auto-injetor (Tempo zero, 24 e 48 horas).

Amostra	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)	CV (%) n=3
CQB	0,006	3,2
CQA	0,086	6,2

A avaliação do efeito de matriz (TABELA 1.14) demonstra que os valores de precisão estão de acordo ($\leq 15\%$) com os parâmetros estabelecidos pelo guia de validação adotado. Estes resultados demonstram uma eficaz exclusão dos interferentes da matriz pela coluna RAM-C₈-BSA, garantindo ao método uma quantificação mais precisa dos compostos analisados.

TABELA 1.14: Valores de CV para Efeito de Matriz.

Amostra	CV (%) (n=6)
QB	13
QA	6,0

Com o método validado, este foi aplicado para as amostras de peixes expostos ao CIP, para a avaliação de bioacumulação.

Aplicação do método para determinação de CIP no músculo de tilápia

O método foi aplicado para duas amostras, selecionadas aleatoriamente, de indivíduos expostos às concentrações de 0,5, 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de CIP, para 7 e 14 dias de exposição, num total de 12 amostras. Os tecidos foram submetidos ao procedimento de extração do antibiótico, descrito no Capítulo 5 desta tese, e injetados no sistema de LC-MS/MS.

Somente a amostra de músculo de tilápia exposta à concentração de $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ foi possível quantificar o CIP, numa concentração de $14,3 \text{ ng g}^{-1}$ de tecido. A FIGURA 1.31 apresenta o cromatograma referente às transições de quantificação e confirmação para o CIP. Nas outras amostras as concentrações ficaram abaixo do limite de quantificação.

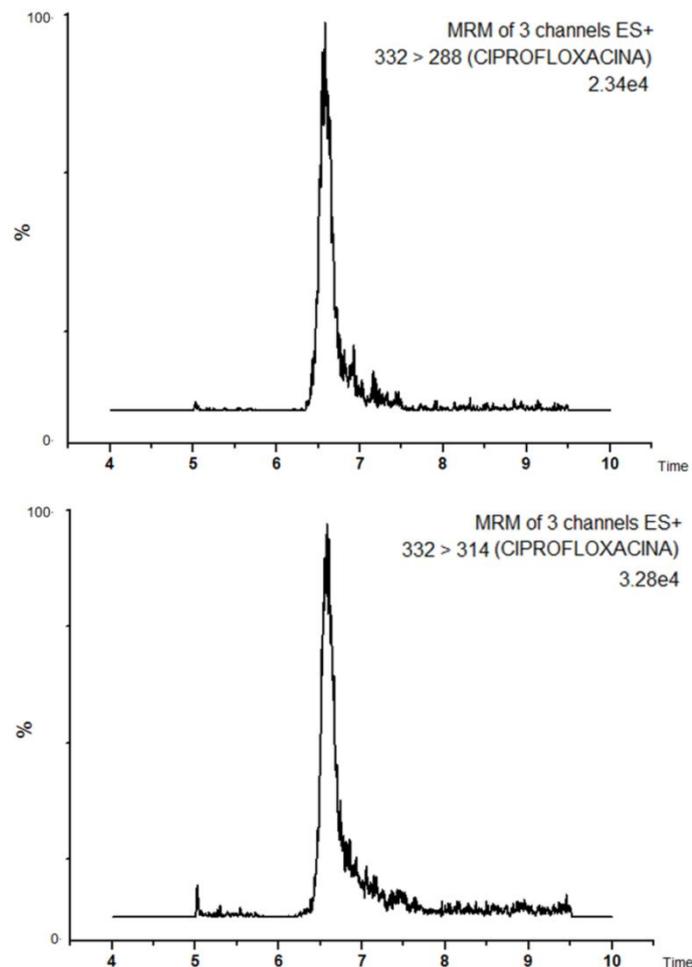


FIGURA 1.31: Cromatogramas extraídos de MRM (Monitoramento do íon 288 e 314). Amostra: músculo de tilápia exposta ao CIP ($5,0 \mu\text{g L}^{-1}$) por 7 dias. Volume injetado: $100 \mu\text{L}$. Condições cromatográficas descritas na FIGURA 1.14 (Página 26).

A partir destes resultados infere-se que o CIP apresenta um baixo potencial bioacumulativo em músculo de tilápia, visto a concentração encontrada no referido tecido. No entanto, a toxicidade deste fármaco ainda deve ser cautelosamente avaliada. Ensaios de biotransformação do CIP em peixes podem auxiliar na avaliação do potencial risco ambiental, fornecendo dados toxicológicos que poderão predizer sobre a periculosidade desta classe de antibióticos em diferentes níveis tróficos.

1.4 Conclusões

Efluentes da bacia hidrográfica do Rio Monjolinho

O presente trabalho reportou o desenvolvimento, validação e aplicação de um método com injeção direta de amostra no sistema LC-QqQ-MS/MS para quantificação simultânea de seis fluoroquinolonas em amostras de água de rio da região da bacia do Rio Monjolinho do município de São Carlos e amostras de influente/efluente da ETE do município.

A eficiência da coluna RAM-C₈-BSA para a exclusão das substâncias húmicas tornou possível o seu uso em condição unidimensional, com injeção direta de 500 µL de amostra ambiental e com limites de quantificação da ordem de ng L⁻¹. Seu desempenho no *clean-up* das amostras foi evidenciado nos resultados obtidos na avaliação do efeito de matriz, o qual é comumente observado em análises de amostras ambientais por LC-MS com fontes de ionização do tipo ESI. A qualidade do desempenho da coluna RAM-C₈-BSA foi mantido após 700 injeções (500 µL cada) de amostras ambientais dos locais selecionados neste estudo.

O método desenvolvido foi validado com baixos limites de detecção e quantificação e com boa exatidão e precisão, atendendo o que foi preconizado pelo guia de validação adotado. Sendo assim, a aplicação deste método para identificação simultânea dos seis antibióticos selecionados pode ser efetuada em amostras ambientais aquáticas da região da bacia do Rio Monjolinho¹¹⁴.

Bioacumulação em músculo de tilápia

Entre os solventes avaliados, água foi o adequado para extração do CIP do músculo do peixe, sem causar precipitações decorrentes da extração de proteínas e ou lipídeos. O êxito na exclusão dos interferentes da matriz e eluição do CIP foram novamente alcançados com o uso da coluna RAM-C₈-BSA. As figuras de mérito avaliadas na validação do método mostraram-se satisfatórias, tornando possível a quantificação do fármaco selecionado em músculo de tilápia.

Considerando o aporte contínuo de CIP nos ambientes aquáticos, os resultados deste estudo são importantes para o melhor entendimento da toxicidade deste composto e seus efeitos subletais em uma espécie nativa e de importância na pirâmide alimentar humana, uma vez que há pouca informação disponível sobre a toxicidade de fluoroquinolonas em organismos aquáticos. Além disso, espera-se que estes resultados auxiliem os órgãos reguladores a estabelecerem limites para este fármaco em águas superficiais e efluentes.

Capítulo 2

**Efeito da exposição ao ciprofloxacino em
fígado, brânquia e músculo de tilápia
(*Oreochromis niloticus*)**

Efeito da exposição ao ciprofloxacino em fígado, brânquia e músculo de tilápia (*O. niloticus*)

2.1 Introdução

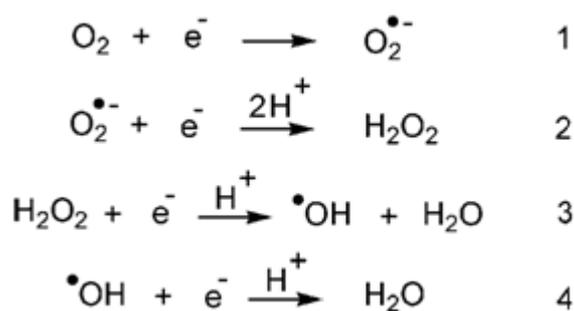
Biomarcadores bioquímicos e estresse oxidante

O organismo tem dois principais mecanismos de eliminação de agentes químicos: excreção, podendo ser na sua forma original, ou biotransformação, levando à formação de compostos hidrofílicos, os quais são excretados mais facilmente que o composto original. Em áreas poluídas, a exposição de peixes aos xenobióticos pode resultar em alterações na atividade das enzimas antioxidantes¹¹⁵ causadas pelo excesso de espécies reativas de oxigênio (ERO). Alterações dessas enzimas são indicativos importantes de resposta ao estresse oxidante. Dessa forma, alterações na atividade das enzimas antioxidantes podem indicar produção de ERRO provocada pela exposição ao xenobiótico.

As ERO são produzidas continuamente em sistemas biológicos, principalmente através de processos celulares como transporte mitocondrial de elétrons, metabolismo de xenobióticos e inflamações^{116,117}. As ERO podem ser geradas na cadeia transportadora de elétrons, a partir da redução parcial do oxigênio molecular.

A base da toxicidade do oxigênio está na sua capacidade em realizar transferências de elétrons, que produzem intermediários reativos. Por outro lado, a sua capacidade de agir também como receptor de elétrons está subjacente à sua utilidade para organismos aeróbios como, por exemplo, no transporte mitocondrial de elétrons, responsável pela produção de adenosina trifosfato (ATP). Nos processos aeróbios, o O₂ é reduzido à H₂O, em reações multi-etapas, como mostra o esquema 1:

Esquema 1:



As equações 1, 2 e 3 mostram a formação do radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^{\bullet}). Estes e alguns de seus derivados são exemplos de ERO. Embora o peróxido de hidrogênio não seja uma espécie radicalar, ele é uma espécie reativa devido a sua capacidade de difundir através das membranas e gerar espécies OH^{\bullet} devido à presença de metais de transição no interior das células¹¹⁸, de acordo com o esquema 2:

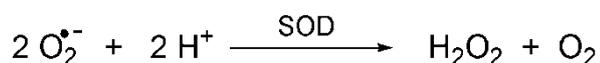
Esquema 2:



Dentre as defesas antioxidantes, a principal defesa celular contra as ERO ocorre por meio das principais enzimas antioxidantes: catalase (CAT) e superóxido desmutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e redutase (GR) (com o GSH como co-fator); além das enzimas, a célula conta com antioxidantes de baixa massa molecular, como os carotenóides, o retinol, o α -tocoferol, e o ácido ascórbico. Se estes antioxidantes presentes no organismo estão incapazes de anular os radicais livres, o aumento de ERO pode causar dano à célula, conhecido como estresse oxidativo¹¹⁶.

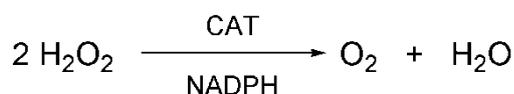
A SOD catalisa a destruição do ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio. A decomposição deste ânion ocorre naturalmente, porém, por obedecer a uma cinética de segunda ordem, é necessária a colisão entre duas moléculas de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Esquema 3). A presença da enzima SOD favorece essa dismutação, tornando a reação de primeira ordem, eliminando a necessidade da colisão entre as moléculas.

Esquema 3:



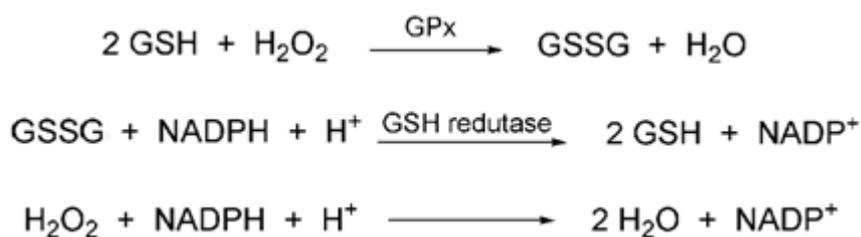
A catalase é a enzima responsável pela transformação do peróxido de hidrogênio em H₂O e O₂ (Esquema 4).

Esquema 4:



O sistema GSH também catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, sendo que a glutathiona opera em ciclos entre sua forma oxidada e sua forma reduzida¹¹⁸. Estes sistemas enzimáticos são alvo de estudo no campo da ecotoxicologia, uma vez que as mudanças nos níveis de atividade das enzimas antioxidantes podem ser utilizadas como possíveis biomarcadores em diferentes organismos aquáticos¹¹⁹. O esquema 5¹²⁰ mostra as reações envolvidas nos respectivos sistemas enzimáticos:

Esquema 5:



A GPx atua na catálise do H₂O₂ e de hidroperóxidos de ácidos graxos, convertendo-os em água e seus produtos não tóxicos por oxidação da glutathiona reduzida (GSH) à glutathiona oxidada (GSSG) (Esquema 5). A GPx é específica para a GSH e tem capacidade de desintoxicar rapidamente o H₂O₂ e certos lipoperóxidos. A ação integrada desses agentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos estão representadas na FIGURA 2.1.

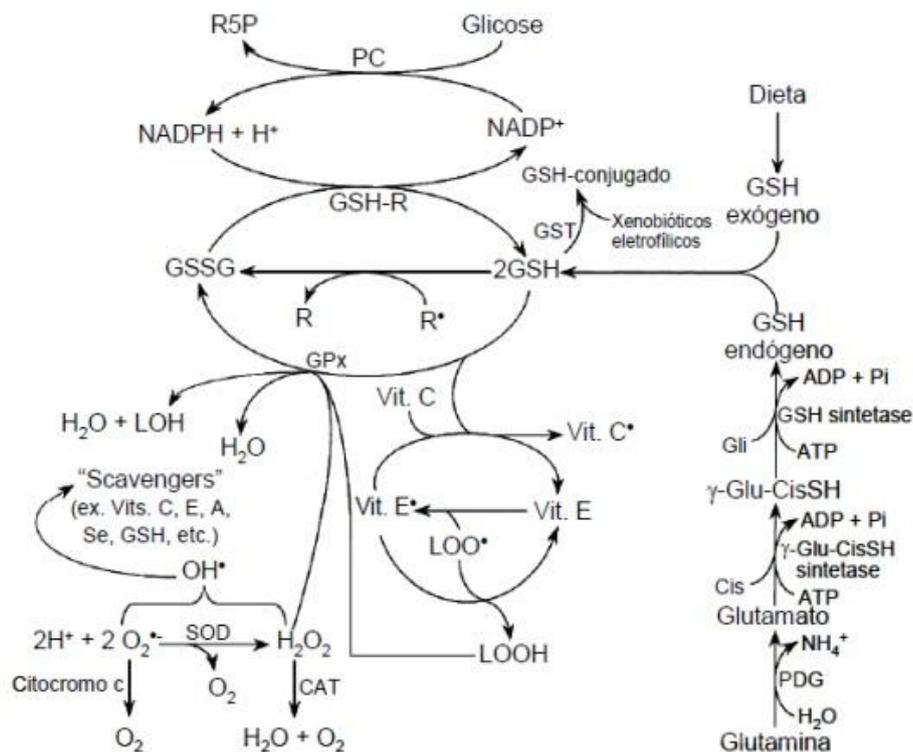
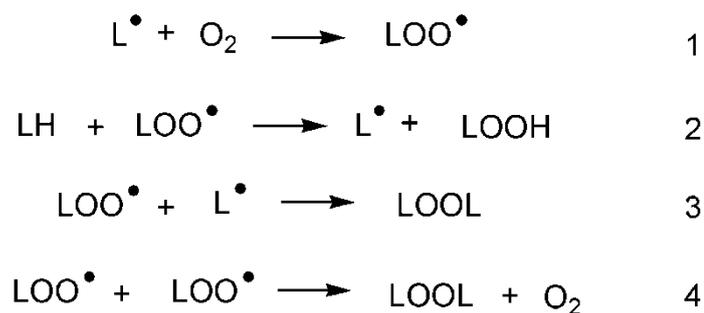


FIGURA 2.1: Esquema representando o sistema antioxidante, enzimático e não enzimático em célula de mamífero. Adaptado de FANG e colaboradores¹²¹.

As ERO podem agir sobre os lipídeos de membrana, causando sua oxidação e formando hidroperóxidos, mecanismo conhecido como peroxidação lipídica (LPO). A LPO é um importante marcador de lesão na membrana celular e estresse oxidativo¹²². Seu aumento pode ocasionar a desestabilização da membrana celular, provocando aumento da permeabilidade da célula e extravasamento das enzimas lisossomais no citosol, acarretando danos nas principais funções celulares. O processo da LPO ocorre em três etapas distintas (Esquema 6). Na primeira delas, a etapa de iniciação, ocorre a metabolização dos ácidos graxos presentes na membrana da célula, formando radicais alquila (L[•]), que em seguida formam o radical peroxila (LOO[•]) quando em contato com o O₂. Por fim, o LOO[•] pode reagir com outro ácido graxo, formando um hidroperóxido de lipídio (LOOH) e outro L[•], finalizando a segunda etapa. A terceira etapa, chamada de terminação, ocorre a aniquilação dos intermediários radicais formados, gerando produtos não radicalares¹²².

Esquema 6:



Alguns poluentes ambientais são capazes de alterar o comportamento de células nervosas, podendo causar efeitos neurotóxicos. As manifestações de neurotoxicidade podem ser verificadas por sinais de intoxicação do animal avaliado pela atividade da acetilcolinesterase (AChE). A inibição da atividade desta enzima é um importante biomarcador de poluição ambiental, principalmente para pesticidas organofosforados e derivados de carbamato¹²³. A AChE está presente na fenda sináptica e nas junções neuromusculares de organismos vertebrados, e desempenha um papel importante na neurotransmissão colinérgica, hidrolisando o neurotransmissor acetilcolina (ACh) para colina. O modo de ação da AChE é através da remoção da ACh, impedindo assim uma nova excitação da célula pós-sináptica. Desta forma, a inibição da AChE pode provocar acúmulo de ACh em junções sinápticas, levando a alterações comportamentais e fisiológicas ao animal^{124,125}.

Mesmo em baixas concentrações, a presença de fármacos no ambiente aquático gera grande preocupação. Uma vez que são substâncias biologicamente ativas, podem desencadear efeitos farmacodinâmicos em organismos aquáticos que possuam receptores enzimáticos compatíveis. Desta forma, a qualidade dos recursos hídricos se torna ameaçada pela presença de fármacos, alterando a biodiversidade e o equilíbrio de ecossistemas aquáticos¹⁹.

Em um estudo de toxicidade de fármacos para alguns tipos de algas (inibição do crescimento), os antibióticos ciprofloxacino e enrofloxacino mostraram-se tóxicos para cianobactérias *Anabaena flos-aquae* (EC50 de 170 e 10,2 mg L⁻¹) e *Lemna minor* (EC50 de 107 e 62,5 mg L⁻¹). Enquanto o enrofloxacino foi mais tóxico para algas verdes, ciprofloxacino foi mais tóxico para cianobactérias¹²⁶. NUNES *et al*¹²⁷, investigaram a toxicidade aguda em peixes da espécie *Gambusia holbrooki*, frente a ação de alguns agentes terapêuticos, dentre eles o diazepam e detergentes.

As respostas dos ensaios de estresse oxidante diminuíram frente à exposição por estes dois agentes. Os animais expostos ao diazepam apresentaram pigmentação escura e movimento natatório alterado¹²⁷. É importante salientar que os organismos são expostos a muitos compostos diferentes simultaneamente, podendo ocorrer efeito aditivo ou até mesmo sinérgico entre os fármacos ou outras substâncias presentes no ambiente¹⁹.

Na tentativa de avaliar efeitos toxicológicos em ambientes aquáticos, a utilização de peixes como organismos testes é um atrativo pelo fato destes organismos estarem, geralmente, no topo da cadeia trófica destes ambientes. Peixes são sensíveis às alterações no ambiente, e suas alterações biológicas podem ser iniciadas em concentrações químicas muito baixas, o que fornece um panorama detalhado sobre o impacto ambiental causado por xenobióticos.

A tilápia do Nilo (O. niloticus)

A tilápia do Nilo (*O.niloticus*) constitui uma das cinco espécies de peixe, pertencente à ordem Perciformes e família *Cichlidae*, encontradas no córrego Monjolinho, o qual faz parte da sub-bacia do Alto Jacaré-Guaçu, alvo deste estudo¹²⁸. É possível que a origem dessa espécie no Monjolinho seja recorrente de pisciculturas¹²⁸. É também uma espécie comumente encontrada em águas salgadas e de estuários ao redor do mundo, a qual responde prontamente a alterações ambientais aquáticas¹²⁹. A presença de resíduos de pesticidas^{116,119} e metais pesados^{129,130} têm sido reportados em espécies de tilápia; no entanto, pouca atenção tem sido dada a exposição destes peixes a produtos farmacêuticos, principalmente antibióticos.

Ciprofloxacino no meio ambiente

O CIP vem sendo detectado em águas residuais e efluentes na ordem de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$, e a faixa de concentração pode variar de $0,5 \text{ ng L}^{-1}$ ³¹ até $89 \mu\text{g L}^{-1}$ ¹⁰⁹. Embora neste estudo o CIP tenha sido detectado e quantificado na amostra de água proveniente da entrada da estação de tratamento de água e esgoto do município de São Carlos¹¹⁴ na concentração de 195 ng L^{-1} , optou-se em estudar os

efeitos bioquímicos causados em concentrações detectadas em panorama mundial. Desta forma, selecionaram-se três concentrações ambientalmente relevantes: 0,5, 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

2.2 Objetivos

Objetivo geral

O presente trabalho objetivou avaliar o sistema de defesa antioxidante em tilápia (*O. niloticus*), após exposição subletal ao CIP em diferentes concentrações (0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) por 7 e 14 dias.

Objetivos específicos

Determinar os efeitos da exposição ao CIP na produção de hidroperóxido de lipídios em brânquias, fígado e músculo de tilápia, expostas as concentrações de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de CIP, por 7 e 14 dias.

Determinar as respostas do sistema de defesa antioxidante enzimático SOD, CAT, GPx e GST e não enzimático GSH em fígado, brânquia e músculo de tilápia, expostas as concentrações de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de CIP, por 7 e 14 dias.

Avaliar a atividade da acetilcolinesterase em músculo de tilápia expostas as concentrações de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de CIP, por 7 e 14 dias.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Alterações no sistema de defesa antioxidante em tecido hepático de tilápia (*O. niloticus*).

O fígado é um órgão chave quando se considera a ação dos poluentes químicos, pois é o órgão principal responsável na biotransformação dos xenobióticos¹³¹. Devido a sua função no metabolismo e sua sensibilidade a

poluentes do ambiente, o fígado tem recebido atenção especial em estudos toxicológicos relacionados à contaminação de diferentes espécies de peixes por agentes químicos orgânicos e inorgânicos^{132,133}.

O delineamento experimental, bem como a descrição dos ensaios enzimáticos e não enzimáticos aplicados para a avaliação das alterações bioquímicas nos tecidos analisados estão detalhados no capítulo 5 da presente tese.

Sistema de defesa antioxidante SOD-CAT.

O perfil da atividade enzimática da SOD presente no fígado das tilápias frente à exposição do CIP nas concentrações selecionadas é mostrado na FIGURA 2.2.

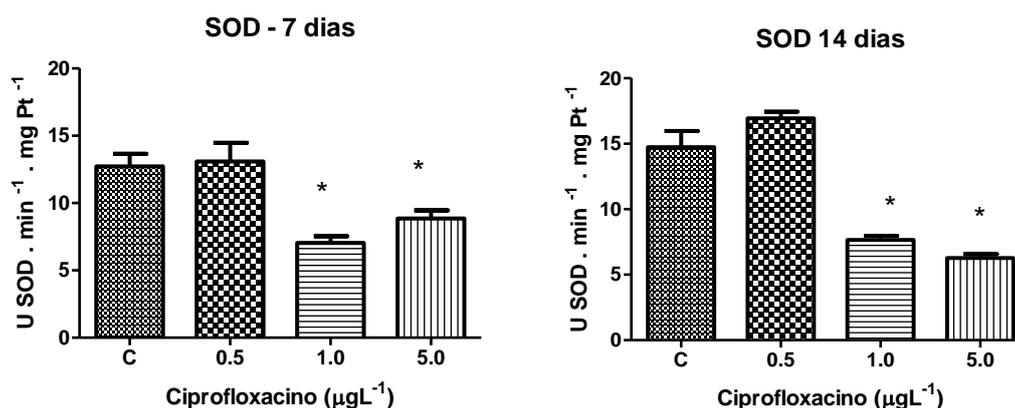


FIGURA 2.2: Atividade da SOD em 7 e 14 dias de exposição ao CIP no fígado de tilápia (*O. niloticus*) do grupo controle (C) e grupos expostos a 0,5, 1,0 e 5,0 µg L⁻¹. * Indica diferença estatística (P>0,05) em relação ao controle. Valores médios e desvio padrão: 7 dias (Controle = 12,7 ± 2,92; 0,5 µg L⁻¹ = 13,1 ± 3,88; 1,0 µg L⁻¹ = 7,04 ± 1,55; 5,0 µg L⁻¹ = 8,85 ± 1,9), 14 dias (Controle = 14,7 ± 3,9; 0,5 µg L⁻¹ = 16,9 ± 1,42; 1,0 µg L⁻¹ = 7,65 ± 0,889; 5,0 µg L⁻¹ = 6,27 ± 0,926).

A partir da FIGURA 2.2 é possível observar que, em relação ao controle, os animais expostos por 7 e 14 dias apresentaram diferenças significativas nos parâmetros enzimáticos de defesa antioxidante da SOD frente às duas maiores concentrações analisadas. A atividade específica da SOD teve uma queda de 45% e 30% para as concentrações de 1,0 µg L⁻¹ e 5,0 µg L⁻¹ respectivamente, durante exposição por 7 dias. Para 14 dias de exposição, a atividade diminuiu em porcentagem ainda maior, 48% para a concentração de 1,0 µg L⁻¹ e 57% para 5,0 µg

L⁻¹. Esses resultados indicam a possibilidade de uma alta concentração de peróxido (H₂O₂), uma vez que este é substrato direto da enzima apresentada.

Para a CAT, a FIGURA 2.3 mostra os resultados obtidos para sua atividade enzimática em fígado de tilápia, após 7 e 14 dias de exposição ao fármaco.

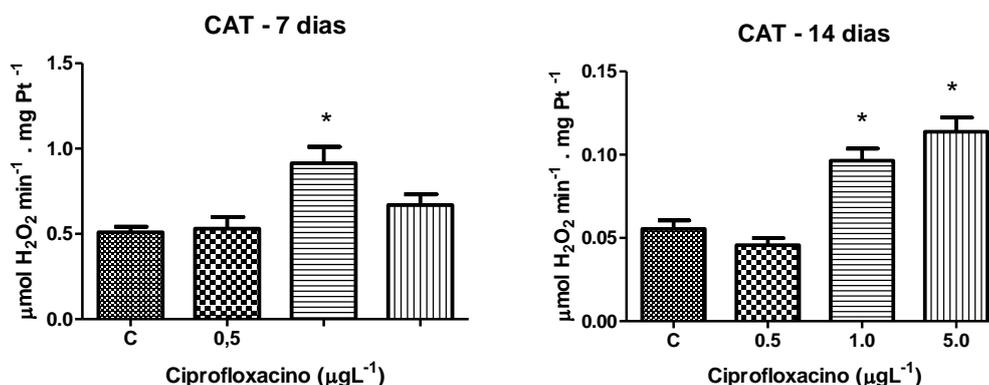


FIGURA 2.3: Atividade específica da CAT, em 7 e 14 dias de exposição ao CIP no fígado de tilápia (*O. niloticus*) do grupo controle (C) e grupos expostos a 0,5, 1,0 e 5,0 μg L⁻¹. * Indica diferença estatística (P>0,05) em relação ao controle. Valores médios e desvio padrão: 7 dias (Controle = 0,510 ± 0,0891; 0,5 μg L⁻¹ = 0,530 ± 0,197; 1,0 μg L⁻¹ = 0,914 ± 0,291; 5,0 μg L⁻¹ = 0,667 ± 0,195), 14 dias (Controle = 0,0555 ± 0,0160; 0,5 μg L⁻¹ = 0,0456 ± 0,0131; 1,0 μg L⁻¹ = 0,0965 ± 0,0217; 5,0 μg L⁻¹ = 0,114 ± 0,0268).

Neste caso, a CAT apresentou aumento significativo para as concentrações de 1,0 e 5,0 μg L⁻¹ (73% e 107%, respectivamente), durante 14 dias de exposição, e 1,0 μg L⁻¹ (aumento de 30%) para 7 dias.

Na maioria das espécies, a ativação do sistema SOD-CAT, primeira linha de defesa antioxidante, indica uma rápida resposta dos mecanismos de defesa. Porém, a exposição ao CIP diminuiu a capacidade oxidante do sistema SOD, inferindo uma inativação desse sistema enzimático por meio do aumento da produção de ERO. De forma a corroborar com o presente estudo, outros autores mostraram que o tratamento com enrofloxacin, fármaco também da classe das fluoroquinolonas, não promoveu alterações significativas na atividade da enzima SOD em camarões da espécie *Penaeus monodon*¹³⁴.

Os valores aumentados para a atividade da CAT nos tecidos hepáticos dos peixes, sob as concentrações de CIP de 1,0 μg L⁻¹ (7 dias) e 1,0 e 5,0 μg L⁻¹ (14 dias) indicam aumento da concentração de H₂O₂. Este aumento de H₂O₂ pode ser proveniente de outros meios reacionais além do sistema SOD, uma vez que a oxidação de ácidos graxos também leva à formação de H₂O₂¹¹⁸. Embora o peróxido

de hidrogênio seja pouco reativo frente às moléculas orgânicas na ausência de metais de transição, ele exerce papel importante no estresse oxidante por sua capacidade de atravessar as membranas celulares e gerar o radicalhidroxila¹³⁵.

Sistema de defesa antioxidante GPX, GSH e GST.

As enzimas glutathiona S-transferase (GST) e a glutathiona peroxidase (GPx) atuam em conjunto no processo antioxidante, utilizando a glutathiona reduzida (GSH) como co-fator¹³⁶.

Para a exposição de 7 dias, não houve alteração significativa da atividade da GST. No entanto, a exposição de 14 dias ocasionou o aumento de atividade nas concentrações de 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (FIGURA 2.4).

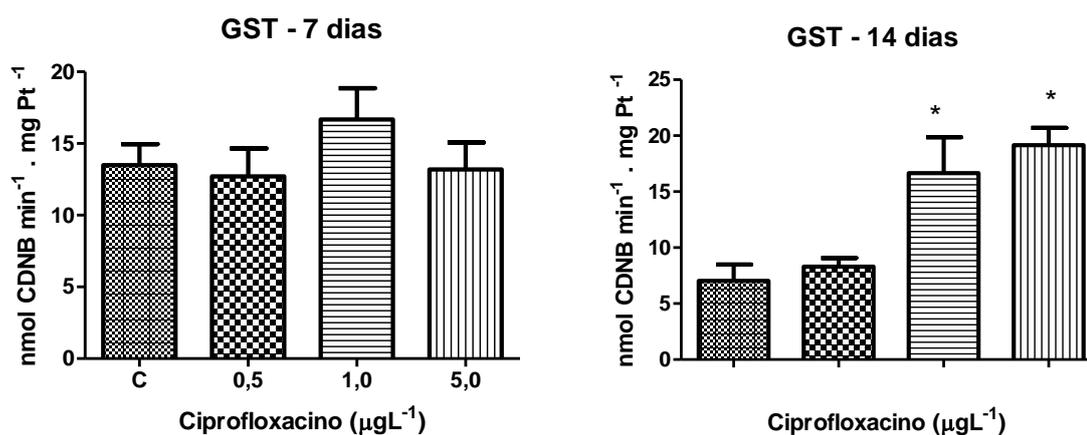


FIGURA 2.4: Atividade da GST em 7 e 14 dias de exposição ao CIP no fígado de tilápia (*O. niloticus*) do grupo controle (C) e grupos expostos a 0,5, 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. * Indica diferença estatística ($P > 0,05$) em relação ao controle. Valores médios e desvio padrão: 7 dias (Controle = 13,5 ± 4,63; 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ = 12,7 ± 5,52; 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = 16,7 ± 6,9; 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = 13,2 ± 5,63), 14 dias (Controle = 7,04 ± 4,60; 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ = 8,31 ± 2,037; 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = 16,6 ± 9,60; 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = 19,1 ± 4,88).

Nota-se um aumento maior do que 100% na atividade da GST nestas condições, o que demonstra um comportamento dose-dependente para o CIP sob maior tempo de exposição. NIE e colaboradores¹³⁷ relataram o mesmo comportamento na exposição de microalgas (*Pseudokirchneriella subcapitata*) a diferentes concentrações de eritromicina, ciprofloxacina e sulfametazol. Os resultados obtidos por estes autores mostraram que para todas as concentrações de CIP analisadas (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 mg L^{-1}) ocorreu um leve aumento na

atividade da GST, de forma dose-dependente, sugerindo a biotransformação da CIP levando à formação de metabólitos e posterior eliminação.

A atividade da GPx apresentou alterações significativas para a concentração de 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de CIP em ambos os tempos de exposição (FIGURA 2.5).

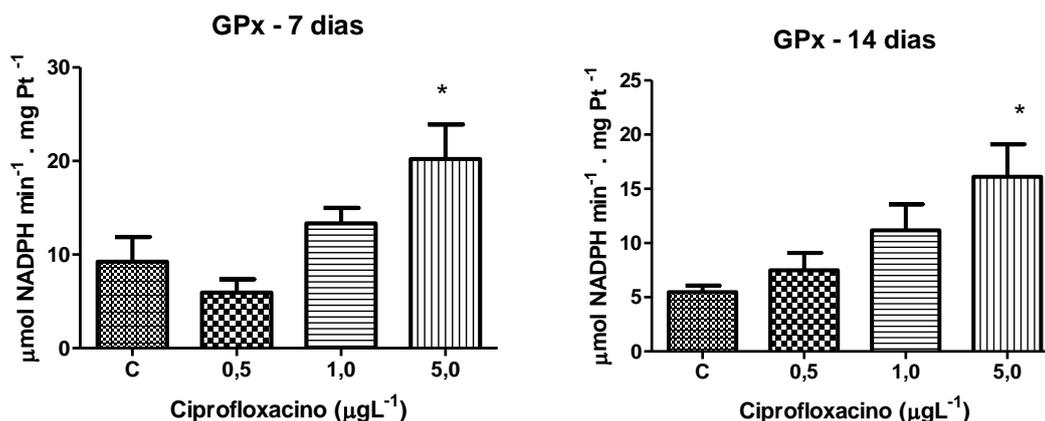


FIGURA 2.5: Atividade da GPx em 7 e 14 dias de exposição ao CIP no fígado de tilápia (*O. niloticus*) do grupo controle (C) e grupos expostos a 0,5, 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. * Indica diferença estatística ($P > 0,05$) em relação ao controle. Valores médios e desvio padrão: 7 dias (Controle = 9,25 ± 8,39; 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ = 5,94 ± 4,04; 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = 13,3 ± 4,96; 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = 20,2 ± 11,1), 14 dias (Controle = 5,46 ± 1,93; 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ = 7,50 ± 5,03; 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = 11,2 ± 7,25; 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = 16,1 ± 9,50).

Uma análise detalhada da FIGURA 2.5 demonstra um aumento da atividade da GPx de forma dose-dependente, independente do tempo de exposição. Assim como a CAT, a GPx atua na degradação do H_2O_2 , levando à formação de água e seus correspondentes alcoóis não tóxicos. Desta forma, o aumento da atividade desta enzima era esperado, já que a atividade da CAT no tecido hepático também aumentou nos peixes expostos ao CIP (1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) no mesmo período de exposição. Isso também foi observado por outros autores em um estudo com camarões da espécie *Penaeus monodon*²⁰ expostos à enrofloxacin. Desta forma, sugere-se que a indução da enzima GPx apresenta um importante papel na defesa antioxidante hepática de animais expostos ao CIP.

O sistema da GPx-GSH é muito importante para os mecanismos de defesa contra agentes oxidantes e na defesa contra xenobióticos.

A concentração de GSH alterou significativamente na exposição por 14 dias nas concentrações de 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, bem como a concentração de 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ na exposição por 7 dias.

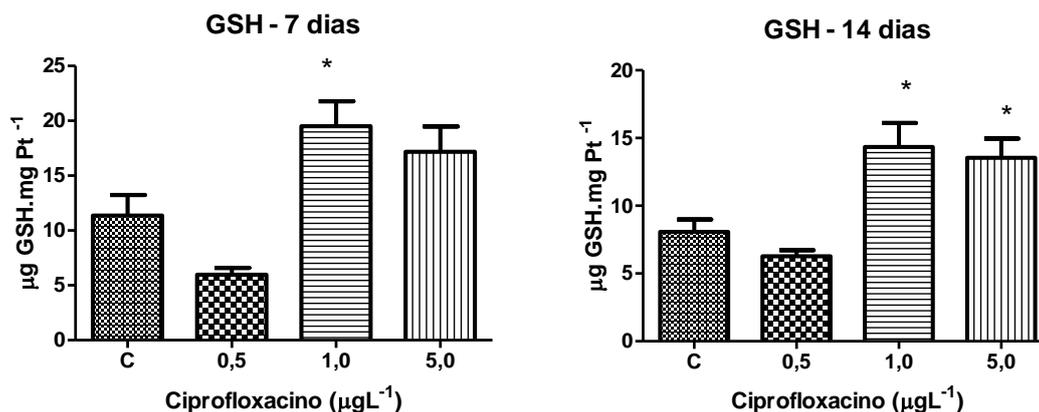


FIGURA 2.6: Concentração de GSH, em 7 e 14 dias de exposição ao CIP no fígado de tilápia (*O. niloticus*) do grupo controle (C) e grupos expostos a 0,5, 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. * Indica diferença estatística ($P > 0,05$) em relação ao controle. Valores médios e desvio padrão: 7 dias (Controle = $11,4 \pm 5,58$; 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $5,97 \pm 1,65$; 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $19,5 \pm 6,79$; 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $17,2 \pm 6,97$), 14 dias (Controle = $8,08 \pm 2,87$; 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $6,27 \pm 1,36$; 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $14,3 \pm 5,28$; 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $13,5 \pm 4,51$).

O aumento da concentração de GSH no fígado dos animais expostos parece ser necessário à manutenção das enzimas GPx e GST, cujas atividades estão aumentadas. Este perfil sugere interdependência funcional entre os sistemas de defesa GPx-GSH.

Níveis de hidróperóxido de cumeno na lipoperoxidação

A concentração da LPO no fígado das tilápias aumentou nos grupos de peixes expostos às concentrações de 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, tanto em 7 dias quanto em 14 dias de exposição ao fármaco, como mostra a FIGURA 2.7. Para 7 dias de exposição, este aumento foi de 81% para a concentração de 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Em 14 dias de exposição, o aumento foi de 81% e 135% para as concentrações de 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

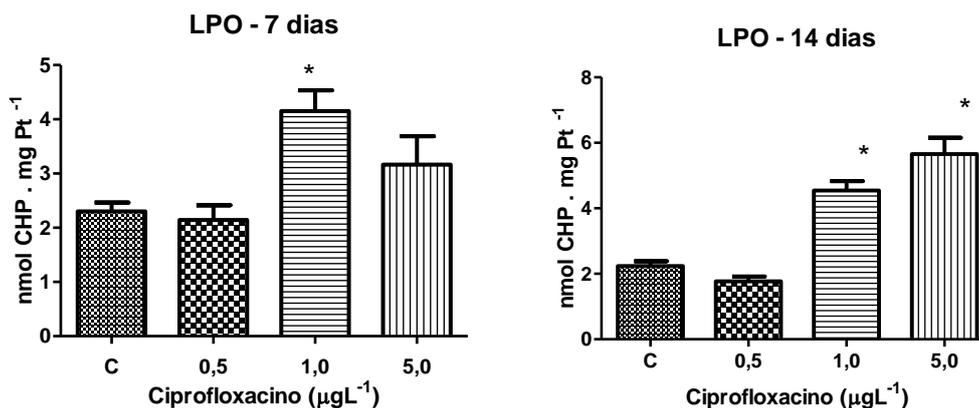


FIGURA 2.7. Concentração de hidroperóxido de cumeno (CHP) na peroxidação lipídica (LPO) em fígado de tilápia (*O. niloticus*), em 7 e 14 dias de exposição ao CIP do grupo controle (C) e grupos expostos a 0,5, 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. * Indica diferença estatística ($P > 0,05$) em relação ao controle. Valores médios e desvio padrão: 7 dias (Controle = $0,00185 \pm 0,0007059$; $0,5 \mu\text{g L}^{-1} = 0,00162 \pm 0,000815$; $1,0 \mu\text{g L}^{-1} = 0,0015 \pm 0,000530$; $5,0 \mu\text{g L}^{-1} = 0,00112 \pm 0,000640$), 14 dias (Controle = $0,0200 \pm 0,00667$; $0,5 \mu\text{g L}^{-1} = 0,0155 \pm 0,00723$; $1,0 \mu\text{g L}^{-1} = 0,0162 \pm 0,00517$; $5,0 \mu\text{g L}^{-1} = 0,0270 \pm 0,0116$).

Um dos efeitos nocivos em resposta ao estresse oxidante envolve a peroxidação de ácidos graxos insaturados presentes na membrana celular. A peroxidação lipídica induzida pelo aumento de espécies reativas de oxigênio afeta a integridade da membrana celular, ocasionando danos irreversíveis às funções celulares. No fígado das tilápias expostas às concentrações de 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de CIP, os níveis de CHP aumentaram, sugerindo que nesse grupo as defesas antioxidantes (CAT e GSH), apesar de estarem aumentadas, não foram eficientes em evitar que o dano celular ocorresse. NIE e colaboradores¹³⁷ relataram resposta semelhante quando da exposição de microalgas (*Pseudokirchneriella subcapitata*) a diferentes concentrações de eritromicina, ciprofloxacina e sulfametazol. Para as microalgas expostas ao ciprofloxacino, houve aumento da concentração de CHP em todas as concentrações analisadas, corroborando com os resultados obtidos no estudo aqui apresentado.

2.3.2 Alterações no sistema de defesa antioxidante em tecido branquial de tilápia (*O. niloticus*).

As brânquias atuam como órgão alvo dos peixes para os poluentes, por estarem em contato permanente com o ambiente aquático e apresentarem uma área

superficial muito grande. As brânquias exercem funções vitais como respiração, osmorregulação e excreção. Além disso, constituem o órgão de entrada e saída de contaminantes, e o local onde pode ocorrer reações de biotransformação de agentes tóxicos¹³¹.

Sistema de defesa antioxidante SOD-CAT

No presente estudo, a atividade da CAT não alterou significativamente nas brânquias dos animais expostos ao CIP por 7 e 14 dias (FIGURA 2.8).

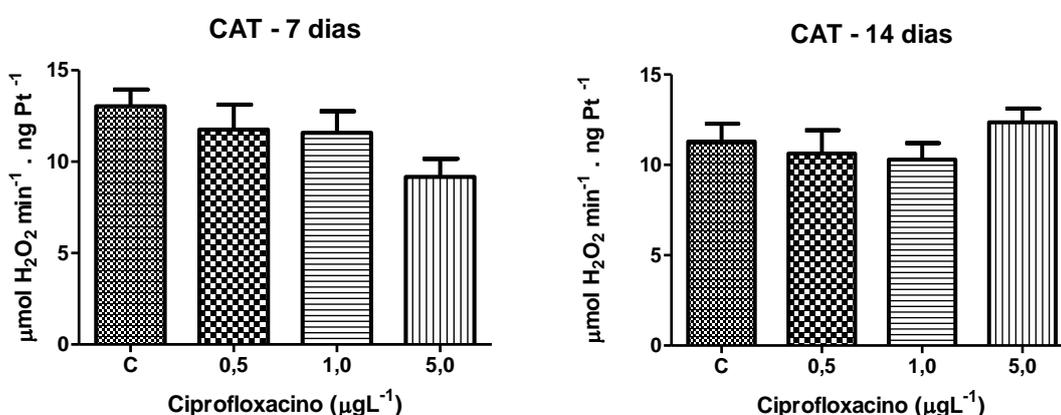


FIGURA 2.8: Atividade específica da CAT em brânquias de tilápia (*O. niloticus*) sem exposição (controle) e expostos por 7 dias à diferentes concentrações de CIP (0,5, 1,0 e 5,0 μg L⁻¹). Valores médios e desvio padrão: 7 dias (Controle = 13,0 ± 2,88; 0,5 μg L⁻¹ = 11,7 ± 3,87; 1,0 μg L⁻¹ = 11,6 ± 3,74; 5,0 μg L⁻¹ = 9,17 ± 3,13), 14 dias (Controle = 11,3 ± 3,13; 0,5 μg L⁻¹ = 10,6 ± 4,06; 1,0 μg L⁻¹ = 10,3 ± 2,91; 5,0 μg L⁻¹ = 12,3 ± 2,44).

A SOD apresentou aumento da atividade enzimática na exposição de 7 dias para todas as concentrações de CIP, sobretudo nas concentrações de 0,5 e 1,0 μg L⁻¹, as quais representaram aumento significativo, em valor de porcentagem quase o dobro (198 e 199%, respectivamente) da atividade do grupo controle (FIGURA 2.9). Entretanto, não houve qualquer alteração significativa para a exposição durante 14 dias, indicando assim uma possível resposta efetiva desse sistema no período de 7 dias. Este comportamento na atividade da SOD das brânquias indica o elevado poder antioxidante desse sistema neste tecido, a fim de neutralizar os impactos das espécies radicalares formadas pela exposição ao CIP.

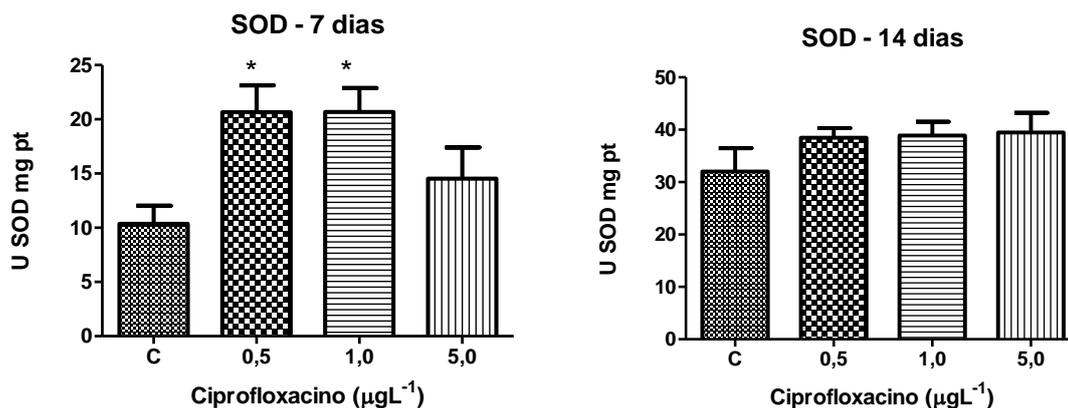


FIGURA 2.9: Atividade da SOD em brânquias de tilápia (*O. niloticus*) sem exposição (controle) e expostos por 7 dias à diferentes concentrações de CIP (0,5, 1,0 e 5,0 µg L⁻¹). * Indica diferença estatística ($P > 0,05$) em relação ao controle. Valores médios e desvio padrão: 7 dias (Controle = 10,4 ± 5,00; 0,5 µg L⁻¹ = 20,6 ± 6,97; 1,0 µg L⁻¹ = 20,7 ± 6,21; 5,0 µg L⁻¹ = 14,5 ± 8,58), 14 dias (Controle = 32,0 ± 13,3; 0,5 µg L⁻¹ = 38,5 ± 5,89; 1,0 µg L⁻¹ = 38,9 ± 8,27; 5,0 µg L⁻¹ = 39,5 ± 11,8).

Sistema de defesa antioxidante GPX, GSH e GST.

A FIGURA 2.10 apresenta as respostas de GSH e GPx em brânquias.

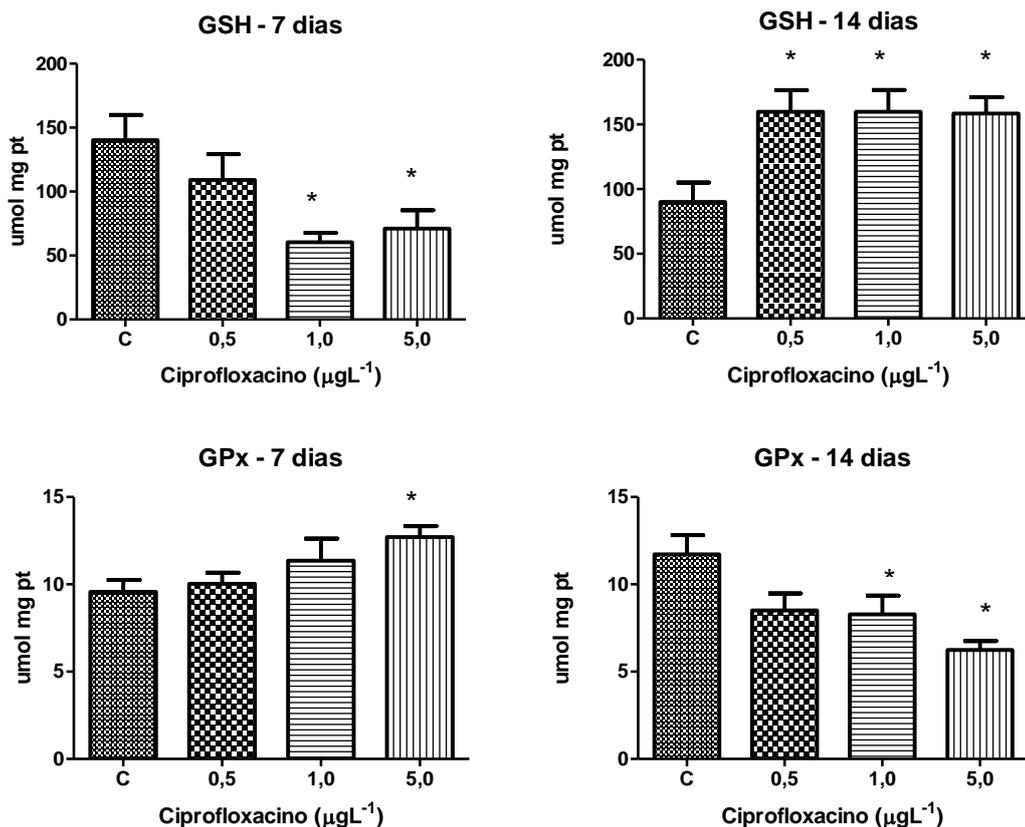


FIGURA 2.10: Concentração de GSH e atividade da GPx, em 7 e 14 dias de exposição ao CIP na brânquia de tilápia (*O. niloticus*) do grupo controle (C) e grupos expostos a 0,5, 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. * Indica diferença estatística ($P > 0,05$) em relação ao controle. Valores médios e desvio padrão para GSH: 7 dias (Controle = $140 \pm 59,0$; $0,5 \mu\text{g L}^{-1} = 109 \pm 56,7$; $1,0 \mu\text{g L}^{-1} = 60,4 \pm 22,1$; $5,0 \mu\text{g L}^{-1} = 71,1 \pm 43,3$), 14 dias (Controle = $90,1 \pm 45,0$; $0,5 \mu\text{g L}^{-1} = 160 \pm 50,1$; $1,0 \mu\text{g L}^{-1} = 160 \pm 47,4$; $5,0 \mu\text{g L}^{-1} = 158 \pm 38,2$). Valores médios e desvio padrão para GPx: 7 dias (Controle = $9,57 \pm 2,18$; $0,5 \mu\text{g L}^{-1} = 10,0 \pm 1,80$; $1,0 \mu\text{g L}^{-1} = 11,4 \pm 3,99$; $5,0 \mu\text{g L}^{-1} = 12,7 \pm 1,88$), 14 dias (Controle = $11,7 \pm 3,50$; $0,5 \mu\text{g L}^{-1} = 8,51 \pm 3,07$; $1,0 \mu\text{g L}^{-1} = 8,28 \pm 3,40$; $5,0 \mu\text{g L}^{-1} = 6,25 \pm 1,61$).

Houve aumento da atividade da GPx à concentração $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de CIP, seguida de diminuição da concentração da GSH no tecido branquial do peixes expostos à concentração $1,0$ e $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de CIP por 7 dias. Entretanto, quando expostos por 14 dias, observa-se um efeito oposto nas brânquias dos animais. Neste caso, houve diminuição da atividade da enzima GPx no tecido branquial do peixes expostos à concentração $1,0$ e $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$, seguida de um aumento das concentrações de GSH no mesmo tecido porém, em todas as condições de exposição.

Os dados apresentados para estes dois sistemas podem indicar os seguintes fenômenos:

- A exposição por período de 7 dias promoveu um possível aumento da concentração de H_2O_2 nas brânquias dos animais, induzindo a atividade da GPx,

que por sua vez causou um aumento da oxidação de GSH, o que justifica seus valores diminuídos.

- A exposição por 14 dias promoveu uma resposta positiva do sistema antioxidante nas brânquias dos animais, uma vez que os valores diminuídos da atividade da GPx, seguido de concentrações elevadas da GSH indicam que o sistema GPx/GSH foi efetivo na metabolização de H_2O_2 no tecido branquial dos animais sob exposição.

Para a GST, os resultados obtidos são mostrados na FIGURA 2.11:

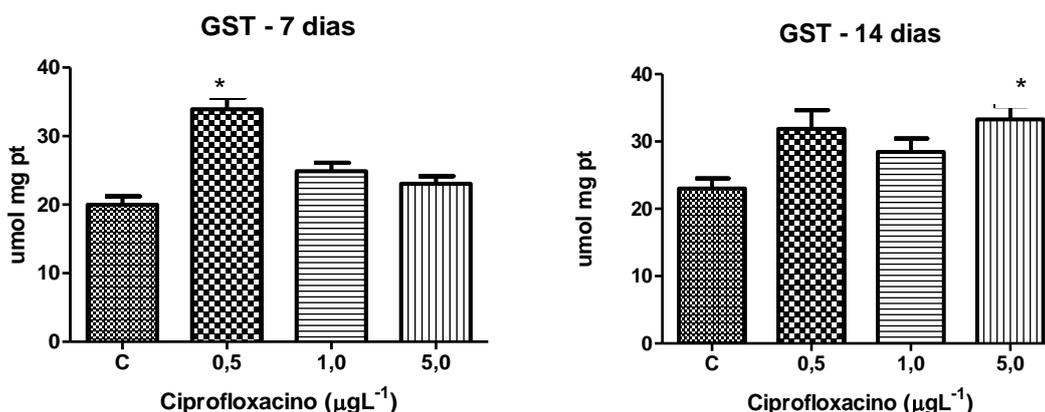


FIGURA 2.11: Atividade da GST em 7 e 14 dias de exposição ao CIP na brânquia de tilápia (*O. niloticus*) do grupo controle (C) e grupos expostos a 0,5, 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. * Indica diferença estatística ($P > 0,05$) em relação ao controle. Valores médios e desvio padrão: 7 dias (Controle = $20,0 \pm 3,90$; 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $33,9 \pm 4,81$; 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $24,9 \pm 3,61$; 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $23,1 \pm 3,46$), 14 dias (Controle = $23,0 \pm 4,51$; 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $31,9 \pm 8,24$; 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $28,4 \pm 5,66$; 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $33,3 \pm 5,85$).

Quando sob ação de xenobióticos, reações de conjugação por mediação da GSH ou a ação direta da GST podem ocorrer na tentativa de remoção destes compostos do organismo. A GST faz parte do sistema de desintoxicação do organismo. Neste estudo, o aumento da atividade da GST nos animais expostos à 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ por 7 dias e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ por 14 dias indicam que a conjugação com a GSH pode ser uma das vias de metabolização do CIP em tilápia¹³⁸.

Níveis de hidroperóxido de cumeno na lipoperoxidação

Os resultados referentes à concentração de hidroperóxido de cumeno no tecido branquial estão apresentados na FIGURA 2.12.

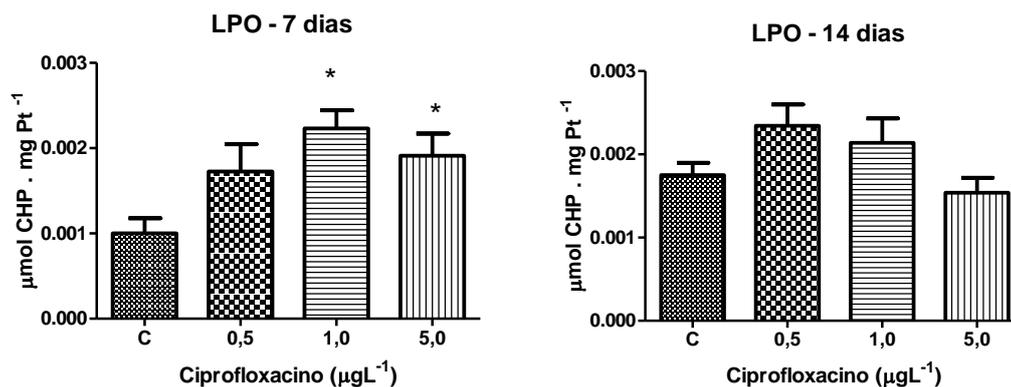


FIGURA 2.12: Peroxidação lipídica (LPO) em 7 e 14 dias de exposição ao CIP na brânquia de tilápia (*O. niloticus*) do grupo controle (C) e grupos expostos a 0,5, 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. * Indica diferença estatística ($P > 0,05$) em relação ao controle. Valores médios e desvio padrão: 7 dias (Controle = 0,0010 \pm 0,000562; 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ = 0,00172 \pm 0,000907; 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = 0,00223 \pm 0,000673; 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = 0,00191 \pm 0,000828), 14 dias (Controle = 0,00175 \pm 0,000472; 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ = 0,00234 \pm 0,000760; 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = 0,00214 \pm 0,000830; 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = 0,00154 \pm 0,000512).

Na FIGURA 2.12 pode-se observar um aumento de nas concentrações de hidroperóxido de cumeno nas brânquias dos peixes expostos as concentrações de 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de CIP por período de 7 dias, indicando assim peroxidação lipídica e estresse oxidativo. Entretanto, quando expostos por um período de 14 dias, os animais não apresentaram mudanças significativas nos valores de hidroperóxido de cumeno em tecidos branquiais, o que permite inferir que a resposta antioxidante foi bastante efetiva. Essa condição indica que a defesa antioxidante nas brânquias destes animais foi eficiente no combate às ERO ocorridas em 14 dias de exposição.

Muitas das alterações bioquímicas observadas nas brânquias foram mais pronunciadas que no fígado, em virtude da grande superfície de contato com o meio externo que estas possuem, e por serem os sítios primários de absorção e ação de xenobióticos em peixes.

2.3.3 Alterações no sistema de defesa antioxidante e na atividade da acetilcolinesterase em tecido muscular de tilápia (*O. niloticus*).

A TABELA 2.1 mostra os resultados obtidos para as atividades de todos os sistemas de defesa antioxidante avaliados em músculo de tilápia.

TABELA 2.1: Respostas das atividades para os sistemas SOD ($\text{U SOD mg proteína}^{-1}$), para as concentrações de GSH ($\mu\text{mol GSH mg proteína}^{-1}$), para as atividades da GST ($\mu\text{mol CDNB min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$), da GPx ($\mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$) e da concentração de LPO ($\mu\text{mol CHP mg proteína}^{-1}$) em músculo de tilápias expostas ao CIP em 7 e 14 dias. * Indica diferença estatística ($P > 0,05$) em relação ao controle. Valores representados por média \pm desvio padrão dos indivíduos ($n=10$ para cada grupo).

7 dias				
	Controle	$0,5 \mu\text{g L}^{-1}$	$1,0 \mu\text{g L}^{-1}$	$5,0 \mu\text{g L}^{-1}$
SOD	$4,84 \pm 0,77$	$6,09 \pm 0,81$	$3,56 \pm 0,21$	$4,49 \pm 0,52$
GSH	$1327 \pm 83,5$	$1119^* \pm 23,7$	$789,3 \pm 38,9$	$909,6 \pm 19,6$
GST	$1,12 \pm 0,15$	$1,07 \pm 0,13$	$0,67 \pm 0,067$	$1,27 \pm 0,16$
GPx	$0,14 \pm 0,018$	$0,10 \pm 0,010$	$0,075 \pm 0,016$	$0,11 \pm 0,027$
LPO	$6,95 \pm 0,39$	$7,68 \pm 1,07$	$4,76 \pm 0,31$	$5,74 \pm 0,43$
14 dias				
	Controle	$0,5 \mu\text{g L}^{-1}$	$1,0 \mu\text{g L}^{-1}$	$5,0 \mu\text{g L}^{-1}$
SOD	$4,78 \pm 0,27$	$5,79 \pm 0,83$	$5,13 \pm 0,75$	$4,55 \pm 0,65$
GSH	$747,6 \pm 70,2$	$689,3 \pm 109$	$737,2 \pm 94,8$	$639,3 \pm 59,6$
GST	$0,92 \pm 0,053$	$1,28 \pm 0,23$	$1,59 \pm 0,21$	$1,03 \pm 0,18$
GPx	$0,073 \pm 0,01$	$0,121 \pm 0,021$	$0,127 \pm 0,021$	$0,119 \pm 0,02$
LPO	$5,89 \pm 0,22$	$6,87 \pm 0,83$	$7,86 \pm 1,18$	$6,80 \pm 0,83$

Os dados da TABELA 2.1 mostram que não houve alterações significativas nas atividades das enzimas do sistema antioxidante em ambas as condições experimentais, bem como nas concentrações da GSH. Também não foi observado alterações significativas para os níveis de peroxidação lipídica. Isso significa que a exposição ao CIP possivelmente não promoveu aumento na concentração de ERO e na peroxidação lipídica no tecido muscular dos animais, indicando que o CIP não causou estresse oxidativo neste tecido.

Atividade da acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase (AChE), presente em tecidos muscular e nervoso de peixes, têm sido usada como biomarcador para monitorar os efeitos de neurotoxicidade¹²⁵. A principal função da AChE é a hidrólise da acetilcolina (ACh), mediadora das sinapses colinérgicas no sistema nervoso e vital para o funcionamento do sistema sensorial e neuromuscular¹³⁹.

Houve decréscimo da atividade da AChE do músculo dos peixes expostos ao CIP (FIGURA 2.13) na concentração de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ após 7 dias de exposição.

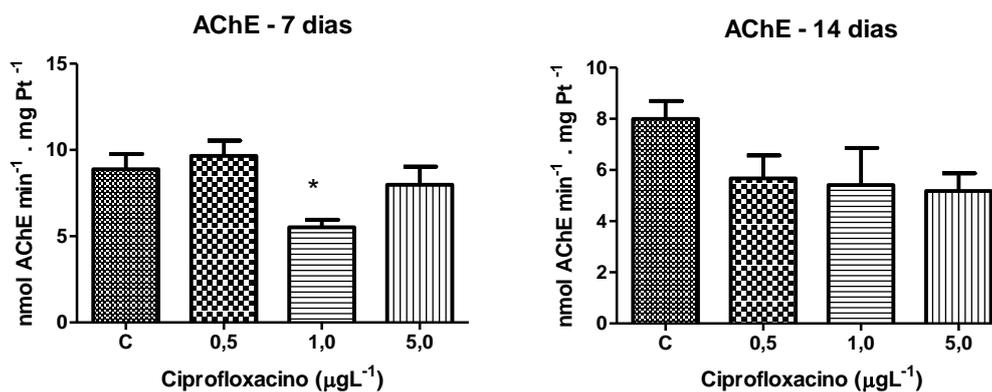


FIGURA 2.13: Atividade AChE, em 7 e 14 dias de exposição ao CIP no músculo de tilápia (*O. niloticus*) do grupo controle (C) e grupos expostos a 0,5, 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. * Indica diferença estatística ($P > 0,05$) em relação ao controle. Valores médios e desvio padrão: 7 dias (Controle = $8,88 \pm 2,84$; 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $9,65 \pm 2,50$; 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $5,52 \pm 1,30$; 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $7,98 \pm 3,32$), 14 dias (Controle = $7,99 \pm 2,10$; 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $5,67 \pm 2,83$; 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $5,41 \pm 4,58$; 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ = $5,17 \pm 2,20$).

Resposta semelhante foi obtida com a espécie *Pangasianodon hypophthalmus* após exposição ao fármaco enrofloxacino¹⁴⁰. O acúmulo de acetilcolina provoca hiperexcitação dos neurônios pós-sinápticos ou dos órgãos dependentes da ação sobre receptores nicotínicos da acetilcolina, principalmente os músculos. A inibição da atividade da AChE provoca hiperexcitabilidade de transmissão colinérgica, paralisando funções vitais do organismo, levando o indivíduo à morte¹⁴¹.

2.4 Conclusões

A exposição subletal por 7 e 14 dias ao fármaco CIP nas concentrações avaliadas induziram respostas tecido-específicas para os sistemas antioxidantes analisados, sendo o fígado e as brânquias os tecidos mais afetados pelo xenobiótico. O músculo do peixe não sofreu qualquer alteração significativa nas respostas bioquímicas analisadas.

No tecido hepático das tilápias, a exposição em curto prazo ao fármaco causou estresse oxidante, visto aumento dos níveis de lipoperoxidação. Os sistemas de defesa responsáveis pela degradação do peróxido de hidrogênio e espécies radicalares não foram efetivos neste tecido. Além disso, a indução da GST indica uma provável rota de metabolização da CIP nesta espécie de estudo.

Nas brânquias, a exposição ao CIP por 7 dias induziu estresse oxidante em tilápias. Mais uma vez, os principais sistemas de defesa antioxidante (SOD, CAT e GPx) não foram efetivos no combate às ERO. Já para a exposição de 14 dias, o sistema antioxidante GPx-GSH foi capaz de reverter o estresse oxidante causado pela exposição ao fármaco CIP, uma vez que os níveis de lipoperoxidação não foram significativamente diferentes do controle.

Embora o tecido muscular não tenha sofrido qualquer alteração significativa nas respostas dos sistemas antioxidantes, a exposição ao CIP promoveu inibição da acetilcolinesterase.

Capítulo 3

**Ensaio de biotransformação *in vitro*
utilizando frações S9 de truta
(*Oncorhynchus mykiss*)**

Ensaio de biotransformação *in vitro* utilizando frações S9 de truta (*O. mykiss*)

3.1 Introdução

Espectrometria de massas de alta resolução

Tradicionalmente, a análise quantitativa é considerada a mais importante aplicação da espectrometria de massas, tendo o uso de analisadores do tipo triplo quadrupolo os mais bem estabelecidos para este tipo de análise¹⁴². Algumas aplicações, como a análise de misturas complexas, requerem a utilização de espectrômetros de massa com alto poder de resolução, maior exatidão na determinação de massa acurada, alta sensibilidade e ampla faixa de dinâmica linear de concentração. Desta forma, espectrômetros de massa de alta resolução começaram a se tornar ferramentas fundamentais em análises que requerem identificação e elucidação estrutural de compostos desconhecidos em matrizes complexas, uma vez que possibilitam maior rapidez na aquisição de dados e capacidade de separar compostos isobáricos^{11,143}.

O analisador do tipo Orbitrap, introduzido por Makarov^{144,145}, é um sistema híbrido de armadilha de íons linear acoplado a um Orbitrap (LTQ-Orbitrap – FIGURA 3.1). Este tipo de analisador possibilita um elevado poder de resolução (>150000), e exatidão de massas com erros menores do que 1-2 ppm.

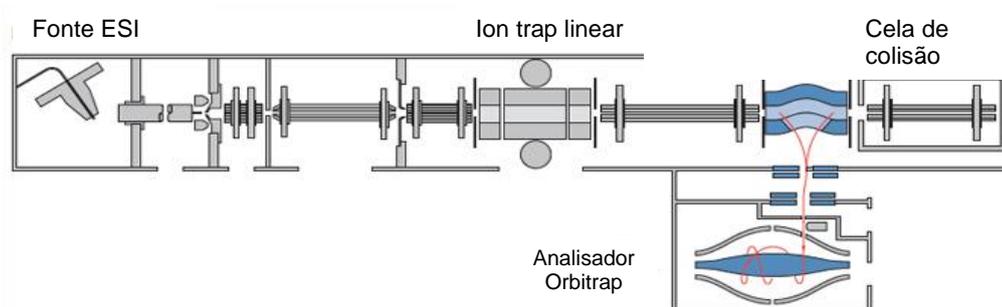


FIGURA 3.1: Esquema do analisador de massas do tipo Orbitrap, modelo LTQ Orbitrap XL – Thermo Fisher (Adaptada de MAKAROV, 2006¹⁴⁴).

O Orbitrap funciona como uma armadilha de íons tridimensional, retendo íons radialmente em um eletrodo interno axial e outro eletrodo externo coaxial em formato de barril, mantidos a um vácuo maior que 3×10^{-10} torr. Um potencial elétrico constante é aplicado entre dois eletrodos axissimétricos, sem a ação de nenhum outro campo magnético ou potencial elétrico oscilante¹⁴².

A introdução de íons no interior do Orbitrap é realizada a partir de quantidades mínimas, e seguem uma órbita circular em torno do eletrodo central. Uma vez que a massa dos íons e o raio da órbita não possuem qualquer dependência, os íons são retidos radialmente no Orbitrap. Assim, a frequência das oscilações harmônicas dos íons retidos em órbita ao longo do eixo do campo eletrostático independe da velocidade do íon, e inversamente proporcional à raiz quadrada da relação massa carga, e assim a armadilha pode ser operada como um analisador de massas. As frequências das oscilações são registradas por um detector como imagens da velocidade axial dos íons, e o sinal é convertido por transformada de Fourier em um espectro de massas de alta resolução^{143,146}.

Um dos benefícios do uso do Orbitrap é a capacidade de quantificação por meio de experimentos no modo de aquisição completa dos dados (*full scan*), também conhecido como modo de varredura total de íons. Desta forma, todos os íons presentes na amostra podem ser detectados, e os espectros de massa são obtidos em valores de massa exata para cada íon detectado, possibilitando a separação e identificação de compostos isobáricos. Além disso, durante o processamento de dados, a amostra pode ser reanalisada na busca por informações adicionais, como metabólitos, biomarcadores, compostos de degradação, etc¹⁴⁷, excluindo a necessidade de reinjeção de uma mesma amostra.

Além do modo de aquisição completa de dados, experimentos adicionais podem ser realizados a fim de se obter maiores detalhes na identificação estrutural de compostos desconhecidos. Desta forma, diferentes experimentos de MS/MS são possíveis com o modo de aquisição dependente de dados (DDA – *data-dependent acquisition*). Deste modo, um número de íons é selecionado de acordo com parâmetros pré- definidos para íons precursores, e assim são conduzidos a um experimento de fragmentação sequenciada. Ambos os espectros de *full scan* e DDA são obtidos na mesma análise, combinando informações qualitativas e quantitativas, além de promoverem um aumento da seletividade e sensibilidade do método analítico¹⁴³.

O Orbitrap tornou-se uma opção poderosa para a análise de amostras complexas, promovendo alta seletividade e maior confiança em análises de rotina. Devido ao desempenho analítico tem sido usado para ampla gama de aplicações envolvendo, por exemplo, identificação de compostos a níveis traço, em proteoma, controle de doping, detecção de contaminantes em alimentos, metabolismos de fármacos, entre outras¹⁴⁵.

Biotransformação in vitro em organismos aquáticos

Um fator que está intimamente ligado à bioacumulação de fármacos é a propensão destes à biotransformação. Uma vez que o fármaco é biotransformado, sua acumulação no tecido tende a se reduzir. A biotransformação depende de alguns fatores, como quantidade de lipídios no organismo, hidrofobicidade do composto e atividade das enzimas metabolizadoras. Mas a principal preocupação é se a biota aquática é capaz de metabolizar significativamente estes xenobióticos^{2,3,148,149}.

Pouco se sabe a respeito de rotas de biotransformação em várias espécies de peixes. Em contrapartida, estudos realizados mostram que é possível avaliar rotas metabólicas em organismos aquáticos baseados na informação já descrita sobre farmacocinética em mamíferos^{88,150}. Estudos de depleção de substratos *in vitro* utilizando tecidos de fígado vêm sendo realizados com sucesso para avaliar as taxas de biotransformação de fármacos em peixes. Além disso, este tipo de ensaio é de rápida realização, boa relação custo-benefício, e os resultados dão suporte para a avaliação de riscos ambientais¹⁵¹.

GOMES e colaboradores¹⁵² realizaram estudos de biotransformação *in vitro* de alguns fármacos, entre eles o ibuprofeno e o propranolol, a fim de obter informações a respeito do potencial metabólico de duas espécies de peixes (*Oncorhynchus mykiss* e *Ictalurus punctatus*). Os resultados mostraram que os peixes são capazes de metabolizar diversos fármacos prescritos para terapêutica humana, além de fornecer informações iniciais sobre as rotas metabólicas de xenobióticos, baseados em estudos já estabelecidos para seres humanos.

Muitos processos fisiológicos importantes, como biossíntese e metabolização de xenobióticos, sofrem ação das enzimas da família do citocromo P450¹⁵³. Os produtos da biotransformação por estas enzimas são relativamente

hidrofílicos, podendo até sofrer outras reações levando a conjugados ainda mais polares, os quais são facilmente excretados pelo organismo. Imaginava-se que os peixes não possuíam tais enzimas, mas estudos realizados mostraram que estas estão presentes nos fígados de alguns peixes, bem como várias isoformas desta superfamília de enzimas¹³¹.

Deste modo, o peixe pode possuir um citocromo capaz de catalisar reações normalmente associadas a um citocromo específico presente em seres humanos. Portanto, é importante determinar se os peixes e os seres humanos possuem atividades metabólicas semelhantes, e assim proporcionar uma base para a previsão do metabolismo dos peixes a partir de dados de metabolismo humano. A investigação destes perfis de biotransformação é importante para o entendimento da capacidade, semelhanças e diferenças entre as espécies de peixes.

O metabolismo hepático de xenobióticos em peixes vem sendo estudado utilizando diversos sistemas de ensaio *in vitro*, como hepatócitos, frações subcelulares (microssomas e frações S9), e sistemas de enzimas recombinantes¹²⁰. Particularmente, a fração S9 de fígado é um atrativo, pois é de fácil preparação e manuseio, e contém tanto as enzimas da fase citosólica quanto microssomais. Esta fração contém as enzimas envolvidas no metabolismo de fase I (CIPs) e fase II (como sulfotransferase, uridina difosfato-glucuronosiltransferase, glutationa S-transferase) de xenobióticos. Estas características tornam o sistema S9 uma boa escolha para estudos destinados a avaliar a taxa de depuração hepática de peixe, principalmente se as enzimas responsáveis pelo metabolismo de uma determinada substância são desconhecidos. Embora a fração S9 tenha sido assim chamada considerando a velocidade de centrifugação (9000 g) utilizada na sua preparação, pesquisas recentes têm empregado velocidades de centrifugação mais elevadas, a fim de se obter um homogeneizado com maior pureza¹⁵⁴.

Fármacos na aquicultura

Os atuais sistemas de produção de peixes estão representados, em sua maioria, por sistemas de criação intensivos. Nesses sistemas, os animais são expostos constantemente ao manuseio excessivo, transporte, altas densidades de estocagem, variações na qualidade da água, além de dependerem de uma dieta artificial como única fonte de alimento. Essas práticas de manejo induzem ao

estresse, com consequentes perdas na produção devido à diminuição no ganho de peso e na imunidade, que aumenta a susceptibilidade a doenças¹⁵⁵.

Um dos maiores problemas em aquicultura são a ocorrência de parasitas e bactérias, e acarretam perdas na produção e produtividade, muitas vezes devido ao retardo do crescimento dos peixes e a alta mortalidade¹⁵⁶. Em função da elevada ocorrência de doenças, o uso de produtos quimioterápicos e antibióticos tem aumentado nesses sistemas de criação intensiva¹⁵⁷. Além disso, muitas vezes, esses compostos químicos são utilizados de forma errônea, com doses erradas e produtos que eram para combater uma doença são utilizados para combater outra. O uso excessivo de antibióticos na aquicultura pode impactar negativamente a saúde dos peixes e do homem, assim como o ambiente aquático, como o aumento da resistência bacteriana e sua disseminação no ambiente.

Existem hoje vários antibióticos utilizados no controle de doenças bacterianas em pisciculturas no mundo todo¹⁵⁸. Dentre eles, alguns são comumente utilizados, como oxitetraciclina e florfenicol. Dentre estes, somente o uso do florfenicol é permitido no Brasil¹⁵⁶. Outros fármacos também são comumente utilizados, como enrofloxacino, da classe das fluoroquinolonas, e sulfadimetoxina, da classe das sulfonamidas^{158,159}. Apesar de não ser um antibiótico, a trimetoprima é amplamente utilizada em associação com outros antibióticos, principalmente da classe das sulfonamidas, como sulfadiazina¹⁶⁰. A FIGURA 3.2 mostra as estruturas químicas dos fármacos utilizados em pisciculturas selecionados para o presente estudo de biotransformação.

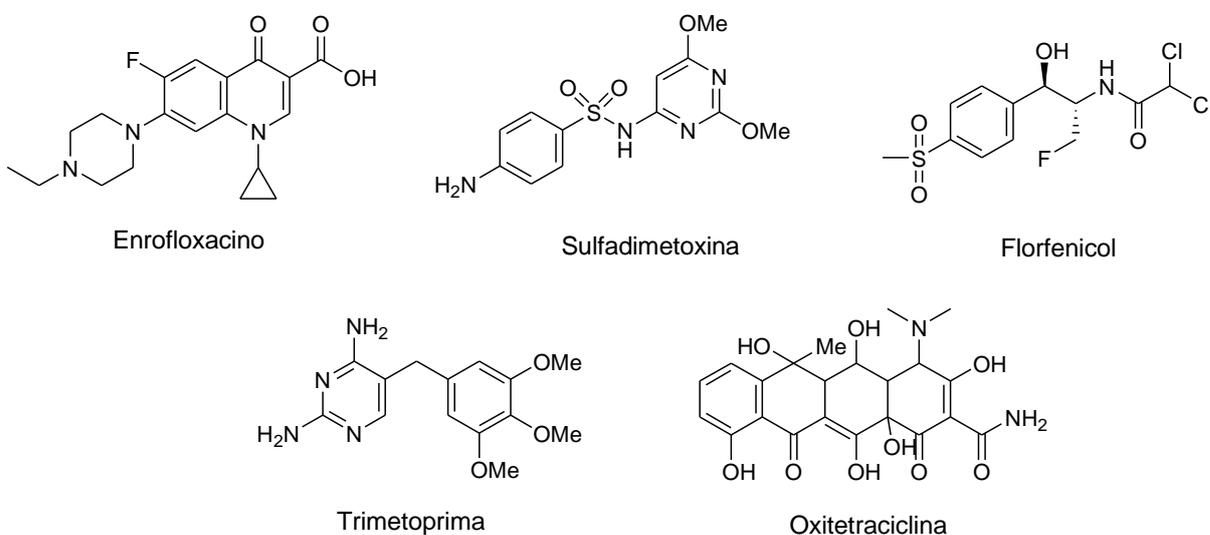


FIGURA 3.2: Estrutura dos fármacos utilizados em pisciculturas selecionados para o estudo de biotransformação *in vitro*.

A truta (*Oncorhynchus mykiss*) é um dos peixes mais utilizados como modelo para diversos estudos toxicológicos^{120,161-163}. Diversos protocolos para ensaios *in vitro* foram desenvolvidos para trutas, e podem ser facilmente adaptados para outras espécies, desde que sejam consideradas as especificidades entre as espécies (manutenção do peixe em cativeiro, temperatura fisiológica)¹⁵⁴.

3.2 Objetivos

Objetivo geral

Avaliação dos processos de biotransformação *in vitro* utilizando frações S9 de fígado de truta (*O. mykiss*) para diferentes fármacos por LC-MS/MS e identificação de metabólitos.

Objetivos específicos

Desenvolvimento de um método por LC-MS/MS, para a análise dos fármacos propranolol (PRO), diclofenaco (DCF), enrofloxacino (ENR), florfenicol (FLO), trimetoprima (TMP), oxitetraciclina (OXI) e sulfadimetoxina (SDT).

Ensaio de incubação *in vitro* utilizando frações S9 de fígado de truta para a avaliação da biotransformação dos fármacos selecionados.

Utilização da espectrometria de massas de alta resolução para identificação de produtos de biotransformação *in vitro*.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Verificação do método de LC-MS/MS

Para todos os fármacos analisados, as curvas de calibração foram lineares, com coeficiente de correlação $r \geq 0.990$. Os dados de precisão e exatidão intra e inter-lotes estão representados na TABELA 3.1. Precisão e exatidão foram determinadas analisando duas replicatas de uma amostra controle de qualidade, com concentração intermediária à faixa de concentração da curva analítica. Os

resultados de precisão estão expressos em função do CV, e estão de acordo com o critério estabelecido para a verificação do método¹⁶⁴.

TABELA 3.1: Linearidade, precisão, exatidão, recuperação e LD do método analítico.

Composto	Equação	r^2	Faixa ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Exatidão (%)	Precisão CV (%)	Recuperação (%)	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)
ENR	$y = 0,196x + 0,001$	0,999	3 - 1000	101	0,20	83,4	0,626
DCF	$y = 0,767x - 0,008$	0,999	5 - 1000	92,4	13,7	85	0,603
FLO	$y = 1,051x + 0,049$	0,997	20 - 1000	92	4,4	59,2	4,17
OXY	$y = 2,401x - 0,013$	0,999	25 - 1000	93,1	2,1	93,7	4,25
PRO	$y = 4,034x - 0,020$	0,999	10 - 1000	94,9	2,2	91	1,38
SDT	$y = 0,8171x - 0,001$	0,999	5 - 1000	99,9	1,3	81,3	1,55
TRI	$y = 0,5856x + 0,061$	0,999	15 - 1000	96,3	4,3	90,4	2,82

Considerando a utilização do Orbitrap, um analisador de massas de alta resolução, somente a massa exata do íon precursor foi monitorada e utilizada para a quantificação de cada analito. A TABELA 3.2 mostra a precisão, indicado pelo erro (unidades de ppm) entre as massas exatas e massas medidas para cada composto.

TABELA 3.2: Valores de massa exata, fórmula molecular e precisão dos fármacos analisados

Composto	Polaridade	Fórmula molecular	Massa exata	Massa medida	Erro (ppm)
ENR	+	$\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{FN}_3\text{O}_3$	360,17179	360,17236	1,565
DCF	-	$\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{NO}_2$	294,00831	294,00755	-6,317
FLO	-	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{FNO}_4\text{S}$	355,99209	355,99093	3,255
OXY	+	$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_9$	461,15546	461,15646	-0,203
PRO	+	$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{NO}_2$	260,16450	260,16479	-1,094
SDT	+	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$	311,08085	311,08142	-1,700
TMP	+	$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3$	291,14517	291,14545	0,972

O limite de detecção foi calculado, considerando uma relação de sinal-ruído >3 . O baixo erro entre massa exata e massa medida possibilitou a quantificação de todos os compostos selecionados com uma exatidão analítica bem definida. O método atingiu uma boa seletividade, e está apto para ser aplicado para a triagem e identificação de metabólitos em ensaios de biotransformação *in vitro*.

3.3.2 Incubações das frações S9

Propranolol e diclofenaco

A depleção de fármacos por peixes deve ser avaliada a fim de determinar o tempo necessário para o composto ser eliminado do tecido do animal e determinar com segurança quando o peixe pode ser consumido¹⁶⁵.

Uma etapa importante para a avaliação do metabolismo dos fármacos é a comparação do *clearance* intrínscio (CL_{INT}) de substratos bem conhecidos para seres humanos e que já possuem estudos bem estabelecidos para truta¹⁴. Assim, atendendo a esses requisitos, selecionaram-se os fármacos propranolol e diclofenaco.

O propranolol é substrato das CIP 1A2 e 2D6 em seres humanos. Esperava-se alta taxa de CL_{INT} , uma vez que já foi demonstrada a atividade da CIP da família 1A em frações S9 de trutas¹⁶⁶. GOMEZ e colaboradores¹⁶⁷ empregaram a técnica de depleção do substrato para medir o metabolismo do propranolol em frações S9 de brânquias e fígado de truta (*Oncorhynchus mykiss*) e bagre (*Ictalurus punctatus*). O CL_{INT} determinado para fígado de truta foi de 0,3 a 0,5 mL/hr/mg de proteína. No presente trabalho, o resultado obtido foi de 0,43 mL/hr/mg de proteína, portanto em acordo com os valores da literatura. A FIGURA 3.3 mostra o gráfico do perfil de biotransformação para o PRO.

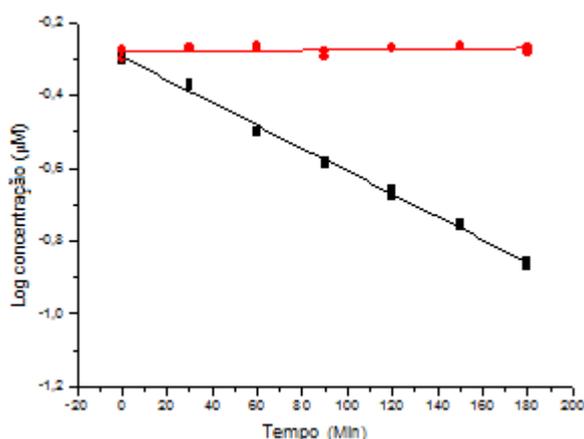


FIGURA 3.3: Depleção da concentração do propranolol em fração S9 de fígado de truta (*O. mykiss*). Vermelho: S9 inativa; preto: S9 ativa (n=2 para cada medida).

O DCF é também substrato para a CIP-2C9 em seres humanos. Neste estudo, DCF apresentou uma modesta taxa de CL_{INT} (0,18 mL/h/g proteína) (FIGURA 3.4). Estudos reportados na literatura demonstraram que a biotransformação do DCF em larvas de zebrafish (*Danio rerio*) resultava em produtos de reações de hidroxilação. Adicionalmente, já foram observados metabólitos de fase I e II do DCF em experimentos de metabolismo *in vivo* com trutas juvenis^{168,169}. Uma vez que frações S9 de fígado contêm as enzimas de fase I e II de biotransformação, não é possível atribuir a depleção observada para o DCF a nenhuma enzima específica da fração S9.

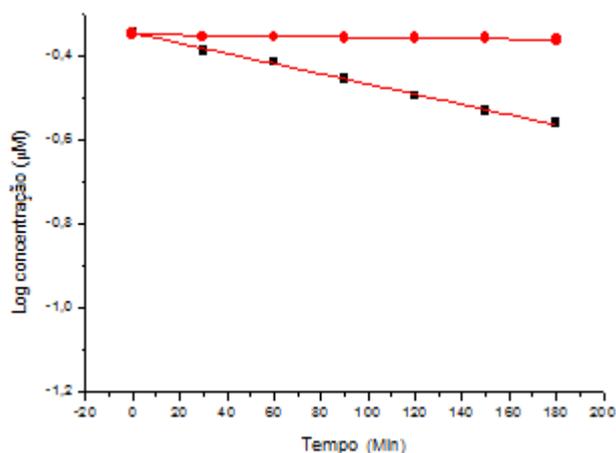


FIGURA 3.4: Depleção da concentração do diclofenaco em fração S9 de fígado de truta (*O. mykiss*). Vermelho: S9 inativa; preto: S9 ativa (n=2 para cada medida).

Embora os ensaios de depleção dos fármacos com frações S9 de fígado não forneçam informações que possam levar a identificação das enzimas responsáveis pela biotransformação, estes dados indicam que o fígado de truta possui maquinaria enzimática capaz de metabolizar estes fármacos.

Enrofloxacino

O perfil de depleção do ENR (FIGURA 3.5) mostra que não houve diminuição significativa do substrato ($P > 0,05$).

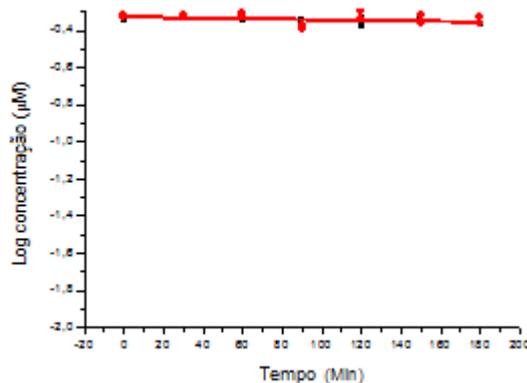


FIGURA 3.5: Depleção da concentração do enrofloxacin em fração S9 de fígado de truta (*O. mykiss*). Vermelho: S9 inativa; preto: S9 ativa (n=2 para cada medida).

Os estudos relatados para este fármaco já reportados na literatura mostram ensaios realizados em sistemas *in vivo*. LUCCHETTI e colaboradores¹⁶⁵ observaram que uma baixa taxa de depleção do ENR em truta (*O. mykiss*). Neste estudo, os peixes foram tratados com ração fortificada com ENR (10 mg por kg de truta por dia), e mantidos em cativeiro em uma piscicultura. Os resultados obtidos mostraram ainda que o tempo de eliminação do fármaco era muito maior do que o sugerido pela legislação, e que tecidos comestíveis de truta ainda podiam conter 0,17 mg de ENR por quilo, o que é um valor alto considerando o valor máximo permitido para resíduos farmacêuticos em geral, de acordo com a legislação italiana (0,10 mg kg⁻¹)¹⁶⁵. Em outro estudo, KOC e colaboradores¹⁷⁰ avaliaram a farmacocinética do ENR após a administração intravenosa e oral em truta marrom (*Salmo trutta fario*). A meia-vida de eliminação foi maior em comparação com mamíferos e espécies de aves. No entanto, o perfil cinético foi semelhante a outras espécies de peixes. Os estudos em espécies como robalo (*Dicentrarchus labrax*)¹⁷¹, bagre (*Ictalurus punctatus*)¹⁷², pacu (*Piaractus mesopotamicus*)¹⁷³ e dourada (*Sparus aurata L.*)¹⁷⁴ relataram uma taxa de biotransformação *in vivo* lenta, o que está em conformidade com os resultados dos ensaios *in vitro* aqui apresentados.

Florfenicol

O perfil farmacocinético do FLO em frações S9 de fígado de truta é mostrado na FIGURA 3.6. A redução da concentração do substrato nas amostras ativas de S9 também não foi significativa ($P > 0,05$), quando comparado com amostras inativas.

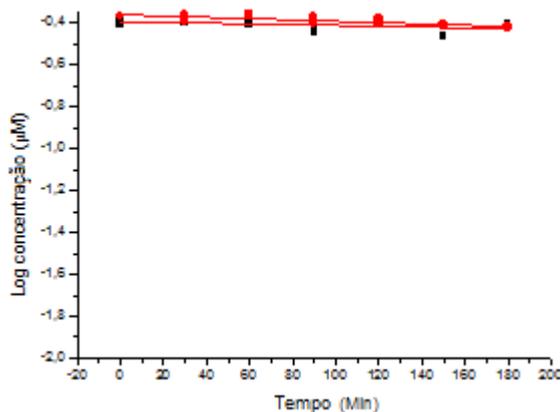


FIGURA 3.6: Depleção da concentração do florfenicol em fração S9 de fígado de truta (*O. mykiss*). Vermelho: S9 inativa; preto: S9 ativa (n=2 para cada medida).

Os estudos da literatura sobre farmacocinética e que investigam a absorção e eliminação da FLO em várias espécies de peixes têm observado um lento tempo de decaimento, seguindo abordagem *in vivo*. DI SALVO e colaboradores¹⁷⁵ avaliaram a depleção de FLO e seu principal metabólito, florfenicol amina, a partir do tecido de peixes das espécies *O. mykiss* e *Spatus aurata L.* após o tratamento com alimentos fortificados com o medicamento. Concentrações de metabólito ativo foram detectadas no músculo de trutas em 24 h pós-tratamento, o que significa uma biotransformação lenta do substrato. SAMUELSEN e colaboradores¹⁷⁶ avaliaram o perfil farmacocinético de FLO no plasma, fígado e músculo de bacalhau (*Gadus morhua*), após administração intravenosa e oral. A alta meia-vida do fármaco nesta espécie (43 h) implica em elevado tempo de desaparecimento no tecido do peixe. Este resultado sugere uma deficiência enzimática, o que aumenta o tempo de residência do FLO no bacalhau.

Em relação aos resultados relatados no presente estudo, é correto deduzir que a truta pode ter a mesma incapacidade enzimática para metabolizar o FLO, notado pela insignificante taxa de depleção. Vale ressaltar que este fármaco é um dos poucos registrados, juntamente com a oxitetraciclina, para uso em aquicultura no Brasil.

Sulfadimetoxina

As sulfonamidas são uma grande classe de compostos bacteriostáticos sintéticos, e são amplamente utilizados em aquicultura. Este agente terapêutico tem

sido mostrado para ser eficaz no tratamento de infecções bacterianas em peixes, e a sua utilização em aquicultura é recomendada no mundo todo¹⁷⁷. Apesar disso, existem estudos sobre a farmacocinética e metabolismo de sulfonamidas em peixes. Estudos *in vitro* do efeito da SDT em peixes são ainda mais escassos.

Os resultados encontrados para o SDT foi uma taxa de depleção não significativa ($P > 0,05$) (FIGURA 3.7) e estão em conformidade com o trabalho de BAKAL e colaboradores¹⁷⁸ sobre a farmacocinética *in vivo* da SDT e em associações com outros fármacos em peixes de espécie híbrida (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). Em sistemas *in vivo*, os tempos de meia-vida da SDT para administração intraperitoneal e oral foram de 26 e 10,5 horas, respectivamente. Segundo os autores que reportaram este comportamento farmacocinético, este efeito foi provavelmente devido lenta absorção da SDT, resultando numa diminuição aparente da taxa de eliminação^{177,179}.

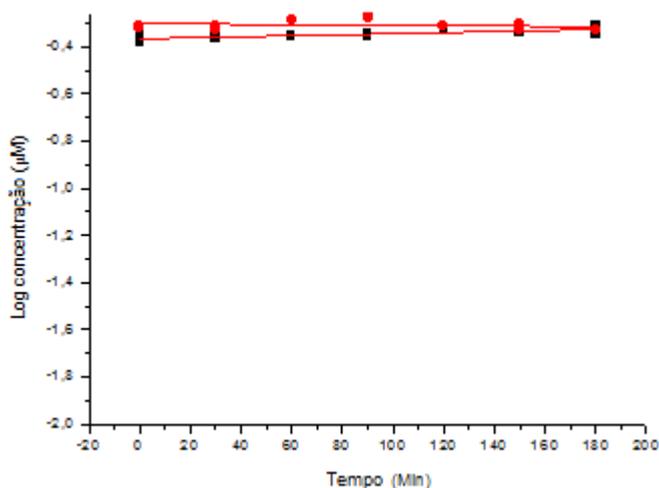


FIGURA 3.7: Depleção da concentração da sulfadimetoxina em fração S9 de fígado de truta (*O. mykiss*). Vermelho: S9 inativa; preto: S9 ativa (n=2 para cada medida).

Em um estudo *in vivo* com truta (*O. mykiss*), UNO e colaboradores¹⁸⁰ avaliaram a farmacocinética da SDT após a administração oral, através de experimentos de depleção em tecido. A análise do fígado do animal mostrou elevado tempo de meia-vida (68 h), o que significa uma taxa de eliminação lenta. No entanto, o metabolito N-acetilado foi encontrado no fígado com uma hora após a administração.

No presente estudo, a SDT não sofreu metabolização significativa após 180 minutos de incubação *in vitro*. Mesmo em peixes da mesma espécie, o perfil farmacocinético *in vivo/in vitro* de um fármaco pode alterar dependendo das condições experimentais as quais foram submetidos, como concentração analítica do fármaco e sua entrada no organismo (via oral, intraperitoneal, ou alimentação), bem como o tempo de incubação/exposição⁴⁴.

Oxitetraciclina

OXI é o principal membro do grupo das tetraciclinas usadas na aquicultura. Seu uso terapêutico tem ganhado um interesse especial em criações de animais, devido ao seu amplo espectro e baixo custo em relação a outros agentes antimicrobianos¹⁸¹.

Para o presente estudo, o perfil farmacocinético da OXI em frações S9 de fígado de truta é mostrado na FIGURA 3.8. Mais uma vez, nota-se que não houve decaimento significativo ($P > 0,05$) da concentração do substrato quando comparado com a incubação feita com amostras de S9 inativas.

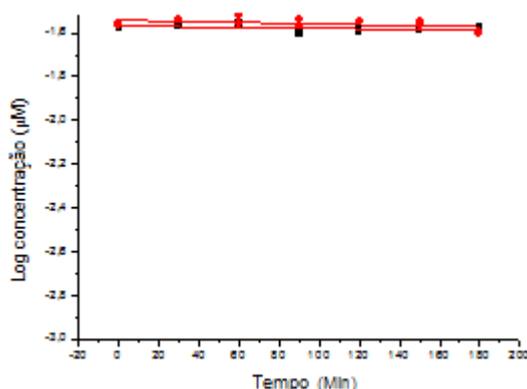


FIGURA 3.8: Depleção da concentração da oxitetraciclina em fração S9 de fígado de truta (*O. mykiss*). Vermelho: S9 inativa; preto: S9 ativa (n=2 para cada medida).

Estudos realizados por ABEDINI e colaboradores¹⁸² demonstram a farmacocinética e biodisponibilidade *in vivo* da OXI em truta (*O. mykiss*) e salmão (*Oncorhynchus tshawytscha*). Os resultados comparativos entre ambas as espécies indicaram uma eliminação lenta do fármaco, o que é notado pelo elevado tempo de meia-vida de eliminação (88,3 h para salmão e 94,2 h para truta). Outras

observações da literatura¹⁸³⁻¹⁸⁶, relacionados à estimativa de regimes de dosagem e períodos de abstinência seguras para peixes criados em cativeiros, relataram perfil farmacocinético semelhante aos resultados obtidos *in vitro* no presente estudo.

Trimetoprima

TMP é um fármaco comumente utilizado na medicina humana e na aquicultura. O perfil farmacocinético *in vitro* de TMP em frações S9 de fígado de truta é mostrado na FIGURA 3.9. Neste caso, observou-se uma resposta significativa ($P < 0,05$) para o decaimento do substrato nas frações S9 ativas.

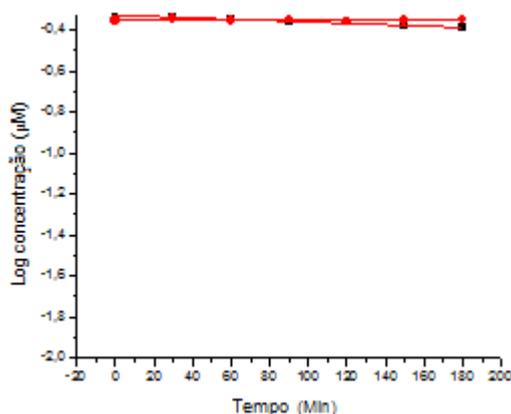


FIGURA 3.9: Depleção da concentração da trimetoprima em fração S9 de fígado de truta (*O. mykiss*). Vermelho: S9 inativa; preto: S9 ativa (n=2 para cada medida).

Foi observada uma baixa taxa de decaimento de substrato, e o CL_{INT} obtido para TMP foi de 0,051 mL/hr/mg de proteína, que representa um valor 8 vezes menor que o CL_{INT} obtido para o PRO e cerca de 3 vezes menor que o obtido para o DCF, no presente estudo *in vitro*.

Existem poucos dados farmacocinéticos disponíveis sobre TMP em espécies de peixes. Observações feitas por TAN e colaboradores¹⁸⁷, investigando a farmacocinética *in vivo* da TMP em truta (*O. mykiss*) verificaram uma cinética de primeira ordem, com eliminação do substrato de forma lenta. A meia-vida de eliminação (36,1 h) reforça a baixa capacidade de biotransformação, e está em acordo com os resultados aqui apresentados para o ensaio *in vitro* de biotransformação.

Em seres humanos e em ratos, TMP é biotransformada em vários metabolitos. A desmetilação e hidroxilação são as principais vias de metabolismo nestas espécies. No entanto, não há informação disponível sobre quais enzimas do citocromo P450 humano estão envolvidas neste metabolismo oxidativo¹⁸⁸. No presente estudo, nenhum metabólito da TMP foi encontrado.

Em geral, estudos de farmacocinética *in vivo* de fármacos são realizados utilizando várias espécies, sob diferentes condições, como a variação biológica (idade e tamanho), metodológica (dose e via de administração), e ambiental (pH, temperatura). Cada uma destas variáveis afeta os parâmetros farmacocinéticos dos substratos, por isso os resultados não refletem diferenças entre espécies.

3.3.3 Produtos de biotransformação: DCF e PRO

O metabolismo de DCF e PRO tem sido objeto de muitos estudos. Além de serem contaminantes ambientais, eles servem como modelos para estudos de farmacocinética em peixes, uma vez que são substratos de importantes CIPs em seres humanos.

Sabe-se que a truta (*O. mykiss*) possui enzimas da família do citocromo CIP-3 e CIP-4 com características semelhantes às CIPs destas mesmas famílias presentes em seres humanos. Também já foi demonstrada a ausência de enzimas da família CIP-2 nestes mesmos organismos¹⁸⁹. Uma vez que pouco se sabe sobre a especificidade de substrato das CIPs presentes em peixes, é grande a probabilidade destes possuírem uma CIP de uma determinada família capaz de catalisar reações que são tipicamente associadas a uma diferente família de CIPs presentes em humanos¹⁶⁶.

A busca por produtos de metabolismo foi realizada investigando-se inicialmente as reações envolvidas no processo, como hidroxilação, glucoronidação, sulfonação e reações na cadeia alquílica. Em seguida, foi feita a busca destes compostos através de suas massas e padrões de fragmentação, analisando-se detalhadamente os espectros de MSⁿ, comparando-se amostras de S9 ativas com as inativas, bem como o tempo de retenção do composto alvo em cada tempo de incubação analisado. Por fim, determinou-se a fórmula molecular do produto de

metabolismo formado e calculou-se a exatidão de massa, confirmando assim a identidade do composto em questão.

No ensaio de biotransformação *in vitro* com hepatócitos de truta, o produto de metabolismo do diclofenaco foi formado em concentrações insuficientes para a obtenção de um espectro de massa que pudesse confirmar a formação e caracterização deste produto.

Estudos avaliando o metabolismo do PRO com microssomas de fígado humano e de rato têm revelado a formação de metabólitos derivados da hidroxilação do anel aromático, além dos derivados de oxidação da cadeia lateral¹⁹⁰. Foi demonstrado que a CIP-2D6 catalisa o processo de biotransformação *in vitro* para os compostos 4-hidroxi e 5-hidroxiopropranolol, bem como a formação do metabólito derivado de uma N-desisopropilação, catalisada pela CIP-1A2. Foi demonstrado também que os metabólitos hidroxilados sofrem glucuronidação originando os correspondentes ésteres O- β -d-glucoronídeos^{191,192}.

No ensaio de biotransformação *in vitro* com as amostras S9 ativas do fígado de truta foram encontrados três metabólitos do PRO: 4-hidroxiopropranolol (4'-OHPRO), o hidroxi-conjugado glucoronídeo (4'-Glu-OHPRO) e N-desisopropil (NDI-PRO). Os íons isolados e monitorados durante os experimentos tiveram sua identidade correlata ao composto de partida, comparando-se padrões de fragmentação entre a molécula inicial e os metabólitos em espectros de massa de alta resolução e de MSⁿ. No que se refere às fragmentações referentes a ruptura do anel aromático, elas não foram conclusivas e deste modo não foi possível determinar indubitavelmente a posição da hidroxila. No entanto, trabalhos publicados apresentam que o metabolismo do propranolol pela CIP 2D6 produz majoritariamente o 4-hidroxiopropranolol^{191,192}. Assim, para o produto de hidroxilação o 4'-OHPRO foi o metabólito considerado.

Os compostos 4'-OHPRO e NDI-PRO foram detectados nas amostras dos tempos de incubação de 30 a 180 minutos. Já o 4'-Glu-OHPRO foi encontrado nas amostras dos tempos de incubação de 60 a 180 minutos. A FIGURA 3.10 mostra a rota metabólica sugerida para o PRO em frações S9 de fígado de truta.

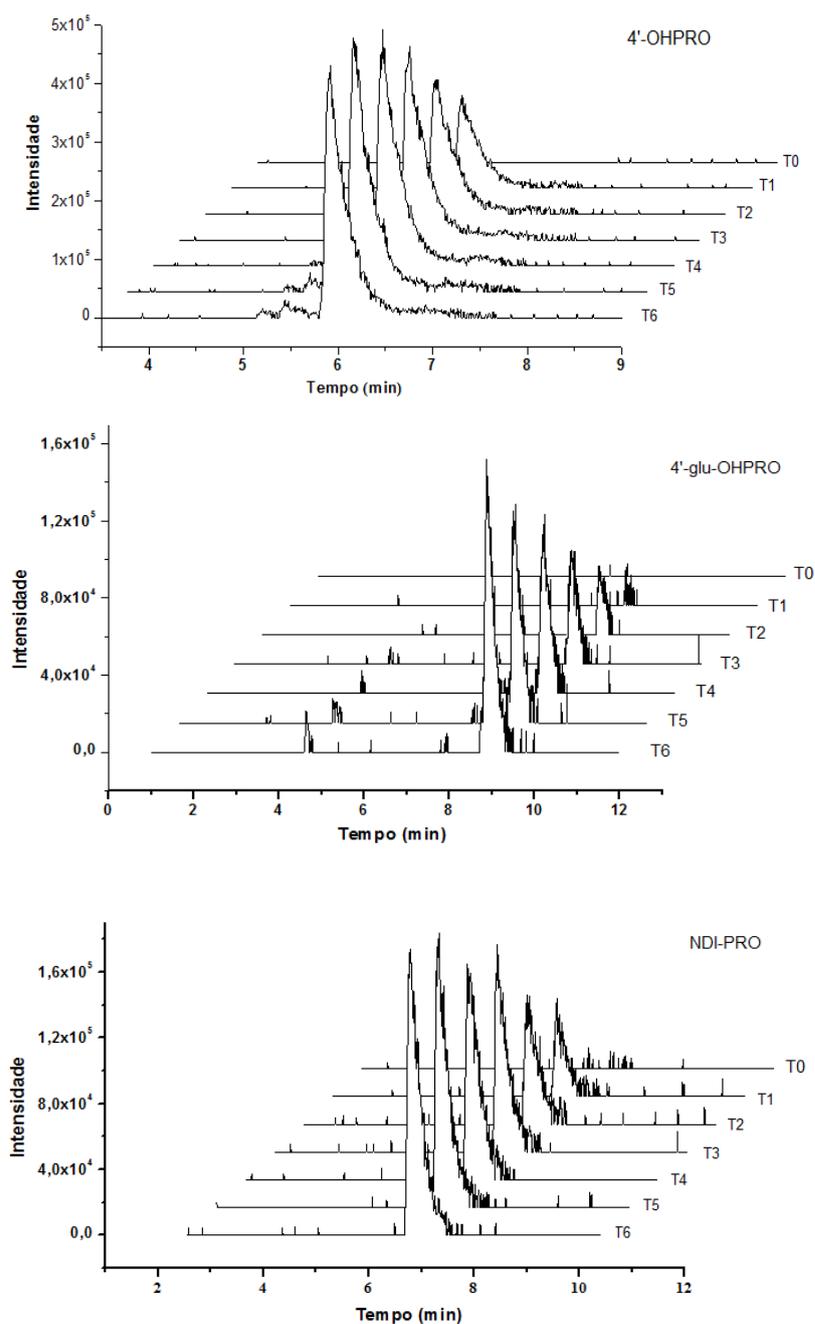


FIGURA 3.11: Cromatogramas representativos do 4'-OHPRO (Tempo de retenção: 5,92 min), 4'-Glu-OHPRO (Tempo de retenção: 8,86 min) e NDI-PRO (Tempo de retenção: 6,78 min).

O espectro de MS^n do 4'-OHPRO (FIGURA 3.12) mostra a presença de fragmentos característicos: m/z 258,14862 (perda de uma molécula de H_2O) e m/z 215,09357 (perda do grupo $NH_2CH(CH_3)_2$), além de outros.

S9 Active T6 DD #395-559 RT: 5,79-7,73 AV: 4 NL: 2,19E4
T: Average spectrum MS2 276,16 (395-559)

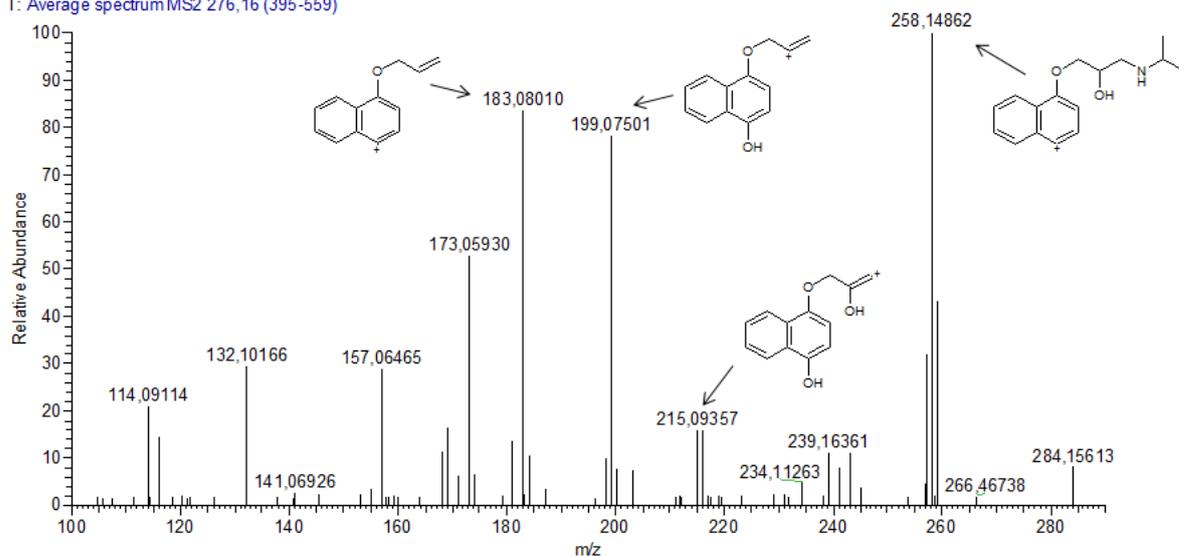


FIGURA 3.12: Espectro de MSⁿ 4'-OHPRO (m/z 276.1595) no tempo de incubação de 180 min.

A partir do metabólito hidroxilado, houve a formação de seu conjugado glucoronídeo 4'-Glu-OHPRO, cujo espectro de MSⁿ confirma a sua identificação (FIGURA 3.13), através da presença do fragmento m/z 276,15998, que corresponde à perda de 176 unidades, referente à porção glucorônica da molécula.

S9 Active T5 DD #656-662 RT: 8,79-8,86 AV: 2 NL: 4,84E4
T: Average spectrum MS2 452,19 (656-662)

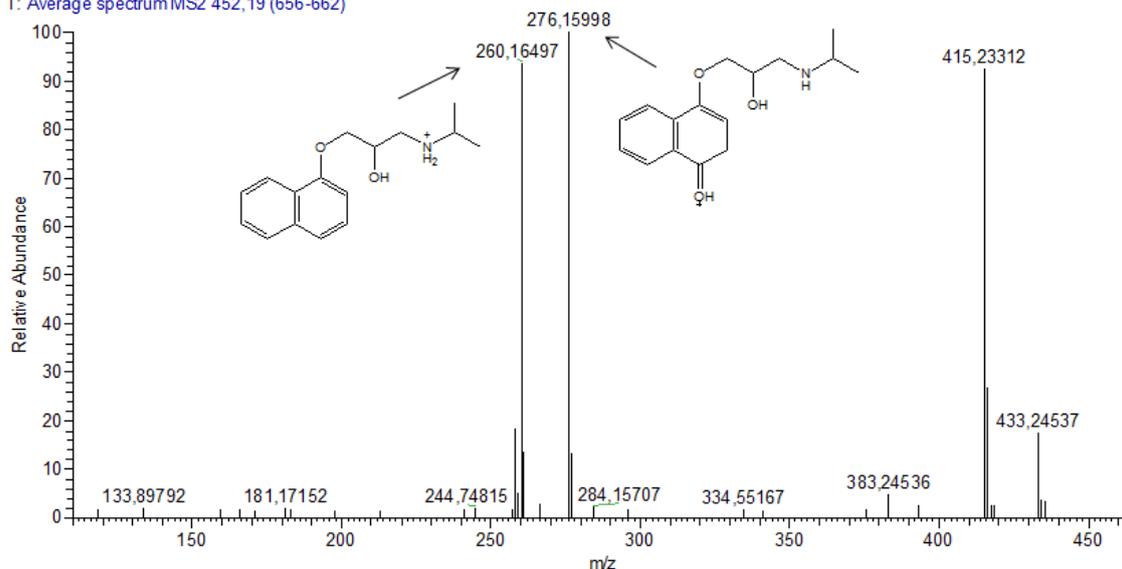


FIGURA 3.13: Espectro de MSⁿ do 4'-Glu-OHPRO (m/z 452,19138) no tempo de incubação de 150 min.

O produto de desalquilação NDI-PRO teve sua identificação confirmada pela presença do fragmento m/z 201,11211 (perda de NH_3), como mostra o espectro de MS^n (FIGURA 3.14).

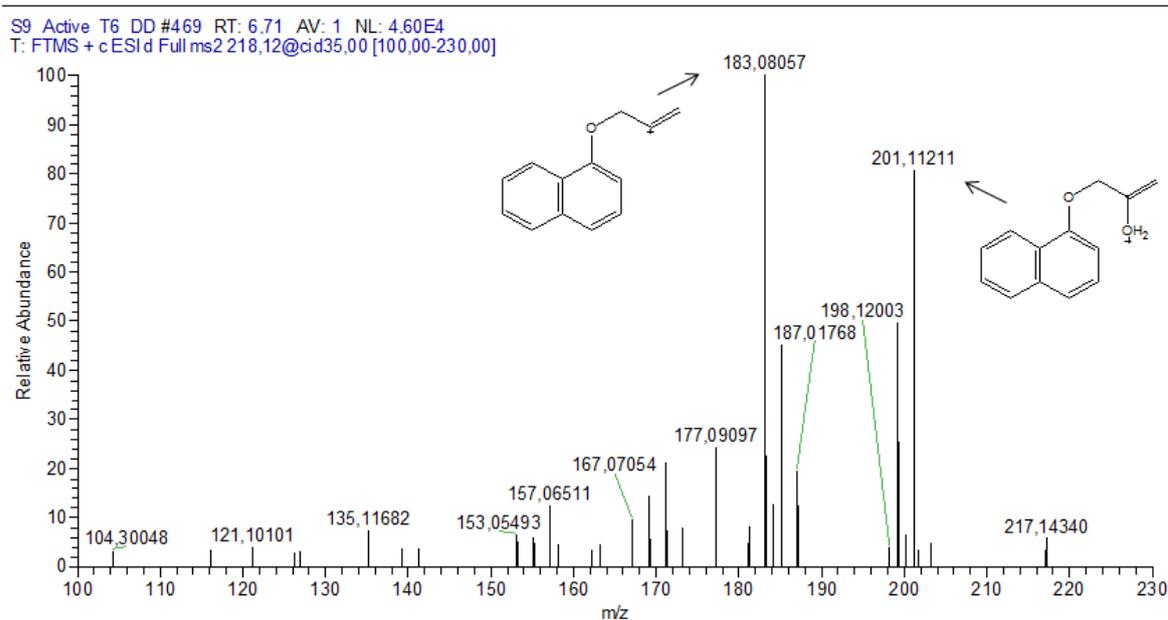


FIGURA 3.14: Espectro de MS^n do NDI-PRO (m/z 218,11763) no tempo de incubação de 180 min.

Os valores de precisão de massa para cada produto de biotransformação do PRO encontram-se na TABELA 3.3.

TABELA 3.3: Valores de massa exata, precisão e fórmula molecular dos metabólitos encontrados para o PRO.

Metabólito	Fórmula molecular	Massa exata	Massa medida	Erro (ppm)
4'-OHPRO	$\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_3$	276,15943	276,15950	0,253
4'-glu-OHPRO	$\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{NO}_9$	452,19125	452,19138	0,283
NDI-PRO	$\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_2$	218,11755	218,11763	0,343

Em microssomas de fígado humano, a hidroxilação do anel aromático da molécula de PRO é comumente catalisada pela CIP-2D6, e reações de desisopropilação são catalisadas principalmente pela CIP-1A2 e CIP-2D6¹⁹³. Os resultados obtidos sugerem que a espécie *Oncorhynchus mykiss* possui isoformas

semelhantes de CIPs presentes em seres humanos para os substratos analisados. Além disso, os resultados colaboram para a base de dados e fornecem subsídios para o entendimento do metabolismo de biotransformação desta espécie.

Ensaio de toxicidade in vitro: perspectivas

Uma análise recente da literatura mostrou que não existem estudos de biotransformação *in vitro* em peixes com os fármacos selecionados para este estudo. Esta abordagem do uso de ensaios *in vitro* tem sido aplicada com sucesso para compostos farmacêuticos de baixa polaridade e produtos de higiene pessoal, tais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs)¹⁹⁴. No entanto, pouca atenção tem sido dada para compostos de alta polaridade.

Estudos de previsão de impacto ambiental de compostos farmacêuticos ativos vêm sendo realizados com base em medidas de coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), que fornece dados sobre lipofilicidade de compostos, principalmente quanto à toxicologia destes em organismos aquáticos¹⁵¹. No entanto, quando levado em consideração o meio ambiente como um todo, assim como os processos físico-químicos que nele ocorrem, esta abordagem não é a mais adequada para avaliar os riscos bioacumulativos, uma vez que compostos de alta polaridade podem também causar danos a organismos aquáticos. Embora haja uma preocupação global sobre o uso desenfreado de antibióticos em medicina humana e veterinária, há uma carência de dados na literatura a respeito dos efeitos toxicológicos desta classe de compostos sobre organismos aquáticos, uma vez que o aporte destes contaminantes no ambiente é contínuo.

Algumas propriedades físico-químicas, como constante de acidez (k_a), tem grande influência sobre reações enzimáticas e devem ser cuidadosamente avaliadas em estudos farmacocinéticos *in vivo/in vitro*. Devido às diferentes propriedades físico-químicas dos antibióticos, eles podem ser absorvidos em diferentes taxas e se acumularem em níveis que podem variar muito entre os diferentes tecidos e em cada espécie de peixe¹⁹⁵. Os modelos *in vitro* buscam usar informações de farmacocinética e farmacodinâmica para comparar concentrações terapêuticas humanas com concentrações estimadas peixes, e assim extrapolar os efeitos adversos para compostos específicos. Estes modelos *in vitro*, porém, ainda não estão adequados para a análise de todas as classes de compostos químicos. As incertezas associadas aos modelos *in vitro* propostos, bem como o incentivo na

redução do uso de animais nos ensaios de laboratório, estão impulsionando as pesquisas para o desenvolvimento de estratégias complementares para avaliar e refinar estimativas de potenciais de bioacumulação.

3.4 Conclusões

Os ensaios de biotransformação *in vitro* mostraram que a espécie *O. mykiss* possui enzimas capazes de metabolizar estes fármacos, visto o decaimento de suas concentrações ao longo de 180 minutos.

De acordo com modelo *in vitro* avaliado, os fármacos ENR, FLO, SDT e OXI não apresentaram perfil de biotransformação, o que sugere que eles possuem potencial bioacumulativo em tecidos de peixes.

A identificação inequívoca dos metabólitos do PRO após incubação *in vitro* mostra a capacidade de biotransformação da espécie utilizada como modelo. Estes resultados ampliam o entendimento da capacidade, similaridades e diferenças entre diferentes espécies de peixes, e também contribuem para a avaliação do impacto ambiental de compostos presentes no meio ambiente.

Capítulo 4

Considerações finais

Considerações finais

Atualmente, existe uma tendência por métodos sustentáveis nas análises de compostos farmacêuticos em matrizes ambientais. O baixo consumo de solvente de apenas 10 mL da fase móvel por análise proporciona significativa redução de resíduos e é uma das maiores vantagens do processo aqui relatado. Além disso, o curto tempo de análise também proporciona maior produtividade. Desta forma, este método de injeção de amostra on-line, baseado na utilização da coluna RAM-C₈-BSA no modo unidimensional acoplado ao MS/MS, tem vantagens distintas quando comparados com os tradicionais procedimentos usados em análises de amostras ambientais e análises de tecidos biológicos. No monitoramento feito com amostras coletadas ao longo do Rio Monjolinho e na entrada e saída da estação de tratamento de esgoto (ETE) do município de São Carlos, SP, CIP (195 ng L⁻¹) e NOR (270 ng L⁻¹) foram quantificadas em amostras de efluentes provenientes da entrada da ETE. No estudo de bioacumulação, CIP foi quantificada na concentração de 14,3 ng g⁻¹ em músculos de tilápias expostas por 7 dias à concentração de 5,0 µg L⁻¹.

A exposição subletal ao fármaco CIP nas concentrações avaliadas induziram respostas tecido-específicas para os sistemas antioxidantes analisados, sendo o fígado e as brânquias os tecidos mais afetados pelo estresse. O músculo do peixe não sofreu qualquer alteração significativa nas respostas bioquímicas, indicando ausência do estresse neste tecido. As respostas bioquímicas avaliadas mostraram ser bons biomarcadores frente à exposição subletal à CIP. Estas respostas indicaram que, apesar da indução do sistema antioxidante, o fígado e as brânquias sofreram estresse oxidativo, evidenciado pelos danos severos ocorridos à níveis celulares, uma vez que as respostas dos níveis de lipoperoxidação mostraram alterações significativas nestes tecidos.

Os ensaios de biotransformação *in vitro* mostraram que a espécie *Oncorhynchus mykiss* é um bom modelo para este tipo de análise, uma vez que possui enzimas da família do citocromo P450 capazes de metabolizar substratos específicos, semelhantes ao comportamento enzimático das CIPs em seres humanos, como demonstrado na identificação dos metabólitos do PRO após incubação. Os resultados apresentados com o presente modelo *in vitro* mostraram que os fármacos utilizados em aquicultura ENR, SDT, TRI, OXI e FLO não

apresentaram perfil de biotransformação, inferindo que eles podem bioacumular no organismo de peixes. Os resultados obtidos contribuem para o entendimento da capacidade, similaridades e diferenças entre diferentes espécies de peixes, e também para a avaliação do impacto ambiental de compostos presentes no meio ambiente.

Capítulo 5

Experimental

5.1 Generalidades

Os solventes orgânicos utilizados foram grau HPLC, das marcas MALLINCKRODT e J. T. BAKER (St Louis, EUA).

A água utilizada na composição das fases móveis e preparação de soluções foi ultrapura purificada através de um sistema MILLIPORE.

Os eluentes utilizados foram sempre medidos na relação volume/volume.

Uma empacotadora Shandon foi utilizada para o empacotamento das colunas cromatográficas.

A homogeneização de todas as amostras foi efetuada em um vórtex PHOENX AP56, além de um ultra-som COLE-PALMER 8852.

Para a pesagem dos reagentes foi utilizada uma balança analítica AND, modelo HR200, com precisão $\pm 0,0001\text{g}$.

As medidas de pH foram realizadas utilizando um pHmetro, QUALXTRON, modelo 8010, com precisão de $\pm 0,01$ unidades de pH, conectado a um eletrodo de vidro combinado Ag/AgCl. A calibração do pHmetro foi realizada com soluções tampão pH 4,00 e 7,00 (CHEMIS).

As micropipetas utilizadas no preparo das amostras foram GILSON e EPPENDORF.

Durante as análises foram utilizados os seguintes padrões dos fármacos: ciprofloxacino (Lote: M348738), moxifloxacino (Lote: M201400) e norfloxacino (Lote: M343980), doados pelo Instituto Vita Nova (Hortolândia – SP – Brasil); gemifloxacino (Lote: QUB10006), doado pela indústria farmacêutica Aché (Guarulhos, SP, Brasil); enrofloxacino (Lote: SZBA336XV), ofloxacino (Lote: 040M1313V), propranolol e diclofenaco foram comerciais, da marca Sigma-Aldrich (St Louis, EUA); florfenicol (Lote: F405750), sulfadimetoxina (Lote: S699060), oxitetraciclina (Lote: O877501) e trimetoprima foram comerciais, da marca Toronto Research Chemicals (Toronto, Canadá).

O ácido fórmico foi comercial, da marca Fluka. β -NADPH (>95% pureza) foi obtido da Oriental Yeast Co. (Osaka, Japão). Todos os outros reagentes e cofatores foram comerciais, da marca Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

5.2 Preparo da coluna RAM-BSA

Sílica utilizada e preenchimento da coluna

A sílica utilizada no empacotamento da coluna foi octilsílica LUNA (100 Å, 10 µm). A fase hidrofóbica (0,5 g) foi suspensa em 50 mL metanol, homogeneizada no ultra-som durante 3 minutos e empacotada em uma coluna de aço inoxidável (5,0 x 0,21 cm d.i.), a uma pressão de 7500 psi. A coluna foi condicionada em metanol durante aproximadamente 24 horas a uma vazão de 0,5mL/min.

Imobilização da fase hidrofóbica com BSA

Após o empacotamento da fase hidrofóbica e condicionamento da coluna, eluíu-se a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹, solução tampão KH₂PO₄ (0,05 M; pH 6,0) durante 20 minutos. Em seguida, ocorreu a adsorção da BSA, utilizando solução de 1,0 mg mL⁻¹ preparada em solução tampão KH₂PO₄ (0,05 M; pH 6,0), durante 30 minutos. Na sequência foi eluído água (20 mL) e 20 mL de glutaraldeído (25% (v/v)). Após um repouso de 12 horas, uma solução de boroidreto de sódio (1,0 g mL⁻¹) foi eluída pela coluna até obtenção de um eluente com valor de pH 10. Após 2 horas em repouso, a fase estacionária foi lavada com água durante 30 minutos e guardada em geladeira.

5.3 Caracterização da área de estudo

O rio Monjolinho, antes de percorrer a área urbana de São Carlos, recebe contribuições de alguns tributários como: córrego da Matinha, córrego Ponte de Tábua, córrego São Rafael e outros de menor porte. Na área urbana, este rio foi canalizado recebendo contribuições de diversos córregos, como os Maria Madalena, Tijuco Preto, Mineirinho e Gregório. Recebe, também, efluentes da região norte de São Carlos e despejos industriais, incluindo cerca de 1100 indústrias representadas por metalurgia, papel, tintas, alimentos, curtumes, têxtil, entre outras. Após drenar o trecho urbano, o rio percorre áreas agropastoris, com predomínio de culturas de cana-de-açúcar, recebendo contribuições dos córregos: Água Quentes e Água Fria, córrego da Serra, Cancã, Palmital e finalmente, desemboca no rio Jacaré-Guaçu¹⁹⁶.

Os pontos de coleta ao longo do rio Monjolinho correspondem a: (1) nascente do rio Monjolinho - latitude: 22°00'33"S e longitude: 47°50'07"W; (2) áreas consideradas suscetíveis a contaminação industrial e urbana - latitude: 21°98'58"S, longitude: 47°88'22"W. Localiza-se na Universidade Federal de São Carlos. (3) localiza-se a alguns metros da jusante da confluência com o córrego do Tijuco Preto, inserida em área urbanizada. Latitude 22°00'68"S, longitude: 47°90'47" W. (4) situa-se no trecho médio do Monjolinho, logo após a área urbana. Nesse local, havia uma barragem construída pela Companhia de Força e Luz (CPFL), a qual foi parcialmente derrubada, em 1999, para aumentar o escoamento. Latitude: 22°02'21"S, longitude: 47°91'40"W.

A cidade de São Carlos apresenta um sistema de tratamento de esgoto, operando em 100% da sua capacidade. A localização geográfica do influente e efluente da ETE corresponde a: latitude: 22°3'41.99"S, longitude: 47°55'29.22"W, e latitude: 22°3'30.69"S, longitude: 47°55'51.66"W, respectivamente.

5.4 Armazenamento das amostras ambientais

As amostras de água coletadas diretamente da nascente do rio Monjolinho foram filtradas em um filtro de microfibras de vidro GF/D 2,7 µm (Whatman, Kent, UK), para remoção de partículas suspensas. Em seguida, foram armazenadas em frascos de vidro âmbar de 1L, refrigeradas a aproximadamente 4°C, e posteriormente utilizadas no desenvolvimento do método e determinação dos analitos de interesse. Após filtração foram adicionadas três gotas de metanol (grau HPLC) em cada amostra de um litro de água residual ou estuário.

5.5 Sistema LC-MS

Sistema cromatográfico de ultra eficiência Waters ACQUITY UPLC (Milford, USA) composto por uma bomba binária (BSM), uma quaternária (QSM), com injetor automático Waters 2777C e sistema de válvulas comutadoras de seis caminhos especialmente configuradas para extração *on-line* (válvula Valco® VICI para injeção e 2 válvulas Everflow® para acoplamento das duas dimensões) acoplado a um detector de UV-vis Waters modelo TUV operando a 254 nm. Este

sistema foi acoplado a um espectrômetro de massa modelo Xevo TQ-MS (Waters, Milford, USA) com ionização por *electrospray* (ESI) operando no modo positivo.

Para a otimização das condições de ionização, uma mistura das 6 FQs preparada em água ultrapura ($1,0 \mu\text{g L}^{-1}$) foi infundida no sistema no modo combinado com vazão de $500 \mu\text{L min}^{-1}$ de ACN:água (0,1% ácido fórmico) na proporção de 70:30 (v/v) vinda do sistema cromatográfico combinada com uma vazão de $30 \mu\text{L min}^{-1}$ da bomba seringa contendo as soluções aquosas. As condições de operação da fonte de ionização foram ajustadas manualmente, sendo: voltagem do capilar: 2.0 kV; temperatura de desolvatação: 600°C ; vazão do gás de desolvatação: 800 L Hr^{-1} ; vazão do gás do cone: 20 L Hr^{-1} ; vazão do gás de colisão: $0,15 \text{ mL min}^{-1}$.

As energias de colisão e voltagem do cone para cada um dos compostos foram otimizadas através do software MassLynx com a ferramenta de ajuste automático IntelliStart.

O espectrômetro de massa operou no modo *selected reaction monitoring* (SRM) e duas transições de cada analito foram selecionadas para quantificação e confirmação.

5.6 Validação do método analítico para determinação das FQs em efluentes

Preparo das soluções de trabalho

Foram preparadas, individualmente, seis soluções estoque de cada fármaco na concentração de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ através da dissolução de $1,0 \text{ mg}$ do composto para um volume final de 10 mL de água ultrapura: metanol (90:10), em balão volumétrico.

A partir das soluções estoque, foram obtidas, por diluição em água ultrapura, a solução estoque (1) da GEM na concentração de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ e a solução estoque (2) com os fármacos NOR, CIP, ENR, OFL e MOX combinados, na concentração de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ para cada um deles.

As oito soluções de trabalho para a curva de calibração e para os três controles de qualidade foram obtidas por diluição, em água ultrapura, das misturas das soluções estoque (1) e (2) nas seguintes concentrações:

Soluções de trabalho para a curva de calibração: 0,8, 1,6, 4,0, 10,0, 26,0 e 32,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CIP, ENR, NOR, MOX e OFL); 6,0, 14,0, 22,0, 26,0, 30,0 e 34,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (MOX).

Soluções de trabalho para o controle de qualidade: 2,4, 14 e 28 $\mu\text{g L}^{-1}$ para CIP, ENR, NOR, MOX e OFL; 12, 20 e 28 $\mu\text{g L}^{-1}$ para GEM.

Os valores de concentração dos controles de qualidade do método foram calculados da seguinte forma:

1- O controle de qualidade de concentração mais baixa em torno de 110-120%, em relação ao ponto de menor concentração da curva de calibração.

2- O controle de qualidade de concentração média em torno de 40-60%, em relação ao ponto de maior concentração da curva de calibração.

3- O controle de qualidade de concentração alta, em torno de 75-95%, em relação ao ponto de maior concentração da curva de calibração.

As amostras da nascente do Monjolinho (1930 μL) foram fortificadas com alíquotas de 50 μL das soluções de trabalho (curva de calibração e controles de qualidade), juntamente com 20 μL de ácido fórmico concentrado e homogeneizadas em vórtex por 10 segundos. O volume injetado no sistema cromatográfico foi de 500 μL .

Figuras de mérito avaliadas na validação do método analítico

Uma vez que não existe um guia de validação específico para análise de compostos em matrizes ambientais, adotou-se o protocolo proposto pela EMA¹⁰¹ para métodos bioanalíticos. As figuras de mérito avaliadas foram: linearidade, seletividade, recuperação, precisão e exatidão, limites de quantificação e de detecção, estabilidade e efeito de matriz.

Linearidade: para determinar a linearidade, seis amostras da nascente do Rio Monjolinho foram fortificadas em triplicata em seis níveis de concentração (20,0, 40,0, 100, 250, 650, 850 ng L^{-1} para CIP, NOR, MOX, OFL e ENR; 150, 350, 550, 650, 750, 850 ng L^{-1} para GEM) e analisadas. A curva gerada foi submetida a um tratamento matemático de regressão linear ($y = a + bx$), considerando-se a relação entre a área da banda cromatográfica e a concentração do analito.

Seletividade: avaliada através de amostras de água da nascente isenta dos antibióticos em questão. As análises foram realizadas com amostras

coletadas do Ponto 1, em seis dias diferentes, e avaliadas quanto à presença de interferentes na região de eluição dos analitos de estudo.

Precisão e Exatidão: a precisão inter e intra-lotes e a exatidão foram avaliadas, utilizando-se as amostras controle de qualidade do método (QB = 60 ng L⁻¹, QM = 350 ng L⁻¹ e QA = 700 ng L⁻¹ para CIP, ENR, NOR, OFL e MOX; QB = 300 ng L⁻¹, QM = 500 ng L⁻¹ e QA = 700 ng L⁻¹ para GEM), as quais foram preparadas em quintuplicata (n=5) em água da nascente. A precisão do método foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) das replicatas. A exatidão foi calculada através da razão da média das concentrações encontradas e o valor médio das concentrações nominais, e expressa em porcentagem. A variabilidade dos percentuais de exatidão e os valores de CV não devem ultrapassar 15%.

Recuperação (Eficiência de extração): foi avaliada utilizando-se as soluções de controle de qualidade, em quintuplicata. Os percentuais de eficiência da extração foram calculados através da razão entre o valor médio das áreas obtidas em amostras preparadas em água da nascente do Rio Monjolinho (n = 5) com os resultados das amostras preparadas em água ultrapura (n =5).

Estabilidade de curta duração (Estabilidade de auto-injetor): a estabilidade de curta duração das amostras controle de qualidade do método (baixa e alta) foi verificada através da comparação dos resultados obtidos de amostras recém-preparadas (t = 0 hora) com aqueles obtidos após 24 e 48 horas no auto-injetor. O período de 48 horas foi baseado no tempo excedente de duração das análises para a obtenção da curva analítica. A precisão das análises, expressa pelo CV (n=3), determinou a estabilidade das amostras, onde foram consideradas estáveis as amostras cuja variabilidade foi de até 15%.

Efeito de Matriz: a avaliação do efeito de matriz foi realizada com amostras coletadas nos pontos (2), (3) e (4), em dois dias diferentes. As áreas das bandas dos antibióticos foram calculadas e a precisão foi expressa pelo coeficiente de variação das seis amostras analisadas. Para esta análise utilizaram-se amostras controle de qualidade baixo e alto.

Aplicação do método

Para a aplicação do método foram coletados amostras de efluentes do rio Monjolinho situadas no município de São Carlos, bem como em amostras de influente e efluente da Estação de Tratamento de Esgoto do município de São

Carlos, para identificação simultânea das seis fluoroquinolonas selecionadas. A coleta foi realizada durante o período de dezembro de 2012 à fevereiro de 2013.

Para a quantificação das FQs nas amostras ambientais foram utilizadas as curvas de calibração construídas. As amostras foram preparadas em triplicata e a elas foram adicionados 20 μL ácido fórmico, em seguida estas foram injetadas diretamente no sistema de LC-MS.

5.7 Animais

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da UFSCar (Protocolo 6926040815).

Exemplares de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (n=80), juvenis, de ambos os sexos, foram provenientes da Piscicultura Santa Cândida, Santa Cruz da Conceição, SP, Brasil. Os animais foram transportados para o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (LZBC) do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos.

Os animais foram aclimatados em tanques de 1000 L, com aeração constante e fluxo contínuo de água sem cloro. A água foi mantida a $24 \pm 2^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo natural (~12:12 horas). Os peixes foram alimentados diariamente *ad libitum* com ração comercial (40% de proteína). Os parâmetros da qualidade da água foram monitorados e mantiveram-se aproximadamente constantes: oxigênio dissolvido (7,0-7,5 mg L^{-1}), pH (7,1-7,4), condutividade (125-130 $\mu\text{S cm}^{-1}$), alcalinidade (35-43 $\text{mg L}^{-1} \text{CaCO}_3$) e dureza total (39-50 $\text{mg L}^{-1} \text{CaCO}_3$).

5.8 Delineamento experimental

Os peixes permaneceram nas condições descritas anteriormente durante 90 dias para recuperação do estresse decorrente da coleta e transporte até o laboratório, bem como para a aclimatação e crescimento. Para início do experimento, os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, cada qual com 10 peixes, num total de 40 peixes para cada tempo de exposição (7 ou 14 dias) e aclimatados por 24 horas, com suspensão da alimentação. Cada grupo de peixes foi colocado em aquário (180 L) e mantido por 7 dias ou 14 dias em sistema semi-estático, com renovação a cada 48 horas. Para cada tempo de exposição, um grupo

controle (C) foi mantido em água do laboratório e os demais foram expostos ao ciprofloxacino nas seguintes concentrações: $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$; $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Estas concentrações foram selecionadas baseadas em valores aproximados encontrados na literatura com relação à ocorrência do ciprofloxacino em águas superficiais.

Iniciado o experimento, os animais foram alimentados a cada 48 horas.

Amostras de água de cada aquário foram coletadas a cada 24 horas e analisadas por LC-MS, segundo método descrito no item 5.6 desta seção, para monitorar a concentração do fármaco ao longo do experimento. A concentração do CIP manteve-se dentro de um coeficiente de variação de 20% durante todo o experimento.

5.9 Coleta das amostras teciduais

Ao final de 7 ou 14 dias, a eutanásia dos animais foi feita por secção medular. Foram coletados os seguintes tecidos: músculo, fígado e brânquia.

Cada tecido foi cuidadosamente removido, lavado em solução de soro fisiológico (NaCl 0,9 %), colocado em tubos apropriados e armazenados à -80°C . O peso e o comprimento total de cada peixe foram medidos (Anexo I).

5.10 Validação do método analítico para determinação do CIP em músculo de tilápia

Extração do CIP em músculo de tilápia

Inicialmente, as amostras de músculo de tilápia foram liofilizadas. Após liofilização, o tecido foi macerado com auxílio de almofariz e pistilo.

A extração do CIP do músculo de tilápia seguiu o seguinte procedimento:

- 300 mg de tecido em tubo falcon;
- Adição de 3 mL de água deionizada;
- Homogeneização com homogeneizador Ultraturrax (5000 rpm);
- Centrifugação (20 minutos, 10000 rpm);
- Coleta do sobrenadante;
- Re-extração do pellet (adição de 3 mL de água deionizada);

- Centrifugação (20 minutos, 10000 rpm);
- Soma dos dois sobrenadantes.

Após esta última etapa, uma alíquota de 100 µL foi injetada no sistema de UHPLC, utilizando uma coluna RAM-C₈-BSA.

Preparo das soluções de trabalho

Foi preparada uma solução estoque de CIP na concentração de 0,1 mg mL⁻¹ através da dissolução de 1,0 mg do composto para um volume final de 10,0 mL de água ultrapura: metanol (90:10), em balão volumétrico.

A partir desta solução, foi obtida por diluição em água ultrapura, a solução estoque CIP na concentração de 4,0 mg L⁻¹.

As oito soluções de trabalho para a curva de calibração e para os três controles de qualidade foram obtidas por diluição, em água ultrapura, da solução estoque nas seguintes concentrações: soluções de trabalho para a curva de calibração: 12,0, 120, 240, 360, 480, 600, 720, 840 µg L⁻¹. Soluções de trabalho para o controle de qualidade: 36,0, 480, 720 µg L⁻¹.

O tecido liofilizado de peixe foi fortificado com 50 µL das soluções de trabalho (curva de calibração e controles de qualidade), extraídas segundo procedimento descrito no item anterior, e injetadas no sistema de LC-MS.

Validação do método analítico

O protocolo de validação adotado foi o proposto pela EMA¹⁰¹. As figuras de mérito avaliadas foram: linearidade, seletividade, recuperação, precisão e exatidão, limites de quantificação e de detecção, estabilidade e efeito de matriz.

Linearidade: Para determinar a linearidade, tecidos provenientes do grupo controle do experimento de exposição (7 dias) foram fortificadas em triplicata em seis níveis de concentração (0,1; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 µg L⁻¹), que foram extrapolados para a quantidade de tecido utilizada, para quantificar a massa de CIP por grama de músculo de tilápia (0,002; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1; 0,12 e 0,14 µg g⁻¹). A curva gerada foi submetida a um tratamento matemático de regressão linear, considerando-se a relação entre a área da banda cromatográfica e a concentração do analito.

Seletividade: avaliada através de amostras de músculo de peixe, provenientes do grupo controle do experimento de 7 dias. As análises foram realizadas com amostras de seis peixes, e avaliadas quanto à presença de interferentes na região de eluição da CIP.

Precisão e Exatidão: a precisão inter e intra-lotes e a exatidão foram avaliadas, utilizando-se as amostras controle de qualidade do método (QB = 0,006 $\mu\text{g g}^{-1}$, QM = 0,08 $\mu\text{g g}^{-1}$ e QA = 0,086 $\mu\text{g g}^{-1}$), as quais foram preparadas em triplicata (n=5) segundo o procedimento de extração. A precisão do método foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) das replicatas. A exatidão foi calculada através da razão da média das concentrações encontradas e o valor médio das concentrações nominais, e expressa em porcentagem. A variabilidade dos percentuais de exatidão e os valores de CV não devem ultrapassar 15%.

Recuperação (Eficiência de extração): avaliada utilizando-se as soluções de controle de qualidade, em triplicata (n=3). Os percentuais de eficiência da extração foram calculados através da razão entre o valor médio das áreas obtidas das amostras em que adicionaram-se as alíquotas das amostras CQ antes do processo de extração, com os resultados das amostras em que foram adicionadas as alíquotas de amostras CQ após o processo de extração do tecido.

Estabilidade de curta duração (Estabilidade de auto-injetor): a estabilidade de curta duração das amostras controle de qualidade do método (baixa e alta) foi verificada através da comparação dos resultados obtidos de amostras recém-preparadas (t = 0 hora) com aqueles obtidos após 24 e 48 horas no auto-injetor. O período de 48 horas foi baseado no tempo excedente de duração das análises para a obtenção da curva analítica. A precisão das análises, expressa pelo CV (n=3), determinou a estabilidade das amostras, onde foram consideradas estáveis as amostras cuja variabilidade foi de até 15%.

Efeito de Matriz: para a avaliação do efeito de matriz foram utilizados tecidos provenientes de três animais do grupo controle de cada experimento de exposição (7 e 14 dias). As áreas das bandas dos antibióticos foram calculadas e a precisão foi expressa pelo coeficiente de variação das sextuplicatas (n=6). Para esta análise utilizaram-se amostras controle de qualidade baixo e alto.

Aplicação do método

O método desenvolvido foi aplicado para duas amostras, selecionadas aleatoriamente, de indivíduos expostos às concentrações de 0,5, 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de CIP, para 7 e 14 dias de exposição, num total de 12 amostras.

Para a quantificação do CIP nas amostras foi utilizada a curva de calibração construída. As amostras foram preparadas em triplicata, extraídas e em seguida foram injetadas diretamente no sistema de LC-MS.

5.11 Análises bioquímicas

Preparação do homogeneizado

Após o descongelamento, as amostras de tecido (fígado e brânquia) foram mantidas em proporções de 50,0 mg de tecido para 1,0 mL de tampão de homogeneização (fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4). Para o músculo, a proporção foi de 100 mg de tecido para 1 mL de tampão de homogeneização. Para as análises das atividades das enzimas superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT) e determinação dos níveis de hidroperóxido de lipídio (LPO) foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,4) e centrifugados a 11000 g por 5 minutos a 4°C. Para a análise da atividade da glutathione-S-transferase (GST), concentração de glutathione reduzida (GSH) e atividade da glutathione peroxidase (GPx), o tecido foi homogeneizado em tampão TRIS-HCl (0,2 M, pH 8,0), centrifugados a 11000 g por 5 minutos, a 4°C. Para ambos os homogeneizados, o sobrenadante foi coletado e utilizado para a determinação das respectivas atividades enzimáticas ou concentrações.

Determinação da concentração protéica dos tecidos de tilápia

A solução do corante azul brilhante foi preparada na concentração de 10,0 mg mL^{-1} , segundo o procedimento descrito por BRADFORD¹⁹⁷. Dissolveu-se 50,0 mg do corante azul brilhante em 25,0 mL de etanol e a seguir acrescentou-se 50,0 mL de ácido fosfórico (85% P.A.). Transferiu-se esta solução para um balão volumétrico de 500 mL, completando-se o volume com água. A solução do corante foi estocada em um frasco de vidro âmbar. Para a construção da curva de calibração foi utilizada uma solução padrão de albumina (1,0 mg mL^{-1}), e à partir desta

preparou-se uma curva de seis concentrações (1,0; 0,5; 0,25; 0,12; 0,06; 0,03 mg mL⁻¹). O procedimento foi adaptado para leitura em microplaca (Dynex Technologies Ltd., MRXTC, UK) utilizando procedimento de KRUGER e colaboradores¹⁹⁸. Pipetou-se 10 µL da solução preparada de albumina (1,0 mg mL⁻¹), adicionou-se 200 µL da solução do reagente de Bradford e a reação permaneceu em repouso por 10 minutos. Em seguida, registrou-se a absorbância no comprimento de onda 596 nm, relativo à máxima absorbância do complexo proteína-corante. As absorbâncias foram medidas contra um branco de água.

5.12 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes

Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pela medida da inibição da taxa de redução do citocromo C pelo radical superóxido, segundo a metodologia de MCCORD e FRIDOVICH¹⁹⁹. Como referência, 1,0 mL de uma mistura reativa (tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,8; EDTA 0,1 mM; xantina 1mM; NaOH 0,001 M) mais 40 µl de xantina oxidase foi utilizada para absorbância padrão de 0,025 abs min⁻¹. Para as amostras, adicionou-se 10 µl da amostra e as leituras foram feitas em $\lambda = 550$ nm. Uma unidade de SOD representa a quantidade de enzima necessária para produzir 50% de inibição da taxa de redução do citocromo C, uma vez que a SOD dismuta o radical superóxido em H₂O e H₂O₂. A atividade da enzima foi expressa em U SODmin⁻¹ mg proteína⁻¹.

Determinação da atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT foi mensurada pela avaliação contínua do decréscimo da concentração de peróxido de hidrogênio em $\lambda = 240$ nm, segundo a metodologia de BEUTLER (1975). A redução foi medida durante um minuto em cubeta contendo 1 mL de solução recém preparada de H₂O₂ em água destilada (30%), tampão da catalase (tris 1M; EDTA 5mM) e 10 µl da amostra. A reação foi iniciada na adição do peróxido de hidrogênio. A atividade da enzima foi expressa em µmol H₂O₂ metabolizado min⁻¹ mg proteína⁻¹.

Determinação da atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi determinada pelo método de HOPKINS e TUDHOPE²⁰⁰, baseado na oxidação do NADPH em presença do peróxido de hidrogênio, em $\lambda = 340$ nm. Em uma cubeta de quartzo foi adicionado 1 mL de meio de reação (NADPH, azida sódica 5 mM, GSH, tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0) juntamente com 20 μ l de GR, 20 μ l de H₂O₂ 20 mM e 10 μ l de amostra. A GPx presente na amostra degrada o H₂O₂ na presença de GSH. A atividade da enzima foi expressa em μ mol NADPH oxidado min^{-1} mg proteína⁻¹.

Determinação da concentração da glutathiona reduzida (GSH)

A concentração de tióis não protéicos, incluindo a GSH foi determinada de acordo com o método de BEUTLER e colaboradores²⁰¹, utilizando o reativo de Elmann (ácido 5,5'-ditio di-2-nitrobenzoico – DTNB), adaptada por WILHELM-FILHO e colaboradores²⁰². As amostras foram tratadas com ácido tricloroacético (TCA) 12% (1:1) e após centrifugação (5000 g, 4°C, 15 minutos), o sobrenadante foi utilizado para analisar o conteúdo de GSH. Aos sobrenadantes foi adicionado um tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH8,0), contendo 0,25 mM de DTNB (1:1). A formação do ânion tiolato resultante da reação da GSH com o reativo de Elmann, foi determinada em espectrofotômetro a $\lambda = 412$ nm.

O conteúdo de GSH foi expresso em μ g GSH mg proteína⁻¹, a partir de uma curva padrão de GSH.

Determinação da atividade da glutathiona-S-transferase (GST)

A atividade da GST foi medida de acordo com KEEN e colaboradores²⁰³, utilizando-se 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A mistura reativa continha 100 mM de CDNB em etanol 100%, 100 mM de GSH, tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) e extratos enzimáticos. Utilizou-se 990 μ L da mistura e 10 μ L de amostra. A formação do aduto glutathiona-2,4-dinitrobenzeno foi monitorada pelo aumento da absorbância a 340 nm contra um branco. O coeficiente de extinção molar de $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi utilizado para o cálculo da atividade enzimática. A atividade da GST foi expressa como a quantidade da enzima que catalisa a formação de 1μ mol min^{-1} proteína⁻¹.

Determinação dos níveis de peroxidação lipídica (LPO)

A peroxidação lipídica foi quantificada pela oxidação do Fe^{+2} (sulfato ferroso amoniacal – FeSO_4) a Fe^{+3} pelos hidroperóxidos em meio ácido na presença de um pigmento complexador de Fe (III), o alaranjado xilenol (Ferrous Oxidation-Xylenol Orange) como descrito por JIANG e colaboradores²⁰⁴.

Uma alíquota de 100 μl de amostra foi tratada com TCA 10% na proporção 1:1 e centrifugados a 5000 g a 4°C por 10 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi encubado por 30 minutos à temperatura ambiente com 900 μl de mistura reativa (alaranjado xilenol 100 μM ; FeSO_4 250 μM ; ácido sulfúrico 25 mM; butilatohidroxitolueno 4mM; diluídos em metanol 90%). O Fe^{+3} formado na presença dos hidroperóxidos reage com o alaranjado de xilenol formando um composto colorido, com um pico de absorção em 560 nm (comprimento de onda em que as leituras foram realizadas no espectrofotômetro). As concentrações de LPO foram determinados em 560 nm e expressas em μM hidroperóxido de cumeno por mg de proteína a partir de uma curva padrão para o hidroperóxido de cumeno (CHP).

Determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE)

A atividade de hidrólise da acetilcolina pela ACh foi determinada segundo procedimento descrito por ELLMAN²⁰⁵, utilizando ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB), sob comprimento de onda de 412 nm, monitorando a formação do 5-tio-2-nitrobenzoato. Somente o tecido muscular foi utilizado para este bioensaio. Uma alíquota de 20 μl de homogeneizado foi adicionado a uma mistura contendo tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,5), acetilcolina (3,75 mM) e DTNB (6,4 mM). A atividade da AChE foi expressa em unidades (U) por miligrama de proteína. A unidade U foi definida como a quantidade de enzima necessária para formação de 1 μmol do produto da reação por minuto.

5.13 Análises estatísticas

Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão. Depois de submetidos ao teste de normalidade (D'Agostino & Pearson), as diferenças entre os animais expostos em relação aos animais controle foram detectadas por análise de variância (ANOVA) one-way, seguida pelo pós-teste de

Bonferroni, utilizando software GraphPad Prism 5.0. Diferenças estatisticamente significantes foram consideradas quando $P < 0,05$ em relação ao grupo controle.

5.14 Ensaios de biotransformação *in vitro* utilizando frações “S9” de fígado de truta

Obtenção e caracterização das frações “S9” de fígado de truta

Os ensaios de biotransformação foram realizados na Baylor University (Waco, TX, EUA), sob supervisão do professor Dr. Bryan W. Brooks. Os experimentos foram conduzidos utilizando as frações S9 obtidas, seguindo procedimento descrito por JOHANNING *et al*¹⁵⁴, com poucas modificações.

As frações S9 de fígado de truta (*Onchorynchus mykiss*) foram provenientes do laboratório da U.S. Environmental Protection Agency (Duluth, MN, EUA). A caracterização destas frações (concentração protéica e de GSH) também foi realizada no mesmo laboratório.

Os procedimentos foram realizados segundo CONNORS *et al*²⁰⁶, em que foram utilizadas trutas de ambos os sexos, com idade aproximada de 1,5 anos e pesando aproximadamente 350 g. Os animais sofreram eutanásia com solução de etil 3-aminobenzoato metanosulfonato (MS222, 250 mg L⁻¹), e o fígado foi coletado. O homogeneizado foi preparado em solução tampão TRIS-EDTA (50 mM, pH 7,8) com auxílio de almofariz e pistilo. Após centrifugação (13000 g; 4 °C) por 20 minutos, a fração S9 foi coletada e rapidamente armazenada à -80°C.

Ensaios de biotransformação *in vitro*

As frações S9 de fígado foram pré-incubadas no gelo, com solução de alameticina (25 µg mL⁻¹) por 15 minutos, em frascos de vidro de 1,0 mL. A alameticina é utilizada para criar poros no retículo endoplasmático, facilitando reações de glucoronidação. Os cofatores NADPH, ácido uridina-5'-difosfoglucurônico (UDPGA), adenosina3'-fosfato 5-fosfosulfato (PAPS), e GSH (concentrações de 2 mM, 2 mM, 0,1 mM, e 5 mM, respectivamente) preparadas em tampão fosfato de potássio (100 mM; pH 7,8) foram adicionadas ao meio reacional e incubadas por mais 10 minutos, a 11°C sob agitação. A reação foi iniciada com a adição de 5 µL do composto alvo, preparado em água ultrapura. A concentração final do substrato no

meio reacional foi de 2,0 μM , num volume total de 200 μL e concentração protéica final de 1,0 mg mL^{-1} .

Para o grupo controle, foram utilizadas amostras S9 inativas após processo de aquecimento. Cada reação foi finalizada em intervalos de tempo regulares (30 minutos) com adição de 600 μL de metanol gelado. O tempo total de incubação foi de 180 minutos, e cada ponto coletado em duplicata. A cada amostra foi adicionado 25 μL do padrão interno (preparado na concentração de 100 mg L^{-1}), homogeneizadas por 15 segundos, e centrifugadas a 10000 g por 15 minutos, a 4°C. Sobrenadantes foram coletados, filtrados em filtros de membrana de celulose (poro de 0,2 μM) e analisados por LC-MS.

Análise por LC-MS

Para as análises de biotransformação *in vitro* foi utilizado um sistema cromatográfico modelo Thermo Accela Bundle, acoplado a um Thermo LTQ Orbitrap Discovery®, assistido pelo software Xcalibur. As análises cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna Extend-C18, de 15 cm \times 2,1 mm de dimensões (5 μm , 80 Å; Agilent Technologies, Palo Alto, EUA) conectadas a uma pré-coluna Extend-C18, de dimensões 12,5 mm \times 2,1 mm (5 μm , 80 Å; Agilent Technologies).

Como fase móvel, o solvente A foi composto por água ultrapura (Millipore, Billerica, EUA) com 0,1% de ácido fórmico (v.v.), e metanol foi o solvente B. O gradiente linear, sob vazão de 0,5 mL min^{-1} , iniciou-se com 3% de B, até 97% em 10 minutos, seguida da volta para 3% de B em 1 minuto, e o acondicionamento para a próxima corrida em 5 minutos.

O espectrômetro de massas, com fonte de ionização do tipo eletrospray, operou em modo positivo (exceto para diclofenaco e o florfenicol, em que foi utilizado o modo negativo de ionização), sob os seguintes parâmetros: temperatura do capilar: 275°C; voltagem da fonte: 5 kV; corrente da fonte: 100 μA ; voltagem do capilar: 15 V; tube lens 60 V. Para a polaridade (-): temperatura do capilar: 275°C; voltagem da fonte: 3,5 kV; corrente da fonte: 100 μA ; voltagem do capilar: -34 V; tube lens -58,4 V.

5.15 Tratamento dos dados

As concentrações dos compostos analisados foram transformadas em logaritmos, e plotados *versus* o tempo da reação, e avaliados por regressão linear. Os valores do ângulo de inclinação da reta para cada regressão (fração S9 ativa e inativa) foram comparados para diferenças significativas ($p < 0,05$) utilizando o teste t de Student. No caso de diferenças significativas, a constante de depleção (k ; hr^{-1}) foi calculada de acordo com a equação:

$$k = -2.3 * \text{inclinação da reta}$$

A constante obtida foi dividida pela concentração proteica de S9 utilizada, para calcular a depuração intrínseca hepática (Intrinsic clearance), e por fim extrapolar para depuração intrínseca hepática por grama de fígado ($Cl_{\text{IN VITRO, INT}}$; mL/hr/g fígado).

Referências

Referências

1. PETROVIC, M.; GONZALEZ, S. & BARCELÓ, D., "Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **22**(10): 685, 2003.
2. KUMAR, A. & XAGORARAKI, I., "Human health risk assessment of pharmaceuticals in water: An uncertainty analysis for meprobamate, carbamazepine, and phenytoin". *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. **57**(2-3): 146, 2010.
3. FENT, K.; WESTON, A.A. & CAMINADA, D., "Ecotoxicology of human pharmaceuticals". *Aquatic Toxicology*. **76**(2): 122, 2006.
4. LISHMAN, L.; SMYTH, S.A.; SARAFIN, K.; KLEYWEGT, S.; TOITO, J.; PEART, T.; LEE, B.; SERVOS, M.; BELAND, M. & SETO, P., "Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogens by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada". *Science of The Total Environment*. **367**(2-3): 544, 2006.
5. BARCELÓ, D., "Emerging pollutants in water analysis". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **22**(10): xiv, 2003.
6. KHETAN SUSHIL, K. & COLLINS TERRENCE, J., "Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to Green Chemistry". *Chemical reviews*. **107**(6): 2319, 2007.
7. MADUREIRA TANIA, V.; BARREIRO JULIANA, C.; ROCHA MARIA, J.; ROCHA, E.; CASS QUEZIA, B. & TIRITAN MARIA, E., "Spatiotemporal distribution of pharmaceuticals in the Douro River estuary (Portugal)". *The Science of the total environment*. **408**(22): 5513, 2009.
8. RICHARDSON, B.J.; LAM, P.K.S. & MARTIN, M., "Emerging chemicals of concern: Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Asia, with particular reference to Southern China". *Marine Pollution Bulletin*. **50**(9): 913, 2005.
9. ROBERTS, P.H. & THOMAS, K.V., "The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment". *Science of The Total Environment*. **356**(1-3): 143, 2006.
10. JJEMBA, P.K., "Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment". *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **63**(1): 113, 2006.
11. CASS, Q.B. & CASSIANO, N.M., *Cromatografia Líquida: Novas tendências e aplicações*. 2015, Rio de Janeiro: Elsevier.
12. CARLSSON, C.; JOHANSSON, A.-K.; ALVAN, G.; BERGMAN, K. & KAHLER, T., "Are pharmaceuticals potent environmental pollutants?: Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients". *Science of The Total Environment*. **364**: 67, 2006.
13. BILA, D.M.D., MÁRCIA "Fármacos no meio ambiente". *Química Nova*. **26**(4): 523, 2003.
14. HIRSCH, R.; TERNES, T.; HABERER, K. & KRATZ, K.-L., "Occurrence of antibiotics in the aquatic environment". *The Science of the total environment*. **225**(1-2): 109, 1999.
15. HEBERER, T., "Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data". *Toxicology Letters*. **131**(1-2): 5, 2002.

16. ANDREOZZI, R.; MAROTTA, R.; PINTO, G. & POLLIO, A., "Carbamazepine in water: persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity". *Water Research*. **36**(11): 2869, 2002.
17. GIBS, J.; STACKELBERG, P.E.; FURLONG, E.T.; MEYER, M.; ZAUGG, S.D. & LIPPINCOTT, R.L., "Persistence of pharmaceuticals and other organic compounds in chlorinated drinking water as a function of time". *Science of The Total Environment*. **373**(1): 240, 2007.
18. YAMAMOTO, H.; NAKAMURA, Y.; MORIGUCHI, S.; NAKAMURA, Y.; HONDA, Y.; TAMURA, I.; HIRATA, Y.; HAYASHI, A. & SEKIZAWA, J., "Persistence and partitioning of eight selected pharmaceuticals in the aquatic environment: Laboratory photolysis, biodegradation, and sorption experiments". *Water Research*. **43**(2): 351, 2009.
19. MELO, S.A.S.; TROVO, A.G.; BAUTITZ, I.R. & NOGUEIRA, R.F.P., "Degradation of residual pharmaceuticals by advanced oxidation processes". *Quimica Nova*. **32**(1): 188, 2009.
20. LAM, M.W. & MABURY, S.A., "Photodegradation of the pharmaceuticals, atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole in natural waters". *Aquatic Sciences*. **67**(2): 177, 2005.
21. GUILLEMOT, D., "Antibiotic use in humans and bacterial resistance". *Current Opinion in Microbiology*. **2**(5): 494, 1999.
22. MOLDOVAN, Z., "Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania". *Chemosphere*. **64**(11): 1808, 2006.
23. YOON, Y.; RYU, J.; OH, J.; CHOI, B.-G. & SNYDER, S.A., "Occurrence of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals, and personal care products in the Han River (Seoul, South Korea)". *Science of The Total Environment*. **408**(3): 636, 2010.
24. TERNES, T.A., "Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers". *Water Research*. **32**(11): 3245, 1998.
25. ZUCCATO, E.; CASTIGLIONI, S.; BAGNATI, R.; CHIABRANDO, C.; GRASSI, P. & FANELLI, R., "Illicit drugs, a novel group of environmental contaminants". *Water Research*. **42**(4-5): 961, 2008.
26. KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R.M. & GUWY, A.J., "The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK". *Water Research*. **42**(13): 3498, 2008.
27. ELJARRAT, E. & BARCELÓ, D., "Priority lists for persistent organic pollutants and emerging contaminants based on their relative toxic potency in environmental samples". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **22**(10): 655, 2003.
28. PETROVIC, M.; HERNANDO, M.D.; DIAZ-CRUZ, M.S. & BARCELO, D., "Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review". *Journal of Chromatography A*. **1067**(1-2): 1, 2005.
29. KÜMMERER, K., "Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I". *Chemosphere*. **75**(4): 417, 2009.
30. DIAZ-CRUZ, M.S. & BARCELO, D., "LC-MS2 trace analysis of antimicrobials in water, sediment and soil". *TrAC, Trends in Analytical Chemistry*. **24**(7): 645, 2005.
31. LOCATELLI, M.A.F.S., F. F.; JARDIM, W. F. , "Determination of Antibiotics in Brazilian Surface Waters Using Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry". *Arch Environ Contam Toxicol*, 2010.

32. MARTINEZ, M.; MCDERMOTT, P. & WALKER, R., "Pharmacology of the fluoroquinolones: A perspective for the use in domestic animals". *Veterinary Journal*. **172**(1): 10, 2006.
33. CROSS, J.J.T., "Fluoroquinolones". *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*. **12**(3): 211, 2001.
34. STRATTON, C.W., "Mechanisms of activity and resistance for fluoroquinolones". *Antimicrobics and Infectious Diseases Newsletter*. **14**(10): 69, 1995.
35. BOLAN, M.K., "The Newer Fluoroquinolones". *Infectious disease clinics of North America*. **23**(4): 1027, 2009.
36. BLONDEAU, J.M., "Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance". *Survey of Ophthalmology*. **49**(2, Supplement 2): S73, 2004.
37. HIGGINS, P.G.; FLUIT, A.C. & SCHMITZ, F.J., "Fluoroquinolones: Structure and target sites". *Current Drug Targets*. **4**(2): 181, 2003.
38. XIAO, Y.; CHANG, H.; JIA, A. & HU, J.Y., "Trace analysis of quinolone and fluoroquinolone antibiotics from wastewaters by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*. **1214**(1-2): 100, 2008.
39. YIRUHAN; WANG, Q.-J.; MO, C.-H.; LI, Y.-W.; GAO, P.; TAI, Y.-P.; ZHANG, Y.; RUAN, Z.-L. & XU, J.-W., "Determination of four fluoroquinolone antibiotics in tap water in Guangzhou and Macao". *Environmental Pollution (Oxford, United Kingdom)*. **158**(7): 2350, 2010.
40. MITANI, K. & KATAOKA, H., "Determination of fluoroquinolones in environmental waters by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Analytica Chimica Acta*. **562**(1): 16, 2006.
41. CASS, Q.B.; LIMA, V.V.; OLIVEIRA, R.V.; CASSIANO, N.M.; DEGANI, A.L.G. & PEDRAZZOLI, J., "Enantiomeric determination of the plasma levels of omeprazole by direct plasma injection using high-performance liquid chromatography with achiral-chiral column-switching". *Journal of Chromatography B*. **798**(2): 275, 2003.
42. ROGATSKY, E. & STEIN, D., "Evaluation of matrix effect and chromatography efficiency: new parameters for validation of method development". *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. **16**(11): 1757, 2005.
43. BARREIRO, J.C.; VANZOLINI, K.L.; MADUREIRA, T.V.; TIRITAN, M.E. & CASS, Q.B., "A column-switching method for quantification of the enantiomers of omeprazole in native matrices of waste and estuarine water samples". *Talanta*. **82**: 384, 2010.
44. KLOEPFER, A.; QUINTANA, J.B. & REEMTSMA, T., "Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples". *Journal of Chromatography, A*. **1067**(1-2): 153, 2005.
45. WU, J.; QIAN, X.; YANG, Z. & ZHANG, L., "Study on the matrix effect in the determination of selected pharmaceutical residues in seawater by solid-phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography-electrospray ionization low-energy collision-induced dissociation tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*. **1217**(9): 1471, 2010.
46. TRUFELLI, H.; PALMA, P.; FAMIGLINI, G. & CAPPIELO, A., "An overview of matrix effects in liquid chromatography - Mass spectrometry". *Mass Spectrometry Reviews*, 2010.

47. DIONÍSIO, A.G.G.; BATISTÃO, M.B.; SANTOS, V.B.D.; ICERI, T.M.; CASSIANO, N.M. & CASS, Q.B., "Novas tendências em preparo de amostras para Cromatografia Líquida". *Scientia Chromatographica*. **2**(3): 19, 2010.
48. CASSIANO, N.M.; BARREIRO J., C.; MORAES, M.C.; OLIVEIRA, R.V. & CASS QUEZIA, B., "Restricted-access media supports for direct high-throughput analysis of biological fluid samples: review of recent applications". *Bioanalysis*. **1**(3): 577, 2009.
49. MULLETT, W.M., "Determination of drugs in biological fluid by direct injection of samples for liquid-chromatographic analysis". *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **70**(2): 263, 2007.
50. SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S. & VEUTHEY, J.L., "Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis". *Journal of Chromatography B*. **801**(2): 141, 2004.
51. HOGENDOORN, E.A.; VAN ZONEN, P.; POLETTINI, A.; MARRUBINI BOULAND, G. & MONTAGNA, M., "The Potential of Restricted Access Media Columns As Applied in Coupled-Column LC/LC-TSP/MS/MS for the High-Speed Determination of Target Compounds in Serum. Application to the Direct Trace Analysis of Salbutamol and Clenbuterol". *Analytical Chemistry*. **70**(7): 1362, 1998.
52. SCHOENMAKERS, P.; MARRIOTT, P. & BEENS, J., "Nomenclature and conventions in comprehensive multidimensional chromatography". *LC-GC Europe*. **16**(6): 335, 2003.
53. CASSIANO, N.M.; LIMA, V.V.; OLIVEIRA, R.V.; PIETRO, A.C. & CASS, Q.B., "Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **385**(8): 1580, 2006.
54. GEORGI, K. & BOOS, K.-S., "Control of Matrix Effects in Bioanalytical MS-MS Using On-Line Multidimensional Solid-Phase Extraction". *LC-GC North America*. **23**(4): 396, 2005.
55. CASSIANO, N.M.; BARREIRO, J.C.; OLIVEIRA, R.V. & CASS, Q.B., "Direct bioanalytical sample injection with 2D LC-MS". *Bioanalysis*. **4**(22): 2737, 2012.
56. PELLETT, J.; LUKULAY, P.; MAO, Y.; BOWEN, W.; REED, R.; MA, M.; MUNGER, R.C.; DOLAN, J.W.; WRISLEY, L.; MEDWID, K.; TOLTL, N.P.; CHAN, C.C.; SKIBIC, M.; BISWAS, K.; WELLS, K.A. & SNYDER, L.R., "'Orthogonal' separations for reversed-phase liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*. **1101**(1-2): 122, 2006.
57. PHILLIPS, J.B. & BEENS, J., "Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a hyphenated method with strong coupling between the two dimensions". *Journal of Chromatography A*. **856**(1-2): 331, 1999.
58. JUNIOR, E.S.; ROCHA, J.C.; ROSA, A.H.; ZARA, L.F. & DOS SANTOS, A., "Substâncias Húmicas Aquáticas: fracionamento molecular e caracterização de rearranjos internos após complexação com íons metálicos.". *Química Nova*. **24**(3) 2001.
59. RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; CHAMORRO, S.; MARTI, E.; HUERTA, B.; GROS, M.; SÀNCHEZ-MELSIÓ, A.; BORREGO, C.M.; BARCELÓ, D. & BALCÁZAR, J.L., "Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river". *Water Research*. **69**(0): 234, 2015.

60. PEREIRA, A.M.P.T.; SILVA, L.J.G.; MEISEL, L.M.; LINO, C.M. & PENA, A., "Environmental impact of pharmaceuticals from Portuguese wastewaters: geographical and seasonal occurrence, removal and risk assessment". *Environmental Research*. **136**(0): 108, 2015.
61. ROSSMANN, J.; SCHUBERT, S.; GURKE, R.; OERTEL, R. & KIRCH, W., "Simultaneous determination of most prescribed antibiotics in multiple urban wastewater by SPE-LC-MS/MS". *Journal of Chromatography B*. **969**(0): 162, 2014.
62. WAGIL, M.; KUMIRSKA, J.; STOLTE, S.; PUCKOWSKI, A.; MASZKOWSKA, J.; STEPNOWSKI, P. & BIAŁK-BIELIŃSKA, A., "Development of sensitive and reliable LC-MS/MS methods for the determination of three fluoroquinolones in water and fish tissue samples and preliminary environmental risk assessment of their presence in two rivers in northern Poland". *Science of The Total Environment*. **493**(0): 1006, 2014.
63. HU, F.-Y.; HE, L.-M.; YANG, J.-W.; BIAN, K.; WANG, Z.-N.; YANG, H.-C. & LIU, Y.-H., "Determination of 26 veterinary antibiotics residues in water matrices by lyophilization in combination with LC-MS/MS". *Journal of Chromatography B*. **949-950**(0): 79, 2014.
64. COUTU, S.; WYRSCH, V.; WYNN, H.K.; ROSSI, L. & BARRY, D.A., "Temporal dynamics of antibiotics in wastewater treatment plant influent". *Science of The Total Environment*. **458-460**(0): 20, 2013.
65. ADACHI, F.; YAMAMOTO, A.; TAKAKURA, K.-I. & KAWAHARA, R., "Occurrence of fluoroquinolones and fluoroquinolone-resistance genes in the aquatic environment". *The Science of The Total Environment*. **444**: 508, 2013.
66. GRABIC, R.; FICK, J.; LINDBERG, R.H.; FEDOROVA, G. & TYSKLIND, M., "Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in environmental samples using liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry". *Talanta*. **100**(0): 183, 2012.
67. GROS, M.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S. & BARCELÓ, D., "Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*. **1292**(0): 173, 2013.
68. MONTESDEOCA-ESPONDA, S.; SOSA-FERRERA, Z. & SANTANA-RODRÍGUEZ, J.J., "Comparasion of solid phase extraction using micellar desorption combined with LC-FD and LC-MS/MS in the determination of antibiotics fluoroquinolone residues in sewage samples". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **35**(14): 2081, 2012.
69. GRACIA-LOR, E.; SANCHO, J.V. & HERNÁNDEZ, F., "Multi-class determination of around 50 pharmaceuticals, including 26 antibiotics, in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*. **1218**(16): 2264, 2011.
70. SOUSA, M.A.; GONÇALVES, C.; CUNHA, E.; HAJŠLOVÁ, J. & ALPENDURADA, M.F., "Cleanup strategies and advantages in the determination of several therapeutic classes of pharmaceuticals in wastewater samples by SPE-LC-MS/MS". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **399**(2): 807, 2011.
71. PRIETO, A.; SCHRADER, S.; BAUER, C. & MOEDER, M., "Synthesis of a molecularly imprinted polymer and its application for microextraction by packed sorbent for the determination of fluoroquinolone related compounds in water". *Analytica Chimica Acta*. **685**(2): 146, 2011.

72. TUC DINH, Q.; ALLIOT, F.; MOREAU-GUIGON, E.; EURIN, J.; CHEVREUIL, M. & LABADIE, P., "Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC-MS/MS". *Talanta*. **85**(3): 1238, 2011.
73. BABIĆ, S.; MUTAVDZIĆ PAVLOVIĆ, D.; AŠPERGER, D.; PERIŠA, M.; ZRNČIĆ, M.; HORVAT, A.J.M. & KAŠTELAN-MACAN, M., "Determination of multi-class pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS)". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **398**(3): 1185, 2010.
74. SEGURA, P.; GAGNON, C. & SAUVÉ, S., "Application of Turbulent Flow Chromatography Load Columns for the On-Line Analysis of Anti-Infectives in Wastewaters". *Chromatographia*. **70**(1-2): 239, 2009.
75. MADUREIRA, T.V.; RIBEIRO, A.R. & TIRITAN, M.E., *Quantificação de fármacos em águas no ambiente*, in *Cromatografia Líquida: novas tendências e aplicações*, CASS, Q.B. & CASSIANO, N.M., Editors. 2015, Elsevier: Rio de Janeiro. p. 197.
76. PATEL, R.; ROY, M. & DUTTA, G., "Mass spectrometry- A review". *Vet. World*. **5**(3): 185, 2012.
77. CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H. & JARDIM, I.C.S.F., "The state of the art of chromatography associated with the tandem mass spectrometry for toxic compound analyses in food". *O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos*. **31**(3): 623, 2008.
78. HOLČAPEK, M.; JIRÁSKO, R. & LÍSA, M., "Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques". *Journal of Chromatography A*. **1259**: 3, 2012.
79. CASSIANO, N.M.; BARREIRO, J.C.; OLIVEIRA, R.V. & CASS, Q.B., "Direct bioanalytical sample injection with 2DLC-MS". *Bioanalysis*. **4**(22) 2012.
80. PITT, J.J., "Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry". *The Clinical Biochemist Reviews*. **30**(1): 19, 2009.
81. LIANG, Y.; WANG, G.; XIE, L. & SHENG, L., "Recent development in liquid chromatography/mass spectrometry and emerging technologies for metabolite identification". *Current Drug Metabolism*. **12**(4): 329, 2011.
82. HOCART, C.H., *Mass Spectrometry: An Essential Tool for Trace Identification and Quantification*, in *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology*, MANDER, L. & LUI, H.-W., Editors. 2010, Elsevier: Oxford.
83. YODIM, K.A. & SAUNDERS, K.C., "A review of LC-MS techniques and high-throughput approaches used to investigate drug metabolism by cytochrome P450s". *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **878**(17-18): 1326, 2010.
84. DE LIMA, V.V.; CASSIANO, N.M. & CASS, Q.B., "Desenvolvimento de colunas cromatográficas de meios de acesso restrito proteína-imobilizada e suas avaliações para análise de fármacos com injeção direta de plasma humano". *Química Nova*. **29**(1): 72, 2006.
85. MULLETT, W.M., "Determination of drugs in biological fluids by direct injection of samples for liquid-chromatographic analysis". *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **70**(2): 263, 2007.
86. JOHN W. NICHOLS, P.N.F., LAWRENCE P. BURKHARD, "In vitro - In vivo extrapolation of quantitative hepatic biotransformation data for fish. II. Modeled

- effects on chemical bioaccumulation ". *Environmental Toxicology and Chemistry*. **26**(6): 1304, 2007.
87. BRODINT, F.J., JONSSON M, KLAMINDER J., "Dilute Concentrations of a Psychiatric Drug Alter Behavior of Fish from Natural Populations". *Science*. **339**: 814, 2013.
88. VALENTI JR, T.W.; GOULD, G.G.; BERNINGER, J.P.; CONNORS, K.A.; KEELE, N.B.; PROSSER, K.N. & BROOKS, B.W., "Human Therapeutic Plasma Levels of the Selective Serotonin Reuptake Inhibitor (SSRI) Sertraline Decrease Serotonin Reuptake Transporter Binding and Shelter-Seeking Behavior in Adult Male Fathead Minnows". *Environmental Science & Technology*. **46**: 2427–2435, 2012.
89. BERNINGER, J.P., BROOKS B W, "Leveraging mammalian pharmaceutical toxicology and pharmacology data to predict chronic fish responses to pharmaceuticals". *Toxicology Letters*. **193**: 69, 2010.
90. CABELLO, F.C.; GODFREY HP FAU - TOMOVA, A.; TOMOVA A FAU - IVANOVA, L.; IVANOVA L FAU - DOLZ, H.; DOLZ H FAU - MILLANAO, A.; MILLANAO A FAU - BUSCHMANN, A.H. & BUSCHMANN, A.H., "Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health". *Environ Microbiol*. **15**(7): 1917, 2013.
91. CASS, Q.B.; GOMES, R.F.; CALAFATTI, S.A. & PEDRAZOLLI, J., "Determination of amoxicillin in human plasma by direct injection and coupled-column high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*. **987**(1-2): 235, 2003.
92. OLIVEIRA, R.V. & CASS, Q.B., "Evaluation of liquid chromatographic behavior of cephalosporin antibiotics using restricted access medium columns for on-line sample cleanup of bovine milk". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**(4): 1180, 2006.
93. BELAZ, K.R.A.; CASS, Q.B. & OLIVEIRA, R.V., "Determination of albendazole metabolites by direct injection of bovine plasma and multidimensional achiral-chiral high performance liquid chromatography". *Talanta*. **76**(1): 146, 2008.
94. MENEZES, M.L. & FELIX, G., "Analysis of organochlorine pesticides in plain milk using direct injection on an ISRP column, with column switching". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **19**(19): 3221, 1996.
95. CASSIANO, N.M.; BARREIRO, J.C. & CASS, Q.B., "New Trends in sample preparation in Brazil: an overview of bioanalytical applications by liquid chromatography". *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **25**: 9, 2014.
96. DE PAULA, F.C.C.R.; DE PIETRO, A.C. & CASS, Q.B., "Simultaneous quantification of sulfamethoxazole and trimethoprim in whole egg samples by column-switching high-performance liquid chromatography using restricted access media column for on-line sample clean-up". *Journal of Chromatography A*. **1189**: 221, 2008.
97. VANZOLINI, K.L., "Métodos para a determinação enantiomérica dos fármacos omeprazol, lansoprasol e pantoprazol em águas residuais e de estuário". São Carlos, Universidade Federal de São Carlos. **Dissertação de Mestrado** 2009.
98. QIANG, Z. & ADAMS, C., "Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics". *Water Research*. **38**(12): 2874, 2004.
99. WISHART D. S.; KNOX C.; GUO A. C.; SHRIVASTAVA S.; HASSANALI M.; STOTHARD P.; CHANG Z. & J., W., "DrugBank: a comprehensive resource

- for in silico drug discovery and exploration". *Nucleic Acids Research*. **34 (Database issue): D668-72**. (16381955) 2006.
100. IMMA FERRER; JERRY A. ZWEIGENBAUMB & THURMAN, E.M., "Analysis of 70 Environmental Protection Agency priority pharmaceuticals in water by EPA Method 1694". *Journal of Chromatography A*. **1217**: 5674, 2010.
 101. EMA, "European Medicines Agency - Guideline on bioanalytical method validation". 2011.
 102. 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". *Quimica Nova*. **31**(3): 623, 2008.
 103. YE, Z.; WEINBERG, H.S. & MEYER, M.T., "Trace Analysis of Trimethoprim and Sulfonamide, Macrolide, Quinolone, and Tetracycline Antibiotics in Chlorinated Drinking Water Using Liquid Chromatography Electrospray Tandem Mass Spectrometry". *Analytical Chemistry*. **79**(3): 1135, 2006.
 104. AILETTE PRIETO; MONIKA MÖDER; ROSARIO RODIL; LORENZ ADRIAN & MARCO-URREA, E., "Degradation of the antibiotics norfloxacin and ciprofloxacin by a white-rot fungus and identification of degradation products". *Bioresource Technology*. **102**: 10987, 2011.
 105. BABIC, S.; MUTAVDZIC PAVLOVIC, D.; ASPERGER, D.; PERISA, M.; ZRNCIC, M.; HORVAT, A.J.M. & KASTELAN-MACAN, M., "Determination of multi-class pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS)". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **398**(3): 1185, 2010.
 106. DORIVAL - GARCÍA, N.; ZAFRA - GÓMEZ, A.; CANTARERO, S.; NAVALÓN, A. & VÍLCHEZ, J.L., "Simultaneous determination of 13 quinolone antibiotic derivatives in wastewater samples using solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Microchemical Journal*. **106**(0): 323, 2012.
 107. CHEN, L.; ZHANG, X.; XU, Y.; DU, X.; SUN, X.; SUN, L.; WANG, H.; ZHAO, Q.; YU, A.; ZHANG, H. & DING, L., "Determination of fluoroquinolone antibiotics in environmental water samples based on magnetic molecularly imprinted polymer extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Analytica Chimica Acta*. **662**(1): 31, 2010.
 108. TRUFELLI, H.; PALMA, P.; FAMIGLINI, G. & CAPPIELLO, A., "An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry". *Mass Spectrometry Reviews*, 2010.
 109. HARTMANN, A.; ALDER, A.C.; KOLLER, T. & WIDMER, R.M., "Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater". *Environmental Toxicology and Chemistry*. **17**(3): 377, 1998.
 110. ALEJANDRO J. RAMIREZ, M.A.M., BRYAN W. BROOKS, AND C. KEVIN CHAMBLISS, "Analysis of Pharmaceuticals in Fish Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry". *Analytical Chemistry*. **79**(8): 3155, 2007.
 111. XU, W.; ZHU, X.; WANG, X.; DENG, L. & ZHANG, G., "Residues of enrofloxacin, furazolidone and their metabolites in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)". *Aquaculture*. **254**(1-4): 1, 2006.
 112. PASCHOAL, J.A.R.; REYES, F.G.R. & RATH, S., "Quantitation and identity confirmation of residues of quinolones in tilapia fillets by LC-ESI-MS-MS QToF". *Anal Bioanal Chem*. **394**: 2213, 2009.

113. SANTOS N. GARCIA; MICHAEL FOSTER; LISA A. CONSTANTINE & HUGGETT, D.B., "Field and laboratory fish tissue accumulation of the anti-convulsant drug carbamazepine". *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **84**: 207, 2012.
114. DENADAI, M. & CASS, Q.B., "Simultaneous determination of fluoroquinolones in environmental water by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with direct injection: A green approach. ". *Journal of Chromatography A*. **1418**: 177, 2015.
115. GÜL, S.; BELGE-KURUTAS, E.; YILDIZ, E.; AHAN, A. & DORAN, F., "Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dan Lake, Turkey". *Environment International*. **30**: 605, 2004.
116. ÜNER, N.; ORUÇ, E. & SEVGILER, Y., "Oxidative stress-related and ATPase effects of etoxazole in different tissues of *Oreochromis niloticus*". *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **20**(1): 99, 2005.
117. LUSHCHAK, V.I., "Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals". *Aquatic Toxicology*. **101**(1): 13, 2011.
118. BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. & DAVID, J.P., "Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo". *Quimica Nova*. **29**(1): 113, 2006.
119. MATOS, P.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; PEIXOTO, F.; CARROLA, J. & ROCHA, E., "Biochemical and histological hepatic changes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to carbaryl". *Pesticide Biochemistry and Physiology*. **89**(1): 73, 2007.
120. SCHLENK, D.; CELANDER, M.; GALLAGHER, E.P.; GEORGE, S.; JAMES, M.; KULLMAN, S.W.; VAN DEN HURK, P. & WILLETT, K., *Biotransformation in fish*, in *The Toxicology of Fishes*, DI GIULIO, R.T. & HINTON, D.E., Editors. 2008, CRC Press.
121. FANG, Y.Z.; YANG, S. & WU, G., "Free radicals, antioxidants, and nutrition". *Nutrition*. **18**: 872, 2002.
122. GUTTERIDGE, J.M.C., "Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. ". *Clinical Chemistry*. **41/42**: 1819, 1995.
123. FULTON, M.H. & KEY, P.B., "Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects.". *Environ. Toxicol. Chem.* **20**: 37, 2001.
124. TU, H.T.; SILVESTRE, F.; SCIPPO, M.-L.; THOME, J.-P.; PHUONG, N.T. & KESTEMONT, P., "Acetylcholinesterase activity as a biomarker of exposure to antibiotics and pesticides in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)". *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **72**: 1463, 2009.
125. REDDY, P.M. & PHILIP, G.H., "In vivo inhibition of AChE and ATPase activities in the tissues of freshwater fish, *Cyprinus carpio* exposed to technical grade cypermethrin". *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. **52**(4): 619, 1994.
126. EBERT, I.; BACHMANN, J.; KUEHNEN, U.; KUESTER, A.; KUSSATZ, C.; MALETZKI, D. & SCHLUETER, C., "Toxicity of the fluoroquinolone antibiotics enrofloxacin and ciprofloxacin to photoautotrophic aquatic organisms". *Environmental Toxicology and Chemistry*. **30**(12): 2786, 2011.
127. NUNES, B.; GAIO, A.R.; CARVALHO, F. & GUILHERMINO, L., "Behaviour and biomarkers of oxidative stress in *Gambusia holbrooki* after acute exposure to widely used pharmaceuticals and a detergent". *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **71**(2): 341, 2008.

128. SHIBATTA, O.A. & SILVA-SOUZA, Â.T., "Fish, Ribeirão do Feijão Basin, São Carlos, São Paulo, Brazil.". *Check List*. **4**(1): 75, 2008.
129. ALMEIDA, J.A.; DINIZ, Y.S.; MARQUES, S.F.G.; FAINE, L.A.; RIBAS, B.O.; BURNEIKO, R.C. & NOVELLI, E.L.B., "The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination". *Environment International*. **27**(8): 673, 2002.
130. ATLI, G.; ALPTEKIN, Ö.; TÜKEL, S. & CANLI, M., "Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*". *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. **143**(2): 218, 2006.
131. DI GIULIO, R.T. & HINTON, D.E., *The Toxicology of Fishes*. 2008: CRC Press.
132. BARTRAM, A.E.; MJ, W.; HUGGETT, D.B.; MCCORMACK, P.; CONSTANTINE, L.A.; HETHERIDGE, M.J.; HUTCHINSON, T.H.; KINTER, L.B.; ERICSON, J.F.; SUMPTER, J.P. & OWEN, S.F., "In vivo and in vitro liver and gill EROD activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to the beta-blocker propranolol". *Environmental Toxicology*. **27**(573-582) 2012.
133. HAN, X.; NABB DL FAU - YANG, C.-H.; YANG CH FAU - SNAJDR, S.I.; SNAJDR SI FAU - MINGOIA, R.T. & MINGOIA, R.T., "Liver microsomes and S9 from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): comparison of basal-level enzyme activities with rat and determination of xenobiotic intrinsic clearance in support of bioaccumulation assessment". *Environmental Toxicology*. **28**(3): 481, 2009.
134. TU, H.T.; SILVESTRE, F.; BERNARD, A.; DOUNY, C.; PHUONG, N.T.; TAO, C.T.; MAGHUIN-ROGISTER, G. & KESTEMONT, P., "Oxidative stress response of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) to enrofloxacin and to culture system". *Aquaculture*. **285**(1-4): 244, 2008.
135. HALLIWELL B; CLEMENT MV & LH., L., "Hydrogen peroxide in the human body.". *FEBS Lett*. **486**: 10, 2000.
136. MONTEIRO, D.A.; RANTIN, F.T. & KALININ, A.N., "Inorganic mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the tropical freshwater fish matrinxa, *Brycon amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829)". *Ecotoxicology*. **19**: 105, 2010.
137. NIE, X.-P.; LIU, B.-Y.; YU, H.-J.; LIU, W.-Q. & YANG, Y.-F., "Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole exposure to the antioxidant system in *Pseudokirchneriella subcapitata*". *Environmental Pollution*. **172**(0): 23, 2013.
138. MYERS, C.R., *Subcellular sites of xenobiotic-induced free-radical generation*. Free Radical Toxicology, ed. WALLACE, K.B. 1997, London: Taylor & Francis.
139. STURM, A.; DA SILVA DE ASSIS, H.C. & HANSEN, P.D., "Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potencial use in the monitoring of neurotoxic contamination". *Marine Environmental Research*. **47**: 389, 1999.
140. WANG, N.; NOEMIE, N.; HIEN, N.-N.; HUYNH, T.-T.; SILVESTRE, F.; PHUONG, N.-T.; DANYI, S.; WIDART, J.L.; DOUNY, C.; SCIPPO, M.-L.; KESTEMONT, P. & HUONG, D.-T.-T., "Adverse effects of enrofloxacin when associated with environmental stress in Tra catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)". *Chemosphere*. **77**(11): 1577, 2009.
141. DUTTA, H.M. & ARENDS, D.A., "Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish". *Environmental Research*. **91**: 157, 2003.

142. HOPFGARTNER, G.; VARESIO E FAU - TSCHAPPAT, V.; TSCHAPPAT V FAU - GRIVET, C.; GRIVET C FAU - BOURGOGNE, E.; BOURGOGNE E FAU - LEUTHOLD, L.A. & LEUTHOLD, L.A., "Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer for the analysis of small molecules and macromolecules". *J Mass Spectrom.* **39**(8): 845, 2004.
143. OLIVEIRA, R.V. & FERREIRA DA SILVA, B., *Analísadores de massas de alta resolução*, in *Cromatografia Líquida: Novas tendências e aplicações*, CASS, Q.B. & CASSIANO, N.M., Editors. 2015, Elsevier: Rio de Janeiro. p. 93.
144. MAKAROV, A.; DENISOV, E.; KHOLOMEEV, A.; BALSCHUN, W.; LANGE, O.; STRUPAT, K. & HORNING, S., "Performance Evaluation of a Hybrid Linear Ion Trap/Orbitrap Mass Spectrometer". *Anal. Chem.* **78**: 2113, 2006.
145. ZUBAREV, R.A. & MAKAROV, A., "Orbitrap Mass Spectrometry". *Analytical Chemistry.* **85**: 5288–5296, 2013.
146. HU, Q.; NOLL RJ FAU - LI, H.; LI H FAU - MAKAROV, A.; MAKAROV A FAU - HARDMAN, M.; HARDMAN M FAU - GRAHAM COOKS, R. & GRAHAM COOKS, R., "The Orbitrap: a new mass spectrometer". *J Mass Spectrom.* **40**(4): 430, 2005.
147. ROCHAT, B.; KOTTELAT E FAU - MCMULLEN, J. & MCMULLEN, J., "The future key role of LC-high-resolution-MS analyses in clinical laboratories: a focus on quantification". *Bioanalysis.* **24**(4): 2939, 2012.
148. RAMIREZ, A.J.; BRAIN, R.A.; USENKO, S.; MOTTALEB, M.A.; O'DONNELL, J.G.; STAHL, L.L.; WATHEN, J.B.; SNYDER, B.D.; PITT, J.L.; PEREZ-HURTADO, P.; DOBBINS, L.L.; BROOKS, B.W. & CHAMBLISS, C.K., "Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in fish: results of a national pilot study in the united states ". *Environmental Toxicology and Chemistry.* **28**(12): 2587, 2009.
149. RAMIREZ, A.J.; MOTTALEB, M.A.; BROOKS, B.W. & CHAMBLISS, C.K., "Analysis of Pharmaceuticals in Fish Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry". *Analytical Chemistry.* **79**(8): 3155, 2007.
150. STEWART F. OWEN, E.G., DUANE B. HUGGETT, THOMAS H. HUTCHINSON, JOANNE SAYE D, MATTHEW J. WINTER, JOHN P. SUMPTER, "Comparative physiology, pharmacology and toxicology of β -blockers: mammals versus fish". *Aquatic Toxicology.* **82**: 145, 2007.
151. NICHOLS, J.W.; HUGGETT, D.B.; ARNOT, J.A.; FITZSIMMONS, P.N. & COWAN-ELLSBERRY, C.E., "Toward improved models for predicting bioconcentration of well-metabolized compounds by rainbow trout using measured rates of in vitro intrinsic clearance". *Environmental Toxicology and Chemistry.* **32**(7): 1611, 2013.
152. GOMEZ, C.F.; CONSTANTINE, L. & HUGGETT, D.B., "The influence of gill and liver metabolism on the predicted bioconcentration of three pharmaceuticals in fish". *Chemosphere.* **81**: 1189, 2010.
153. BUHLER, D.R. & WANG-BUHLER, J.-L., "Rainbow trout cytochrome P450s: purification, molecular aspects, metabolic activity, induction and role in environmental monitoring". *Comparative Biochemistry and Physiology Part C.* **121**: 107, 1998.
154. JOHANNING, K.; HANCOCK, G.; ESCHER, B.; ADEKOLA, A.; BERNHARD, M.J.; COWAN-ELLSBERRY, C.; DOMORADZKI, J.; DYER, S.; EICKHOFF, C.; EMBRY, M.; ERHARDT, S.; FITZSIMMONS, P.; HALDER, M.; HILL, J.; HOLDEN, D.; JOHNSON, R.; RUTISHAUSER, S.; SEGNER, H.; SCHULTZ, I. & NICHOLS, J., "Assessment of metabolic stability using the rainbow trout

- (*Oncorhynchus mykiss*) liver S9 fraction". *Curr Protoc Toxicol.* **14**(Unit 14.10): 1, 2012.
155. SCHALCH, S.H.C.; FRANÇA, F.M. & PEREIRA DA SILVA, S.M., *Fitoterápicos na piscicultura: revisão comentada*, in *Aquicultura no Brasil: Novas Perspectivas*, TAVARES-DIAS, M. & MARIANO, W.D.S., Editors. 2015, Pedro & João Editores: São Carlos. p. 237.
 156. CARRASCHI, S.P.; SHIOGIRI, N.S.; VENTURINI, F.P.; CRUZ, C.D.; GÍRIO, A.C.F. & MACHADO NETO, J.G., "Acute toxicity and environmental risk of oxytetracycline and florfenicol antibiotics to pacu (*Piaractus mesopotamicus*)". *Bol. Inst. Pesca.* **37**(2): 115 2011.
 157. CABELLO, F.C., "Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment". *Environmental Microbiology.* **8**(7): 1137, 2006.
 158. SAPKOTA, A.; SAPKOTA AR FAU - KUCHARSKI, M.; KUCHARSKI M FAU - BURKE, J.; BURKE J FAU - MCKENZIE, S.; MCKENZIE S FAU - WALKER, P.; WALKER P FAU - LAWRENCE, R. & LAWRENCE, R., "Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities". *Environ Int.* **34**(8): 1215, 2008.
 159. SLANA, M. & DOLENC, M.S., "Environmental Risk Assessment of antimicrobials applied in veterinary medicine-A field study and laboratory approach". *Environ Toxicol Pharmacol.* **35**(1): 131, 2013.
 160. DAMSTEN, M.C.; DE VLIJGER JS FAU - NIESSEN, W.M.A.; NIESSEN WM FAU - IRTH, H.; IRTH H FAU - VERMEULEN, N.P.E.; VERMEULEN NP FAU - COMMANDEUR, J.N.M. & COMMANDEUR, J.N., "Trimethoprim: novel reactive intermediates and bioactivation pathways by cytochrome p450s". *Chem Res Toxicol.* **21**(11): 2181, 2008.
 161. SHILLING, A.D.; CARLSON, D.B. & WILLIAMS, D.E., "Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, as a model for aromatase inhibition". *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* **70**: 89, 1999.
 162. BAILEY, G.S.; WILLIAMS, D.E. & HENDRICKS, J.D., "Fish models for environmental carcinogenesis: the rainbow trout". *Environmental Health Perspectives.* **104**(Suppl 1): 5, 1996.
 163. NICHOLS, J.W.; HOFFMAN, A.D. & FITZSIMMONS, P.N., "Optimization of an isolated perfused rainbow trout liver model: Clearance studies with 7-ethoxycoumarin". *Aquatic Toxicology.* **95**(3): 182, 2009.
 164. USEPA, "Quality Assurance Project Plan for Laboratory Sample Preparation and Analysis Activities in the National Pilot Study of Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) in Fish Tissue". *Contract No. EP-W-06-046*, 2006.
 165. LUCCHETTI, D.; FABRIZI, L.; GUANDALINI, E.; PODESTA, E.; MARVASI, L.; ZAGHINI, A. & CONI, E., "Long Depletion Time of Enrofloxacin in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **48**(10): 3912, 2004.
 166. CONNORS, K.A.; DU, B.W.; FITZSIMMONS, P.N.; CHAMBLISS, C.K.; NICHOLS, J.W. & BROOKS, B.W., "Enantiomer-Specific In Vitro Biotransformation of Select Pharmaceuticals in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)". *Chirality.* **25**(11): 763, 2013.
 167. GOMEZ, C.F.; CONSTANTINE, L. & HUGGETT, D.B., "The influence of gill and liver metabolism on the predicted bioconcentration of three pharmaceuticals in fish". *Chemosphere.* **81**: 1189, 2010.

168. LAHTI, M.; BROZINSKI, J.; JYLHA, A.; KRONBERG, L. & OIKARI, A., "Uptake from water, biotransformation, and biliary excretion of pharmaceuticals by rainbow trout". *Environmental Toxicology and Chemistry*. **30**(6): 1403, 2011.
169. MEHINTO, A.C.; HILL, E.M. & TYLER, C.R., "Uptake and biological effects of environmentally relevant concentrations of the nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceutical diclofenac in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". *Environmental science & technology*. **4**: 2176, 2010.
170. KOC, F.; UNEY, K.; ATAMANALP, M.; TUMER, I. & KABAN, G., "Pharmacokinetic disposition of enrofloxacin in brown trout (*Salmo trutta fario*) after oral and intravenous administrations". *Aquaculture*. **295**: 142, 2009.
171. INTORRE, L.; CECCHINI, S.; BERTINI, S.; VARRIALE, A.M.C.; SOLDANI, G. & MENGOZZI, G., "Pharmacokinetics of enrofloxacin in the seabass (*Dicentrarchus labrax*)". *Aquaculture*. **182**: 49, 2000.
172. DANYI, S.; WIDART, J.; DOUNY, C.; DANG, P.K.; BAIWIR, D.; WANG, N.; TU, H.T.; TUNG, V.T.; PHUONG, N.-T.; KESTEMONT, P. & SCIPPO, M.-L., "Determination and kinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in Tra catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) and giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) using a liquid chromatography/mass spectrometry method". *J. vet. Pharmacol. Therap.* **34**: 142, 2010.
173. PASCHOAL, J.A.R.; QUESADA, S.P.; GONÇALVES, L.U.; CYRINO, J.E.P. & REYES, F.G.R., "Depletion study and estimation of the withdrawal period for enrofloxacin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*)". *J. vet. Pharmacol. Therap.* **36**: 594, 2013.
174. ROCCA, G.D.; SALVO, A.D.; MALVISI, J. & SELLO, M., "The disposition of enrofloxacin in seabream (*Sparus aurata* L.) after single intravenous injection or from medicated feed administration". *Aquaculture*. **232** 2004.
175. SALVO, A.D.; ROCCA, G.D.; TERZETTI, E. & MALVISI, J., "Florfenicol depletion in edible tissue of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and sea bream, *Sparus aurata* L.". *Journal of Fish Diseases*. **36**: 685, 2013.
176. SAMUELSEN, O.B.; BERGH, Ø. & ERVIK, A., "Pharmacokinetics of florfenicol in cod *Gadus morhua* and in vitro antibacterial activity against *Vibrio anguillarum*". *Diseases of aquatic organisms*. **56**: 127, 2003.
177. SAMUELSEN, O.B., "Absorption, tissue distribution, metabolism and excretion of ormetoprim and sulphadimethoxine in cod (*Gadus morhua*) after oral administration of Romet³⁰". *J. Appl. Ichthyol.* **22**: 68, 2006.
178. BAKAL, R.S.; BAI, S.A. & STOSKOPF, M.K., "Pharmacokinetics of sulfadimethoxine and ormetoprim in a 5:1 ratio following intraperitoneal and oral administration, in the hybrid striped bass (*Morone chrysops* · *Morone saxatilis*)". *J. vet. Pharmacol. Therap.* **27**: 1, 2004.
179. KOSOFF, R.E.; CHEN CY FAU - WOOSTER, G.A.; WOOSTER GA FAU - GETCHELL, R.G.; GETCHELL RG FAU - CLIFFORD, A.; CLIFFORD A FAU - CRAIGMILL, A.L.; CRAIGMILL AL FAU - BOWSER, P.R. & BOWSER, P.R., "Sulfadimethoxine and ormetoprim residues in three species of fish after oral dosing in feed". *J Aquat Anim Health*. **19**(2): 109, 2007.
180. UNO, K.; AOKIB, T. & UENO, R., "Pharmacokinetics of sulphamonomethoxine and sulphadimethoxine following oral administration to cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". *Aquaculture*. **115**: 209, 1993.
181. PASCHOAL, J.A.R.; BICUDO, Á.J.A.; CYRINO, J.E.P.; REYES, F.G.R. & RATH, S., "Depletion study and estimation of the withdrawal period for oxytetracycline in tilapia cultured in Brazil". *J. vet. Pharmacol. Therap.* **35**: 90, 2011.

182. ABEDINI, S.; NAMDARI, R. & LAW, F.C.P., "Comparative pharmacokinetics and bioavailability of oxytetracycline in rainbow trout and chinook salmon". *Aquaculture*. **162**: 23, 1998.
183. MALVISI, J.; ROCCA, G.D.; ANFOSSI, P. & GIORGETTI, G., "Tissue distribution and residue depletion of oxytetracycline in sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus Labrax*) after oral administration ". *Aquaculture*. **147**: 159, 1996.
184. ZHANG, Q. & LI, X., "Pharmacokinetics and residue elimination of oxytetracycline in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*". *Aquaculture*. **272**: 140, 2007.
185. UNO, K.; AOKI, T.; KLEECHAYA, W.; TANASOMWANG, V. & RUANGPAN, L., "Pharmacokinetics of oxytetracycline in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and the effect of cooking on the residues". *Aquaculture*. **254**: 24, 2006.
186. UNO, K.; AOKI, T.; UENO, R. & MAEDA, I., "Pharmacokinetics of oxytetracycline in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* following bolus intravenous administration". *Fisheries Science*. **63**: 90, 1997.
187. TAN, W.P. & WALL, R.A., "Disposition kinetics of trimethoprim in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ". *Xenobiotica*. **25**(3): 315, 1995.
188. DAMSTEN, M.C.; VLIENER, J.S.B.D.; NIESSEN, W.M.A.; IRTH, H.; VERMEULEN, N.P.E. & COMMANDEUR, J.N.M., "Trimethoprim: Novel Reactive Intermediates and Bioactivation Pathways by Cytochrome P450s". *Chem. Res. Toxicol.* **21**: 2181, 2008.
189. GOLDSTONE, J.V.; MCARTHUR, A.G.; KUBOTA, A.; ZANETTE, J.; PARENTE, T.; JONSSON, M.E.; NELSON, D.R. & STEGEMAN, J.J., "Identification and developmental expression of the full complement of Cytochrome P450 genes in zebrafish". *BMC Genomics*. **11**: 643, 2010.
190. GUPTA, S.M.; BARTELS, M.J.; KERR, B.M.; LAGANIERE, S.; SILBER, B.M. & NELSON, W.L., "Chemical aspects of propranolol metabolism". *Res Commun Chem Path Pharmacol*. **42**: 235, 1983.
191. YU, L.; QIAN, M.; LIU, Y.; YAO, T. & ZENG, S., "Stereoselective metabolism of propranolol glucuronidation by human UDP-glucuronosyltransferases 2B7 and 1A9". *Chirality*. **22**: 456, 2010.
192. THOMPSON, J.A.; HULL, J.E. & NORRIS, K.J., "Glucuronidation of propranolol and 4'-hydroxypropranolol. Substrate specificity and stereoselectivity of rat liver microsomal glucuronyltransferases. ". *Drug Metab Dispos*. **9**: 466, 1981.
193. OTEY, C.R.; BANDARA, G.; LALONDE, J.; TAKAHASHI, K. & ARNOLD, F.H., "Preparation of Human Metabolites of Propranolol Using Laboratory-Evolved Bacterial Cytochromes P450". *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING*. **93**(3): 494, 2006.
194. NICHOLS, J.W.; SCHULTZ, I.R. & FITZSIMMONS, P.N., "In vitro–in vivo extrapolation of quantitative hepatic biotransformation data for fish. I. A review of methods, and strategies for incorporating intrinsic clearance estimates into chemical kinetic models". *Aquatic Toxicology*: 74, 2006.
195. SCHREIBER, R.; GÜNDEL, U.; FRANZ, S.; KÜSTER, A.; RECHENBERG, B. & ALTENBURGER, R., "Using the fish plasma model for comparative hazard identification for pharmaceuticals in the environment by extrapolation from human therapeutic data". *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. **61**: 261, 2011.
196. NOVELLI, A., "Estudo limnológico e ecotoxicológico da água e sedimento do rio Monjolinho - São Carlos (SP), com ênfase nas substâncias de referência

- cádmio e cobre.". São Carlos, Universidade de São Paulo. **Dissertação de mestrado**, 2005.
197. BRADFORD, M.M., "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.* **72**: 248, 1976.
 198. KRUGER, N.J., *The Bradford Method for Protein Quantitation*, in *Basic Protein and Peptide Protocols*. 1994. p. 9.
 199. MCCORD, J.E. & FRIDOVICH, I.S., "Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin". *J. Biol. Chem.* **244**: 6049, 1969.
 200. HOPKINS, J. & TUDHOPE, G.R., "Glutathione Peroxidase in Human Red Cells in Health and Disease". *British Journal of Haematology.* **25**(5): 563, 1973.
 201. BEUTLER, E., *Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods*. Grune & Stratton. 1975, New York.
 202. WILHELM-FILHO, D.; TORRES, M.A.; ZANIBONI-FILHO, E. & PEDROSA, R.C., "Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongates* (Valenciennes, 1847)". *Aquaculture.* **244**(349-357) 2005.
 203. KEEN, J.H.; HABIG, W.H. & JAKOBY, W.B., "Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferase". *J. Biol. Chem.* **251**: 6183, 1976.
 204. JIANG, Z.-Y.; WOOLLARD, A.S. & WOLFF, S., "Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method". *Lipids.* **26**(10): 853, 1991.
 205. ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES JR, V. & FEATHERSTONE, R.M., "A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity". *Biochemical Pharmacology.* **7**: 88, 1961.
 206. CONNORS, K.A.; DU, B.; FITZSIMMONS, P.N.; HOFFMAN, A.D.; CHAMBLISS, C.K.; NICHOLS, J.W. & BROOKS, B.W., "Comparative pharmaceutical metabolism by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver S9 fractions". *Environmental Toxicology and Chemistry.* **32**(8): 1810, 2013.

Anexo

ANEXO 1-A: Peso e comprimento dos peixes após 7 dias de exposição ao ciprofloxacino.

Grupo	Animal	Comprimento (cm)	Peso (g)	Grupo	Animal	Comprimento (cm)	Peso (g)
Controle	1	22	240,79	1,0 µg/L	1	17	190,16
	2	24	256,36		2	17	171,13
	3	23	262,59		3	16,5	193,7
	4	20	165,11		4	16,5	158,81
	5	23	221,51		5	15	129,83
	6	23	254,91		6	16,5	146,4
	7	21,5	185,83		7	19,5	242,22
	8	21,5	222,95		8	17,5	200,46
	9	20	170,29		9	16	179,73
	10	23	213,77		10	21	188,26
0,5 µg/L	1	19,5	142,33	5,0 µg/L	1	21,5	201,52
	2	18	141,6		2	22	184,53
	3	20,5	155,81		3	22,5	212,62
	4	18,5	121,28		4	20	195,84
	5	18	129,64		5	21	178,56
	6	17,5	151,03		6	18	120,44
	7	16	158,64		7	21	148,49
	8	17,5	151		8	17,5	123,4
	9	Não sobreviveu			9	18	127,59
	10	Não sobreviveu			10	18,5	144,6

ANEXO 1-B: Peso e comprimento dos peixes após 14 dias de exposição ao ciprofloxacino.

Grupo	Animal	Comprimento (cm)	Peso (g)	Grupo	Animal	Comprimento (cm)	Peso (g)
Controle	1	17	165,75	1,0 µg/L	1	17,5	189,22
	2	18,5	224,38		2	15,5	112,96
	3	18	173,17		3	14	114,28
	4	19,5	230,78		4	15,5	118,11
	5	16,5	167,79		5	16	132,38
	6	19	202,78		6	15	105,43
	7	17	162,1		7	17	138,63
	8	18,5	212,03		8	13,5	85,94
	9	17	180,1		9	16	135,46
	10	17,5	201,05		10	15,5	132,5
0,5 µg/L	1	15,5	141,55	5,0 µg/L	1	16,5	140,84
	2	18	224,4		2	13,5	83,33
	3	16,5	171,5		3	16,5	162,69
	4	15,5	138,86		4	16	136,99
	5	14,5	108,68		5	14	91,26
	6	16	119,8		6	14,5	106,75
	7	16	135,75		7	16	131,01
	8	15	122,8		8	15,5	128,49
	9	13,5	81,75		9	14,5	113,23
	10	14	87,99		10	16,8	147,75