UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

KARLA CAROLINE MUNIZ DE ARAUJO

OTIMIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA UTILIZANDO CLAE/FL PARA MONITORAMENTO DE FÁRMACOS ANTIBACTERIANOS FLUOROQUINOLÔNICOS EM ÁGUAS DO RIO ANIL LOCALIZADO NA CIDADE DE SÃO LUÍS – MA

São Luís
2013

KARLA CAROLINE MUNIZ DE ARAUJO

OTIMIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA UTILIZANDO CLAE/FL PARA MONITORAMENTO DE FÁRMACOS ANTIBACTERIANOS FLUOROQUINOLÔNICOS EM ÁGUAS DO RIO ANIL LOCALIZADO NA CIDADE DE SÃO LUÍS – MA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão, para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Gilvanda Silva Nunes

São Luís
2013

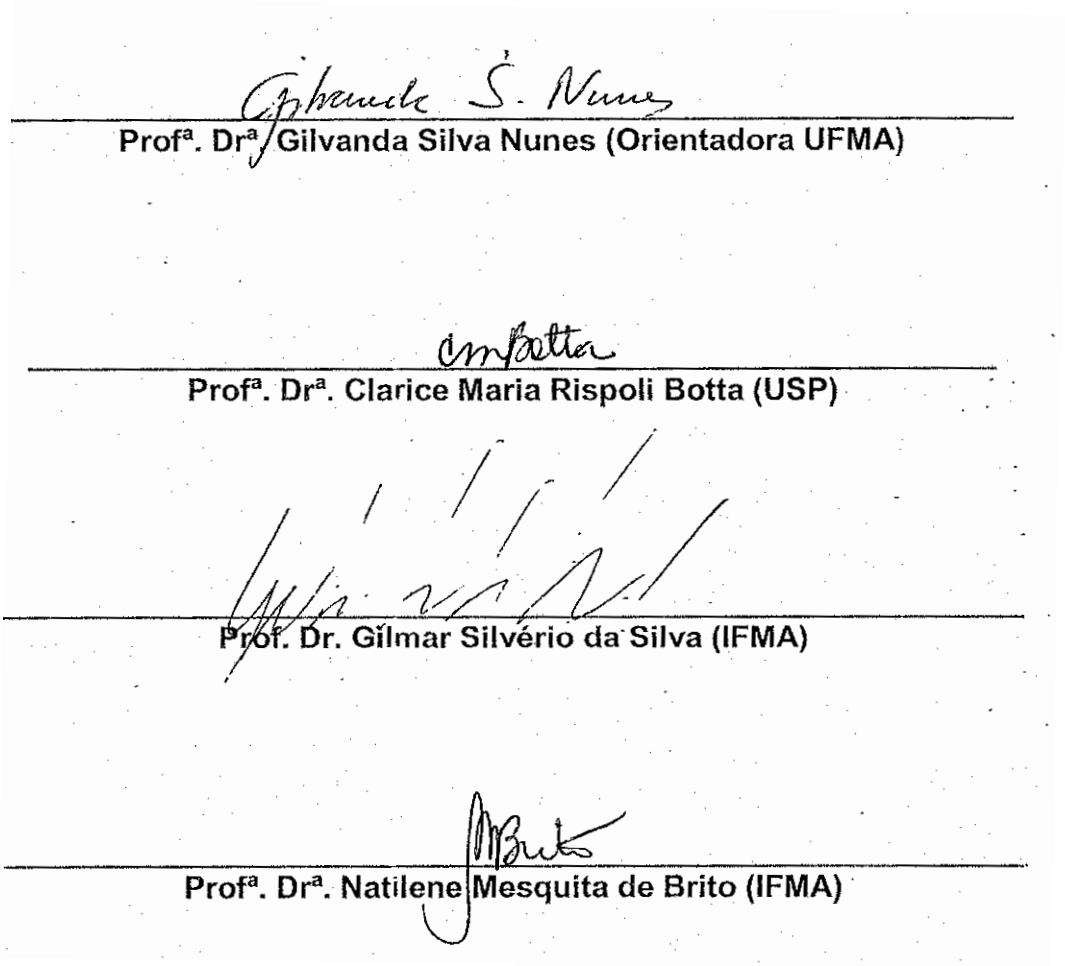
KARLA CAROLINE MUNIZ DE ARAUJO

OTIMIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA UTILIZANDO CLAE/FL PARA MONITORAMENTO DE FÁRMACOS ANTIBACTERIANOS FLUOROQUINOLÔNICOS EM ÁGUAS DO RIO ANIL LOCALIZADO NA CIDADE DE SÃO LUÍS – MA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão, para a obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em 05 de abril de 2013.

BANCA EXAMINADORA



Profª. Drª. Gilvanda Silva Nunes (Orientadora UFMA)

Profª. Drª. Clarice Maria Rispoli Botta (USP)

Prof. Dr. Gilmar Silvério da Silva (IFMA)

Profª. Drª. Natilene Mesquita de Brito (IFMA)

AGRADECIMENTOS

Quero aqui deixar algumas palavras de agradecimento a todos àqueles que de alguma maneira foram imprescindíveis na realização deste trabalho.

Começo por agradecer à Deus, que me ajudou a seguir em frente quando os obstáculos me faziam desanimar.

À UFMA e ao IFMA por terem possibilitado o desenvolvimento desta pesquisa e a CAPES que, por meio do Programa de Cooperação Acadêmica (PROCAD, 2007), deu-me a oportunidade de vivenciar outro ambiente acadêmico e assim observar que algumas das dificuldades enfrentadas na vida acadêmica não são exclusivas dos alunos do PPGQUI.

À professora Gilvanda Nunes que me acolheu como aluna, confiando no meu trabalho e pela orientação sempre consistente.

Aos professores Natilene Mesquita, Ozelito Amarante e Hilton Rangel, os quais sempre se mostraram disponíveis a colaborar e aconselhar quando tudo parecia perdido. Entretanto, devo agradecer especialmente a professora Natilene Mesquita, pelo apoio e imensa colaboração de co-orientação extraoficial e confiança depositada mais uma vez em mim.

Às pesquisadoras Eny Vieira e Clarice Botta, e ao colega Amandio por terem me acolhido e conduzido na USP.

Aos meus familiares, pelo companheirismo.

À Mayara Coelho, Lúcia Guêzo e Mônica Neves, grandes amigas que me socorreram durante os momentos mais tumultuados deste trabalho.

A Thiago Araújo, por sempre tornar os meus dias melhores.

Aos colegas e amigos que colaboraram para o meu crescimento pessoal e profissional, e que se propuseram a ajudar sempre que possível, em especial, à: José Elias, Amanda, Suzyéth, Joseany, Wanderson, Helmara, Verônica, Lana e Ilmar.

RESUMO

Os antibacterianos fluoroquinolônicos são amplamente utilizados para tratamentos de doenças infecciosas. Estes compostos e seus metabólitos são excretados pelas vias urinárias, podendo alcançar o ambiente e causar diversos danos à saúde, humana e animal, além de proporcionar resistência bacteriana. Diante disto, realizou-se a otimização de um método cromatográfico para determinação de três antibacterianos fluoroquinolônicos (CIPRO, LEVO e NORF) via CLAE/FL em águas do Rio Anil da cidade de São Luís-MA. Para isto, otimizou-se os parâmetros cromatográficos e verificou-se a faixa linear através da construção de curvas analíticas e posteriormente de curvas de calibração para cada um dos analitos. As condições cromatográficas que se mostraram mais satisfatórios para análise foram: coluna Luna (250 x 4,6 mm, 5 µm), fase móvel composta por uma mistura de Metanol/tampão fosfato ($NaHPO_4.H_2O$ 0,04 M ajustado á pH 3 com H_3PO_4 85%), na proporção 30/70 (v/v), modo isocrático, fluxo de 1 $mL.min^{-1}$, monitorado a com comprimentos de onda de 278 nm de emissão e 450 nm de excitação. Os LD do método para os compostos CIPRO, LEVO e NORF foram de 1,8199, 4,0967 e 0,7567 $\mu g.L^{-1}$, respectivamente e o LQ do método foi de 5 $\mu g.L^{-1}$ para todos os três analitos. Os estudos de recuperação por EFS apresentaram níveis de recuperação entre 77,95 a 100,28% para os três analitos. Posteriormente a metodologia foi aplicada em amostras de água do Rio Anil, não sendo detectado nenhum dos analitos em estudo. Foram realizados ensaios de toxicidade aguda com o organismo teste *C. silvestrii*, apresentando CE(I)50,48h médio de 0,4656 $mg.L^{-1}$ para o CIPRO e de 0,6788 $mg.L^{-1}$ para o LEVO.

Palavras-chaves: Fluoroquinonas, Águas naturais, CLAE/FL.

ABSTRACT

Fluoroquinolone antibacterial agents are widely used for treatment of infectious diseases. These compounds and their metabolites are excreted through the urinary tract, reaching the environment and cause many health hazards, human and animal, besides providing bacterial resistance. Given this, it was carried out an optimization of a chromatographic method for determination of three fluoroquinolone antibiotics (CIPRO, LEVO and NORF) by HPLC/FL in waters of Anil River at São Luís City-MA. For this, the chromatographic parameters were optimized and the linear range was obtained by constructing analytical curves and subsequently calibration curves for each analyte. The most satisfactory chromatographic conditions for analysis were: Luna column (250 x 4.6 mm, 5 mm), mobile phase consisting of a mixture of Methanol/Buffer (0,04 M $NaHPO_4.H_2O$ adjusted to pH 3 with H_3PO_4 85%) in proportion 30/70 (v/v), isocratic mode, flow 1 $mL.min^{-1}$, monitored at wavelengths of 278 nm and emission 450 nm excitation. The LD of the method for compounds CIPRO, LEVO and NORF were 1,8199, 4,0967 and 0,7567 $\mu g.L^{-1}$ respectively and LQ of the method was 5 $\mu g.L^{-1}$ for all three analytes. The studies of recovery by SPE showed levels from 77,95 to 100,28% for all three analytes. Subsequently the methodology was applied in water samples from the Anil River, being detected none of the analytes under study. Were performed acute toxicity tests with the test organism *C. silvestrii*, with EC(I)50,48h average of 0,4656 $mg.L^{-1}$ for CIPRO and 0,6788 $mg.L^{-1}$ for LEVO.

Keywords: Fluoroquinolones, Natural water, HPLC/FL.

LISTA DE SIGLAS

ABNT	-	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACN	-	Acetonitrila
ANA	-	Agencia Nacional de Águas
ANVISA	-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C_1	-	Concentração inicial efetiva de ciprofloxacino que causa imobilidade a 50% dos organismos no intervalo de 48 horas referente ao teste de ecotoxicidade aguda 1
C_2	-	Concentração inicial efetiva de ciprofloxacino que causa imobilidade a 50% dos organismos no intervalo de 48 horas referente ao teste de ecotoxicidade aguda 2
C_3	-	Concentração inicial efetiva de ciprofloxacino que causa imobilidade a 50% dos organismos no intervalo de 48 horas referente ao teste de ecotoxicidade aguda 3
C_4	-	Concentração inicial efetiva de ciprofloxacino que causa imobilidade a 50% dos organismos no intervalo de 48 horas referente ao teste de ecotoxicidade aguda 4
C_8	-	Grupos alquila octil
C_{18}	-	Grupos alquila octadecil
CENO	-	Concentração de efeito não observado
CEO	-	Concentração de efeito observado
CE_{50}	-	Concentração efetiva para 50% dos indivíduos
$CE(I)_{50(48h)}$	-	Concentração inicial efetiva que causa imobilidade a 50% dos organismos no intervalo de 48 horas
CETESB	-	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CIPRO	-	Ciprofloxacino
CL	-	Cromatografia a líquido
CL_{50}	-	Concentração letal efetiva para 50% dos organismos
CG/EM	-	Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas
CLAE	-	Cromatografia a líquido de alta eficiência
CLAE/DAD	-	Cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção por foto-arranjo de diodos

CLAE/EM - Cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

CLAE/FL - Cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção de fluorescência

CLAE/UV - Cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção no ultravioleta

CRHEA - Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada

CV - Coeficiente de variação

DCM - Diclorometano

E_1 - Procedimento de extração em fase sólida 1

E_2 - Procedimento de extração em fase sólida 2

E_3 - Procedimento de extração em fase sólida 3

EFS - Extração em fase sólida

EM - Espectrometria de massas

EtOAc - Acetato de etila

ETE - Estações de tratamento de esgoto

FDA - Food and Drug Adminidtration

FL - Fluorescência

GEA - Grupo de Estudos Ambientais

ICH - International Conference on Harmonisation

IFMA - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

L_1 - Concentração inicial efetiva de levofloxacino que causa imobilidade a 50% dos organismos no intervalo de 48 horas referente ao teste de ecotoxicidade aguda 1

L_2 - Concentração inicial efetiva de levofloxacino que causa imobilidade a 50% dos organismos no intervalo de 48 horas referente ao teste de ecotoxicidade aguda 2

L_3 - Concentração inicial efetiva de levofloxacino que causa imobilidade a 50% dos organismos no intervalo de 48 horas referente ao teste de ecotoxicidade aguda 3

L_4 - Concentração inicial efetiva de levofloxacino que causa imobilidade a 50% dos organismos no intervalo de 48 horas referente ao teste

		de ecotoxicidade aguda 4
LD	-	Limite de detecção
LDI	-	Limite de detecção instrumental
LEVO	-	Levofloxacino
LQ	-	Limite de quantificação
LQI	-	Limite de quantificação instrumental
MA	-	Maranhão
MeOH	-	Metanol
NARP	-	Núcleo de análise de resíduos de pesticidas
NORF	-	Norfloxacino
R^2	-	coeficiente de correlação linear
S	-	coeficiente angular gerado na equação da reta
TC_1	-	Teste de ecotoxicidade aguda 1 com a substância ciprofloxacino
TC_2	-	Teste de ecotoxicidade aguda 2 com a substância ciprofloxacino
TC_3	-	Teste de ecotoxicidade aguda 3 com a substância ciprofloxacino
TC_4	-	Teste de ecotoxicidade aguda 4 com a substância ciprofloxacino
t_{cal}	-	“t” calculado para o teste de significância “t” de Student
TL_1	-	Teste de ecotoxicidade aguda 1 com a substância levofloxacino
TL_2	-	Teste de ecotoxicidade aguda 2 com a substância levofloxacino
TL_3	-	Teste de ecotoxicidade aguda 3 com a substância levofloxacino
TL_4	-	Teste de ecotoxicidade aguda 4 com a substância levofloxacino
t_R	-	tempo de retenção
t_T	-	tempo total de análise
t_{tab}	-	“t” tabelado para o teste de significância “t” de Student
UFMA	-	Universidade Federal do Maranhão
USP	-	United States Pharmacopoea
USP–SC	-	Universidade de São Paulo localizado na cidade de São Carlos
UV	-	Ultravioleta
λ	-	Comprimento de onda
λ_{ems}	-	Comprimento de onda de emissão
λ_{exc}	-	Comprimento de onda de excitação

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Percentual de recuperações 46
Equação 2. Teste “t” de Student 46
Equação 3. Limite de detecção instrumental 47
Equação 4. Limite de quantificação Instrumental 47
Equação 5. Limite de detecção do método 47
Equação 6. Desvio padrão combinado das recuperações 47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Breve esquema da geração de fármacos residuais 19

Figura 2. Estruturas moleculares do ácido nalidíxico e das fluoroquinolonas CIPRO, LEVO e NORF 24

Figura 3. Equilíbrio ácido-base de uma fluoroquinolona. Molécula carregada positivamente em meio ácido (a), molécula na forma de íon dipolar em pH 7,4 (b) e molécula carregada negativamente em meio básico (c)..... 26

Figura 4. Exemplificação da geração de bactérias resistentes 27

Figura 5. Rotas de exposição de fármacos no ambiente 29

Figura 6. Etapas empregadas em EFS para retenção do(s) analito(s) 33

Figura 7. Localização do Rio Anil 37

Figura 8. Soluções estoque e soluções de trabalho 42

Figura 9. Processo de fortificação, dopagem ou enriquecimento das amostras 46

Figura 10. Pontos de coleta das amostras de água do Rio Anil 48

Figura 11. Esquema ilustrativo da montagem dos testes de sensibilidade, testes preliminares e testes de toxicidade com *C. silvestrii*..... 50

Figura 12. Cromatograma obtido a partir da injeção de 20 µL de soluções de trabalho individuais e mista de CIPRO, LEVO e NORF na concentração de 100 $\mu g.L^{-1}$ em CLAE/FL. Condições cromatográficas: coluna Kinetex (50 x 4,6 mm; 2,6 µm), fase móvel MeOH/tampão fosfato ($NaHPO_4.H_2O$ 0,04 M ajustado a pH 3 com H_3PO_4 85%), na proporção 16/84 (v/v), modo isocrático, fluxo de 1 $mL.min^{-1}$, λ_{exc}= 280 nm e λ_{ems} = 450 nm 53

Figura 13. Co-eluição dos analitos LEVO e NORF. Cromatograma obtido a partir da injeção de 20 µL de solução de trabalho mista de CIPRO, LEVO e NORF na concentração de 250 $\mu g.L^{-1}$ em CLAE/FL. Condições cromatográficas: coluna Luna (250 x 4,6 mm; 5 µm), fase móvel ACN/tampão fosfato ($NaHPO_4.H_2O$ 0,04 M ajustado a pH 3 com H_3PO_4 85%), na proporção 16/84 (v/v), modo isocrático, fluxo de 1 $mL.min^{-1}$, λ_{exc}= 280 nm e λ_{ems} = 450 nm 54

Figura 14. Variação do t_R dos analitos. Cromatograma obtido a partir da injeção de 20 µL de solução de trabalho mista de CIPRO, LEVO e NORF na concentração de 100 µg.L^{-1} em CLAE/FL. Condições cromatográficas: coluna Luna (250 x 4,6 mm; 5 µm), fase móvel ACN/MeOH/tampão fosfato ($NaHPO_4.H_2O$ 0,04 M ajustado a pH 3 com H_3PO_4 85%), na proporção 22/8/70 (v/v), modo isocrático, fluxo de 1 mL.min^{-1}, λ_{exc} = 280 nm e λ_{ems} = 450 nm 55

Figura 15. Cromatograma obtido a partir da injeção de 20 µL de solução de trabalho mista de CIPRO, LEVO e NORF na concentração de 100 µg.L^{-1} em CLAE/FL. Condições cromatográficas: coluna Luna (250 x 4,6 mm; 5 µm), fase móvel MeOH/tampão fosfato ($NaHPO_4.H_2O$ 0,04 M ajustado a pH 3 com H_3PO_4 85%), na proporção 30/70 (v/v), modo isocrático, fluxo de 1 mL.min^{-1}, λ_{exc}= 280 nm e λ_{ems} = 450 nm 56

Figura 16. Avaliação dos comprimentos de onda. Cromatograma obtido a partir da injeção de 20 µL de solução de trabalho mista de CIPRO, LEVO e NORF na concentração de 100 µg.L^{-1} em CLAE/FL. Condições cromatográficas: coluna Luna (250 x 4,6 mm; 5 µm), fase móvel MeOH/ACN/tampão fosfato ($NaHPO_4.H_2O$ 0,04 M ajustado a pH 3 com H_3PO_4 85%), na proporção 23/7/70 (v/v), modo isocrático, fluxo de 1 mL.min^{-1}..... 56

Figura 17. Curvas analíticas dos compostos CIPRO, LEVO e NORF. Condições cromatográficas: coluna Luna (250 x 4,6 mm; 5 µm), fase móvel MeOH/tampão fosfato ($NaHPO_4.H_2O$ 0,04 M ajustado á pH 3 com H_3PO_4 85%), na proporção 30/70 (v/v), modo isocrático, volume de injeção de 20µL, fluxo de 1 mL.min^{-1}, λ_{exc} = 280 nm e λ_{ems} = 450 nm 57

Figura 18. Curvas de calibração para os compostos CIPRO, LEVO e NORF. Condições cromatográficas: coluna Luna (250 x 4,6 mm; 5 µm), fase móvel MeOH/tampão fosfato ($NaHPO_4.H_2O$ 0,04 M ajustado á pH 3 com H_3PO_4 85%), na proporção 30/70 (v/v), modo isocrático, fluxo de 1 mL.min^{-1}, λ_{exc} = 280 nm e λ_{ems} = 450 nm 59

Figura 19. Comparação dos valores de recuperação do CIPRO, LEVO e

NORF, em frente aos três procedimentos de extração avaliados (E_1, E_2 e E_3). As linhas vermelhas correspondem ao valor máximo (120%) e mínimo (70%) aceitos para análises de resíduos 60

Figura 20. Cromatogramas obtidos a partir da injeção de 20 µL dos extratos do branco da matriz da matriz fortificada com CIPRO, LEVO e NORF na concentração de 5 µg.L^{-1} (vermelho) em CLAE/FL. Condições cromatográficas: coluna Luna (250 x 4,6 mm; 5 µm), fase móvel MeOH/tampão fosfato ($NaHPO_4.H_2O$ 0,04 M ajustado á pH 3 com H_3PO_4 85%), na proporção 30/70 (v/v), modo isocrático, fluxo de 1 mL.min^{-1}, λ_{exc} = 280 nm e λ_{ems} = 450 nm 61

Figura 21. Fluxograma do método analítico otimizado para a determinação dos compostos fluoroquinolônicos em água do Rio Anil 64

Figura 22. Sobreposição dos cromatogramas obtidos da análise das quatro amostras de água do Rio Anil e da amostra fortificada com o menor nível a partir da injeção de 20 µL de solução em CLAE/FL. Condições cromatográficas: coluna Luna (250 x 4,6 mm; 5 µm), fase móvel MeOH/tampão fosfato ($NaHPO_4.H_2O$ 0,04 M ajustado a pH 3 com H_3PO_4 85%), na proporção 30/70 (v/v), modo isocrático, fluxo de 1 mL.min^{-1}, λ_{exc} = 280 nm e λ_{ems} = 450 nm..... 65

Figura 23. Avaliação dos diferentes comprimentos de onda para análise de fluoroquinolonas em amostra de efluente hospitalar que desemboca nas margens do Rio Anil a partir da injeção de 20 µL de solução em CLAE/FL. Picos com mesmo perfis cromatográficos e t_R das substâncias LEVO (a) e CIPRO (b). Condições cromatográficas: coluna Luna (250 x 4,6 mm; 5 µm), fase móvel MeOH/tampão fosfato ($NaHPO_4.H_2O$ 0,04 M ajustado a pH 3 com H_3PO_4 85%), na proporção na proporção 30/70 (v/v), modo isocrático, fluxo de 1 mL.min^{-1} 66

Figura 24. Controle da sensibilidade das culturas de *C. silvestrii* à substância de referência cloreto de sódio..... 67

Figura 25. Testes de toxicidade aguda com a substância CIPRO (TC_1, TC_2, TC_3 e TC_4) com o organismo *C. silvestrii* 68

Figura 26. Testes de toxicidade aguda com a substância LEVO (TL_1, TL_2, TL_3

e TL_4) com o organismo *C. silvestrii* 68

Figura 27. Dispersão dos $CE(I)_{50(48h)}$ dos compostos CIPRO: $CE(I)_{50(48h)}$ = C_1, C_2, C_3 e C_4 (a) e LEVO: $CE(I)_{50(48h)}$ = L_1, L_2, L_3 e L_4 (b) dos testes de toxicidade aguda com o organismo *C. silvestrii* 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas gerais dos antibióticos fluoroquinolonicos 26

Tabela 2. Condições cromatográficas estabelecidas por autores para detecção de fluoroquinolonas via CLAE 32

Tabela 3. Métodos analíticos para determinação de fluoroquinolonas em diversas matrizes 34

Tabela 4. Parâmetros de validação segundo USP, ICH, FDA, ANVISA e INMETRO 35

Tabela 5. Parâmetros de validação quanto à natureza 36

Tabela 6. Parâmetros de validação quanto ao propósito 37

Tabela 7. Padrões utilizados no desenvolvimento do estudo 41

Tabela 8. Procedimentos de EFS pesquisados e propostos para uso no método 45

Tabela 9. Resumo das condições de ensaio dos testes de sensibilidade, testes preliminares e testes de toxicidade aguda com *C. silvestrii*. 51

Tabela 10. Condições cromatográficas estabelecidas para o estudo 57

Tabela 11. Faixa linear dinâmica obtida a partir da injeção de 20 µL de solução 58

Tabela 12. Padrões utilizados no desenvolvimento do estudo 59

Tabela 13. Resultados de recuperação, precisão e exatidão obtidos para cada fluoroquinolonas em três níveis de fortificação e cinco repetições (n=5) 62

Tabela 14. Dados obtidos a partir do teste de sensibilidade realizado com *C. silvestrii* com a substância de referência cloreto de sódio ($g.L^{-1}$) .. 67

Tabela 15. Toxicidade aguda dos compostos CIPRO e LEVO para a *C. silvestrii* com concentrações em $mg.L^{-1}$ 68

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18
2 OBJETIVOS 22
2.1 Objetivo Geral 22
2.2 Objetivos Específicos 22
3 REVISÃO DA LITERATURA 23
3.1 Antibacterianos Fluoroquinolonicos 23
3.1.1 Propriedades físico-químicas dos antibacterianos fluoroquinolonicos 24
3.2 Antibacterianos no Ambiente 26
3.1.2 Ocorrências de fluoroquinolonas no ambiente 29
3.3 Metodologias de Análise de Antibacterianos 30
3.4 Extração em Fase Sólida (EFS) 33
3.5 Validação de Metodologia Analítica 35
3.6 Local de Estudo 37
3.7 Estudos Ecotoxicológicos 38
3.7.1 Ensaios ecotoxicológicos com fluoroquinolonas 39
4 MATERIAIS E MÉTODOS 41
4.1 Metodologia Analítica 41
4.1.1 Padrões, solventes e reagentes 41
4.1.2 Preparo e armazenamento de soluções estoque e soluções de trabalho. 42
4.1.3 Equipamento de cromatografia a líquido (CL) 42
4.1.4 Otimização das condições cromatográficas 43
4.1.5 Curvas analíticas e de calibração, linearidade, sensibilidade..... 43
4.1.6 Preparo das amostras 44
4.1.7 Ensaios de Recuperação 45
4.1.8 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)..... 47
4.1.9 Seletividade 48
4.1.10 Coleta, transporte e preparo das amostras 48
4.2 Ensaios de Ecotoxicidade 49
4.2.1 Teste de sensibilidade 49
4.2.2 Testes preliminares 52
4.2.3 Teste de Toxicidade aguda 52

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES 53
5.1 Otimização das condições cromatográficas 53
5.2 Curvas analíticas e de calibração, linearidade e sensibilidade 57
5.3 Eficiências dos procedimentos de EFS 59
5.4 Verificação da presença de Interferentes 61
5.5 Recuperação, Precisão e Exatidão 61
5.6 Síntese do método desenvolvido para análise de fluoroquinolonas 63
5.7 Aplicação da metodologia otimizada na análise de amostras reais... 64
5.8 Ensaios de Ecotoxicidade 65
5.2.1 Teste de sensibilidade 66
5.2.2 Testes preliminares 67
5.2.3 Teste de Toxicidade aguda 67
6 CONCLUSÃO 71
REFERÊNCIAS 73

1 INTRODUÇÃO

Após a descoberta dos antibióticos, em 1928, houve uma mudança significativa no controle das doenças infecciosas, principalmente de origem bacteriana, com impactos positivos para a saúde pública e a qualidade de vida da população. Atualmente, os antibióticos ou antimicrobianos têm uma elevada demanda, tanto na medicina humana quanto no setor de produção animal, como por exemplo, na bovinocultura, nas produções avícolas e suínas e na aquicultura (THIELE-BRUHN, 2003).

Entretanto, o uso indiscriminado dos antibióticos vem causando grande impacto na área de saúde pública e ambiental, devido à possibilidade de surgimento de cepas altamente resistentes aos antibióticos convencionais, inclusive com a detecção de resistências múltiplas a determinados antibióticos, e ocorrência de casos fatais de infecções hospitalares, adquiridas com patógenos polirresistentes (DEPIZZOL, 2006).

Observa-se uma série de estudos recentes indicando a presença destas substâncias, em pequenas concentrações ($ng.L^{-1}$ ou $\mu g.L^{-1}$), em diversas matrizes ambientais, tais como excretos animais, lagoas de tratamento de resíduos de origem animal, solos e águas superficiais e subterrâneas (PENG, 2008). Contudo, estudos sobre os impactos ecotoxicológicos de antibióticos em organismos não alvos não tem sido amplamente estimados (SANTOS et al, 2010).

A ocorrência destes compostos no ambiente pode causar efeitos adversos nos organismos aquáticos e terrestres (toxicidade crônica e aguda), além de exercer possível influência no aumento da resistência de microrganismos aos antibióticos (KEMPER, 2008).

O fenômeno da resistência a antibióticos decorre, principalmente, da seleção de cepas bacterianas em ambientes que apresentam concentrações destes quimioterápicos, tal como ocorre no intestino de humanos, quando indivíduos submetidos a tratamento intensivo e com elevadas dosagens de antibióticos liberam microrganismos resistentes nas fezes juntamente com antibióticos excretados. Estes microrganismos, patogênicos ou não, presentes nas fezes e na urina junto com os produtos de degradação destes quimioterápicos são lançados em pias e/ou ralos (esgoto sanitário) podendo alcançar o ambiente (DEPIZZOL, 2006).

De acordo com Mulroy (2001), entre 50% e 90% de uma dosagem dos fármacos após a administração de algumas formas farmacêuticas, são excretados inalterados pelos humanos e animais.

Outro agravante para a geração de fármacos residuais é o descarte inadequado dos antimicrobianos, pois as sobras não consumidas, são acumuladas até a perda da validade quando então são descartadas como “lixo”, que comumente, não é tratado, e tem como destino o ambiente (SANTOS; PIZZOLATO; CUNHA, 2007). A Figura 1 apresenta um resumo do mecanismo de geração de fármacos residuais.

Figura 1. Breve esquema da geração de fármacos residuais.

As vias urbanas (residência e principalmente hospitais) são os grandes geradores e disseminadores de fármacos residuais, através de seus efluentes carregados de fármacos e metabolitos farmacologicamente ativos. Certas substâncias de origem hospitalar, como agentes antitumorais, antibióticos e organoalogenados, podem deixar as plantas de tratamento de efluentes sem sofrerem degradação. A presença desses contaminantes biologicamente ativos e não-biodegradáveis nos efluentes domésticos e hospitalares requer um tratamento especializado para prevenir a contaminação ambiental (REZAEE et al, 2005; GAUTAM et al, 2007).

Além das vias urbanas, as vias rurais, que fazem uso de medicamentos para o tratamento de animais, também contribuem para a geração de fármacos residuais. Estudos têm estimado que 70 a 80% das drogas administradas em

fazendas são lançadas ao meio ambiente. Tal fato levou, por exemplo, a países como a Suécia a proibir uso de antibióticos como promotores de crescimento em animais, restringindo as vendas às prescrições veterinárias (SANDERSON et al, 2004).

Assim, a presença de fármacos em matrizes ambientais, entre eles os antibióticos, tem sido alvo de questionamentos e pesquisas nas áreas de saúde pública e ambiental devido, principalmente, ao potencial desenvolvimento de bactérias resistentes, à sua persistência no meio ambiente e aos efeitos adversos aos organismos aquáticos (DEPIZZOL, 2006).

Estudos mostraram que o ciprofloxacino (CIPRO) apresenta toxicidade aguda para a espécie de alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (GRUNG et al, 2008). Outros trabalhos foram realizados com a espécie *Daphnia magna*, e os resultados mostraram que o ciprofloxacino (CIPRO) apresentou baixa toxicidade aguda (HALLING-SORENSEN et al, 2000; MARTINS et al, 2012), contudo, ainda são escassos estudos que visam avaliar a toxicidade aguda das fluoroquinolonas sobre a espécie nativa *Ceriodaphnia silvestrii*.

De acordo com Bila e Bezotti (2003), diferentes métodos analíticos são reportados na literatura, os quais são principalmente válidos para matrizes biológicas como sangue, tecido e urina, sendo que algumas modificações nestes métodos podem ser suficientes para amostras ambientais. No entanto, as análises de fármacos em efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE), em águas superficiais e subterrâneas, e em água potável requerem ainda o desenvolvimento de métodos mais sensíveis para a detecção de concentrações na faixa de $\mu g.L^{-1}$ e $ng.L^{-1}$ (MULROY, 2001).

Para análise destes compostos em amostras de água, por exemplo, os métodos disponíveis na literatura são baseados em extração em fase sólida (EFS), em alguns casos derivatização da substância ácida e subsequente determinação do derivado por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) ou cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE/EM) (BILA e BEZOTTI, 2003).

Contudo, devido às polaridades e às características físico-químicas (polaridade mediana, capacidade de absorção de energia na região do ultravioleta e a capacidade que alguns possuem de fluorescerem) das principais classes representantes dos antibióticos, pode-se empregar também, como técnica analítica,

a cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção no ultravioleta por foto-arranjo de diodos (CLAE/UV ou CLAE/DAD) e com detecção de fluorescência (CLAE/FL).

Dentro deste contexto, o objetivo deste estudo foi otimizar um método analítico para detecção e quantificação de alguns compostos antibacterianos fluoroquinolônicos em amostras de água do Rio Anil, localizado cidade de São Luís, no estado do Maranhão (MA), Brasil, e estimar a toxicidade aguda dos antibióticos CIPRO e levofloxacino (LEVO) por meio de ensaios ecotoxicológicos com *Ceriodaphnia silvestrii*.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver uma metodologia analítica utilizando CLAE/FL para determinação de três fármacos antibacterianos fluoroquinolônicos (ciprofloxacino – CIPRO, levofloxacino – LEVO e norfloxacino – NORF) em amostras de água do afluente Rio Anil localizado na cidade de São Luís – MA e avaliar a toxicidade aguda destes compostos (CIPRO e LEVO) por meio de ensaios ecotoxicológicos com o cladócero *Ceriodaphnia silvestrii*.

2.2 Objetivos Específicos

a) Desenvolver um método de separação cromatográfica dos fármacos antimicrobianos fluoroquinolônicos CIPRO, LEVO e NORF, empregando um sistema de CLAE/FL;
b) Determinar a eficiência do procedimento de extração das amostras, mediante a realização de ensaios de recuperação por procedimentos de EFS e detecção final por CLAE/FL;
c) Otimizar a metodologia analítica por meio das seguintes figuras de mérito: linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) e reprodutibilidade;
d) Determinar a eficiência do método para análise dos antibióticos em amostras reais (águas do Rio Anil), mediante ensaios de recuperação;
e) Determinar e quantificar fármacos antimicrobianos fluoroquinolônicos em amostras de água do Rio Anil da cidade de São Luís, MA, via CLAE/FL;
f) Avaliar a toxicidade aguda dos compostos fluoroquinolônicos CIPRO e LEVO, através de ensaios ecotoxicológicos com *Ceriodaphnia silvestrii*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Antibacterianos Fluoroquinolônicos

Os antimicrobianos são compostos utilizados para inibir o crescimento de determinados microrganismos, podendo ser utilizados para tratar enfermidades com a finalidade terapêutica, prevenir contra doenças causadas pela presença de microrganismos patogênicos (profilático) e melhorar a taxa de crescimento animal, ou seja, como promotores de crescimento (SANTOS, 2009).

As fluoroquinolonas fazem parte de uma família de fármacos da classe dos antibióticos. Atualmente constituem uma das maiores classes de agentes antibacterianos e, por isso, são utilizados mundialmente no tratamento de infecções de origem bacteriana. Suas indicações terapêuticas evoluíram da aplicação nas infecções urinárias para infecções em quase todo o corpo humano (SOUSA, 2007).

Este grupo de fármacos se desenvolveu de forma a ultrapassar grande parte das suas adversidades possuindo, atualmente, um espectro de ação mais abrangente em relação às outras classes de antibacterianos. Além disso, apresenta uma boa disponibilidade oral, uma melhor difusão para os tecidos, tempo de meia vida maior e uma toxicidade consideravelmente reduzida (SOUSA, 2007).

Sua principal via de eliminação é a renal, onde aproximadamente 70% das fluoroquinolonas excretadas permanecem na sua forma inalterada e cerca de 30% na forma de seus metabólitos (SOUZA, 2005).

Todas as fluoroquinolonas agem por inibição da atividade das enzimas DNA-girase e topoisomerase IV, responsáveis primariamente pela introdução de super espirais na molécula do DNA bacteriano na presença de ATP, sendo este processo dependente basicamente do pH do meio. Alterações no estado topológico do DNA bacteriano desempenham funções nos processos de replicação, transcrição, recombinação e reparação celular, tendo assim um efeito bactericida (KIM et al, 2010).

Quimicamente, as fluoroquinolonas diferem da sua antecessora, ácido nalidíxico, por possuir a combinação de um átomo de flúor e um grupo piperazinil na sua estrutura molecular (Figura 2). Os principais representantes deste grupo são o enrofloxacino (uso exclusivo em medicina veterinária), o norfloxacino (NORF), o ciprofloxacino (CIPRO), o levofloxacino (LEVO), o ofloxacino, o lomefloxacino e o

perfloxacino (uso humano e animal), das quais, o CIPRO, LEVO e NORF são os mais utilizados atualmente para a terapêutica de humanos (SILVA e HOLLENBACH, 2010).

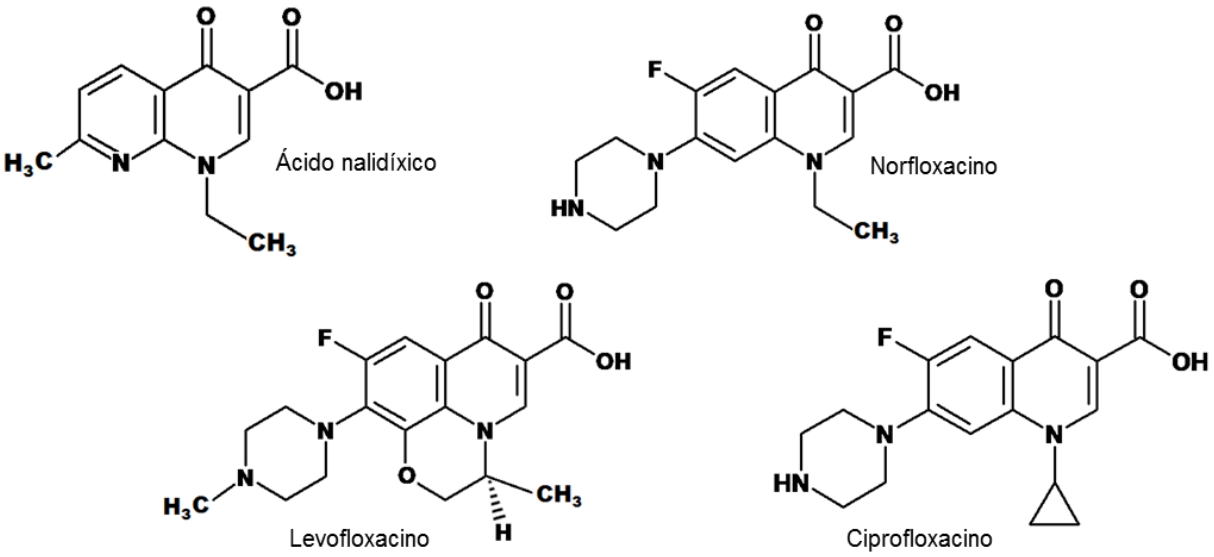


Figura 2. Estruturas moleculares do ácido nalidíxico e das fluoroquinolonas CIPRO, LEVO e NORF. Fonte: Adaptado de SILVA, 2006.

Existe atualmente um grande número de novas fluoroquinolonas, e as modificações estruturais efetuadas permitiram que esta classe de antibióticos se desenvolvesse significativamente, desde os primeiros compostos sintetizados até aos novos compostos, cujo maior espectro de ação e farmacocinética permite uma única dosagem diária (SOUZA, 2005).

Diferentes sistemas de classificação têm sido utilizados na literatura para descrever a evolução das classes de quinolonas, mas, sob a ótica cronológica, pode-se identificá-las em distintas gerações: primeira geração (ácido nalidíxico); segunda geração (ácido oxolínico, cinoxacino e NORF); terceira geração (CIPRO, LEVO e ofloxacino), e quarta geração (moxifloxacino e gatifloxacino) (SILVA, 2006; TASSO, 2008).

3.1.1 Propriedades físico-químicas dos antibacterianos fluoroquinolônicos

As fluoroquinolonas pertencem a uma classe de agentes antibacterianos com um largo espectro de atividade contra organismos Gram-positivos e Gram-negativos, assim como microrganismos anaeróbios e algumas micobactérias, sendo

a sua ação terapêutica fundamental, sobretudo em infecções causadas por microrganismos resistentes a outras classes de fármacos (SOUZA, 2005).

As propriedades físico-químicas das fluoroquinolonas vão influenciar no comportamento tanto *in vivo* como *in vitro* destes microrganismos, especialmente as suas propriedades ácido/base, capacidade para complexar íons metálicos, assim como o seu caráter hidro/lipofílico (PARK; KIM; BARK, 2002).

A presença de um grupo ácido (grupo carboxílico) e de um grupo básico (amina terciária) atribui aos compostos fluoroquinolônicos propriedades anfotéricas podendo, deste modo, existir mais do que uma espécie presente em solução, dependendo do pH, devido à protonação/desprotonação deste grupo influenciando, assim, o comportamento farmacológico destes compostos, uma vez que a presença de grupos carregados é necessária para a atividade biológica (PARK; KIM; BARK, 2002).

Dependendo do pH do meio, as fluoroquinolonas podem existir sob as formas catiônica, aniônica, neutra ou de íon dipolar (Figura 3). A pH 7,4 (fisiológico), as fluoroquinolonas encontram-se total ou parcialmente ionizadas, sendo a espécie predominante a forma de íon dipolar, podendo no entanto coexistir com as formas aniônica e catiônica (PARK; KIM; BARK, 2002).

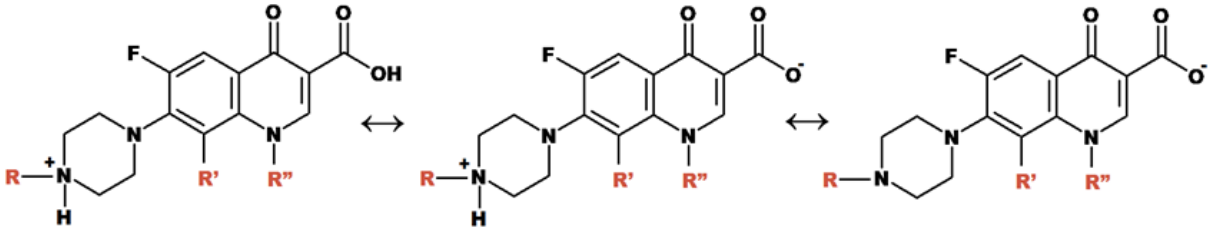


Figura 3. Equilíbrio ácido-base de uma fluoroquinolona. Molécula carregada positivamente em meio ácido (a), molécula na forma de íon dipolar em pH 7,4 (b) e molécula carregada negativamente em meio básico (c). Fonte: Adaptado de USLU et al, 2008, PARK et al, 2000 e LEAL, 2012.

De acordo com as constantes de acidez e diferentes estruturas, as fluoroquinolonas irão exibir diferentes ações antibacterianas. Sendo as porinas uma das principais vias de entrada das fluoroquinolonas nas células bacterianas Gram-negativas, a hidrofobicidade, o peso molecular, e a forma iônica em pH fisiológico são propriedades que irão dificultar a interação destes fármacos (SOUSA, 2007).

No caso das bactérias Gram-positivas, como estas não possuem uma membrana externa, onde se encontram os canais porínicos, a difusão através da

membrana celular será o local de entrada dos antibacterianos na célula bacteriana e, neste caso, a hidrofobicidade do composto é a propriedade mais importante (SOUSA, 2007). A Tabela 1 mostra as propriedades físico-químicas do grupo de antibióticos fluoroquinolônicos (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006).

Tabela 1. Propriedades físico-químicas gerais dos antibióticos fluoroquinolônicos

Grupo farmacológico	*MM ($g.mol^{-1}$)	*S_w ($mg.L^{-1}$)	*Log K_{ow}	pk_a (25ºC)	Pressão de vapor (mmHg)
Fluoroquinolonas	229,50 a 417,6	3,2 a 17790	-1 a -1,6	8,6	$2,1x10^{-13}$ a $8,4x10^{-14}$

*MM = massa molar; *S_w = solubilidade em água; *Log K_{ow} = coeficiente de partição octonal/água. Fonte: Adaptado de SARMAH; MEYER e BOXALL, 2006.

3.2 Antibacterianos no Ambiente

Nos últimos anos, o monitoramento de resíduos de fármacos no ambiente vem ganhando grande interesse devido ao fato de muitas dessas substâncias serem frequentemente encontradas em esgotos que podem atingir ou impactar os corpos d'águas receptores (rios e lagos), além de causar possíveis efeitos adversos à saúde humana (KÜMMERER et al, 2004).

Dentre as classes de fármacos, os antibacterianos têm sido amplamente discutidos na literatura, devido seu grande uso, tanto na medicina humana quanto na veterinária (crescimento do gado, na aquicultura, na produção avícola e suína), e em especial, seu alto potencial de desenvolvimento de bactérias resistentes no ambiente (BILA e DEZOTTI, 2003).

Segundo pesquisas de Santos e colaboradores (2010), os antibióticos foram a segunda classe de fármacos mais detectados (15%) no ambiente entre os anos de 1997 a 2009.

Os antibióticos podem ser mais ou menos metabolizados pelos seres humanos e animais. Entretanto, uma quantidade significativa dessas substâncias originais e seus metabólitos são excretados pela urina, fezes ou esterco animal, sendo frequentemente encontrados no ambiente, o que pode causar sérios impactos nos diversos ecossistemas e nos microrganismos em diferentes níveis tróficos presentes nestes locais (KÜMMERER, 2004; NAGULAPALLY et al, 2009).

Somente alguns antibacterianos são biodegradados no ambiente e, por isso, muitos tipos de bactérias patogênicas resistentes e até mesmo multirresistentes têm sido identificadas em esgotos domésticos, hospitalares, solo, mananciais e estações de tratamento de efluentes (KÜMMERER, 2003).

O uso generalizado de antibacterianos na criação de animais e na agricultura para o tratamento ou prevenção de infecção e promoção de crescimento também vem desempenhando um importante papel no desenvolvimento e disseminação de resistência aos antibióticos no ambiente (REGITANO; LEAL, 2010). Sabe-se, por exemplo, que a exposição em longo prazo a baixas doses de um antibiótico é susceptível de contribuir para a seleção de bactérias resistentes (KEMPER, 2008).

Os estudos de Helt e colaboradores (2012) sobre o efeito do antibacteriano CIPRO no desenvolvimento de mecanismos de resistência a diferentes indicadores fecais (*Escherichia coli* e *Enterococcus spp*) em uma comunidade bacteriana intrínseca de um ecossistema modelo de água doce sugeriram que a presença de um evento de exposição isolada ao CIPRO pode afetar potencialmente os perfis de resistência de diferentes classes de antibióticos, já que foi observado que a *E. coli* apresentava resistência aos antibacterianos CIPRO, a linezolida e estreptomicina e o *Enterococcus spp* manteve altos níveis de resistência aos antibacterianos CIPRO, linezolida, e estreptomicina, com um aumento significativo à vancomicina. A Figura 4 exemplifica sucintamente uma forma de seleção artificial de bactérias resistentes através da utilização de antibacterianos.

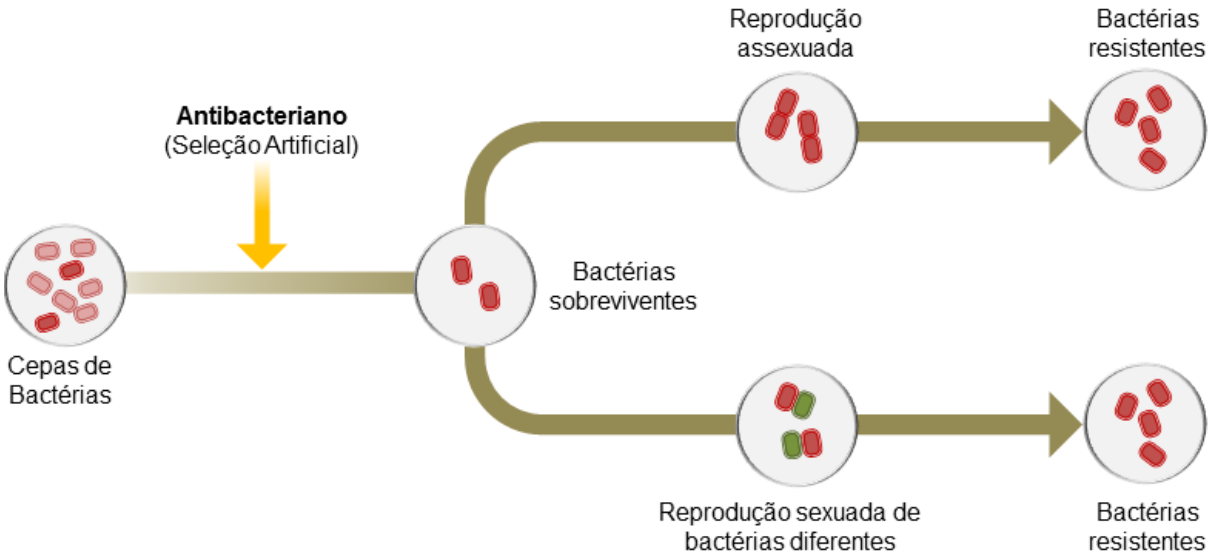


Figura 4. Exemplificação da geração de bactérias resistentes.

Observa-se na Figura 4 que os antibióticos podem promover, artificialmente, a seleção de bactérias resistentes. No processo de reprodução assexuada (bipartição), há uma proliferação de “clones” de bactérias resistentes selecionadas. Na reprodução sexuada ou transmissão genética, as bactérias resistentes podem disseminar seu material genético por diversos mecanismos (transdução, transformação e conjugação), permitindo a existência de cepas mais resistentes aos antibióticos, que podem ser selecionadas pelo uso dos mesmos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

A maioria das resistências a antibacterianos envolvem mecanismos genéticos de transferência de genes. Os genes que codificam estes mecanismos estão localizados no cromossomo bacteriano ou nos plasmídeos extracromossomais (moléculas circulares duplas de DNA que estão separadas do DNA cromossômico bacteriano). Estes são transmitidos para as próximas gerações (transferência vertical do gene) como também podem ser trocados entre bactérias de diferentes associações taxonômicas (transferência horizontal do gene) (DEPIZZOL, 2006).

Devido à ocorrência de resíduos de antibióticos em esgotos domésticos e águas naturais poderem vir a favorecer a resistência bacteriana, a comunidade científica internacional tem dado grande relevância a este assunto. Resíduos de antibióticos já foram detectados nos efluentes de estações de tratamento de águas (ETA) residuais em praticamente todo o mundo (CARBALLA et al, 2004, BATT; AGA, 2005; COSTANZO; MURBY; BATES, 2005).

Uma vez no esgoto, os antibióticos podem alcançar ambientes aquáticos naturais, mesmo quando tratados. De acordo com Baquero e colaboradores (2008), uma ETE só consegue eliminar parcialmente os antibacterianos presentes. Segundo Bila e Dezotti (2003), nas ETE, existem três destinos possíveis para qualquer resíduo de fármaco:

a) O resíduo pode ser biodegradável, ou seja, mineralizado a gás carbônico e água;
b) O resíduo pode passar por algum processo metabólico ou ser degradado parcialmente;
c) O resíduo pode tonar-se persistente, grande maioria dos casos.

As principais vias de contaminação do ambiente com resíduos de fármacos de uso humano e veterinário estão apresentadas na Figura 5.

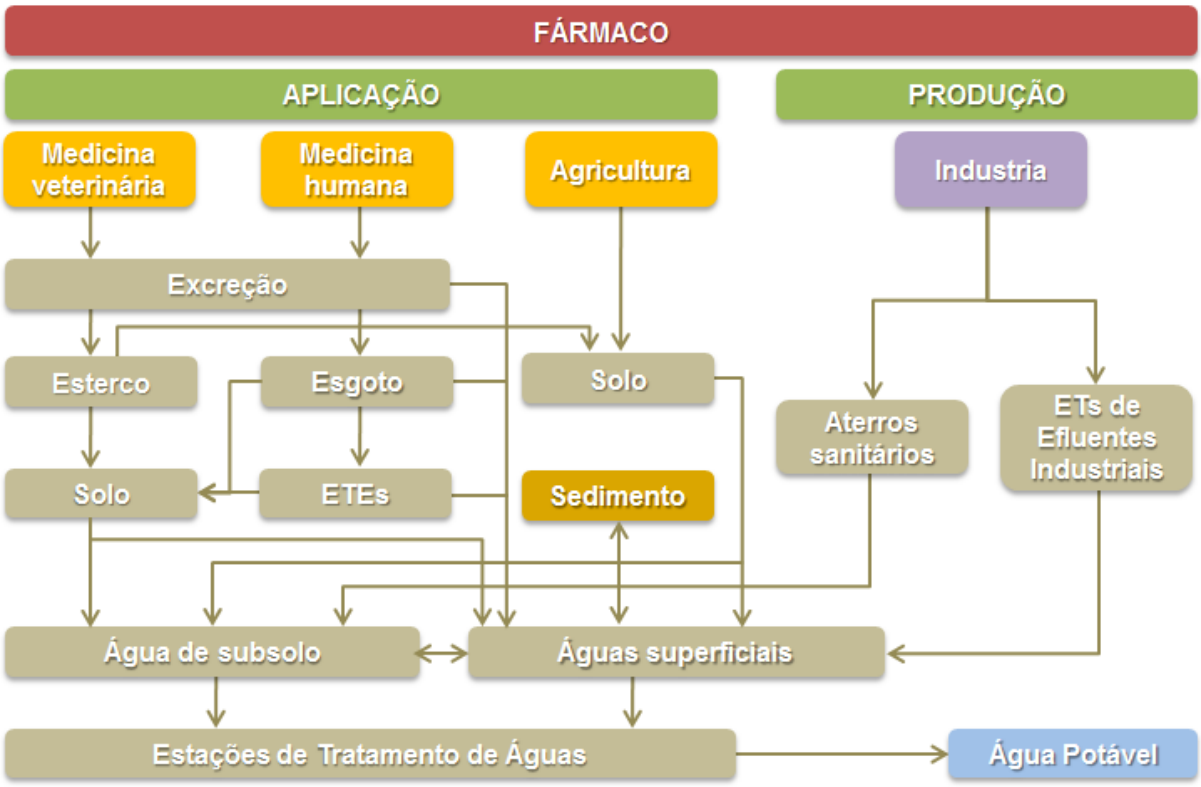


Figura 5. Rotas de exposição de fármacos no ambiente. Fonte: Adaptado de BILA; DEZOTTI, 2003.

A Figura 5 mostra que a contaminação do ambiente aquático subterrâneo pelo esterco animal contaminado com resíduos farmacológicos antibacterianos ocorre principalmente devido a sua utilização como fertilizantes do solo (BILA; DEZOTTI, 2003).

Da mesma forma os resíduos farmacológicos presentes nos efluentes das indústrias farmacêuticas, e no esgoto doméstico e hospitalar podem contaminar as águas subterrâneas quando são lançados sem tratamento adequado em solos de aterros sanitários e/ou nas águas superficiais (BILA; DEZOTTI, 2003).

3.2.1 Ocorrências de fluoroquinolonas no ambiente

A ampla utilização dos antibacterianos fluoroquinolonicos, aliado ao fato de que eles são largamente excretados na sua forma inalterada, fez com que estes antibióticos fossem frequentemente detectados em solos, águas residuais municipais, bem como em águas de superfície em várias regiões do mundo, indicando assim, que tais substâncias tornaram-se potenciais contaminantes do meio ambiente.

Estudos de Lee e Svoboda (2007), mostraram que o CIPRO foi detectado em amostras de águas residuais municipais com concentrações variando de 42 a 721 $ng.L^{-1}$. O NORF ocorreu em efluentes de esgoto em níveis de 10 a 126 $ng.L^{-1}$. Já o ofloxacino estava presente nas concentrações de 32-2148 $ng.L^{-1}$.

Diferentes estudos quantificaram presença de CIPRO em efluentes hospitalares na região do Novo México (2 a 11 $\mu g.L^{-1}$), em efluentes de ETE de Coimbra, Portugal (< 6 – 310 $ng.L^{-1}$) e em águas superficiais, como por exemplo no Rio Lambro, Itália (14,36 $ng.L^{-1}$) e no Rio Mondego, Portugal, em concentrações entre 79,6 – 119,2 $ng.L^{-1}$. (BROWN et al, 2006; SEIFRTOVÁ et al, 2008; CALAMARI et al, 2003; PENA et al, 2007).

Nos estudos de Peng e colaboradores (2008), ao se determinar a ocorrência de multirresíduos de antibióticos em águas residuais urbanas da China, observou-se que entre as classes estudadas, os compostos fluoroquinolonicos foram encontradas em até 0,459 $\mu g.L^{-1}$.

3.3 Metodologias de Análise de Fluoroquinolonas

O conhecimento das propriedades físico-químicas das fluoroquinolonas é de extrema importância para evitar problemas relacionados com reações secundárias, impurezas ou degradações na sua estrutura durante a aplicação do método analítico para a sua identificação e quantificação (SILVA; COLLINS, 2011).

Muitos métodos vêm sendo desenvolvidos para determinar antibióticos em várias matrizes (PENG, 2008). Geralmente, a CLAE/EM, a CLAE/UV e a CLAE/FL têm sido as técnicas analíticas mais citadas (SILVA; COLLINS, 2011).

A utilização da detecção por UV foi mais empregada nos primeiros trabalhos que envolveram a determinação de fluoroquinolonas, enquanto que a FL vem se destacando atualmente, por apresentar maior seletividade e melhor detectabilidade em relação ao primeiro (PASCHOAL, 2007).

O detector de EM apresenta alta seletividade, sendo normalmente usado em análises confirmatórias de identidade. No entanto, a difusão do seu emprego ainda é limitada pelo alto custo dos equipamentos (PASCHOAL, 2007).

As colunas analíticas mais usadas em técnicas cromatográficas de CLAE são as de fase reversa à base de sílica, funcionalizadas com grupos alquila principalmente octil (C_8) e octadecil (C_{18}). Devido aos grupos silanóis residuais e

impurezas metálicas dos materiais de recheio dessas colunas, as mesmas podem levar a problemas de assimetrias dos picos cromatográficos (efeito cauda). Aliado a esse fato tem-se que as fluoroquinolonas possuem caráter anfótero, o que prejudica a separação destes compostos nesse tipo de coluna (HERNANDEZ; SANCHO; GUERRERO, 2007).

Para tanto, métodos mais recentes de separação de fluoroquinolonas por CLAE têm feito uso de colunas capeadas ou de sílica de alta pureza, tais como Inertsil, Kromasil, Puresil, Versapack, Wakosil, L-column, Luna ou Zorbax RX, que são livres de traços metálicos responsáveis pelas propriedades ácidas dos grupos silanóis (HERNÁNDEZ-ARTESEROS et al, 2002; STOLKER; BRINKMAN, 2005).

A grande maioria dos métodos de CLAE, empregando fase estacionária reversa para determinação de fluoroquinolonas, faz uso de misturas para compor a fase móvel contendo acetonitrila (ACN) ou metanol (MeOH), ou uma mistura de ambos os solventes com soluções aquosas (PASCHOAL, 2007; SILVA; COLLINS, 2011).

Ainda com o objetivo de melhorar a simetria dos picos cromatográficos, agentes redutores de cauda do pico são adicionados. O pH geralmente é mantido em três ou muito próximo deste valor, para que haja uma redução da ionização de silanóis e minimizar suas interações com as fluoroquinolonas (HERNANDEZ; SANCHO; GUERRERO, 2007).

Embora soluções de tampão fosfato sejam as mais utilizadas para o ajuste de pH (RAMOS et al, 2003), outras soluções, tais como ácido cítrico (BAILAC et al, 2004), ácido fosfórico (ROUDAUT e YORKE, 2002) ou ácido oxálico (HERNÁNDEZ-ARTESEROS et al, 2002) são também usadas. A Tabela 2 apresenta várias condições cromatográficas utilizadas para analises por CLAE de algumas fluoroquinolonas.

Tabela 2. Condições cromatográficas estabelecidas por autores para detecção de fluoroquinolonas via CLAE

Analito	Método	Condições cromatográficas		Referência
		Coluna	Fase móvel, fluxo e *λ	
Enrofloxacino Ciprofloxacino Danofloxacino	CLAE/FL	Apollo C_{18} (250 x 4,6 mm, 5 µm), pré-coluna C_{18} (4,6 x 7,5 mm, 5 µm) á 40°C	0,04 M de tampão fosfato (pH=3,0)/ACN (82/18, v/v); fluxo de 1 mL.min^{-1}, λ_{exc} = 278 nm e λ_{ems} = 450 nm	CHOI et al, 2010
Ciprofloxacino	CLAE/FL	Synergi® Max-RP C_{12} (150 x 4,6 mm, 4 µm), pré-coluna LiChrospher® RP-8 C_8 (10 x 4,6 mm, 5 µm) a 40°C	ácido orto-fosfórico (0,025 M)/MET/ACN (13/12/75, v/v) e pH = 3,0 ajustado com trietilamina; fluxo de 1 mL.min^{-1}, λ_{exc} = 278 nm e λ_{ems} = 450 nm	MUCHOHI et al, 2010
Ciprofloxacino	CLAE/UV	C_{18} (250 x 4,6 mm, 5 µm)	ACN/ brometo de tetrabutilamônio 0,02M (8/92, v/v; pH=2,60); fluxo de 1 mL.min^{-1}, λ = 277 nm	QIAO; SUN, 2010
Ofloxacino Ciprofloxacino Moxifloxacino	CLAE/FL	C_{18} (150 x 2,1 mm, 3,5 µm), pré-coluna Alltima C_{18} (7,5 x 2,1 mm, 5 µm)	ACN/MeOH/0,025M cloreto de tetrabutilamônio/ácido trifluoroácetico (75/25/899/1 e 150/50/799/1, v/v), fluxo de 0,25 mL.min^{-1}, λ_{exc} = 279 nm e λ_{ems} = 442 nm	SMET et al, 2008
Ciprofloxacino Prulifloxacino	CLAE/FL CLAE/EM	Zorbax SB-C_8 (150 x 2,1 mm, 3,5 µm), pré-coluna SB-C_8 (12,5 x 2,1 mm, 5 µm)	ACN/MeOH/ácido fórmico/H_2O (6/12/0,5/81,5, v/v), fluxo de 0,2 mL.min^{-1}, λ_{exc} = 278 nm e λ_{ems} = 445 nm	LEE et al, 2007
Enrofloxacino Ciprofloxacino	CLAE/FL	C_{18} (250 mm × 4,6 mm, 5µm)	ACN/0,4% trietilamina ajustado para pH 2,5 com acido fosfórico 85% (14/86, v/v) , fluxo de 1,2 mL.min^{-1}, λ_{exc} = 294 nm e λ_{ems} = 500 nm	GONZÁLEZ et al, 2005
Ciprofloxacino	CLAE/FL	C_{18} (250 × 4,6 mm, 5µm)	MeOH/ 5,0 mmol.L^{-1} de brometo de tetrabutil amônio (70/30, v/v) e pH 2,4 ajustado para por ácido fosfórico 0,01 mol.L^{-1}, fluxo de 1 mL.min^{-1}, λ_{exc} = 277 nm e λ_{ems} = 453 nm	GUO et al, 2005

*λ: comprimento de onda; λ_{exc}: comprimento de onda de excitação e λ_{ems}: comprimento de onda de emissão

3.4 Extração em Fase Sólida (EFS)

A EFS é atualmente a técnica mais empregada para amostras líquidas, como matrizes de águas superficiais e efluentes. A técnica é fundamentada basicamente nos mesmos mecanismos de retenção envolvidos em cromatografia a líquido (CL) de baixa pressão. Ela emprega tipicamente a utilização de cartuchos de polipropileno do tipo seringa ou barril recheados com aproximadamente 50 a 500 mg de sorvente (fase estacionária) com 40-60 µm de tamanho de partícula, fixado no tubo através de dois filtros, comumente chamados de cartuchos de extração (SILVA; COLLINS, 2011). Em geral, os procedimentos de EFS contêm quatro etapas (Figura 6), são elas (QUEIROZ, COLLINS, JARDIM, 2001; LANÇAS, 2009):

a) Condicionamento do cartucho, ou etapa de ativação dos sítios disponíveis do sorvente;
b) Introdução da amostra, ou seja, passagem da amostra pelo sorvente do cartucho. É neste momento que ocorre a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes;
c) Limpeza ou lavagem da coluna (fase estacionária) para retirada dos interferentes (eluição dos interferentes) menos retidos que o analito, e
d) Eluição do analito da coluna para posterior análise.

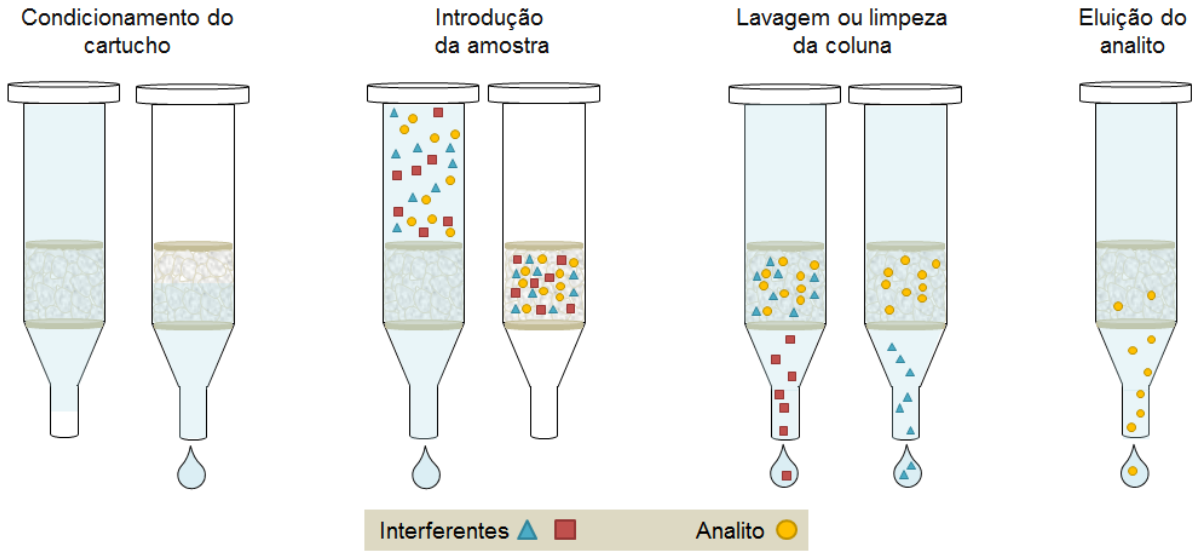


Figura 6. Etapas empregadas em EFS para retenção do(s) analito(s). Fonte: Adaptado de LANÇAS, 2009.

Atualmente, um número grande de sorventes para EFS é disponível comercialmente, sendo, em geral, similares aos usados em CL (QUEIROZ, COLLINS, JARDIM, 2001).

Os materiais sorventes dependem das características de acidez dos compostos analisados. Para extração de antibióticos, os materiais sorventes mais utilizados em EFS são os de copolímero divinilbenzeno e N-vinilpirrolidona que, por apresentarem características de interação mista hidro/lipofílica, podem extrair analitos de média a alta polaridade, apresentando os melhores percentuais de recuperação (QUEIROZ, COLLINS, JARDIM, 2001).

A Tabela 3 mostra uma breve revisão dos trabalhos envolvendo métodos analíticos para determinação de fluoroquinolonas em diversas matrizes utilizando procedimentos de EFS para preparo da amostra.

Tabela 3. Métodos para determinação de fluoroquinolonas em diversas matrizes

Analito	Matriz	Método	Cartucho	Rec %	Referência
CIRPO LEVO NORF	Leite de vaca	CLAE/EM	Oasis HLB (500mg/6mL)	73–113	HERRERA-HERRERA et al, 2011
CIPRO NORF	Esgoto doméstico	CLAE/EM	Oasis WCX (150mg/6mL)	87–94	LEE et al, 2007
CIPRO NORF	Plasma humano	CLAE/FL	C_{18} (500mg/1mL)	72	VYBÍRALOVÁ et al, 2005
CIPRO	Plasma e tecido endometrial de éguino	CLAE/FL	C_{18} (500mg/1mL)	78	GONZÁLEZ et al, 2006
CIPRO	Leite de cabra	CLAE/FL	C_{18} (200mg/6mL)	88	CINQUINA et al, 2003
CIPRO	Urina humana	CLAE/FL	C_{18} (200mg/3mL)	86	ZOTOU et al, 2002
CIPRO	Plasma e tecido de porco e coelho	CLAE/UV	C_{18} (100mg/3mL)	90	MANCEAU et al, 1999
CIPRO	Água de rio	CLAE/DAD CLAE/FL	Oasis HLB (500mg/6mL)	68–77 em pH 4,2 86–93 em pH 2,8	PENG et al, 2008
CIPRO NORF	Água de abastecimento	CLAE/FL	C_{18} e Oasis HLB (500mg/6mL)	31–61 64–81	SHI et al, 2010
CIPRO NORF	Água de abastecimento	CLAE/MS	Oasis HLB (500mg/6mL)	68–107	SENTA et al, 2008

3.5 Validação de Metodologia Analítica

A validação de um método analítico é definida como as várias etapas que um método deve ser submetido, para obter a sua qualificação e atender às exigências estabelecidas para seu uso. O objetivo de validar um procedimento analítico é demonstrar que está adequado ao que se propõe (BERNARDES, SOUZA, 2011). Em geral, a validação avalia se o método é adequado para a proposta dentro de um intervalo de concentração e materiais teste aos quais será aplicado. Resultados analíticos não confiáveis não só podem ser contestados, mas também podem levar a laudos incorretos (PETERS, MAURER, 2002).

É essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação de faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados (PETERS, MAURER, 2002).

Os órgãos United States Pharmacopoea (USP), International Conference on Harmonisation (ICH), Food and Drug Adminidtration (FDA) (SHABIR, 2003), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2003) definem quais os parâmetros devem ser avaliados e seus critérios de aceitação de acordo com objetivos do método. A Tabela 4 demonstra alguns parâmetros recomendados por órgãos, como guias ou resoluções.

Tabela 4. Parâmetros de validação segundo USP, ICH, FDA, ANVISA e INMETRO

USP	ICH	FDA	ANVISA	INMETRO
Especificidade	Especificidade	Especificidade	Especificidade/ Seletividade	Especificidade/ Seletividade
Exatidão	Exatidão	Exatidão	Faixa de trabalho	Faixa de trabalho
Precisão Repetitividade Precisão intermediária Reprodutividade	Precisão Repetitividade Precisão intermediária Reprodutividade	Precisão Repetitividade Precisão intermediária Reprodutividade	Linearidade	Linearidade
LD	LD	LD	-	Curva de calibração
LQ	LQ	LQ	LD	LD
Linearidade	Linearidade	Linearidade	LQ	LQ
Robustez	Robustez	Robustez	Sensibilidade	-
Faixa de trabalho	Faixa de trabalho	Faixa de trabalho	Exatidão	Exatidão

USP	ICH	FDA	ANVISA	INMETRO
-	-	Sensibilidade	Precisão Repetitividade Precisão intermediária Reprodutividade	Precisão Repetitividade Precisão intermediária Reprodutividade
-	-	Recuperação	Robustez	Robustez
-	-	Estabilidade	Incerteza de medição	-
-	-	*System suitability*	-	-

LD = Limite de Detecção, LQ = Limite de Quantificação.
Fonte: MOREAU; SIQUEIRA, 2010.

A validação total deve ser desenvolvida quando é implementado um método novo, todavia a validação parcial pode ser aplicada em casos em que o método originalmente validado foi modificado. Tais modificações podem incluir, entre outras, transferências entre laboratórios, mudanças de equipamento ou software, mudanças na matriz em que será analisado o analito (SHAH et al, 2000).

Segundo Brito e colaboradores (2003), os critérios a serem aplicados para validação de determinado método depende da sua natureza e propósito. Um método para um determinado analito requer um critério de aceitação e uma abordagem diferente de um método desenvolvido para outro analito.

Usa-se a distinção entre método "novo", "padrão" e "modificado" para caracterizar sua natureza. Método padrão, nessa definição, é o método completamente validado (com todos os parâmetros estabelecidos). Com relação ao propósito do método, os mesmos são classificados em qualitativo, quando destinados apenas a acusar a presença do analito, e quantitativos, podendo ser para análise traços ou componente majoritário na matriz de interesse. A validação requerida para tais métodos está resumida nas Tabelas 5 e 6 (BRITO et al, 2003).

Tabela 5. Parâmetros de validação quanto à natureza

Método	Precisão	Exatidão	LD	LQ	Linearidade	Especificidade
Novo	▲	▲	▲	●	●	▲
Padrão	▲	▲	▲	●	●	■
Modificado	▲	▲	▲	●	■	■

LD = Limite de Detecção, LQ = Limite de Quantificação.
Legenda: ▲ Sempre, ● Se relevante e ■ Não necessário.
Fonte: Adaptado de BRITO et al, 2003.

Tabela 6. Parâmetros de validação quanto ao propósito

Método	Precisão	Exatidão	LD	LQ	Linearidade	Especificidade
Identificação	■	■	▲	■	■	▲
Dosagem do P.A.	▲	▲	■	■	▲	▲
Dosagem de impurezas	▲	▲	■	▲	▲	▲

LD = Limite de Detecção, LQ = Limite de Quantificação, P.A. = princípio ativo.
▲ Sempre, ■ Não necessário.
Fonte: Adaptado de BRITO et al, 2003.

3.6 Local de Estudo

A Bacia Hidrográfica do Rio Anil localiza-se no Brasil, estado do Maranhão, na Ilha de São Luís, município de São Luís, na porção noroeste entre as latitudes 02º29'14" e 02º34'47" sul e as longitudes 44º19'15" e 44º12'55" oeste. O Rio Anil, com cerca de 13,8 Km de extensão (Figura 7), com grande parte de seu curso constituído por manguezais, com suas nascentes localizadas na Chapada do Tirirical (Bairro Aurora), corta o centro urbano da cidade de São Luís na porção noroeste desaguando na baía de São Marcos (LABOHIDRO, 1980; SIQUEIRA, 1987 apud ALCANTARA, MOCHEL e AMORIM, 2005).

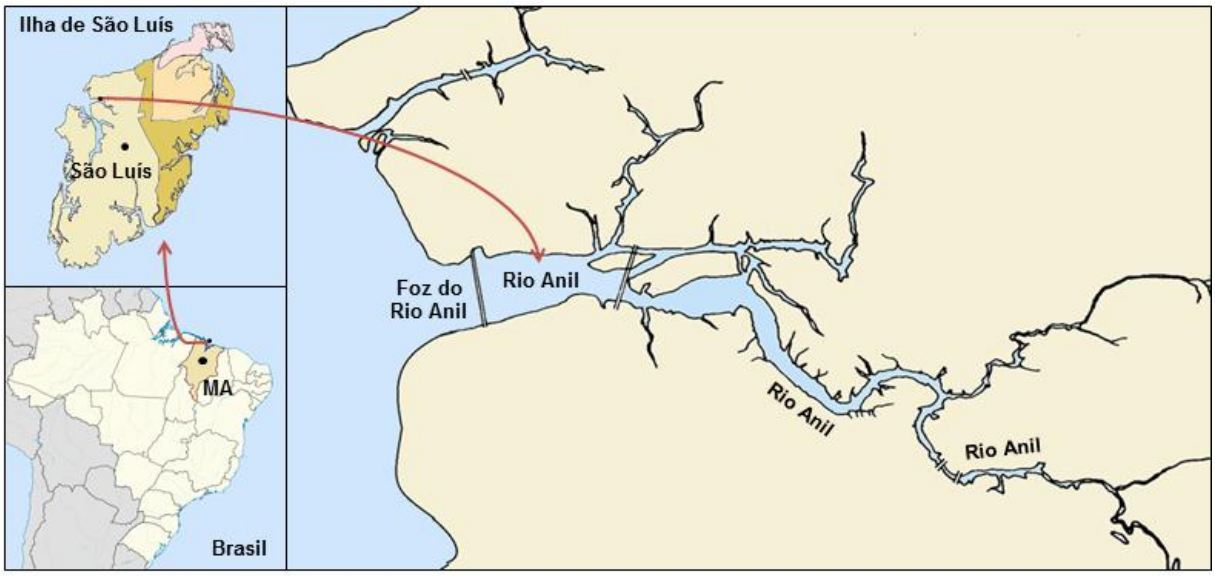


Figura 7. Localização do Rio Anil. Fonte: Adaptado de REBÊLO, 2001 e LEE LIAO et al, 1984.

Nas ultimas décadas, a bacia do Rio Anil foi extremamente agredida pelo grande crescimento populacional acarretando sérios problemas de degradação

ambiental implicando no gradativo desaparecimento do leito deste rio e seus afluentes (ALCÂNTARA et al, 2004). O Rio Anil é receptor de grande quantidade de efluentes oriundos dos esgotos domésticos *in natura*, que são lançados constantemente nos corpos hídricos da Ilha causando a eutrofização dos ambientes fluviais. Apesar da grande poluição, o Rio Anil é carente de estudos e iniciativas para minimizar a devastação que vem sofrendo.

3.7 Estudos Ecotoxicológicos

Segundo Lameira (2008) os ensaios de ecotoxicologia consistem na exposição de organismos aquáticos a várias concentrações de um efluente ou de uma substância química em um determinado período de tempo e através deles podem-se conhecer os efeitos que estas amostras causam aos organismos teste, tais como, efeitos letais, fisiológicos, desordens comportamentais, mutagênicos e/ou teratogênicos.

Em ensaios de toxicidade, na sua maioria, adotam procedimentos padronizados que usam organismos representativos de vários níveis tróficos (JACONETTI, 2005). Atualmente, os crustáceos da ordem Cladócera são os organismos teste mais empregados em ensaios de ecotoxicidade. Basicamente, eles são caracterizados por possuírem uma rápida reprodução assexuada, curto ciclo de vida, sensibilidade aos tóxicos presentes no ambiente, fácil cultivo e manutenção em laboratório (SHURIN & DODSON, 1997). Em vias gerais, as espécies mais usadas em testes de ecotoxicidade são as exóticas como, *Daphnia similis* e *Daphnia magna* e a cosmopolita, *Ceríodaphnia dúbia.* Porém estes organismos não ocorrem naturalmente nos corpos d'água brasileiros.

O uso de espécies nativas para avaliação da toxicidade possibilita maior representatividade quando a proximidades dos dados de ensaios em laboratório com as condições "*in situ*", aumentando a confiabilidade das avaliações de toxicidade. Por isso, a utilização de espécies nativas tem se tornado uma prática comum em diversos centros de pesquisas nacionais (JACONETTI, 2005). No Brasil a espécie nativa de água doce *Ceríodaphnia silvestrii* tem sido bastante utilizada em ensaios de ecotoxicidade aguda e crônica. Há oito anos esta espécie foi padronizada no Brasil como organismo teste pela Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT

(ABNT-NBR, 2005), após ter sido estudada e adaptada ao cultivo em laboratório em condições padronizadas (FONSECA; ROCHA, 2004).

Segundo Zagatto e Bertoletti (2008) os ensaios de toxicidade aguda são caracterizados por estimar a concentração de substância-teste que causa efeito severo em 50 % da população exposta em um curto período do ciclo de vida dos organismos-testes, variável para cada espécie. A partir destes testes se estabelece a concentração letal (CL_{50}), ou concentração efetiva (CE_{50}), ou seja, a concentração que causa efeito adverso a 50% dos organismos-teste (ABNT, 2004).

Os ensaios de ecotoxicidade crônica comumente compreendem um maior tempo de exposição, que varia de acordo com o ciclo de vida do indivíduo em estudo. A exposição dos organismos ao agente tóxico, em níveis subletais, pode ocasionar efeitos que não são observáveis em testes de toxicidade aguda, necessitando-se da utilização dos testes de toxicidade crônica, o qual permitirá analisar os efeitos sutis ao organismo exposto (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Em ensaios de toxicidade crônica, o objetivo é avaliar entre quais concentrações do agente tóxico podem-se ocasionar alterações no crescimento, reprodução e sobrevivência do organismo-teste, avaliando-se assim, o CENO (concentração que não causa efeito observado no ciclo de vida do organismo) e o CEO (concentração que causa efeito observado no ciclo de vida do organismo) (CAPIZZI et al, 1985 apud ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008, ABNT, 2005).

3.7.1 Ensaios ecotoxicológicos com fluoroquinolonas

Trabalhos científicos demonstraram que as fluoroquinolonas apresentam toxicidade a diversos organismos e em diferentes espécies de plantas. Como exemplo, têm-se os estudos realizados por Robinson, Belden, e Lydy (2005) com sete fluoroquinolonas (CIPRO, lomefloxacino, ofloxacino, LEVO, clinafloxacino, enrofloxacino e flumequino) em cinco organismos aquáticos. A cianobactéria *Microcystis aeruginosa* foi o organismo mais sensível em relação ao crescimento e reprodução, com CE_{50} variando de 7,9 a 1960 $\mu g.L^{-1}$, seguida de macrófita de água doce *Lemna minor* com valores de CE_{50} que variaram entre 53 a 2470 $\mu g.L^{-1}$, e da alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* com valores de CE_{50} entre 1100 a 22700 $\mu g.L^{-1}$. Brain e colaboradores (2004) confirmaram a presença de fitotoxicidade significativa para a planta aquática *Lemna gibba* quando exposta aos membros

pertencentes à fluoroquinolonas, sulfonamidas, e a classes de antibióticos de tetraciclinas.

Os testes agudos com *Daphnia magna* e *Pimephales promelas* mostrou baixa toxicidade com valores de CENO próximos de 10 $mg.L^{-1}$. Pesos secos obtidos de peixes *Brachydanio rerio* tratados com 10 $mg.L^{-1}$ de CIPRO, LEVO e ofloxacino foram significativamente mais elevados do que dos peixes do controle (ROBINSON; BELDEN; LYDY, 2005).

Segundo Robinson e colaboradores (2005) a concentração de fluoroquinolonas em corpos aquáticos pode ser estimada em torno de 1 $mg.L^{-1}$ com base em concentrações ambientais, medidos em águas superficiais, relatados anteriormente. Nesse nível, apenas *M. aeruginosa* pode estar em risco em águas superficiais. No entanto, a toxicidade seletiva destes compostos pode ter implicações para a estrutura da comunidade aquática.

Apesar de haver alguns trabalhos relatados na literatura com ensaios de toxicidade com fluoroquinolonas, ainda considera-se escasso as informações sobre os efeitos destes antibióticos nos ecossistemas, sendo necessários estudos mais aprofundados, como por exemplo, testes “in situ” ou ensaios de toxicidade com outras espécies, como organismos bentônicos, comunidades bacterianas aquáticas e espécies nativas, a fim de avaliar os efeitos que tais compostos provocam na biota.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas de desenvolvimento, otimização, validação e aplicação do método de detecção dos três antibacterianos fluoroquinolonicos deste estudo foram realizadas no laboratório do Grupo de Estudos Ambientais (GEA) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão (IFMA), em parceria com o laboratório do Núcleo de Análise de Resíduos de Pesticidas (NARP) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). A etapa de ensaios ecotoxicológicos foi desenvolvida no Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (CRHEA) da Universidade de São Paulo, localizado na cidade de São Carlos (USP–SC).

4.1 Metodologia Analítica

4.1.1 Padrões, solventes e reagentes

Os padrões utilizados foram cedidos pelo GEA do IFMA. Conforme apresentado na Tabela 7, os compostos foram das marcas Fluka® e Sigma®, ambos da Sigma Aldrich®, com pureza mínima de 98%, tendo sido adquiridos em estado sólido, sob forma de pó ou de pequenos cristais amarelados.

Tabela 7. Padrões utilizados no desenvolvimento do estudo

Padrões	Fabricante	Pureza	CAS
Cloreto de Ciprofloxacino monohidratado	Fluka®	≥ 98,0%	86393-32-0
Levofloxacino	Sigma®	≥ 98,0%	100986-85-4
Norfloxacino	Fluka®	≥ 98,0%	70458-96-7

Todos os solventes usados foram de grau cromatográfico. O MeOH e a ACN foram da LiChrosolv® (Merck), o diclorometano (DCM) da Mallinckrodt® (Baker) e o acetato de etila (EtOAc) da F. Maia. A água deionizada foi obtida pelos sistemas Milli-Q®, da Millipore.

Os demais reagentes empregados foram de grau padrão analítico e todos da ISOFAR, são eles: ácido clorídrico (36,5–38,0%), ácido orto-fosfórico (85,0%), ácido fórmico (85,0%), fosfato de sódio monobásico (98,0–102,0%) e cloreto de sódio (99,0%). O gás nitrogênio (99,0%) foi da marca Linde.

Deve-se ressaltar que todas as vidrarias utilizadas para manuseio dos padrões, reagentes, solventes e soluções foram previamente lavadas com solução de Extran® alcalino 5% e depois enxaguados com água potável, água destilada e ambientados com o solvente apropriado, respectivamente.

4.1.2 Preparo e armazenamento de soluções estoque e soluções de trabalho

Partindo dos compostos sólidos dos padrões dos antibacterianos fluoroquinolonicos em estudo, foram preparadas soluções estoque de 100 $mg.L^{-1}$ de cada analito. O CIPRO e o LEVO foram diluídos em água deionizada e o NORF em ACN, devido à sua baixa solubilidade em água. As soluções estoque foram armazenadas em frasco âmbar sob refrigeração, ao abrigo de luz em temperatura de 2°C e renovadas a cada 30 dias, segundo recomendações de Muchohi e colaboradores (2010), devido à instabilidade das fluoroquinolonas em solução.

Para o preparo das soluções de trabalho, partiu-se primeiramente da mistura de alíquotas iguais das diferentes soluções padrão e em seguida, diluiu-se esta mistura com a fase móvel escolhida para análise, como representado na Figura 8. Todas as soluções de trabalho foram armazenadas em frasco âmbar e renovadas diariamente.

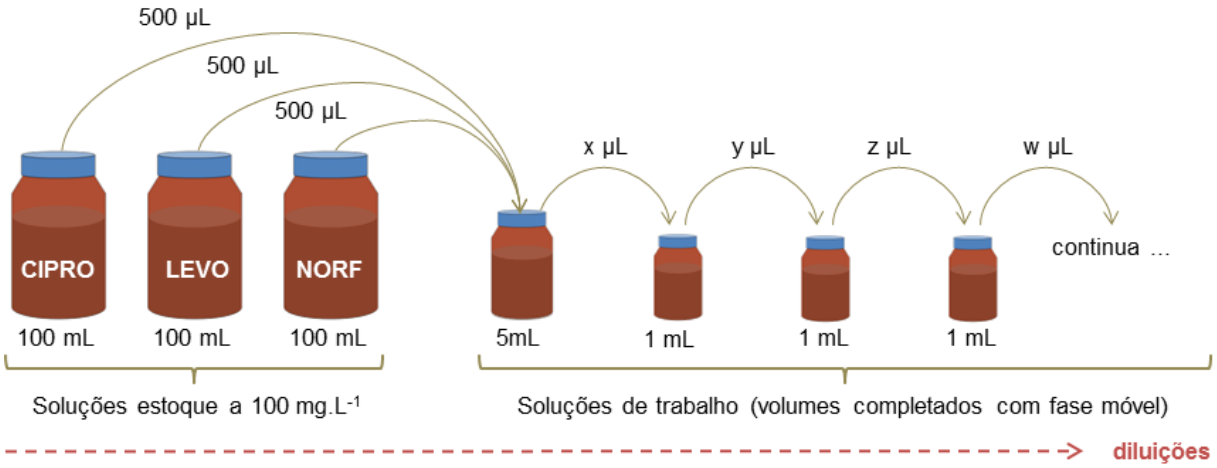


Figura 8. Soluções estoque e soluções de trabalho.

4.1.3 Equipamento para cromatografia a líquido (CL)

O sistema cromatográfico de CL usado foi da marca Shimadzu® LC 20AT Prominence, do modelo DGU-20A com duas bombas de alta pressão acopladas a

um detector de FL modelo RF-10AXL também da Shimadzu®, e injetor com capacidade de 20 µL. Para o controle do equipamento e obtenção dos dados, fez-se uso de um microcomputador e do programa LCsolution®.

4.1.4 Otimização das condições cromatográficas

Foram testadas e utilizadas as colunas modelo Kinetex C_{18} da marca Phenomenex® com 50 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno, preenchida com C_{18} quimicamente ligado a sílica com partículas de 2,6 µm e a coluna Luna C_{18} da marca Phenomenex® com 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno, preenchida com C_{18} quimicamente ligado a sílica com partículas de 5 µm. A coluna de guarda utilizada foi C_{18} de 5 cm de comprimento, K50-4282 da Phenomenex®.

Formam empregadse soluções de trabalho de 100 e 250 $\mu g.L^{-1}$ para testes de verificação do comportamento dos analitos frente às diversas condições cromatográficas como fase móvel, fluxo, t_R, resolução dos picos cromatográficos, λ_{exc} e λ_{ems} para detecção por FL. Os testes basearam-se em alguns procedimentos expostos na Tabela 2, com algumas alterações, tais como variação no fluxo e nas proporções dos solventes.

4.1.5 Curvas analíticas e de calibração, linearidade e sensibilidade

Após a definição das condições cromatográficas, foram construídas curvas analíticas e de calibração dos três analito, a partir das soluções de trabalho.

A construção das curvas analíticas foi estabelecida para verificação de toda a faixa linear dinâmica de detecção do equipamento, ou seja, o intervalo de massas dentro do qual a resposta do detector foi linear. Assim, estabeleceram-se as menores e maiores concentrações detectáveis com reprodutibilidade.

Então, a partir das curvas analíticas, foram determinadas as faixas de concentração das curvas de calibração, sendo de 0,5–200 $\mu g.L^{-1}$ para os compostos CIPRO e NORF e de 2,5–200 $\mu g.L^{-1}$ para o composto LEVO.

As concentrações analisadas para a construção das curvas de calibração do CIPRO e NORF foram 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 20; 30; 40; 50; 100; 200 $\mu g.L^{-1}$ e a do LEVO foram 2,5; 5,0; 10; 20; 30; 40; 50; 100; 200 $\mu g.L^{-1}$, onde cada ponto foi injetada em triplicata, tendo sido calculadas as médias e os desvios-padrão relativos.

A linearidade do método, ou seja, a proporcionalidade da quantidade dos analitos na amostra foi estabelecida pelo coeficiente de correlação linear (R^2) e a sensibilidade, ou seja, a capacidade de distinção de duas quantidades próximas do analito, foi definido pelo coeficiente angular proveniente da equação da reta das curvas de calibração (AMARANTE et al, 2001; LANÇAS, 2009). O aplicativo Microsoft Excel® 2010 foi utilizado para a construção das curvas analíticas e de calibração, cálculos da equação da reta e R^2.

4.1.6 Preparo das amostras

O preparo das amostras foi realizado por meio de EFS, tendo sido avaliados dois tipos de cartuchos: cartuchos C_{18} (octadecilsilano) com 500 mg de preenchimento e capacidade de 6 mL da Strata®, Phenomenex®, e cartuchos polimérico (N-vinilpirrolidona e divinilbenzeno) com 60 mg de preenchimento e capacidade de 3 mL da Oasis HLB®, Waters®.

Para a montagem do sistema de extração, utilizou-se um *Manifold* da Phenomenex® para múltiplas extrações com 12 canais. Durante a extração dos analitos, primeiramente selecionou-se metodologias de EFS que estavam descritas na literatura para pelo menos uma das fluoroquinolonas em estudo, conforme descrito na Tabela 8. Optou-se em testar três destes procedimentos, que estão expostos detalhadamente na Tabela 3, adaptando-os para os três analitos e, em alguns casos, para a análise da matriz, uma vez que poucos trabalhos envolviam a extração simultânea das três fluoroquinolonas ou para a matriz em estudo.

Inicialmente, foram testados os procedimentos de EFS utilizados por Shi et al (2010), aqui chamados de E_1. Nos testes, foi utilizado o cartucho de EFS preenchidos com C_{18} da Strata®, Phenomenex®. Posteriormente, foram testados e adaptados os procedimentos de EFS descritos por Shi et al (2010) e Peng et al (2008), designados de E_2 e E_3, respectivamente. Para E_2 e E_3, empregou-se o cartucho polimérico Oasis HLB® da Waters®.

É importante ressaltar que, para a execução dos procedimentos EFS, utilizou-se água deionizada com o objetivo de garantir que a matriz estivesse isenta dos analitos, na vazão de 1 $mL.min^{-1}$ na etapa de adição da amostra e somente a ação da gravidade nas demais etapas.

Tabela 8. Procedimentos de EFS pesquisados e propostos para uso no método

Etapa	Procedimentos de EFS		
	E_1	E_2	E_3
Tipo de cartucho	C_{18} Strata®	Oasis HLB®	
Condicionamento do cartucho	2,5x2 mL de DCM, 2,5x2 mL de MeOH, 3x3 mL de H_3PO_4 pH 3		3x2 mL de MeOH e EtOAc (1:1), 3x2 mL de MeOH, 3x2 mL HCl pH 3
Adição da amostra	200 mL pH 3 acidificada com H_2PO_4		200 mL á 2,93 $g.L^{-1}$ de NaCl acidificada á pH 3 com HCl
Lavagem do cartucho	3x3 mL de solução pH 2-3 de H_3PO_4 a 5% MeOH		2 mL de solução de MeOH 5%
Eluição dos analitos	3x2 mL de MeOH á 2% de CH_2O_2, v:v		3x2 mL de solução de MeOH 95%
Secagem do extrato	N_2 á 0,1 mL		
Reconstituição	á 1 mL com fase móvel		

Antes da injeção dos extratos finais no equipamento de CLAE, estes foram filtrados em filtros de 0,45 µm de diâmetro, de nylon, da Chrom Tech®.

4.1.7 Ensaios de recuperação

A recuperação está relacionada à exatidão (BRITO et al, 2003), pois reflete na eficiência da metodologia analítica quanto ao processo de isolamento dos analitos da amostra (LANÇAS, 2009). Neste trabalho, fez-se uso dos procedimentos de EFS para avaliar a recuperação dos analitos da amostra.

Para a realização dos processos de recuperação, foram adicionadas alíquotas de solução de trabalho mista que possuíam CIPRO, LEVO e NORF em água deioniza em três níveis de fortificação: menor nível, nível médio e maior nível (BRITO et al, 2003), sendo eles: 0,025; 0,1 e 1 $\mu g.L^{-1}$, respectivamente (Figura 9). No mínimo cinco análises foram realizadas para cada um dos três níveis de fortificação estudados. Ao final do procedimento, objetivou-se recuperar as concentrações de 5; 20; 200 $\mu g.L^{-1}$, por conseguinte, ter-se-ia um fator de concentração igual a 200, em um nível de recuperação de 100%.

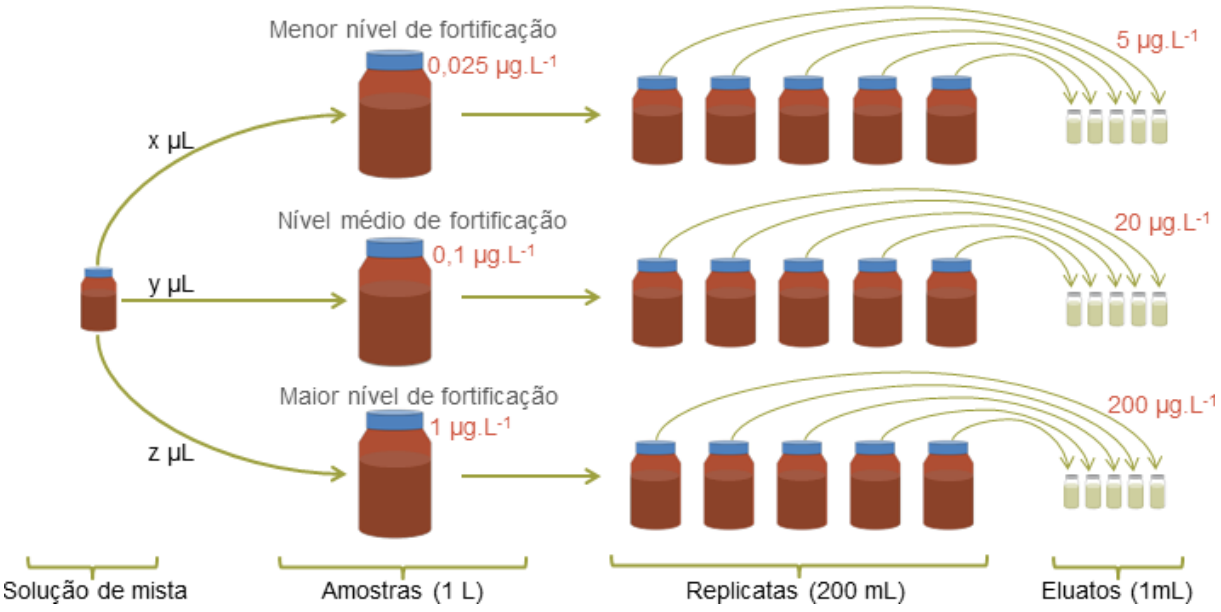


Figura 9. Processo de fortificação, dopagem ou enriquecimento das amostras. Fonte: Adaptado de BRITO et al, 2003.

O parâmetro de comparação entre os resultados obtidos dos procedimentos de EFS estabeleceu o percentual de recuperação das fluoroquinolonas, cujo valor foi adquirido relacionando-se suas áreas de picos cromatográficos de soluções aquosas extraídas com soluções de trabalho não extraídas, ambas com a mesma concentração, através da seguinte equação (LANÇAS, 2009):

$$Rec\ (\%) = \left(\frac{\bar{X}_i}{\bar{X}_v}\right)\ x\ 100 \qquad \text{equação (1)}$$

Onde: *Rec*(%) = percentual de recuperação, $\bar{X}_i$ = média das áreas dos picos cromatográficos obtidos de amostras extraídas ou "recuperadas", e $\bar{X}_v$ = média das áreas dos picos cromatográficos obtidos de amostras não-extraídas.

Para os estudos de recuperação, foram realizados testes de significância, utilizando o teste "t" de Student em nível de 95% de significância baseando-se na equação abaixo (BRITO et al, 2003):

$$t = \frac{Rec-100}{\frac{S_{Rec}}{\sqrt{n-1}}} \qquad \text{equação (2)}$$

Onde: *Rec* = média das recuperações obtidas para n repetições; *100* = recuperação percentual desejada; *n* = número de repetições (n ≥ 5) e S_{Rec} = desvio padrão das recuperações.

4.1.8 Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Os Limites de Detecção e Quantificação Instrumental (LDI e LQI) foram estabelecidos a partir do branco da matriz. O LDI e LQI foram determinados mediante o sinal/ruído; o desvio-padrão da resposta e o coeficiente angular da equação da reta foram obtidos na curva de calibração (BRITO et al, 2003). O desvio padrão foi obtido injetando-se no mínimo sete vezes o branco da amostra para posterior aplicação nas equações abaixo (3 e 4) correspondentes ao LDI e LQI, respectivamente.

$$LDI = \frac{3\ x\ s}{S} \qquad \text{equação (3)}$$

$$LQI = \frac{10\ x\ s}{S} \qquad \text{equação (4)}$$

Onde: *s* = desvio padrão do branco e *S* = coeficiente angular da curva analítica.

No entanto, existe um interesse em se desenvolver, criteriosamente, um método com os menores valores de LD e LQ, pois assim pode-se detectar e quantificar concentrações em níveis de traço na matriz de estudo, refletindo na eficiência do método. Sendo assim, os valores estimados para LD foram calculados a partir de dados obtidos do branco da matriz e dos parâmetros da curva analítica, conforme as seguintes equações:

$$LD = \frac{2\ x\ t_{n,95\%}\ x\ S_{com}}{S} \qquad \text{equação (5)}$$

Onde: $t_{n,95\%}$ = valor tabelado em função de *n* (número de análises); *S* = coeficiente angular da curva de calibração, e S_{com} = desvio padrão combinado das recuperações e desvio padrão do menor nível de fortificação, calculado através da equação 4.

$$S_{com} = \sqrt{\frac{(m-1){S_A}^2+(n-1){S_B}^2}{m+n-2}} \qquad \text{equação (6)}$$

Na qual, *m* = número de determinações do menor nível de fortificação; *n* = número de determinações do branco; S_A = desvio-padrão da amostra do menor nível de fortificação, e S_B = desvio-padrão do branco.

O LQ do método foi estabelecido como sendo o menor nível de fortificação com níveis aceitáveis de recuperação.

4.1.9 Seletividade

Segundo Lanças (2009), a seletividade da metodologia corresponde à capacidade do método em determinar seguramente o analito na presença de outras substâncias presente na matriz. No presente trabalho, a seletividade foi medida através da comparação de cromatogramas provenientes de processos de EFS do branco da matriz e da matriz fortificada com os analitos, em cinco réplicas, a fim de verificar a presença de interferentes nos mesmo t_R das fluoroquinolonas em estudo.

4.1.10 Coleta, transporte e preparo das amostras

Os procedimentos de coleta e transporte das amostras foram realizados conforme recomendações sugeridas pela Agencia Nacional de Águas (ANA) e pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) para coleta de águas superficiais (CETESB, 2011).

Os pontos de coleta do Rio Anil estão identificados na Figura 10.

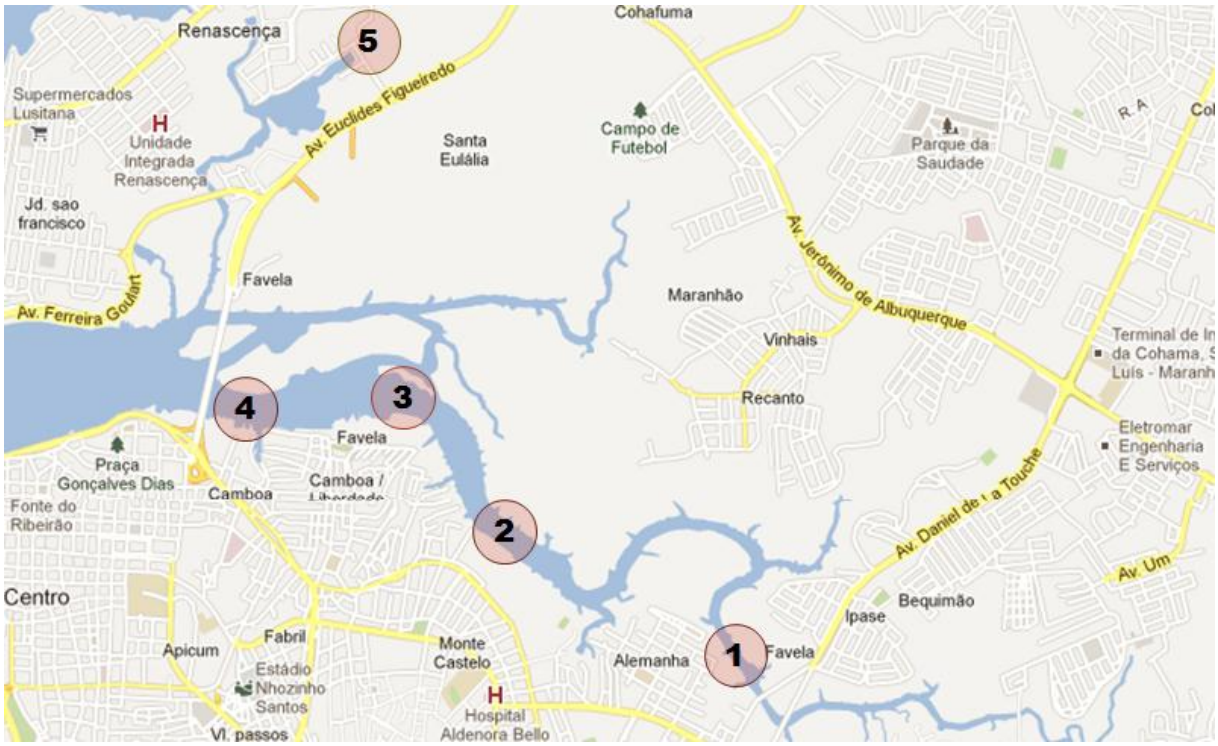


Figura 10. Pontos de coleta das amostras de água do Rio Anil. Fonte: Google Mapas, 2012.

A coleta das amostras de água do Rio Anil foi realizada no dia 5 de dezembro de 2012, entre 8–11 horas da manhã. Para coleta do material, foram evitados locais próximos às margens, tendo sido as amostras armazenadas em frascos âmbar, previamente limpos e secos. As coletas foram feitas contra corrente da água, em profundidade de 30 cm da superfície. Posteriormente, os frascos foram hermeticamente fechados, codificados e transportados em para o GEA e acondicionados na geladeira. Para o transporte das amostras, foi utilizada caixa térmica contendo gelo com temperatura mantida em 2°C.

O preparo das amostras por EFS ocorreu em até 48 h após a coleta, para posterior análise no sistema cromatográfico CLAE/FL. Antes de empregar os procedimentos de EFS, as amostras foram filtradas em filtro de 0,45 µm de diâmetro de poro (Millipore, Merck).

4.2 Ensaios de Ecotoxicidade

Os ensaios de ecotoxicidade foram realizados somente com os compostos CIPRO e LEVO, pois o NORF é pouco solúvel em água, dificultando a execução dos ensaios de ecotoxicidade com o organismo *C. silvestrii*. É importante ressaltar que os ensaios ecotoxicológicos foram realizados sempre em soluções individuais para cada composto.

4.2.1 Teste de sensibilidade

Os testes de sensibilidade têm como função permitir a observação sobre a condição dos organismos usados para iniciar um teste de toxicidade. Por isso são considerados como pré-requisito para realização de ensaios de toxicidade. Estes testes devem ser realizados periodicamente, através da exposição dos organismos teste a diferentes concentrações de uma substância de referência para avaliar a sua sensibilidade (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

A avaliação da sensibilidade da *C.silvestríi* com o composto Cloreto de Sódio (NaCl) (substância de referência) foi verificada antes da realização dos testes preliminares e testes de toxicidade aguda. A metodologia de ensaios foi baseada nas normas da ABNT (2004; 2005). As soluções teste nas concentrações de 1,0;

1,3; 1,6; 1,9 e 2,2 $g.L^{-1}$, foram preparadas a partir de diluições sucessivas de uma solução estoque de 100 $g.L^{-1}$ dos antibióticos CIPRO e LEVO.

Neonatas entre 6 a 24 h foram selecionadas de cultivos individuais a partir da 3° postura para exposição às soluções teste. Como água de diluição, utilizou-se água natural reconstituída. De acordo com a Agência de Proteção Ambiental (EPA, 2002), a água de superfície ou água reconstituída é aceitável como água de diluição para testes com substâncias químicas, se os Dafinídeos sobreviverem na duração do cultivo, a aclimatação e no período do teste, sem mostrar sinais de estresse.

A dureza da água de diluição foi ajustada entre 40 e 48 $mg.L^{-1}$ com carbonato de cálcio ($CaCO_3$), e submetida à aeração por no mínimo 24 h. Antes da realização dos ensaios, foram aferidos os seguintes parâmetros de potabilidade da água: dureza, pH (7,6 ≥ pH ≥ 7), oxigênio dissolvido (OD ≥ 5 $mg.L^{-1}$) e condutividade, a fim de verificar a conformidade do sistema para a espécie em estudo.

Os testes foram realizados em copos plásticos descartáveis com capacidade de 50 mL e aferidos com uma micropipeta a 10 mL. Foram colocados cinco organismos em cada copo, utilizando quatro réplicas, totalizando um grupo de vinte organismos em teste. Para avaliação dos testes, preparou-se um controle com 10 mL de água de diluição não contaminada, com quatro réplicas, contendo cada uma cinco organismos. A Figura 11 exemplifica um esquema de montagem dos testes de sensibilidade, testes preliminares e testes de toxicidade aguda. Durante o período que os testes estavam sendo realizados (48 h) os organismos não foram alimentados.

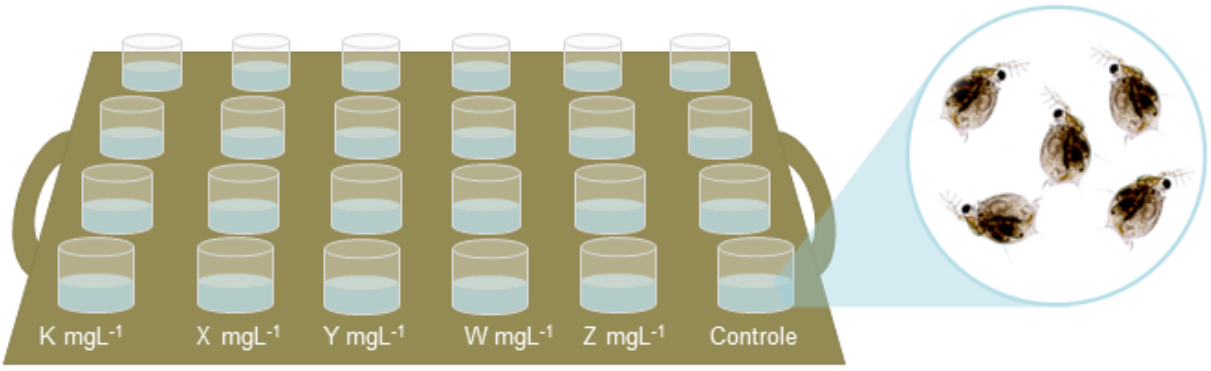


Figura 11. Esquema ilustrativo da montagem dos testes de sensibilidade, testes preliminares e testes de toxicidade aguda.

O ensaio foi mantido a 25°C (±2) e realizado com fotoperíodo (claro/escuro de 16/8 h). O efeito observado para os organismos foi a imobilidade.

Os organismos que não apresentaram movimentação em um intervalo de 15 s foram considerados imóveis (ABNT, 2004; EPA, 2002). Também foi observado, como requisito para considerar o teste válido, a mortalidade inferior a 10% dos organismos expostos no controle. As condições de ensaios e análise dos resultados dos testes preliminares e testes de toxicidade aguda seguem os mesmos parâmetros estabelecidos para o teste de sensibilidade e encontram-se resumidos na Tabela 9.

Tabela 9. Resumo das condições de ensaio dos testes de sensibilidades, testes preliminares e testes de toxicidade aguda com *C. silvestrii*

Parâmetros	**Parâmetros**
Tipo de ensaio	Semi-estático
Idade do organismo teste	6–24 horas
Substâncias teste	NaCl (teste de sensibilidade), antibióticos CIPRO e LEVO (testes preliminares e testes de toxicidade aguda)
Câmara teste	Copos descartáveis
Troca de soluções	Não
Água de diluição	Água reconstituída
Volume mínimo da solução teste	10 mL
Número mínimo de diluições	5, mais controle (teste de sensibilidade e testes de toxicidade aguda), e 1 mais controle (testes preliminares)
Número mínimo de replicata por diluição	4
Número de organismos por replicata	5
Alimentação	Não
Temperatura	25°C (± 2)
Fotoperíodo	Sim (claro/escuro de 16/8 h)
Duração do teste	48 horas
Efeito observado	Imobilidade
Expressão dos resultados	$CE(I)_{50(48h)}$

Fonte: Adaptado de ABNT, 2005.

A $CE(I)_{50(48h)}$ (concentração inicial efetiva que causa imobilidade a 50% dos organismo no intervalo de 48 horas) do teste de sensibilidade e dos testes de toxicidade aguda foi determinada para cada ensaio através do método Spearman-Karber (HAMILTON et al, 1977 apud LAMEIRA, 2008).

4.2.2 Testes preliminares

Foram realizados testes preliminares com a *C. silvestrii* com os compostos CIPRO e LEVO, com o objetivo de determinar as faixas de concentração dos antibacterianos a serem utilizados nos testes agudos definitivos.

As soluções teste foram preparadas a partir de diluições sucessivas de soluções estoque de 100 $mg.L^{-1}$ de CIPRO e LEVO. As soluções estoques foram mantidas sob refrigeração a temperatura de até 4°C, ambientadas no momento dos testes e renovadas a cada 15 dias. A concentração das soluções utilizadas para os ensaios preliminares foram de 5 $mg.L^{-1}$ para ambos os compostos. Esta concentração foi escolhida com base nos estudos de Robson e colaboradores (2005), que relatou efeito agudo em *D. magna* com o antibiótico CIPRO em concentração de aproximadamente 10 $mg.L^{-1}$.

4.2.3 Testes de toxicidade aguda

Depois de verificados os resultados dos testes preliminares, foram montados quatro testes de toxicidade aguda para cada substância teste. As concentrações testadas variaram de 0,0625 a 5 $mg.L^{-1}$ para ambos os compostos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Otimização das condições cromatográficas

As condições cromatográficas, como tipo de coluna, fase móvel, fluxo da fase movél, tempo de retenção (t_R), resolução dos picos cromatográficos, comprimentos de onda (λ_{exc} e λ_{ems}) foram avaliados nesta etapa do trabalho.

Os λ_{exc} e λ_{ems} foram fixados em 280 nm e 450 nm, respectivamente, para a otimização da fase móvel e avaliação do desempenho de separação cromatográfica empregando-se a coluna modelo Kinetex C_{18}. Inicialmente, cada analito foi testado separadamente, com soluções de 100 $\mu g.L^{-1}$ e depois com uma solução de trabalho mista de 100 $\mu g.L^{-1}$ de cada analito. As fases móveis utilizadas consistiam em misturas de ACN ou MeOH com tampão fosfato ($NaHPO_4.H_2O$ a 0,04 M, acidificado a pH 3 com H_3PO_4 85%) com proporções da fase orgânica (ACN ou MeOH) variando entre 15 a 30%. Contudo, não foram observadas variações significativas nos $t_{R'}^{S}$ dos analitos entre as diferentes fases móveis testadas. O fluxo de análise que apresentou melhor perfil de simetria dos picos foi de 1 $mL.min^{-1}$.

Apesar da boa simetria dos picos, baixos $t_{R'}^{S}$ (< 2 min) dos analitos, tempos de análises adequados (< 5 min), e pouco solvente utilizado, a coluna Kinetex empregada não se mostrou seletiva para as fluoroquinolonas, pois houve co-eluição dos analitos, sendo impossível quantificá-los separadamente (Figura 12).

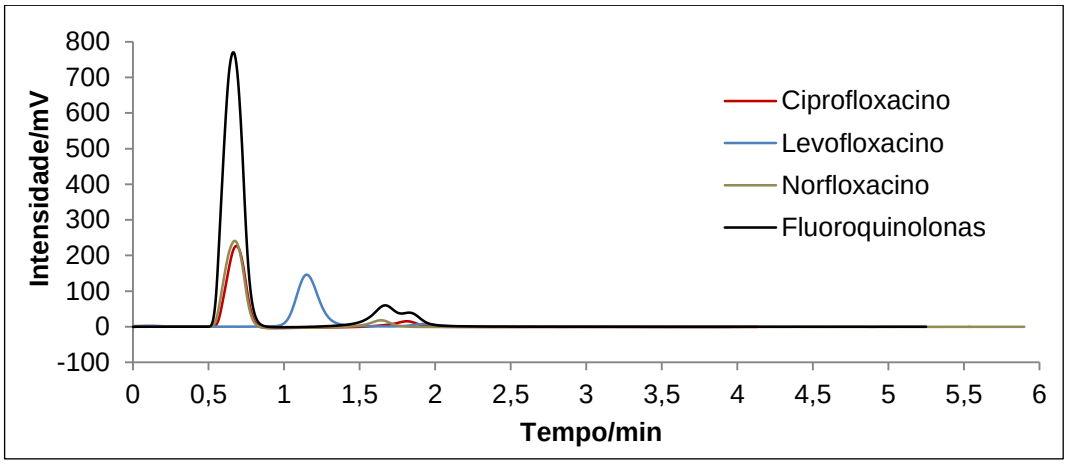


Figura 12. Cromatograma obtido a partir da injeção de 20 µL de soluções de trabalho individuais e mista de CIPRO, LEVO e NORF na concentração de 100 $\mu g.L^{-1}$ em CLAE/FL. Condições cromatográficas: coluna Kinetex (50 x 4,6 mm; 2,6 µm), fase móvel MeOH/tampão fosfato ($NaHPO_4.H_2O$ 0,04 M ajustado a pH 3 com H_3PO_4 85%), na proporção 16/84 (v/v), modo isocrático, fluxo de 1 $mL.min^{-1}$, λ_{exc} = 280 nm e λ_{ems} = 450 nm.

Apesar da coluna Kinetex (50 x 4,6 mm; 2,6 µm) utilizada não ser eficaz na separação multiresidual dos analitos, possivelmente, aumentando-se a partição dos solutos através do aumento do número de pratos teóricos, ou seja, com o aumento no comprimento da coluna cromatográfica, se conseguiria uma boa eficiência de separação apesar de se obter um maior tempo de análise (LANÇAS, 2009). Então, posteriormente, avaliou-se o desempenho de separação cromatográfica da coluna modelo C_{18} Luna (250 x 4,6 mm; 5 µm).

As primeiras fases móveis testadas com a coluna modelo Luna C_{18} foram baseadas nas condições operacionais descritas por Choi e colaboradores (2010), sendo que, neste caso, as proporções dos solventes foram diferentes. As condições consistiam em ACN/tampão fosfato (em diferentes concentrações e condições de pH) com proporções de solventes e fluxos variáveis, no modo isocrático, com λ_{exc} e λ_{ems} de 280 e 450nm, respectivamente. Contudo, não se obteve uma boa separação cromatográfica, uma vez que, mais uma vez, ocorreu sobreposição dos picos (co-eluição) dos analitos LEVO e NORF, como pode ser observado em um dos cromatogramas obtidos, apresentado na Figura 13. Ainda, observou-se que os t_R's aumentaram, não só em função do comprimento da coluna cinco vezes maior, mas também devido ao tamanho das partículas do material do núcleo, duas vezes maior.

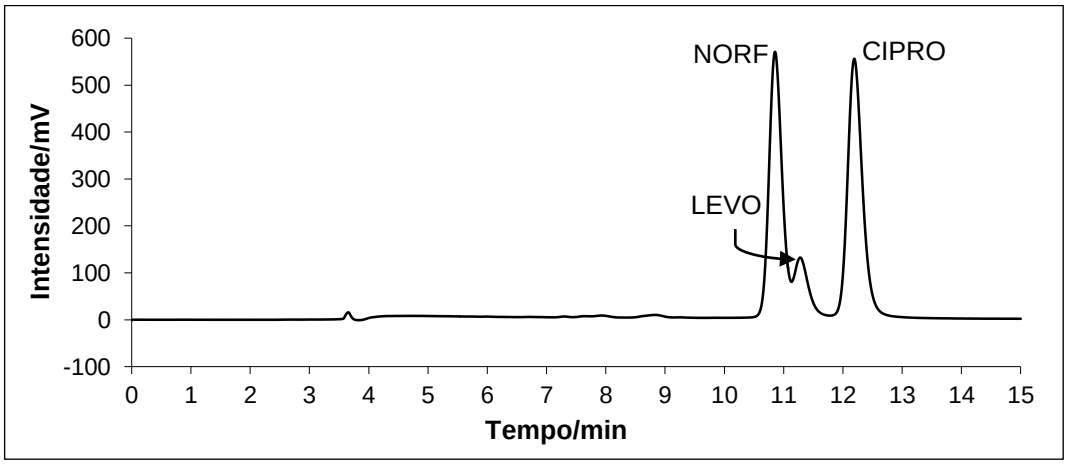


Figura 13. Co-eluição dos analitos LEVO e NORF. Cromatograma obtido a partir da injeção de 20 µL de solução de trabalho mista de CIPRO, LEVO e NORF na concentração de 250 $\mu g.L^{-1}$ em CLAE/FL. Condições cromatográficas: coluna Luna (250 x 4,6 mm; 5 µm), fase móvel ACN/tampão fosfato ($NaHPO_4.H_2O$ 0,04 M ajustado a pH 3 com H_3PO_4 85%), na proporção 16/84 (v/v), modo isocrático, fluxo de 1 $mL.min^{-1}$, λ_{exc} = 280 nm e λ_{ems} = 450nm.

Devido à co-eluição dos compostos LEVO e NORF, foram então testadas outras fases móveis a fim de proporcionar uma melhor separação e resolução dos

picos. Assim, foram empregadas como misturas de MeOH/ACN/tampão fosfato (em diferentes concentrações e condições de pH) em diversas proporções e fluxos, sempre no modo isocrático (MUCHOHI et al, 2010). A mistura que proporcionou melhor eficiência na separação e resolução dos picos foi MeOH/ACN/tampão fosfato ($NaHPO_4.H_2O$ a 0,04 M, acidificado a pH 3 com H_3PO_4 85%), na proporção 22/8/70 (v/v). Contudo, apesar da eficiência na separação e resolução dos picos obtidos com a utilização dessa fase móvel, optou-se em testar uma fase móvel que não fosse necessário misturar dois solventes (MeOH/ACN) em uma única bomba (o equipamento dispunha somente de bomba binária), uma vez que se observou que o t_R dos analitos variavam em cada montagem de fase móvel, fato ocorrido provavelmente devido às pequenas variações na polaridade da fase móvel. A cada preparo desta fase móvel, não se conseguia alcançar uma precisão em relação ao t_R dos picos, como pode ser observado na Figura 14.

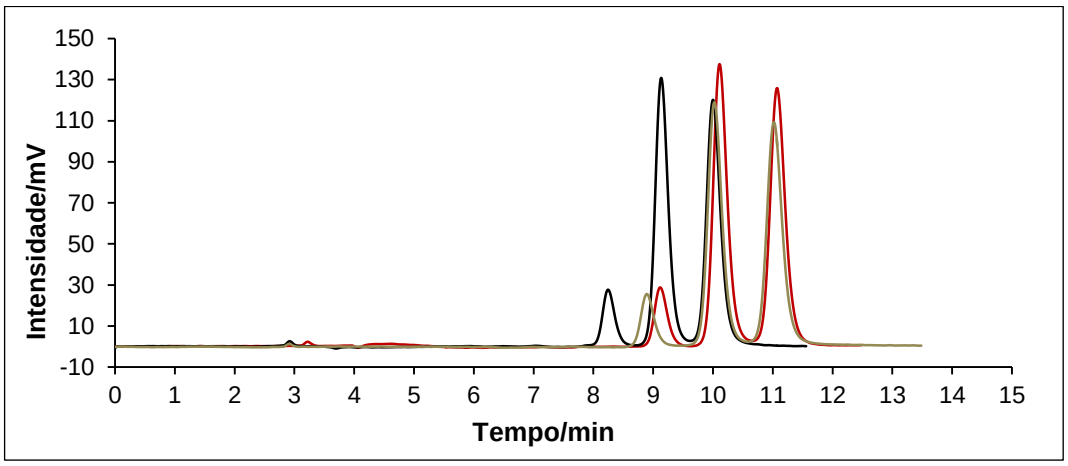


Figura 14. Variação do t_R dos analitos. Cromatograma obtido a partir da injeção de 20 µL de solução de trabalho mista de CIPRO, LEVO e NORF na concentração de 100 $\mu g.L^{-1}$ em CLAE/FL. Condições cromatográficas: coluna Luna (250 x 4,6 mm; 5 µm), fase móvel ACN/MeOH/tampão fosfato ($NaHPO_4.H_2O$ 0,04 M ajustado a pH 3 com H_3PO_4 85%), na proporção 22/8/70 (v/v), modo isocrático, fluxo de $1mL.min^{-1}$, λ_{exc} = 280 nm e λ_{ems} = 450 nm.

Assim, avaliou-se a fase móvel formada pela mistura MeOH/tampão fosfato ($NaHPO_4.H_2O$ a 0,04 M, acidificada a pH 3 com H_3PO_4 85%), em diversas proporções, onde 30/70 (v/v) foi a que apresentou melhor condições de análise, ou seja, o MeOH apresentou-se como melhor solvente diferenciador em relação a ACN para os analitos. De acordo com o as condições experimentais empregadas, foi possível estabelecer uma reprodutibilidade entre os perfis cromatográficos de resolução e separação dos picos, fluxo e t_R dos analitos, não havendo co-eluição das espécies, como pode ser observado no cromatograma da Figura 15.

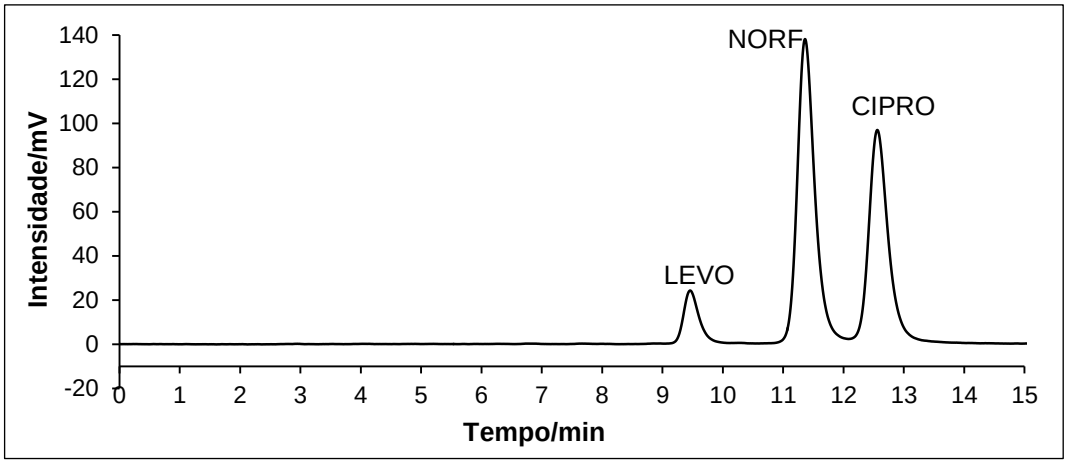


Figura 15. Cromatograma obtido a partir da injeção de 20 µL de solução de trabalho mista de CIPRO, LEVO e NORF na concentração de 100 µg.L^{-1} em CLAE/FL. Condições cromatográficas: coluna Luna (250 x 4,6 mm; 5 µm), fase móvel MeOH/tampão fosfato ($NaHPO_4.H_2O$ 0,04 M ajustado a pH 3 com H_3PO_4 85%), na proporção 30/70 (v/v), modo isocrático, fluxo de 1 mL.min^{-1}, λ_{exc} = 280 nm e λ_{ems} = 450 nm.

Com as condições cromatográficas estabelecidas, os t_R obtidos para o LEVO, NORF e CIPRO ocorreram em 9,5; 11,8 e 12,5 min, respectivamente. Estabeleceu-se, como tempo total de análise (t_T) 15 min para a coluna modelo C_{18} Luna (250 x 4,6 mm, 5 µm).

Também foram realizados testes de verificação do perfil dos picos cromatográficos dos analitos frente a diferentes comprimentos de onda, conforme apresentado no cromatograma da Figura 16.

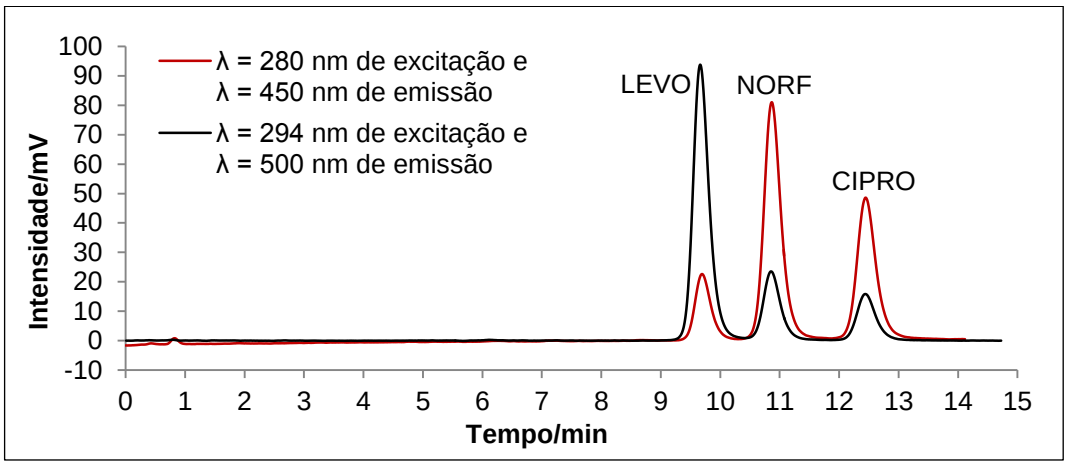


Figura 16. Avaliação dos comprimentos de onda. Cromatograma obtido a partir da injeção de 20 µL de solução de trabalho mista de CIPRO, LEVO e NORF na concentração de 100 µg.L^{-1} em CLAE/FL. Condições cromatográficas: coluna Luna (250 x 4,6 mm; 5 µm), fase móvel MeOH/ACN/tampão fosfato ($NaHPO_4.H_2O$ 0,04 M ajustado a pH 3 com H_3PO_4 85%), na proporção 23/7/70 (v/v), modo isocrático, fluxo de 1 mL.min^{-1}.

De acordo com a Figura 16, observa-se que o LEVO apresentou melhor sinal de detecção com os λ_{exc} = 294 nm e λ_{ems} = 500 nm; entretanto, para o CIPRO e o NORF houve grande diminuição do sinal, por isso optou-se em estabelecer os λ_{exc} e λ_{ems} iguais a 280 nm e 450 nm, respectivamente.

As condições cromatográficas otimizadas neste trabalho, para análise dos fármacos por CLAE/FL estão simplificadas na Tabela 10.

Tabela 10. Condições cromatográficas estabelecidas para o estudo

Coluna	Luna C_{18}, Phenomenex® (250 x 4,6 mm, partículas de 5 µm)
Fase móvel	MeOH/tampão fosfato ($NaHPO_4.H_2O$ á 0,04 M pH 3 com H_3PO_4 85%), na proporção 30/70 (v/v)
Vazão	1 $mL.min^{-1}$
λ_{exc} e λ_{ems}	280 nm e 450nm
$t_{R\ (LEVO)}$	9,2 ± 0,2 minutos
$t_{R\ (CIPRO)}$	12,3 ± 0,2 minutos
$t_{R\ (NORF)}$	11,3 ± 0,2 minutos
t_T de análise	15 minutos

5.2 Curvas analíticas e de calibração, linearidade e sensibilidade

Após a definição das condições cromatográficas, foram determinadas as faixas lineares dinâmicas do detector para os compostos, a partir das curvas analíticas (Figura 17).

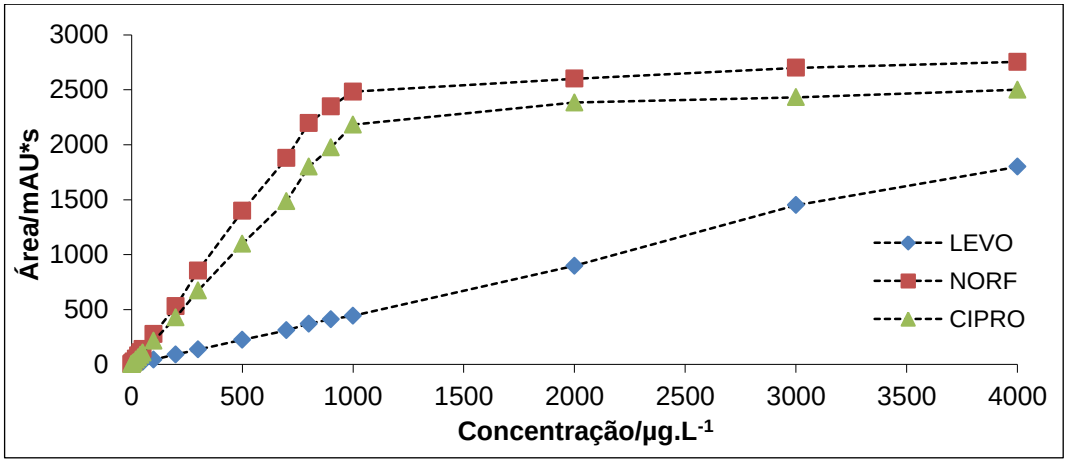


Figura 17. Curvas analíticas dos compostos CIPRO, LEVO e NORF. Condições cromatográficas: coluna Luna (250 x 4,6 mm; 5 µm), fase móvel MeOH/tampão fosfato ($NaHPO_4.H_2O$ 0,04 M ajustado á pH 3 com H_3PO_4 85%), na proporção 30/70 (v/v), modo isocrático, volume de injeção de 20µL, fluxo de 1 $mL.min^{-1}$, λ_{exc}= 280 nm e λ_{ems} = 450nm.

Observou-se que, para os compostos CIPRO e NORF, houve desvio da linearidade quanto à sua detectabilidade, em concentrações abaixo de 0,5 $\mu g.L^{-1}$ e acima de 950 e 750 $\mu g.L^{-1}$, respectivamente. Já o composto LEVO foi o que apresentou maior faixa linear dinâmica, possuindo desvio da linearidade em concentrações abaixo de 2,5 $\mu g.L^{-1}$ e acima de 10.000 $\mu g.L^{-1}$. Estes valores foram relatados em quantidade de massa dos analitos na Tabela 11.

Tabela 11. Faixa linear dinâmica obtida a partir da injeção de 20 µL de solução

Analitos	*$V_{amostra}$ (µL)	*$C_{mín}$ ($\mu g.L^{-1}$)	*$C_{máx}$ ($\mu g.L^{-1}$)	*$M_{mín}$ (µg)	*$M_{máx}$ (µg)
CIPRO	20	0,5	950	$1x10^{-5}$	$1,9x10^{-2}$
LEVO		2,5	≈ 10.000	$5x10^{-5}$	$\approx 2x10^{-1}$
NORF		0,5	750	$1x10^{-5}$	$1,5x10^{-2}$

*$V_{amostra}$ = volume da amostra, *$C_{mín}$ = concentração de detecção mínima do analito, *$C_{máx}$ = concentração de detecção máxima do analito na curva, *$M_{mín}$ = massa mínima detectada do analito, e *$M_{máx}$ = massa máxima detectada do analito.

Através da curva analítica, demonstra-se que é possível analisar os compostos CIPRO, LEVO e NORF nas mesmas condições cromatográficas por CLAE/FL em outros estudos que necessitam de faixas de trabalho com maiores concentrações, desde que as mesmas estejam dentro dos pontos máximos de concentração estabelecidos para a faixa linear dinâmica.

A partir da curva analítica, foram selecionadas as faixas de trabalho para a construção das curvas de calibração dos antibióticos CIPRO, LEVO e NORF. Estabeleceu-se que as menores concentrações detectáveis com sinal reprodutível seriam o ponto mínimo de concentração (0,5 $\mu g.L^{-1}$ para o CIPRO e NORF, e 2,5 $\mu g.L^{-1}$ para o LEVO) e que 200 $\mu g.L^{-1}$ seria o ponto de concentração mais elevado da curva de calibração.

As curvas de calibração para as fluoroquinolonas (Figura 18) foram consideradas satisfatórias quanto aos coeficientes de correlação das retas (R^2), pois foram obtidos valores maiores que 0,99 para o NORF e LEVO, sendo consideradas como correlações fortíssimas e para o CIPRO sendo igual a 1, ou seja, correlação perfeita (BRITO, 2003), satisfazendo assim as recomendações da ANVISA (2003) para validação de métodos analíticos. Os dados das curvas de calibração estão simplificados na Tabela 12.

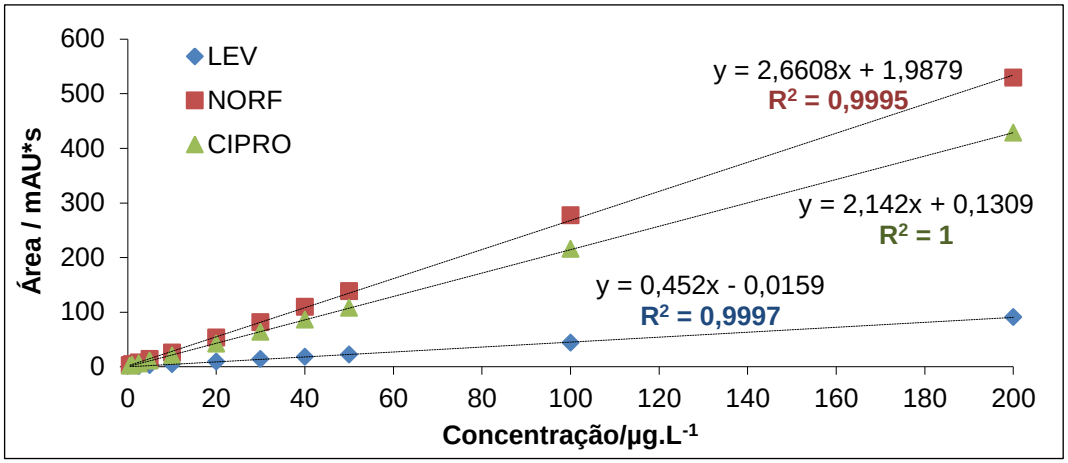


Figura 18. Curvas de calibração para os compostos CIPRO, LEVO e NORF. Condições cromatográficas: coluna Luna (250 x 4,6 mm; 5 µm), fase móvel MeOH/tampão fosfato ($NaHPO_4.H_2O$ 0,04 M ajustado á pH 3 com H_3PO_4 85%), na proporção 30/70 (v/v), modo isocrático, fluxo de 1 $mL.min^{-1}$, λ_{exc} = 280 nm e λ_{ems} = 450nm.

Tabela 12. Padrões utilizados no desenvolvimento do estudo

Analitos	Faixa de trabalho ($\mu g.L^{-1}$)	Curva de calibração	*R^2	*S
CIPRO	0,5–200	y = 2,142x + 0,1309	1	2,142
LEVO	2,5–200	y = 0,452x - 0,0159	0,9997	0,452
NORF	0,5–200	y = 2,6608x + 1,9879	0,9995	2,6608

R^2 = coeficientes de correlação das retas e S = coeficientes angulares da reta.

A sensibilidade do método foi determinado pelo coeficiente angular gerado na equação da reta (S) para cada composto. Os valores são mostrados na Tabela 12. Como o presente estudo não consiste em comparação de metodologias, sugeriu-se uma comparação entre as três substâncias. Por isso, pode-se dizer que o método apresentou maior sensibilidade para o NORF, seguido pelo CIPRO e menor para o composto LEVO (LANÇAS, 2009).

5.3 Eficiências dos procedimentos de EFS

Segundo Melo (2011), para a realização de estudos envolvendo EFS, faz-se indispensável analisar os vários fatores que possam contribuir em melhores percentuais de recuperação e, portanto, no melhor desempenho do método analítico.

Os parâmetros considerados no estudo foram os diferentes tipos de cartuchos de EFS, os solventes de condicionamento, o pH da amostra, os solventes

de lavagem e volumes de eluição. Optou-se por trabalhar com os cartuchos C_{18} da Strata®, Phenomenex® e poliméricos da Oasis® HLB, Waters®.

A Figura 19 apresenta os resultados dos ensaios de recuperação para as diferentes metodologias testadas, permitindo fazer uma comparação entre elas.

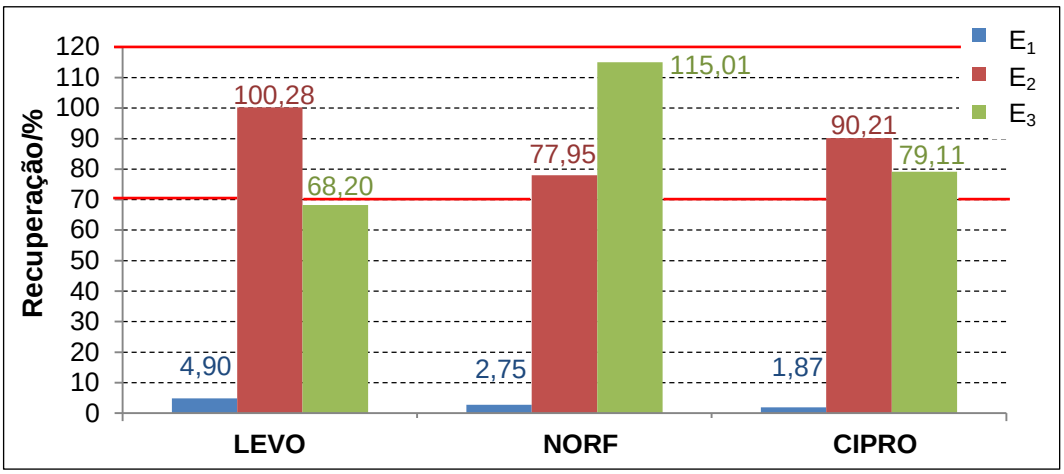


Figura 19. Comparação dos valores de recuperação do CIPRO, LEVO e NORF, em frente aos três procedimentos de extração avaliados (E_1, E_2 e E_3). As linhas vermelhas correspondem ao valor máximo (120%) e mínimo (70%) aceitos para análises de resíduos.

Observa-se, claramente, que os procedimentos realizados com os adsorventes poliméricos do cartucho Oasis HLB® (E_2 e E_3) apresentaram melhores percentuais de recuperação dos analitos. Já os procedimentos realizados com o adsorvente C_{18} (E_1) mostraram-se inadequados para a recuperação dos analitos da matriz em estudo, devido a sua baixa eficiência de recuperação, tendo sido portanto desconsiderados para o restante deste estudo.

A ANVISA (2003) estima que, para a validação de métodos para fins de análises de traços, sejam próximos a 100%, considerando-se valores menores ou maiores, desde que não apresentem precisão e exatidão superiores a 20%. Diversos pesquisadores afirmam que intervalos de recuperação entre 70–120% são aceitáveis para análise de resíduos; não obstante, devem apresentar precisão de até ± 20% (RIBANI et al, 2004; AMARANTE et al, 2005, BRITO et al, 2003 e AMARANTE et al, 2001).

Optou-se em realizar os ensaios de recuperação empregando-se o procedimento E_2, apesar do E_3 também ter-se mostrado adequado para as análises, pois os valores de recuperação para o procedimento E_2 apresentam-se dentro dos limites mais aceitáveis para análise de resíduos em níveis de traço.

5.4 Verificação da presença de interferentes

A seletividade do método foi avaliada por meio da comparação dos cromatogramas obtidos, nas mesmas condições cromatográficas, do extrato do branco da matriz (amostra testemunha) e do extrato da matriz fortificado com as fluoroquinolonas, para a verificação da presença de algum interferente da matriz nos mesmos t_R dos analitos. Este procedimento foi necessário para verificação da necessidade de se alterar ou não o método de EFS. A sobreposição dos cromatogramas está apresentada na Figura 20.

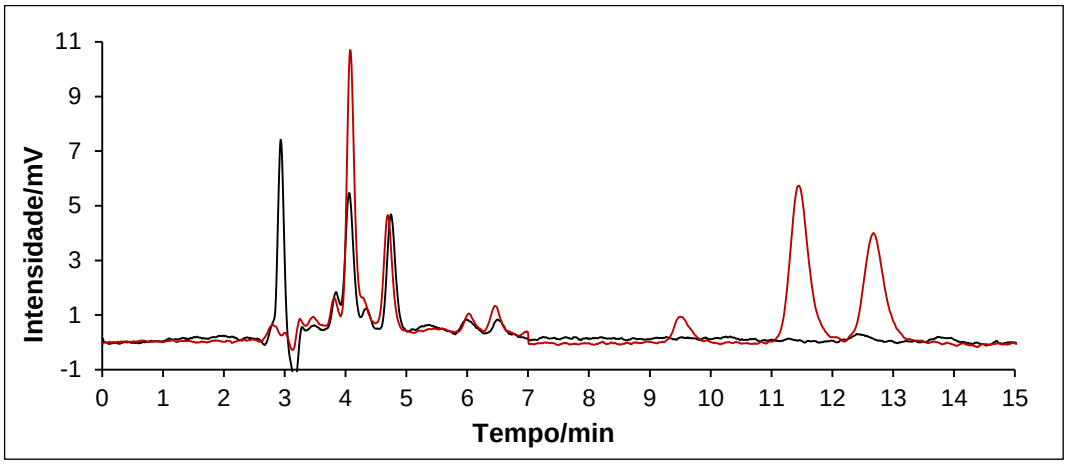


Figura 20. Cromatogramas obtidos a partir da injeção de 20 µL dos extratos do branco da matriz da matriz fortificada com CIPRO, LEVO e NORF na concentração de 5 µg.L^{-1} (vermelho) em CLAE/FL. Condições cromatográficas: coluna Luna (250 x 4,6 mm; 5 µm), fase móvel MeOH/tampão fosfato ($NaHPO_4.H_2O$ 0,04 M ajustado á pH 3 com H_3PO_4 85%), na proporção 30/70 (v/v), modo isocrático, fluxo de 1 mL.min^{-1}, λ_{exc} = 280 nm e λ_{ems} = 450 nm.

Verifica-se que o método é seletivo, pois apesar de se observar a presença de co-extrativos provenientes da matriz, estes não eluiram nos mesmos t_R dos analitos em estudo, não constituindo assim em interferentes.

5.5 Recuperação, precisão e exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio de ensaios de recuperações, em três níveis de concentração, com cinco repetições para cada nível. Os percentuais de recuperação dos analitos são apresentados na Tabela 13, e mostram que, para todas as fluoroquinolonas, as recuperações estão dentro dos valores estabelecidos para análise de resíduos (RIBANI et al, 2004).

Tabela 13. Resultados de recuperação, precisão e exatidão obtidos para cada fluoroquinolonas em três níveis de fortificação e cinco repetições (n=5)

Analitos	*C (µg.L^{-1})	*Rec (%)	*t_{calc}	*S	*CV (%)	*LDI (µg.L^{-1})	*LQI (µg.L^{-1})	*LD (µg.L^{-1})	*LQ (µg.L^{-1})
CIPRO	5	90,2125	-19,7189	0,9927	10,0571	0,024	0,079	1,8199	5
	20	89,9853	-4,9879	4,0156	10,6316				
	200	89,8117	-0,8320	24,4898	6,3688				
LEVO	5	94,6555	-22,6798	0,4713	19,5507	0,11	0,37	4,0967	5
	20	100,2839	0,4691	1,2104	13,0584				
	200	102,7412	1,6948	3,2349	3,4603				
NORF	5	77,9523	-86,0398	0,5125	4,9084	0,019	0,063	0,7567	5
	20	99,5558	-0,1863	4,7693	8,9695				
	200	91,9819	-0,5526	29,0177	5,9655				

*C = concentração do analito para níveis de fortificação, *Rec (%) = média aritmética do percentual de recuperação do analito entre cada grupo de concentração (n=5), *t_{cal} = t calculado, *S = desvio padrão das recuperações, *CV (%) = coeficiente de variação,*LDI = limite de detecção instrumental, *LQI = limite de quantificação instrumental, *LD = limite de detecção do método, *LQ = limite de quantificação do método e *t_{tab}= 2,77 para 95% de confiança.

Para o teste de significância “t” de Student, utilizou-se o “t” tabelado (t_{tab}) igual a 2,7764 considerando 95% de significância e 4 graus de liberdade. Sendo assim, os valores obtidos para o t_{cal} foram menores que o t_{tab}, ou seja, o método desenvolvido pode ser considerado exato (BRITO et al, 2003).

Quanto ao estudo de precisão do método, observa-se que os valores de coeficiente de variação (CV) encontram-se no dentro dos limites recomendados (≤ 20%), demostrado que o método pode ser considerado preciso (BRITO et al, 2003; RIBANI et al, 2004).

Os LDI e LQI foram estimados, utilizando-se os parâmetros das curvas analíticas (Tabela 12). Considerando que o extrato final, após EFS, apresenta concentração 200 vezes maior que na amostra original, pode-se inferir que os limites apresentados na Tabela 13 na prática, variam de 0,7567 $\mu g.L^{-1}$ a 4,0967 $\mu g.L^{-1}$ para LD e de 5 $\mu g.L^{-1}$ para LQ, quando aplicada a metodologia desenvolvida neste estudo. Segundo Thier e Zeumer (1987), o LD é considerado o menor nível de fortificação. Para tentar diminuir o LQ, fez-se um teste com o nível de fortificação igual a 3,0 $\mu g\ L^{-1}$, porém as recuperações não corresponderam ao recomendado e variaram entre 54 e 68%. Assim, considerou-se como LQ a concentração de 5,0 $\mu g.L^{-1}$, pois apresentou valores de precisão (20%) e exatidão (70 a 120%) aceitáveis. Aquele que apresentou o menor nível detectável em comparação ao branco da matriz e não satisfez aos valores recomendados de precisão e exatidão, foi identificado como o LD (THIER; ZEUMER, 1987 apud BRITO et al, 2003).

5.6 Síntese do método desenvolvido para análise de fluoroquinolonas

Após determinados os procedimentos de coleta, conservação, transporte e preparo das amostras e otimizadas as condições cromatográficas, e os procedimentos EFS para as fluoroquinolonas CIPRO, LEVO e NORF, o método otimizado foi submetido a processo de validação, de modo a certificar resultados confiáveis ao ser usado na determinação dos antibacterianos fluoroquinolonicos em água. A Figura 21 sintetiza a metodologia, desde a coleta da amostra até a análise cromatográfica.

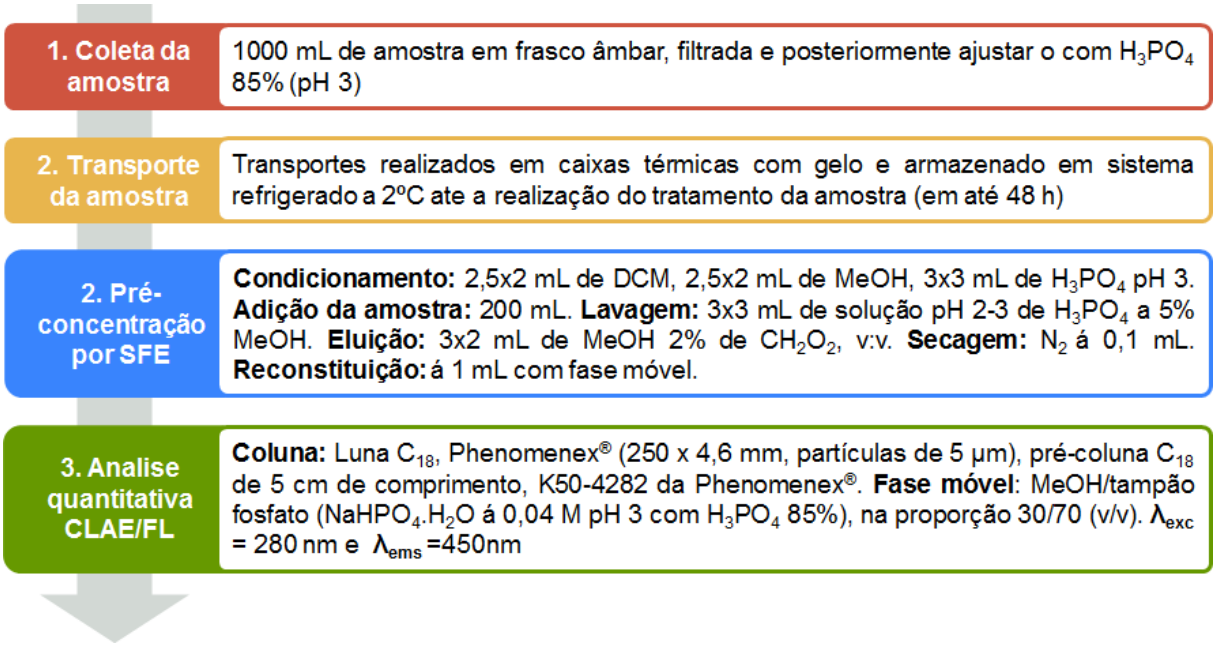


Figura 21. Fluxograma do método analítico otimizado para a determinação dos compostos fluoroquinolônicos em águas do Rio Anil.

5.7 Aplicação da metodologia otimizada na análise de amostras reais

As amostras de água do Rio Anil foram coletadas em quatro pontos distintos, conforme foi apresentado na Figura 10. Em uma das amostras, foram adicionados os analitos no menor nível de fortificação (LQ) para a execução do procedimento de EFS, a fim de certificar se o procedimento estava sendo realizado corretamente. Outra amostra foi contaminada depois de obtido o extrato, a fim de se conseguir uma solução de 5 $\mu g.L^{-1}$, visando a observar se os picos cromatográficos referentes aos compostos em estudo apresentariam o mesmo perfil cromatográfico apresentado no decorrer do desenvolvimento da metodologia.

Depois de realizado o tratamento das amostras, estas foram submetidas à análise por CLAE/FL (Figura 22).

Através dos cromatogramas expostos na Figura 22, é possível notar a ocorrência de uma grande quantidade de substâncias co-extraídas, que não estavam presentes nos procedimentos realizados anteriormente. Isto se deve a diversos fatores, como por exemplo, pela presença da grande quantidade de compostos orgânicos diluídos na matriz, uma vez que o Rio Anil é constituído por varias regiões de manguezais, o que configura a presença potencial de matéria orgânica dissolvida, além de receber grande despejo de lixo e esgoto urbano.

Contudo, a presença de tais substâncias co-extrativas não prejudicou a análise, pois não interferiu nos t_R das fluoroquinolonas CIPRO, LEVO e NORF. Portanto, conclui-se que os antibacterianos fluoroquinilonicos não foram detectados nas amostras de água do Rio Anil.

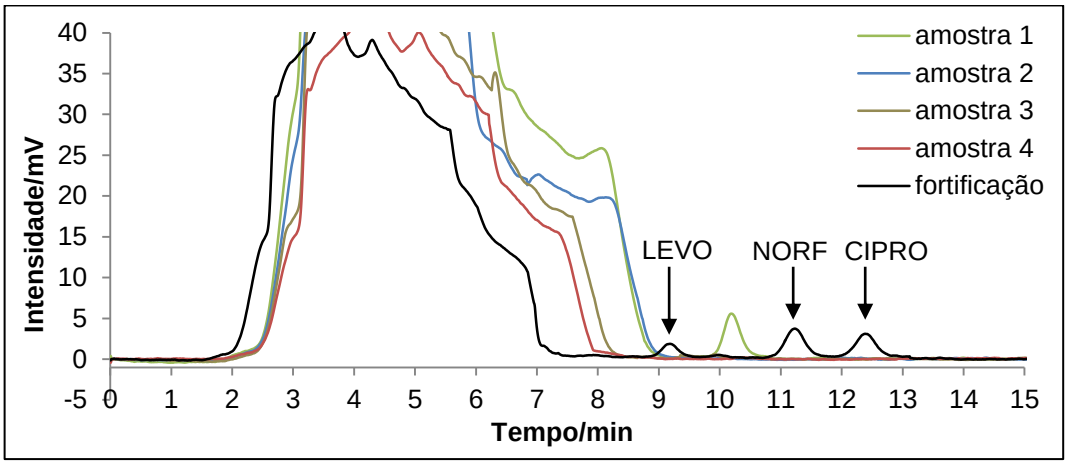


Figura 22. Sobreposição dos cromatogramas obtidos da análise das quatro amostras de água do Rio Anil e da amostra fortificada com o menor nível a partir da injeção de 20 µL de solução em CLAE/FL. Condições cromatográficas: coluna Luna (250 x 4,6 mm; 5 µm), fase móvel MeOH/tampão fosfato ($NaHPO_4.H_2O$ 0,04 M ajustado a pH 3 com H_3PO_4 85%), na proporção na proporção 30/70 (v/v), modo isocrático, fluxo de 1 $mL.min^{-1}$, λ_{exc} = 280 nm e λ_{ems} = 450 nm.

Entretanto, não se pode afirmar que as substâncias CIPRO, LEVO e NORF não estariam presentes nas amostras reais, pois poderiam estar presentes em concentrações menores do que as estabelecidas pelos valores de LD e LQ.

Alguns pesquisadores relatam ter detectado compostos fluoroquinolonicos em efluentes nas concentrações de 5 $ng.L^{-1}$ (LEE, PEART, SVOBODA, 2007). Por isso, faz-se necessário o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis para a investigação e monitoramento destes compostos em diversas matrizes ambientais.

Optou-se em analisar uma amostra de esgoto de que desemboca nas margens do Rio Anil a fim de verificar a eficiência do método desenvolvido para a detecção das fluoroquinolonas em águas de afluentes em águas de efluentes.

É possível observar nos cromatogramas apresentados na Figura 23 uma grande quantidade de interferentes presentes no esgoto, não sendo possível estimar eficientemente a presença dos compostos CIPRO, LEVO e NORF, nesta matriz, concordando com os resultados encontrados por Lee e colaboradores (2007). Contudo, verifica-se a presença de possíveis picos referentes aos compostos fluoroquinolonicos LEVO (a) e CIPRO (b) por meio da comparação do perfil do sinal

destas substâncias frente aos diferentes comprimentos de ondas utilizados para análises de fluoroquinolonas. Por isso, faz-se necessária a utilização de detectores mais seletivos para a identificação de fluoroquinolonas em matrizes mais complexas.

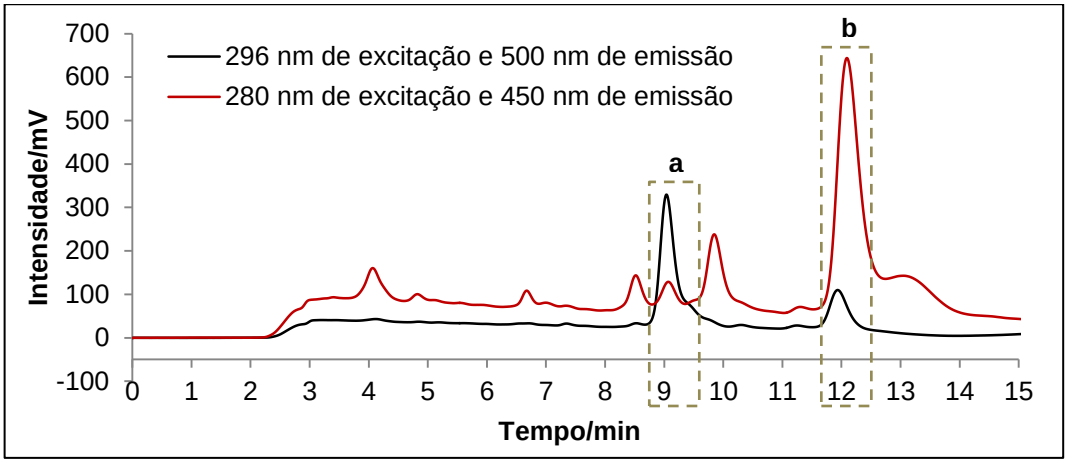


Figura 23. Avaliação dos diferentes comprimentos de onda para análise de fluoroquinolonas em amostra de efluente que desemboca nas margens do Rio Anil a partir da injeção de 20 µL de solução em CLAE/FL. Picos com mesmo perfis cromatográficos e t_R das substâncias LEVO (a) e CIPRO (b). Condições cromatográficas: coluna Luna (250 x 4,6 mm; 5 µm), fase móvel MeOH/tampão fosfato ($NaHPO_4.H_2O$ 0,04 M ajustado a pH 3 com H_3PO_4 85%), na proporção na proporção 30/70 (v/v), modo isocrático, fluxo de 1 $mL.min^{-1}$.

5.8 Ensaios de Ecotoxicidade

5.8.1 Teste de sensibilidade

A partir dos resultados obtidos nos testes de sensibilidade com *C. silvestrii* com a substância de referência cloreto de sódio, foi confeccionada uma carta controle. A carta controle corresponde a um gráfico onde foram registrados os valores sucessivos dos resultados dos testes de sensibilidade realizados no CRHEA, nos períodos antes, durante e após os testes preliminares e testes de toxicidade aguda com as fluoroquinolonas CIPRO e LEVO, a fim de verificar se os organismos teste estavam aptos a serem utilizados para os ensaios de toxicidade (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

O resultado obtido no teste de sensibilidade realizado (dia 18 de julho de 2012) foi plotado na carta controle e posteriormente se calculado o desvio padrão (s), e os limites de aceitabilidade de dados de ± 2s da média (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). O gráfico da carta controle esta apresentado na Figura 24.

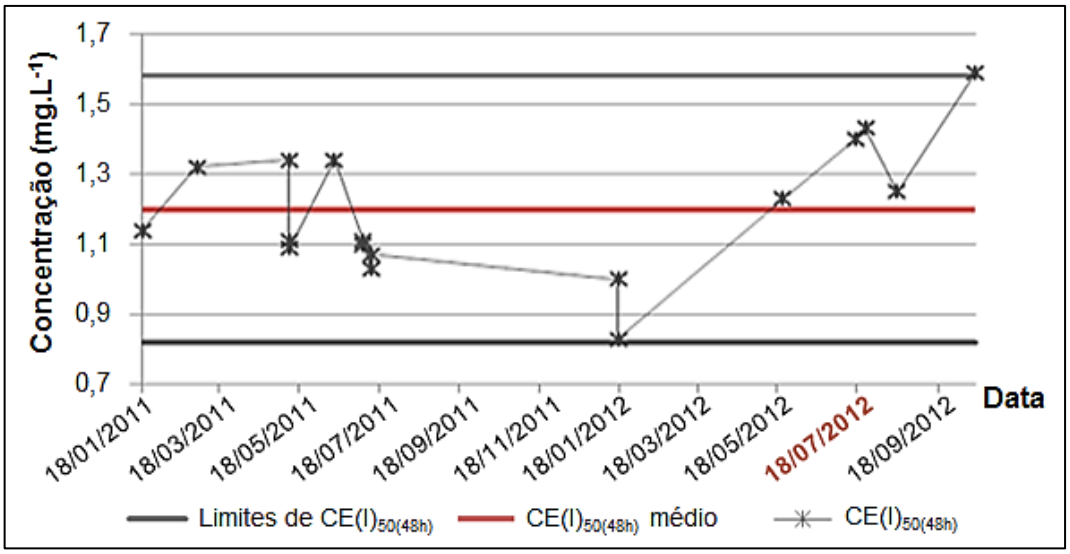


Figura 24. Controle da sensibilidade das culturas de *C. silvestrii* à substância de referência cloreto de sódio.

Os resultados obtidos dos cálculos referentes ao teste de sensibilidade realizado neste trabalho estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Dados obtidos a partir do teste de sensibilidade realizado com *C. silvestrii* com a substância de referência cloreto de sódio ($g.L^{-1}$)

*$CE(I)_{50(48h)}$ médio	*s	Limite Inferior	Limite Superior	Faixa de sensibilidade	Teste sensibilidade	*$IC_{95\%}$
1,20	0,19	0,82	1,58	0,82 - 1,58	1,40	1,30 – 1,51

$CE(I)_{50(48h)}$ médio = Concentração inicial efetiva médio que causa imobilidade a 50% dos organismos no intervalo de 48 horas, s = desvio padrão e $IC_{95\%}$ = intervalo de confiança de 95 %.

De acordo com os valores expostos na Tabela 14, considera-se que as *C. silvestrii* cultivadas no CRHEA estavam aptas para serem utilizadas durante o período de realização dos testes preliminares e testes de toxicidade aguda com os compostos CIPRO e LEVO.

5.8.2 Testes preliminares

Os testes preliminares indicaram que a *C. silvestrii* tem mortalidade de 100% na presença dos fármacos antibacterianos CIPRO e LEVO na concentração de 5 $mg.L^{-1}$. Assim, esta concentração tornou-se o valor máximo a ser utilizado nos ensaios de ecotoxicidade aguda.

5.8.3 Testes de toxicidade aguda

Foram realizados quatro testes de toxicidade aguda com o CIPRO (TC_1, TC_2, TC_3 e TC_4) e o LEVO (TL_1, TL_2, TL_3 e TL_4), com as concentrações variando de 0,0625–5 $mg.L^{-1}$ para ambos os compostos. Deve-se ressaltar que não houve mortalidade acima de 10% dos organismos controle. Os testes estão apresentados nas Figuras 25 e 26.

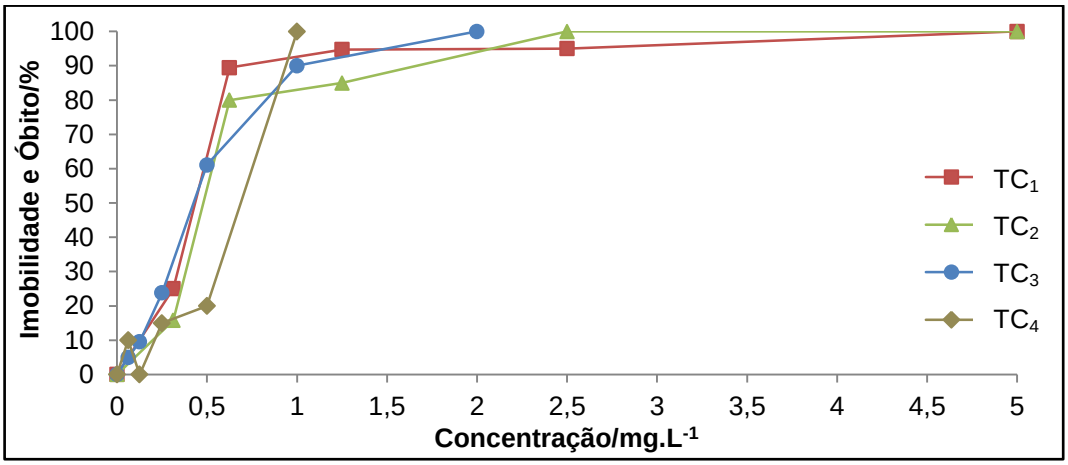


Figura 25. Testes de toxicidade aguda com a substância CIPRO (TC_1, TC_2, TC_3 e TC_4) com o organismo *C. silvestrii.*

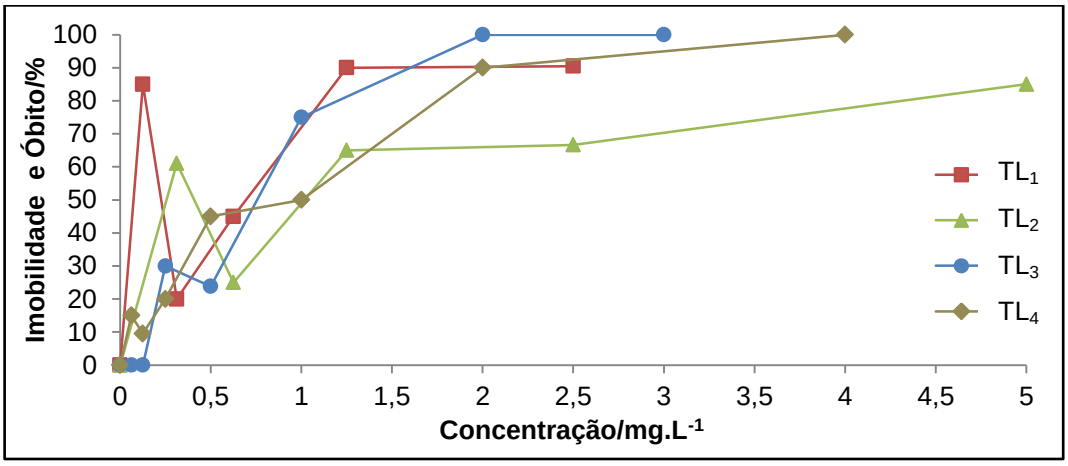


Figura 26. Testes de ecotoxicidade aguda com a substância LEVO (TL_1, TL_2, TL_3 e TL_4) com o organismo *C. silvestrii.*

Como podem ser observados nas Figuras 25 e 26, os antibacterianos CIPRO e LEVO apresentaram perfis semelhantes entre os testes de toxicidade aguda realizada para cada composto.

Os $CE(I)_{50(48h)}$ dos testes de toxicidade aguda realizados para os compostos CIPRO e LEVO estão apresentados na Tabela 15 e no gráfico de dispersão (Figuras 27).

Tabela 15. Toxicidade aguda dos compostos CIPRO e LEVO para a *C. silvestrii* com concentrações em $mg.L^{-1}$

Analitos	Testes	$CE(I)_{50(48h)}$	$CE(I)_{50(48h)}$ médio	*$IC_{95\%}$	Faixa de sensibilidade	*s	*CV
CIPRO	TC_1	0,4089	0,4656	0,33-0,50	0,3004 – 0,6308	0,0826	17,7506
	TC_2	0,4597		0,37-0,56			
	TC_3	0,4095		0,32-0,53			
	TC_4	0,5843		0,48-0,71			
LEVO	TL_1	0,6592	0,6788	0,38-1,15	0,502 – 0,8556	0,0884	13,0183
	TL_2	0,7937		0,37-1,69			
	TL_3	0,5797		0,46-0,73			
	TL_4	0,6826		0,48-0,96			

$CE(I)_{50(48h)}$ = Concentração inicial efetiva que causa imobilidade a 50% dos organismos no intervalo de 48 horas, s = desvio padrão, $IC_{95\%}$ = intervalo de confiança de 95 % e CV = coeficiente de variação.

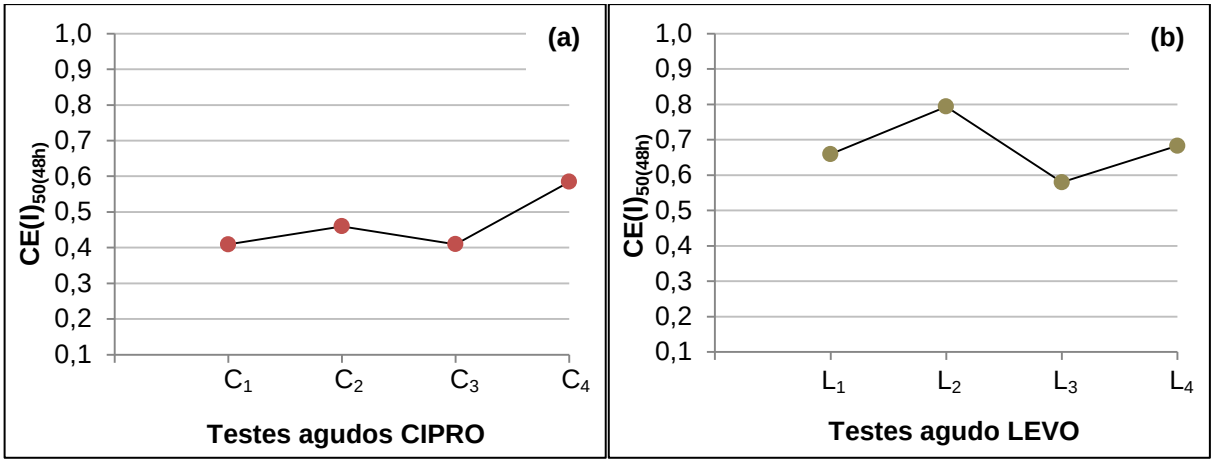


Figura 27. Dispersão dos $CE(I)_{50(48h)}$ do composto CIPRO: $CE(I)_{50(48h)}$ = C_1, C_2, C_3 e C_4 (a) e do composto LEVO: $CE(I)_{50(48h)}$ = L_1, L_2, L_3 e L_4 (b) dos testes de toxicidade aguda com *C. silvestrii*. $CE(I)_{50(48h)}$ = Concentração inicial efetiva que causa imobilidade a 50% dos organismos no intervalo de 48 horas.

Observa-se na Tabela 15 que os CV dos testes realizados foram menores que 30%. Isto indica que o método ecotoxicológico realizado foi considerado adequado, no tocante à variação dos resultados (ZAGATT, BERTOLETTI, 2008). Por meio da Figura 15, é possível verificar que não houve dispersão significativa dos

dados, onde se deva desconsiderar algum teste. O $CE(I)_{50(48h)}$ médio para o CIPRO e LEVO foram de 0,4656 $mg.L^{-1}$e de 0,6788 $mg.L^{-1}$, respectivamente.

No entanto, em estudos realizados com o organismo *C.silvestrii* por Mansano e colaboradores (2012), o valor de $CE(I)_{50(48h)}$ para o CIPRO é maior (9,17 $mg.L^{-1}$) do que o encontrado neste estudo (0,4656 $mg.L^{-1}$). Por isso, é necessário mais estudos toxicológicos, como ensaios de toxicidade crônica com os compostos fluoroquinolonicos com *C. silvestrii*.

Apesar das faixas de sensibilidade encontradas para os organismos *C. silvestrii* quando expostos as fluoroquinolonas CIPRO e LEVO estejam acima das concentrações encontradas em matrizes ambientais aquáticas (seção 3.2.1), não se pode garantir que estes antibacterianos não irão ocasionar danos a esses organismos em concentrações menores, uma vez que não foram realizados testes de toxicidade crônica, pois através destes testes seria possível observar efeitos mais sutis, que não podem ser estimados nos testes de toxicidade aguda, tais como teratogenêse e diminuição e/ou alterações na reprodução (ZAGATTO, BERTOLETTI, 2008).

Muitos testes de toxicidade realizados para avaliar a qualidade das águas em regiões tropicais e subtropicais baseiam-se em métodos padronizados com espécies que não são comuns nestas regiões, podendo assim, gerar resultados equivocados quanto aos critérios de limites máximos de concentrações aceitáveis de alguns compostos químicos nos corpos d'água (MANSANO; OLIVEIRA; ROCHA, 2012). Por isso, os testes de toxicidade aguda com a espécie nativa *C. silvestrii* realizados neste trabalho, estabelecem significativas condições de efeitos na biota aquática nativa.

6 CONCLUSÃO

A metodologia analítica desenvolvida neste trabalho envolveu a detecção por CLAE/FL e mostrou-se simples e eficiente para a análise dos compostos CIPRO, LEVO e NORF.

Em relação aos procedimentos de preparo da amostra por EFS, os resultados indicaram que os procedimentos realizados com a utilização de cartuchos poliméricos OASIS® HLB com caráter hidro/lipofílico mostraram-se mais apropriados para extração, em especial o procedimento E_2 com recuperações dentro dos limites aceitáveis de recuperação (variaram de 77,95 a 100,28%), sendo satisfatória para a determinação simultânea das três fluoroquinolonas em estudo.

A validação do método, como parte importante e essencial no desenvolvimento e otimização de um novo método, foi realizada em relação aos parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, recuperação e repetitividade, e através dessa validação verificou-se que o método atende aos critérios estabelecidos tanto pela ANVISA e INMETRO quanto por organizações internacionais de controle (USP, ICH, FDA). Em relação ao preparo de amostra e condições cromatográficas, o método pode ser considerado seletivo, linear, preciso e exato.

A aplicação do método na análise dos compostos CIPRO, LEVO e NORF em amostras coletadas do afluente do Rio Anil evidenciou a ausência destes, pelo menos em níveis de concentrações que pudessem ser detectados pela metodologia desenvolvida. No entanto, não pode se descartar a possibilidade destas fluoroquinolonas estarem presentes no afluente do Rio Anil, em concentrações inferiores ao LD do método otimizado, devido ao fato de este corpo d'água receber continuamente consideráveis cargas de efluentes domésticos, industriais e hospitalares. Para uma análise mais aprofundada, faz-se necessária à utilização de detectores mais sensíveis, como por exemplo o detector por EM.

Os testes de toxicidade aguda com os antibacterianos CIPRO e LEVO com o organismo teste *C. silvestrii* demonstram que os valores de $CE(I)_{50(48h)}$ encontram-se em níveis mais elevados do que as concentrações dos antibacterianos detectados nas varias matrizes ambientais aquáticas. Entretanto, para garantir que os menores níveis de concentração dos antibacterianos CIPRO e NORF não sejam capazes de causar transtornos aos organismos *C. silvestrii*, faz-se necessária a

realização de outros ensaios, como por exemplo, ensaios de toxicidade crônica. Testes de toxicidade realizados com a espécie nativa *C. silvestrii* estabelecem correlações mais expressivas das condições de efeitos na biota aquática nativa.

REFERÊNCIAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT NBR - 12713: **Ecotoxicologia aquática-Toxicidade aguda-Método de ensaio com *Daphnia spp* (Cladocera, Crustacea).** 2ª ed. Rio de Janeiro, Brasil, 2004.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT NBR - 13373: **Ecotoxicologia aquática-Toxicidade Crônica - Método de ensaio com *Ceríodaphnia spp* (Cladocera, Crustacea).** Rio de Janeiro, Brasil, 2005.

Agência Nacional de Águas (ANA), Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, **Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras: Água, Sedimento, Comunidades Aquáticas e Efluentes Líquidos**, Brasília, DF: CETESB, 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÊNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia para validação de métodos analíticos. Anvisa, Brasília, Resolução nº 899, 29/05/2003.

ALCÂNTARA, E. H. Mudanças climáticas, incertezas hidrológicas e vazão fluvial: o caso do estuário do Rio Anil. **Caminhos de Geografia,** v. 8, n. 12, p. 158-173, 2004.

ALCÂNTARA, E. H.; MOCHEL, F. R.; AMORIM, A. J. E. Aplicação do Sensoriamento Remoto e da Geoestatística no Estudo de Variáveis Físico-Químicas e Biológicas da Água do Estuário do Rio Anil, São Luís, Maranhão – Brasil. **Anais do XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, Goiânia, Brasil, 16-21 abril 2005, INPE, p. 2803-2810.

AMARANTE JUNIOR, O. P.; BRITO, N. M.; RIBELO, M. L. Desenvolvimento de método simples para a determinação de resíduos de diuron por cromatografia a líquido em amostras de laranja. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 15, jan./dez. 2005.

AMARANTE Jr, O. P. et al. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Caderno de pesquisa**, São Luís, v. 12, n. ½, p. 116-131, 2001.

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotics resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 260-265, 2008.

BAILAC, S. et al. Determination of quinolones in chicken tissues by liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. **Journal of Chromatography A**, v.1029, p. 145-151, 2004.

BATT, A. L.; AGA, D. S. Simultaneous analysis of multiple classes of antibiotics by ion trap LC/MS/MS for assessing surface water and groundwater contamination. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 10, p. 2940-2947, 2005.

BERNARDES, A. C. M.; SOUZA, S. V. C. Análise comparativa do guia para validação de métodos analíticos propostos pela Anvisa (RE nº 899 de 2003) com documento orientativo do INMETRO e o protocolo internacional harmonizado pela AOAC Internacional, ISO e IUPAC. **Revista Analytica**, n. 51, p. 66-77, 2011.

BILA, M. D.; DEZOTTI, M. Fármacos no Meio Ambiente. **Química Nova**, v. 26, p. 523-530, 2003.

BRAIN, R. A. Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 2, p. 371–382, 2004.

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Revista de ecotoxicologia e meio ambiente,** v.13, p.129-146, 2003.

BROWN, K.D. et al. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. **Science of the Total Environment**, v. 366, p. 772–783, 2006.

CALAMARI, D. et al. Strategic survey of therapeutic drugs in the Rivers Po and Lambro in Northern Italy. **Environmental Science and Technology**, v. 37, p. 1241–1248, 2003.

CARBALLA, M. et al. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. **Water Research**, v. 38, n. 12, p. 2918–2926, 2004.

CAPIZZI, T. et al. Statistical considerations in the evaluation of cronic aquatic toxicity studies. **Environmental Science and Technology**, v. 19, p. 35-43, 1985.

CINQUINA, A. L. et al. D etermination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in goat milk by high-performance liquid chromatography with diode-array detection Optimization and validation. **Journal of Chromatography A**, v.987, p.221–226, 2003.

CHOI, J. et al. Development of a single-step precipitation cleanup method for the determination of enrofloxacin, ciprofloxacin, and danofloxacin in porcine plasma. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1878–1883, 2010.

COSTANZO, S. D.; MURBY, J.; BATES, J. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 51, n.1, p. 218–223, 2005.

DEPIZZOL, F. **Avaliação da resistência a antibióticos em isolados de *Escherichia coli* provenientes de esgotos hospitalar e sanitário**. Vitória, ES, 2006.145p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal do Espírito Santo, UFES, 2006.

EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. EPA-821-R-02-1: **Methods for measuring the acute toxicity of efluents and receiving waters to freshwater and marine organisms.** 5ª ed. Washigton, USA, 2002.

GAUTAM, A. K. et al. Preliminary study of physico-chemical treatment options for hospital wastewater. **Journal of Environmental Management**, v. 83, p. 298-306, 2007.

GONZÁLEZ, C. et al. A liquid chromatographic method, with fluorometric detection, for the determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in plasma and endometrial tissue of mares. **Analytica Chimica Acta**, v. 560, p. 227–234, 2006.

GRUNG, M. et al. Environmental assessmentof Norwegian priority pharmaceuticals based on the EMEA guideline. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, p. 328–340, 2008.

GUO, L. et al. Pharmacokinetics of ciprofloxacin in eels by high-performanceliquid chromatography with fluorescence detection. **Analytical Biochemistry**, v.341, p.275–279, 2005.

HALLING-SORENSEN, B. et al. Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** v. 46, p. 53–58, 2000.

HAMILTON, M. A.; RUSSO R. C; THURSTON R. V. Trimmed Spearman-Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology,** v. 11, p. 714-719, 1977.

HELTA, C. D. et al. Antibiotic resistance profiles of representative wetland bacteria and faecal indicators following ciprofloxacin exposure in lab-scale constructed mesocosms. **Ecological Engineering**, v. 39, p. 113–122, 2012.

HERNANDEZ, F.; SANCHO, J. V.; GUERRERO, M. I. C.; Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. **Trends in Analytical. Chemistry**, v. 26, p. 466-485, 2007.

HERNÁNDEZ-ARTESEROS, J. A.; BARBOSA, J.; COMPAÑÓ, R.; PRAT, M. D. Analysis of quinolone residues in edible animal products. **Journal of Chromatography A**, v. 945, p. 1-24, 2002.

HERRERA-HERRERA, A. V. et al. Determination of quinolone residues in infant and young children powdered milk combining solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p.7608– 7614, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. DOQ-CGRE-008, 2003.

JACONETTI, P. C. M. **Validação de ensaios ecotoxicológicos com organismos autóctones - *Daphnia laevis* e *Ceriodaphnia silvestrii.*** 206p. Dissertação (Mestrado), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN/USP, São Paulo. 2005.

KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecological Indicators**, v. 8, p. 1-13, 2008.

KIM, M. S. et al. Mutations in the *gyrB*, *parC* and *parE* genes of quinolone-resistant isolates and mutants of *Edwardsiella tarda*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 1735-1743, 2010.

KÜMMERER, K. Significance of antibiotics in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, p. 5-7, 2003.

KÜMMERER, K. Antibiotics in aquatic environment – A review – Part I, **Chemosphere**, v. 75, p. 417-434, 2004.

KÜMMERER, K. et al. Standardized tests fail to assess the effects of antibiotics on environmental bacteria. **Water Research**, v. 38, p. 2111-2116, 2004.

LABOHIDRO. Estudos Bioecológicos nos Estuários dos Rios Anil e Bacanga – Ilha de São Luis-MA. (Relatório parcial), 1980.

LAMEIRA, V. **Estudo dos efeitos letais e subletais (reprodução e teratogênese) do fármaco triclosan para *Daphnia similis, Ceriodaphnia dubia, Ceríodaphnia silvestríi* (Cladocera, Crustacea).** 225p. Dissertação (Mestrado), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN/USP, São Paulo. 2008.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia Liquida Moderna (HPLC/CLAE).** 1ª ed. São Paulo: Editora Átomo, 2009.

LEAL, R. M. P. **Ocorrência e comportamento ambiental de resíduos de antibióticos de uso veterinário**. 134p. Dissertação (Mestrado), Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP, Piracicaba, 2012.

LEE, H.; PEART, T. E.; SVOBODA, M. L. Determination of ofloxacin, norfloxacin, and ciprofloxacin in sewage by selective solid-phase extraction, liquid chromatography with fluorescence detection, and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1139, p. 45–52, 2007.

LEE LIAO, P. S. D. et al. Análise dos indicadores bacterianos de poluição dos rios Anil e Bacanga, na Ilha de São Luís, Estado do Maranhão, Brasil. **Revista Saúde Pública,** São Paulo, v. 18, p. 278-287, 1984.

MANCEAU, J. et al. Simultaneous determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in animal biological fluids by high-performance liquid chromatography Application in pharmacokinetic studies in pig and rabbit. **Journal of Chromatography B**, v. 726, p.175–184, 1999.

MANSANO, A. S.; OLIVEIRA, L. L. D.; ROCHA, O. Avaliação da Toxicidade aguda do antibiótico ciprofloxacina aos cladóceros *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia silvestrii.* **VIII Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 8, n. 12, p. 76-88, 2012.

MARTINS, N. et al. Ecotoxicological effects of ciprofloxacin on fresh water species: data integration and derivation of toxicity thresholds for risk assessment. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 1167–1176, 2012.

MELO, S. M. **Desreguladores endócrinos no ambiente: determinação de bisfenol a e 17α-etinilestradiol em águas por CLAE-fluorescência.** São Luís, MA, 2011. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal do Maranhão, UFMA, 2011.

MONREAU, R. L. M; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia Analítica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2010.

MULROY, A. Monitoring and Analysis of Water and Wastes. **Journal of Water and Environment Technology**, v. 13, nº 2, p. 32-36, 2001.

MUCHOHI, S. N. et al. Determination of ciprofloxacin in human plasma using high-performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection: Application to a population pharmacokinetics study in children with severe malnutrition. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 146–152, 2010.

NAGULAPALLY, S. R. et al. Occurrence of ciprofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole and vancomycin resistant bacteria in a municipal wastewater treatment plant. **Water Environment Research,** v. 81, n. 1, p. 82-90, 2009.

PARK, H. R.; KIM, T.H.; BARK, K.M. Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various environments. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.37, p.443-460, 2002.

PARK, H. R. et al. Ionization and divalent cation complexation of quinolone antibiotics in aqueous solution. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 21, n. 9, p. 849-854, 2000.

PASCHOAL, J. A. R. **Resíduos de antimicrobianos em peixe: depleção residual e desenvolvimento de métodos analíticos**. Campinas, SP, 2007.174p. Tese (Doutorado em Química). Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 2007.

PENA, A. et al. Determination of fluoroquinolone antibiotics in surface waters from Mondego River by high performance liquid chromatography using amonolithic column**. Journal of Separation Science**, v. 30, p. 2924–2928, 2007.

PENG, X. et al. Multiresidue determination of fluoroquinolone, sulfonamide, trimethoprim and chloramphenicol antibiotics in urban Waters in China. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 1, p. 73-79, 2008.

PETERS, F. T.; MAURER, H. H. Bioanalytical method validation and its implication for forensic and clinical toxicology – a reviw. **Accreditation and Quality Assurance**, v.7, p.441-449, 2002.

QIAO, F.; SUNA, H. Simultaneous extraction of enrofloxacin and ciprofloxacin from chicken tissue by molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, p. 795–798, 2010.

QUEIROZ, S. C. N., COLLINS, C. H. E., JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em Fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova***,* v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

RAMOS, M. et al. Simple and sensitive dertemination of five quinolones in food by liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 789, p. 373-381, 2003.

REBÊLO, J. M. M. Freqüência horária e sazonalidade de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 1, p. 221-227, 2001.

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

REZAEE, A. et al. Hospital wastewater treatment using an integrated anaerobic aerobic fixed film bioreactor. **American Journal of Environmental Sciences**, v.1 nº4, p.259-263, 2005.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

ROBINSON, A. A.; BELDEN, J. B.; LYDY, M. J. Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 423–430, 2005.

ROUDANT, B.; YORKE, J. C. High-performance liquid chromatography method with fluorescence detection for the screening and quantification of oxolinic acid, flumequine ando sarafloxacin in fish. **Journal of Chromatography B**, v. 780, p. 481-485, 2002.

SANDERSON, H. et al. Ranking and prioritization of environmental risks of pharmaceuticals in surfacewaters. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.39, nº 2, p. 158-183, 2004.

SANTOS, L. H. M. L. M., et al. Review ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, p. 45–95, 2010.

SANTOS, P. N. **Validação de metodologias para determinação de antimicrobianos em pescado por cromatografia líquida de alta eficiência.** Recife, PE, 2009, 84 p. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRP, 2009.

SANTOS, J. H. Z.; PIZZOLATO, T. M.; CUNHA, A. C. B. Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação de fármacos em meio aquático por extração em fase sólida e HPLC. **Revistas de ciências ambientais**, v. 1, n. 2, p. 19-34, 2007.

SARMAH, A. K.; MEYER, M. T.; BOXALL, A. B. A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. **Chemosphere**, v. 65, n. 5, p. 725-759, 2006.

SEIFRTOVÁ, M. et al. Determination of fluoroquinolone antibiotics in hospital and municipal wastewaters in Coimbra by liquid chromatography with a monolithic column and fluorescence detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, p. 799–805, 2008.

SENTA, I.; TERZIC, S.; AHEL, M. Simultaneous Determination of Sulfonamides, Fluoroquinolones, Macrolides and Trimethoprim in Wastewater and River Water by LC-Tandem-MS. **Chromatographia**, v. 68, n. 9/10, p. 747-758, 2008.

SHABIR, G. A. J. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p.57-66, 2003.

SHAH, P. V. et. al. Bioanalytical methods validation: a revisit with a decade of progress. **Pharmaceutical Research**, v.17, n. 12, p. 1551-1557, 2000.

SHI, L. et al. Development of an analytical method for eight fluoroquinolones using solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. **Intern. J. Environ. Anal. Chem.**, v. 90, p. 1085–1098, 2010.

SHURIN, J. B.; DODSON, S. I. Sublethal toxic effects of cyanobacteria and nonylphenol on environmental sex determination and development in Daphnia. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, p. 1269-1276, 1997.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SILVA, C. G. A. da; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química. Nova***,* v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011.

SILVA, J. M. B. da; HOLLENBACH, C. B. Fluoroquinolonas x Resistência bacteriana na medicina veterinária. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.2, p.363-369, abr./jun., 2010.

SIQUEIRA, A. M. F. **Efeitos da Poluição por efluentes domésticos e industriais sobre o rio Anil.** (Monografia). Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 1987.

SMET, J. et al. Pharmacokinetics of fluoroquinolones in critical care patients: A bio-analyticalHPLC method for the simultaneous quantification of ofloxacin, ciprofloxacin and moxifloxacin in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 961–967, 2008.

SOUSA, I. C. **Interacção da Enrofloxacina com modelos biomembranares: influência das suas propriedades físicoquímicas**. Lisboa, Portugal, 2007. Dissertação (Mestrado em Tecnologia, Ciência e Segurança Alimentar). Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2007.

SOUZA, M. V. N. New fluoroquinolones: A class of potent antibiotics. **Minireviews in Medicinal Chemistry**, v.5, p.1019-1017, 2005.

STOLKER, A. A. M.; BRINKMAN, U. A. T. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals – a review. **Journal of Chomatography A**, v. 1067, p. 15-53, 2005.

TASSO, L. **Modelagem farmacocinética-farmacodinâmica das fluoroquinolonas levofloxacino e gatifloxacino**. Porto Alegre, RS, 2008, 115p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, 2008.

THIELE-BRUHN, S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 166, n. 2, p. 145-167, 2003.

TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005.

USLU, M. O. et al. Analysis and sorption behavior of fluoroquinolonas in solid matrices. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 190, n. 1-4, p. 55-63, 2008.

VYBÍRALOVÁ, Z. et al. High-performance liquid chromatographic determination of ciprofloxacin in plasma samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.37, p.851–858, 2005.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: Princípios e aplicações**. 2ª ed. São Carlos: RIMA, 2008.

ZOTOU, A.; MILTIADOU, N. Sensitive LC determination of ciprofloxacin in pharmaceutical preparations and biological fluids with fluorescence detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p.559–568, 2002.