

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

SÉRGIO HENRIQUE MONTEIRO

Ocorrência de antibióticos e estudo de resistência microbiana em sistemas aquaculturais do Rio Paraná, reservatório de Ilha Solteira, na região de Santa Fé do Sul, estado de São Paulo

Piracicaba

2014

SÉRGIO HENRIQUE MONTEIRO

Ocorrência de antibióticos e estudo de resistência microbiana em sistemas aquaculturais do Rio Paraná, reservatório de Ilha Solteira, na região de Santa Fé do Sul, estado de São Paulo

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Tese apresentada no Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Valdemar Luiz Tornisielo

Piracicaba

2014

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Monteiro, Sérgio Henrique

Ocorrência de antibióticos e estudo de resistência microbiana em sistemas aquaculturais do Rio Paraná, reservatório de Ilha Solteira, na região de Santa Fé do Sul, estado de São Paulo / Sérgio Henrique Monteiro; orientador Valdemar Luiz Tornisielo. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014.

111 f.: il.

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

1. Agentes antimicrobianos 2. Água fluvial 3. Aquicultura 4. Cromatografia líquida 5. Espectrometria de massas 6. Poluição de rios 7. Resíduos químicos 8. Sedimentologia fluvial 9. Tilápia-do-Nilo I. Título

CDU 628.193 : 577.18

Dedico

Aos meus pais Idia de Oliveira Monteiro e Bernardo Monteiro (*in memoriam*) que me fizeram filho de Deus perfeito, nada, além disso!

Aos meus irmãos, em especial a Sandra que é meu anjo da guarda aqui na Terra.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me feito a sua imagem verdadeira.

Ao Prof. Dr. Valdemar Luiz Tornisielo, primeiramente por ter acreditado em mim e por sua orientação com humildade e sabedoria.

A FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo) pelo apoio financeiro através do auxílio a pesquisa que me deu recursos para desenvolver este trabalho. (FAPESP Processo: 2011/18179-1).

A empresa Agilent Technologies e seus funcionários principalmente ao André Santos e a Daniela Daniel por todo o suporte e participação no programa “Brazil Food”.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) e todos os seus funcionários, que me deu a oportunidade e estrutura para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Instituto Biológico que me concedeu o a afastamento para que pudesse me dedicar ao doutorado em plenitude.

As pisciculturas e seus funcionários por abrir as portas e dar todo o apoio para a coleta das amostras.

Aos técnicos do Laboratório de Ecotoxicologia, Dorelli e principalmente ao Rodrigo pela amizade e apoio nas realizações das análises e na amostragem.

A querida e simpática Renata por todos os “galhos quebrados”.

A minha pupila Thais por toda a dedicação prestada ao trabalho.

A bibliotecária Marilia pela revisão da tese e dos artigos, mesmo aqueles que ainda virão.

A pesquisadora da Apta regional de Votuporanga Dra. Fabiana Garcia por ter acreditado e abraçado o trabalho junto comigo, pelas análises de resistência microbiana e todo o apoio intelectual.

As bravas meninas Daiane e Kátia por todo o apoio nas coletas e nas análises de resistência microbiana.

Aos amigos do Laboratório de Ecotoxicologia: Aderbal, Franz, Paulo, Carol, Rafael Leal, Carol Poppi, Nadia, Neide, Bruno, Luana, Carina, Marília, Rosana, Alyne, Felipe, Ademar, Marcela, Tatiana pela amizade e apoio.

Ao Prof. Dr. Ruy Bessa Lopes pela inspiração e confiança.

Ao amigo Rafael, por todo apoio no trabalho e pelos momentos de descontração.

A Leila pela amizade e o incrível apoio com o tratamento estatístico.

A Jeane por toda a contribuição desde a elaboração do projeto até as análises das amostras e os momentos de alegrias, e também de dúvidas que passamos juntos.

A minha quase irmã Graziela, uma das melhores coisas desse período foi te conhecer, obrigado por tudo.

A todos meus amigos, em especial a “família”, que a pesar das piadas, me inspiraram, me compreenderão e me apoiaram.

E a todos que de uma forma ou de outra contribuirão com a realização deste projeto.

Muito obrigado!

“Não é a terra que é frágil. Nós é que somos frágeis. A natureza tem resistido a catástrofes muito piores do que as que produzimos. Nada do que fazemos destruirá a natureza. Mas podemos facilmente nos destruir.”

James Lovelock

“Só quando a última árvore for derrubada, o último peixe for morto e o último rio for poluído é que o homem perceberá que não pode comer dinheiro”

Provérbio Indígena

“... saber que ao menos uma vida respirou mais fácil porque você viveu. Isso é ter tido sucesso.”

Ralph Waldo Emerson

RESUMO

MONTEIRO, S. H. **Ocorrência de antibióticos e estudo de resistência microbiana em sistemas aquaculturais do Rio Paraná, Reservatório de Ilha Solteira, na região de Santa Fé do Sul, estado de São Paulo**. 2014. 111 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

A aquicultura teve um aumento significativo em todo o mundo nos últimos anos. Muitas classes de antimicrobianos são usadas na aquicultura para o tratamento de infecções causadas por bactérias patogênicas. Entretanto, a contaminação do ambiente, do alimento e a ocorrência de resistência microbiana decorrentes da intensa utilização dos antimicrobianos são motivos de preocupação. Com o objetivo de se saber a ocorrência de antimicrobianos e possíveis formação de resistência microbiana em pisciculturas paulistas, um método rápido, sensível e simples de extração em fase sólida acoplada à cromatografia líquida e espectrometria de massas sequencial (SPE-LC-MS/MS), foi desenvolvido e validado para a determinação simultânea de 12 antimicrobianos (oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina, ciprofloxacina, enrofloxacina, sarafloxacina, norfloxacina, florfenicol, cloranfenicol, sulfatizol, sulfadimetoxina e sulfametazina) em água superficial e sedimento. Outro método, utilizando LC-MS/MS, foi elaborado para a determinação dos antimicrobianos em peixes. Paralelamente, também, foi avaliada a seleção de resistência microbiana dessas classes de antimicrobianos em peixe. Os antimicrobianos foram extraídos do sedimento com acetonitrila e tampão citrato, a fase orgânica foi eliminada e a purificação do extrato realizada com cartuchos SPE Strata SAX 500 mg Phenomenex. Os extratos de sedimento e as amostras de água (sem pré-tratamento) foram injetadas em um sistema analítico, pela primeira vez utilizado no Brasil, que consistia em uma pré-concentração com um amostrador automático equipado com um *loop* de 900 µL, uma válvula usada para alternar entre os modos de carregamento ou eluição, duas bombas e um sistema de MS/MS. Os extratos de peixe foram purificados por filtração utilizando cartuchos Captiva ND. Sulfadimetoxina-d6 foi utilizado como padrão interno para aferir a precisão dos resultados. Os métodos desenvolvidos foram validados baseados na decisão da União Europeia 2002/657/CE. As amostras foram coletadas de 4 pisciculturas localizadas na represa da usina hidrelétrica de Ilha Solteira, Brasil. Foram feitas 4 amostragens no período de abril de 2013 a janeiro de 2014, totalizando 144 amostras de água, 144 de sedimento e 126 amostras de peixe. Resíduos de oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina foram encontrados em sedimentos e oxitetraciclina, tetraciclina e florfenicol foram identificados nas amostras de água e peixe; à medida que aumentava a distância dos tanques e o tamanho do peixe as quantidades encontradas nas amostras diminuía. Isolou-se bactérias resistentes a quinolonas, tetraciclinas, sulfonamidas em 36 cepas e o índice de resistência múltipla a antibióticos (MAR), variou entre 0 e 0,86, ou seja, cepas sensíveis a 100% dos antimicrobianos testados e outras resistentes a 86%. De acordo com os resultados encontrados considera-se que ações educativas são necessárias quanto ao uso intensivo de antimicrobianos na produção de peixes afim de proteger o ambiente e a saúde do homem, buscando sempre a sustentabilidade na produção.

Palavras-chave: Aquicultura. Peixe. Sedimento. Água superficial. Antibióticos. Resíduos. Método multirresíduo. Antimicrobianos. SPE-*Online*. SPE-LC-MS/MS. Resistência microbiana.

ABSTRACT

MONTEIRO, S. H. **Occurrence of antibiotics and antimicrobial resistance study in aquaculture systems in Paraná River, Ilha Solteira reservoir, in Santa Fé do Sul area, Sao Paulo state.** 2014. 111 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

The aquaculture has had a sharp increase worldwide in the last years. Many classes of antibiotics have been used in aquaculture to treat infections caused by a number of pathogenic bacteria. However, environmental and food contamination and bacterial resistance are the main concerns arisen by these intense uses. In order to know the occurrence of antibiotics and possible antimicrobial resistance in fish farms in São Paulo, a fast, sensitive, and simple on-line solid phase extraction to liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS) was developed and validated for simultaneous assessment of 12 drugs (chloramphenicol, florfenicol, oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline, sulfadimethoxine, sulfathiazole, sulfamethazine, enrofloxacin, ciprofloxacin, norfloxacin, and sarafloxacin) in surface water and sediment. Another method using LC-MS/MS was elaborated to determine antibiotics in fish. In parallel, the selection of antimicrobial resistance of these classes of antibiotics in fish was evaluated. The antibiotics were extracted from sediment with acetonitrile and citric buffer, the organic phase was eliminated and the clean-up was made by Strata SAX 500 mg of Phenomenex. The water phase of sediment and water samples (without pre-treatment) was injected in the analytical system, which consisted of a pre-concentration with an automated liquid sampler fitted with a 900 µL injection loop; a valve is used to switch between the load or elution modes, a pair of pumps and a MS/MS system, it is the first time that this system is used in Brazil. The fish extracts were cleaned by filtration by Captiva cartridges. Sulfadimethoxine-d6 was used as an internal standard to obtain more reliable results. The developed method was validated based in the European Union Decision 2002/657/EC. The samples were collected from 4 fish farms located in Ilha Solteira hydroelectric dam, Brazil. Four sampling were made in the period April/2013 until January/2014, totalizing 144 samples of water and sediment and 126 fish samples. Residues of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline, were found in sediment and oxytetracycline, tetracycline, and florfenicol have been identified in water and fish samples, with increasing distance from the tanks and the size of the fishes the quantities of residue found in the samples decreased. Bacteria were resistant to quinolones, tetracyclines, sulfonamides in 36 strains and the multiple antibiotic resistance index (MAR) values ranged between 0 and 0.86, that is, strains with a sensitivity of 100% to the tested antimicrobials and others resistant of 86% to the tested antimicrobials. According to the results is important educational initiatives about the use of antibiotics in fish production in order to protect the environment and human health, always striving for sustainability of the production.

Keywords: Aquaculture. Fish. Sediment. Surface water. Antibiotics. Residue. Multiresidue method. Antimicrobial. SPE-*Online*. SPE-LC-MS/MS. Microbial resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Campo de amostragem, contendo a localização e região de pisciculturas localizadas nos Rios Paraná e Grande, Brasil	36
Figura 2 - Halos de inibição em antibiograma	48
Figura 3– Sistema SPE- <i>online</i> com direcionamento das fases móveis, tempo de formação das das fases móveis nas colunas de carregamento e coluna analítica e de tempo de viragem da válvula.....	53
Figura 4 - Cromatogramas de íons totais (TIC) do extrato de “branco” da água - Método SPE- <i>online</i>	56
Figura 5- Cromatogramas de íons totais (TIC) de amostras de água fortificada em (A) 100 ng L ⁻¹ e (B) 200 ng L ⁻¹	57
Figura 6- Cromatograma de íons totais (TIC) do extrato de “branco” do sedimento - Método SPE- <i>online</i>	59
Figura 7- Cromatogramas de íons totais (TIC) de amostras de sedimento fortificadas em (A) 20 µg kg ⁻¹ , (B) 50 µg kg ⁻¹ e (C) 200 µg kg ⁻¹	61
Figura 8 - Cromatogramas de íon total (TIC) de uma amostra de peixe fortificada em 100 µg kg ⁻¹	63
Figura 9- Media das concentrações de OTC detectada nos sedimentos em razão das distâncias dos locais de produção e da data de coleta ao longo de um ano.....	84
Figura 10 - Media das concentrações de TC detectada no sedimento em razão da data de coleta ao longo de um ano	86
Figura 11 – Índice de resistência múltipla aos antibióticos (MAR) de cepas de bactérias isoladas de tilápias do Nilo de diferentes tempos de cultivo	94
Figura 12 - Índice de resistência múltipla aos antibióticos (MAR) de cepas de bactérias isoladas de tilápias do Nilo ao longo de um período de um ano.....	94
Figura 13 - Índice de resistência múltipla aos antibióticos (MAR) de cepas de bactérias isoladas de tilápias do Nilo de diferentes pisciculturas no Reservatório de Ilha Solteira	95
Figura 15 – Evidências de atividades antropogênicas (A) e criação de gado (B) as margens da represa, bem próximos aos tanques de criação de peixes (C).....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Antimicrobianos estudados CAS <i>number</i> , limites de referência, fórmula molecular, massa molar e pKa	33
Tabela 2 - Tempo de eluição dos antimicrobianos em diferentes colunas	50
Tabela 3 – Coeficientes de variação calculados (%) calculados para os tempos de estabilização da coluna de carregamento.	51
Tabela 4 - Antimicrobianos, tempo de retenção (t_R), íons precursores, íons produto, energia de fragmentação e energia de colisão	54
Tabela 5- Equações da reta e coeficiente de determinação (r^2) para os antimicrobianos estudados.....	56
Tabela 6-Resultados do estudo de recuperação, exatidão, precisão, LD e LQ para as amostras de água.....	58
Tabela 7- Equações da reta, r^2 , LD e LQ dos antimicrobianos estudados para sedimento.....	59
Tabela 8 - Resultados do estudo de recuperação, exatidão e precisão para as amostras de sedimento	62
Tabela 9 - Limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ) e coeficiente de determinação (r^2) de antimicrobianos em músculo de tilápia do Nilo	65
Tabela 10 - Resultados do estudo de recuperação, exatidão e precisão para três níveis de fortificação em peixes e precisão interdia para o nível $100 \mu\text{g kg}^{-1}$	66
Tabela 11 - Características das pisciculturas de criação de tilápias do Nilo em tanques-rede no reservatório da usina hidrelétrica de Ilha Solteira e medidas profiláticas e terapêuticas adotadas.	68
Tabela 12 - Características físico-químicas das amostras de água coletada em diferentes pisciculturas localizadas no Rio Paraná e Grande no município de Santa Fé do Sul, São Paulo, Brasil.....	69
Tabela 13 - Caracterização química, de macronutrientes e de micronutrientes dos sedimentos	74

Tabela 14 - Resultados das determinações de antimicrobianos nas amostras de água	77
Tabela 15 - Concentração de OTC durante o período de um ano em amostras de água coletadas na piscicultura 4.....	78
Tabela 16 - Concentração de FF em amostras de água da Piscicultura 1 – coleta de janeiro de 2014 e Piscicultura 3 – coleta de outubro de 2013	78
Tabela 17 - Concentração de OTC e TC em amostras de água da Piscicultura 1 - coleta de julho/2013.....	79
Tabela 18 - Concentração de OTC em amostras de água da Piscicultura 4	80
Tabela 19- Resultados das determinações de antimicrobianos nas amostras de sedimento	83
Tabela 20 - Média das concentrações de OTC na Piscicultura 3 nas amostras de sedimento coletadas a 0 m.....	85
Tabela 21 - Resultados das determinações de antimicrobianos nas amostras de peixe	89
Tabela 22 - Perfil de resistência aos antimicrobianos e resistência múltipla a antibióticos (MAR) de bactérias isoladas de rim cefálico de tilápias do Nilo.....	92

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Aquicultura	19
1.2	Características da produção	20
1.3	Características dos antimicrobianos	21
1.4	Influência do uso de antimicrobianos no ambiente aquático	23
1.5	Resíduos de antimicrobianos em peixe	24
1.6	Métodos de detecção de antimicrobianos em matrizes da aquicultura	25
1.7	Resistência microbiana	28
2	OBJETIVOS	31
2.1	Objetivo geral	31
2.2	Objetivos específicos	31
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	Equipamentos	32
3.2	Solventes e reagentes	32
3.2.1	Para a determinação dos resíduos:	32
3.2.2	Para a determinação da resistência microbiana:	35
3.3	Coleta, tratamento e preparo das amostras	35
3.3.1	Para análise de água	35
3.3.2	Para análise de sedimento	37
3.3.3	Análise peixe	39
3.3.4	Para determinação de resistência bacteriana	40
3.3.5	Caracterização das pisciculturas	40
3.4	Desenvolvimento do método SPE-LC-MS/MS para água e sedimento.	40
3.5	Método LC-MS/MS para peixe	41

3.6	Espectrometria de massas	42
3.7	Quantificação, controle de qualidade e validação do método	43
3.8	Método de identificação de resistência bacteriana	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1	Desenvolvimento do método SPE-LC-ESI-MS/MS	49
4.1.1	Coluna de carregamento	49
4.1.2	Coluna analítica	51
4.1.3	Condições cromatográficas adotadas	52
4.1.4	Parâmetros do espectrômetro de massas	53
4.2	Validação, quantificação e controle de qualidade dos métodos	55
4.2.1	Análise da água	55
4.2.2	Análise do sedimento	58
4.2.3	Análise de peixe	62
4.3	Caracterização das pisciculturas quanto à produção, medidas profiláticas e terapêuticas adotadas	67
4.4	Parâmetros físico-químicos da água	69
4.5	Caracterização do Sedimento	73
4.6	Determinação de antimicrobianos em amostras de água	75
4.7	Determinação de antimicrobianos em amostras de sedimento	81
4.8	Determinação de antimicrobianos em amostras de peixe	86
4.9	Avaliação da resistência bacteriana	90
5	CONCLUSÕES	101
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	103
	REFERÊNCIAS	104

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aquicultura

A atual definição de aquicultura, segundo a FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura) é "o cultivo de organismos aquáticos, incluindo peixes, moluscos, crustáceos e plantas aquáticas" (FAO, 2009).

A aquicultura vem apresentando um crescimento anual de cerca de 9% em todo o mundo, e no Brasil, o crescimento da produção de peixes atingiu 60,2% somente entre 2007 e 2009. A América Latina contribuiu com 2,4% do total de produção aquicultural no mundo em 2009, enquanto o Brasil respondeu com 22% deste montante de produção (FAO, 2009). A produção de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) aumentou 105% em apenas sete anos (2003-2009). Em relação à produção aquícola mundial de 2010, a China é o maior produtor, com aproximadamente 36 milhões de toneladas. O Brasil ocupa a 17ª posição no *ranking* mundial, com a produção de 415.649 t. Na América do Sul, apenas o Chile teve produção maior que o Brasil, com 881.084 t. O Brasil tem um grande potencial para o desenvolvimento da aquicultura considerando seus 8.400 quilômetros de costa e 5,5 milhões de hectares de corpos de água doce, o que totaliza cerca de 12% da água doce disponível no planeta (FAO, 2012).

A maior parcela da produção aquícola brasileira é oriunda da aquicultura continental, que representou 82,3% da produção total nacional e a tilápia do Nilo é a espécie mais cultivada. Sua produção foi 155.450,8 t em 2010, o que correspondeu a mais de 39% da produção (BRASIL, 2012). Essa produção aumentou de forma significativa no triênio 2008-2010, resultado de um incremento de aproximadamente 40% durante este período. Na transição de 2009 para 2010, embora tenha sido menos acentuado, o crescimento da produção também foi verificado, registrando-se um incremento de 16,9%, quando a produção passou de 337.353 t em 2009 para 394.340 t (BRASIL, 2012). É importante salientar que este crescimento da produção aquícola brasileira deve acontecer sem detrimento da sustentabilidade ambiental.

O estado do Rio Grande do Sul é o maior polo produtor de pescado do Brasil, com 55.066,4 t, seguido pelo estado de São Paulo com 45.084,4 t que teve um incremento na produção de origem aquícola continental de 2008 para 2010 de mais de 40% (BRASIL, 2012).

A maior oferta de energia no Brasil vem de usinas hidrelétricas; o país tem mais de 6,5 milhões de hectares de reservatórios, lagos e represas, com capacidade potencial para produzir 700 mil toneladas de tilápia por ano (ROJAS; WADSWORTH, 2007). Diante desse cenário, o governo brasileiro vem incentivando fortemente a piscicultura utilizando tanques redes em corpos d'água. Desde 2004, o governo delimitou seis reservatórios, totalizando 28.503 hectares de água, nos quais 42 parques aquícolas estão sendo instalados (BRASIL, 2014).

No reservatório da usina hidrelétrica de Ilha Solteira, localizado no rio Paraná, a criação de tilápia em tanques redes encontra-se em pleno desenvolvimento devido principalmente à qualidade dos recursos hídricos, às condições climáticas favoráveis à espécie, e à delimitação de áreas aquícolas. A tilápia é o peixe mais utilizado neste sistema de criação por apresentar bons índices de desempenho, como crescimento rápido e bom rendimento de filé, além de ampla aceitação no mercado nacional e internacional (MALLASEN et al., 2012).

1.2 Características da produção

A produção de tilápia em tanques rede no Brasil é caracterizada por altas densidades de estocagem (80 a 120 kg m⁻³), enquanto que em outros países, as densidades variam de 2 a 50 kg m⁻³ (OUATTARA et al., 2003; GIBTAN; GETAHUN; MENGISTOU, 2008). Estas condições aumentam os riscos de surtos de doenças e tornam o sistema cada vez mais dependente de insumos químicos, principalmente antimicrobianos (GARCIA et al., 2013). Antimicrobianos autorizados para uso na aquicultura em geral são oxitetraciclina, florfenicol, sarafloxacina, eritromicina, sulfonamidas potencializadas com trimetoprim ou ormetoprim (FAO, 2012). Os piscicultores brasileiros têm apenas dois ingredientes ativos, antimicrobianos disponíveis licenciados para a criação de peixes; o florfenicol e a oxitetraciclina; e apenas o florfenicol é recomendado, especificamente, para a criação de tilápia

(SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL, 2014). Devido a falta de opções, essas drogas comerciais são usadas repetidamente no mesmo ciclo de produção.

A produção animal é uma das atividades mais expressivas do agronegócio brasileiro. A fim de assegurar a produtividade e a competitividade do setor, a utilização de medicamentos com fins terapêuticos e de profilaxia é uma prática bastante comum. Dos medicamentos utilizados, os agentes antimicrobianos correspondem a uma das classes mais prescritas (THIELE-BRUHN et al., 2004). Atualmente, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento autoriza o uso de aproximadamente 35 antimicrobianos como aditivos na alimentação animal e outros 50 para fins terapêuticos, muitos dos quais de uso comum entre as diversas espécies animais, como bovinos, suínos, aves, cães, caprinos e peixes (BRASIL, 2014).

O uso de antimicrobianos em animais produtores de alimentos tem gerado preocupação e relevância consideráveis, pois a administração generalizada destes fármacos pode levar ao desenvolvimento de agentes bacterianos patogênicos resistentes. Um grande aumento no consumo de peixes vem ocorrendo desde o século passado, levando a um aumento concomitante na produção aquícola, caracterizado pela grande densidade de peixe por tanque e a utilização de alimentação formulada contendo antimicrobianos, entre outras substâncias (GARCIA et al., 2013). Portanto, a determinação precisa e sensível de resíduos de antimicrobianos em peixe é uma necessidade.

1.3 Características dos antimicrobianos

Os antimicrobianos são frequentemente utilizados na prática veterinária para o tratamento de infecções bacterianas de animais. Apesar da obediência de um período de carência adequado, preocupações têm sido levantadas em relação às questões de saúde pública sobre a ocorrência de antimicrobianos na cadeia alimentar (KAN; MEIJER, 2007). Estes resíduos podem incluir o composto na sua forma original e metabolitos e/ou conjugados (CHAFER-PERICAS et al., 2010). Os resíduos de antimicrobianos podem ser diretamente tóxicos ou até mesmo causar reações alérgicas em alguns indivíduos hipersensíveis. Além disso, alimentos

consumidos por longos períodos, contendo baixas concentrações de antimicrobiano, podem levar à ocorrência de micro-organismos resistentes aos medicamentos (FERNANDEZ-TORRES et al., 2011).

Os antimicrobianos podem ser agrupados pela sua estrutura química ou mecanismo de ação. Em relação a estrutura química podem ser divididos em diferentes subgrupos, tais como beta-lactâmicos, quinolonas, tetraciclinas, macrolídeos, sulfonamidas entre outros. São moléculas complexas que muitas vezes podem possuir diferentes funções químicas dentro da mesma molécula. Portanto, sob diferentes condições de pH, os antimicrobianos possuem características neutras, catiônicas, aniônicas ou zwitteriônicas. Devido às diferentes funções químicas dentro de uma única molécula, suas propriedades físico-químicas e biológicas, tais como $\log P_{ow}$, comportamento de sorção, foto-reatividade, atividade antibiótica e toxicidade podem mudar com o pH (KUMMERER, 2009a).

Halling-Sorensen et al. (1998), citam que as substâncias farmacêuticas, tanto de emprego humano como veterinário, foram desenvolvidas para produzirem um efeito biológico. Os produtos farmacêuticos, em sua maior parte, são compostos que se caracterizam por uma complexa estrutura química. Com algumas exceções, os fármacos são moléculas com massas molares bastante variáveis (172 a 916 g mol⁻¹), baixos potenciais de volatilização (constante de Henry $< 4,1 \times 10^{-8}$ Pa m³ mol⁻¹), vários grupos funcionais ionizáveis, diferentes valores de pKa e baixos valores de coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) o que sugere baixa lipofilicidade (THIELE-BRUHN et al., 2004). Cronin et al. (2002) citam que baixos valores de $\log P$ (descriptor fundamental de hidrofobicidade molecular) são exigidos para que ocorra atividade microbiana. Os compostos sintéticos como as quinolonas, nitrofuranos e macrolídeos possuem baixa solubilidade (KUMMERER, 2009a).

1.4 Influência do uso de antimicrobianos no ambiente aquático

As maneiras mais comuns de administração de agentes antimicrobianos na aquicultura são o uso de ração contendo antimicrobianos e adicionando os compostos diretamente à água (terapia de imersão). Estas práticas podem resultar na utilização intensa de agentes antimicrobianos e transferência de grande quantidade, não apenas para os animais, mas, também, para o ambiente. Conseqüentemente, o uso de agentes antimicrobianos na aquicultura resulta em um amplo impacto sobre as bactérias ambientalmente relevantes (HEUER et al., 2009).

Excretas de animais terrestres e humanos podem ser descartados ou terem como destino final o ambiente aquático, e, por consequência, o ambiente aquático pode ser influenciado por bactérias resistentes que surgiram em outros ambientes. Barreiras sanitárias utilizadas na alimentação de animais terrestres são difíceis de serem estabelecidas na aquicultura. Estas condições em combinação com alta densidade populacional, má qualidade da água ou ambos, podem levar a um aumento de infecções bacterianas e contribuir para o aumento da utilização de agentes antimicrobianos, aumentando assim a pressão seletiva sobre as bactérias no ambiente aquático (HEUER et al., 2009).

Uma vez no ambiente, os contaminantes podem estar sujeitos a uma combinação de processos que podem afetar o seu destino e comportamento. As substâncias potencialmente tóxicas podem ser degradadas por processos abióticos e bióticos que ocorrem na natureza. No entanto, algumas delas resistem aos processos de degradação e por isso são capazes de persistirem no ambiente por longos períodos. O descarte contínuo no ambiente de uma substância persistente pode levar à sua acumulação em níveis ambientais suficientes para resultar em ecotoxicidade (COSTA et al., 2008).

Segura et al. (2009) ressaltam que estes compostos não precisam ser muito persistentes no ambiente para apresentarem efeitos deletérios; a constante liberação no ambiente destes compostos ativos podem considerá-las persistentes. Uma vez que os antimicrobianos atinjam o ambiente, na sua forma original ou como metabólitos ativos, estes podem ser transportados e distribuídos na água e no

sedimento dependendo das características físico-químicas da molécula e das características do meio receptor.

Lutzhof et al. (1999) estimaram que 70 a 80% das drogas utilizadas na aquicultura possuem potencial para atingir o meio ambiente. Dos antimicrobianos administrados via alimento poucos são 100% absorvidos. É estimado que 1 a 5% do alimento seja perdido em cultivos de salmonídeos e 15 a 40% em salmões estocados em tanques redes. Entre peixes enfermos é comum a taxa de ingestão ser ainda mais baixa devido à reduzida palatabilidade da dieta.

Cravedi et al. (1987) citaram que cerca de 7 a 9% da oxitetraciclina ingerida foi absorvida durante a passagem pelo trato gastrointestinal de truta arco-íris. Considerando está reduzida absorção do trato digestivo, é razoável supor que mais de 93% da oxitetraciclina administrada não é assimilada pelos organismos cultivados, e, sendo assim, descartado nos compartimentos ambientais. Rogstad et al. (1991) observaram absorção menor que 1% depois de 24 h de administração de oxitetraciclina e de 2,6% após 72 h.

Há escassez de investigações em relação ao uso de produtos químicos com fins terapêuticos utilizados na aquicultura. Kummerer (2009a; 2009b) destaca que os antimicrobianos merecem atenção especial no que diz respeito a contaminação de ecossistemas terrestres e aquáticos. É importante ressaltar que os antimicrobianos estão incluídos no grupo de compostos ativos considerados como contaminantes ambientais emergentes (RODRIGUEZ-MOZAZ; LOPEZ De ALDA; BARCELÓ, 2007).

1.5 Resíduos de antimicrobianos em peixe

A presença de resíduos de antimicrobianos em produtos da aquicultura destinados à alimentação apresenta riscos para os seres humanos, como reações alérgicas, toxicidade, alterações da flora intestinal e seleção de bactérias resistentes aos antimicrobianos. O reconhecimento dos riscos associados aos efeitos diretos e indiretos sobre a saúde humana devido ao consumo, ativo e passivo de antimicrobianos, levou a definição de regulamentações sobre o uso de alguns

antimicrobianos na produção de alimentos de origem animal e o estabelecimento de limites máximos de resíduos (LMR) para aqueles que apresentam riscos conhecidos. A União Europeia (UE) estabeleceu esses limites através da diretiva 2377 /90 CE (EUROPEAN COMMISSION, 1990; 2002). O Brasil não estabelece LMR para medicamentos veterinários, adotando aqueles recomendados pelo Mercosul, Codex Alimentarius, União Europeia ou Estados Unidos (PACHECO-SILVA; SOUZA; CALDAS, 2014).

Os possíveis riscos à saúde humana decorrentes do emprego de medicamentos veterinários em animais produtores de alimentos podem estar associados aos resíduos dos mesmos em níveis acima dos limites máximos recomendados. Isto pode ocorrer quando o emprego do produto não observa as boas práticas de uso de medicamentos veterinários, em especial as especificações de uso.

Os LMRs dos antimicrobianos são definidos com base em estudos científicos para garantir a integridade da saúde pública, são relativamente baixos na faixa de $\mu\text{g kg}^{-1}$ e ng kg^{-1} , e por isso, os métodos analíticos devem ser suficientemente sensíveis e capazes de detectar os compostos de forma inequívoca. A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa com analisador do tipo triplo quadrupolo (LC-MS/MS) é uma excelente ferramenta de análise devido sua alta especificidade e sensibilidade, entretanto, componentes da matriz podem influenciar a resposta do analito, por isso requer adequada preparação da amostra, principalmente no processo de purificação do extrato, para minimizar os efeitos da matriz (MARAZUELA; BOGIALLI, 2009).

1.6 Métodos de detecção de antimicrobianos em matrizes da aquicultura

A determinação de antimicrobianos em amostras ambientais representa uma tarefa difícil, devido à alta complexidade das matrizes analisadas e as baixas concentrações destes compostos nas amostras (DINH et al., 2011).

A maioria dos métodos analíticos desenvolvidos para a determinação de antimicrobianos em água utilizam a extração em fase sólida *off-line* (SPE) e LC-

MS/MS (BATT; AGA, 2005; DIAZ-CRUZ; GARCIA-GALAN; BARCELO, 2008; FERRER; ZWEIGENBAUM; THURMAN, 2010; FERRER; THURMAN, 2012; GAO et al., 2012; ZHOU; MASKAOUI; LUFADJEU, 2012; GROS; RODRIGUEZ-MOZAZ; BARCELO, 2013; ZHOU; KANG, 2013). Alguns estudos, no entanto, apontam para o desenvolvimento de métodos com sistema SPE-LC-MS/MS, que permitem redução na quantidade de amostra, menor tempo de preparação e, conseqüentemente, aumento da produtividade, além de menor manipulação da amostra, diminuindo as chances de contaminação (CHOI et al., 2007; KIM; CARLSON, 2007; TONG et al., 2009; GARCIA-GALAN; DIAZ-CRUZ; BARCELO, 2010; DINH et al., 2011; GARCIA-GALAN; DIAZ-CRUZ; BARCELO, 2011; GARCIA-GALAN et al., 2011). O sistema SPE-*online* também vem sendo utilizado na determinação de pesticidas, hormônios, explosivos, medicamentos e produtos de higiene pessoal (GALLART-AYALA; MOYANO; GALCERAN, 2010; 2011; SUN et al., 2011; ANUMOL; MEREL; SNYDER, 2013; HURTADO-SANCHEZ et al., 2013).

Dentre as vantagens do método SPE-*online*, podemos destacar a pequena quantidade de amostra necessária, o que facilita em termos de transporte e armazenamento, visto que na maioria das vezes os locais de coleta estão muito distantes dos laboratórios. Vários passos no preparo da amostra, tais como a evaporação e a reconstituição são eliminados e há menor necessidade de processamento e manipulação das amostras, o que leva a uma diminuição do tempo da análise e interferência do analista minimizando erros, perdas e contaminação da amostra o que é refletido em melhores valores de exatidão e precisão do método, além de uma significativa redução do consumo de solvente orgânico contribuindo para a “química verde” (STOOB et al., 2005; POZO et al., 2006).

Para a determinação de antimicrobianos em matrizes sólidas ambientais, especificamente sedimento, foram desenvolvidos diferentes procedimentos que envolvem várias técnicas, tais como: a extração acelerada por solvente (EAS), extração com líquido pressurizado (ELP), extração assistida por ultrassom (EAU) e extração assistida por micro-ondas (EAM). A escolha do solvente é fundamental para assegurar a seletividade e minimizar a extração de demais constituintes da matriz. Melhor difusão do solvente nos interstícios da matriz, através da mistura entre a amostra e areia de quartzo, contida no sedimento, é fundamental para obter um melhor desempenho. O ajuste do pH da solução também aumenta o rendimento da

extração, em geral meios ácidos são mais indicados pois favorecem a repulsão eletrostática entre antimicrobianos e a superfície do sedimento, ambos protonados (SPELTINI et al., 2011).

Antes da determinação cromatográfica dos antimicrobianos, uma purificação da amostra pós-extração é, muitas vezes, necessária para remover os interferentes (por exemplo, matéria orgânica co-extraída) e para atingir limites de quantificação menores. A adoção dessa estratégia leva a melhoria substancial na seletividade do método onde a limpeza feita na maioria dos casos é realizada por extração em fase sólida (SPE). Os adsorventes empregados diferem na composição, nas propriedades químicas e na afinidade com o analito (SPELTINI et al., 2011).

A extração assistida por ultrassom, seguido por filtração ou centrifugação é o procedimento mais comum. Yang et al. (2010) desenvolveram um método com EAU utilizando uma mistura de acetonitrila e tampão citrato (50:50 v/v), colocados em banho de ultrassom por 15 min e repetindo este processo três vezes. O extrato em seguida foi purificado utilizando cartuchos em série de SPE, SAX (6 mL, 500 mg) e HLB (6 mL, 200 mg); o procedimento obteve recuperações acima de 70% para 14 antimicrobianos estudados em sedimento dos rios Pearl na província de Guangdong, China, no ano seguinte o mesmo método também foi utilizado por Zhou et al. (2011) que aumentou o número de antimicrobianos determinados.

A extração dos antimicrobianos do sedimento e a transferência destes para uma solução aquosa pode proporcionar a utilização do sistema SPE-*online* aumentando a sensibilidade do método, facilitando o preparo das amostras e diminuindo etapas de purificação, como exposto neste trabalho.

Já para amostras biológicas, como por exemplo, a matriz peixe, um dos principais problemas para a determinação quantitativa de produtos farmacêuticos é que o analito geralmente está ligado a proteínas e péptidos, com a consequente necessidade de clivagem destas estruturas antes da análise. A digestão enzimática é amplamente aceita como método de preparação de amostras para a análise de compostos em matrizes biológicas, no entanto, estes métodos são de trabalho intensivo e prolongam significativamente o tempo de análise (FERNANDEZ-TORRES et al., 2011). A maioria das metodologias utilizam procedimentos de extração com base na extração líquido-líquido, com solventes relativamente polares e subsequente purificação do extrato utilizando cartuchos de extração em fase sólida

(CANADA-CANADA; de La PENA; ESPINOSA-MANSILLA, 2009; MARAZUELA; BOGIALLI, 2009).

O procedimento de extração deve ser apropriado para a análise a que se destina e a realidade do laboratório, assim fatores como o consumo de reagentes, disponibilidade de mão de obra especializada e aquisição de equipamentos são cruciais. Métodos simples e rápidos destacam-se neste contexto porque são menos dependentes de altos investimentos (KINSELLA et al., 2009; BERENDSEN; STOLKER; NIELEN, 2013). Não há descrito na literatura a purificação do extrato de peixe para determinação de antimicrobianos, utilizando uma simples filtragem como será apresentado neste trabalho.

1.7 Resistência microbiana

Um desafio significativo para a criação de peixes é o surgimento de doenças causadas por bactérias, como *Aeromonas spp.*, *Vibrio spp.*, *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas spp.* e *Flavobacterium spp.* O controle do uso de antimicrobianos na aquicultura varia muito de um país para outro. Em países desenvolvidos, como os membros da União Europeia, Estados Unidos, Canadá e Noruega, existe um número limitado de produtos registrados e o controle regulatório é eficiente; somando estas condições com a melhoria na gestão de produção e o desenvolvimento de vacinas mais eficazes, observa-se uma diminuição do uso de antimicrobianos (AKINBOWALE; PENG; BARTON, 2006). No entanto, 90% da produção aquícola ocorre em países em desenvolvimento, onde a regulamentação da utilização de medicamentos e os controles são ineficientes e o uso de antimicrobianos pelos produtores está cada vez mais difundido.

Um dos maiores problemas que o uso de antimicrobianos pode ocasionar é o aparecimento de resistência bacteriana à drogas utilizadas. A resistência bacteriana surge e é mantida através de mutações no DNA bacteriano ou através de mecanismos de transferência horizontal de genes, incluindo conjugação com outras bactérias, a transdução com o bacteriófago e a absorção de DNA livre via transformação (SAPKOTA et al., 2008).

O uso intensivo de agentes antimicrobianos na aquicultura fornece uma pressão seletiva à criação de bactérias resistentes aos medicamentos e genes resistentes a patógenos transmissíveis dos peixes a outras bactérias no ambiente aquático. A partir dessas bactérias resistentes, genes resistentes podem disseminar por transferência horizontal de genes e se transferir para patógenos humanos. Patógenos resistentes aos medicamentos, presentes no ambiente aquático podem atingir diretamente os seres humanos. A transferência horizontal de genes pode ocorrer no ambiente da aquicultura, na cadeia alimentar, ou no trato intestinal humano. Entre os agentes antimicrobianos comumente utilizados na aquicultura, vários são classificados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como de extrema importância para o uso em seres humanos. A ocorrência de resistência a estes agentes antimicrobianos em patógenos humanos limita severamente as opções terapêuticas em infecções humanas. Tendo em vista o rápido crescimento e a importância da indústria da aquicultura em muitas regiões do mundo e da generalizada, intensa e muitas vezes irregular utilização de agentes antimicrobianos nesta área de produção animal, são necessários esforços para prevenir o desenvolvimento e propagação da resistência antimicrobiana na aquicultura para reduzir o risco para a saúde humana (HEUER et al., 2009).

A intensidade de exposição das bactérias aos agentes antimicrobianos influencia a amplitude de sua resistência, e a intensidade de exposição normalmente depende da origem dos tratamentos aos quais as bactérias foram submetidas. Costanzo, Murby e Bates (2005), indicaram que bactérias oriundas de reator de estação de tratamento de esgoto apresentaram resistência aos antimicrobianos ciprofloxacina, tetraciclina, ampicilina, trimetoprima, eritromicina e sulfametoxazol, ao passo que aquelas bactérias isoladas do curso d'água do receptor do efluente mostraram resistência à eritromicina e ampicilina. Esse mesmo trabalho mostrou que os antimicrobianos eritromicina, claritromicina e amoxicilina, na concentração de $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$, reduziram de maneira expressiva a taxa de desnitrificação bacteriana, evidenciando o possível impacto negativo desses resíduos em bactérias de relevância ecológica.

Em estudo realizado na Austrália, bactérias isoladas de amostras de água de tanque e de espécimes animais empregadas na aquicultura mostraram: resistência generalizada aos antimicrobianos ampicilina, amoxicilina, cefalexina e eritromicina;

resistência frequente aos antimicrobianos oxitetraciclina, tetraciclina, ácido nalidíxico e moléculas do grupo das sulfonamidas; resistência pouco frequente aos antimicrobianos cloranfenicol, florfenicol, ceftiofur, ácido oxolínico, gentamicina e trimetoprina, além de outros (AKINBOWALE; PENG; BARTON, 2006).

Em estudo realizado em águas salobras de pisciculturas do Egito, também foram identificadas bactérias resistentes a diversos antimicrobianos. No estudo, 33,2% das bactérias isoladas, incluindo vários patógenos de peixes e bactérias zoonóticas apresentaram resistência a diversas drogas principalmente a ampicilina, estreptomicina, tetraciclina, cefpodoxima, cefoxitina, aztreonam, ácido nalidíxico, cefotaxima, cloranfenicol, trimetoprim/sulfametoxazol e ciprofloxacina. A maioria destes agentes antimicrobianos é utilizada regularmente na criação de peixes no Mediterrâneo (ISHIDA et al., 2010).

Esses relatos confirmam a ocorrência de resistência microbiana em meios como a aquicultura, evidenciando os riscos de transferência de bactérias resistentes ao homem por meio do consumo de produtos provenientes dessa fonte ou por outro meio de transferência genética indireta.

Como consequências diretas temos o aumento da frequência da ineficiência dos tratamentos, aumento da severidade das infecções, prolongamento da duração das doenças, aumento na frequência de infecção na corrente sanguínea, aumento da hospitalização e aumento da mortalidade. O prolongamento de doenças tem sido demonstrado em estudos de caso-controle de *Campylobacter* resistentes a fluoroquinolonas e um aumento da gravidade de infecções devido a *Salmonella typhimurium* resistentes a quinolonas, assim como o aumento da morbidade ou mortalidade, também atribuídas a sorotipos de *Salmonella* não tifoidal e a *Campylobacter* (HEUER et al., 2009). É razoável considerar que o mesmo fenômeno demonstrado para espécies de *Salmonella* e *Campylobacter* possa ocorrer com outros agentes patogênicos humanos resistentes a drogas, pois a resistência pode ter origem na aquicultura.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar a ocorrência de resíduos de antimicrobianos em água, sedimento e musculo de Tilápia do Nilo (*Oreochromis Niloticus*) e a seleção de resistência microbiana em pisciculturas do Rio Paraná, reservatório de Ilha Solteria na região de Santa Fé do Sul, estado de São Paulo, correlacionando estes resultados em favorecimento da sustentabilidade da produção de pescado continental.

2.2 Objetivos específicos

Caracterizar as unidades de produção aquiculturais quanto a diferentes parâmetros relacionados à produção e manejo sanitário praticados nas pisciculturas da região de Santa Fé do Sul – SP;

Desenvolver um sistema mecanizado de extração em fase sólida *online* a LC-MS/MS com fonte de ionização *electrospray* para determinação simultânea de 12 antimicrobianos (oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina, ciprofloxacina, enrofloxacina, sarafloxacina, norfloxacina, florfenicol, cloranfenicol, sulfatizol, sulfadimetoxina e sulfametazina) de diferentes classes químicas em amostras de água superficial e sedimento;

Desenvolver e validar um método rápido e eficiente utilizando filtragem com cartuchos Captiva e LC-MS/MS com fonte de ionização *electrospray* para determinar e quantificar a presença de resíduos dos 12 antimicrobianos em Tilápia do Nilo;

Determinar a ocorrência espacial e sazonal dos 12 antimicrobianos em água e sedimento em quatro pisciculturas da represa da usina hidroelétrica de Ilha Solteira, formada pelos rios Paraná e Rio Grande, na região de Santa Fé do Sul no estado de São Paulo, Brasil;

Determinar resíduos dos 12 antimicrobianos em músculo de Tilapia do Nilo, coletadas nas pisciculturas monitorizadas;

Determinar a ocorrência de resistência microbiana, das bactérias isoladas de rim cefálico de Tilápias do Nilo também coletadas nas mesmas pisciculturas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Equipamentos

- Sonda - Aquaread AP 5000 AgSolv;
- Draga tipo Petersen;
- Liofilizador Liotop L101;
- Ultrassom Branson 2510;
- Centrifuga Beckeman J2-HS;
- Vortex Uniscience Biovortex V1;
- Rotaevaporador - Rotavapor R-215 Buchi;
- Bomba de vácuo Vacuubrand;
- Manifold Supelco Visiprep;
- Ultraturrax Marconi modelo MA102;
- Cromatógrafo líquido Agilent equipado com uma bomba quaternária (bomba de carregamento) 1260 VL Infinity G1311C; bomba binária (bomba analítica) 1200 Series G1312A; injetor automático 1260 Infinity G1329A com adaptação para volume até 900 μ L; desgaseificador 1260 Infinity G4225A; forno de colunas 1200 Series G1316A e válvula de 10 portas;
- Balança semi analítica GEHAKA modelo BG 4400;
- Balança analítica AND modelo HA 202M.

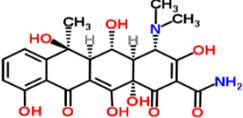
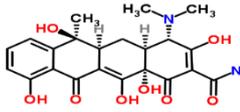
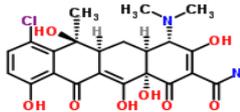
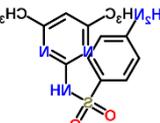
3.2 Solventes e reagentes

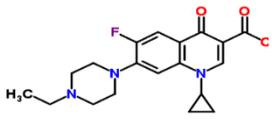
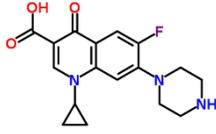
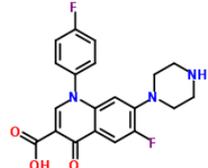
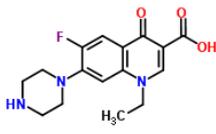
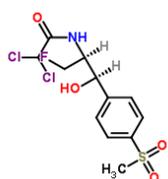
3.2.1 Para a determinação dos resíduos:

Os solventes e reagentes utilizados foram: metanol e acetonitrila grau HPLC (Tedia), ácido fórmico (JT Baker), ácido ortofosfórico (Mallinckrodt Chemicals), Na₂EDTA (Sigma-Aldrich), azida de sódio (Merck), ácido cítrico monoidratado e citrato de sódio di-hidratado (JT Baker), todos reagentes de grau analítico. A água utilizada foi purificada usando-se um sistema Milli-Q (Millipore).

Os antimicrobianos foram selecionados baseados no programa brasileiro de controle de resíduos em peixes. Da Fluka Analítica foram adquiridos: oxitetraciclina 97% (OTC), tetraciclina 97,5% (TC), clortetraciclina 93% (CTC), ciprofloxacina 99,5% (CFX), enrofloxacina 99,0% (EFX), sarafloxacina 97,2% (SAR), sulfatizol 98,0% (STZ), florfenicol 98,0% (FF), norfloxacina 99% (NFX) e o padrão interno sulfadimetoxina-d6 99,4% (SDM-d6). A sulfadimetoxina (SDM) e a sulfametazina (SMZ) ambas com 99,5% de pureza foram adquiridas da Chem Service e o cloranfenicol 98,5% (CAP) foi adquirido do Dr. Ehrestorfer (Tabela 1).

Tabela 1 - Antimicrobianos estudados CAS *number*, limites de referência, fórmula molecular, massa molar e pKa

Grupo	Antimicrobianos	CAS	Limite de Referência* $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	Fórmula Molecular	Massa Molar (g mol^{-1})	pKa
Tetraciclinas	Oxitetraciclina (OTC)	79-57-2	200		461	3.27 (a 25 °C)
	Tetraciclina (TC)	60-54-8	200		445	3.3 (a 25 °C)
	Clortetraciclina (CTC)	57-62-5	200		479	7,55
Sulfonamidas	Sulfametazina (SMZ)	57-68-1	100		279	7,59
	Sulfadimetoxina (SDM)	122-11-2	100		311	6,21
	Sulfatiazol (STZ)	72-14-0	100		256	7,24

Grupo	Antimicrobianos	CAS	Limite de Referência* $\mu\text{g.kg}^{-1}$	Fórmula Molecular	Massa Molar (g mol^{-1})	pKa
Floroquinolonas	Enrofloxacin (EFX)	93106-60-6	100		360	6,43 7,76
	Ciprofloxacin (CFX)	85721-33-1	100		332	6,43 8,68
	Sarafloxacin (SAR)	98105-99-8	30		386	6,17 8,68
	Norfloxacin (NFX)	70458-96-7	-		319	6,32 8,47
Anfenicóis	Florfenicol (FF)	73231-34-2	1000#		358	10,73 -1,79
	Cloranfenicol (CAP)	56-75-7	0,3		322	11,03 -1,73

* Limites de referência adotado para pescado (Brasil, 2009); # Limite máximo de resíduos permitido para tilápia (Brasil, 2009); Fontes: <http://www.drugbank.ca/>; <http://www.chemspider.com/>;

As soluções estoque padrão dos antimicrobianos (100 mg mL^{-1}) foram dissolvidas em solvente apropriados e diluídas em metanol e mantidas a $-18 \text{ }^\circ\text{C}$, em frasco de vidro âmbar, por até 6 meses. Uma solução *mix* intermediária ($1000 \mu\text{g L}^{-1}$) foi preparada por diluição apropriada das soluções estoque com água, para serem utilizadas nos métodos de água e sedimento, e em metanol para a

análise dos peixes. As soluções foram mantidas armazenadas sob refrigeração a ± 3 °C e renovadas semanalmente.

Foram também preparadas soluções de trabalho com concentrações entre $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e $50 \mu\text{g L}^{-1}$ em água de rio e em água ultrapura com o pH ajustado para 4 com ácido ortofosfórico e Na_2EDTA na concentração de 1 mg mL^{-1} . Todas as soluções foram estocadas em refrigerador a ± 3 °C.

3.2.2 Para a determinação da resistência microbiana:

Os solventes e reagentes utilizados foram: álcool 70% (Caal), *Brain Heart Infusion Agar* (Difco), sangue ovino, kit API 20 Strep (Biomerieux), kit API 20 E (Biomerieux), meio ágar (Müller-Hinton) e discos antibiogramas (CEFAR) contendo norfloxacin 10 μg , ciprofloxacina 5 μg , tetraciclina 30 μg , enrofloxacin 5 μg , sulfonamidas 300 μg , cloranfenicol 30 μg e florfenicol 30 μg .

3.3 Coleta, tratamento e preparo das amostras

3.3.1 Para análise de água

Para o desenvolvimento e validação do método analítico, amostras de água superficial em condição semelhante a dos tanques de produção aquicultural sem a presença dos antimicrobianos do estudo (branco), foram coletadas no Rio Paraná a montante de onde se inicia as atividades aquiculturais. Frascos âmbar, utilizados para a coleta de amostras de água, foram previamente lavados com acetona e aquecidos a 280 °C e em seguida identificados. Também foi adicionado Na_2EDTA nas amostras de água superficial a fim de complexar os metais, evitando a complexação destes com os antimicrobianos nas amostras. Após as coletas, as amostras foram transportadas em caixas térmicas até o laboratório e imediatamente filtradas em membrana de teflon de 0,22 μm de poro (Agilent Technologies) para a subtração do material particulado. Em seguida, o pH das amostras foi ajustado para 4,0 pela adição de ácido ortofosfórico e armazenadas a ± 4 °C para posterior procedimento de extração, que foi realizada em até sete dias após a coleta.

Os frascos âmbar são importantes para evitar a fotodegradação de alguns antimicrobianos como as tetraciclina (TCs). As TCs foto decompõem-se facilmente, porque podem sofrer fotólise direta e serem convertidas em vários produtos (HALLING-SØRENSEN; SENGELØV; TJØRNELUND, 2002). As TCs podem quelar íons de metal bivalentes e trivalentes tais como Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , e Al^{3+} . Íons metálicos sempre estão presentes nos ambientes aquáticos e por isso a importância da adição do complexante Na_2EDTA às amostras (HALLING-SØRENSEN; SENGELØV; TJØRNELUND, 2002).

Águas superficiais foram coletadas em quatro pisciculturas localizadas no reservatório da usina hidrelétrica de Ilha Solteira, no município de Santa Fé do Sul, São Paulo/Brasil, formada pelos rios Paraná e Rio Grande. Todos os pontos de coleta foram georreferenciados (Figura 1) usando a sonda - Aquaread AP 5000 AgSolv que contém um sistema de posicionamento global (GPS): Piscicultura 1 - Lat: S 20 15.2298 Lon: W 050 58.9350; Piscicultura 2 - Lat: S 20 03.0532 Lon: W 050 55.2490; Piscicultura 3 - Lat: S 20 15.7743 Lon: W 050 57.2261; Piscicultura 4 - Lat: S 20 04.4438 Lon: W 050 58.1522. A mesma sonda foi utilizada para verificar a qualidade da água em termos de temperatura (Temp), turbidez (Turb), oxigênio dissolvido (OD), condutividade elétrica (CE), sólidos totais dissolvidos (STD), resistividade (RES) e pH.



Figura 1 - Campo de amostragem, contendo a localização e região de pisciculturas localizadas nos Rios Paraná e Grande, Brasil

Fonte: <https://maps.google.com.br/maps/ms?msid=210093975468361900717.0004d9ef84be88e128dff&msa=0&ll=-20.160387,-50.975876&spn=0.356451,0.676346>

As coletas de amostras de água foram realizadas em três locais diferentes para cada piscicultura: na área dos tanques redes (0 metros), 100 metros e

1000 metros a jusante da área dos tanques redes. Todas as coletas foram feitas em triplicata, a cada três meses durante um ano, totalizando 144 amostras.

Foram coletadas 100 mL de água por amostra que em seguida, foram colocadas em uma caixa de isopor com gelo e transportadas para o laboratório. No laboratório, a água foi filtrada e armazenada a aproximadamente 3 °C por até 24 horas. Antes da análise, o padrão interno SDM-d6 na concentração 100 ng mL⁻¹ foi adicionado às amostras e o pH foi ajustado para 4,0 usando ácido ortofosfórico. Mais uma vez, a amostra foi filtrada com membrana de teflon de 0,22 µm de poro (Agilent Technologies), transferidas para frasco de 6 mL e injetado em um sistema SPE-LC-MS/MS.

3.3.2 Para análise de sedimento

Amostras do branco de sedimento (isentas de antimicrobianos) foram coletadas no Rio Paraná, a montante de onde se iniciam as atividades aquícolas, para o desenvolvimento e validação do método analítico.

As amostras de sedimento foram coletadas nos mesmos locais da amostragem da água (Figura 1).

Em cada piscicultura as amostras de sedimento foram coletadas em triplicatas distintas, em três posições diferentes, na área dos tanques redes, 100 metros a jusante da área dos tanques redes e 1000 metros a jusante da área dos tanques redes, a cada três meses durante um ano, totalizando 144 amostras.

Foi utilizada draga tipo Petersen para coleta de sedimento superficial. Aproximadamente 300 g de amostras de sedimento foram colocadas em frascos âmbar. Os frascos foram previamente lavados com acetona e aquecidos a 280 °C, silanizados e em seguida identificados. Um grama de azida de sódio foi adicionado em cada frasco para inibir a atividade microbiana.

Após as coletas, as amostras foram transportadas em caixas térmicas até o laboratório. As amostras de sedimento foram secas a baixa temperatura utilizando um liofilizador Liotop L101 e, em seguida, passadas em peneira de 2 mm. Foram armazenadas a -18°C para posterior procedimento de extração que foi realizada em até 30 dias após a coleta.

Os sedimentos foram caracterizados quimicamente pelo laboratório PiraSolo Laboratório Agrotécnico Piracicaba Ltda, onde se mediram: carbono orgânico (CO), matéria orgânica (MO), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), H+Al, alumínio (Al), soma de bases (SB), capacidade de troca de cátions (CTC), saturação por bases, Al saturado, enxofre (S) na forma de sulfato (SO₄) e pH em CaCl₂.

A extração dos antimicrobianos do sedimento foi realizada baseada no método proposto por Yang et al. (2010), onde foram pesados 2 g de sedimento liofilizado, em frasco de teflon de 25 mL com tampa de rosca, adicionado 10 mL de acetonitrila + 10 mL de tampão citrato pH 3 e agitado em vortex Uniscience Biovortex V1 por 1 minuto. Em seguida, o extrato foi colocado em banho de ultrassom Branson 2510 por 15 minutos, centrifugado a 5 °C na centrifuga Beckman J2-HS a 1350 x g por 10 minutos e transferido o sobrenadante para balão de fundo redondo de 250 mL contendo 0,2 g de Na₂EDTA. O processo de extração foi repetido três vezes e os sobrenadantes incorporados no mesmo balão.

O tampão citrato pH 3 foi preparado com a dissolução de 57,4 g de ácido cítrico monoidratado e 17,6 g de citrato de sódio di-hidratado em um litro de água ultrapura.

O extrato foi concentrado em evaporador rotativo Rotavapor R-215 Buchi a 40 °C até a eliminação da acetonitrila (quantidade < 5 %). O extrato aquoso remanescente foi avolumado para 50 mL com água ultra pura.

O processo de purificação do extrato foi modificado em relação ao método original de Yang et al. (2010). No processo aqui descrito o extrato foi purificado apenas utilizando o cartucho SPE Strata SAX de 500 mg/6 mL Phenomenex; o cartucho HLB foi substituído pelo processo de SPE-*online*.

Os cartuchos Strata SAX foram condicionados com 10 mL de metanol e em seguida com 10 mL de água ultrapura. Após o condicionamento a água remanescente no cartucho foi eliminada utilizando bomba de vácuo Vacuubrand pelo manifold Supelco Visiprep, por meia hora e então 6 mL de extrato aquoso foram eluídos pelo cartucho e o eluato coletado em tubo de vidro de 12 mL.

O extrato foi então filtrado em unidade filtrante de teflon de 0,22 µm de poro, para um frasco de 2 mL, e injetado no sistema de SPE-LC-MS/MS nas mesmas condições da análise da água.

3.3.3 Análise peixe

Por não existir um material branco de referência certificado para tilápia isento de antimicrobianos, as amostras em branco foram capturadas no rio Paraná, em uma região onde não há produção de tilápias (amostra em branco).

As amostras de peixe foram coletadas no mesmo local de amostragem nas quatro pisciculturas (Figura 1).

Em cada piscicultura foram coletadas 3 amostras distintas de 3 tamanhos diferentes de peixe, pequeno (até 100 g), médio (até 500 g) e grande (até 900g), dando-se preferência àqueles tanques que faziam uso de medicação antibiótica. Quatro coletas foram feitas durante um ano nos meses de abril de 2013, julho de 2013, outubro de 2013 e janeiro de 2014. A Piscicultura 2 não permitiu a coleta de peixe em outubro de 2013 e janeiro de 2014 e no total foram coletadas 126 amostras de peixe. As amostras de peixes foram coletadas utilizando puçá, colocadas em embalagens individuais de sacos plásticos contendo gelo e eugenol, armazenados em uma caixa de isopor com gelo, e transportado para o laboratório. No laboratório, os peixes foram anestesiados com benzocaina $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ e foram abatidos por seccionamento medular, o músculo com a pele foi retirado, cortado e triturado com gelo seco utilizando um liquidificador com copo de vidro. Depois de rotulados os frascos foram condicionados adequadamente à aproximadamente $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$. O procedimento de extração foi realizado em até 15 dias após a coleta das amostras.

Foram pesadas 5 g de amostra, colocada em um tubo de teflon de 50 mL com tampa de rosca. Adicionou-se 50 μL de padrão interno, SDM-d6 $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em cada amostra, inclusive no branco de solventes, 1 ml de solução 0,1 M Na_2EDTA e 24 mL de solução de água:acetonitrila (70:30, v/v) com 0,1% ácido fórmico. A mistura foi homogeneizada durante 5 minutos com o ultraturrax Marconi modelo MA102 e depois centrifugada numa centrífuga Hitachi CF16RXII durante 5 min a $1370 \times g$. A seguir, uma alíquota de 500 μL do sobrenadante foi eluída em cartucho Captiva ND (Agilent) para frascos de 2 mL utilizando um sistema manifold Supelco Visiprep e então analisadas utilizando um sistema LC-MS/MS.

3.3.4 Para determinação de resistência bacteriana

Peixes da espécie tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foram coletados nas pisciculturas em sistema de tanques-rede (Figura 1), seguindo o mesmo protocolo de amostragem da coleta de peixes para a determinação dos resíduos de antimicrobianos, previamente descrito. Em cada piscicultura foram coletadas e peixes para cada amostra de 3 tamanhos diferentes de peixe, pequeno, médio e grande. Quatro coletas foram feitas durante um ano nos meses de abril de 2013, julho de 2013, outubro de 2013 e janeiro de 2014. A Piscicultura 2 não permitiu a coleta de peixe em outubro de 2013 e janeiro de 2014. Após a captura, cada peixe foi armazenado em saco plástico, identificado e mantido em ambiente refrigerado entre camadas de gelo por duas horas e trinta minutos (tempo médio gasto com o deslocamento e coleta do material).

Em seguida, realizou-se a avaliação externa do exemplar. Tal avaliação consistiu em anotar o estado físico do peixe: se apresentava caquexia, com má formação ou conformação, lesões pelo corpo e em nadadeiras, com ascite ou escurecimento do tegumento, tais informações contribuíram para a identificação das bactérias.

3.3.5 Caracterização das pisciculturas

As pisciculturas foram caracterizadas quanto a produção anual de pescado (t/ano), espécies cultivadas, taxa de mortalidade/ano, uso de fármacos, doses empregadas, regime de administração dos fármacos (período) e frequência de administração. O questionamento foi feito de forma informal durante as coletas, para que não houvesse resistência dos responsáveis pelas pisciculturas em dar as respostas.

3.4 Desenvolvimento do método SPE-LC-MS/MS para água e sedimento

As seguintes condições foram testadas:

- Para a bomba de carregamento: pH da amostra de água e da fase móvel (4,0 e 7,0); tempo de eluição dos compostos da coluna de carregamento e tempo de

virada da válvula de 10 portas que intercalavam entre os modos de carregamento e eluição; tempo de estabilização da coluna de carregamento e sete colunas de carregamento: Agilent Zorbax Eclipse Plus - C18 (4,6 x 12,5 mm; 5 μ m), Agilent HC - C18 (2) (4,6 x 12,5 mm; 5 μ m), Agilent TC - C18 (2) (4,6 x 12,5 mm; 5 μ m), Agilent Zorbax Extend - C18 (4,6 x 12,5 mm; 5 μ m), Agilent Zorbax CB - C18 (4,6 x 12,5 mm; 5 μ m), Agilent Eclipse XDB - C18 (4,6 x 12,5 mm; 5 μ m), e Agilent Zorbax 80 SB - C8 (9,4 x 15 mm; 7 μ m).

- Para a bomba analítica: a fase móvel foi testada no modo isocrático, A - água (0,1% ácido fórmico) e B - acetonitrila (0,1% ácido fórmico); A:B (80:20) e nos seguintes gradientes: iniciando com 20% de B até 5 min com gradiente linear até 80% de B em 12 ou 15 min, permanecendo constante por mais 3 min. Depois da corrida a coluna ficou em reequilíbrio por 10 min com 20% de B; foram testadas as vazões 0,4 e 0,6 mL min⁻¹.

O procedimento de carregamento da amostra foi feito com coluna Agilent Zorbax 80 SB-C8 (9.4 x 15 mm; 7 μ m) e a separação cromatográfica foi realizada na coluna Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (3 x 100 mm; 3.5 μ m) a 30 °C.

As análises foram feitas no sistema SPE-LC-ESI-MS/MS: Cromatógrafo líquido Agilent equipado com uma bomba quaternária (bomba de carregamento) 1260 VL Infinity G1311C; bomba binária (bomba analítica) 1200 Series G1312A; injetor automático 1260 Infinity G1329A com adaptação para volume até 900 μ L; degaseificador 1260 Infinity G4225A; forno de colunas 1200 Series G1316A e válvula de 10 portas.

3.5 Método LC-MS/MS para peixe

As análises foram realizadas em sistema LC-MS/MS com ionização *electrospray* (ESI): Cromatógrafo Líquido Agilent 1200 equipado com bomba binária 1200 Series G1312A; injetor automático 1260 Infinity G1329A; degaseificador 1260 Infinity G4225A e forno de colunas 1200 Series G1316A. As separações cromatográficas foram realizadas na coluna Agilent Zorbax Eclipse C18 (3 x 100 mm, 3,5 mm). A fase móvel foi água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B). O programa de gradiente iniciado com 5% de B, com gradiente linear até 95% B em 13 minutos em seguida constante durante 3 minutos.

O tempo de equilíbrio pós corrida foi de 10 min, utilizando 5% de B. A vazão manteve-se em $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, a temperatura da coluna fixada em $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e o volume de injeção foi de $10 \text{ }\mu\text{L}$.

Para melhorar a sensibilidade, florfenicol foi injetado separadamente dos outros antimicrobianos no modo de ionização negativo. As condições foram as mesmas, apenas o programa de gradiente foi alterado começando a 30 % de B até 2 minutos, seguido de um gradiente linear até 95 % B em 5 min, em seguida constante durante 2 minutos. O tempo de equilíbrio pós-corrida foi 10 min com 30% de B.

3.6 Espectrometria de massas

Para a seleção do íon precursor e dos íons produto foi realizada uma injeção de $10 \text{ }\mu\text{l}$ de solução padrão ($10 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ em acetonitrila com 0,1% ác. fórmico) diretamente no espectrômetro de massas. Diferentes energias de fragmentação (de 50 a 200 V) e diferentes energias de colisão (de 0 a 120 eV) foram investigadas. Foi utilizado o software Agilent Mass Hunter Optimizer para a realização destes testes. A partir do íon precursor, duas diferentes transições de maior abundância foram selecionadas para quantificar e confirmar a resposta analítica.

Para esses testes, as injeções foram feitas sem coluna para observar somente a ionização das transições selecionadas. A fase móvel foi água e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (50:50). A vazão foi de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ durante todo o processo.

Nitrogênio 99,99% foi utilizado como gás nebulizador e 99,9999% como gás de colisão. O software Agilent Mass Hunter foi usado para a obtenção dos dados. Para a detecção no MS/MS foi utilizado o modo de monitoramento de reação múltipla (MRM).

3.7 Quantificação, controle de qualidade e validação do método

O procedimento de validação foi baseado nos critérios da Decisão 2002/657/CE da União Europeia (EUROPEAN COMMISSION, 2002), considerando os seguintes parâmetros: seletividade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão e exatidão (ensaios de recuperação).

A seletividade foi avaliada através da análise da amostra em branco e verificada a presença de qualquer interferente (sinais, picos, traços iônicos) na região de interesse, onde eram esperados a eluição dos analitos alvos.

Para o estudo de linearidade, curvas analíticas foram feitas com amostras em branco fortificadas, calibração com compensação da matriz (CCM) com sete níveis de diferentes concentrações dos 12 antimicrobianos: ng L^{-1} e 2000 ng L^{-1} para água; 10; 20; 50; 100; 200; 500 e $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o sedimento e 5; 10; 20; 50; 100; 200; e $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o peixe. Cada nível de concentração foi preparado em triplicata.

LD e LQ foram determinadas como a quantidade mínima detectável do antimicrobiano na matriz no modo MRM com uma relação sinal-ruído (S/N) de 3 e 10, respectivamente. Os índices S/N foram obtidos utilizando o software Agilent Mass Hunter.

A recuperação foi calculada em dois níveis para água (100 e 200 ng L^{-1}) e três níveis para o sedimento (20 , 50 e $200 \mu\text{g kg}^{-1}$) e para o peixe (50 , 100 , e $200 \mu\text{g kg}^{-1}$), determinada pela relação entre a concentração dos antimicrobianos encontrada na amostra de branco fortificada com a concentração adicionada (antes da extração) multiplicado por 100.

A precisão foi determinada pela análise de sete amostras de branco fortificadas para o estudo de recuperação em um dia (intradia) e em dois dias, $t = 0$ e $t = 30$ dias (interdia – precisão intermediária) com sete repetições em uma das concentrações estudadas. A precisão foi expressa como coeficiente de variação (CV%).

Todos os dados gerados a partir da análise foram acompanhados de procedimentos de controle de qualidade. A cada conjunto de amostras analisadas, um branco de solvente, um branco de amostra e uma amostra independente fortificada foram analisadas em conjunto para verificar se houve coeluição ou contaminação, e verificar o desempenho do método. Para os valores quantificados apresentados de cada antimicrobiano nas amostras verificaram-se os seguintes padrões: mesmo tempo de retenção que o padrão de calibração ($\pm 5\%$), as mesmas proporções das duas transições avaliadas (variação de $\pm 20\%$) e a área do pico apresentada foi aceita sempre que apresentou variação de $\pm 20\%$ do valor esperado.

As concentrações dos antimicrobianos nas amostras foram calculadas usando o método do padrão interno. SDM-d6 foi utilizado como um padrão interno, ele foi escolhido pelos resultados observados nos testes preliminares, que demonstraram recuperações próximas a 100% para a sulfadimetoxina e por ser um dos poucos padrões deuterados encontrados disponíveis no mercado. Para a quantificação em LC-MS/MS, o método de adição de padrão interno é desejável para compensar efeitos da matriz e potenciais erros experimentais na análise de resíduos de contaminantes orgânicos. O padrão interno ideal para um composto é o seu isótopo análogo deuterado. No entanto, é dispendioso e difícil de encontrar o padrão interno deuterado correspondente para cada um dos compostos alvo.

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada utilizando o programa ASSISTAT (SILVA; AZEVEDO, 2009) e os dados de distribuição normal foram comparados por análise de variância (ANOVA). Em seguida, foi aplicado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.8 Método de identificação de resistência bacteriana

As análises de seleção de resistência microbiana foram realizadas no Laboratório de Enfermidade de Animais Aquáticos (LENAQ) do Pólo Regional do Noroeste Paulista, APTA/SAA de Votuporanga, pela equipe da Dra. Fabiana Garcia.

Após a avaliação externa, o peixe passou por uma antissepsia com álcool 70%, principalmente na sua região frontal. Dentro da capela de fluxo laminar, com materiais cirúrgicos esterilizados, realizaram-se duas aberturas de acesso: a primeira longitudinal, na região frontal do crânio, no sentido crânio-caudal, para a visualização do cérebro; a segunda transversal, na região dorsal, no sentido dorso-ventral, para a visualização do rim cefálico. Mediante a visualização dos órgãos citados anteriormente, coletou-se uma amostra de cada tecido com alça estéril flambada. Em seguida, as amostras foram inoculadas em placas de Petri contendo Brain Heart Infusion Agar, enriquecido com 5% de sangue ovino. A inoculação seguiu a técnica de esgotamento por estrias, o que facilita o crescimento de colônias isoladas. As placas foram armazenadas na incubadora a 30 °C por um período de 1 a 10 dias. De todas as colônias isoladas formadas, anotaram-se suas principais características: cor; tamanho; aspecto (lisa, rugosa, ressecada); consistência (pastosa, leitosa, seca); aspecto do meio de cultura (hemolítica ou não-hemolítica) e óptico (brilhante ou fosca; opaca, translúcida ou transparente).

Na sequência, procedeu-se a coloração de Gram. No microscópio, observaram-se a coloração e a forma da bactéria (cocos, diplococos, estafilococos, estreptococos ou bacilos). Quando foi observado que a colônia analisada não se apresentava pura, essa foi estriada em uma nova placa pela técnica de esgotamento e uma nova coloração de Gram foi realizada dessa nova colônia. O processo se repetiu até a obtenção de colônias puras, fato que garante um melhor resultado dos testes bioquímicos.

A partir do resultado da coloração de Gram, o processo na microbiologia se dividiu. Para bactéria Gram-positiva, procedeu-se o teste da catalase. As bactérias catalase-negativas foram semeadas em meio de cultura BHI acrescido de 5% de sangue ovino, incubadas por 24 horas e submetidas a testes bioquímicos API 20

Strep da Biomerieux®. O resultado do kit para esse tipo de bactéria é obtido entre 4 e 24 horas de incubação.

Para bactérias gram-negativas, procedeu-se o teste da oxidase. Independente do resultado desse teste, essas bactérias foram estriadas em BHI acrescido de 5% de sangue ovino e incubadas por 24 horas, para serem submetidas a testes bioquímicos contidos no API 20 E da Biomerieux®. O resultado desse kit é obtido em 24 horas.

Com as amostras das bactérias já identificadas realizou-se o antibiograma, que é um teste que avalia a suscetibilidade dos micro-organismos a agentes antimicrobianos auxiliando, assim, na escolha da terapêutica antimicrobiana. O princípio do método baseia-se na difusão, através do ágar, de um antimicrobiano impregnado em um disco de papel-filtro. Com isso, o antimicrobiano leva à formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano cujo diâmetro é inversamente proporcional à concentração inibitória mínima (MIC). É um método qualitativo, permitindo classificar a amostra em suscetível (S), intermediária (I) ou resistente (R) ao antimicrobiano.

Tal teste seguiu as normas propostas pela National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) e constituiu em:

- a) Preparação do meio de Ágar Müller-Hinton. No caso de *Streptococcus ssp* o meio foi suplementado por sangue de carneiro a 5%;
- b) Preparação do inóculo pelo método de suspensão direta das colônias: o inóculo foi realizado por meio de uma suspensão direta, em solução salina, de colônias isoladas numa placa de ágar de 18-24 horas. A suspensão foi ajustada para que a turbidez coincidissem com a da solução padrão de McFarland 0,5 (método recomendado para testar estreptococos);
- c) Inoculação das placas: mergulhou-se um *swab* de algodão estéril na suspensão. Na retirada, o *swab* foi girado várias vezes e apertado firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido, para a retirada do excesso de inóculo. Na superfície seca da placa de ágar Müller-Hinton foi

inoculada esfregando o *swab* em toda a superfície. Repetiu-se o procedimento esfregando outras duas vezes, girando a placa aproximadamente 60° cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo. Como passo final, o *swab* foi passado na extremidade da placa de ágar. A tampa da placa foi deixada entreaberta de três a cinco minutos, a fim de permitir que qualquer excesso de umidade fosse absorvido antes de se aplicar os discos;

- d) Aplicação de discos: cada disco foi pressionado contra a placa, assegurando o contato completo com a superfície do ágar. É importante lembrar que os discos foram distribuídos por igual, de maneira que a distância de centro para centro não excedesse 24 mm. Como regra geral 12 discos são colocados, no máximo, em uma placa de 150 mm ou cinco discos em uma placa de 100 mm. Para este estudo foram utilizados os antimicrobianos norfloxacinina 10 µg, ciprofloxacina 5 µg, tetraciclina 30 µg, enrofloxacinina 5 µg, sulfonamidas 300 µg, cloranfenicol 30 µg e florfenicol 30 µg;
- e) Leitura das placas e interpretação dos resultados: ocorreu após 24 horas de incubação a 30°C. Foram observados, quando a placa foi satisfatoriamente semeada, os halos de inibição uniformemente circulares. Os diâmetros dos halos de inibição total (julgadas a olho nu) foram mensurados, incluindo o diâmetro do disco. Os halos foram medidos em milímetros usando uma régua, que foi encostado na parte de trás da placa de Petri invertida, contra uma fonte de luz. Qualquer crescimento discernível dentro do halo de inibição foi considerado como indicativo de resistência bacteriana (Figura 2).

Para esse teste, três repetições foram realizadas para cada bactéria identificada e seguiu o padrão interpretativo proposto pelo fabricante dos discos (CEFAR®).

Com os resultados do antibiograma, o índice de resistência múltipla a antimicrobianos (MAR) foi calculado para cada bactéria isolada, considerando o número de antimicrobianos classificados como resistente dividido pelo total de antimicrobianos testados. É uma ferramenta útil para análise de risco à saúde, usado para verificar resistência a antimicrobianos. Valores acima de 0,250 são considerados de alto risco.

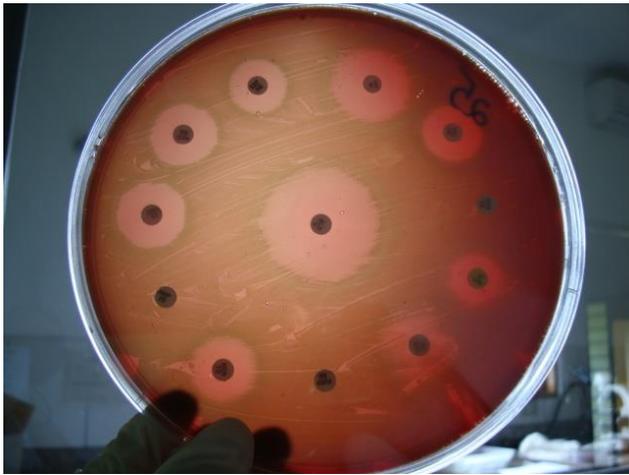


Figura 2 - Halos de inibição em antibiograma

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento do método SPE-LC-ESI-MS/MS

Para a obtenção de um método capaz de identificar e quantificar com confiabilidade 12 antimicrobianos, de diferentes classes em água e sedimento utilizando um sistema de SPE-*online*, vários parâmetros foram otimizados.

A baixa pressão proporcionada pela utilização de uma pré-coluna semipreparativa permitiu a hifenização direta de um sistema de SPE com o LC-MS/MS apresentando alta eficiência de separação dos picos para os compostos estudados em menos de 13 min de corrida.

4.1.1 Coluna de carregamento

Foram realizados estudos de pH com a amostra e com a fase móvel, dois pHs 4,0 e 7,0 foram testados e a fase móvel contendo 5% de metanol. Os antimicrobianos que apresentaram melhor resposta, picos mais simétricos e mais intensos em pH 4,0 foram FF, OTC, TC, SDM, STZ, SMZ, EFX, CFX, NFX e SAR, e em pH 7,0 foram CTC e CAP.

Para verificar a possibilidade de realizar as análises dos 12 antimicrobianos no mesmo pH foram realizados testes preliminares de repetibilidade e linearidade de resposta do equipamento. As soluções de antimicrobianos foram injetadas em pH 4,0 e mostraram recuperações acima de 70%, possibilitando a análise de todos os fármacos no mesmo pH, ou seja pH 4,0.

A confirmação desta possibilidade pode ser comprovada pela observação dos resultados de validação apresentados. Outro estudo também confirmou a estabilidade das TCs em pH 4,0, mostrando que impurezas comuns à TCs que incluem a epiTCs e anhydroTCs. EpiTCs, no qual ocorre a epimerização no C-4, que pode ser formado em condições aquosas ligeiramente ácidas, porém, estes

isômeros não foram formado em níveis significativos em pH 4 (ANDERSON; RUPP; WU, 2005).

O tempo de eluição em diferentes colunas de carregamento foi avaliado utilizando uma solução padrão de mistura de antimicrobianos que foi injetada na coluna de carregamento e eluída diretamente para o espectrômetro de massas para saber o tempo final da eluição.

A vazão foi de 1,0 mL min⁻¹ com a fase móvel: C (metanol) e D (água acidificada a pH 4,0 com ácido fórmico). O seguinte gradiente foi testado: 5% de C constante até 2 minutos passando para um gradiente com 20% de C até 3 min, esta condição permaneceu até a eluição total dos antimicrobianos.

Foram testadas sete colunas de carregamento nestas condições, os tempos de eluição estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Tempo de eluição dos antimicrobianos em diferentes colunas

Coluna	Tempo inicial da eluição (min)	Tempo final da eluição (min)
Zorbax Eclipse Plus – C18	1,9	5,8
Agilent HC – C18	3,6	10,7
Agilent TC-C18	3,2	10,9
Zorbax Extend –C18	1,3	27,5
Zorbax CB-C18	3,4	9,0
Eclipse XDB-C18	2,3	16,0
Zorbax 80 SB-C8	8,2	60,0

A coluna Zorbax 80 SB-C8 que é na realidade uma pré-coluna utilizada em sistemas semipreparativos, foi a que reteve por mais tempo os antimicrobianos, portanto, foi a coluna escolhida devido à maior capacidade de retenção, que proporciona a possibilidade da limpeza da amostra, permitindo um maior tempo de passagem da fase móvel através dela sem perda dos antimicrobianos.

A estabilização da coluna de carregamento também foi avaliada. Inicialmente observou-se que a pressão da bomba de carregamento estabilizava em menos de 4 minutos, mas havia muita variação das áreas dos picos entre as injeções. Foram então testados os tempos de estabilização de 4, 8 e 15 minutos com cinco injeções da solução *mix* de antimicrobianos 100 ng L⁻¹ e calculado o coeficiente de variação entre as injeções (Tabela 3).

Tabela 3 – Coeficientes de variação calculados (%) calculados para os tempos de estabilização da coluna de carregamento.

Antibióticos	Tempo de estabilização (minutos)		
	4	8	15
	Coeficientes de variação (%)		
Ciprofloxacina	31	6	3
Oxitetraciclina	12	3	4
Enrofloxacina	25	11	5
Tetraciclina	18	5	3
Sulfatiazol	2	2	2
Sulfametazina	1	1	2
Sarafloxacina	24	3	3
Cloranfenicol	2	4	3
Sulfadimetoxina	2	1	1
Sulfadimetoxina D6	2	1	2

Com o tempo de estabilização de 15 minutos, verificou-se o menor CV% para os compostos testados. O tempo de 15 minutos foi escolhido para a estabilização da coluna de carregamento com a fase móvel inicial de 95% de água acidificada em pH 4.0 com ácido ortofosfórico e 5% de metanol.

Observou-se para esta coluna de carregamento a possibilidade de se realizar até 150 injeções de amostras provindas das pisciculturas (água e/ou sedimento), sem prejudicar a resolução dos picos e sensibilidade de resposta para os antimicrobianos estudados. Após 150 injeções inicia-se uma perda de resolução dos picos, prejudicando a estabilidade da coluna.

4.1.2 Coluna analítica

A composição de fase móvel, com que se obteve, melhor resolução e separação dos antimicrobianos na coluna analítica foi: A - água 0,1% de ácido fórmico e B - acetonitrila 0,1% de ácido fórmico, com o gradiente iniciando com 80% de A, depois de 5 minutos um gradiente linear para 30% de A até 12 minutos e isocrático, nestas condições, por mais 3 min.

Foi testada também a vazão da fase móvel. A melhor vazão foi de 0,4 mL min⁻¹, pois se obteve melhor resolução e separação dos antimicrobianos. Nestas condições, o tempo da análise cromatográfica foi de 13 minutos e mais 15 minutos para a estabilização da coluna.

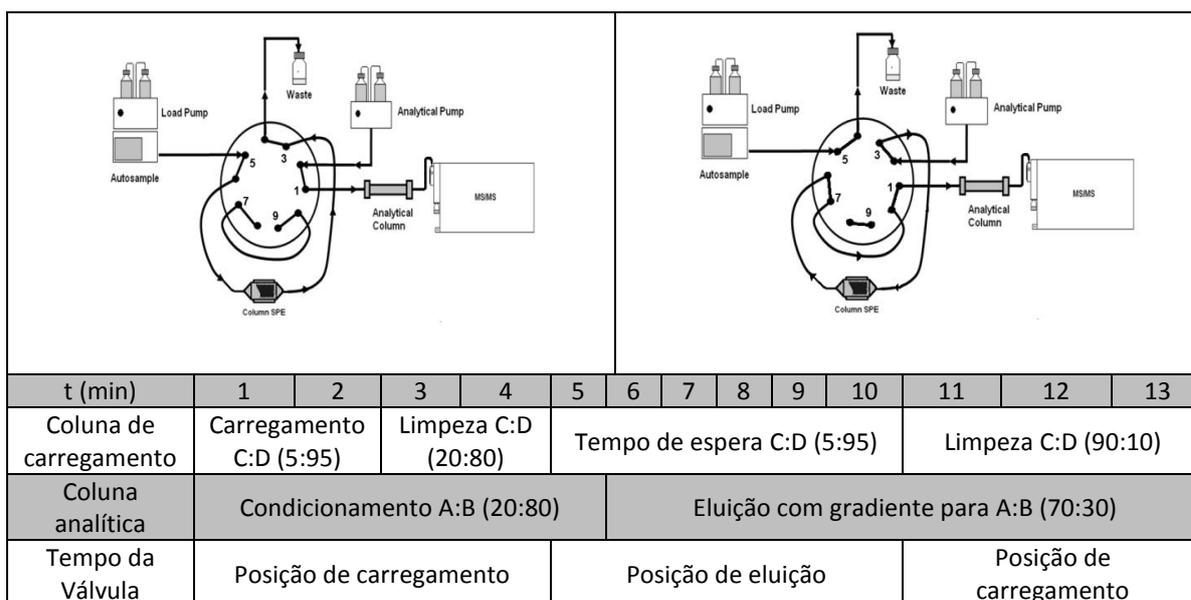
Em um sistema de SPE convencional o tempo para preparação de seis amostras é de aproximadamente quatro horas mais o tempo da análise cromatográfica. No sistema SPE-*online* estas mesmas seis amostras podem ser preparadas em menos da metade do tempo, gerando economia de solventes e mão de obra.

4.1.3 Condições cromatográficas adotadas

As condições ótimas do sistema foram:

- 900 μL da amostra injetada na coluna de carregamento, este volume comparado a um sistema cromatográfico convencional, que utiliza 10 μL como volume de injeção, representa um fator de concentração para o sistema SPE-*online* de 90 vezes;
- fase móvel da bomba de carregamento C (metanol) e D (água acidificada a pH 4 com ác. fórmico);
- fase móvel da bomba analítica A (água 0,1% de ácido fórmico) e B (acetonitrila 0,1% de ácido fórmico);
- na coluna de carregamento a fase móvel iniciou com C:D (5:95) a uma vazão de 1 mL min^{-1} que foi mantida por 2 min, depois alterou-se a fase móvel para um gradiente de C:D (20:80) até 4 min com a finalidade de limpar a amostra retida na coluna, após 4 min a proporção voltou para (5:95) para economizar o metanol da fase, passados 10 min a fase móvel voltou para C:D (90:10) por 3 min;
- na coluna analítica primeiro houve um condicionamento com A:B (80:20) a uma vazão de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, esta razão foi mantida até 5 minutos, após 5 min iniciou-se o gradiente linear na coluna analítica alterando para A:B (30:70) de 5 para 13 min;
- após 13 min ambas as fases móveis voltaram para as condições iniciais permanecendo por 15 minutos até um total reequilíbrio do sistema;

- a válvula que alterava entre as posições “carregamento” e “eluição”, iniciou na posição “carregamento”, em 4 min foi para a posição “eluição” e em 10 min voltou para a posição de carregamento para uma nova limpeza da coluna de carregamento;
- a temperatura do forno da coluna foi mantida a 30 °C durante toda a análise. Um esquema geral do processo está apresentado na Figura 3.



Esquerda: Posição da válvula em “carregamento”. **Direita:** Posição da válvula em “eluição”.

Figura 3 – Sistema SPE-*online* com direcionamento das fases móveis, tempo de eluição das fases móveis nas colunas de carregamento e coluna analítica e de tempo de viragem da válvula

Para não prejudicar a sensibilidade, o florfenicol foi injetado separadamente dos outros antimicrobianos no modo de ionização negativa, mas nas mesmas condições analíticas.

4.1.4 Parâmetros do espectrômetro de massas

A otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas foi realizada conforme descrito no item 3.5 e as energias de fragmentação e colisão e os íons monitorados para cada composto estão listados na Tabela 4.

As condições do espectrômetro de massas foram: temperatura do gás de secagem 325 °C, vazão de gás 12 L min⁻¹, pressão do nebulizador utilizando N₂ 50 psi e tensão do capilar 4000 V.

Tabela 4 - Antimicrobianos, tempo de retenção (t_R), íons precursores, íons produto, energia de fragmentação e energia de colisão

Composto (abreviações na Tabela 1)	t _R (min)	Ion precursor (m/z)	Ion produto (m/z)	Energia de fragmentação (V)	Energia de colisão (eV)
CTC	10,61	479,1	462,2*	125	12
		479,1	444,1**	125	17
OTC	9,68	461,2	426*	115	16
		461,2	201,1**	115	41
TC	9,94	445,2	410,2*	115	17
		445,2	154,2**	115	30
SDM	11,98	311,1	156*	120	16
		311,1	108**	120	28
SMZ	10,12	279,1	186*	115	12
		279,1	156**	115	16
STZ	9,12	256	156*	90	8
		256	108**	90	20
CFX	9,78	332,1	288,1*	125	13
		332,1	245,1**	125	22
EFX	10,02	360,2	342,2*	132	17
		360,2	316,2**	132	16
NFX	9,69	320,1	302,1*	125	20
		320,1	231,0**	125	44
SAR	10,56	386,1	342,1*	119	15
		386,1	299,1**	119	26
CAP	11,56	323	305*	70	0
		323	275**	70	8
FF***	3,32	355,9	335,9*	139	5
		355,9	185,1**	139	13
SDM-d6	11,94	317,1	162,2*	65	20
		317,1	108,1**	65	28

*Transições utilizadas para quantificação ** Transições utilizadas para a qualificação *** Ionização no modo negativo, SDM-d6: padrão interno.

É importante que todos os parâmetros sejam otimizados para que os compostos possam ser analisados em uma única corrida proporcionando economia de custo e tempo. As transições e energias de alguns produtos foram otimizadas manualmente, uma vez que o software Mass Hunter Optimizer não apresentou fragmentação adequada.

Com exceção do FF todos os antimicrobianos foram ionizados no modo positivo. O uso de espectrometria de massa por MRM no modo negativo e positivo, injetados separadamente, apresentou boa sensibilidade e seletividade para a análise dos antimicrobianos em concentrações de ng L⁻¹ em amostras de água.

4.2 Validação, quantificação e controle de qualidade dos métodos

4.2.1 Análise da água

Os procedimentos utilizados para identificação dos picos dos antimicrobianos foram os seguintes: tempo de retenção e duas transições no modo MRM. A relação de sinal dos íons detectados utilizados neste trabalho para fins de confirmação foi baseada nos critérios indicados pela União Europeia 2002/657/CE (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

A seletividade do método foi verificada com injeções dos extratos de “branco” da matriz (sem adição de antimicrobianos) e extratos fortificados com os antimicrobianos. A amostra de água não apresentou interferentes superiores a 30% do limite de quantificação, nos mesmos tempos de retenção dos compostos analisados o que torna o método seletivo. A Figura 4 apresenta os cromatogramas obtidos pelo sistema SPE-LC-MS/MS do extrato da matriz “branco” evidenciando apenas o padrão interno.

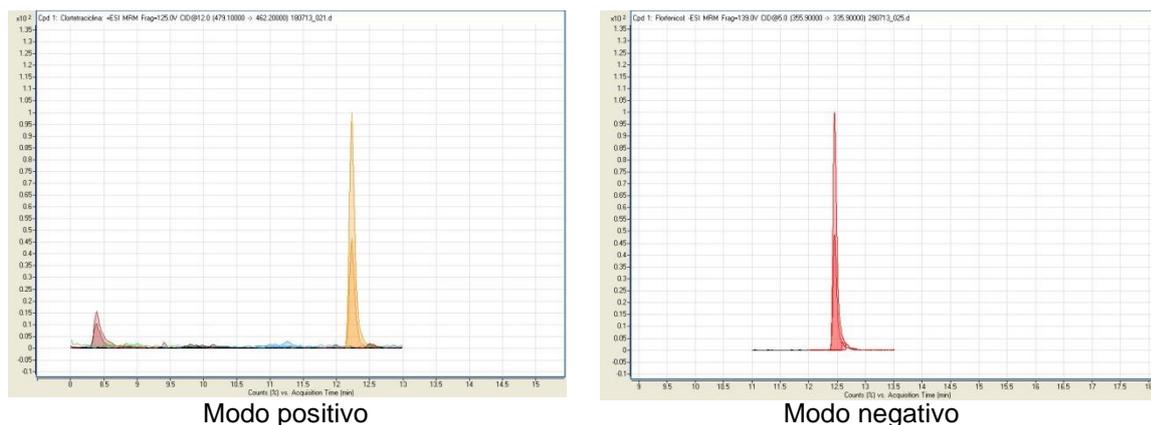


Figura 4 - Cromatogramas de íons totais (TIC) do extrato de “branco” da água - Método SPE-online

A linearidade e faixa de trabalho foram verificadas pela construção das curvas analíticas feitas a partir da resposta do antimicrobiano em CCM em relação ao padrão interno de concentração 100 ng L^{-1} . As curvas analíticas produzidas na faixa de concentração de 10 ng L^{-1} a 2000 ng L^{-1} apresentaram linearidade de resposta dos padrões, com coeficientes de determinação (r^2) superiores a 0,99 para todos os antimicrobianos (Tabela 5). A exatidão dos pontos em relação a curva apresentou variação inferior a 20%; estes dados foram calculados utilizando o software MassHunter e os resultados demonstram uma faixa linear de trabalho de segunda ordem onde podem ser determinados os antimicrobianos nas amostras de água.

Tabela 5- Equações da reta e coeficiente de determinação (r^2) para os antimicrobianos estudados

Antimicrobiano	Equação da reta	r^2
CTC	$y = 0,1779x - 0,0021$	0,9948
OTC	$y = 0,7039x - 0,052$	0,9971
TC	$y = 0,7643x - 0,066$	0,9985
SDM	$y = 2,328x - 0,094$	0,9976
SMZ	$y = 1,983x - 0,11$	0,9979
STZ	$y = 0,8493x - 0,081$	0,9965
CFX	$y = 0,2808x - 0,13$	0,9970
EFX	$y = 0,5303x - 0,25$	0,9967
NFX	$y = 0,6895x - 0,44$	0,9984
SAR	$y = 0,3417x - 0,055$	0,9948
CAP	$y = 0,1154x - 0,094$	0,9918
FF	$y = 0,01980x + 0,0036$	0,9991

Os valores de limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos para o método SPE-*online* estão apresentados na Tabela 6.

Os estudos de recuperação foram feitos com sete replicatas nos níveis 100 ng L⁻¹ e 200 ng L⁻¹. A Figura 5 mostra os cromatogramas obtidos de amostras fortificadas nos dois níveis.

Os resultados apresentados na Tabela 6 mostram as recuperações nos dois níveis de fortificação com média variando entre 70 a 106% e CV% menores que 11%. Os resultados estão de acordo com os limites propostos no anexo II da instrução normativa 24 de 2009 para o Plano Nacional de Controle de Resíduos de Contaminantes (BRASIL, 2009).

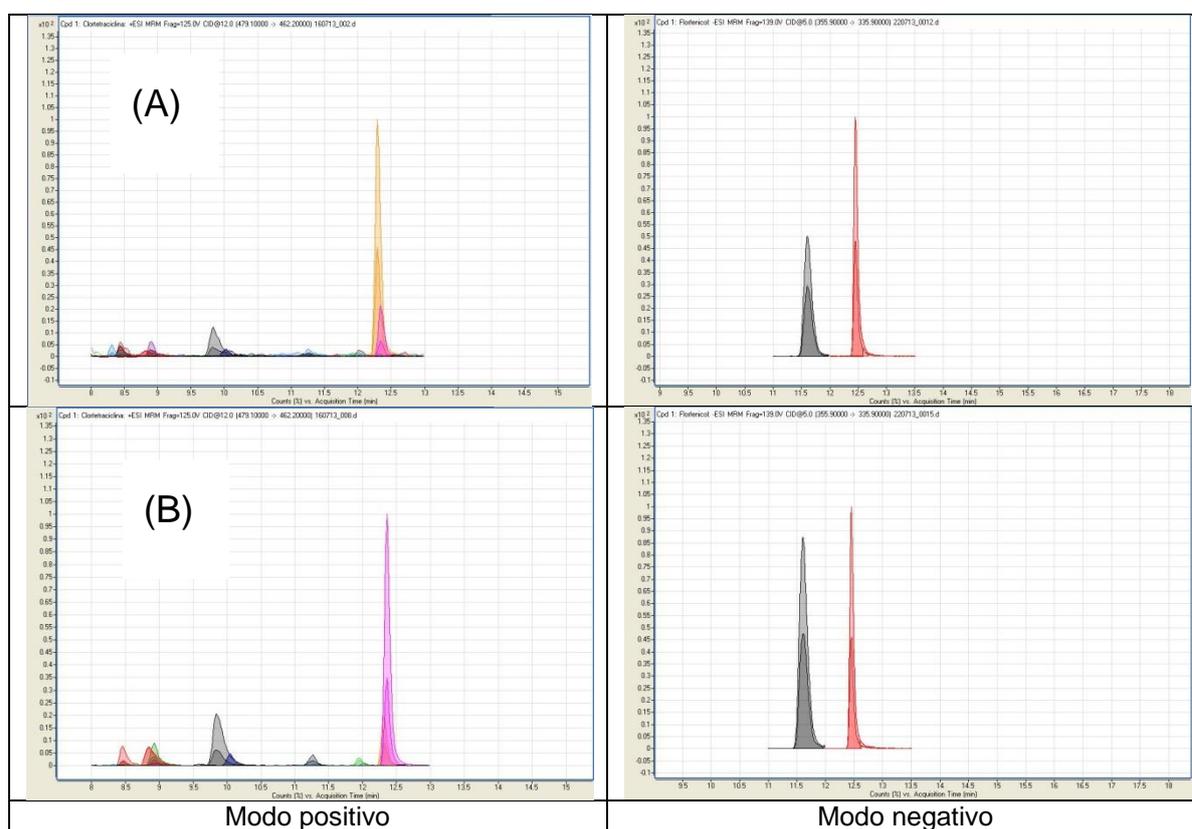


Figura 5- Cromatogramas de íons totais (TIC) de amostras de água fortificada em (A) 100 ng L⁻¹ e (B) 200 ng L⁻¹.

A precisão intermediária (Tabela 6) foi estabelecida durante a operação de rotina do sistema após um período de 30 dias depois do primeiro estudo de recuperação, com sete repetições na concentração de 100 ng L⁻¹ realizada por um analista diferente, e apresentou resultados adequados com CV% entre 2 e 20%.

Tabela 6-Resultados do estudo de recuperação, exatidão, precisão, LD e LQ para as amostras de água

Antimicrobiano	LD ng L ⁻¹	LQ ng L ⁻¹	Recuperação (%)					
			Intradia			Interdia		
			100 ng L ⁻¹	CV (%)	200 ng L ⁻¹ 1	CV (%)	100 ng L ⁻¹ 1	CV (%)
CTC	1,5	4,7	93,0	8,0	83,0	4,0	86,0	10
OTC	1,2	4,0	90,0	6,0	86,0	6,0	88,0	7,0
TC	1,5	4,8	88,0	4,0	86,0	4,0	86,0	5,0
SDM	1,0	3,2	91,0	3,0	90,0	3,0	90,0	3,0
SMZ	0,60	2,1	93,0	4,0	91,0	3,0	93,0	3,0
STZ	1,2	4,1	97,0	5,0	93,0	4,0	100	5,0
CFX	1,2	4,1	81,0	7,0	101	1,0	70,0	20
EFX	0,50	1,6	70,0	5,0	87,0	3,0	64,0	9,0
NFX	1,2	3,9	88,0	7,0	101	4,0	81,0	20
SAR	2,6	8,5	101	5,0	93,0	5,0	104	6,0
CAP	2,7	8,8	106	11	98,0	10	105	7,0
FF	0,10	0,50	104	3,0	94,0	2,0	83,0	4,0

O método desenvolvido demonstrou ser preciso e exato e pode ser utilizado, com confiabilidade, para a determinação de antimicrobianos em água.

Todos os extratos de amostras fortificadas, injetados intercaladas com as amostras de água, para o controle de qualidade, mostraram recuperação e CV% dentro da faixa recomendada. As amostras de matriz em branco confirmam a seletividade do método.

4.2.2 Análise do sedimento

A seletividade do método foi verificada com injeções dos extratos de “branco” da matriz (sem adição de antimicrobianos) e extratos fortificados com os antimicrobianos. A amostra de branco de sedimento, não apresentou interferentes, superiores a 30% do limite de quantificação, nos mesmos tempos de retenção dos compostos analisados o que torna o método seletivo. A Figura 6 apresenta os cromatogramas obtidos pelo sistema SPE-LC-MS/MS do extrato da matriz “branco” evidenciando apenas o padrão interno.

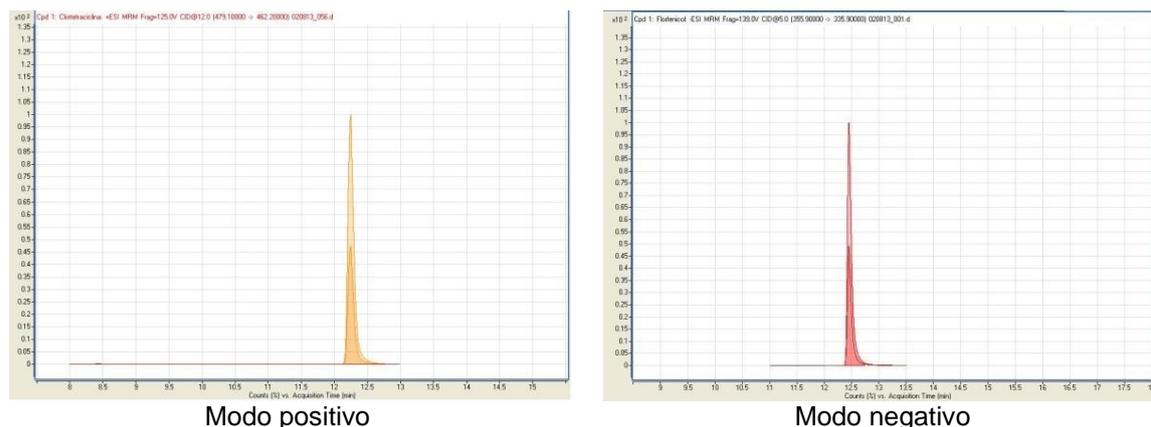


Figura 6- Cromatograma de íons totais (TIC) do extrato de “branco” do sedimento - Método SPE-online

A linearidade e faixa de trabalho foram verificadas pela construção das curvas analíticas feitas a partir da resposta do antimicrobiano em CCM em relação ao padrão interno de concentração $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. As curvas analíticas produzidas na faixa de concentração de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ apresentaram linearidade de resposta dos padrões, apresentando coeficientes de determinação (r^2) superiores a 0,99 para todos os antimicrobianos (Tabela 7). A exatidão dos pontos em relação a curva apresentaram variação inferior a 20%; estes dados foram calculados com a utilização do software MassHunter e os resultados demonstram uma ampla faixa linear de trabalho de segunda ordem na qual podem ser determinados os antimicrobianos nas amostras de sedimento.

Tabela 7- Equações da reta, r^2 , LD e LQ dos antimicrobianos estudados para sedimento

Antimicrobiano	Equação da reta	r^2	LD $\mu\text{g kg}^{-1}$	LQ $\mu\text{g kg}^{-1}$
CTC	$y=0,0023x+0,0082$	0,9987	2,5	8,2
OTC	$y=0,011x-0,0073$	0,9993	1,3	4,3
TC	$y=0,0073x+0,013$	0,9991	1,0	3,2
SDM	$y=0,018x-0,023$	0,9996	0,60	1,9
SMZ	$y=0,010x-0,0050$	0,9998	3,0	9,9
STZ	$y=0,0031x-0,013$	0,9993	4,0	13
CFX	$y=0,0011x+0,020$	0,9987	5,1	16
EFX	$y=0,0025x+0,0013$	0,9992	4,1	13
NFX	$y=0,0014x+0,0099$	0,9978	4,2	13
SAR	$y=0,0018x-0,0056$	0,9989	3,4	11
CAP	$y=0,0013x-0,0015$	0,9990	4,3	14
FF	$y=0,00090x+0,0062$	0,9999	0,40	1,3

Os valores de limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos para o sedimento no método SPE-*online* estão apresentados na Tabela 7. Os valores obtidos pela razão sinal/ruído estão acima do menor ponto da curva analítica que foi de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e que se mostrou linear a partir desta concentração, portanto, o LQ prático para o método foi considerado 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para todos os antimicrobianos.

Os estudos de recuperação foram feitos com sete replicatas nos níveis 20, 50 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Amostras branco de sedimento foram fortificadas utilizando soluções padrão de misturas dos antimicrobianos em metanol e mantidas durante a noite em refrigerador a aproximadamente 3 °C e analisadas somente no dia seguinte. A Figura 7 apresenta os cromatogramas obtidos de amostras fortificados nos três níveis.

A recuperação e a precisão foram calculadas através da análise de sete repetições independentes das amostras de sedimento fortificadas nas concentrações de 20, 50 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e estão apresentadas na Tabela 8. Os valores estão de acordo com os limites propostos no anexo II da instrução normativa 24 de 2009 para o Plano Nacional de Controle de Resíduos de Contaminantes (BRASIL, 2009).

A precisão intermediária (Tabela 8) foi estabelecida durante a operação de rotina do sistema após um período de 30 dias do primeiro estudo de recuperação, com sete repetições na concentração de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, realizadas por um analista diferente, e apresentou resultados adequados com CV% entre 2 a 15%.

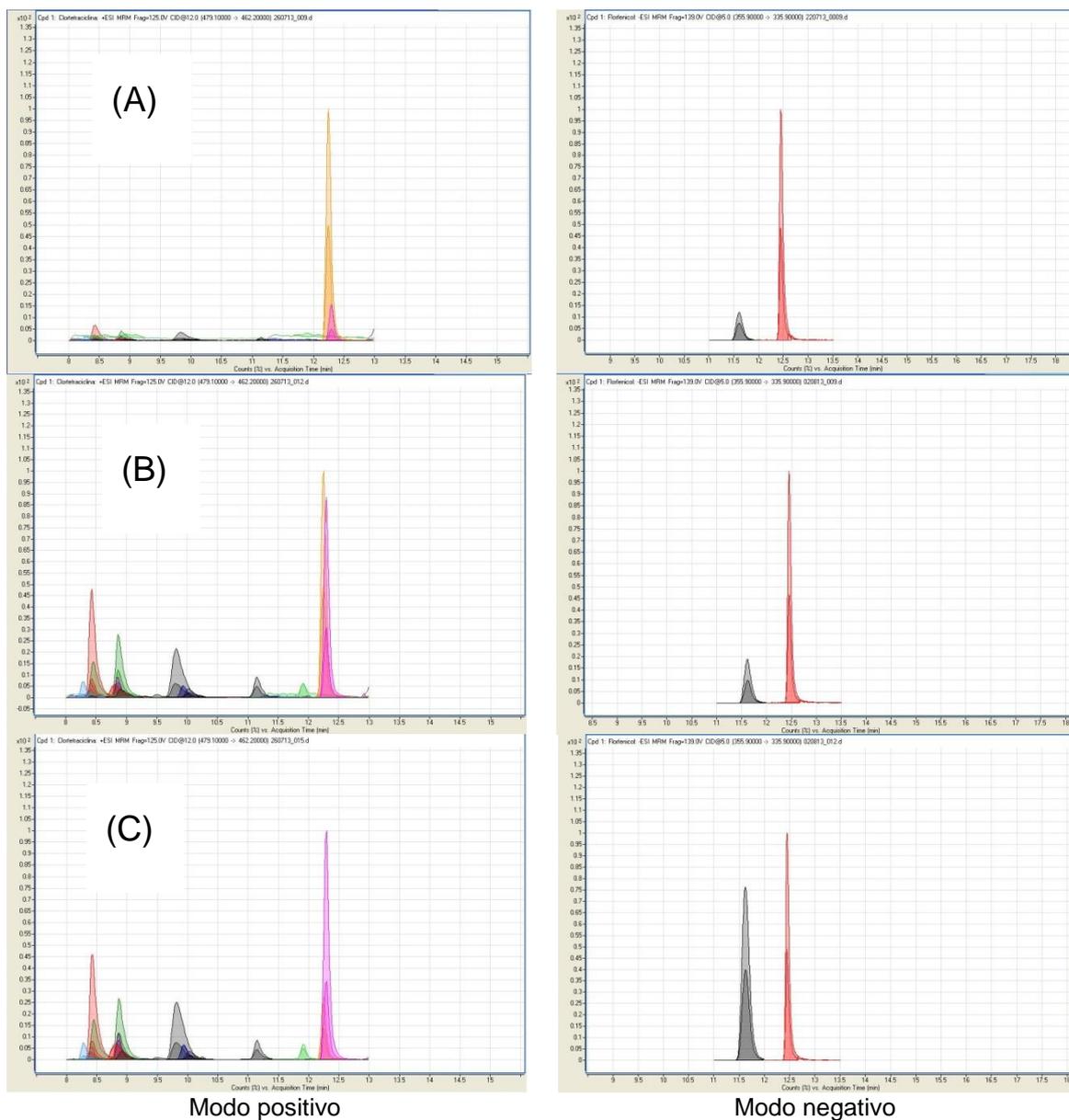


Figura 7- Cromatogramas de íons totais (TIC) de amostras de sedimento fortificadas em (A) $20 \mu\text{g kg}^{-1}$, (B) $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ e (C) $200 \mu\text{g kg}^{-1}$

O método desenvolvido demonstrou ser preciso e exato e pode ser utilizado, com confiabilidade, para a determinação de antimicrobianos em sedimento.

Todos os extratos de amostras fortificadas, injetados intercaladas com as amostras de sedimento, para o controle de qualidade, mostraram recuperação e CV% dentro da faixa recomendada. As amostras de matriz em branco confirmam a seletividade do método.

Tabela 8 - Resultados do estudo de recuperação, exatidão e precisão para as amostras de sedimento

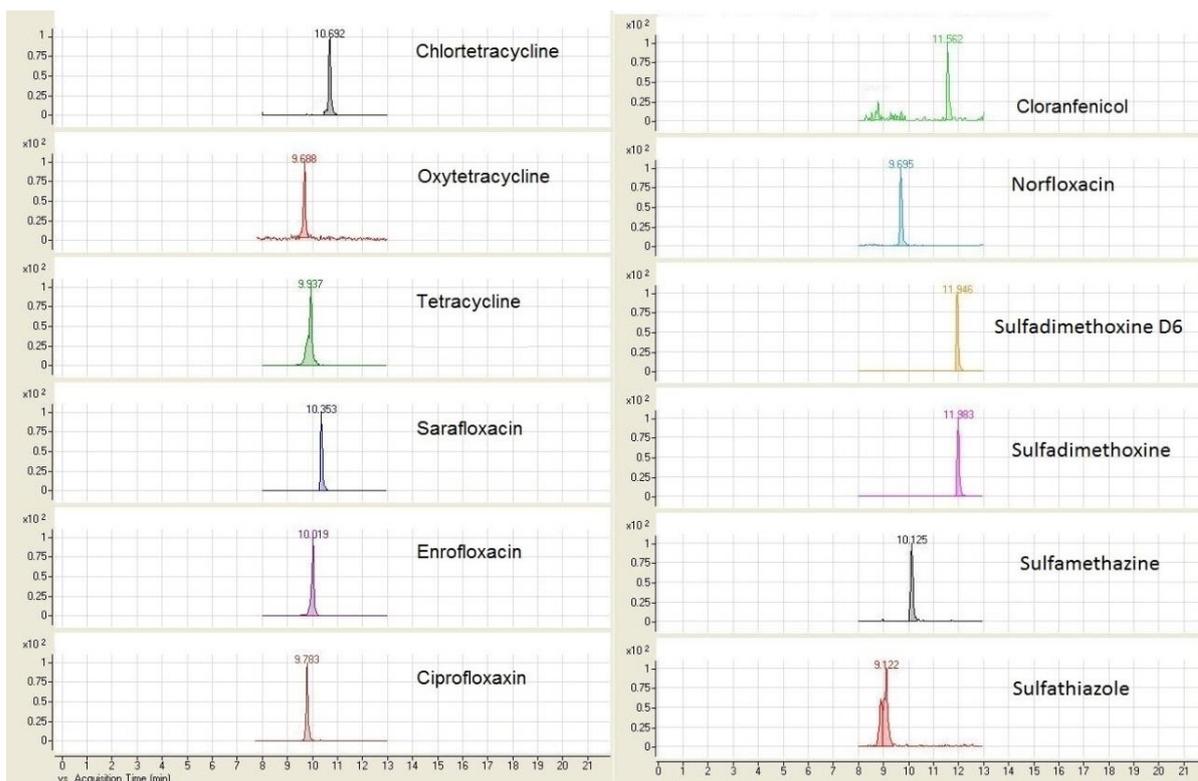
Antimicrobiano	Recuperação (%)							
	Intradia				Interdia			
	20 µg kg ⁻¹	CV (%)	50 µg kg ⁻¹	CV (%)	200 µg kg ⁻¹	CV (%)	50 µg kg ⁻¹	CV (%)
CTC	106	6	105	2	109	2	99,0	6,0
OTC	105	3	105	4	109	3	106	5,0
TC	101	7	102	6	95,0	5	102	5,0
SDM	96,0	6	94,0	2	100	3	95,0	2,0
SMZ	89,0	6	89,0	4	105	3	94,0	6,0
STZ	102	4	104	5	106	5	103	4,0
CFX	107	3	106	6	110	4	103	7,0
EFX	109	2	106	4	95,0	7	99,0	8,0
NFX	102	5	102	7	111	4	98,0	6,0
SAR	105	4	118	6	119	2	104	15
CAP	106	6	116	4	116	3	108	9,0
FF	96,0	6	104	6	101	4	95,0	11

Para a análise do sedimento o método apresentado se mostrou mais simples do que o proposto por Zhou et al. (2011) por não conter uma etapa da purificação da amostra que foi substituída pela utilização do SPE-*online*, previamente desenvolvido para a análise de água.

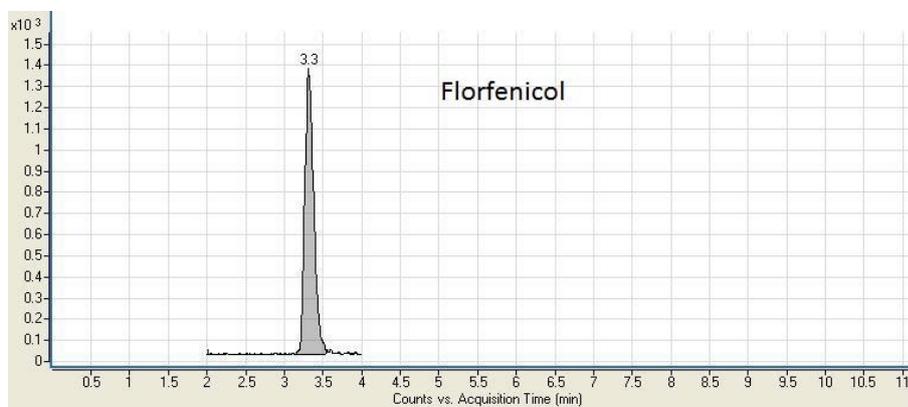
4.2.3 Análise de peixe

A fim de identificar um método de preparação de amostras simples e eficiente para a determinação de resíduos de antimicrobianos em peixes, foi utilizado filtragem com cartuchos Captiva e detecção pelo sistema LC-MS/MS no modo MRM, que se mostrou uma ferramenta eficiente para essa finalidade.

Os procedimentos utilizados para identificação dos picos dos antimicrobianos foram os seguintes: tempo de retenção e duas transições no modo MRM. Os cromatogramas dos compostos com as transições selecionadas para a análise estão apresentados na Figura 8. A relação de sinal dos íons detectados utilizados neste trabalho para fins de confirmação foi baseada nos critérios indicados pela União Europeia 2002/657/CE (EUROPEAN COMMISSION, 2002).



(A)



(B)

(A) Modo positivo e (B) Modo negativo.

Figura 8 - Cromatogramas de íon total (TIC) de uma amostra de peixe fortificada em $100 \mu\text{g kg}^{-1}$

Condições cromatográficas:

As condições cromatográficas foram estudadas para fornecer resolução entre os picos. Assim, a composição da fase móvel foi investigada para maximizar a sensibilidade e a resolução do método. Primeiramente, vários testes foram realizados para avaliar as fases móveis. Primeiramente foram testados os solventes utilizados; metanol e/ou acetonitrila (como fase orgânica) e água com ácido fórmico 0,1%. Acetonitrila proporcionou maior sensibilidade e resolução do que o metanol. Além disso, o gradiente foi otimizado para proporcionar resolução entre os compostos selecionados, em menos de 13 min. Outros parâmetros, tais como a temperatura da coluna, a vazão e volume de injeção, também foram testados. Os melhores resultados foram obtidos com as condições descritas na Secção 2.3. Resolução máxima dos picos detectados foram obtidos utilizando um *dwell time* de 50 ms.

A principal vantagem do uso do cartucho Captiva é que este pode ser facilmente utilizado de forma eficiente para a remoção de proteínas e de material particulado. Esta vantagem foi demonstrada pela seletividade do método verificada após as injeções de amostras em branco de peixe (sem a adição de antimicrobianos) e os extratos fortificados com antimicrobianos. A amostra em branco de peixe não mostrou interferentes maiores que 30% do limite de quantificação, nos mesmos tempos de retenção dos compostos analisados, o que assegura a seletividade do método.

A linearidade e faixa de trabalho foram verificados através da construção de curvas padrão utilizando CCM. A curva analítica foi feita com a razão das concentrações e as respostas relativas dos antimicrobianos com a o padrão interno (SDM-d6) que foi adicionado na concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, juntamente com outros antimicrobianos na matriz antes da extração. As análises foram realizadas em triplicata em sete concentrações diferentes. A faixa de concentrações ($5\text{-}400 \mu\text{g kg}^{-1}$) apresentou linearidade de resposta com o sinal analítico que é indicado pelos valores de coeficiente de determinação (r^2) maior que 0,99 para todos os compostos na matriz (Tabela 9).

Os resultados demonstram uma faixa de trabalho de segunda ordem onde podem se determinar os antimicrobianos em amostras de peixes com uma dispersão dos pontos na curva inferior a 20%. As curvas e cálculos foram realizados utilizando o software Mass Hunter.

Os LDs e LQs obtidos estão apresentados na Tabela 9 e foram adequados para a determinação de antimicrobiano nos peixes. Apenas FF possui LMR para tilápia no Brasil com o mesmo valor que na UE ($1000 \mu\text{g kg}^{-1}$). Os valores de referência para o controle de resíduos dos antimicrobianos em peixes estão apresentados na Tabela 1 (BRASIL, 2013) (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2013).

Os limites encontrados foram semelhantes ou menores do que os obtidos na literatura para a quantificação de antimicrobianos em peixes (CHAFER-PERICAS et al., 2010; EVAGGELOPOULOU; SAMANIDOU, 2013a; 2013b), e todos os limites são menores do que os LMR estabelecidos pela UE e menores do que os valores de referência, para o controle de resíduos dos antimicrobianos em peixes, do governo brasileiro, com exceção do CAP que possui um LMR de $0,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Tabela 1) por estar proibido para uso tanto na UE como no Brasil, demonstrando que os métodos de extração e detecção são adequados para a análise.

Tabela 9 - Limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ) e coeficiente de determinação (r^2) de antimicrobianos em músculo de tilápia do Nilo

Produto	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	r^2
CTC	0,91	3,0	0,9992
OTC	1,2	4,0	0,9994
TC	1,0	3,2	0,9994
SDM	0,30	0,90	0,9995
SMZ	0,80	2,6	0,9992
STZ	1,3	4,0	0,9990
CFX	0,40	1,2	0,9994
EFX	0,50	1,5	0,9976
NFX	1,3	4,3	0,9992
SAR	0,60	1,9	0,9986
CAP	1,0	3,5	0,9992
FF	1,1	3,6	0,9985

A precisão e a exatidão expressas em termos de recuperação do antimicrobiano em músculo de tilápia do Nilo foram estudadas através da análise das amostras fortificadas nas concentrações de 50, 100 e $200 \mu\text{g kg}^{-1}$. A precisão intradia

foi estudada com 7 repetições nos níveis de concentração mencionados e os resultados são apresentados na Tabela 10. Precisão interdia foi estabelecida durante operação de rotina do sistema após um período de 30 dias, utilizando sete repetições, para a concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, realizada por um analista diferente, e os resultados obtidos foram adequados entre 3% e 11%.

Os resultados do ensaio de recuperação estão apresentados na Tabela 10 e foram comparáveis com aqueles obtidos em trabalhos anteriormente publicados (De MENDOZA et al., 2012; LOPES et al., 2012; EVAGGELOPOULOU; SAMANIDOU, 2013a; 2013b). O método desenvolvido demonstrou ser preciso e exato e pode ser utilizado para a determinação de antimicrobianos em peixe.

Todos os extratos de amostras fortificadas de controle de qualidade, injetados juntamente com as amostras reais, mostraram recuperação e CV% dentro da faixa recomendada.

Tabela 10 - Resultados do estudo de recuperação, exatidão e precisão para três níveis de fortificação em peixes e precisão interdia para o nível $100 \mu\text{g kg}^{-1}$

Antimicrobi anos	Recuperação (%)						Interdia CV (%)
	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$		100 $\mu\text{g kg}^{-1}$		200 $\mu\text{g kg}^{-1}$		
	CV (%)	CV (%)	CV (%)	CV (%)	CV (%)	CV (%)	
CTC	108	3,7	100	4,5	87,5	7,7	6,1
OTC	103	4,6	96,8	11	86,3	8,3	8,5
TC	106	4,5	107	5,4	93,0	7,4	6,2
SDM	86,5	6,0	89,3	9,3	96,0	4,8	7,8
SMZ	99,3	4,1	94,9	7,7	97,6	5,0	5,6
STZ	92,5	3,3	92,3	7,2	95,8	5,8	7,7
CFX	87,9	6,5	87,2	8,6	82,8	6,2	9,1
EFX	98,4	6,6	108	4,7	95,4	8,3	8,5
NFX	96,0	10	100	9,4	87,5	5,1	7,8
SAR	98,1	3,0	90,0	5,4	90,7	4,4	4,7
CAP	93,2	5,2	90,5	13	94,5	5,5	10
FF	102	2,5	98,7	2,6	87,6	3,4	2,8

Diferentemente do estudo realizado por Lopes et al. (2012) o presente estudo não abrangeu um grande número de moléculas, no entanto, apresentou valores de LQs mais baixos, melhores resultados de recuperação e precisão. Além disso, o procedimento de preparo da amostra utilizado foi mais simples, visto que eles empregaram um sistema de extração em fase sólida a mais na etapa de purificação do extrato.

4.3 Caracterização das pisciculturas quanto à produção, medidas profiláticas e terapêuticas adotadas

As pisciculturas foram questionadas, no momento das coletas, sobre as medidas profiláticas e terapêuticas adotados, também foi feita uma caracterização de cada piscicultura. Os dados apresentados na Tabela 11 não são regulares pois o questionamento foi realizado de forma informal, pois, os responsáveis pelas pisciculturas que nos recebiam nos dias de amostragem, possuem restrição a responder questionários formais, com algum receio de lhes prejudicar.

De modo geral, cada piscicultura apresenta número e tamanho variado de tanques-rede, produzem exclusivamente tilápia do Nilo e possui um manejo particular para prevenção e controle de enfermidades. A produção anual da menor piscicultura é de 120 t ano⁻¹ e da maior, 1800 t ano⁻¹ e possuem uma biomassa por tanque de aproximadamente 100 kg m⁻³. Todas as pisciculturas utilizam banhos de sal (cloreto de sódio) como medida profilática e/ou terapêutica, assim como utilizam antimicrobianos (OTC e/ou FF) como medida terapêutica e/ou profilática sem haver uma periodicidade constante. As características gerais de cada piscicultura estão apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11 - Características das pisciculturas de criação de tilápias do Nilo em tanques-rede no reservatório da usina hidrelétrica de Ilha Solteira e medidas profiláticas e terapêuticas adotadas.

	Piscicultura 1	Piscicultura 2	Piscicultura 3	Piscicultura 4
Produção anual	1500 t/ano	1800 t/ano	120 t/ano	840 t/ano
Número de tanques				
2 x 2 (6 m3)	-	-	120	-
3 x 3 (18 m3)	263	1280	8	233
6 x 6 (108 m3)	50	10	-	-
Biomassa por tanque				
2 x 2 (6 m3)	-	-	92 kg/m ³	-
3 x 3 (18 m3)	100 kg/m ³	90 kg/m ³	-	100 kg/m ³
6 x 6 (108 m3)	70 kg/m ³	60 kg/m ³	-	-
% de sobrevivencia	90-95	70	80	90
Métodos profiláticos				
quarentena	-	-	-	-
monitoramento limnológico	-	sim	-	-
banho curto de sal	4 kg/100 L de água na classificação	3 kg/80 L de água na classificação	sim	-
banhos longos de sal antimicrobianos oral	-	-	-	-
antimicrobianos na água	oxitetraciclina na 1ª classificação e no povoamento contra	oxitetraciclina na 1ª classificação	-	-
vacina	<i>streptococcus agalactiae</i> : peixes com 30 g	-	-	-
densidade reduzida (verão)	20% de redução no número de peixes	-	-	5 % de redução no número de peixes
controle do mexilhão dourado	footoxi, foothills	-	-	-
anestesia na classificação	eugenol	-	-	eugenol
teste de rações	-	-	-	guabi, malta cleyton e zippy
Métodos terapêuticos				
banhos rápido de sal	-	-	-	sal e permanganato para monogênea
banhos longos de sal remanejamento	-	-	sim	-
antimicrobiano oral	oxitetraciclina	oxitetraciclina, florfenicol	florfenicol	oxitetraciclina
dose	-	-	1g/kg de ração na presença de sinais clínicos	-
frequência	-	-	-	-
período	-	10 dias	10 dias	8 a 10 dias

4.4 Parâmetros físico-químicos da água

Os parâmetros físico-químicos da água foram mensurados para determinar a qualidade da água onde os peixes são cultivados e estão apresentados na Tabela 12. Os valores observados foram comparados com os valores delimitados pela legislação através da resolução 354 de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) para água Classe 2 (Brasil, 2005).

Tabela 12 - Características físico-químicas das amostras de água coletada em diferentes pisciculturas localizadas no Rio Paraná e Grande no município de Santa Fé do Sul, São Paulo, Brasil

Data	Piscicultura	Temp (°C)	pH	ORP (REDOX)	OD (mg L ⁻¹)	CE (μS cm ⁻¹ @25°C)	STD (mg L ⁻¹)	Turb (NTU)
Abril 2013	1 - 0m	28,3	7,35	+0251,3	06,42	8	5	00,0
	1 - 100m	28,4	7,38	+0248,1	07,44	8	5	00,8
	1 - 1000m	28,6	7,53	+0263,0	08,27	7	4	14,6
	2 - 0m	28,5	7,25	+0235,8	02,53	18	11	00,0
	2 - 100m	28,5	7,27	+0260,4	03,18	17	11	00,0
	2 - 1000m	28,3	7,36	+0266,4	04,43	16	10	00,0
	3 - 0m	28,4	6,52	+0264,3	05,62	8	5	06,4
	3 - 100m	28,5	6,65	+0288,3	07,60	8	5	01,3
	3 - 1000m	28,5	6,72	+0285,8	07,66	9	5	11,3
	4 - 0m	28,1	7,69	+0224,7	06,00	11	7	00,0
	4 - 100m	28,1	7,57	+0259,9	07,36	14	9	00,0
	4 - 1000m	28,1	7,55	+0222,3	07,38	13	8	00,0
Julho 2013	1 - 0m	24,4	7,70	+0220,9	06,90	20	13	80,2
	1 - 100m	24,5	7,61	+0259,6	08,05	19	12	81,1
	1 - 1000m	24,5	7,66	+0263,3	09,09	18	11	80,1
	2 - 0m	24,3	7,35	+0269,8	02,02	25	16	79,9
	2 - 100m	24,5	7,39	+0278,3	05,26	24	15	82,0
	2 - 1000m	24,5	7,39	+0259,3	05,81	23	14	82,6
	3 - 0m	24,7	8,03	+0204,6	08,07	18	11	84,3
	3 - 100m	24,7	7,76	+0243,1	08,08	20	13	81,1
	3 - 1000m	24,7	7,81	+0239,1	09,03	20	13	81,8
	4 - 0m	24,3	7,97	+0192,7	06,40	25	16	82,3
	4 - 100m	24,2	7,87	+0231,9	07,47	23	14	80,6
	4 - 1000m	24,2	7,79	+0238,4	07,84	22	14	81,1

Data	Piscicultura	Temp (°C)	pH	ORP (REDOX)	OD (mg L ⁻¹)	CE (µS cm ⁻¹ @25°C)	STD (mg L ⁻¹)	Turb (NTU)
Out 2013	1 - 0m	26,6	7,76	+0258,4	06,85	15	9	21,0
	1 - 100m	26,7	8,00	+0265,4	09,34	14	9	20,5
	1 - 1000m	26,8	7,91	+0262,0	09,22	11	7	22,2
	2 - 0m	28,0	7,00	+0209,4	07,62	21	13	33,7
	2 - 100m	27,9	7,25	+0204,4	09,11	21	13	22,3
	2 - 1000m	27,7	7,94	+0214,4	10,03	20	13	22,3
	3 - 0m	26,8	8,50	+0185,3	08,86	20	13	20,1
	3 - 100m	26,9	8,17	+0189,2	09,24	17	11	21,2
	3 - 1000m	27,0	8,07	+0201,8	09,01	15	9	20,1
	4 - 0m	26,8	8,37	+0172,9	08,91	16	10	30,7
	4 - 100m	26,6	8,49	+0188,5	09,93	19	12	31,3
	4 - 1000m	26,5	8,68	+0185,1	10,48	18	11	23,6
Jan 2014	1 - 0m	30,4	7,61	+0204,4	04,62	13	8	00,0
	1 - 100m	30,5	7,58	+0278,5	05,12	11	7	00,0
	1 - 1000m	30,3	7,61	+0260,0	06,33	12	7	00,0
	2 - 0m	30,1	7,36	+0243,5	04,04	22	14	00,0
	2 - 100m	30,0	7,11	+0259,6	03,43	22	14	00,0
	2 - 1000m	30,0	7,13	+0276,6	03,93	22	14	00,0
	3 - 0m	30,5	7,43	+0234,1	03,50	13	8	00,0
	3 - 100m	30,4	7,47	+0209,4	05,86	11	7	00,0
	3 - 1000m	30,4	7,69	+0196,7	06,59	11	7	00,0
	4 - 0m	29,4	8,16	+0202,7	03,02	20	13	00,0
	4 - 100m	29,5	7,74	+0235,4	05,52	18	11	00,0
	4 - 1000m	29,5	7,64	+0235,3	06,19	18	11	00,0

*Temperatura (Temp), pH, potencial de oxi-redução (ORP), oxigênio dissolvido (OD), condutividade elétrica (CE), sólidos totais dissolvidos (STD) e turbidez (Turb).

A temperatura da água é parte rotineira de monitoramento de recursos hídricos, seja ele lótico ou lêntico, sendo que geralmente, esta tem padrão sazonal e diurno e também pode variar de acordo com a profundidade do corpo hídrico. A temperatura é uma variável muito importante no ciclo de vida de organismos aquáticos, já que muitas espécies precisam de uma determinada temperatura para incubação de ovos, crescimento e desenvolvimento e desova. Nos locais de amostragem de água na área de estudo, observou-se uma variação temporal, onde menores e maiores valores foram observados em julho de 2013 e janeiro de 2014, respectivamente, sendo que pouca variação foi observada entre os pontos de

amostragens dentro de cada mês. De acordo com Kubitzka (2000), a temperatura da água ideal para criação de tilápias deve estar entre 27 e 32 °C.

O pH é uma variável que está relacionada à acidez, neutralidade ou alcalinidade de uma solução aquosa e tem sido bastante utilizado em avaliações da qualidade da água. Segundo o CONAMA, ambientes aquáticos brasileiros Classe 2, podem apresentar pH de 6 a 9 como critério de preservação da biota (BRASIL, 2005). Foi observado que em todos os meses em todos os locais de amostragens, as amostras de água apresentaram valores de pH dentro do permitido pelo CONAMA. De acordo com Boyd (2003), a baixa sobrevivência de tilápias está diretamente relacionada a pH abaixo de 4.

O potencial de oxi-redução (ORP) é a medida em volts de uma substância que pode ser oxidada ou reduzida, isto é, sua capacidade em perder e ganhar elétrons. Valores positivos significam que o ambiente está oxidado e desta forma maiores valores de oxigênio dissolvido serão observados na amostra. Os valores para este parâmetro variaram entre +172,9 a +288,3, no entanto o CONAMA não estabelece limites para esta variável.

Um dos parâmetros mais importantes dos ecossistemas aquáticos é o oxigênio dissolvido. Isso porque a grande maioria dos seres vivos necessita desta molécula para a sua manutenção. A maior concentração de oxigênio dissolvido foi observada no mês de outubro de 2013 a aproximadamente 1000 metros da localização dos tanques redes e a menor no mês de julho de 2013 em amostra de água coletada próximo aos tanques redes. De acordo com a resolução 357 do CONAMA, valores de oxigênio dissolvido não deve ser inferior a 5 mg L⁻¹ para água Classe 2, e desta forma, observa-se que as amostras de água coletada no mês de janeiro de 2013 foram as que apresentaram menores valores (Tabela 12), estando a maioria abaixo do permitido pela legislação ambiental brasileira. Este fato pode ser decorrente das altas temperaturas da água observada neste mês, uma vez que nesta situação há menor dissolução de oxigênio na água. Em relação ainda a este parâmetro, pode ser observado que para todos os meses de amostragem, os menores valores de oxigênio dissolvido foram observados próximos aos tanques redes (0 m), fato este que se deve ao consumo pelos peixes confinados. De modo geral, a Piscicultura 2 apresentou menores valores de oxigênio dissolvido, e em grande parte das amostras, foram menores que o recomendado para o bem estar

dos peixes. Esta característica da qualidade da água pode ser a causadora da menor taxa de sobrevivência dos peixes, quando comparada às demais pisciculturas (Tabela 11). Os valores apresentados sugerem que a capacidade de suporte desta piscicultura foi ultrapassada e que as características do braço onde ela está instalada não suportam a produção atual, de 1800 t de tilápias por ano.

A condutividade elétrica está relacionada com a quantidade de sais dissolvidos na água, sendo que altos valores indicam que o ambiente está sendo influenciado por alguma fonte de poluição. Menores valores de condutividade elétrica foram observados em amostras de água coletada no mês de abril de 2013 (Tabela 12), no entanto, de forma geral, os valores observados para os outros meses estão de acordo com os apresentados nos trabalhos de Guarino et al. (2005), e Minello et al. (2010). Valores elevados de condutividade em pisciculturas estão relacionados à forma de manejo, em que, geralmente, grande quantidade de ração oferecida aos peixes não é aproveitada por estes organismos, sendo decomposta por microorganismos e assim liberando íons para o ambiente aquático (MERCANTE et al., 2005). Segundo Mercante et al. (2005) a faixa recomendada de condutividade elétrica em sistemas aquícolas deve estar entre 40 a 70 $\mu\text{s cm}^{-1}$, sendo que os valores encontrados nas amostras estão todos abaixo (Tabela 12).

Os STD se referem a quantidade de substâncias dissolvidas em água, incluindo matéria orgânica, minerais e substâncias inorgânicas. Desta forma, este parâmetro está diretamente relacionado com a condutividade e turbidez de um ambiente aquático, sendo que maiores valores de turbidez e condutividade são esperados quando observados altos valores de STD. A legislação 357 do CONAMA determina que em corpos de água brasileiros Classe 2, inclusive em sistemas aquícolas, o valor máximo de STD seja menor que 500 mg L^{-1} . No presente estudo, em todos os locais e meses amostrados, observaram-se valores inferiores ao estabelecido pela legislação (Tabela 12). Conseqüentemente, baixos valores de turbidez da água foram também observados, atendendo desta forma, os critérios para este parâmetro segundo o CONAMA que é de até 100 UNT para aquicultura.

4.5 Caracterização do Sedimento

Os parâmetros físico-químicos, micronutrientes e macronutrientes foram determinados com o propósito de identificar qualquer correlação com a presença dos antimicrobianos. Os resultados estão apresentados na Tabela 13.

Devido a grande quantidade de íons metálicos presentes no sedimento acredita-se que muitos dos resíduos de antimicrobianos presentes nos sedimentos das pisciculturas possam estar quelados com estes íons como é sugerido por diversos autores (HALLING-SØRENSEN; SENDELØV; TJØRNELUND, 2002; VAZQUEZ-ROIG et al., 2010; SPELTINI et al., 2011).

O fósforo é o principal indicador do estado trófico dos corpos d'água por ser um fator limitante ao crescimento de algas (SCHELSKE, 2009). O monitoramento da concentração deste nutriente no sedimento torna-se importante, pois em determinadas condições, o fósforo acumulado no sedimento pode ser liberado e disponibilizado na coluna d'água (STEINBERG, 2011). Por outro lado, os sistemas aquícolas intensivos, como a criação de tilápias em tanques-rede, podem contribuir significativamente com o aumento de fósforo nos corpos d'água, devido ao grande aporte de nutrientes liberado na coluna d'água pelas sobras de ração e excretas dos peixes cultivados. Dentre os nutrientes presentes nas rações de tilápias, o fósforo é um dos elementos que apresenta menor digestibilidade aparente. Da lista de cinco alimentos avaliados por Köprücü e Özdemir (2005), a digestibilidade do fósforo variou de 9,7 a 30,1%, ou seja, aproximadamente 70 a 90% do fósforo adicionado às rações não são incorporados pelas tilápias, sendo excretados para os corpos d'água.

Desta forma, fica clara a contribuição das pisciculturas amostradas no acúmulo deste nutriente no sedimento. Em todas as pisciculturas, o ponto 0 m (logo abaixo dos tanques-rede) apresentou maiores concentrações de fósforo acumulado no sedimento e, com o distanciamento das pisciculturas (pontos 100 e 1000), os valores de fósforo apresentados foram menores (Tabela 13).

Tabela 13 - Caracterização química, de macronutrientes e de micronutrientes dos sedimentos

Amostra	pH	M.O.	C.O.	P	K	Ca	Mg	H+Al	Al	Soma	CTC	Sat.	Sat.	S	Cu	Fe	Zn	MN	
	CaCl ₂	resina			bases					bases	Al	SO ₄	DTPA						
	S.B.										V%	m%	mg dm ⁻³	-----mg dm ⁻³ -----					
	g dm ⁻³		mg dm ⁻³		-----mmol _c dm ⁻³ -----														
P. 1 (0 m)	5,9	39	23	530	1,2	34	10	25	0	45	70	64	0	19	4	472	3	37,6	
P. 1 (100 m)	5,7	39	23	23	1,3	41	23	28	0	65	93	70	0	14	4	456	0,6	53,6	
P. 1 (1000 m)	5,6	32	19	22	1,6	40	16	25	0	58	83	70	0	14	3,5	456	0,4	63,6	
P. 2 (0 m)	5,4	37	21	24	1,3	36	18	31	1	55	86	64	2	11	3,3	472	0,2	26	
P. 2 (100 m)	6,1	18	10	6	1,3	36	8	20	0	45	65	69	0	*	6,4	368	0,7	91,2	
P. 2 (1000 m)	5,5	23	13	10	1,2	23	6	28	0	30	58	52	0	7	8	440	0,6	73	
P. 3 (0 m)	5,4	18	10	153	0,8	13	4	20	0	18	38	47	0	6	1,3	344	0,5	9,6	
P. 3 (100 m)	5,5	18	10	38	0,6	15	5	22	0	21	43	48	0	7	1,5	480	0,6	31,2	
P. 3 (1000 m)	5,3	23	13	11	0,5	15	4	25	0	20	45	44	0	7	1,4	496	0,4	34,4	
P. 4 (0 m)	5,6	25	15	330	0,6	18	4	18	0	23	41	56	0	6	1,6	368	1,2	10,8	
P. 4 (100 m)	6,1	25	15	61	1	46	9	20	0	56	76	74	0	15	2,9	416	1	69,2	
P. 4 (1000 m)	6,4	18	10	6	1	29	5	13	0	35	48	73	0	7	1,6	424	0,5	16	

P.1 – Piscicultura 1; P.2 – Piscicultura 2; P.3 – Piscicultura 3; P.4 – Piscicultura 4; (0 m) na posição dos tanques; (100 m) a jusante dos tanques; (1000 m) a jusante dos tanques.

*Não obteve-se quantidade suficiente de amostra para análise.

4.6 Determinação de antimicrobianos em amostras de água

O método SPE-*online* desenvolvido e validado para a determinação e quantificação dos antimicrobianos em água foi aplicado em amostras de águas superficiais provenientes de pisciculturas localizadas na represa hidroelétrica de Ilha Solteira.

Amostras nas quais se observaram valores de antimicrobianos em concentrações acima da curva analítica, foram diluídas com o extrato da matriz, em proporção para que os valores das áreas dos picos ficassem dentro da curva analítica, os fatores de diluição foram, utilizados nos cálculos das concentrações dos antimicrobianos nas amostras. O mesmo procedimento de diluição foi utilizado para as amostras de sedimento e de peixe.

Dos 12 antimicrobianos avaliados pelo método apenas OTC, TC e FF apresentaram resíduos nas amostras de água. Na Tabela 11 pode-se observar que OTC e FF são as duas moléculas utilizadas para tratamento de enfermidade das tilápias nas pisciculturas. Para os demais fármacos analisados não encontraram-se valores de resíduos acima dos respectivos LQs (Tabela 14).

Todas as pisciculturas avaliadas apresentaram algum resíduo de antimicrobiano na água. As Pisciculturas 1, 2 e 4 apresentaram níveis de OTC, variando de 14 ng L⁻¹ a 7993 ng L⁻¹. Já as pisciculturas 1, 3 e 4 apresentaram níveis de FF variando de 7 ng L⁻¹ a 425 ng L⁻¹ e a Piscicultura 1 apresentou também níveis de TC de 7 ng L⁻¹, conforme pode ser observado na Tabela 14.

Em relação a data da coleta, observou-se maior concentração de OTC nos meses de julho e outubro. Também foi observado que as pisciculturas que acumularam mais OTC neste período foram a Piscicultura 1, onde foi encontrada concentração de 7993 ng L⁻¹ para o mês de julho/2013 e a Piscicultura 4 com uma concentração de 7028 ng L⁻¹, ambas a 0 m dos tanques redes, como pode ser verificado na Tabela 14.

Uma possível explicação para este fato é que nestes meses foram registradas as temperaturas mais baixas, devido ao período de inverno no Brasil, coincidindo com os meses de estiagem. Devido à menor precipitação pluviométrica, a taxa de renovação de água nas represas é menor, dificultando a diluição e dissolução das moléculas de antimicrobianos. Nestes meses, também foi registrado os maiores índices de turbidez e sólidos dissolvidos (Tabela 12), o que explica a maior concentração do antimicrobiano na água devido à necessidade de manutenção da sanidade dos peixes em baixas temperaturas, e a menor mobilidade dos antimicrobianos na água devido à alta presença de sólidos em suspensão.

Tabela 14 - Resultados das determinações de antimicrobianos nas amostras de água

Amostras	Coleta de Abril 2013		Coleta de Julho 2013		Coleta de Outubro 2013		Coleta de Janeiro 2014	
	OTC	FF	OTC	TC	OTC	FF	OTC	FF
	Concentração (ng L⁻¹)							
P. 1 (0 m)	-	-	7993 (107)	7 (1)	-	-	-	425 (46) a
P. 1 (100 m)	-	-	-	-	-	-	-	10 (1) b
P. 1 (1000 m)	-	-	-	-	-	-	-	-
P. 2 (0 m)	-	-	-	-	-	-	-	-
P. 2 (100 m)	-	-	-	-	-	-	27 (2)	-
P. 2 (1000 m)	-	-	-	-	-	-	-	-
P. 3 (0 m)	-	14 (3) a	-	-	-	40 (4) a	-	-
P. 3 (100 m)	-	89 (2) b	-	-	-	7 (1) b	-	-
P. 3 (1000 m)	-	9 (2) b	-	-	-	-	-	-
P. 4 (0 m)	296 (19) a	-	7028 (117) a	-	4130 (351)	22 (6)	220 (8)	-
P. 4 (100 m)	20 (2) b	-	16 (8) b	-	-	-	-	-
P. 4 (1000 m)	14 (1) b	-	-	-	-	-	-	-

P.1 – Piscicultura 1; P.2 – Piscicultura 2; P.3 – Piscicultura 3; P.4 – Piscicultura 4; (0 m) na posição dos tanques; (100 m) a jusante dos tanques; (1000 m) a jusante dos tanques.

Os valores estão representados pela média de três amostras analisadas = X e o desvio padrão = S; ou seja → X (S).

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, na mesma data de coleta e no mesmo local, não diferem estatisticamente entre si (p <0,05).

A Piscicultura 4 apresentou concentrações de OTC nas quatro coletas realizadas, o que condiz com o que foi relatado pelo produtor quando questionado a respeito das medidas profiláticas e terapêuticas usadas nos peixes (Tabela 15).

Tabela 15 - Concentração de OTC durante o período de um ano em amostras de água coletadas na piscicultura 4

OXITETRACICLINA			
Local de coleta	Data	Concentração (ng L⁻¹)*	CV (%)
	Abr/13	296 (19) c	
Piscicultura 4 0m (no local)	Jul/13	7028 (118) a	6%
	Out/13	4130 (351) b	
	Jan/14	220 (8) c	

* médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,01$).

Já o antimicrobiano FF foi quantificado nas pisciculturas 1, 3 e 4 nos meses de abril e outubro de 2013 e janeiro de 2014. No entanto, a maior presença deste fármaco ocorreu na Piscicultura 1 durante a coleta de janeiro de 2014, justamente no mês em que a temperatura da água foi maior (Tabela 16). A concentração de FF encontrada nas pisciculturas 3 e 4 foram 14 ng L⁻¹ para o mês de abril de 2013 e 22 ng L⁻¹ para o mês de outubro de 2013, respectivamente.

Tabela 16 - Concentração de FF em amostras de água da Piscicultura 1 – coleta de janeiro de 2014 e Piscicultura 3 – coleta de outubro de 2013

FLORFENICOL			
Local e data de coleta	Distância (m)	Concentração (ng L⁻¹)*	CV (%)
Piscicultura 1 Jan/14	0 m	425 (46) a	15%
	100 m	9 (1) b	
Piscicultura 3 Out/14	0 m	40 (4) a	13%
	100 m	7 (1) b	

* médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,01$).

A presença do antimicrobiano TC na Piscicultura 1, na coleta de julho de 2013, pode estar relacionada à presença de altas concentrações de OTC encontradas nesta mesma área (Tabela 17).

A TC é um dos subprodutos na fabricação de OTC que é produzida pela fermentação de determinadas cepas de *Streptomyces rimosus* (LYKKEBERG et al., 2004); provavelmente a presença de TC pode estar ligada às altas concentrações de OTC encontradas nas amostras.

Tabela 17 - Concentração de OTC e TC em amostras de água da Piscicultura 1 - coleta de julho/2013

Data coleta	Piscicultura 1	Concentração (ng L ⁻¹)
Julho/2013	Oxitetraciclina	7993 (107)
	Tetraciclina	7 (1)

Sanderson et al. (2005), apontam para uma meia vida ($T_{1/2}$) de 1,02 dias para a OTC em baixa concentração em água, porém ao alcançarem o sedimento este $T_{1/2}$ pode atingir até 400 dias. No mesmo estudo é apontado a formação do isômero 4-epianidrotetraciclina em pH neutro e/ou levemente básico, que é o pH da água presente nas pisciculturas indicado na Tabela 12.

Os resultados encontrados neste estudo estão abaixo dos valores estimados no estudo de toxicidade aguda e risco ambiental por Carraschi et al. (2011) que revelaram uma concentração letal média (CL_{50}), de OTC e de FF, para o pacu, estimada em 48h de 7,6 mg L⁻¹ e > 1.000 mg L⁻¹, respectivamente. No entanto, estudos ecotoxicológicos devem ser realizados com as doses ambientalmente relevantes. Carraschi et al. (2011) concluíram ainda que a OTC reduz a concentração do oxigênio dissolvido, e é considerada moderadamente tóxica, causando elevado risco de intoxicação ambiental para o pacu. O FF não apresenta risco de intoxicação ambiental para o pacu e não altera as variáveis de qualidade da água (CARRASCHI et al., 2011).

De modo geral, tanto a OTC quanto o FF apresentaram perfil de diluição à medida que os pontos de coleta se distanciaram do local onde foram aplicados (Tabela 14). Entretanto, no mês de abril, nota-se a presença dessas moléculas mesmo na maior distância das pisciculturas (ponto 1000 m). Nas amostras coletadas a jusante da posição dos tanques redes, observou-se pequena ou nenhuma quantidade de resíduos de antimicrobianos acima dos limites de detecção.

Em alguns casos como a OTC na Piscicultura 4 (Tabela 18) e o FF na Piscicultura 1 e 3 (Tabela 16), observou-se uma diminuição acentuada na quantidade de resíduos a medida que distanciou-se dos tanques.

Existem vários fatores que podem contribuir com esta diminuição: diluição no próprio corpo da água; sedimentação causada principalmente com a presença de material sólido em suspensão; biodegradação dos antimicrobianos que podem ser metabolizados por micro-organismos presentes na água; processos oxidativos, hidrólise, fotodegradação, formação de complexos com cátions bivalentes tais como cálcio ou magnésio; sorção com substâncias húmicas dissolvidas na água; ou até mesmo absorção pelas plantas (KUMMERER, 2009a).

Tabela 18 - Concentração de OTC em amostras de água da Piscicultura 4

OXITETRACICLINA		
Piscicultura 4	Distância dos tanques (m)	Concentração (ng L⁻¹)*
Abril/2013	0 m	296 (19) a
	100 m	20 (2) b
	1000 m	14 (1) b
Julho/2013	0 m	7028 (118) a
	100 m	16 (9) b

*médias seguidas pela mesma letra, na mesma data de coleta, não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,01$).

Nenhum dos outros nove antimicrobianos estudados apresentou resíduos na água. De acordo com dados reportados por diversos estudos que apresentaram contaminação ambiental atribuída a atividades pecuárias, bastante comuns em toda a margem da área estudada, e pelo descarte de esgoto das cidades da região (KEMPER, 2008; TONG et al., 2009; DINH et al., 2011; GARCIA-GALAN; DIAZ-CRUZ; BARCELO, 2011; FERRER; THURMAN, 2012; GAO et al., 2012; GROS, RODRIGUEZ-MOZAZ; BARCELO, 2013), era esperada a presença de antimicrobianos principalmente da classe das sulfonamidas e quinolonas. A ausência de resíduos de antimicrobianos, que não a OTC, TC e o FF, utilizados nas pisciculturas comprova que a área estudada é uma área integra em relação à contaminação de antimicrobianos e que a contaminação que está ocorrendo deve-se a atividade aquícola instalada na região.

Como sugerido por Sapkota et al. (2008) a intensa utilização profilática e terapêutica dos antimicrobianos na aquicultura podem levar a elevadas concentrações de resíduos em águas, sedimentos, produtos da aquicultura, peixes nativos e outros recursos naturais. A presença de resíduos de antimicrobianos em ambientes da aquicultura, bem como seus produtos, pode resultar em efeitos ecológicos e de saúde pública. Por exemplo, muitos antimicrobianos são tóxicos para os organismos aquáticos, incluindo *Daphnia* e *Artemia* (JONES; VOULVOULIS; LESTER, 2004). Em termos de saúde humana, exposições abaixo nível de resíduos de antimicrobianos presentes no ambiente e nos alimentos não são susceptíveis de causar efeitos tóxicos agudos entre o público em geral, no entanto, efeitos crônicos são ainda pouco estudados (JONES, VOULVOULIS e LESTER, 2004). Além disso, ainda não está claro como exposições repetidas à misturas contendo baixas concentrações de resíduos de antimicrobianos podem afetar indivíduos que trabalham nas pisciculturas manipulando estes produtos.

4.7 Determinação de antimicrobianos em amostras de sedimento

O método SPE-*online* desenvolvido e validado para a determinação e quantificação dos antimicrobianos em sedimento, foi aplicado em amostras provenientes de pisciculturas localizadas na represa da usina hidroelétrica de Ilha Solteira. Dos 12 antimicrobianos avaliados pelo método apenas OTC, TC e CTC, todos pertencentes ao grupo das tetracilinas, apresentaram resíduos, os demais antimicrobianos não apresentaram resíduos acima dos LQs correspondentes (Tabela 19).

De modo geral, as concentrações de OTC no sedimento coincidiram com as observadas na coluna d'água, tendo sido encontrados altos valores no sedimento quando os valores na coluna d'água também eram maiores. Notou-se também que, em alguns meses, este antimicrobiano não foi detectado na coluna d'água, mas foi encontrado no sedimento.

Zhou et al. (2012) encontraram concentrações de TCs, especialmente OTC e TC relativamente altas em lama de tratamento de esgoto, e relataram que apesar das TCs serem bastante solúveis em água e fracamente adsorvida a biomassa, os mecanismos não-hidrofóbicos, tais como interações iônicas, complexação por metais,

formação de pontes de hidrogênio ou polarização, provavelmente desempenharam um papel significativo na sorção de TCs nos sólidos. As características dos sedimentos analisados apresentados na Tabela 13, apontam principalmente a presença de íons metálicos, sugerindo a formação destes mecanismos e reiterando a presença das TCs.

Em relação à distância de coleta dos sedimentos dos pontos onde estão instalados os tanques redes, observou-se claramente uma diminuição da quantidade de resíduo dos antimicrobianos à medida que se afasta do local de produção, o que fica claro observando os resultados encontrados na Piscicultura 3 da coleta de abril de 2013 que apresentou para 0 m uma concentração média de $57 \mu\text{g kg}^{-1}$, para 100 m $19 \mu\text{g kg}^{-1}$ e para 1000 m concentração abaixo do LQ (Figura 9).

Na coleta realizada no mês de outubro de 2013 a Piscicultura 2 apresentou um acréscimo na quantidade de OTC à medida que se distanciava dos tanques rede, a 0 m $29 \mu\text{g kg}^{-1}$ e a 1000 m a concentração foi de $88 \mu\text{g kg}^{-1}$, porém esta piscicultura está localizada em um braço do Rio Grande (Figura 1) onde estão também instaladas outras 3 pisciculturas; provavelmente este valor de OTC pode ser oriundo das demais pisciculturas ali instaladas.

A Piscicultura 2 apresentou um decréscimo na presença de OTC no seu sedimento variando de $2009 \mu\text{g kg}^{-1}$ na posição 0 m no mês de abril de 2013 a zero no mês janeiro de 2014 (Figura 9) demonstrando claramente que esta piscicultura não utilizou, ou pelo menos, diminuiu consideravelmente o tratamento com o antimicrobiano OTC. O oposto disso observa-se na Piscicultura 4 onde a média da concentração de OTC passou de $36 \mu\text{g kg}^{-1}$ no mês de abril de 2013 para $5477 \mu\text{g kg}^{-1}$ no mês de janeiro de 2014; valores encontrados nas amostras de água e de peixe evidenciam a contínua utilização de OTC nesta piscicultura (Figura 9).

Tabela 19- Resultados das determinações de antimicrobianos nas amostras de sedimento

Amostras	Coleta de Abril 2013		Coleta de Julho 2013		Coleta de Outubro 2013		Coleta de Janeiro 2014		
	OTC	TC	OTC	TC	OTC	TC	OTC	TC	CTC
	Concentração (ng L⁻¹)								
P. 1 (0 m)	456 (43)	10 (1)	7343 (848) a	22 (5)	71 (17)	-	379 (9)	-	-
P. 1 (100 m)	-	-	43 (8) b	-	-	-	-	-	-
P. 1 (1000 m)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P. 2 (0 m)	1677 (327) a	20 (7)	705 (8)	-	29 (11) b	-	-	-	-
P. 2 (100 m)	22 (1) b	-	-	-	26 (8) b	-	-	-	-
P. 2 (1000 m)	-	-	11 (2)	-	88 (28) a	-	-	-	-
P. 3 (0 m)	57 (14) a	-	135 (41)	-	21 (1)	-	57 (26)	-	-
P. 3 (100 m)	19 (2) b	-	-	-	-	-	-	-	-
P. 3 (1000 m)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P. 4 (0 m)	36 (14) a	-	1995 (502)	21 (3)	2040 (92)	12 (2)	5477 (376)	72 (13)	16 (2)
P. 4 (100 m)	17 (6) ab	-	-	-	-	-	-	-	-
P. 4 (1000 m)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

P.1 – Piscicultura 1; P.2 – Piscicultura 2; P.3 – Piscicultura 3; P.4 – Piscicultura 4; (0 m) na posição dos tanques; (100 m) a jusante dos tanques; (1000 m) a jusante dos tanques.

Os valores estão representados pela média de três amostras analisadas = X e o desvio padrão = S; ou seja → X (S).

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, na mesma data de coleta e no mesmo local, não diferem estatisticamente entre si (p <0,05).

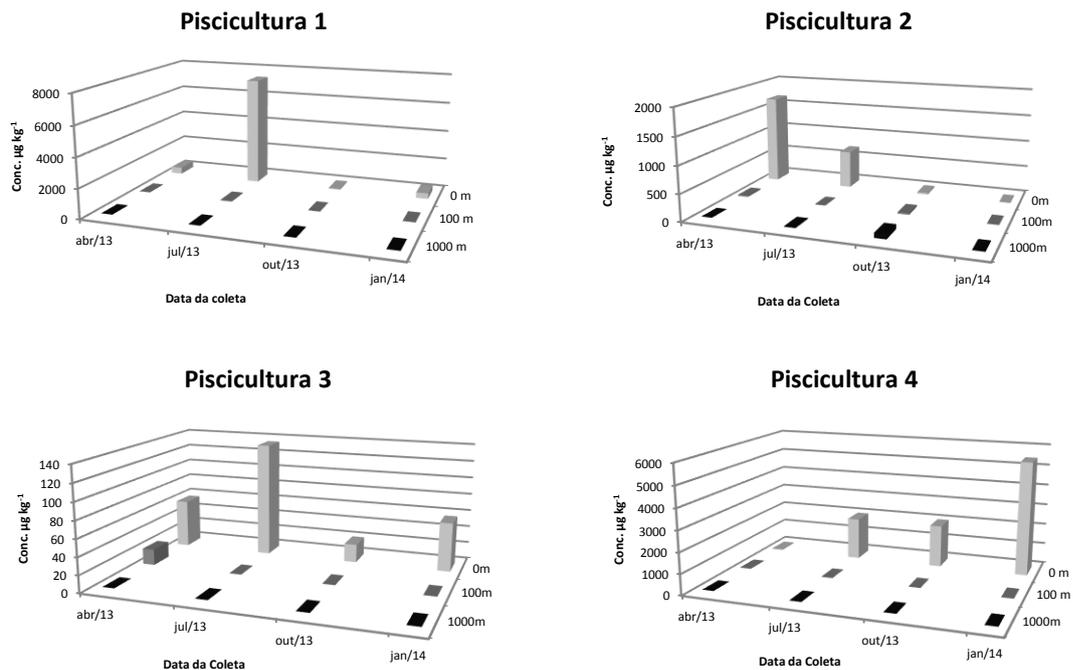


Figura 9- Media das concentrações de OTC detectada nos sedimentos em razão das distâncias dos locais de produção e da data de coleta ao longo de um ano

Os sedimentos da Piscicultura 1 não apresentam quantidades de OTC regulares, na coleta feita a 0 m, ao longo do período amostrado (Figura 9), chama atenção a quantidade de OTC encontrada no mês de julho de 2013, 7343 $\mu\text{g kg}^{-1}$; ocasionada provavelmente pela grande utilização no período entre a primeira coleta realizada em abril até a segunda amostragem.

Analisando a Piscicultura 3 (Tabela 20) as quantidade de OTC não diferem estatisticamente quando aplicado o teste de Tukey, com exceção da 2ª coleta que apresenta uma quantidade maior; a presença de OTC no sedimento desta piscicultura pode ser atribuída provavelmente ao uso intensivo deste antimicrobiano anteriormente ao início das coletas que ainda permaneceram no sedimento. O $T_{1/2}$ para a OTC em sedimento de pisciculturas é relatada como sendo maior que 400 dias, onde as concentrações encontradas foram de até 4,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ (SANDERSON et al., 2005).

Tabela 20 - Média das concentrações de OTC na Piscicultura 3 nas amostras de sedimento coletadas a 0 m

OXITETRACICLINA			
Local de coleta	Data	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) [*]	CV (%)
Piscicultura 3 0m (no local)	1ª coleta	57 (14) b	37%
	2ª coleta	135 (41) a	
	3ª coleta	21 (1) b	
	4ª coleta	57 (26) b	

* médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,01$).

Foram encontradas concentrações de TC somente nas coletas realizadas no local onde estavam instalados os tanques rede (0 m) e nos sedimentos que apresentaram quantidades de OTC superiores a $400 \mu\text{g kg}^{-1}$. Inclusive as maiores concentrações de TC observadas foram também nas amostras onde observou-se as maiores concentrações de OTC, sendo a Piscicultura 1 nas coletas de abril e julho de 2013, Piscicultura 2 na coleta de abril de 2013 e na Piscicultura 4 nas coletas de julho e outubro de 2013 e em janeiro de 2014 (Figura 10). A TC é um dos subprodutos na fabricação de OTC que é produzida pela fermentação de determinadas cepas de *Streptomyces rimosus* (LYKKEBERG et al., 2004); muito provavelmente a presença de TC está ligada às altas concentrações de OTC encontradas nas amostras.

Foi encontrada CTC na concentração de $16 \mu\text{g kg}^{-1}$ na Piscicultura 4 a 0 m, no mês de janeiro de 2014, justamente a mesma amostra que apresentou a maior concentração de TC e a segunda maior de OTC. Apesar da CTC não ser uma impureza ou produto de degradação da OTC acredita-se que ela possa ter sido formada, no ambiente ou até mesmo no processo de análise, por processos reversíveis de degradação, ao ser submetida a diferentes condições, como mudança do pH do meio, temperatura, exposição à luz entre outros como sugerido por HALLING-SØRENSEN; SENDELØV; Tjørnelund, (2002).

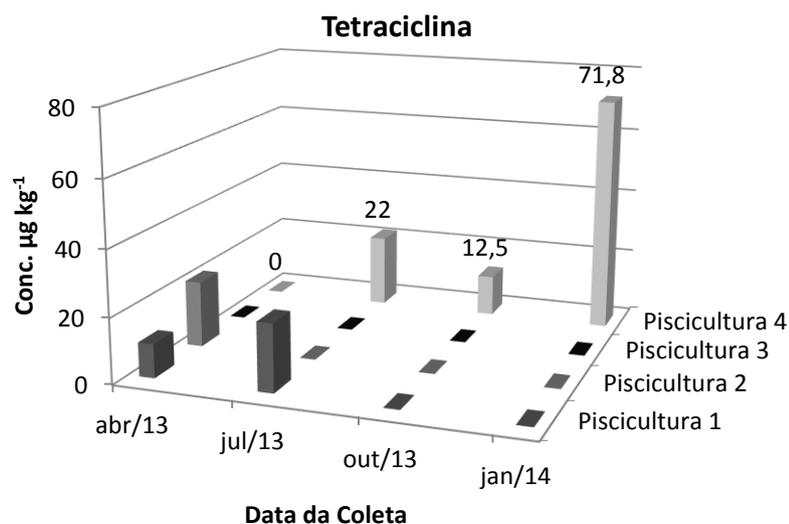


Figura 10 - Media das concentrações de TC detectada no sedimento em razão da data de coleta ao longo de um ano

O antimicrobiano FF que foi encontrado nas amostras de água e de peixe não foi encontrado nas amostras de sedimento. Em um estudo realizado por Pouliquen et al. (2009) no rio Elorn utilizado para a piscicultura na Bretanha, França, foi encontrada apenas uma amostra positiva das 100 amostras analisadas para florfenicol; os autores sugerem que FF é fracamente adsorvido pelo sedimento e, por conseguinte, facilmente lavado e então degradado além de serem diluídos no rio, tornando-o indetectável.

4.8 Determinação de antimicrobianos em amostras de peixe

Foram analisadas 126 amostras de músculo de tilápia do Nilo, de diferentes tamanhos, coletadas em quatro pisciculturas, na mais importante região produtora do estado de São Paulo. As amostras foram analisadas em triplicata.

Os antimicrobianos detectados nas amostras de peixe foram OTC, TC e FF. OTC foi o antimicrobiano mais encontrado, detectado em amostras das quatro pisciculturas em algum momento do monitoramento. Os demais antimicrobianos não foram detectados acima dos valores de LQs (Tabela 21).

A maioria dos resíduos foi detectada nos peixes pequenos, com aproximadamente 100 g, fase em que os peixes estão mais suscetíveis aos agentes bacterianos e que o tratamento com antimicrobianos incorporados na ração é intensificado. Os peixes médios, com aproximadamente 500 g, apresentaram quantidade de antimicrobianos bem menores que a dos peixes pequenos. Em apenas duas coletas foi detectado resíduos em peixes grandes, com aproximadamente 900 g, uma com OTC e outra com FF (Tabela 21).

Quando comparados estatisticamente verifica-se a diminuição na quantidade de resíduos com o aumento do tamanho do peixe (peixe pequeno para peixe médio e grande) como pode ser observado para OTC, determinada na Piscicultura 1 nos meses de abril e julho de 2013 e na Piscicultura 4 nos meses de julho e outubro de 2013. Entre os peixes médios e grandes, não foi observada diminuição estatística na quantidade de resíduos.

A OTC foi a molécula mais detectada. Ela foi encontrada em 39 das 126 amostras de peixes analisadas, os níveis variaram de 10 a 1379 $\mu\text{g kg}^{-1}$. TC foi observada em algumas amostras que apresentaram grandes quantidades de OTC, como já foi dito a TC é um subproduto da fabricação de OTC, muito provavelmente a OTC fornecida aos piscicultores está contaminada com TC, desta forma observa-se a necessidade de um controle de qualidade dos produtos veterinários comercializados no Brasil. Outra suposição seria que os piscicultores estariam utilizando a TC no tratamento dos peixes, apesar de nenhuma piscicultura ter relatado isso quando questionado.

Os valores da soma das TCs encontradas na Piscicultura 4 para peixes pequenos nas quatro coletas realizadas, assim como os valores encontrados na Piscicultura 1 no mês de julho de 2013, estavam acima do LMR da legislação da EU (EMA, 2013) que é de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e também acima do valor de referência adotado pelo governo brasileiro (BRASIL, 2013) que é de 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Entretanto, deve-se considerar que as tilápias são abatidas e destinadas ao consumo quando atingem 800 g e, nos peixes deste tamanho, não foram detectados valores significativos dos antimicrobianos.

Foi encontrado FF em quantidades acima de 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em peixes pequenos coletados nas Pisciculturas 1 e 3 e, em pequenas quantidades nos peixes médios e grandes. Estes valores estão abaixo do LMR estabelecido para FF em peixe no Brasil

e na EU que é de $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ (BRASIL, 2013; EMA, 2013). O FF é um antimicrobiano de largo espectro que pertence ao grupo dos anfenicóis e é utilizado na medicina veterinária. Em muitos países tem sido utilizado como substituto ao CAP. FF tem demonstrado ser eficaz em baixas concentrações contra bactérias patogênicas em peixes, especialmente em salmonídeos e bagres (SADEGHI; JAHANI, 2013).

Os únicos antimicrobianos disponíveis registrados para a produção de pescado no Brasil são OTC e FF (SINDAN, 2014). Assim, a presença desses resíduos de antimicrobianos no músculo da tilápia do Nilo está diretamente relacionada ao seu uso no controle de doenças bacterianas durante a produção. O antimicrobiano OTC é menos dispendioso do que o FF, no entanto, o produto comercial de OTC mais utilizado pelos piscicultores não é licenciado para cultivo de tilápias, apenas para crustáceos, lagosta, salmonídeos e bagres (SINDAN, 2014).

Em estudo realizado por Chafer-Pericas et al. (2010) na avaliação de sulfadiazina, sulfamerazina, sulfadimetoxina, oxitetraciclina, clortetraciclina e tetraciclina, foram analisadas nove amostras de peixes, provenientes de pisciculturas marinhas do Mediterrâneo da Grécia e Espanha. OTC foi detectado em quatro amostras, nas quais três abaixo do LQ e uma contendo $60 \mu\text{g kg}^{-1}$. De Mendoza et al. (2012) analisaram resíduos de antimicrobianos em 107 amostras de peixe gato (*Pangasius hypophthalmus*) adquiridas em diferentes mercados da capital da Espanha, Madrid. Dessas, 16 amostras apresentaram diferentes níveis de contaminação por antimicrobianos, todas em concentrações menores que os LMRs fixados. Dez das 16 amostras analisadas do bagre continham TC em um intervalo de 3,9 e $80,8 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Tabela 21 - Resultados das determinações de antimicrobianos nas amostras de peixe

Amostras	Coleta de Abril 2013		Coleta de Julho 2013		Coleta de Outubro 2013		Coleta de Janeiro 2014		
	OTC	FF	OTC	TC	OTC	FF	OTC	TC	FF
	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)								
P.1 - PP	61 (10) a	-	485 (26) a	11 (1)	-	417 (27) a	-	-	343 (8)
P.1 - PM	20 (4) b	-	32 (1) b	-	-	-	-	-	-
P.1 - PG	-	-	-	-	-	10 (2) b	-	-	-
P.2 - PP	-	-	11 (1)	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
P.2 - PM	-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
P.2 - PG	-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
P.3 - PP	-	525 (3)	-	-	-	-	-	-	-
P.3 - PM	-	-	-	-	-	27 (9)	90 (25)	-	-
P.3 - PG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P.4 - PP	1162 (60)	-	922 (84) a	12 (1)	725 (59) a	-	1299 (70)	32 (5)	-
P.4 - PM	-	-	13 (1) b	-	14 (2) b	-	-	-	-
P.4 - PG	-	-	12 (2) b	-	-	-	-	-	-

P.1 – Piscicultura 1; P.2 – Piscicultura 2; P.3 – Piscicultura 3; P.4 – Piscicultura 4; PP - peixe pequeno (até 100 g), PM – peixe médio (até 500 g), PG – peixe grande (até 900g).

Os valores estão representados pela média de três amostras analisadas = X; e o desvio padrão = S; ou seja → X (S).

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, na mesma data de coleta e no mesmo local, não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

Ø - períodos não amostrados por decisão do proprietário da piscicultura.

Evaggelopoulou e Samanidou (2013a) determinaram ampicilina, penicilina G, penicilina V, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, tianfenicol, florfenicol e cloranfenicol em 20 amostras de dourada (*Sparus aurata*), coletadas de mercados da Grécia; não foram detectados resíduos de antimicrobianos em nenhuma das amostras. Em outro estudo realizado por Evaggelopoulou e Samanidou (2013b) onde foram analisadas sete quinolonas em 10 amostras de salmão (*Salmo salar L.*) provenientes de mercados da Grécia, também, nenhum antimicrobiano foi detectado.

As diferenças dos resultados entre os estudos sugerem que uma contínua investigação de resíduos de antimicrobianos em amostras de peixe é necessária para garantir a segurança dos consumidores evitando possíveis contaminações por antimicrobianos e o surgimento de resistência microbiana.

4.9 Avaliação da resistência bacteriana

Com o intuito de saber se a utilização e a presença dos antimicrobianos nos peixes provocavam efeito sobre a seleção de bactérias resistentes procedeu-se a avaliação da resistência bacteriana.

Os gêneros de bactérias identificados nas tilápias do Nilo foram: *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Pasteurella*, *Streptococcus*, *Gemella*, *Aeromonas*, *Aerococcus*, *Klebsiella*, *Plesiomonas* e *Lactococcus*. Com base no perfil de resistência antimicrobiana das cepas foi calculada a resistência múltipla aos antibióticos (MAR), que variou entre 0 e 0,86, ou seja, cepas sensíveis a 100% e outras resistentes a 86% dos antimicrobianos testados (Tabela 22).

No mês de abril de 2013 foram isoladas bactérias de todas as pisciculturas amostradas e, somente duas cepas apresentaram resistência às sulfonamidas.

No mês de julho de 2013 não foram isoladas bactérias nos peixes da Piscicultura 1. Pela presença de resíduo de OTC nos peixes (Tabela 21), nota-se que tais exemplares foram tratados com este antimicrobiano e, possivelmente, este tratamento foi eficiente no controle das bactérias da Piscicultura 1. Por outro lado, na Piscicultura 4, que também fez o uso da mesma molécula de antimicrobiano (Tabela 11), foram isoladas oito cepas de bactérias de peixes dos três diferentes tamanhos,

sendo três dessas cepas resistentes à tetraciclina e sete delas resistentes às sulfonamidas. Este resultado indica a seleção de cepas resistentes à OTC e a ineficiência deste tratamento no controle das bacterioses.

Em outubro de 2013 foram isoladas bactérias somente da Piscicultura 3, que não fazia uso de tratamento com antimicrobiano neste período. Das cepas isoladas, quase a totalidade não apresentou resistência a qualquer antimicrobiano testado, exceto a cepa de *Lactococcus lactis*, classificada com o maior valor de MAR (86%), indicando que é uma bactéria resistente a 86 % das moléculas de antimicrobiano testadas.

No mês de janeiro de 2014, novamente identificou-se o tratamento dos peixes pequenos com OTC na Piscicultura 4, devido a presença de resíduos de antimicrobianos nas amostras analisadas (Tabela 21) e, dos peixes tratados (peixes pequenos), foram isoladas sete cepas de bactérias, sendo a maioria do gênero *Aeromonas*, conhecida por causar a septicemia hemorrágica em peixes de cultivo (COSTA, 2003). Dessas sete cepas isoladas dos peixes pequenos, duas delas foram resistentes à tetraciclina, reforçando a hipótese de seleção de cepas resistentes nesta piscicultura.

Pela análise da Tabela 11 nota-se que, apesar de todas as pisciculturas serem de produção de tilápias em tanques-rede, cada uma possui suas peculiaridades em relação ao total de peixes produzidos, manejo adotado, tamanho dos tanques, além das características locais, como taxa de renovação da água, profundidade do braço, direção da corrente, etc. Todos estes fatores podem interferir na eficiência do tratamento utilizado com antimicrobianos, na dispersão dos resíduos e em sua degradação no meio aquático e, conseqüentemente, na seleção de cepas resistentes aos tratamentos.

Dos peixes analisados, quanto maior o tamanho do peixe, maior o MAR, podendo indicar que o maior tempo de permanência no ambiente de cultivo favorece a resistência bacteriana (Figura 11).

Tabela 22 - Perfil de resistência aos antimicrobianos e resistência múltipla a antibióticos (MAR) de bactérias isoladas de rim cefálico de tilápias do Nilo

Data	Amostra	Bactéria	Norfloxacina	Ciprofloxacina	Tetraciclina	Enrofloxacina	Sulfonamidas	Cloranfenicol	Florfenicol	MAR
abr/13	P1	PP	<i>Pseudomonas luteola</i>	S	S	S	S	S	S	0,00
	P2	PG	<i>Pseudomonas luteola</i>	S	S	S	S	S	S	0,00
	P2	PG	não identificada	S	S	S	S	S	S	0,00
	P3	PP	<i>Burkholderia cepacia</i>	S	S	S	S	R	S	0,14
	P3	PM	<i>Pasteurella sp</i>	S	S	S	S	S	S	0,00
	P3	PG	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	I	S	S	S	S	S	0,14
	P4	PP	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	S	S	S	S	R	S	0,29
	P4	PM	<i>Pseudomonas luteola</i>	S	S	S	S	S	S	0,00
	jul/13	P2	PM	<i>Streptococcus agalactiae</i>	S	S	S	S	R	S
P2		PM	<i>Streptococcus agalactiae</i>	S	S	S	S	R	S	0,14
P3		PP	<i>Aerococcus viridans</i>	S	S	S	S	S	S	0,00
P3		PP	<i>Klebsiella sp</i>	S	S	S	S	S	S	0,00
P3		PM	<i>Streptococcus sp.</i>	I	I	S	I	R	S	0,57
P3		PG	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	S	S	R	S	R	S	0,29
P4		PP	<i>Streptococcus agalactiae</i>	S	S	S	S	R	S	0,14
P4		PP	<i>Gemella haemolyans</i>	S	S	S	S	R	S	0,14
P4		PP	<i>Aeromonas sp</i>	S	S	R	S	S	S	0,14
P4		PM	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	S	S	R	S	R	S	0,29
P4		PG	<i>Gemella haemolyans</i>	S	S	S	I	R	S	0,29
P4		PG	<i>Gemella haemolyans</i>	I	R	R	I	R	S	0,71
P4	PP	<i>Streptococcus agalactiae</i>	S	S	S	S	R	S	0,14	
P4	PG	<i>Streptococcus agalactiae</i>	S	S	S	S	R	S	0,14	

Data	Amostra	Bactéria	Norfloxacina	Ciprofloxacina	Tetraciclinas	Enrofloxacina	Sulfonamidas	Cloranfenicol	Florfenicol	MAR	
out/13	P3	PM	<i>Lactococcus lactis</i>	S	S	S	S	S	S	0,00	
	P3	PG	<i>Lactococcus sp</i>	S	S	S	S	S	S	0,00	
	P3	PG	<i>Aerococcus viridans 2</i>	S	S	S	S	S	S	0,00	
	P3	PG	<i>Aeromonas sp</i>	I	S	S	S	I	S	0,29	
	P3	PG	<i>Lactococcus lactis</i>	R	R	R	I	S	I	0,86	
jan/14	P4	PP	<i>Aeromonas sp.</i>	S	S	S	S	I	S	S	0,14
	P4	PP	<i>Aeromonas sp.</i>	S	S	R	S	R	S	S	0,29
	P4	PP	<i>Aeromonas sp.</i>	S	S	S	S	R	S	S	0,14
	P4	PP	<i>Serratia liquefaciens</i>	S	S	S	S	R	S	S	0,14
	P4	PP	<i>Aeromonas sp.</i>	S	S	R	S	R	S	S	0,29
	P4	PP	<i>Aeromonas sp.</i>	S	S	S	S	R	S	S	0,14
	P4	PP	<i>Aeromonas sp.</i>	S	S	S	S	R	S	S	0,14
	P4	PM	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	S	S	S	S	R	S	S	0,14
	P4	PG	<i>Serratia phlymuthica</i>	S	S	S	S	R	S	S	0,14
Frequência de cepas resistentes			11,11	8,33	16,67	13,89	61,11	5,56	2,78		

R= resistente; S= suscetível; I= intermediária

MAR= Resistência Múltipla aos Antibióticos

P1 – Piscicultura 1; P2 – Piscicultura 2; P3 – Piscicultura 3; P4 – Piscicultura 4; PP - peixe pequeno (até 100 g), PM – peixe médio (até 500 g), PG – peixe grande (até 900g).

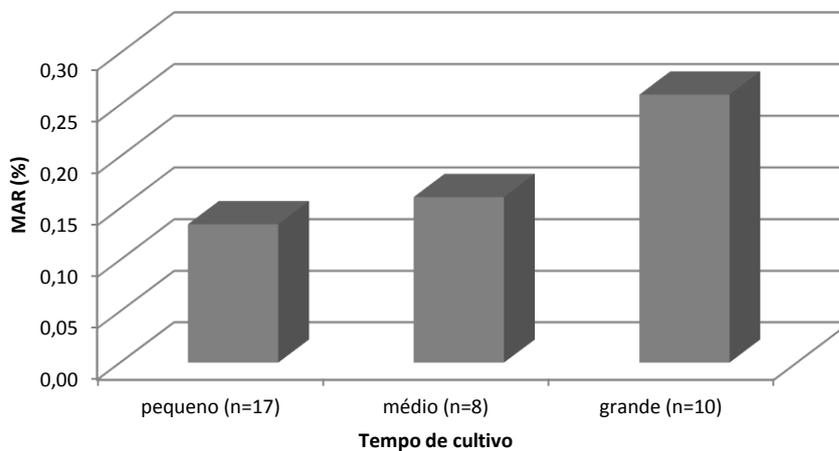


Figura 11 – Índice de resistência múltipla aos antibióticos (MAR) de cepas de bactérias isoladas de tilápias do Nilo de diferentes tempos de cultivo

Quando as avaliações foram iniciadas, em abril de 2013, o MAR foi menor que 0,10. Nas avaliações de julho e outubro de 2013 o MAR foi maior que 0,20, no mês de janeiro de 2014 o valor de MAR foi intermediário. Tal aumento na resistência frente aos antimicrobianos testados não foi influenciado pelo número de bactérias isoladas em cada mês (valores de n) (Figura 12). Os maiores valores de MAR foram para os meses do período de inverno, onde a profilaxia é intensificada.

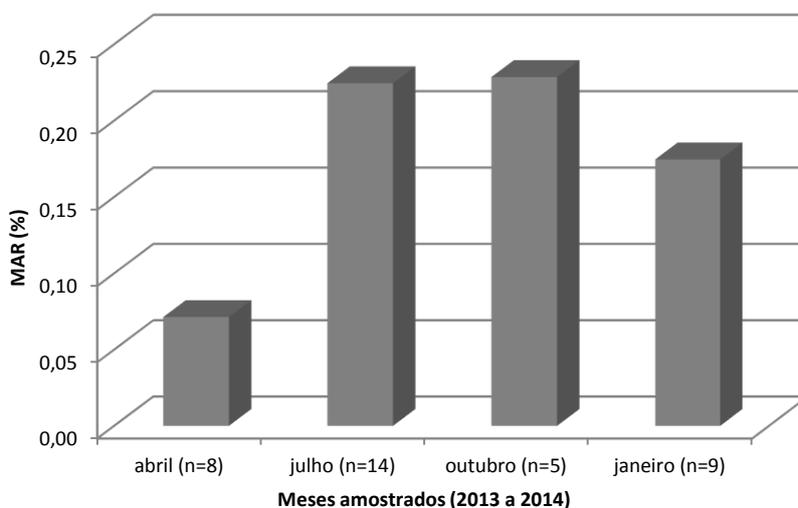


Figura 12 - Índice de resistência múltipla aos antibióticos (MAR) de cepas de bactérias isoladas de tilápias do Nilo ao longo de um período de um ano

Os valores de MAR variaram de 0 a 0,19 entre as pisciculturas amostradas (Figura 13). Esta variação pode ser causada por inúmeros fatores, dentre eles, o manejo profilático e terapêutico adotado por cada piscicultura, bem como a interferência do entorno das pisciculturas (pecuária, uso de medicamentos antimicrobianos, conservação do solo, declividade, etc.) que interferem diretamente na presença de resíduos de antimicrobianos na água e sedimento. Os maiores valores de MAR foram observados nas pisciculturas onde foi isolado o maior número de cepas (Pisciculturas 3 e 4). Em teoria, como todas as pisciculturas fazem uso de antimicrobianos, o tratamento, associado às boas práticas de manejo, deve estar sendo mais eficiente nas pisciculturas onde o número de bactérias isoladas e o MAR foram menores (Pisciculturas 1 e 2). Lembrando que na Piscicultura 2 não foram feitas amostragens de peixes nas coletas de outubro de 2013 e janeiro de 2014.

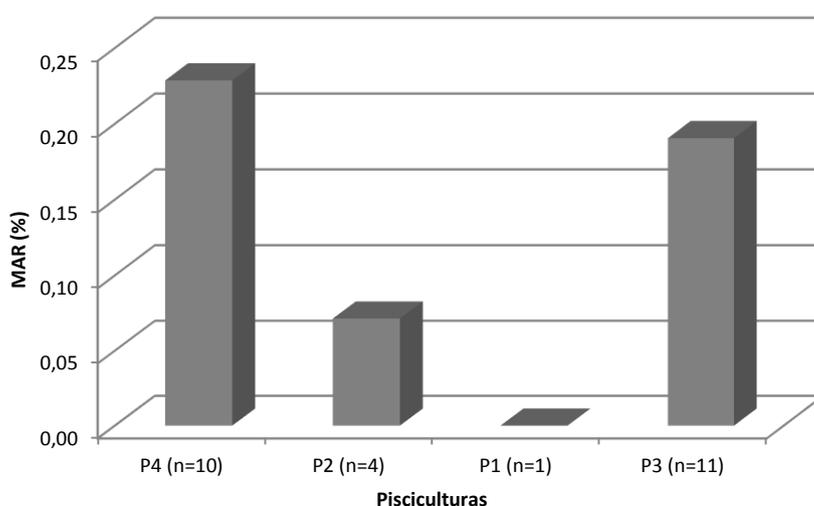


Figura 13 - Índice de resistência múltipla aos antibióticos (MAR) de cepas de bactérias isoladas de tilápias do Nilo de diferentes pisciculturas no Reservatório de Ilha Solteira

De acordo com a quantificação de resíduos de antimicrobianos nos peixes (Tabela 21), nota-se que a Piscicultura 1, que apresentou o menor valor de MAR, faz uso intercalado de dois antimicrobianos com registro para aquicultura, a OTC e o FF, além de adotar outras boas práticas de manejo como uso de banhos de cloreto de sódio para prevenção de ectoparasitos, redução na densidade de estocagem no período mais crítico (verão) e a aplicação de vacina contra o *Streptococcus agalactiae*

(Tabela 11). Estas práticas associadas levam ao sucesso sanitário da propriedade, resultando em baixa taxa de mortalidade evidenciando a sustentabilidade da produção.

As bactérias do gênero *Aerococcus* apresentaram menores valores de MAR enquanto as *Gemellas* demonstraram maiores valores deste índice. Ambas não são relacionadas a surtos de enfermidades em tilápias do Nilo. Por outro lado, as bactérias que apresentaram MAR intermediário são relacionadas a surtos de enfermidade em tilápias do Nilo (Figura 14). As *Aeromonas* apresentaram resistência a TCs e a sulfonamidas e foram intermediárias para NOR e CAP. As *Pseudomonas* foram resistentes às sulfonamidas e intermediárias para NOR. Das bactérias isoladas por Akinbowale, Peng e Barton (2006) de fontes aquiculturais na Austrália, 41% das *Aeromonas* foram resistentes a TC, 45,5% foram resistentes a OTC e menos de 5% resistentes ao FF. Para as *Pseudomonas* das três espécies isoladas, duas foram resistentes ao FF e CAP e uma resistente a TCs.

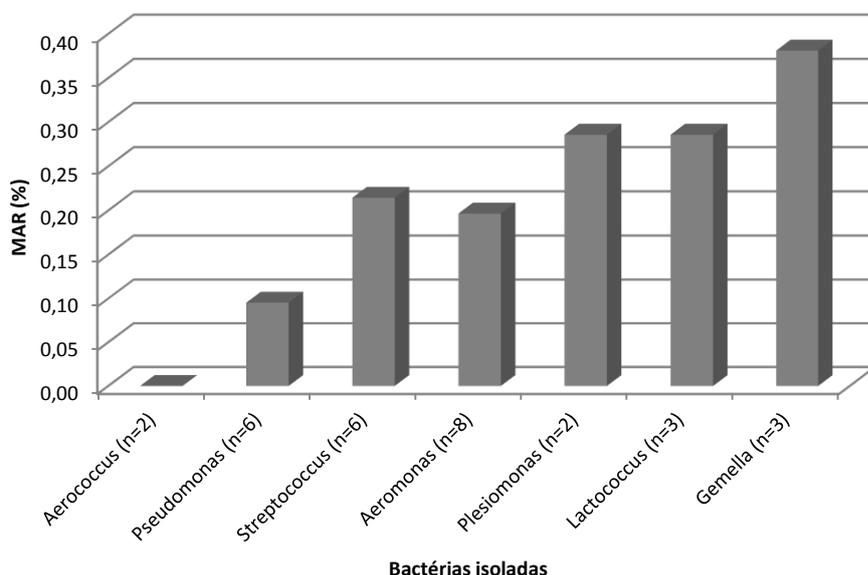


Figura 14 - Índice de resistência múltipla aos antibióticos (MAR) de cepas de bactérias isoladas de tilápias do Nilo

Dos antimicrobianos avaliados, os utilizados no manejo das pisciculturas são a OTC e/ou o FF (Tabela 11). O grupo das sulfonamidas foi o que mais apresentou cepas de bactérias resistentes, seguido pelo das tetraciclinas que tem a OTC como um dos antimicrobianos mais usados nas pisciculturas para terapia e profilaxia dos peixes. Do total das bactérias isoladas por Akinbowale et al. (2006), 16,4% apresentaram resistência à TC e 19,2% à OTC.

Estudos levantados por Sapkota et al. (2008) sugerem que o aparecimento de bactérias resistentes esteja relacionado com a utilização de antimicrobianos na aquicultura. Em um dos estudos realizado em lagoas do sudeste dos Estados Unidos, as bactérias gram-negativas isoladas (predominantemente *Plesiomonas shigelloides* e *Aeromonas hydrophila*) da aquicultura em tanques tratados com antimicrobianos mostraram-se mais resistentes à tetraciclina, oxitetraciclina, cloranfenicol, ampicilina e nitrofurantoína do que as bactérias isoladas de rios não tratados. Em outro estudo apontado por Sapkota et al. (2008), realizado em viveiros de camarão localizados nas Filipinas, os pesquisadores descobriram que a prevalência de resistência a vários antimicrobianos por *Vibrio spp* foi maior em viveiros de camarão, onde o ácido oxolínico foi administrado, do que em tanques onde não foram utilizados antimicrobianos. Sapkota et al. (2008) ainda citam a ocorrência de bactérias resistentes antes e após a introdução de antimicrobianos e, como exemplo, citam o caso no Reino Unido onde a amoxicilina que não foi utilizada na aquicultura até 1990 e, portanto, *Aeromonas salmonicida* isoladas e recolhidas de ambientes aquiculturais antes de 1990 foram sensíveis a amoxicilina. No entanto, cepas resistentes à amoxicilina foram isoladas durante um surto de furunculose que ocorreu alguns anos após a introdução de amoxicilina.

Por se tratar de uma molécula com registro recente para uso na aquicultura no Brasil, o FF, apesar de utilizado em duas das pisciculturas, não causou resistência nas bactérias isoladas. Porém, bactérias patogênicas a humanos com resistência ao FF já foram relacionadas a doenças. Evidências moleculares e epidemiológicas demonstraram resistência a antimicrobianos para *Salmonella enterica* sorotipo *Typhimurium* DT104, um patógeno emergente e a causa de vários surtos de salmonelose em humanos e animais na Europa e nos EUA, que provavelmente teve origem em ambientes aquícolas do extremo oriente. Os determinantes de resistência a antimicrobianos de *S. typhimurium* DT104 foram codificados com um elemento

genético transmissível no cromossomo, que contém um gene de resistência para o FF, extensivamente utilizado na aquicultura no extremo oriente. Este determinante florfenicol, o “floR”, foi detectado pela primeira vez em peixe no patógeno *Vibrio damsela*, em 1999 (CABELLO, 2006).

A epidemiologia de *S. typhimurium* DT104 também sugere que este patógeno pode ter sido transmitido por farinha de peixe, como já aconteceu com a *Salmonella agona* que se originou no Peru há vários anos. Este processo ilustra o potencial papel de transporte de bactérias resistentes aos antimicrobianos, como um mecanismo alternativo responsável pela propagação de resistência a antimicrobianos no meio aquático para o ambiente terrestre. Outros estudos levantados por Cabello (2006) sugerem que o desenvolvimento de resistência bacteriana a antimicrobianos, em ambientes de aquicultura, podem contribuir ou influenciar a resistência a antimicrobianos de bactérias que ocorrem entre as populações humanas. A resistência ocorre pela troca de genes resistentes aos antimicrobianos entre bactérias da aquicultura e bactérias no ambiente terrestre, incluindo bactérias de animais e bactérias patogênicas ao homem.

O presente estudo revelou grande resistência das bactérias aos antimicrobianos das classes das sulfonamidas e quinolonas, porém não foi evidenciada a utilização destes antimicrobianos nas pisciculturas e nem mesmo foi encontrado resíduos desses antimicrobianos nas amostras de água, sedimento e peixe analisadas. A utilização desses antimicrobianos é bastante conhecida e comum na criação de gado e na avicultura em diversos países (REGITANO; LEAL, 2010). O uso de fármacos na aquicultura e no trato intensivo de criações animais (bovinos, suínos e aves) representa a principal via de entrada de antimicrobianos no ambiente, podendo ocasionar a contaminação de ambientes aquáticos e terrestres. Nas criações animais, os antimicrobianos podem atingir diretamente o ambiente por meio das excreções dos animais em pastejo ou, então, podem ser indiretamente disseminados ao ambiente pela aplicação de esterco animal no solo (REGITANO; LEAL, 2010).

Conforme levantado por Caumo et al. (2010) estudos têm demonstrado que o próprio meio ambiente funciona como um grande reservatório de genes de resistência a antimicrobianos. A resistência a antimicrobianos tem sido observada em vários ambientes aquáticos incluindo rios e áreas costeiras, esgoto doméstico, esgoto hospitalar, sedimentos, águas superficiais, lagos, oceanos e água potável, bem como

em solos. Segundo Caumo et al. (2010) mais de 90% dos isolados bacterianos originados da água do mar são resistentes a pelo menos um antimicrobiano e 20% a pelo menos cinco. As sulfonamidas foram os primeiros quimioterápicos sistêmicos utilizados eficazes na prevenção e cura de infecções bacterianas em seres humanos, a utilização das quinolonas também datam a partir dos anos 70 e é comum, portanto supor a existência de resistência das bactérias para esses antimicrobianos.

Como observado na Figura 15 é bastante comum a prática pecuária em toda a margem da represa da usina hidroelétrica de Ilha Solteira e, também, a presença do homem em instalações bem próximas às pisciculturas. Muito provavelmente a presença de bactérias resistentes às sulfonamidas e quinolonas são provenientes de outras fontes pecuárias e até mesmo de atividades antropogênicas.



(A)

Foto: Sérgio Henrique Monteiro



(B)

Foto: Sérgio Henrique Monteiro



(C)

Google Maps: (<https://www.google.com.br/maps/place/Santa+F%C3%A9+do+Sul/@-20.2555504,-50.9829377,974m/data=!3m1!1e3!4m2!3m1!1s0x9499c14e0fbfe3df:0x863fa05660b320fb>)

Figura 15 – Evidências de atividades antropogênicas (A) e criação de gado (B) as margens da represa, bem próximos aos tanques de criação de peixes (C).

5 CONCLUSÕES

As pisciculturas estudadas possuem diferentes números e tamanho variado de tanques-rede, produzem exclusivamente tilápia do Nilo e possuem manejo particular para prevenção e controle de doenças; que inclui o uso regular dos antimicrobianos OTC e FF.

Um método rápido utilizando SPE-*online* com um sistema LC-MS/MS foi desenvolvido e validado para a determinação de 12 antimicrobianos em água e sedimento.

A metodologia utilizada no preparo da amostra foi simples, com economia de tempo e mão de obra. Portanto, pode ser considerada uma ferramenta valiosa para uso na monitorização de rotina destes compostos em água e sedimento.

O método desenvolvido para a determinação de antimicrobianos em músculo de tilápia foi simplificado pelo uso dos cartuchos Captiva e apresentou exatidão, precisão e sensibilidade, permitindo a identificação e quantificação dos antimicrobianos na faixa de partes por bilhão.

Os antimicrobianos OTC, TC e FF foram detectados em amostras de água de diferentes pisciculturas em épocas do ano distintas, e foi observada uma diminuição bastante acentuada nas concentrações em amostras coletadas a jusante do rio à medida que se distanciou das pisciculturas. Os antimicrobianos foram determinados em todas as coletas, demonstrando que a profilaxia é realizada durante todo o ano. Nenhum outro antimicrobiano foi detectado, demonstrando que a região está sofrendo contaminação das águas em decorrência da atividade aquícola.

Os antimicrobianos encontrados no sedimento foram OTC, TC e CTC, todos do grupo das tetraciclinas e provavelmente todos provenientes da OTC utilizada. Observou-se claramente o aumento na quantidade de OTC no sedimento na piscicultura que fazia uso recorrente deste antimicrobiano e uma diminuição nas outras, sugerindo uma diminuição ou até mesmo a descontinuidade de uso no período do estudo.

A presença de OTC e FF nos peixes está diretamente relacionada à sua aplicação para controle e/ou prevenção de enfermidades e, dependendo do manejo adotado pela piscicultura, verificou-se a seleção de bactérias resistentes à OTC.

Das 126 amostras de peixe analisadas nenhuma amostra, destinada ao consumo (peixe com aproximadamente 900 g), continha resíduo de antimicrobianos acima dos limites estabelecidos.

A utilização contínua de antimicrobianos levou a seleção de bactérias resistentes, como observado pela seleção de bactérias resistentes as tetraciclinas.

O florfenicol apesar de ser amplamente utilizado e ter sido observado resíduo nas amostras analisadas, não apresentou bactérias resistentes, até o momento.

As bactérias resistentes as sulfonamidas e quinolonas se devem provavelmente a atividades antropogênicas e pecuárias existentes na região.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi encontrado resíduos de antimicrobianos em água, sedimento e musculo de Tilápia do Nilo e comprovada a seleção de resistência microbiana em pisciculturas do reservatório da usina hidrelétrica de Ilha Solteira no estado de São Paulo. Os resultados demonstram que a atividade aquícola na região está tendo efeito no ambiente e no alimento ali produzido, e pode vir a produzir efeitos deletérios. Porém uma atividade sustentável, como observado por uma das pisciculturas, demonstra que a atividade pode ser praticada sem afetar negativamente o ambiente e o homem.

Contínuos estudos para avaliar a presença de antimicrobianos nos compartimentos aquaculturais e a verificação da resistência bacteriana devem ser realizados para assegurar a saúde do homem e de todo o ambiente. Assim como campanhas educativas juntos aos piscicultores para promover uma produção aquícola sustentável.

REFERÊNCIAS

AKINBOWALE, O.; PENG, H.; BARTON, M. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, n. 5, p. 1103-1113, 2006.

ANDERSON, C. R.; RUPP, H. S.; WU, W.-H. Complexities in tetracycline analysis-chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1075, n. 1-2, p. 23-32, 2005.

ANUMOL, T.; MEREL, S.; SNYDER, S. On-line SPE coupled to LC MS/MS for rapid, sensitive, and simultaneous analysis of multiple PPCPs in water. In: New Orleans ACS National Meeting, 2013, New Orleans. **Abstracts...**Washington, DC: ACS, 2013. Env 101.

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**, Washington, DC, v. 77, n. 9, p. 2940-2947, 2005.

BERENDSEN, B.; STOLKER, L.; NIELEN, M. Selectivity in the sample preparation for the analysis of drug residues in products of animal origin using LC-MS. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 43, p. 229-239, 2013.

BOYD, C. Guidelines for aquaculture effluent management at the farm-level. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 226, n. 1-4, p. 101-112, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal (PNCRC/Vegetal)**. Brasília, DF, 2009. 23 p.

_____. Instrução Normativa nº17, de 29 maio de 2013. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 31 maio 2013, nº 103, Seção 1, p. 6.

_____. **Produtos veterinários**. Brasília, DF, 2013. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/produtos-veterinarios>>. Acesso em: 29 jan. 2014.

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

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**. Brasil - 2010. Brasília, DF, 2012. 128 p.

CABELLO, F. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 7, p. 1137-1144, 2006.

CANADA-CANADA, F.; DE LA PENA, A.; ESPINOSA-MANSILLA, A. Analysis of antibiotics in fish samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 395, n. 4, p. 987-1008, 2009.

CARRASCHI, S. P. et al. Acute toxicity and environmental risk of oxytetracycline and florfenicol antibiotics to pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 115-122, 2011.

CHAFER-PERICAS, C. et al. Multiresidue determination of antibiotics in aquaculture fish samples by HPLC-MS/MS. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 41, n. 9, p. e217-e225, 2010.

CHOI, K. et al. Determination of antibiotic compounds in water by on-line SPE-LC/MSD. **Chemosphere**, Oxford, v. 66, n. 6, p. 977-984, 2007.

COSTA, A. B. **Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica**. 2003. 54 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

COSTA, C. et al. Toxicity in aquatic environments: discussion and evaluation methods. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

COSTANZO, S.; MURBY, J.; BATES, J. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 51, n. 1-4, p. 218-223, 2005.

CRAVEDI, J.; CHOUBERT, G.; DELOUS, G. Digestibility of chloramphenicol, oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow-trout and influence of these antibiotics on lipid digestibility. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 60, n. 2, p. 133-141, 1987.

CRONIN, M. et al. Structure-based classification of antibacterial activity. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, Washington, DC, v. 42, n. 4, p. 869-878, 2002.

DE MENDOZA, J. et al. Validation of antibiotics in catfish by on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, Barking, v. 134, n. 2, p. 1149-1155, 2012.

DINH, Q. et al. Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC-MS/MS. **Talanta**, London, v. 85, n. 3, p. 1238-1245, 2011.

EUROPEAN COMMISSION. Council Regulation (EEC) No 2377/90 of 26 June 1990. Laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. **Official Journal of the European Communities**, Bruxelles, n. L 224, p. 1-8, 1990. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/reg_1990_2377/reg_1990_2377_en.pdf.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, Bruxelles, n. L 221, p. 8-36, 2002. Disponível em: <http://old.eu-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:221:0008:0036:EN:PDF>.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY - EMA. Committee for Veterinary Medicinal Products. **Maximum residue limit reports**. London, 2013. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/vet_mrl_search.jsp&mid=WC0b01ac058006488e. Acesso em: 08 ago. 2013.

EVAGGELOPOULOU, E.; SAMANIDOU, V. Development and validation of an HPLC method for the determination of six penicillin and three amphenicol antibiotics in gilthead seabream (*Sparus aurata*) tissue according to the European Union Decision 2002/657/EC. **Food Chemistry**, Barking, v. 136, n. 3-4, p. 1322-1329, 2013a.

_____. HPLC confirmatory method development for the determination of seven quinolones in salmon tissue (*Salmo salar* L.) validated according to the European Union Decision 2002/657/EC. **Food Chemistry**, Barking, v. 136, n. 2, p. 479-484, 2013b.

FAO. **State of world fisheries and aquaculture**. Rome, 2009.

_____. **State of world fisheries and aquaculture**. Rome, 2012. 230 p.

FERNANDEZ-TORRES, R. et al. Enzymatic-microwave assisted extraction and high-performance liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of selected veterinary antibiotics in fish and mussel samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 54, n. 5, p. 1146-1156, 2011.

FERRER, I.; THURMAN, E. Analysis of 100 pharmaceuticals and their degradates in water samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1259, p. 148-157, 2012.

FERRER, I.; ZWEIGENBAUM, J. A.; THURMAN, E. M. Analysis of 70 Environmental Protection Agency priority pharmaceuticals in water by EPA Method 1694. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, n. 36, p. 5674-5686, 2010.

GALLART-AYALA, H.; MOYANO, E.; GALCERAN, M. On-line solid phase extraction fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bisphenol A and its chlorinated derivatives in water samples. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, n. 21, p. 3511-3518, 2010.

_____. Analysis of bisphenols in soft drinks by on-line solid phase extraction fast liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 683, n. 2, p. 227-233, 2011.

GAO, L. et al. Occurrence, distribution and bioaccumulation of antibiotics in the Haihe River in China. **Journal of Environmental Monitoring**, London, v. 14, n. 4, p. 1248-1255, 2012.

GARCIA, F. et al. Stocking density of Nile tilapia in cages placed in a hydroelectric reservoir. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 410, p. 51-56, 2013.

GARCIA-GALAN, M.; DIAZ-CRUZ, M.; BARCELO, D. Determination of 19 sulfonamides in environmental water samples by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS). **Talanta**, London, v. 81, n. 1-2, p. 355-366, 2010.

_____. Occurrence of sulfonamide residues along the Ebro river basin Removal in wastewater treatment plants and environmental impact assessment. **Environment International**, New York, v. 37, n. 2, p. 462-473, 2011.

GARCIA-GALAN, M. et al. Application of fully automated online solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry for the determination of sulfonamides and their acetylated metabolites in groundwater. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 399, n. 2, p. 795-806, 2011.

GIBTAN, A.; GETAHUN, A.; MENGISTOU, S. Effect of stocking density on the growth performance and yield of Nile tilapia [*Oreochromis niloticus* (L., 1758)] in a cage culture system in Lake Kuriftu, Ethiopia. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 39, n. 13, p. 1450-1460, 2008.

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

GUARINO, A. W. S. et al. Limnological characteristics of an old tropical reservoir (Ribeirão da Lages Reservoir, RJ, Brazil). **Acta Limnologica Brasiliensia**, São Carlos, v. 17, n. 2, p. 129-141, 2005.

HALLING-SØRENSEN, B. et al. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - A review. **Chemosphere**, Oxford, v. 36, n. 2, p. 357-394, 1998.

HALLING-SØRENSEN, B.; SENDELØV, G.; TJØRNELUND, J. Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 42, n. 3, p. 263-271, 2002.

HEUER, O. et al. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 49, n. 8, p. 1248-1253, 2009.

HURTADO-SANCHEZ, M. C. et al. Rapid and sensitive on-line solid phase extraction-ultra high performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry analysis of pesticides in surface waters. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1305, p. 193-202, 2013.

ISHIDA, Y. et al. Molecular analysis of antimicrobial resistance in gram-negative bacteria isolated from fish farms in Egypt. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 72, n. 6, p. 727-734, 2010.

JONES, O.; VOULVOULIS, N.; LESTER, J. Potential ecological and human health risks associated with the presence of pharmaceutically active compounds in the aquatic environment. **Critical Reviews in Toxicology**, Boca Raton, v. 34, n. 4, p. 335-350, 2004. ISSN 1040-8444.

KAN, C.; MEIJER, G. The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed. **Animal Feed Science and Technology**, Amstefam, v. 133, n. 1-2, p. 84-108, 2007.

KARIN, C. et al. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 11, n. 16, p. 89-188, 2010.

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

KIM, S.-C.; CARLSON, K. Quantification of human and veterinary antibiotics in water and sediment using SPE/LC/MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 387, n. 4, p. 1301-1315, 2007.

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

KOPRUCU, K.; OZDEMIR, Y. Apparent digestibility of selected feed ingredients for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 250, n. 1-2, p. 308-316, 2005.

KUBTIZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. 1. ed. Jundiaí: Acqua Supre Com. Suprim. Aqüicultura Ltda, 2000.

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

_____. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part II. **Chemosphere**, Oxford, v. 75, n. 4, p. 435-441, 2009b.

LOPES, R. et al. Multiresidue determination of veterinary drugs in aquaculture fish samples by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 895, p. 39-47, 2012.

LUTZHOFT, H.; HALLING-SORENSEN, B.; JORGENSEN, S. Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 36, n. 1, p. 1-6, 1999.

LYKKEBERG, A. K. et al. Quantitative analysis of oxytetracycline and its impurities by LC-MS-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 325-332, 2004.

MALLASEN, M. et al. Water quality in cage system fish farm in Ilha Solteira Reservoir, SP. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 15-30, 2012.

MARAZUELA, M.; BOGIALLI, S. A review of novel strategies of sample preparation for the determination of antibacterial residues in foodstuffs using liquid chromatography-based analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 645, n. 1-2, p. 5-17, 2009.

MERCANTE, C. T. J. et al. Qualidade da água em pesque-pague da região metropolitana de São Paulo (Brasil): avaliação através de fatores abióticos (período seco e chuvoso). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2005.

MINELLO, M. et al. Evaluation of heavy metal availability in contaminated sediments from the Ilha Solteira hydroelectric dam on the Parana River at Ilha Solteira, SP, Brazil. **Fresenius Environmental Bulletin**, Freising, Germany, v. 19, n. 10, p. 2210-2214, 2010.

OUATTARA, N. et al. Aquaculture potential of the black-chinned tilapia, *Sarotherodon melanocheilus* (Cichlidae). Comparative study of the effect of stocking density on growth performance of landlocked and natural populations under cage culture conditions in Lake Ayame (Cote d'Ivoire). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 34, n. 13, p. 1223-1229, 2003.

PACHECO-SILVA, É.; SOUZA, J. R. D.; CALDAS, E. D. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 111-122, 2014.

POULIQUEN, H. et al. Comparison of water, sediment, and plants for the monitoring of antibiotics: a case study on a river dedicated to fish farming. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 28, n. 3, p. 496-502, 2009.

POZO, O. J. et al. Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1103, n. 1, p. 83-93, 2006.

REGITANO, J.; LEAL, R. Performance and environmental impact of antibiotics in animal production in Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, n. 3, p. 601-616, 2010.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; LOPEZ DE ALDA, M. J.; BARCELÓ, D. Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography–mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1152, n. 1–2, p. 97-115, 2007.

ROGSTAD, A. et al. Pharmacokinetic study of oxytetracycline in fish .1. absorption, distribution and accumulation in rainbow-trout in fresh-water. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 96, n. 3-4, p. 219-226, 1991.

ROJAS, A.; WADSWORTH, S. A review of cage culture: Latin America and the Caribbean. In: HALWART, M.; SOTO, D.; ARTHUR, J.R. (Ed.). **Cage aquaculture – Regional reviews and global overview**. Rome: FAO, 2007. p.70-100. (FAO Technical Paper, 498).

SADEGHI, S.; JAHANI, M. Selective solid-phase extraction using molecular imprinted polymer sorbent for the analysis of Florfenicol in food samples. **Food Chemistry**, Barking, v. 141, n. 2, p. 1242-1251, 2013.

SANDERSON, H. et al. Dissipation of oxytetracycline, chlortetracycline, tetracycline and doxycycline using HPLC-UV and LC/MS/MS under aquatic semi-field microcosm conditions. **Chemosphere**, Oxford, v. 60, n. 5, p. 619-629, 2005.

SAPKOTA, A. et al. Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities. **Environment International**, New York, v. 34, n. 8, p. 1215-1226, 2008.

SCHELSKE, C. Eutrophication: focus on phosphorus. **Science**, Washington, DC, v. 324, n. 5928, p. 722-722, 2009.

SEGURA, P. et al. Review of the occurrence of anti-infectives in contaminated wastewaters and natural and drinking waters. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 117, n. 5, p. 675-684, 2009.

SILVA, F. D. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. D. Principal components analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7., 2009, Reno, Nevada. **Proceedings...** St. Joseph: ASABE, 2009.

SILVIA DIAZ-CRUZ, M.; JESUS GARCIA-GALAN, M.; BARCELO, D. Highly sensitive simultaneous determination of sulfonamide antibiotics and one metabolite in environmental waters by liquid chromatography-quadrupole linear ion trap-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1193, n. 1-2, p. 50-59, 2008.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL - SINDAN. **Compêndio de produtos veterinários**. São Paulo: Med Vet, 2014. Disponível em: <<http://www.cpv.com.br/cpv/>>. Acesso em: 22 fev. 2014.

SPELTINI, A. et al. Analytical methods for the determination of fluoroquinolones in solid environmental matrices. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 30, n. 8, p. 1337-1350, 2011.

STEINBERG, C. Aerobic phosphorus release from shallow lake sediments. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 409, n. 21, p. 4640-4641, 2011.

STOOB, K. et al. Fully automated online solid phase extraction coupled directly to liquid chromatography-tandem mass spectrometry - Quantification of sulfonamide antibiotics, neutral and acidic pesticides at low concentrations in surface waters. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1097, n. 1-2, p. 138-147, 2005.

SUN, Q. et al. On-Line SPE Coupled with LC-APCI-MS for the Determination of Trace Explosives in Water. **Chromatographia**, New York, v. 73, n. 7-8, p. 631-637, 2011.

THIELE-BRUHN, S. et al. Sorption of sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particle-size fractions. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 33, n. 4, p. 1331-1342, 2004.

TONG, L. et al. Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. **Chemosphere**, Oxford, v. 74, n. 8, p. 1090-1097, 2009.

VAZQUEZ-ROIG, P. et al. Determination of pharmaceuticals in soils and sediments by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, n. 16, p. 2471-2483, 2010.

YANG, J. et al. Simultaneous determination of four classes of antibiotics in sediments of the Pearl Rivers using RRLC-MS/MS. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 408, n. 16, p. 3424-3432, 2010.

ZHOU, J. L.; KANG, Y. Matrix effect in high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of antibiotics in environmental water samples. **Journal of Separation Science**, New York, v. 36, n. 3, p. 564-571, 2013.

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

ZHOU, L. et al. Simultaneous determination of human and veterinary antibiotics in various environmental matrices by rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1244, p. 123-138, 2012.

_____. Trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in the sediments of the Yellow River, Hai River and Liao River in northern China. **Environmental Pollution**, London, v. 159, n. 7, p. 1877-1885, 2011.