

Desenvolvimento e validação do método de SPE-HPLC-UV para determinação e quantificação dos antibióticos em água.

Yuliya Logvina

Mestrado MA3Q

Departamento de Química e Bioquímica
2021

Orientador

Joaquim Carlos Gomes Esteves da Silva

Professor Catedrático,

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Coorientadores

Carlos Manuel de Melo Pereira

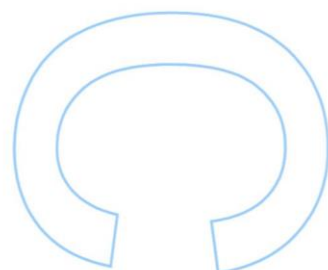
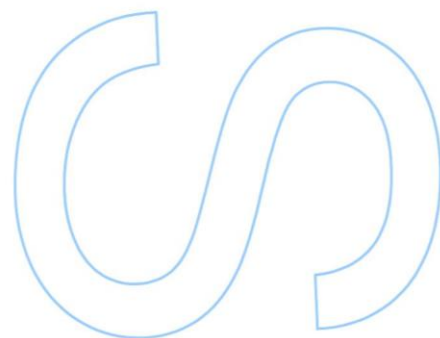
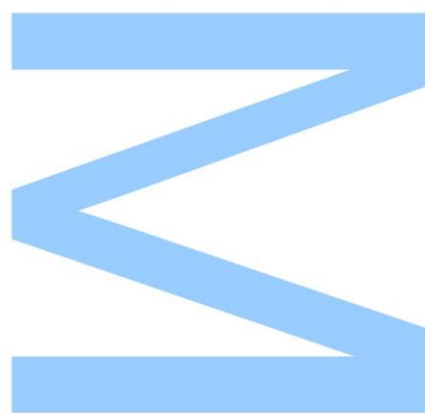
Professor Associado

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Luís Tiago da Costa Pinto da Silva

Investigador

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

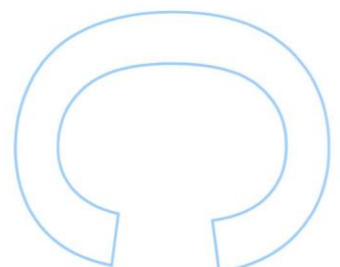
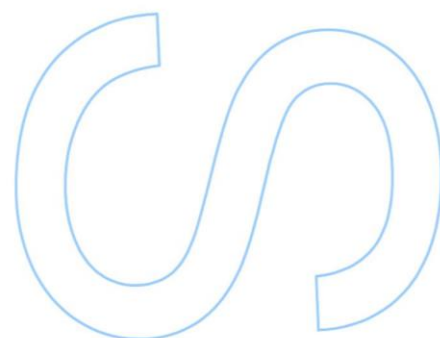
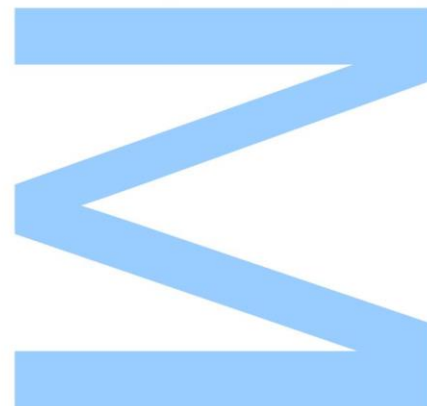




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



*"A primeira lei da ecologia é que tudo
está relacionado com o resto todo."*

Barry Commoner

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, queria expressar os meus infinitos agradecimentos à Universidade do Porto, que se tornou a minha segunda *Alma Mater*. Mas só as pessoas fazem, com que, esta Universidade se possa chamar uma das melhores na Europa. Aqui a comunidade académica traz a sua energia e a cada dia deixa as novas perspetivas e novas descobertas tornarem-se possíveis. Essas pessoas com toda paixão e carinho fazem o seu trabalho no seu dia a dia e vão ficar no meu coração para sempre.

Queria expressar a minha gratidão a todos que fizeram parte e contribuíram para o sucesso deste trabalho, que me orientaram, pelo apoio, interesse e disponibilidade, por toda a atenção, carinho e pela transmissão de conhecimentos durante o tempo em que estive na Faculdade de Ciências.

Ao **Professor Joaquim Carlos Gomes Esteves da Silva** pelo incentivo, orientação e ensinamentos e pela oportunidade dada para a realização desta tese.

Ao **Professor Carlos Manuel de Melo Pereira** por toda a confiança no meu trabalho, pelos conhecimentos transmitidos e pela dedicação.

Ao **Doutor Luís Tiago da Costa Pinto da Silva** pela presença e auxílio constantes, por sua ajuda, sempre tão importante e necessária.

Aos colegas do Mestrado de Química e MA3Q, CIQUP, DGAOT da Universidade do Porto pela contribuição a este trabalho e pelo apoio amigável.

À Fundação para Ciência e Tecnologia (FCT), nomeadamente pelo financiamento dos projetos UIDB/00081/2020, UIDB/05748/2020 e PTDC/QUI-QFI/2870/2020.

Ao Centro de Investigação em Química da Universidade do Porto (CIQUP), Departamento de Geociências, Ambiente e Ordenamento do Território da Universidade do Porto (DGAOT) agradeço por me terem facultado as condições e os materiais necessários para realização desta investigação.

A todos, por toda a compreensão, apoio incondicional, e todas as palavras que me ajudaram neste percurso da minha vida.

Obrigada!

RESUMO

Os antibióticos são um dos grupos mais importantes de fármacos com função antibiológica amplamente utilizados para o tratamento e prevenção de doenças infecciosas em humanos, aquacultura e medicina veterinária. Devido à sua remoção ineficiente por estações de tratamento de água residual convencionais, eles são comumente detetados em amostras de água em concentrações baixas (ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$), e podem causar efeitos tóxicos adversos em humanos e bioma. Devido à complexidade das matrizes das amostras de água, a quantificação de antibióticos em baixas concentrações na análise ambiental é muito desafiadora.

Neste trabalho, foi desenvolvido um procedimento para detecção e quantificação simultânea (*multi-test*) de quatro antibióticos em amostras de água: Ciprofloxacina, Metronidazol, Sulfametoxazol e Trimetoprim. Este procedimento baseia-se em análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - UV), após extração em fase sólida (SPE).

A separação dos 4 antibióticos de diferentes classes foi realizada com uma coluna Acclaim™ 120 C18, usando como fase móvel uma mistura de solução aquosa de acetato de amónio (8 mM), metanol, acetonitrilo e ácido acético (74 : 15 : 10 : 1; v/v). A eluição foi feita de modo isocrático com taxa de fluxo de $0,65 \text{ mL min}^{-1}$. As análises de SPE foram realizadas usando cartuchos Oasis® HLB 500 mg. O presente método apresentou boa linearidade para todos os antibióticos na gama das concentrações de $0,5 - 5,0 \text{ mg L}^{-1}$ (10 soluções-padrão, ensaios em triplicado), tendo-se obtidos coeficientes de correlação ($R^2 > 0,999$). Além disso, os limites de detecção (LD) e os limites de quantificação (LQ) dos antibióticos selecionados foram calculados. Os valores para LD (em ppm): Ciprofloxacina (CFX) - $0,13 \pm 0,05$; Metronidazol (MTZ) - $0,06 \pm 0,03$; Sulfametoxazol (SFX) - $0,11 \pm 0,04$; Trimetoprim (TMP) - $0,06 \pm 0,03$ e para LQ: CFX - $0,37 \pm 0,05$; MTZ - $0,17 \pm 0,03$; SFX - $0,33 \pm 0,04$ e TMP - $0,18 \pm 0,03$. As taxas de recuperação dos antibióticos, depois da preparação da amostra pela técnica SPE, variam num intervalo 80 - 103 %. Na análise de água do rio Douro foram encontrados os antibióticos CFX, SFX e TMP em quantidades de $0,05 \pm 0,19 \mu\text{g L}^{-1}$ (CFX); $0,30 \pm 0,18 \mu\text{g L}^{-1}$ (SFX); $0,83 \pm 0,23 \mu\text{g L}^{-1}$ (TMP).

Palavras-chave: SPE-HPLC, Antibióticos, Água Ambiental, Ciprofloxacina, Metronidazol, Sulfametoxazol, Trimetoprim, Imidazoicos, Fluoroquinolones, Pirimidinas, Sulfonamidas, Química Analítica, Validação.

ABSTRACT

Antibiotics is one of the most important groups of pharmaceuticals with antibiological function extensively used for treatment and prevention of infectious diseases in human, aquaculture and veterinary medicine. Due to their removal inefficiently by conventional wastewater treatment plants, they commonly detected in the aqueous environment at low levels (ng L^{-1} to $\mu\text{g L}^{-1}$) and may be sufficiently for cause adverse toxic effects of human and biome. Due the matrices complexity of water samples, antibiotic quantification at low concentrations in environmental analysing is very challenging.

In this work, optimized solid phase extraction (SPE) method using high performance liquid chromatography (HPLC-UV) have been developed for simultaneous (multi-test) detection and quantification analyse of Ciprofloxacin, Metronidazole, Sulfamethoxazole, Trimethoprim in water samples.

The separation of 4 antibiotics from different classes was performed by Acclaim™ 120 C18 column using mobile phases of 8 mM ammonium acetate aqueous solution, methanol, acetonitrile and acetic acid (74 : 15 : 10 : 1; v/v) by isocratic elution at a flow rate of 0.65 mL min^{-1} . The SPE analyses were carried out using Oasis® HLB 500 mg cartridges. The present method showed good linearity for all antibiotics in the concentration range of $0.5 - 5.0 \text{ mg L}^{-1}$ (10 standard solutions, tests in triplicate) and correlation coefficients ($R^2 > 0.999$) were obtained. Also, detection limits (LODs) and limits of quantification (LOQs) of the selected antibiotics were calculated. The values for LOD on ppm: Ciprofloxacin (CFX) – 0.13 ± 0.05 ; Metronidazole (MTZ) – 0.06 ± 0.03 ; Sulfamethoxazole (SFX) – 0.11 ± 0.04 ; Trimethoprim (TMP) – 0.06 ± 0.03 and for LOQ: Ciprofloxacin – 0.37 ± 0.05 ; Metronidazole – 0.17 ± 0.03 ; Sulfamethoxazole – 0.33 ± 0.04 e Trimethoprim – 0.18 ± 0.03 . Antibiotic recovery rates after sample preparation using the SPE technique range from 80 to 103%. In the analysis of the water of the Douro River, the antibiotics CFX, SFX and TMP were found in amounts of $0.05 \pm 0.19 \mu\text{g L}^{-1}$ (CFX); $0.30 \pm 0.18 \mu\text{g L}^{-1}$ (SFX); $0.83 \pm 0.23 \mu\text{g L}^{-1}$ (TMP).

Keywords: SPE-HPLC, Antibiotics, Environmental Water, Ciprofloxacin, Metronidazole, Sulfamethoxazole, Trimethoprim, Imidazoles, Fluoroquinolones, Pyrimidines, Sulfonamides, Analytical Chemistry, Validation.

ÍNDICE

	página
AGRADECIMENTOS	IV
RESUMO.....	V
ABSTRACT	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABELAS	XI
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	XII
ÍNDICE DE EQUAÇÕES	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 ENQUADRAMENTO	1
1.2 CONSUMO DOS ANTIBIOTICOS	1
1.3 ÁGUA E POLUIÇÃO.....	7
1.4 QUALIDADE DE ÁGUA E LEGISLAÇÃO.....	8
1.5 ANTIBIÓTICOS EM ESTUDO	10
1.6 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS EM ÁGUAS AMBIENTAIS ENCONTRADOS NA REVISÃO.....	14
2. OBJETIVOS	15
3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	16
3.1 MATERIAIS.....	16
3.1.1 Equipamentos e Software.....	16
3.1.2 Materiais.....	17
3.1.3 Reagentes e soluções	17
3.2 AMOSTRAS DE ÁGUA	18
3.3 MÉTODOS	19
3.3.1 Espectrofotometria UV-VIS.....	19
3.3.2 Cromatografia Líquida	20
3.3.3 Espetrometria de massa.....	22
3.3.4 Extração em Fase Sólida.....	23
3.4 VALIDAÇÃO.....	25
3.4.1 Seletividade e Especificidade	27
3.4.2 Linearidade.....	27

3.4.3 Limites (<i>Limite de Branco, Limite de Detecção; Limite de Quantificação</i>) ...	31
3.4.4 Sensibilidade	32
3.4.5 Precisão (<i>Repetibilidade, Reprodutibilidade, Precisão intermedia</i>)	33
3.4.6 Robustez	36
3.4.7 Exatidão	36
3.4.8 Controlo de qualidade (<i>ensaio de recuperação</i>).....	36
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	37
4.1 CONDIÇÕES OPERACIONAIS DA ESPETROSCOPIA UV-VIS.....	37
4.2 CONDIÇÕES OPERACIONAIS DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA.....	37
4.3 CONDIÇÕES OPERACIONAIS DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS	40
4.4 CONDIÇÕES OPERACIONAIS DE SPE	40
4.5 COLHEITA DA AMOSTRA DE ÁGUA.....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 ESPETROFOTOMETRIA UV-VIS	42
5.2 SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA	43
5.3 ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	46
5.4 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	46
5.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO	47
5.5.1 Linearidade.....	47
5.5.2 Avaliação dos Limites (<i>Detecção, Quantificação</i>)	50
5.5.3 Sensibilidade	50
5.5.5 Precisão (<i>Repetibilidade</i>).....	51
5.5.6 Controlo de qualidade (<i>ensaio de recuperação</i>).....	52
5.6 ANÁLISE DA AMOSTRA DE ÁGUA DO RIO DOURO	53
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ANEXO 1.....	63
ANEXO 2.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

página

Figura 1 – O consumo global dos antibióticos por classes em 2000 e 2010. (adaptado)[3]	2
Figura 2 – Farmacêuticos no meio ambiente – ocorrências. (adaptado)[4]	2
Figura 3 – Percentagem dos grupos terapêuticos farmacêuticos analisados em cada região das Nações Unidas. MEC = concentração ambiental medida; EEG = Grupo da Europa Oriental; GRULAC = Estados da América Latina e Caribe; WEOG, Grupo da Europa Ocidental e Outros. (adaptado)[4]	3
Figura 4 – Produtos farmacêuticos identificados em trabalhos científicos encontrados na literatura três ou mais vezes. A linha vermelha tracejada mostra o número 3 que foi considerado como o nível da priorização. (adaptado)[5]	5
Figura 5 – Previsão mundial do crescimento de setor farmacêutico entre 2017 e 2030 por país. A estatística basea-se na relação confirmada de PIB e despesas nos fármacos para uma pessoa. (adaptado)[6]	6
Figura 6 – Atividades antropogénicas que contribuem para a poluição ambiental (difusa e pontual). (adaptado)[12]	7
Figura 7 – Administrações Regionais Hidrográficas e regiões hidrográficas de Portugal. (adaptado)[27]	9
Figura 8 – Estruturas químicas das moléculas dos antibióticos: a) CFX, b) MTZ, c) SFX e d) TMP. [70]	11
Figura 9 – Colheita de amostra diretamente com o recipiente. (adaptado)[37]	19
Figura 10 – Esquema representa o princípio de ação de um espectrofotómetro UV-VIS. (adaptado)	20
Figura 11 – Esquema da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). (adaptado)[43]	21
Figura 12 – Esquema geral do princípio de funcionamento de espetrometria de massa com os nomes dos métodos nas divisões empregados nela. (adaptado)	22

Figura 13 – Principais etapas da extração em fase sólida (SPE).adaptado[49]	24
Figura 14 – Formas de pré-tratamento das amostras, uso dos cartuchos em modo off-line: a) passagem com auxílio de seringa, b) kitazato e bomba de vácuo, c) <i>manifold</i> multibocal e bomba de vácuo.(adaptado)[51]	25
Figura 15 – Intervalos da concentração do analito de um método analítico. (adaptado)[45]	28
Figura 16 – Apresentação gráfica da regressão linear simples. (adaptado)[45]	30
Figura 17 – Ilustração dos limites: limite de branco (LB), limite de deteção (LD), e limite de quantificação (LQ). (adaptado)[59]	31
Figura 18 – Espectros UV-VIS dos antibióticos a) CFX, b) MTZ, c) SFX, d) TMP.....	42
Figura 19 – Cromatogramas dos antibióticos em separado e numa única solução...	44
Figura 20 – Cromatograma obtido para separação dos 4 antibióticos CFX, MTZ, SFX, TMP com os respetivos tempos de retenção.	45
Figura 21 – Espectros MS dos antibióticos: a) ciprofloxacina, b) sulfametoxazol, c) trimetoprim	46
Figura 22 – Retas de calibração obtidas por HPLC-UV dos 4 antibióticos; a) - CFX, b) - MTZ, c) - SFX, e d) - TMP.	48
Figura 23 – Os gráficos obtidos no teste das áreas normalizadas para o HPLC-UV dos antibióticos CFX, MTZ, SFX e TMP.	49
Figura 24 – Os cromatogramas da amostra de água do rio Douro: a) branco, b) 1ª adição padrão.....	53
Figura 25 – Retas de adição-padrão dos 4 antibióticos obtidas por HPLC-UV em análise da água do rio Douro;.....	54
Figura 26 – Reta de calibração obtida em análise por HPLC para CFX incluindo a concentração 0,001 ppm da solução-padrão.	68
Figura 27 – O gráfico obtido no teste das áreas normalizadas para o HPLC do antibiótico CFX, incluindo a concentração 0,001 ppm da solução-padrão.	68

ÍNDICE DE TABELAS

	página
Tabela 1 – Concentrações médias e máximas (mg L^{-1}) dos 16 produtos farmacêuticos encontrados em cada região das Nações Unidas em águas ambientais. (adaptado)[4]	4
Tabela 2 – Características físico-químicas e farmacocinéticas dos antibióticos CFX, MTZ, SFX e TMP. [70].....	13
Tabela 3 – Apresentação dos métodos de detecção dos antibióticos em águas ambientais encontrados em artigos científicos.	14
Tabela 4 – Material laboratorial usado no desenvolvimento do método.	17
Tabela 5 – Reagentes e soluções usados neste trabalho.	18
Tabela 6 – Condições cromatográficas testados em separação dos 4 antibióticos (CFX, MTZ, SFX, TMP).	38
Tabela 7 – Condições usadas para as análises de espectrometria de massa.	40
Tabela 8 – Condições cromatográficas para detecção/separação dos antibióticos CFX, MTZ, SFX, TMP nas soluções em separado.	43
Tabela 9 – Condições para separação cromatográfica dos antibióticos CFX, MTZ, SFX, TMP numa solução.	45
Tabela 10 – Os valores calculados para teste F, análise da homogeneidade das variâncias.	49
Tabela 11 – Os valores obtidos para os limites analíticos em ppm.	50
Tabela 12 – Os declives da sensibilidade da calibração por HPLC-UV dos CFX, MTZ, SFX e TMP.	51
Tabela 13 – Os resultados obtidos para repetibilidade dos CFX, MTZ, SFX e TMP.e avaliados pelo coeficiente de variação (CV)	51
Tabela 14 – Os valores médios das áreas obtidos nos ensaios de recuperação pela técnica SPE dos CFX, MTZ, SFX e TMP com as respetivas taxas calculadas.	52
Tabela 15 – Os volumes das soluções-padrão adicionados e as áreas obtidas por HPLC na análise da água.	53
Tabela 16 – Dados obtidos para as curvas de calibração dos antibióticos CFX, MTZ, SFX e TMP.	67
Tabela 17 – Dados para avaliação da homogeneidade de variâncias dos 4 antibióticos para análises por HPLC.	68
Tabela 18 – Dados para avaliação da precisão (repetibilidade) dos 4 antibióticos para análises por HPLC.	69

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A	Área
A _m	Amostra
ACN	Acetonitrilo
APA	Agência Portuguesa de Ambiente
b	Ordenada na origem
C	Concentração
CFX	Ciprofloxacina
CV	Coeficiente de variação
CVr	Coeficiente de variação de repetibilidade
DIN	Deutsches Institut für Normung (Instituto Alemão de Normalização)
DQA	Diretiva Quadro de Água
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EEG	Eastern European Group (Grupo de Europa Oriental)
EPA	Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)
ETARs	Estações de tratamento de água residual
F _{exp}	Valor F experimental calculado
F _{tab}	Valor F tabelado
FDA	Food and Drug Administration (Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos)
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
GC	Cromatografia Gasosa
gl	Grau de liberdade
GRULAC	Group of Latin America and the Caribbean (Estados da América Latina e Caribe)
HDPE	Polietileno de Alta Densidade
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
IMS	Intercontinental Marketing Services (Serviços de marketing intercontinental da saúde e serviço integrado de análise de dados multinacional)
IPAC	Instituto Português de Acreditação, I.P.
IPMA	Instituto Português do Mar e da Atmosfera

ISO	International Organization for Standardization (Organização Internacional de Normalização)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e Aplicada)
LB	Limite de Branco
LC	Cromatografia Líquida
LC-MS	Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massa
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
m	Declive
MECs	Measured Environmental Concentrations (Concentrações ambientais medidas)
MTZ	Metronidazol
ONU	Organização das Nações Unidas
PhACs	Pharmaceutically active compounds (Compostos farmacologicamente ativos)
PTFE	Politetrafluoroetileno
r	Limite da repetibilidade
SFX	Sulfametoxazol
SPE	(Solid Phase Extraction) Extração em Fase Sólida
Sr	Desvio padrão
UNICEF	United Nations International Children's Emergency Fund (O Fundo de Emergência Internacional das Nações Unidas para a Infância)
UV- VIS	Ultravioleta Visível
USP	US Pharmacopeia
VMA	Valor máximo admissível
VMR	Valor máximo recomendado
t	Valor de T- student
TMP	Trimetoprim
R ²	Coeficiente de correlação
RSD	Relative Standard Deviation (Desvio Padrão Relativo)
RNA	Ácido ribonucleico
WEOG	Western European and Others Group (Grupo de Europa Ocidental)
$\bar{x}$	Media das medições
y _m	Concentração mínima
y _M	Concentração máxima

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

página

$$s_m^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n_m} (y_{mi} - \bar{y}_m)^2}{n_m - 1}$$

Equação 1.....28

$$s_M^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n_M} (y_{Mi} - \bar{y}_M)^2}{n_M - 1}$$

Equação 2..... 29

$$Área\ normalizada = 100 \frac{A_i / C_i}{A_{100} / C_{100}}$$

Equação 3 30

$$y = mx + b$$

Equação 4 30

$$LD_s = b + 3,3 s_{y/x}$$

Equação 5..... 32

$$LQ_s = b + 10 s_{y/x}$$

Equação 6 32

$$LD_c = \frac{3,3}{m} s_{y/x}$$

Equação 7 32

$$LQ_c = \frac{10}{m} s_{y/x}$$

Equação 8 32

$$\Delta C = |C_2 - C_1| = 3\sqrt{2} s_c$$

Equação 9..... 33

$$\gamma = \frac{1}{s_c} = \frac{m}{s_s}$$

Equação 10 33

$$CV = Sr/\bar{x} * 100$$

Equação 11 33

$$s_{rpooled} = \sqrt{\frac{s_1^2 + s_2^2 + \dots + s_k^2}{k}}$$

Equação 12 34

$$s_{rpooled} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2 + \dots + (n_k - 1)s_k^2}{n_1 + n_2 + \dots + n_k - k}}$$

Equação 13 34

$$RDS_{rpooled} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)RDS_1^2 + (n_2 - 1)RDS_2^2 + \dots + (n_k - 1)RDS_k^2}{n_1 + n_2 + \dots + n_k - k}}$$

Equação 14 34

$$r = t(v, \alpha) * Sr$$

Equação 15 34

$$s_I = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}}$$

Equação 16 35

$$s_I = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2}{t(n - 1)}}$$

Equação 17 35

1. INTRODUÇÃO

1.1 ENQUADRAMENTO

O presente trabalho foi desenvolvido no âmbito da Tese do Mestrado em Métodos Avançados e Acreditação em Análise Química, nas instalações da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Esta tese tem como objetivo o desenvolvimento e validação do método de análise química para determinação simultânea de quatro antibióticos (Ciprofloxacina, Metronidazol, Sulfametoxazol, Trimetoprim) em amostras de água, pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, com uso da técnica Extração em Fase Sólida.

1.2 CONSUMO DOS ANTIBIOTICOS

É impossível sobrestimar a influência da descoberta dos antibióticos sobre a vida humana. A descoberta que tornou a vida mais longa e conseguiu combater muitas doenças mortais e drásticas conhecidas pela humanidade. No entanto, os antibióticos, a partir da descoberta da penicilina, feita pelo médico inglês Alexander Fleming em 1940, e a sua utilização no primeiro paciente humano, até hoje em dia, atingiu um enorme uso e aplicação. [1]

O consumo e uso dos antibióticos aumentaram drasticamente nos últimos anos, devido ao aumento contínuo da população, crescimento económico, aumento de despesas no setor médico, aumento de acessibilidade medicamentosa e também, aumento nas doses e tempo de tratamento devido à resistência dos antibióticos adquirida pelos microrganismos. [2]

No estudo, sobre consumo global dos antibióticos entre 2000 e 2010, que é o primeiro estudo desde 1987 a mapear e comparar a evolução do consumo dos antibióticos em escala global, em termos de número dos países que foram incluídos, foram revistas as tendências de consumo de unidades padrão (comprimido, cápsula) de antibióticos para 71 países. Foram usados os dados de vendas para farmácias e hospitais do banco de dados IMS Health MIDAS. O conjunto de dados analisados compreende 16 classes dos antibióticos, entre eles os Flouroquinolones e Trimetoprim (Figura 1). [3]

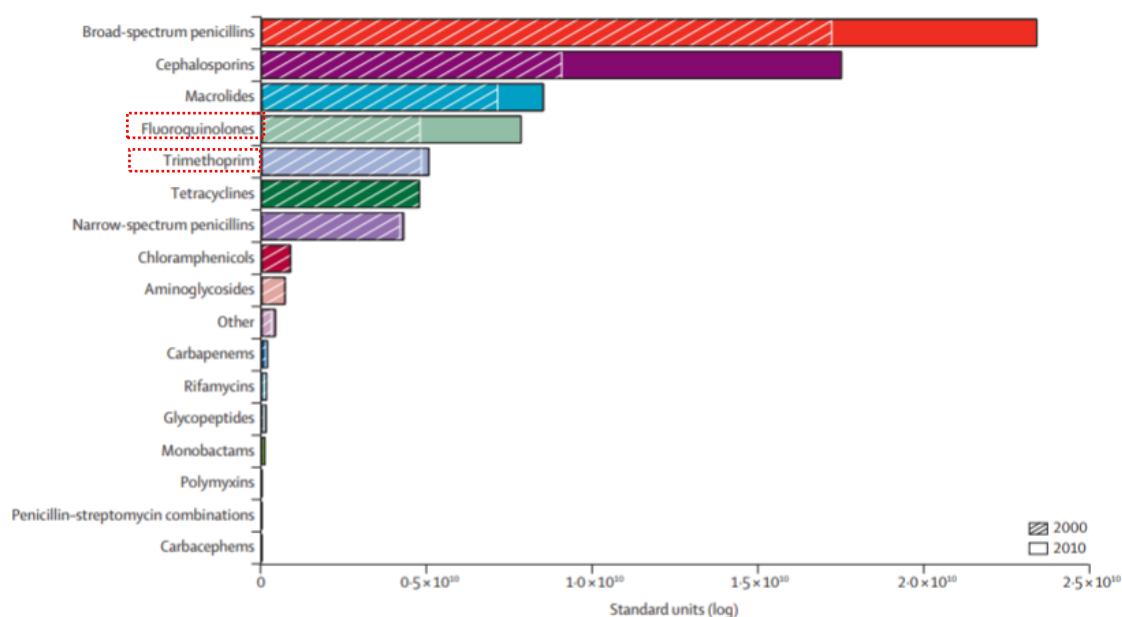


Figura 1 – O consumo global dos antibióticos por classes em 2000 e 2010. (adaptado)[3]

Entre 2000 e 2010, globalmente, o consumo de antibióticos aumentou 36% (de 54 083 964 813 para 73 620 748 816 unidades padrão). [3]

Numa outra revisão recente “*Pharmaceuticals in the environment - Global occurrences and perspectives*”, os autores, das 1 016 publicações originais e 150 artigos de revisão, recolheram os valores de concentrações ambientais medidos (MECs) para substâncias farmacêuticas humanas e veterinárias relatadas em todo o mundo em águas superficiais, subterrâneas, torneiras / água potável, esterco, solo e outras matrizes ambientais. Os dados revelam, que os produtos farmacêuticos ou seus produtos de transformação foram detetados no meio ambiente em 71 países de todos os continentes (Figura 2). [4]

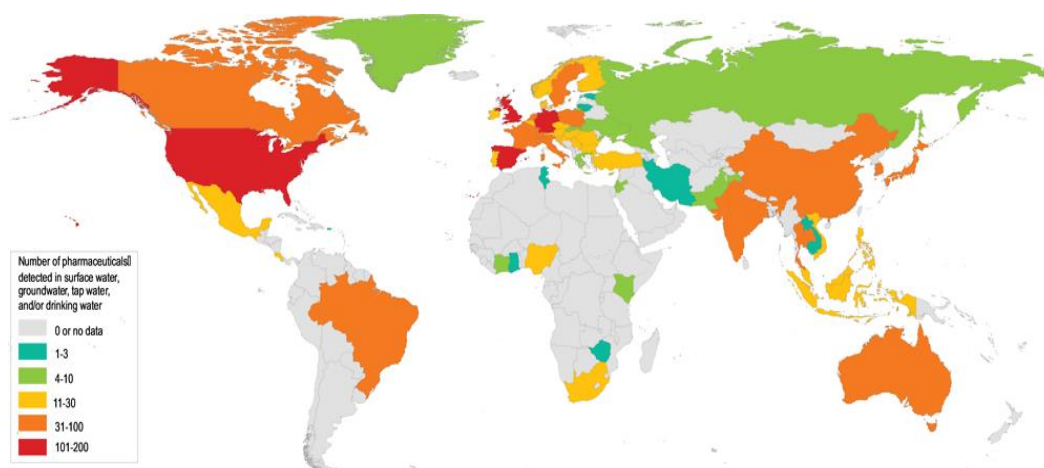


Figura 2 – Farmacêuticos no meio ambiente – ocorrências. (adaptado)[4]

Esses países foram então agrupados em 5 regiões reconhecidas pela Organização das Nações Unidas (ONU): EEG - Grupo da Europa Oriental; GRULAC - Estados da América Latina e Caribe; WEOG - Grupo da Europa Ocidental e Outros. No total, foram encontrados 631 fármacos distintos acima do limite de deteção dos respetivos métodos analíticos empregados. Os antibióticos pertencem aos grupos terapêuticos mais comumente analisados e na Europa Ocidental encontram-se em segundo lugar depois da Ásia (Figura 3). [4]

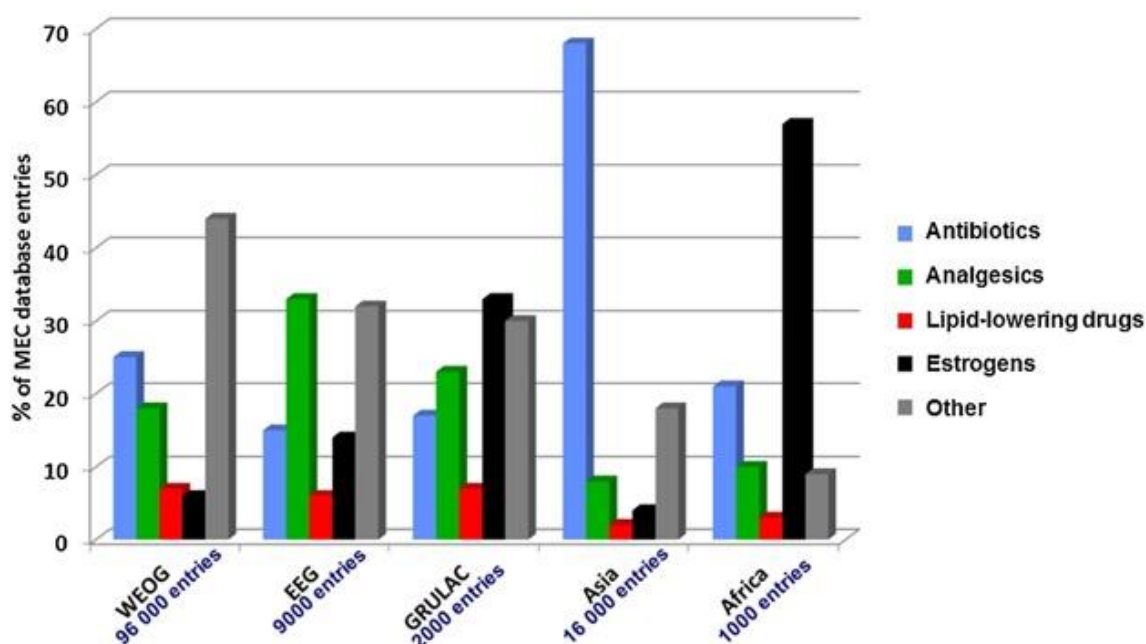


Figura 3 – Percentagem dos grupos terapêuticos farmacêuticos analisados em cada região das Nações Unidas. MEC = concentração ambiental medida; EEG = Grupo da Europa Oriental; GRULAC = Estados da América Latina e Caribe; WEOG, Grupo da Europa Ocidental e Outros. (adaptado)[4]

Nesta revisão salientam-se os valores das concentrações médias e máximas dos produtos farmacêuticos encontrados em cada região das Nações Unidas e entre 16 fármacos apresentados encontram-se 3 antibióticos (Ciprofloxacina, Sulfametoxazole Trimetoprim) em águas ambientais (Tabela 1). No Grupo da Europa Ocidental sulfametoxazol apresenta um valor mais elevado, quer na média, quer no valor máximo, comparando com Ciprofloxacina e Trimetoprim: 0,068 e 29,0 mg L⁻¹ respetivamente.

Tabela 1 – Concentrações médias e máximas (mg L⁻¹) dos 16 produtos farmacêuticos encontrados em cada região das Nações Unidas em águas ambientais. (adaptado)[4]

Substância	África		Ásia-Pacífico		EEG		GRULAC		WEOG		Global	
farmacêutica	Média	Max	Média	Max	Média	Max	Média	Max	Média	Max	Média	Max
Diclofenac	0.273 (14)	1.52	0.090 (152)	4.4	0.111 (420)	4.2	0.239 (130)	6.0	0.020 (6301)	18.74	0.032 (7017)	18.74
Carbamazepine	0.868 (14)	4.5	0.026 (18)	0.04	0.131 (302)	7.6	0.0 (10)	0.0	0.188 (24776)	8.05	0.187 (25115)	8.05
Ibuprofen	3.181 (13)	21.0	0.059 (23)	20.5	0.183 (529)	11.7	0.0 (121)	36.8	0.097 (6264)	303.0	0.108 (6950)	303.0
Sulfamethoxazole	2.53 (58)	21.0	0.258 (518)	14.3	0.033 (139)	0.3	0.001 (95)	0.11	0.068 (7789)	29.0	0.095 (8599)	29.0
Naproxen	0.012 (12)	0.07	0.008 (139)	32.0	0.023 (403)	0.85	0.017 (9)	0.19	0.057 (2666)	12.3	0.050 (3229)	32.0
Estrone	0.004 (96)	0.02	0.012 (159)	0.32	0.001 (262)	0.07	0.347 (79)	5.0	0.004 (1632)	1.25	0.016 (2228)	5.0
Estradiol	0.0001 (46)	0.002	0.0003 (48)	0.007	0.0005 (20)	0.003	No data	No data	0.005 (183)	0.012	0.003 (297)	0.012
Ethinylestradiol	0.0 (32)	0.0	0.008 (159)	0.028	0.002 (57)	0.08	1.175 (50)	5.9	0.005 (1238)	0.28	0.043 (1530)	5.9
Trimethoprim	0.985 (12)	5.5	0.128 (333)	13.6	0.012 (22)	0.174	0.005 (95)	0.48	0.022 (2598)	10.0	0.037 (3060)	13.6
Paracetamol	5.667 (6)	16.0	0.023 (132)	9.17	0.028 (68)	0.61	0.74 (112)	37.0	0.046 (629)	230.0	0.161 (937)	230.0
Clofibric acid	0.007 (6)	0.04	0.003 (3)	0.248	0.009 (48)	0.42	0.0007 (94)	0.03	0.023 (2796)	7.91	0.022 (2947)	7.91
Ciprofloxacin	0.017 (6)	0.034	61.94 (206)	6500	0.002 (22)	0.031	0.001 (95)	0.74	0.008 (343)	13.6	18.99 (672)	6500
Ofloxacin	0.012 (6)	0.036	0.617 (206)	17.7	0.0003 (11)	0.004	0.335 (86)	0.34	0.123 (451)	8.77	0.278 (760)	17.7
Estriol	0.0 (34)	0.0	0.008 (66)	0.074	0.002 (131)	0.08	0.0002 (21)	0.03	0.002 (536)	0.48	0.009 (790)	0.48
Norfloxacin	0.076 (6)	0.15	9.11 (238)	520.0	0.004 (15)	0.057	0.0006 (95)	1.74	0.009 (274)	1.15	3.457 (628)	520.0
Acetylsalicylic acid	0.043 (6)	0.13	No data	7.5	0.062 (29)	0.73	2.07 (112)	20.96	0.002 (107)	0.36	0.922 (254)	20.96

EEG - Grupo da Europa Oriental; GRULAC - Estados da América Latina e Caribe; WEOG - Grupo da Europa Ocidental.

Num estudo recente, sobre a aplicação de abordagens da priorização para otimizar a monitorização ambiental e testes de produtos farmacêuticos, foram analisados os compostos farmacêuticos encontrados nos artigos e apresentados considerados prioritários os quais se encontram três ou mais vezes. Verifica-se que, dos 76 trabalhos encontrados na literatura, a Ciprofloxacina, Sulfametaxazol e Trimetoprim ficam na primeira quinzena dos compostos mais estudados e o Metronidazol ocupa 23º lugar (Figura 4, assinalados com asterisco vermelho). [5]

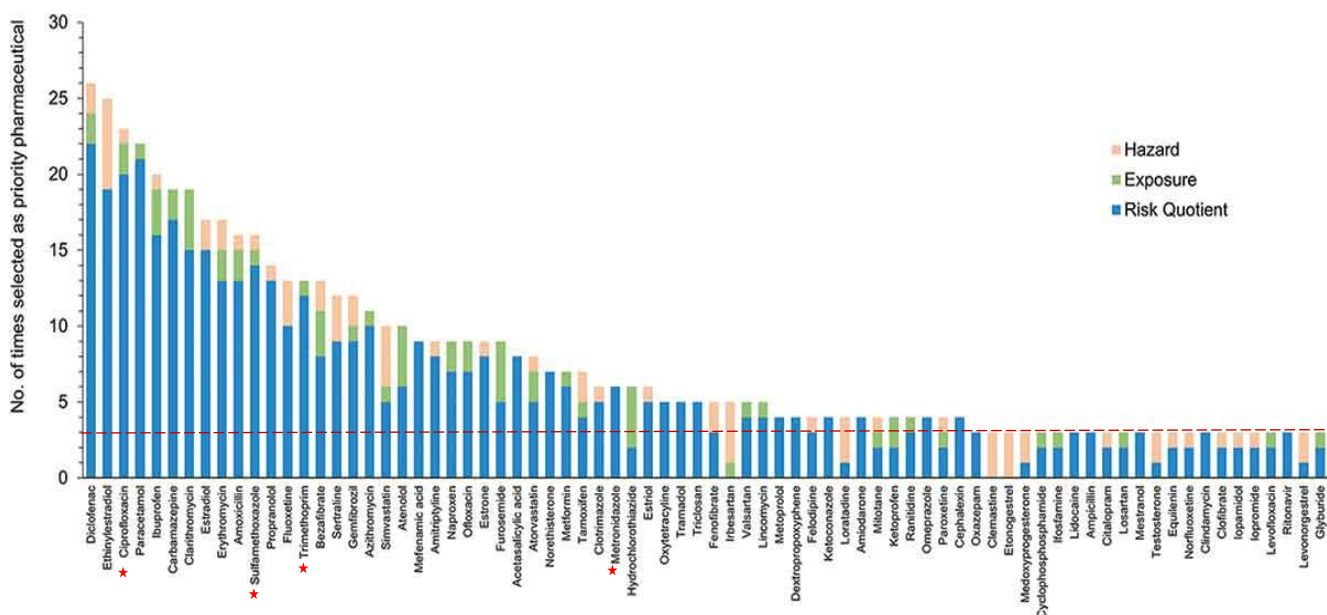


Figura 4 – Produtos farmacêuticos identificados em trabalhos científicos encontrados na literatura três ou mais vezes. A linha vermelha tracejada mostra o número 3 que foi considerado como o nível da priorização. (adaptado)[5]

* Antibióticos que vão ser usados no desenvolvimento do método.

Os dados estatísticos revelam crescimento do setor farmacêutico nas últimas décadas e, de acordo com os valores entre os anos 2017- 2030, o crescimento mundial atinge 160%, com variação em cada país entre 117- 232% (Figura 5). [2, 6]

Entre os vários fatores ligados ao crescimento, está o crescimento contínuo da população, globalização dos processos de mercado, o aumento nas aprovações de medicamentos pelos órgãos reguladores, os procedimentos de fabricação de medicamentos, entre outros. Por exemplo, o FDA aprovou 59 medicamentos em 2018, 49 medicamentos em 2019 e 15 medicamentos até abril de 2020. Além disso, o recente surto de coronavírus COVID-19, provocou um grande número de ensaios clínicos em andamento e criou o impulso de crescimento do mercado. [2, 6]

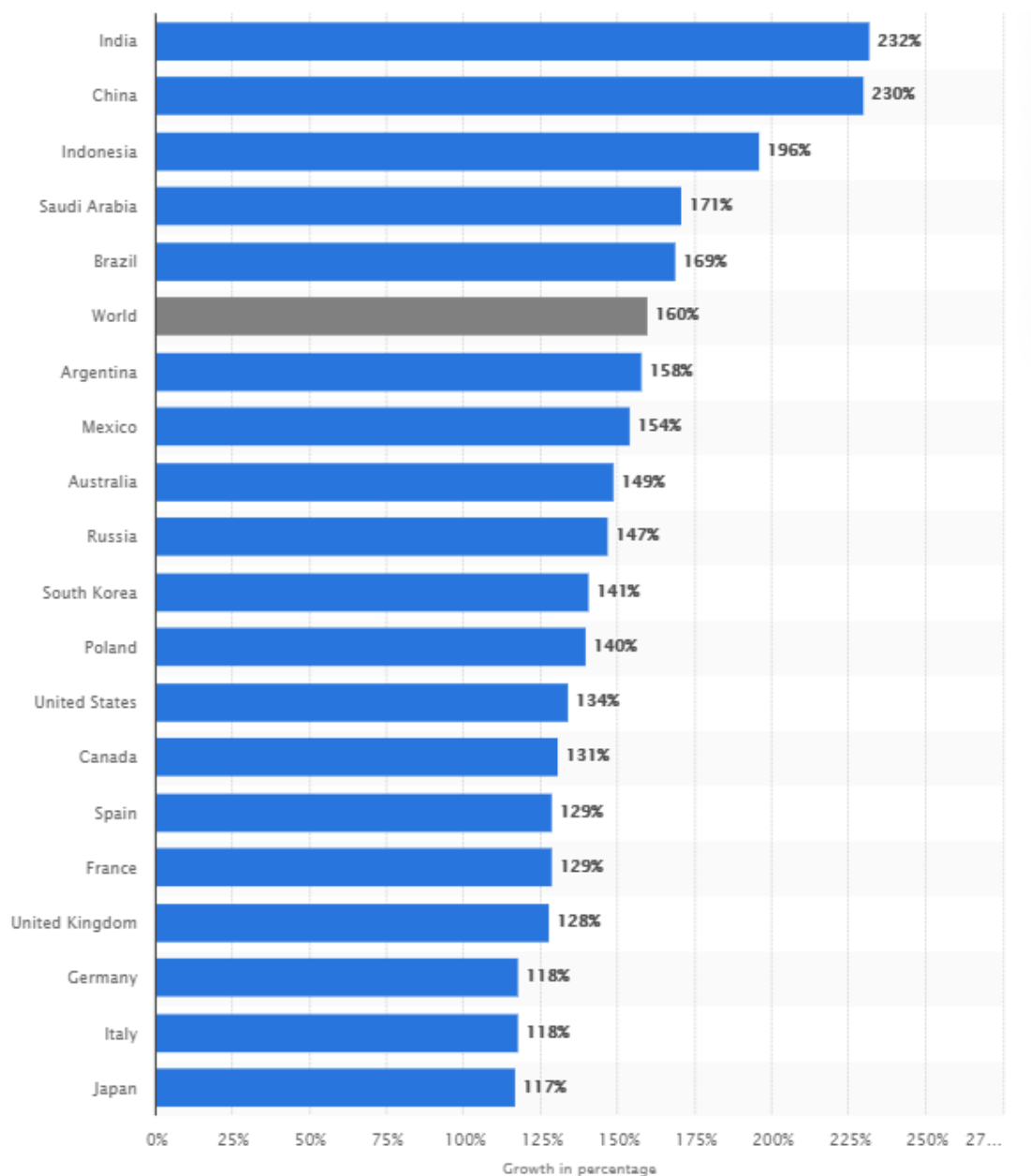


Figura 5 – Previsão mundial do crescimento de setor farmacêutico entre 2017 e 2030 por país. A estatística basea-se na relação confirmada de PIB e despesas nos fármacos para uma pessoa. (adaptado)[6]

Uma vez ingeridos ou injetados no corpo humano, uma parte das substâncias ativas e/ou metabolizados têm sempre saída pelas vias de excreção (grande parte na urina (55-80%) e parcialmente nas fezes), entrando assim no ciclo da água. Verifica-se também que a farmacocinética dos antibióticos no corpo humano tem o seu processo comum com os outros fármacos. Deste modo há preocupação crescente sobre a existência e quantidade dos antibióticos em águas ambientais. [7,8]

1.3 ÁGUA E POLUIÇÃO

A água é o recurso muito importante, tanto para Homem, como para existência da vida no planeta Terra em geral e é o recurso natural mais abundante do planeta.

No “*UNICEF HANDBOOK ON WATER QUALITY*” descreve-se, que a água é uma condição prévia para a saúde e o desenvolvimento da vida e é um direito humano básico. Do outro lado nenhuma água natural é absolutamente pura - as características químicas e físicas da água estão em constante mudança por meio da interação com o meio ambiente. Às vezes, as mudanças podem resultar em água que permanece segura, mas é inaceitável para os consumidores por razões estéticas (sabor, cheiro ou cor). A contaminação química da água é um problema muito sério. E, em alguns casos, a água pode-se tornar insegura para o consumo humano através da contaminação por produtos químicos naturais ou através da poluição de atividades humanas. [9]

Existem dois tipos de contaminação química: os produtos químicos naturais e os poluentes antropogénicos resultantes da atividade humana (agricultura, processos industriais e resíduos domésticos). Contaminantes químicos naturais costumam afetar grandes áreas e várias fontes de água e, em geral, a contaminação natural não pode ser evitada. Além disso, existem técnicas que podem melhorar a qualidade da água *in situ*.

Poluição antropogénica é, em sua vez, subdividida em dois tipos das fontes: fonte pontual (como efluentes de fábricas) e fonte difusa (escoamento dos campos, centros urbanos entre outros) (Figura 6). Deste modo a água fica contaminada pela libertação direta ou indireta dos poluentes antropogénicos no meio ambiente. [9, 10, 11]

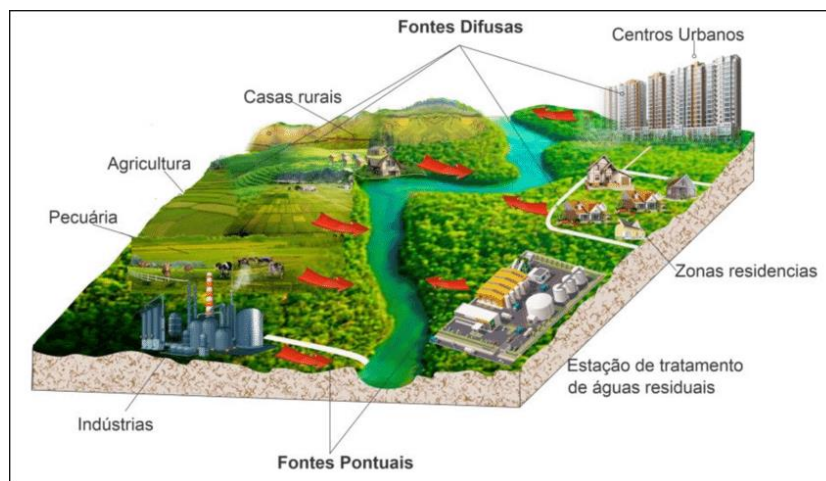


Figura 6 – Atividades antropogénicas que contribuem para a poluição ambiental (difusa e pontual). (adaptado)[12]

1.4 QUALIDADE DE ÁGUA E LEGISLAÇÃO

Todas as massas de água que se encontram na natureza, tem presente no seu corpo diferentes constituintes dissolvidos (compostos orgânicos, inorgânicos, gases, partículas, microrganismos e flora aquática). Esses constituintes influenciam/determinam diretamente ou indiretamente a saúde humana. A água é um património natural fundamental para o desenvolvimento das atividades relacionadas com todas as áreas económicas e sociais da vida humana e apesar de parecer descontínua, tem o seu limite e deve ser salvaguardada e protegida.

A legislação existente em Portugal (Anexo 1) aplica-se à qualidade das águas superficiais e subterrâneas, bem como às águas para consumo humano e abrange um conjunto dos parâmetros físico-químicos, organoléticos e microbiológicos que permitem avaliar a qualidade de água. [13 - 21]

Nem legislação europeia, nem nacional se refere aos critérios/parâmetros da monitorização de nenhum antibiótico em águas ambientais ou consumo.

Foram relatadas muitas vezes preocupações sobre a eficácia dos tratamentos de água residual relativamente aos compostos farmacologicamente ativos (PhACs). Concentrações na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} têm sido relatados mundialmente em água residual, e até mesmo potável. [22 - 26]

Um problema atual das estações de tratamento de água residual (ETARs), refere-se ao funcionamento dos processos dessas estações. Uma vez planeados e construídos eles definem o volume e etapas de tratamento de água, sem possibilidade da alteração, devido ao fluxo contínuo da água. Neste contexto, a não existência da legislação sobre os níveis dos antibióticos em efluentes de água, permite a não exigência aquando da construção das novas ETARs com novas etapas de tratamento, que permitam tratar os antibióticos, quando eles estão presentes em afluentes.[26]

Esses dados apontam claramente à necessidade da investigação nesta direção, desenvolvimento de novos métodos de deteção e monitorização dos níveis de antibióticos em águas ambientais e pesquisa da qualidade da água em rios urbanos, lagos e albufeiras, bem como a necessidade de melhorar as técnicas de tratamento de água, de modo a serem capazes de eliminar este tipo de compostos.

Como este estudo desenvolvido na Universidade do Porto, o método de deteção dos antibióticos vai ser aplicado à água do rio Douro.

De acordo com a portaria n.º 108/2013 de 15 de março de 2013, que segue do Decreto-Lei n.º 56/2012, sobre determinação e organização interna da Agência Portuguesa do Ambiente, I.P (APA, I.P), a bacia do rio Douro (RH3) pertence à Administração da Região Hidrográfica do Norte (ARH do Norte), uma das 7 administrações da ARH, que estão representadas na Figura 7 [27].

As administrações das regiões hidrográficas exercem competências de proteção e valorização dos Recursos Hídricos, garantem o cumprimento dos objetivos da Lei da Água (competências de monitorização, planeamento, fiscalização e licenciamento na sua área geográfica). [14]

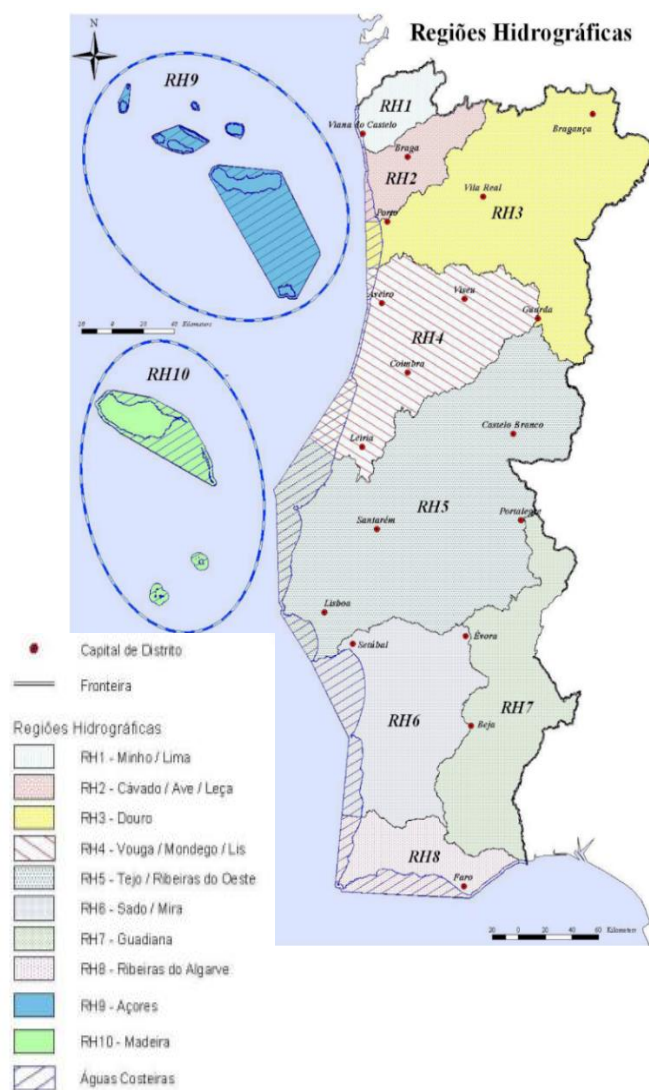


Figura 7 – Administrações Regionais Hidrográficas e regiões hidrográficas de Portugal. (adaptado)[27]

1.5 ANTIBIÓTICOS EM ESTUDO

Os antibióticos são medicamentos/fármacos, que destroem ou impedem o crescimento das bactérias. E hoje em dia, eles constituem o grupo com uma larga variedade de classes, usados para tratar muitas doenças maléficas causadas por bactérias.

Os antibióticos podem ser classificados em diferentes tipos: bactericidas e bacteriostáticos, que por sua vez classificam-se em naturais, semissintéticos e sintéticos. Os bactericidas são antibióticos responsáveis por causar a morte da bactéria, enquanto os bacteriostáticos impedem a sua multiplicação. Os antibióticos naturais e semissintéticos classificam-se em β -lactâmicos, tetraciclinas, peptídicos cíclicos, aminoglicosídeos, estreptograminas, macrolídeos, entre outros. Os sintéticos podem ser classificados em sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas, pirimidinas, nitromidazoicos, entre outros. [28,29]

Os principais mecanismos dos antibióticos nas bactérias que provoca morte ou impedimento da multiplicação, são:

- Inibição da síntese de proteína;
- Alteração da parede celular bacteriana;
- Alterações na membrana plasmática;
- Inibição da síntese de RNA;
- Bloqueio da replicação e reparo do DNA.

A resistência bacteriana aos antibióticos é um problema atual na saúde e é considerado responsável pela dificuldade de encontrar um medicamento que vai ser eficiente contra bactérias resistentes.

Alexander Fleming, na aceitação do Prémio Nobel em 1945 falou sobre a resistência antimicrobiana e o perigo de expor os micróbios a quantidades não letais da droga, tornando-os resistentes. [71]

O processo da resistência bacteriana ocorre devido à ação seletiva exercida pelos antibióticos. O uso de antibióticos em excesso ou não conformidade de uso com a prescrição, contribui para o número crescente de infeções bacterianas, por causa da resistência adquirida aos medicamentos antibacterianos.

Na maioria das vezes o uso inadequado está relacionado com a prescrição de antibióticos sem a certeza diagnóstica ou a interrupção de toma, antes do tempo

indicado. Com o início do tratamento, as bactérias mais frágeis começam a ser eliminadas e as mais fortes, continuam a estar vivas por mais tempo. Se o uso do antibiótico for suspenso, essas bactérias, que ainda estão vivas, multiplicam-se. Com tudo isto, os sintomas podem voltar e o antibiótico usado, na próxima vez, pode não ser mais suficiente para tratar a doença.

Com base em toda informação apresentada, os quatro antibióticos Ciprofloxacina (CFX), Metronidazol (MTZ), Sulfametoxazol (SFX) e Trimetoprim (TMP), das diferentes classes, a seguir apresentados (Figura 8, Tabela 2) foram escolhidos para desenvolvimento do método de análise *multi-test* em água.

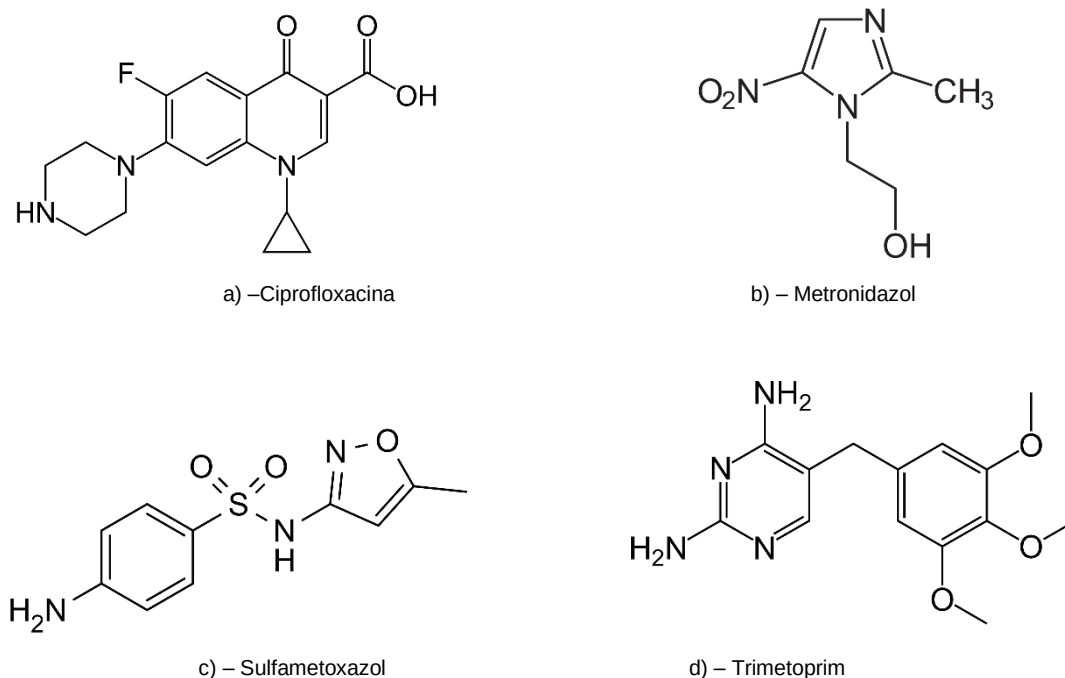


Figura 8 – Estruturas químicas das moléculas dos antibióticos: a) CFX, b) MTZ, c) SFX e d) TMP. [70]

Ciprofloxacina, (nome IUPAC: 1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-7-piperazin-1-ylquinoline-3-carboxylic acid) é o antibiótico sintético de classe das fluoroquinolonas da segunda geração. Fluoroquinolonas são antibióticos derivados do ácido nalidíxico e apresentam um átomo de flúor não observado nas quinolonas. CFX introduzida na prática clínica para o tratamento de várias infeções bacterianas por cerca de 3 décadas e mostra excelente atividade antimicrobiana para várias infeções sistémicas, como infeções urinárias, respiratórias, gastrointestinais e cutâneas. Fluoroquinolonas são eficazes contra ambos

tipos de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, pela inibição de Enzima geradora do DNA que leva à inibição da síntese bacteriana de DNA. Mas, do outro lado, pertence aos antibióticos mais tóxicos atualmente em uso, com mais de 40% dos utilizadores com efeitos colaterais. Mais de metade dos fármacos encontrados dentro desta classe já foram removidos do uso clínico ou foram reportados pela divisão de farmacovigilância da FDA, devido às reações adversas que podem causar dano permanente. [30, 31]

Metronidazol (Nome IUPAC: 2-(2-methyl-5-nitroimidazol-1-yl)ethanol) é um fármaco sintético antiprotozoário, anti-amébio e antibacteriano, que pertence aos nitroimidazólicos e tem uso em medicina humana e veterinária para tratar doenças causadas por bactérias anaeróbias (*Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Campylobacter*, *Clostridium*) e protozoários (*Trichomonas*, *Treponema*, *Histomonas*). Foi descoberto que tem ação cancerígena, mutagénica e tóxica em algumas espécies animais, pelo seu anel original nitroimidazol. O anel nitroimidazol não é facilmente degradado pelo que aparece em vários metabolitos do MTZ. [32 - 34].

Sulfametoxazol (Nome IUPAC: 4-amino-N-(5-methyl-1,2-oxazol-3-yl)benzenosulfonamide) é um antibiótico sintético das sulfonamidas, bacteriostático, que interfere na síntese de ácido fólico em bactérias suscetíveis. É geralmente administrado em combinação com Trimetoprim, que inibe uma etapa sequencial na síntese de ácido fólico bacteriano - esses agentes funcionam sinergicamente para bloquear duas etapas consecutivas na biossíntese de ácidos nucleicos e proteínas que são necessárias para o crescimento e divisão bacteriana, em que os usando em conjunto ajudam a retardar o desenvolvimento da resistência bacteriana. Nesta combinação, é útil para o tratamento de uma grande variedade de infeções bacterianas, incluindo as dos tratos urinário, respiratório e gastrointestinal. [35]

Trimetoprim (Nome IUPAC: 5-[(3,4,5-trimethoxyphenyl)methyl] pyrimidine-2,4-diamine) é um derivado sintético da trimetoxibenzil-pirimidina com propriedades antibacterianas e antiprotozoárias. Atua como inibidor da pirimidina da dihidrofolato redutase bacteriana, o mecanismo consiste na ligação do TMP à enzima bacteriana e bloqueio da produção de ácido tetrahydrofólico a partir do ácido dihydrofólico. A atividade antibacteriana desse agente é potencializada pela sulfonamida. [35]

Na Tabela 2, encontram-se apresentados alguns parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos dos antibióticos CFX, MTZ, SFX e TMP.

Tabela 2 – Características físico-químicas e farmacocinéticas dos antibióticos CFX, MTZ, SFX e TMP. [70]

Antibiótico	Massa molecular, g/mol	Área de Superfície Topológica Polar/Polaridade, Å ² / Polar	Solubilidade em água, mg L ⁻¹	Rota de eliminação, %	Toxicidade
CFX	331,34	72,9	<1 (20 °C)	27 – 46 urina e 62 – fezes	náuseas, vômitos, dor abdominal, cristalúria, nefrotoxicidade e oligúria
MTZ	171,15	83,9	11 (25 °C)	60 – 80 urina e 6 – 15 fezes	alterações hepáticas, distúrbios gastrointestinais e neuropatia periférica
SFX	253,28	107	610 (37 °C)	84,5 – urina	anorexia, cólica, náusea, vômito, tontura, dor de cabeça, sonolência e inconsciência.
TMP	290,32	106	<400 (20 °C)	50 – 60 urina e 4 – fezes	erupção na pele, dermatite, desconforto epigástrico, náuseas e vômitos.

1.6 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS EM ÁGUAS AMBIENTAIS ENCONTRADOS NA REVISÃO.

De acordo com a literatura, os métodos mais relatados para determinação dos fármacos e, antibióticos em particular, em água, são as combinações da técnica da preparação da amostra Extração em Fase Sólida com a análise por Cromatografia Líquida de Alta/Ultra Eficiência com detecção UV-visível/Espetrometria de Massa, ou combinação com a análise pela Espectroscopia Ultravioleta-Visível. [61-69] Também se encontram os métodos de eletroforese capilar [72-74], métodos enzimáticos [75], para a análise das sulfonamidas. Não foi encontrado nenhum método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção UV-visível combinada com Extração em Fase Sólida para determinação simultânea dos 4 antibióticos escolhidos para este trabalho.

Os limites da detecção variam, mas em geral para as análises por Cromatografia Líquida de Alta/Ultra Eficiência apresentam valores menores, em intervalo de centenas microgramas até dezenas nanogramas por litro e pela Espectroscopia UV-visível até dezenas $\mu\text{g L}^{-1}$.

Na Tabela 3 estão resumidamente apresentados alguns métodos/técnicas encontrados com as referências relacionadas, e ainda se salientam os limites de quantificação

Tabela 3 – Apresentação dos métodos de detecção dos antibióticos em águas ambientais encontrados em artigos científicos.

Nome do antibiótico	Método	Limite de Quantificação, $\mu\text{g L}^{-1}$	Referência
ciprofloxacina	LC-MS	0,2367	61
	UPLC-UV	560	68
	SPE-UV-VIS	10	69
metronidazol	UPLC-UV	530	68
	LC-MS	0,0101	67
sulfametoxazol	SPE-HPLC-UV	0,101	62
	SPE-UV-VIS	70	64
	SPE-UV-VIS	40	66
	LC-MS	80	65
	LC-MS	0,3763	61
trimetoprim	LC-MS	50	65
	HPLC-MS	0,0125	63

Cromatografia Líquida de Alta/Ultra Eficiência (U/HPLC), Espetrometria de Massa (MS), Espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-VIS) e Extração em Fase Sólida (SPE).

2. OBJETIVOS

Neste trabalho, pretendeu-se desenvolver e validar um método *multi-test* para determinação e quantificação simultânea de CFX, MTZ, SFX e TMP em água, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção UV-visível, usando a técnica Extração em Fase Sólida, para pré-concentração dos analitos em amostra de água.

Como a etapa preliminar, considerou-se o uso da Espectrofotometria de Ultravioleta Visível para verificação dos espectros dos antibióticos. Depois propõe-se o uso da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, para elaboração das condições cromatográficas com o objetivo da separação e quantificação dos antibióticos, testando duas colunas cromatográficas da fase reversa junto com as variações nas proporções dos constituintes da fase móvel e fluxo em modo isocrático. O uso da técnica Extração em Fase Sólida, foi considerada como a técnica para preparação da amostra para pré-concentração dos antibióticos em água do rio Douro com posterior análise. No final deste trabalho pretendeu-se estudar a viabilidade de empregar o método desenvolvido no monitoramento da quantidade dos antibióticos em água do rio Douro.

3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

O presente capítulo descreve todo o material, incluindo equipamentos, reagentes, como também os métodos da análise química e procedimentos estatísticos, relacionados com a validação do método e usados durante elaboração deste trabalho.

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Equipamentos e Software

Foi utilizado o espectrofotómetro VWR UV-3100PC, com software de aquisição de dados UV-Vis Analyst Version 5.44. O equipamento da cromatografia líquida - Hewlett Packard, série 1100 com injeção manual e detecção SpectraSystem UV6000LP. As colunas da separação utilizadas foram de fase reversa; Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™ C18 (150 mm; 2,1 mm; 5 µm) e Thermo Scientific™ Acclaim™ 120 C18 (150 mm; 4,6 mm; 3 µm). A aquisição dos dados cromatográficos foi feita com o software Xcalibur™ 2.2 SR1. Para extração em fase sólida foi utilizado Vacuum Manifold SUPELCO Visiprep-DL SPE e os cartuchos Waters Oasis® HLB 6cc 500mg. O espectrómetro de massa ESI - MSn com armadilha quádrupla de iões de marca Thermo Finnigan™ LCQTM Deca XP Max foi usado para injeção direta para as análises de espetrometria de massa.

Também foram utilizados o banho de ultrassónico VWR USC100TH para a homogeneização de soluções, a balança analítica Sartorius Lab Instruments GmbH QUINTIX224-1S, o medidor de pH FisherScientific accumet AB150 e o medidor de condutividade CRISON GLP31. Para medição da temperatura da água foi usado termómetro digital VWR.

Todos estes equipamentos encontraram-se em laboratório com temperatura e humidade relativamente controladas (temperatura entre 21 °C e 24 °C, e humidade inferior a 60 %).

3.1.2 Materiais

O material laboratorial usado durante o desenvolvimento deste trabalho está listado na Tabela 4. Salienta-se que, em primeiro lugar procedeu-se à descontaminação de todo o material (plástico e vidro) através da lavagem com detergente e água desionizada abundantemente e, posteriormente com mistura metanol e água desionizada (50 : 50, v/v) e depois procedeu-se à secagem com o ar comprimido.

Tabela 4 – Material laboratorial usado no desenvolvimento do método.

nº	Nome
1	Balão volumétrico
2	Micropipetas
4	Pipetas volumétricas
5	Provetas graduadas
6	Membranas de filtração PTFE (0,22 µm)
7	Espátulas inox
8	Garrafas HDPE e PET
9	Gobéles de vidro
10	Funil de buchner de vidro com placa porosa (2D)

3.1.3 Reagentes e soluções

Padrões químicos dos antibióticos e todos os reagentes usados são de qualidade analítica (> 98 % da pureza) e estão apresentados na Tabela 5.

As soluções-stock dos antibióticos MTZ, SFX e TMP (100 ppm) foram preparadas dissolvendo a massa apropriada em balões volumétricos de 100 mL em metanol e o CFX (100 ppm) por causa da sua solubilidade difícil, em metanol e água desionizada (50 : 50, v/v). Depois da pesagem, os balões foram preenchidos e acertados com solução apropriada e colocados no banho de ultrassom com adição de gelo durante 1 hora. A adição do gelo foi usada para manter a temperatura da água do banho de ultrassom menor do que 30 °C. Os balões volumétricos foram cobertos em folha de alumínio e selados com parafilme, para ser guardados no frigorífico a 4 °C, para evitar evaporação e degradação. As soluções-padrão dos antibióticos (0,001; 0,5; 1,0;

1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 10; 50 mg L⁻¹) para obter as retas de calibração foram preparadas a partir das soluções-stock. As soluções-padrão para análise foram feitas cada vez recentemente antes de usar, diluídos a partir da solução-stock. Na preparação das soluções e na fase móvel para HPLC foi usada a água desionizada Millipore.

Tabela 5 – Reagentes e soluções usados neste trabalho.

nº	Nome	Produção
1	Ciprofloxacina, 98 %	Acros Organics, China
2	Sulfametoxazol 98 %	Sigma-Aldrich, China.
3	Trimetoprim 98 %	Acros Organics, China
4	Metronidazol 98 %	Sigma-Aldrich, China.
5	Metanol 99,9 %	Honeywell, Alemanha
6	Acetonitrilo 99,5 %	Honeywell, Alemanha
7	EDTA 0,1 M	Merk, Alemanha
8	Ácido Acético 99,8 %	VWR, França
9	Acetato de Amónio 99,8 %	Merck, Alemanha
10	Ácido Fórmico 99 %	Honeywell, Alemanha
11	Tiossulfato de sódio x 5H ₂ O 99,8 %	Merck, Alemanha

3.2 AMOSTRAS DE ÁGUA

A amostra é considerada como uma parte representativa tirada de um todo para as análises/ensaios e é um elemento muito importante, uma vez que, se não for representativa o resultado obtido na análise não vai corresponder à realidade. Devido à importância dada à exatidão e representatividade dos dados, prestou-se muita atenção à colheita adequada da amostra para os ensaios, técnicas de conservação/preservação e transporte dessa amostra. A amostragem foi efetuada de acordo com a Norma ISO 17025 : 2005 e é um procedimento que tem de ser bem definido. [36]

Os aspetos importantes do procedimento da colheita das amostras de água para a realização das análises relacionam-se com o tipo de água a analisar (subterrânea, superficial ou residual), tipo de amostragem pretendido (pontual, composta ou integrada) e tipo de ensaio (físico-químico, biológico, microbiológico ou toxicológico). A colheita tem que ser realizada no recipiente adequado e nas condições de conservação,

com o transporte adequado até à análise no laboratório. Medição de pH e de temperatura, durante a colheita, deveriam ser realizadas no local, se isso for possível.

De acordo com a Guia RELACRE 28 “AMOSTRAGEM DE ÁGUAS” a colheita direta com os recipientes à superfície de rios, lagos e albufeiras tem o procedimento a seguir apresentado no esquema em baixo (Figura 9). [37]

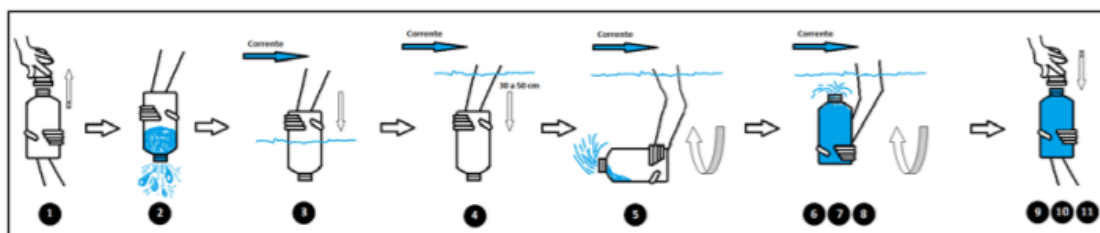


Figura 9 – Colheita de amostra diretamente com o recipiente. (adaptado)[37]

Esta metodologia da colheita foi considerada como apropriada para análise dos antibióticos em água e adotada para colheita da amostra de água do rio Douro.

3.3 MÉTODOS

No âmbito deste trabalho, foram usadas várias técnicas da análise, nos quais foram adaptadas as condições para obter o melhor resultado possível. A espectrofotometria de absorção molecular no UV-visível foi usada como técnica preliminar, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção UV-visível como técnica de separação e quantificação, e Espectrometria de Massa - como a técnica de confirmação dos analitos associados à análise.

3.3.1 Espectrofotometria UV-VIS

A Espectrofotometria Ultravioleta-Visível (UV-VIS) é uma das técnicas instrumentais de análise mais antigas e é apropriada e relativamente barata para a determinação de quantidades micro e semi-micro de analitos numa amostra. A espectrofotometria UV-VIS resulta na medição quantitativa da interação da radiação eletromagnética na região ultravioleta e visível (190-700 nm) com os átomos, moléculas ou iões, onde a concentração na solução do analito absorvente é proporcional à quantidade da luz absorvida.[38]

O esquema apresentado em baixo (Figura 10), representa o princípio da ação de um espectrofotómetro, onde a luz penetra no seu caminho a solução da amostra em cuvete e deteta-se no final.

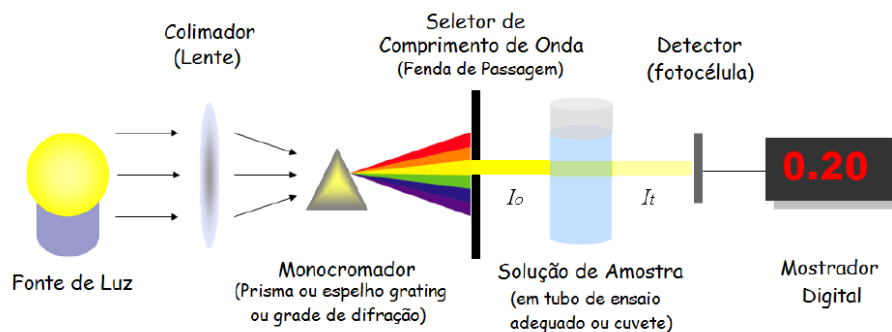


Figura 10 – Esquema representa o princípio de ação de um espectrofotómetro UV-VIS. (adaptado)

Forma quantitativa de determinar as concentrações de uma espécie absorbente em solução, usa a lei de Beer-Lambert:

$$A = \log_{10}(I_0 / I) = \epsilon cL$$

Onde, A é a absorbância medida (em unidades de absorção AU), I_0 é a intensidade da luz incidente num determinado comprimento de onda, I é a intensidade transmitida, L - o comprimento do caminho através da amostra e c - a concentração das espécies absorbentes. Para cada espécie e comprimento de onda, ϵ é uma constante conhecida como absorvidade molar. [38]

3.3.2 Cromatografia Líquida

Cromatografia líquida (LC) é uma técnica utilizada em análises de muitos compostos farmacêuticos e industriais não voláteis e apesar de ser uma técnica de separação, quando é acoplada com as técnicas de deteção espectrofotometria UV- VIS ou espectrometria de massa é muito usada para os fins quantitativos.

Nos dias de hoje, na cromatografia não é apenas dada importância à otimização dos equipamentos e métodos, como também ao aumento das aplicações e eficácia ou eficiência dos processos. [39,40,41]

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) é uma técnica onde o processo se baseia na separação dos analitos numa amostra, os quais se distribuem em duas fases, uma estacionária (FE, coluna) e a outra fase móvel (FM).

A Figura 11 apresenta o esquema geral do funcionamento de equipamento HPLC.

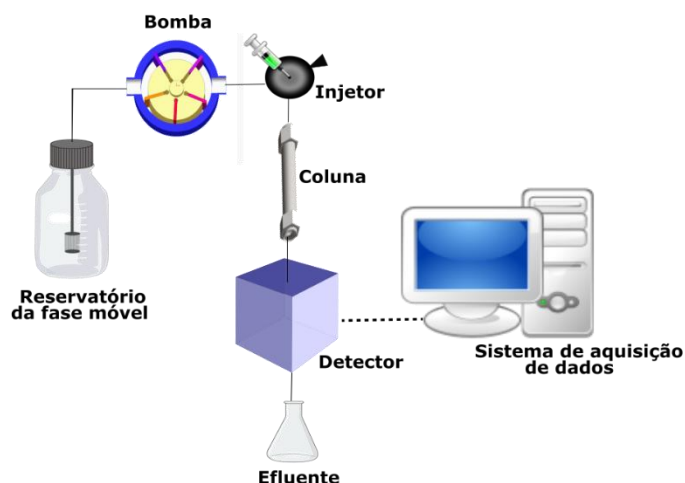


Figura 11 – Esquema da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). (adaptado)[43]

Quando a realização desta separação está assegurada com processo cromatográfico da partição dos componentes entre essas fases, os analitos são transportados por intermédio de uma FM através de uma coluna, com as velocidades diferentes, o que tem como consequência o seu tempo de retenção e separação física e só é possível quando usadas fases convenientes (devido da polaridade dos analitos). As propriedades físico-químicas dos analitos influenciam na sua separação e, por isso, a otimização dos diferentes parâmetros cromatográficos são essenciais. [42,43]

As colunas usadas estão empacotadas com partículas que podem ser sólidas, porosas e com um tamanho pequeno de 3 a 7 μm . Dependendo da natureza do empacotamento, a FE é dividida em dois tipos: fase normal e reversa.

Na cromatografia de fase normal a superfície das partículas da coluna é composta por substâncias polares (ou seja, sílica ou sílica ligada a grupos funcionais polares: $-\text{NH}_2$, $-\text{CN}$ e outros. E neste caso usam-se solventes orgânicos não polares (Ex: *n*-hexano, tolueno e etc.) e usa-se para separação das substâncias não polares ou

menos polares. [44,45]

Na cromatografia de fase reversa, a sílica ligada com os grupos de silanol, não polar. Na FM usa-se uma mistura de solventes orgânicos polares (Ex: água, metanol, acetonitrila e etc.) e é usado para separação substâncias polares ou relativamente polares.

3.3.3 Espectrometria de massa

"O princípio básico da Espectrometria de Massa (MS) é gerar iões de compostos inorgânicos ou orgânicos por qualquer método adequado, separar esses iões por sua razão massa-carga (m/z) e detetá-los quantitativamente por seus respectivos m/z e abundância. O analito pode ser ionizado termicamente, por campos elétricos ou impactando eletrões, iões ou fótons energéticos. Os iões podem ser átomos ionizados simples, aglomerados, moléculas ou seus fragmentos ou associados. A separação de iões é efetuada por campos elétricos ou magnéticos estáticos ou dinâmicos." E essa definição de espectrometria de massa dada em 1968 ainda é válida hoje em dia. [46]

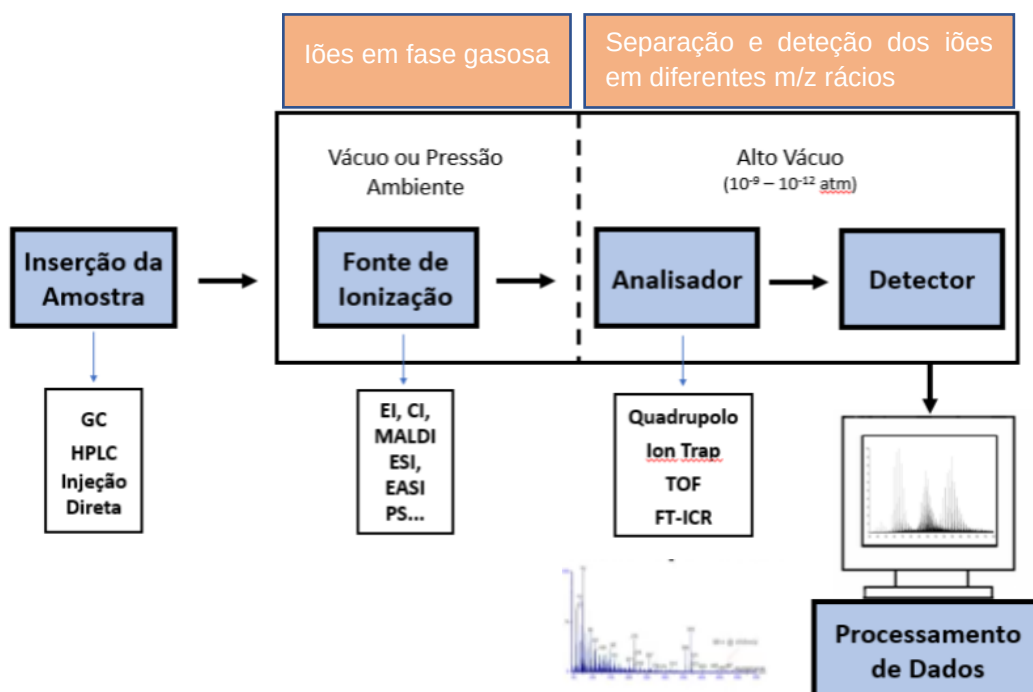


Figura 12 – Esquema geral do princípio de funcionamento de espectrometria de massa com os nomes dos métodos nas divisões empregados nela. (adaptado)

O esquema em cima (Figura 12), descreve os elementos e o princípio de funcionamento do MS. A molécula inicial na fonte de ionização é transformada em ião em fase gasosa, quando passa pelo analisador ocorre separação dos iões em diferentes m/z razões e o detetor regista/deteta as correntes diferentes de iões de cada m/z . O espectro é produzido como intensidade (nº dos iões) vs m/z , onde m é massa em termos da massa do protão (u) e z é a carga em termos de unidade de carga (e). A análise da substância desconhecida ou confirmação do analito é possível através dos iões dos elementos, que têm as suas razões massa/carga (m/z) únicos. Também, em termos da análise, pode ser feito quando ião molecular sofre fragmentação, sendo que cada molécula geralmente possui uma sequência de fragmentação característica, o que possibilita a elucidação da estrutura química das moléculas desconhecidas ou identificação das moléculas alvo com base em fragmentos característicos.[47]

3.3.4 Extração em Fase Sólida

A Extração em Fase Sólida (SPE), é uma técnica de separação líquido-sólido usada para extrair analitos semivoláteis e não voláteis das amostras líquidas. Atualmente, é uma das técnicas mais utilizadas para extração e/ou pré-concentração de analitos em amostras complexas e permite, que analitos em concentrações muito baixas podem ser detetados por HPLC ou outras técnicas.

A SPE foi desenvolvida em 1976 para superar as desvantagens da técnica extração líquido-líquido que se usava na altura, e hoje em dia é uma das técnicas mais popular da preparação de amostra, sendo utilizada pela maioria dos analistas, com vasta aplicação nas áreas de bioquímica e de química orgânica para análises de fármacos, alimentos e meio ambiente. [48, 49]

Essa técnica, na sua forma mais comum, envolve o uso de cartuchos de polipropileno, nas formas de barril ou seringa, recheados com uma pequena quantidade (de 50 a 500 mg) de sorbente (fase sólida), com 40 a 60 μm de tamanho de partícula, fixado no tubo por meio de dois filtros de tamanho de poros de 20 μm . Após a ativação do sorbente com solvente orgânico apropriado a amostra de água (de centenas de mL até alguns litros), contendo o analito de interesse, é inserida no cartucho e aspirada com vácuo de forma a passar pelo cartucho com sorbente ativado, que vai retirar o analito de interesse. Em seguida, faz-se a lavagem e depois a eluição dos analitos retidos em

sorbente com uso do solvente orgânico (alguns mL) (Figura 12). [50]

Em geral, a SPE pode ser usada para três importantes propósitos: extração e/ou pré-concentração do analito, isolamento da matriz e armazenamento da amostra. Assim, o primeiro propósito refere-se aos analitos que ficam retidos no sorbente para posterior eluição e o segundo, aos que são eluídos diretamente, enquanto as substâncias interferentes ficam retidas.

Os mecanismos de retenção são idênticos àqueles envolvidos em LC em coluna. A ilustração a seguir mostra as etapas de SPE e descreve os princípios de cada um (Figura 13).

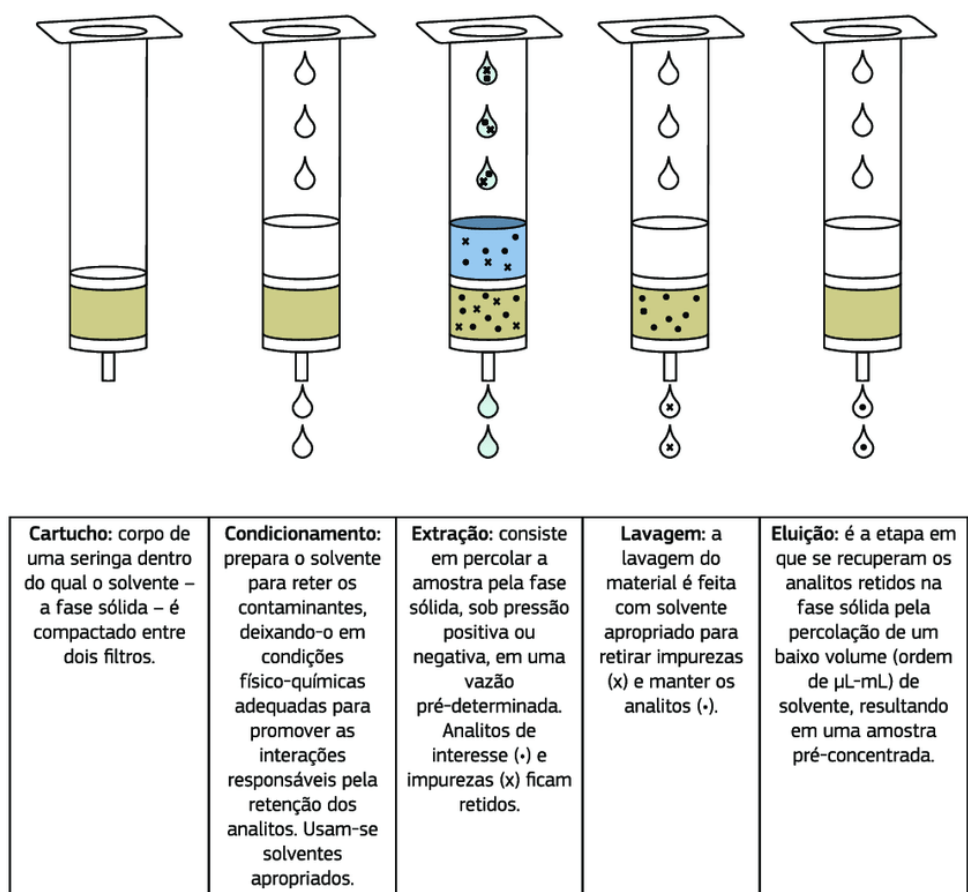


Figura 13 – Principais etapas da extração em fase sólida (SPE).adaptado[49]

A SPE pode ser conduzida nos modos *off-line* e *on-line*. No modo *off-line*, o processamento das amostras e a separação cromatográfica são processados separadamente. Após a etapa de pré-tratamento, a amostra é introduzida de modo

convencional no sistema cromatográfico. O modo off-line é o mais utilizado em SPE. Atualmente, existem equipamentos comerciais para extrações múltiplas. Alguns deles fazem o processo de extração mecanicamente, porém a transferência da amostra para o injetor cromatográfico é manual, como nos sistemas *manifolds* (sistema mecanizado com várias bocas para os cartuchos) (Figura 14). No sistema *on-line*, no mesmo equipamento estão incorporados os dispositivos para extração, lavagem, eluição da amostra e a transferência para HPLC, resultando numa operação sequencial e automatizada.[51]

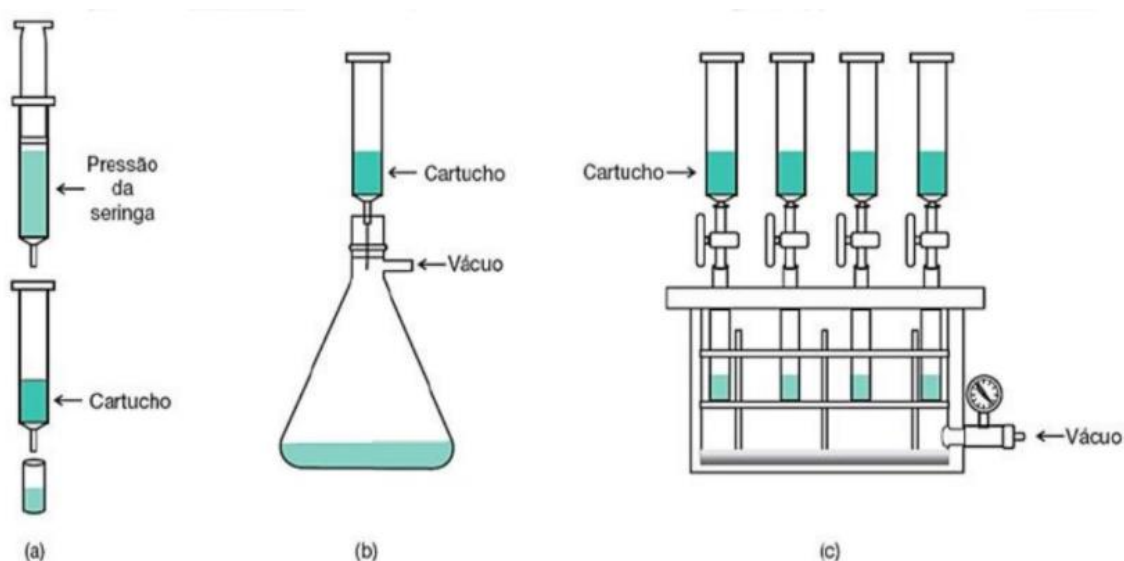


Figura 14 – Formas de pré-tratamento das amostras, uso dos cartuchos em modo off-line: a) passagem com auxílio de seringa, b) kitazato e bomba de vácuo, c) *manifold* multibocal e bomba de vácuo.(adaptado)[51]

A técnica SPE mostra várias vantagens, como o menor investimento em reagentes, equipamentos e materiais, e também rapidez relativa.

3.4 VALIDAÇÃO

A validação de um método analítico é um aspeto muito importante para a garantia da qualidade e surge como resposta à necessidade de mostrar que o método analítico tem as características necessárias para a obtenção de resultados com a objetividade pretendida. [52 - 55]

Segundo a Norma NP EN ISO/IEC 17025, validação é a confirmação, através de estudos estatísticos, da garantia do desempenho do método desenvolvido e permite demonstrar, que os resultados obtidos são confiáveis e adequados à objetividade pretendida. Para fazer validação de um método pode ser efetuada realização de uma avaliação direta ou indireta do método estudado.

Avaliação indireta baseia-se na evidência das suas características, ou seja:

- Os fundamentos teóricos do método mostram a evidência da base científica do método;
- Nas interferências e fontes de erro, para delinear a sua aplicabilidade e dominar a sua execução;
- Estudos de otimização e/ou robustez do método;
- Estudo das características de desempenho do método, ou seja, a qualidade dos resultados obtidos com o método (campo de aplicação, exatidão, repetibilidade, robustez, precisão intermédia, reprodutibilidade, limites de deteção e quantificação, incerteza, etc.).

Avaliação direta baseia-se na comparação dos resultados do método com referências aceites:

- Com métodos normalizados ou de referência;
- Comparação com padrões ou materiais de referência certificados;
- Comparações interlaboratoriais.

A maior parte da avaliação para a validação do método neste trabalho é de forma indireta, pela evidência das suas características. [56]

A validação do método analítico é o aspeto que tem atenção considerável pela comunidade científica e várias organizações governamentais e privadas, tais como a *Food and Drug Administration (FDA)*, *US Pharmacopeia (USP)*, *Environmental Protection Agency (EPA)*, *International Organization for Standardization (ISO)*, *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*.

Os parâmetros listados a baixo são frequentemente usados para efetuar validação de método analítico e eles têm que atender a determinadas especificações:

- Seletividade e Especificidade;
- Linearidade;
- Limites (Limite de deteção, limite de quantificação e limite de branco);

- Sensibilidade;
- Precisão (Repetibilidade, Reprodutibilidade, Precisão intermédia);
- Robustez;
- Exatidão;
- Controlo de qualidade (ensaio de recuperação).

3.4.1 Seletividade e Especificidade

A seletividade do método é a capacidade de detetar um analito numa mistura complexa e distingui-lo da matriz presente na amostra sem ter interferências significativas no sinal analítico. A especificidade do método é a outra capacidade que permite o método produzir uma única resposta para um único analito numa amostra de mistura. Num método seletivo, é possível obter respostas para diferentes analitos químicos com possibilidade de os diferenciar e identificar. Na realidade há poucos métodos específicos capazes de obter resposta única só de um analito. [57]

Como a maioria dos métodos cromatográficos produz resposta para mais do que um analito, o termo de seletividade é o mais adequado neste sentido.

Uma das formas de avaliar ou verificar a seletividade do método é o uso de ensaios de recuperação, em duplicado e nas condições de repetibilidade. Uma vez que, os métodos das técnicas diferentes permitem maiores taxas de recuperação do que os outros, o critério de taxa de recuperação tem que ser entre 80 – 100 %, para método ser considerado seletivo.

3.4.2 Linearidade

A linearidade de um método avalia-se pela capacidade da técnica instrumental do método analítico gerar sinal da característica física diretamente proporcional à concentração de analito dentro de um determinado intervalo de concentração. Representação gráfica do sinal analítico vs concentração ou quantidade do analito é uma das formas apresentar e avaliar linearidade do método (Figura 18).

Na Figura 18, estão apresentados intervalos da concentração do analito normalmente atribuídos numa gama de medições associadas ao desenvolvimento do método analítico.

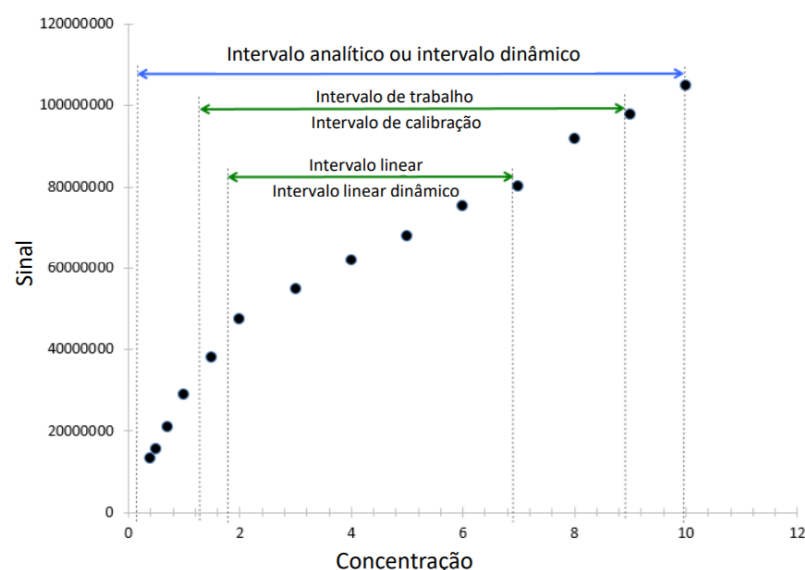


Figura 15 – Intervalos da concentração do analito de um método analítico. (adaptado)[45]

O intervalo linear tem que ser encontrado pelos ensaios de avaliação de linearidade.

Inicia-se pelo procedimento prévio da avaliação de homogeneidade da variância do sinal analítico no intervalo de calibração. Uma das condições que se deve observar para proceder ao traçado da curva de calibração é a homogeneidade do sinal analítico dentro do intervalo de calibração.

Para avaliação da homogeneidade da variância usam-se testes definidos pela norma DIN ISO 8466-1 ou 8466-2, e o teste de Cochran, como teste de rejeição de resultados.[58]

Ao proceder ao teste da avaliação de homogeneidade da variância pela norma DIN ISO 8466-1, faz-se a medição do sinal analítico pelo menos das 10 soluções padrão do analito de cada uma das concentrações limites (mínima (y_m) e máxima (y_M)) do intervalo de calibração. Com os resultados obtidos e usando Equações 1 e 2, procedem-se aos cálculos das respetivas variâncias dos sinais analíticos.

$$s_m^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n_m} (y_{mi} - \bar{y}_m)^2}{n_m - 1}$$

Equação 1

$$s_M^2 = \frac{\sum_i^{n_M} (y_{Mi} - \bar{y}_M)^2}{n_M - 1}$$

Equação 2

As variâncias calculadas avaliam-se pelo teste-F unilateral, que serve para verificação da presença de diferença significativa dos limites do intervalo de calibração.

Se $F_{\text{exp}} \leq F_{\text{tab}} (g_{l_m}; g_{l_M}; 99\%)$, a diferença entre as variâncias não é significativa;

Se $F_{\text{exp}} > F_{\text{tab}} (g_{l_m}; g_{l_M}; 99\%)$, a diferença entre as variâncias é significativa.

Quando a diferença entre as variâncias é significativa deve-se reduzir o intervalo de concentração para ter condição, tal que $F_{\text{exp}} \leq F_{\text{tab}} (g_{l_m}; g_{l_M}; 99 \%)$

Uma vez verificada a homogeneidade da variância no intervalo de calibração, faz-se a avaliação da linearidade pelo cálculo de coeficiente de correlação (R^2), teste de Rikil, teste das áreas normalizadas (ensaios cromatográficos) ou Método de Mendel (norma ISO 8466 - 1) para outras técnicas.

No entanto, para definir o intervalo linear, temos que considerar o critério de cobertura entre 0 – 150 % ou 50 – 150 % da concentração esperada do analito na amostra.

No cálculo, quando $R^2 \geq 0,995$, aceita-se que os pontos de calibração sejam ajustados por uma reta. Mas só o coeficiente de correlação do ajuste da reta de calibração, pode não servir, como critério da avaliação de linearidade [59].

Nos ensaios cromatográficos, outra forma da avaliação de linearidade é o teste das áreas normalizadas, que se baseia na distribuição dos valores normalizados das áreas dos picos cromatográficos para as concentrações de analito em determinado intervalo de concentração. O objetivo deste teste é avaliar a dispersão das áreas dos picos cromatográficos obtidos pela reta de calibração em relação aos valores ótimos, de modo que essa dispersão não seja superior a um intervalo previamente estabelecido.

Usando a equação da reta da regressão linear, estimam-se as áreas dos picos das concentrações usadas. Depois, calcula-se a razão entre o valor da área do pico obtida experimentalmente e o valor da área calculada, para cada concentração. A concentração, onde a razão está mais próxima de 1 é usada como referência (C_{100}), onde é melhor correlação entre ponto experimental e calculado. A distribuição dos valores normalizados é obtida a partir da aplicação, a cada uma das concentrações, da

Equação 3:

$$\text{Área normalizada} = 100 \frac{A_i / C_i}{A_{100} / C_{100}}$$

Equação 3

Onde, A_i - Área do pico correspondente a uma determinada concentração

C_i - Concentração correspondente à área A_i

A_{100} - Área do pico com melhor correlação

C_{100} - Concentração com melhor correlação

O gráfico traçado de valores normalizados *versus* a concentração, permite analisar a existência de linearidade, numa determinada gama de concentração. Os valores normalizados não podiam ter um desvio superior a 15 %, e deverão estar compreendidos entre 85 e 115 %. Sempre que existirem valores normalizados que representam um desvio superior a 15 % devem ser excluídos, reduzindo a gama de concentrações e aplica-se novamente, até que os requisitos sejam satisfeitos.

A aplicação do método dos mínimos quadrados ao ajuste linear tem como objetivo obter o melhor ajuste linear entre os pontos obtidos no gráfico. A Equação 4 de regressão linear tem a seguinte forma e graficamente representada em Figura 16.

$$y = mx + b$$

Equação 4

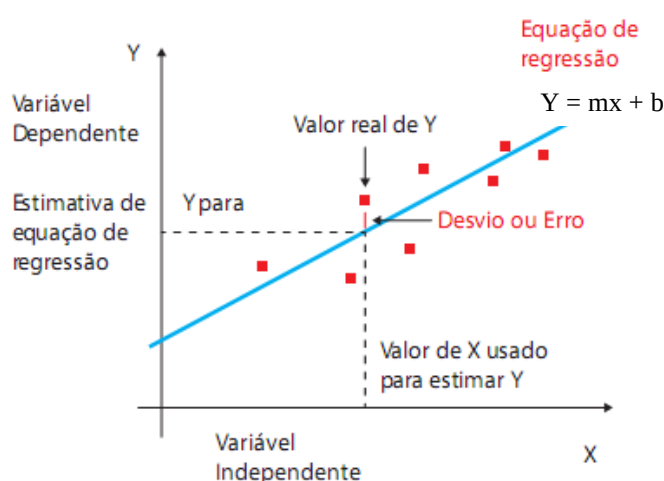


Figura 16 – Apresentação gráfica da regressão linear simples. (adaptado)[45]

Onde: y – sinal analítico, x – concentração do analito, b – declive da reta, a – ordenada na origem.

3.4.3 Limites (Limite de Branco, Limite de Detecção; Limite de Quantificação)

A deteção ou quantificação do analito pelo método analítico tem sempre associado os limites de deteção (LD), quantificação (LQ) e limite de branco (LB), bem como as suas incertezas associadas e conhecidas. Na Figura 17, a seguir, encontram-se ilustrados os limites mencionados em cima.

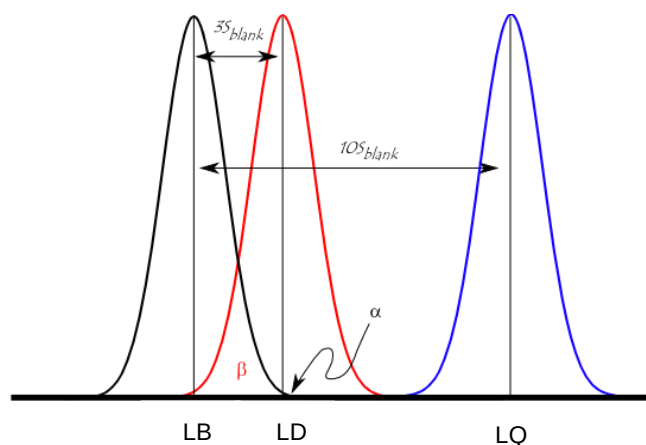


Figura 17 – Ilustração dos limites: limite de branco (LB), limite de deteção (LD), e limite de quantificação (LQ). (adaptado)[59]

O limite de deteção do método corresponde ao sinal do analito mínimo medido, ou seja, quando é possível distinguir o sinal do analito da linha de base produzida pelo ruído associado à matriz existente na amostra.

O limite de quantificação permite quantificar o analito com a sua incerteza associada e estatisticamente aceitável.

A determinação dos limites analíticos da técnica instrumental ou do método analítico podem ser feitos pelas várias abordagens. Uma destas baseia-se na reta de calibração.

Neste modo de procedimento, os limites da técnica instrumental são obtidos a partir da ordenada na origem da reta de calibração e do respetivo desvio padrão do desvio do ponto experimental à reta ($s_{y/x}$, desvio padrão residual), (Equação 5, 6).

$$LD_s = b + 3,3 s_{y/x}$$

Equação 5

$$LQ_s = b + 10 s_{y/x}$$

Equação 6

Onde, LDs e LQs são os limites da técnica instrumental

Para calcular os limites analíticos (LDc) e (LQc) de um método analítico quantitativo é necessário fazer a uma conversão do sinal do detetor em concentração. Essa conversão identifica-se com o declive da reta de calibração. (Equação 7,8)

$$LD_c = \frac{3,3}{m} s_{y/x}$$

Equação 7

$$LQ_c = \frac{10}{m} s_{y/x}$$

Equação 8

Onde, LDc e LQc são os limites do método analítico.

3.4.4 Sensibilidade

Distinguem-se dois tipos de sensibilidade usadas na avaliação do método químico. Um deles é a sensibilidade da técnica instrumental (sensibilidade da calibração) que representa a taxa da variação da propriedade física relativamente à concentração do analito usado em análise. Quando o método da determinação se baseia no modelo linear de 1º grau, a sensibilidade identifica-se como o declive da reta de calibração (m). Quando a curva de calibração é definida por uma função de 2º grau, a sensibilidade define-se como a primeira derivada da curva de calibração nesse ponto de concentração. [60]

Outro tipo é a sensibilidade analítica (sensibilidade do método analítico) que pode ser descrita como a diferença mínima (ΔC) entre as concentrações do analito de duas amostras com concentrações muito semelhantes, e esta diferença tem um certo grau de confiança (Equação 9).

$$\Delta C = |C_2 - C_1| = 3\sqrt{2} s_c$$

Equação 9

Ou pelo inverso do desvio padrão de concentração, onde m é a sensibilidade da técnica e s_s é desvio padrão do sinal analítico, (Equação 10)

$$\gamma = \frac{1}{s_c} = \frac{m}{s_s}$$

Equação 10

3.4.5 Precisão (Repetibilidade, Reprodutibilidade, Precisão intermedia)

A precisão do método é sempre relacionada com o erro aleatório da medição e é uma das duas componentes que contribuem para a incerteza. A precisão pode dar resposta sobre a dispersão dos resultados entre ensaios repetidos sobre amostras semelhantes, a mesma amostra ou padrão nas mesmas condições experimentais do método desenvolvido. Esta dispersão avalia-se pelas três características repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermédia. [1, 8]

Para o estudo da repetibilidade, as medições têm que ser feitas nas mesmas condições, ou seja, no mesmo laboratório, com o mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento e a mesma amostra num curto intervalo de tempo e com o número de ensaios $n > 10$. A partir dos dados obtidos calcula-se o coeficiente de variação (CV) (Equação 11), que representa o desvio padrão relativo. Quando há condições de repetibilidade, o valor do CV não deve ser maior do que a 2% [1, 8].

$$CV = \frac{S_r}{\bar{x}} * 100$$

Equação 11

Onde S_r - desvio padrão

$\bar{x}$ - é a média das medições

Quando os ensaios não conseguem ser realizados no mesmo dia, então realiza-se no dia mais próximo possível nas mesmas condições, mas calcula-se S_r combinado, tendo em conta a quantidade de números de ensaios feitos nesses dias, que pode ser mesma ou diferente. Para esse efeito usam-se Equações 12 e 13 apresentadas a seguir.

$$s_{rpooled} = \sqrt{\frac{s_1^2 + s_2^2 + \dots + s_k^2}{k}}$$

Equação 12

Quando o nº de ensaios em cada dia é constante.

$$s_{rpooled} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2 + \dots + (n_k - 1)s_k^2}{n_1 + n_2 + \dots + n_k - k}}$$

Equação 13

Quando o nº de ensaios em cada dia é diferente.

Quando não há quantidade suficiente de amostra para realizar muitos ensaios é possível fazer a avaliação da repetibilidade com uma amostra semelhante em termos de concentração do analito e da matriz. Assim, a repetibilidade é calculada como desvio padrão relativo pela Equação 14.

$$RDS_{rpooled} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)RDS_1^2 + (n_2 - 1)RDS_2^2 + \dots + (n_k - 1)RDS_k^2}{n_1 + n_2 + \dots + n_k - k}}$$

Equação 14

Também pode ser calculado o limite de repetibilidade (r) que é o valor máximo permitido para a diferença entre dois resultados, com um grau de confiança de 95% ou 99%. Nestas condições, o limite de repetibilidade é expresso pela Equação 15.

$$r = t(v, \alpha) * Sr$$

Equação 15

Onde t é valor de T-student para 95 % ou 99 % grau de confiança e com n -1 graus de liberdade.

Já para o estudo da reprodutibilidade, as medições realizam-se em laboratórios diferentes. Nesta avaliação as condições ambientais de análise e os analistas podem variar-se. O objetivo desta avaliação é verificar se o método desenvolvido pode ser usado nos outros laboratórios.

Da sua definição, a reprodutibilidade não é, um parâmetro de avaliação obrigatório em validação de método interno de laboratório individual, mas deve ser incluída na validação, quando o método é ou vai ser usado por mais do que um laboratório.

A precisão intermédia é designada como reprodutibilidade dentro do laboratório, quando os ensaios se realizam durante um longo período de tempo (um mês ou mais) para a mesma amostra. Neste caso os ensaios são realizados por diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes calibrações, diferentes lotes de reagentes, diferentes materiais de suporte, e outros fatores. Como os ensaios se distribuem por um longo período de tempo, neste caso a precisão intermédia vai sentir os efeitos desses fatores que podem ser considerados aleatórios, ao contrário nos ensaios feitos num curto período de tempo, onde se considere que os efeitos permanecem constantes.

O nº total de ensaios recomendado neste caso deverá ser igual ou superior a 15 e nestas condições, a precisão intermédia é calculada pela equação habitual do desvio padrão (Equação 16):

$$s_I = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}$$

Equação 16

Quando há várias amostras envolvidas nesta avaliação, mas o número de ensaios fica constante, a expressão tem a forma seguinte (Equação 17)

$$s_I = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2}{t(n-1)}}$$

Equação 17

Onde t é a quantidade de amostras.

3.4.6 Robustez

A robustez de um método analítico é avaliada pela estabilidade deste método quando há pequenas variações nas condições experimentais ambientais e operacionais (temperatura, humidade, luminosidade, material, condições de armazenamento, concentração de reagentes devido da estabilidade e etc). Quando um método consegue aguentar e fica pouco sensível as essas variações, o método diz-se robusto.

3.4.7 Exatidão

A exatidão define-se como a concordância entre o resultado de um ensaio obtido pelo método e o valor verdadeiro ou de referência que se aceite como verdadeiro. É determinada através da avaliação direta do resultado obtido com o valor dito verdadeiro. Exatidão é associado aos erros aleatórios e sistemáticos do método analítico. A avaliação da exatidão do método pode ser feita por recurso de materiais de referência certificados, ensaios interlaboratoriais e ensaios de recuperação. Os ensaios de recuperação são utilizados quando se pretende avaliar a exatidão sem a existência de materiais de referência ou ensaios interlaboratoriais.

3.4.8 Controlo de qualidade (ensaio de recuperação)

Com os ensaios de recuperação é possível avaliar a eficiência do método de tratamento das amostras e pode ser avaliada pelo cálculo da comparação da resposta do sinal obtido para a amostra fortificada com solução-padrão e extraída, com o sinal da resposta obtida para a amostra que foi extraída e posteriormente fortificada, a última que representa 100%.

$$\% \text{ Recuperação} = (A_m \text{ fortificada extraída} / A_m \text{ extraída fortificada}) \times 100 \quad \text{Equação 18}$$

Onde A_m – amostra

A recuperação tão melhor quando fica mais próximo do 100. Conselho Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos para Uso Humano recomenda a média das recuperações se situe entre 90 -110 % e a recuperação individual entre 70 - 130 % do analito recuperado.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Neste capítulo são descritos todos os procedimentos usados para desenvolvimento do método e das análises realizadas durante esta investigação.

No desenvolvimento de um método analítico de SPE-HPLC estão envolvidas várias etapas de otimização, sendo eles: os procedimentos relacionados com a preparação da amostra, as condições operacionais da técnica cromatográfica e de SPE.

4.1 CONDIÇÕES OPERACIONAIS DA ESPETROSCOPIA UV-VIS

Como já foi dito, as análises da espectroscopia UV-VIS foram feitas como análises preliminares para obter espectros de cada antibiótico. Os espectros foram estudados e foram identificados os picos característicos, como também comparados com as de referências para serem utilizados no desenvolvimento do método. [64, 66, 69]

Das soluções-stock de cada antibiótico foram preparadas as soluções-padrão com concentração 10 ppm em metanol e água desionizada (50 : 50; v/v). A análise do branco (metanol : água desionizada, 50:50, v/v) foi feito antes de prosseguir as análises espectrofotométricas. Os espectros foram apresentados em modo de absorbância, e a mesma cuvete foi usada para todas as soluções. Esta cuvete antes da análise foi lavada com a solução metanol e água, (50 : 50, v/v) e depois com a solução para análise. O varrimento do espectrofotômetro foi definido na zona 190 – 700 nm.

4.2 CONDIÇÕES OPERACIONAIS DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

As análises cromatográficas dos quatro antibióticos foram adaptadas e realizadas de acordo com as referências listadas no parágrafo 1.6, sendo no final ter um método *multi-test* para todos os antibióticos: CFX, MTZ, SFX, TMP. [61-63, 65, 67, 68]

Foram testadas duas colunas com fase reversa com diferentes tamanhos das partículas (5 e 3 µm) e diâmetro (2,1 e 4,6 mm). O volume de injeção de 20 µL foi igual para todos os ensaios. Durante as análises foram variadas as condições cromatográficas aplicadas (proporções dos constituintes da fase móvel, velocidade de fluxo) para obter melhor resultado e estão apresentadas resumidamente na Tabela 6.

Para as análises por HPLC, as soluções-stock dos antibióticos foram diluídas até 10 ppm em solução metanol e água desionizada (50 : 50, v/v). A análise cromatográfica foi iniciada com as soluções-padrão dos antibióticos, em separado, com concentração 10 ppm, Depois da análise cromatográfica de cada um dos quatro antibióticos com a respetiva solução-padrão, prosseguiu-se a análise com uma única solução de mistura dos 4 antibióticos em concentração 10 ppm cada. Como diferentes fatores influenciam a separação cromatográfica, tais como polaridade da FM, viscosidade, pressão, temperatura, essas condições foram estudadas. Foram feitas várias tentativas para encontrar a melhor separação cromatográfica dos antibióticos e para isso foram aplicados diferentes pHs, constituintes de fase móvel (metanol (MeOH), acetonitrilo (ACN), ácido acético (AA), acetato de amónio (AmA), ácido fórmico (FA)) e velocidade (taxa) de fluxo de FM em modo isocrático. Como as propriedades das colunas recomendam o uso da FM em intervalo de pH 2 a 8, para evitar a degradação, então foi dada atenção a esse fator. A decisão do uso dos constituintes usados na FM, foi baseada nas referências bibliográficas, onde um ou dois antibióticos foram analisadas pelo HPLC. [61-63, 65, 67, 68]

Tabela 6 – Condições cromatográficas testados em separação dos 4 antibióticos (CFX, MTZ, SFX, TMP).

Coluna	MeOH, v/v	ACN, v/v	H ₂ O v/v	AA, v/v	FA, v/v	AmA, mM	Taxa de fluxo, mL min ⁻¹	pH
<i>Hypersil - Gold</i>	50		50				0,40	
	35		65			5	0,40	
<i>Acclaim 120</i>	50		50				0,50	
	35		65			5	0,40	
	35		64,9		0,1	5	0,80	
	49,5		49,5	1		1	0,60	
	44,5		54,5	1		1	0,50; 0,60; 0,70	
	39,5		59,5	1		1	0,70	
	34,5		64,5	1		1	0,70	
	29,5		69,5	1		1	0,70	
	26,5		72,5	1		1	0,75	
	24,5		74,5	1		1	0,75	
	45		55			1	0,70	
	40		60			1	0,70	
	35		65			1	0,70	

Coluna	MeOH, v/v	ACN, v/v	H ₂ O v/v	AA, v/v	FA, v/v	AmA, mM	Taxa de fluxo, mL min ⁻¹	pH
	15		84	1			0,75	
	35		64	1			1,00	
	25		74	1			0,75	
	20		79	1		1	0,80	
		50	49,9		0,1		0,60	
		35	65			20	0,80	
		35	65			10	0,70	
		35	64	1		10	1,00	
		30	70			10	0,70	
		25	75			10	1,00	
		25	74	1		10	1,00	
		20	80			5	1,00	
	30		69	1		1	0,75	3,054
	26,5		72,5	1		1	0,75	2,827
	25		74	1		1	0,75	2,935
	25		74	1			0,75	2,845
	23		76	1		1	1,00	2,829
	25	5	69	1		1	0,75	2,991
	23	7	69	1		1	0,75	3,008
	20	5	74	1		1	0,75; 0,65	2,967
	20	10	69	1		1	0,75	3,094
	20	10	69	1		7	0,55	3,774
	20	10	69	1		5	0,65	3,655
	15	10	74	1		5	0,65	3,741
	15	15	69,9		0,1	1	0,65	2,841
	15	15	69	1		5	0,65	3,666
	15	15	69	1		1	0,60; 0,65; 1,0	2,933
	15	10	74	1		1	0,55; 0,60; 0,65; 0,75	2,917
	15	5	79	1		1	1,0; 0,75	2,906
	15	10	74	1		8	0,65	3,669
	12,5	12,5	74	1		1	0,65	2,966
	12,5	12,5	74	1		5	0,65; 0,70	3,113
	12,5	12,5	74	1		8	0,60	3,579
	10	20	69	1		1	0,75	3,124
	10	15	74	1		1	0,75	3,029

Metanol (MeOH), acetonitrilo (ACN), ácido acético (AA), acetato de amónio (AmA), ácido fórmico (FA).

4.3 CONDIÇÕES OPERACIONAIS DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As análises da espectrometria de massa foram feitas em modo de injeção direta com as soluções dos antibióticos, em separado, com concentração 10 ppm em solução metanol e água desionizada, (50 : 50, v/v). A Tabela 7 apresenta as condições operacionais usados em MS.

Tabela 7 – Condições usadas para as análises de espectrometria de massa.

Parâmetro	Valor/categoria
Gás de dessolvatação	nitrogénio
Temperatura de dessolvatação (°C)	275
Fluxo do gás de dessolvatação (L/h)	19,29
Fluxo do gás de cone (L/h)	-0,16
Voltagem capilar (V)	15,59
Corrente elétrica de fonte (μA)	0,19
Voltagem de fonte (kV)	5,01
Voltagem da lente do tubo	30,0

4.4 CONDIÇÕES OPERACIONAIS DE SPE

Na técnica SPE foi empregue o equipamento *manifold* em modo *off-line*, com fluxo constante de 5,5 mL min⁻¹ e Pressão 10 - 15 inHg, considerados ótimos pela instrução do equipamento.

Os cartuchos Oásis HLB primeiro foram condicionados com 5 mL de metanol e depois com 5 mL da solução aquosa com pH 3,6 ajustado (preparada adicionando 1 mL de ácido acético em 100 mL de água desionizada) passado seguidamente sob vácuo. Depois de passar a amostra da água, o cartucho foi então lavado com 10 mL de água desionizada e deixado sob vácuo durante 20 - 30 minutos para secar.

A eluição foi feita com 8 mL de metanol sob efeito da força de gravidade. A quantidade de eluato (solução metanólica), foi evaporado a 25 °C com fluxo de nitrogénio e o resíduo seco foi diluído em 0,5 mL de solução metanol e água desionizada (50 : 50, v/v) para posterior análise por HPLC.

4.5 COLHEITA DA AMOSTRA DE ÁGUA

A amostra de água foi recolhida no dia 18 de setembro, sábado às 5 horas da manhã na descida do nível do mar (intervalo entre - 0,6 e - 0,4 m) de acordo com a IPMA I.P., no local Rua de Sobreiras, 4150-713, Porto, Portugal (41.146759, -8.657934) onde há saída do efluente do ETAR “Sobreiros” para o rio Douro. A recolha foi feita com garrafa de plástico (PET) de 5 L, de acordo com o procedimento adotado e descrito no subcapítulo 3.2.

No dia da colheita observavam-se nuvens altas e dois dias antes da colheita não tinha chovido. A temperatura da água foi medida no local com medidor digital e estava a 18,3 °C. A condutividade e pH foram medidas no laboratório com os aparelhos eletrónicos designados para esse tipo de medições. A condutividade apresentou valor 14,25 mS/cm e pH estava 7,62. A água depois da colheita foi logo transportada para o laboratório e filtrada com filtro de vidro com placa porosa de 2 µm e depois com filtro PTFE de 0,22 µm. Depois da filtração, a água foi guardada no frigorífico a 4 °C até processar pela técnica SPE nos dias seguintes.

Na recolha da água foram considerados alguns critérios importantes para que a água para análise podia apresentar mais interesse. Foi considerado como critério o período de recolha sem chuva, pelo menos 2-3 dias antes da recolha, espera-se que neste caso a matriz fica menos complexa. O Hospital Santo António do Porto situa-se na zona onde a ETAR “Sobreiros” faz o seu serviço. É muito provável que a descarga dos efluentes da ETAR feita no maré-alta, uma vez que não foi observado em nenhum dia a descarga na maré-baixa. Por isso considerou-se que a melhor altura deverá ser quando o nível do mar tem tendência de descida com metade da sua amplitude para minimizar a quantidade de sais existentes na água provenientes de mar.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo vão ser apresentados os resultados do trabalho elaborado e vão ser discutidos todos os aspetos essenciais emergentes relacionados com o método químico analítico desenvolvido.

5.1 ESPETROFOTOMETRIA UV-VIS

Os espectros obtidos para cada antibiótico em separado, com concentração 10 ppm estão apresentados na Figura 18. Todos os espectros foram comparados e confirmados com as referências e estão de acordo com as mesmas. [68, 69] Os espectros dos antibióticos CFX, SFX e TMP têm os picos característicos com comprimentos de onda muito próximos, 282, 270 e 287 nm respetivamente e por isso poderá existir sobreposição com a deteção espectroscópica UV-VIS quando não se alcança a separação cromatográfica adequada dos antibióticos.

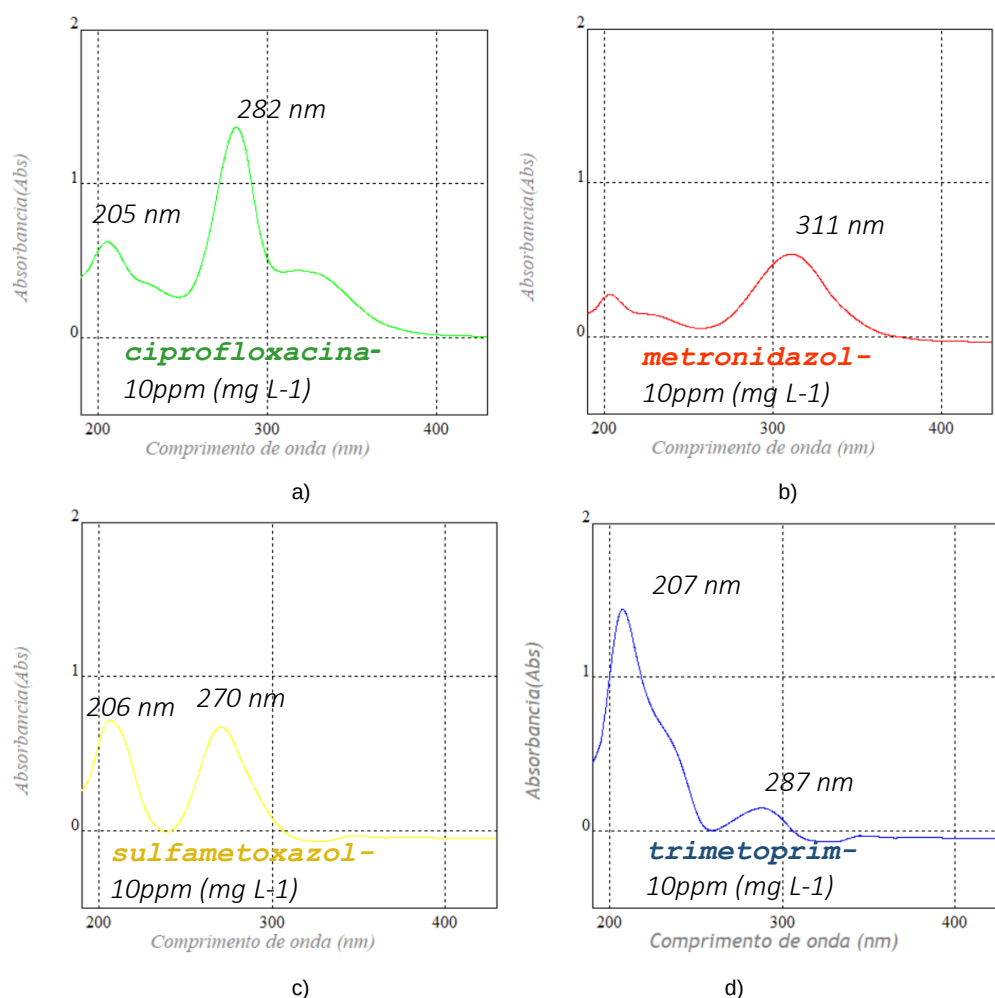


Figura 18 – Espectros UV-VIS dos antibióticos a) CFX, b) MTZ, c) SFX, d) TMP.

5.2 SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

O desenvolvimento relacionado com a análise HPLC iniciou-se, primeiro com o objetivo de encontrar a condição cromatográfica adequada. Esta alcançou-se pela análise de cada um dos antibióticos em separado até que se obtive um sinal analítico com boa intensidade e os tempos de retenção nos cromatogramas deferiram entre si, mas ficaram próximos. Posteriormente, procedeu-se à análise dos quatro antibióticos numa única solução, até ter os picos separados e um tempo de ensaio da análise eficiente.

Depois das várias tentativas da separação cromatográfica com as soluções-padrão dos antibióticos em separado, com uso da coluna “Acclaim 120” e onde na FM foram variadas as proporções dos solventes orgânicos, taxa de fluxo e ajuste pH (de acordo com a Tabela 6, subcapítulo 4.2), conseguiu-se detetar todos os quatro antibióticos. Os 4 cromatogramas, para os antibióticos CFX, MTZ, SFZ, TMP, foram obtidos, como também a primeira tentativa de separação dos 4 antibióticos numa única solução e encontram-se representados na Figura 19. Os cromatogramas apresentados tiveram tempo de retenção considerado apropriado para conseguir a separação da mistura dos quatro. As condições cromatográficas que foram definidas para análise, estão apresentadas em baixo, na Tabela 8.

Os tempos de retenção dos antibióticos CFX, MTZ, SFX, TMP nos cromatogramas em separado são 3,35; 3,49; 4,00; 2,97 minutos, respetivamente.

Tabela 8 – Condições cromatográficas para deteção/separação dos antibióticos CFX, MTZ, SFX, TMP nas soluções em separado.

Coluna	MeOH, v/v	H ₂ O v/v	AA, v/v	AmA, mM	Taxa de fluxo, mL min ⁻¹
Acclaim 120	49,5	49,5	1	1	0,60

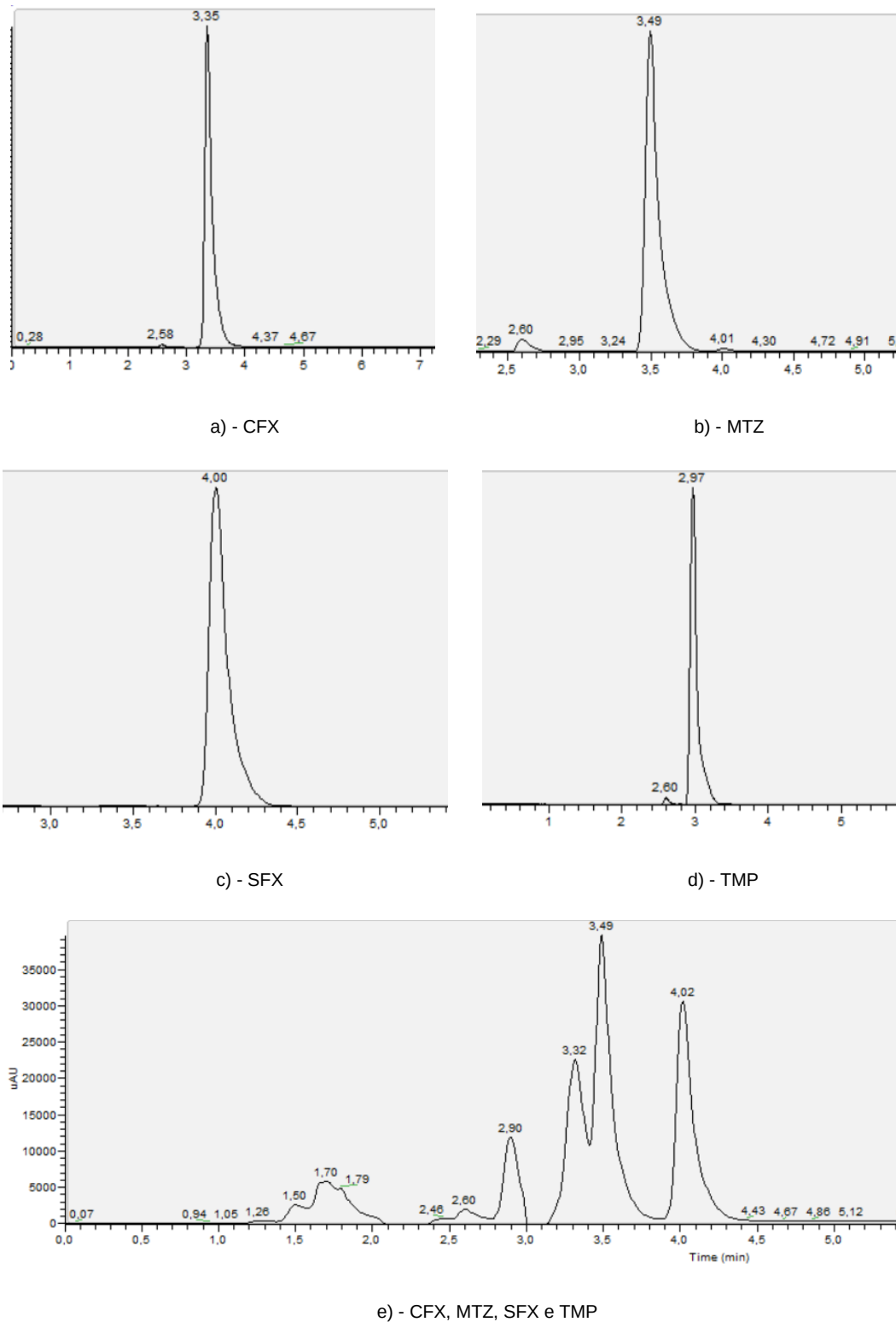


Figura 19 - Cromatogramas dos antibióticos em separado e numa única solução.

a) – ciprofloxacina, b) – metronidazol, c) – sulfametoxazol, d) – trimetoprim, e) – 4 antibióticos junto.

A separação cromatográfica dos antibióticos numa única solução envolveu a variação nas proporções dos solventes orgânicos, velocidade de FM e ajuste de pH. Foram analisados os resultados obtidos e constatou-se que a FM ajustada a pH 3,6 apresenta melhor separação cromatográfica, o que está de acordo com a literatura. [61-63, 65, 67, 68] Foram encontradas as condições consideradas ótimas para a separação cromatográfica dos antibióticos numa solução e estão apresentadas na Tabela 9. O cromatograma obtido tem os picos dos antibióticos CFX - 10,71; MTZ - 5,34; SFX - 16,97; TMP - 7,16 junto com os tempos de retenção em minutos (Figura 20).

Tabela 9 – Condições para separação cromatográfica dos antibióticos CFX, MTZ, SFX, TMP numa solução.

Coluna	MeOH, v/v	ACN, v/v	H ₂ O v/v	AA, v/v	AmA, mM	Taxa de fluxo, mL min ⁻¹	pH
Acclaim 120	15	10	74	1	8	0,65	3,669

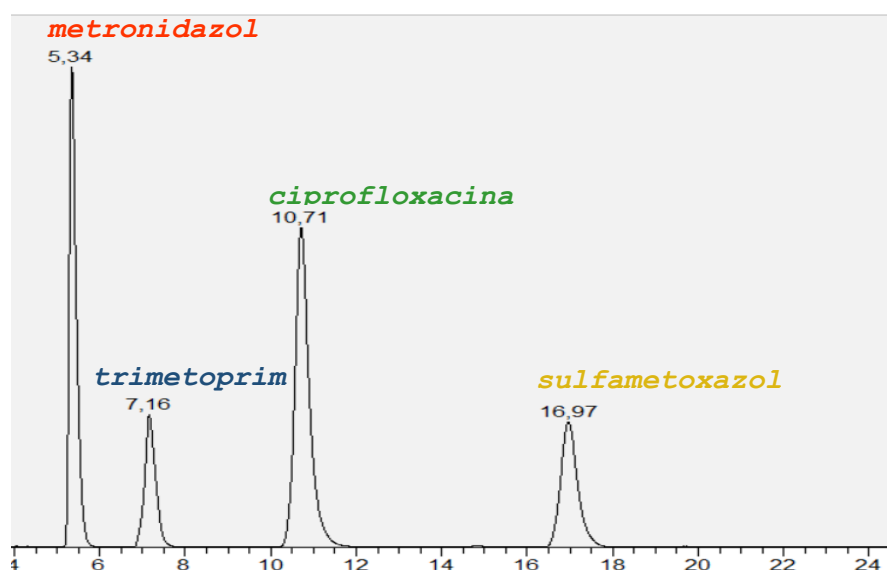


Figura 20 – Cromatograma obtido para separação dos 4 antibióticos CFX, MTZ, SFX, TMP com os respetivos tempos de retenção.

Na análise da separação cromatográfica a atribuição dos picos foi feita com base na deteção espectroscópica UV-VIS.

5.3 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As análises dos antibióticos CFX, MTZ, SFX, TMP por espectrometria de massa foram feitos em modo da injeção direta. O antibiótico MTZ apresentou dificuldade para ionização em ambos os modos (positivo e negativo), o que está relacionado com a dificuldade em geral para os compostos nitrogenados. Os espectros obtidos para CFX, SFX e TMP estão apresentados em baixo (Figura 21).

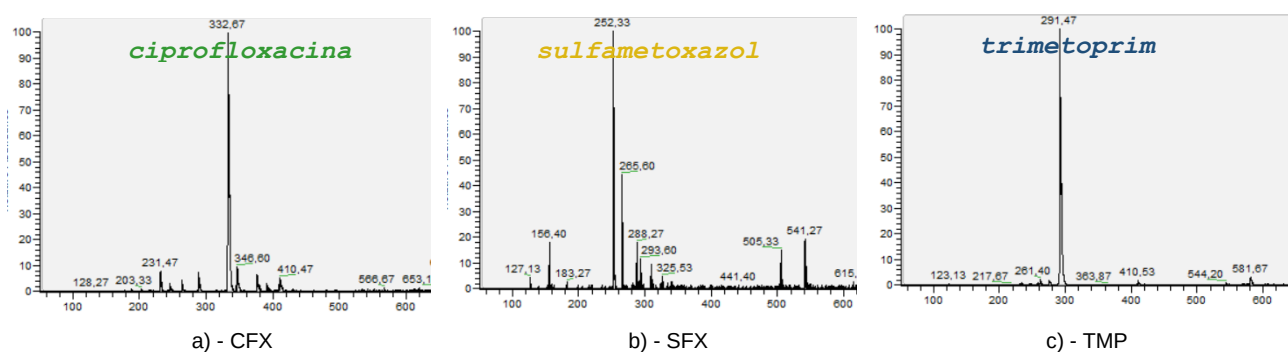


Figura 21 – Espectros MS dos antibióticos: a) ciprofloxacina, b) sulfametoxazol, c) trimetoprim

5.4 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

Antes de proceder à extração dos antibióticos na água do rio Douro foi medida a condutividade e o pH desta água que apresentou os seguintes valores: 14,25 mS cm⁻¹ e 7,62 respetivamente. A mesma água foi usada nos ensaios de recuperação (em duplicado) e na análise da água para determinação da presença dos antibióticos.

Baseado nos artigos e para prevenir que os antibióticos existentes formam complexos com iões metálicos, à água filtrada do rio Douro foi adicionado um agente quelante, a solução de EDTA (0,1 mol L⁻¹) em quantidade 20 mL para cada 1 L da amostra de água. Depois do condicionamento da água, o pH foi medido novamente e apresentou um valor de 6,05. De acordo com as condições operacionais dos cartuchos, o pH deverá estar compreendido num intervalo 2 - 8, pelo que foi concluído que o pH da amostra de água estava apropriado para esse tipo de extração, não sendo necessário ajustar o valor de pH.

Tanto para ensaios de recuperação como para os ensaios de análise foi usada a água de rio na mesma quantidade (500 mL).

Para o processo da preparação da amostra pela técnica SPE, o tempo necessário ficou por volta de 30 min para preparação do equipamento *vacuum manifold*, da água para a processar e condicionamento do cartucho. A passagem de 500 mL da água para análise demorou 1 hora e 30 min com velocidade de fluxo 5,5 mL min⁻¹. Posteriormente são necessários 20 - 30 minutos para secagem do cartucho e eluição dos analitos. A secagem dos analitos eluídos demorou ainda mais de 1 hora, pelo que no total o processo durou 3 horas e meia.

5.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Validação do método de análise dos quatro antibióticos (CFX, MTZ, SFX e TMP) pelo SPE – HPLC – UV foi feito tendo em conta critérios essenciais representados pela Norma NP EN ISO/IEC 17025. Os parâmetros de validação vão ser discutidos neste capítulo.

5.5.1 Linearidade

As curvas de calibração foram construídas usando soluções-padrão das concentrações 0,001; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 10; 50 mg L⁻¹ dos antibióticos, onde cada foi constituída por 10 soluções-padrão, com 3 repetições de cada concentração a ensaiar. Os dados obtidos podem ser observados no Anexo 2, Tabela 16. Nos ensaios com as soluções-padrão de concentração 0,001 mg L⁻¹ só se conseguiu detetar o CFX e foi possível medir a área nas 3 repetições ensaiadas. Para a reta de calibração obteve-se um coeficiente de correlação ($R^2 = 0,9994$) (Anexo 2), no entanto no teste das áreas normalizadas este valor foi excluído da reta porque ficou fora do intervalo 85 – 115 %, considerado como intervalo que compreende os valores linearizados.

Na Figura 22 estão representados graficamente os resultados para o ajuste linear com as respetivas retas de calibração para os quatro antibióticos.

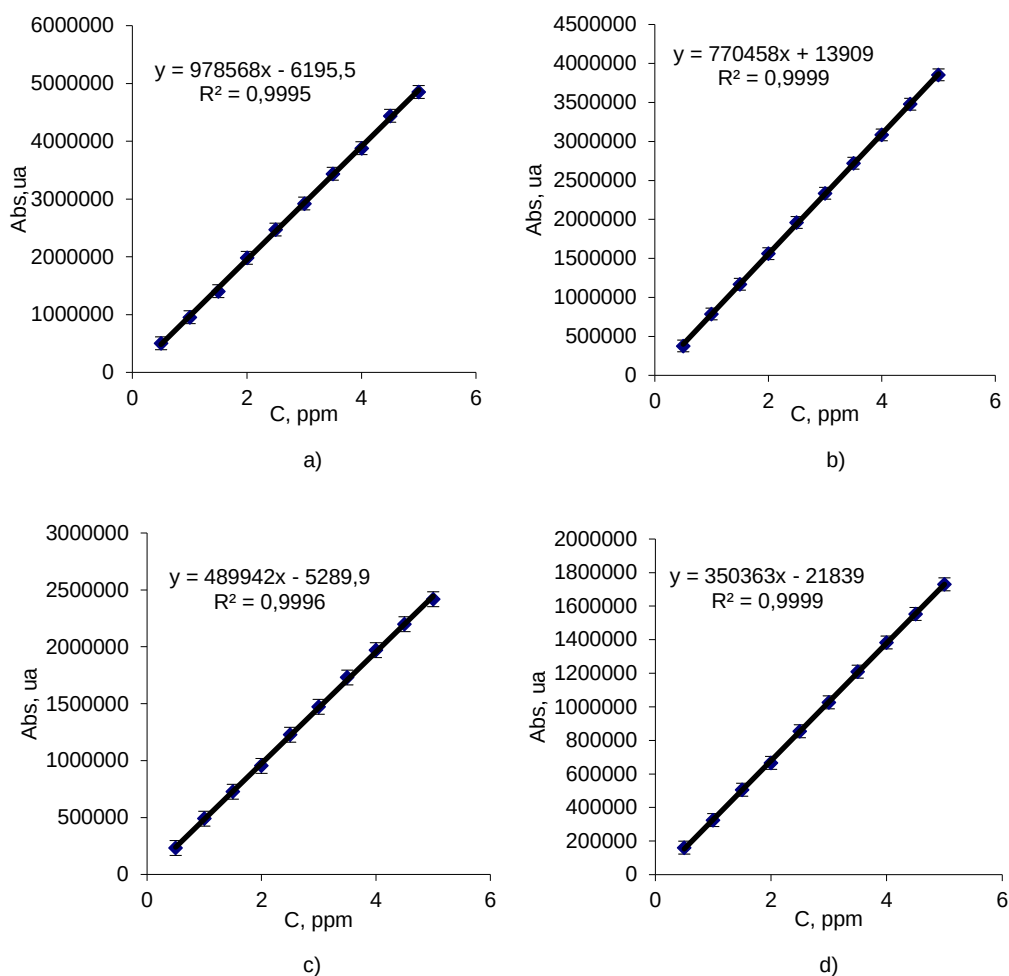
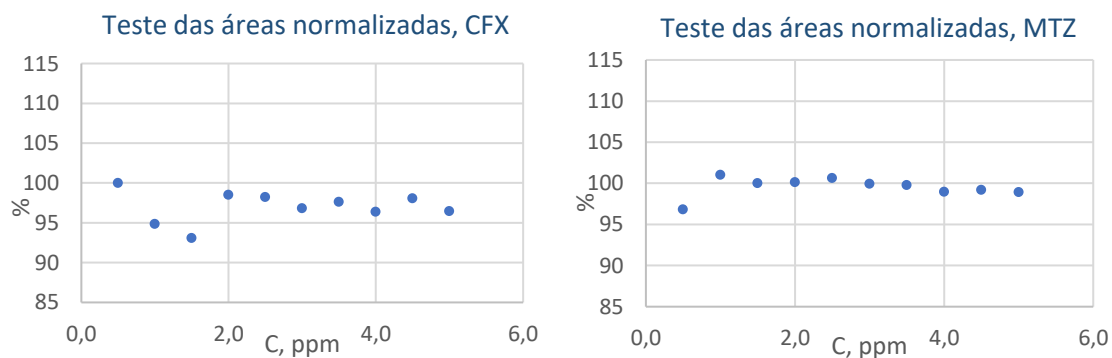


Figura 22 – Retas de calibração obtidas por HPLC-UV dos 4 antibióticos; a) - CFX, b) - MTZ, c) - SFX, e d) - TMP.

A linearidade foi avaliada através do coeficiente de correlação (R^2) das curvas de calibração e o teste das áreas normalizadas. O coeficiente de correlação de todas as retas de calibração apresentou valor superior a 0,999, pelo que as retas foram consideradas com ajuste linear de 1º grau que, posteriormente, foi confirmado com o teste das áreas normalizadas para todos os antibióticos (Figura 23)



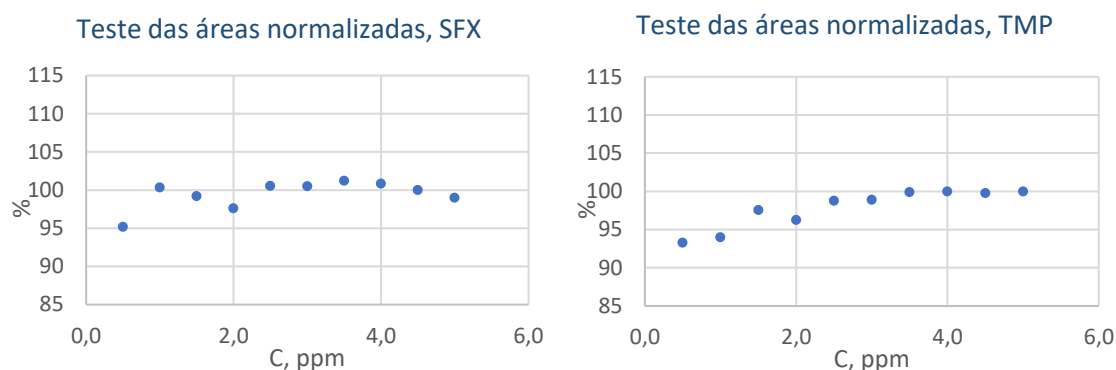


Figura 23 – Os gráficos obtidos no teste das áreas normalizadas para o HPLC-UV dos antibióticos CFX, MTZ, SFX e TMP.

Antes de proceder à avaliação da linearidade, foi avaliada a homogeneidade de variâncias no intervalo de calibração, que cobre as concentrações presentes nas amostras de água em estudo (50 – 150 %). Foram feitas medições do sinal analítico das 10 soluções-padrão de cada antibiótico em cada uma das concentrações limites (mínima (ym) e máxima (yM)). Com os resultados obtidos e usando as Equações 1 e 2 foram calculadas as variâncias e foram submetidas no teste – F unilateral. O valor F crítico com 99% de confiança apresenta um valor de 5,35. Os resultados calculados encontram-se na Tabela 10 e os valores usados para os cálculos encontram-se na Tabela 17, Anexo 2. De acordo com a estatística do teste, o F experimental de todos os antibióticos é menor do que o F tabelado, o que significa que não há diferença significativa nas variâncias.

Tabela 10 - Os valores calculados para teste F, análise da homogeneidade das variâncias.

antibiótico	CFX	MTZ	SFX	TMP
F _{experimental}	2,04	2,56	4,70	1,33
F _{tabelado}	5,35			

Deste modo, os intervalos de calibração dos antibióticos mantêm-se como apresentados na Figura 22.

5.5.2 Avaliação dos Limites (Detecção, Quantificação)

A partir dos resultados obtidos com o uso das retas de calibração foram calculados os limites da técnica instrumental LDs, LQs relativamente ao sinal analítico e do método desenvolvido LDc, LQc em ppm. Os valores calculados pelas Equações 5, 6, 7, e 8 estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Os valores obtidos para os limites analíticos em ppm.

antibiótico	Sy/x, ppm	LDs, ppm	LQs, ppm	LDc, ppm	LQc, ppm
CFX	35727	111702	351068	$0,13 \pm 0,05$	$0,37 \pm 0,05$
MTZ	13500	58458	148904	$0,06 \pm 0,03$	$0,17 \pm 0,03$
SFX	16029	47605,15	154998,2	$0,11 \pm 0,04$	$0,33 \pm 0,04$
TMP	6091	-1742	39064	$0,06 \pm 0,03$	$0,18 \pm 0,03$

Tanto o limite de detecção como o limite de quantificação foram calculados através do desvio padrão residual (Sy/x) das retas de calibração.

Nos resultados obtidos nota-se que, os limites são muito próximos no par CFX e SFX, bem como no par MTZ e TMP. Os resultados obtidos para os limites de quantificação de todos os antibióticos encontram-se abaixo do valor da solução-padrão menos concentrada de cada calibração, uma vez que, é recomendado verificar esse critério no método analítico.

5.5.3 Sensibilidade

De acordo com a definição deste parâmetro e como na determinação dos antibióticos foram considerados como apropriados as funções de 1º grau (linear), a sensibilidade da técnica instrumental (sensibilidade da calibração) é representada pelos declives (m) das retas de calibração. Na Tabela 12, apresentada em baixo, encontram-se os declives obtidos.

Tabela 12 – Os declives da sensibilidade da calibração por HPLC-UV dos CFX, MTZ, SFX e TMP.

antibiótico	m, ua/ppm	Δm , ua/ppm
CFX	978568	7867
MTZ	770458	2973
SFX	489942	3530
TMP	350363	1342

5.5.5 Precisão (Repetibilidade)

No estudo da precisão foi feita a avaliação de repetibilidade do método e foram formados os coeficientes de variação (CV).

Os resultados estão apresentados na Tabela 13. De acordo com o critério coeficiente da variação tem que ser menor a 2. Pela análise dos dados conclui-se que, os antibióticos CFX, MTZ e SFX estão de acordo com o referido critério e o antibiótico TMP tem CV de 6,7 que é maior do que 2.

Tabela 13 – Os resultados obtidos para repetibilidade dos CFX, MTZ, SFX e TMP.e avaliados pelo coeficiente de variação (CV)

antibiótico	CFX	MTZ	SFX	TMP
Sr	5541	5576	4511	10012
media	502565	384209	230195	150132
CV	1,1	1,5	2,0	6,7

Como as análises dos 4 antibióticos foram feitos em quantidade de 10 ensaios de cada antibiótico em 4 dias consecutivos, notou-se que no dia quando foram feitos os ensaios de antibiótico TMP, era o dia muito quente e da tarde temperatura dentro do laboratório chegou até 28 graus celsius. Nos dados apresentados na Tabela 18, Anexo 2 para o cálculo da repetibilidade, observa-se, que nos ensaios do TMP até incluindo nº 4, os valores são maiores, mas coerentes entre si e nos restantes ensaios valores são

menores, mas também coerentes. Podia estar em causa influencia da temperatura nesse dia.

5.5.6 Controlo de qualidade (ensaio de recuperação)

Nos ensaios de recuperação pela técnica SPE foi usada água do rio Douro, para minimizar os efeitos da matriz que podiam influenciar nos resultados da análise.

Nos ensaios de recuperação, aos 500 mL de água do rio que foi considerada como amostra A_{m1} (fortificada com solução-padrão com posterior extração), foram adicionados 0,024 mL de solução-padrão (50 ppm) de cada antibiótico. Na amostra A_{m2} (extraída com posterior fortificação com solução-padrão) depois da eluição também foram adicionados 0,024 mL de cada solução-padrão (50 ppm) dos antibióticos em trabalho. Depois da secagem e dissolução dos analitos extraídos com metanol e água, o volume de 500 μ L de cada amostra foi analisado por HPLC – UV.

A partir dos resultados obtidos nos ensaios em duplicado e de acordo com o descrito no subcapítulo 3.4.8, foram calculadas as taxas de recuperação dos antibióticos. Os valores calculados encontram-se na Tabela 14.

A recuperação de todos os antibióticos na amostra considerou-se aceitável para este tipo da técnica de preparação da amostra e fica dentro do intervalo 80 – 103 %. Esses dados mostram a eficiência da técnica de preparação da amostra de água, elaborada por SPE com posterior análise por HPLC – UV.

Tabela 14 – Os valores médios das áreas obtidos nos ensaios de recuperação pela técnica SPE dos CFX, MTZ, SFX e TMP com as respetivas taxas calculadas.

Antibiótico	Média das 3 áreas, ua		Recuperação %	Média Recuperação %
	A_{m1} fortificada extraída	A_{m2} extraída fortificada		
CFX	2781490	3043474	91%	89%
	2648533		87%	
MTZ	767651	604575	127%	103%
	474145		103%	
SFX	1117712	1457578	77%	80%
	1204467		83%	
TMP	918076	931320	99%	103%
	1002120		108%	

5.6 ANÁLISE DA AMOSTRA DE ÁGUA DO RIO DOURO

Na análise de água do rio Douro depois da preparação da amostra pela técnica SPE, devido à existência da matriz complexa que provocou o aumento da linha de base, foi usado o método da adição-padrão, para o cálculo das concentrações dos antibióticos.

O cromatograma obtido para o branco e a primeira adição-padrão encontra-se a seguir, na Figura 24.

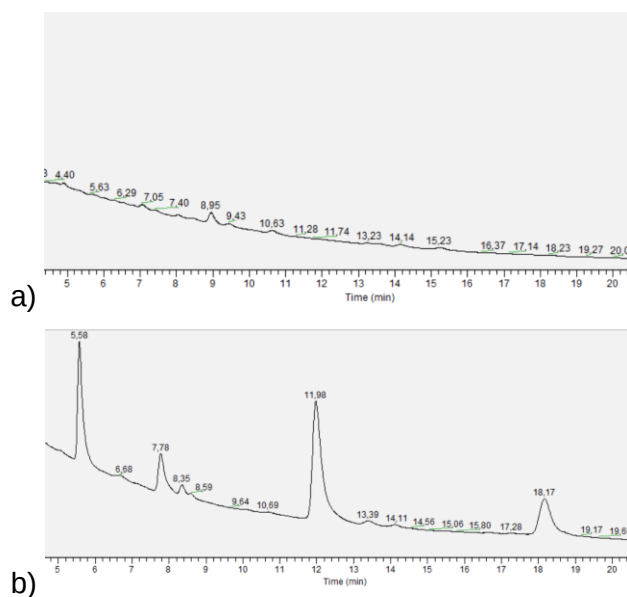


Figura 24 – Os cromatogramas da amostra de água do rio Douro: a) branco, b) 1ª adição padrão

A amostra extraída do cartucho para a análise depois da secagem e diluição com metanol e água desionizada foi dividida em 5 partes por 100 μ L às quais foram adicionados diferentes volumes das soluções-padrão (50 ppm) dos antibióticos e foram analisadas por HPLC - UV. Os dados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 15 – Os volumes das soluções-padrão adicionados e as áreas obtidas por HPLC na análise da água.

antibiótico	Volume da solução-padrão de cada antibiótico adicionado (50 ppm), μ L				
	6	8	10	12	14
	Média das 3 Áreas, ua				
CFX	2648533	2788632	4148848	5046385	5358330
MTZ	474145	853362,3	1089307	1238902	1321115
SFX	1274467	1784364	2028564	2465289	2560134
TMP	1022120	1233752	1410348	1554496	1593342

Com os dados obtidos foram construídas as retas de adição-padrão (Figura 21) e pela extrapolação foram calculadas as concentrações dos antibióticos.

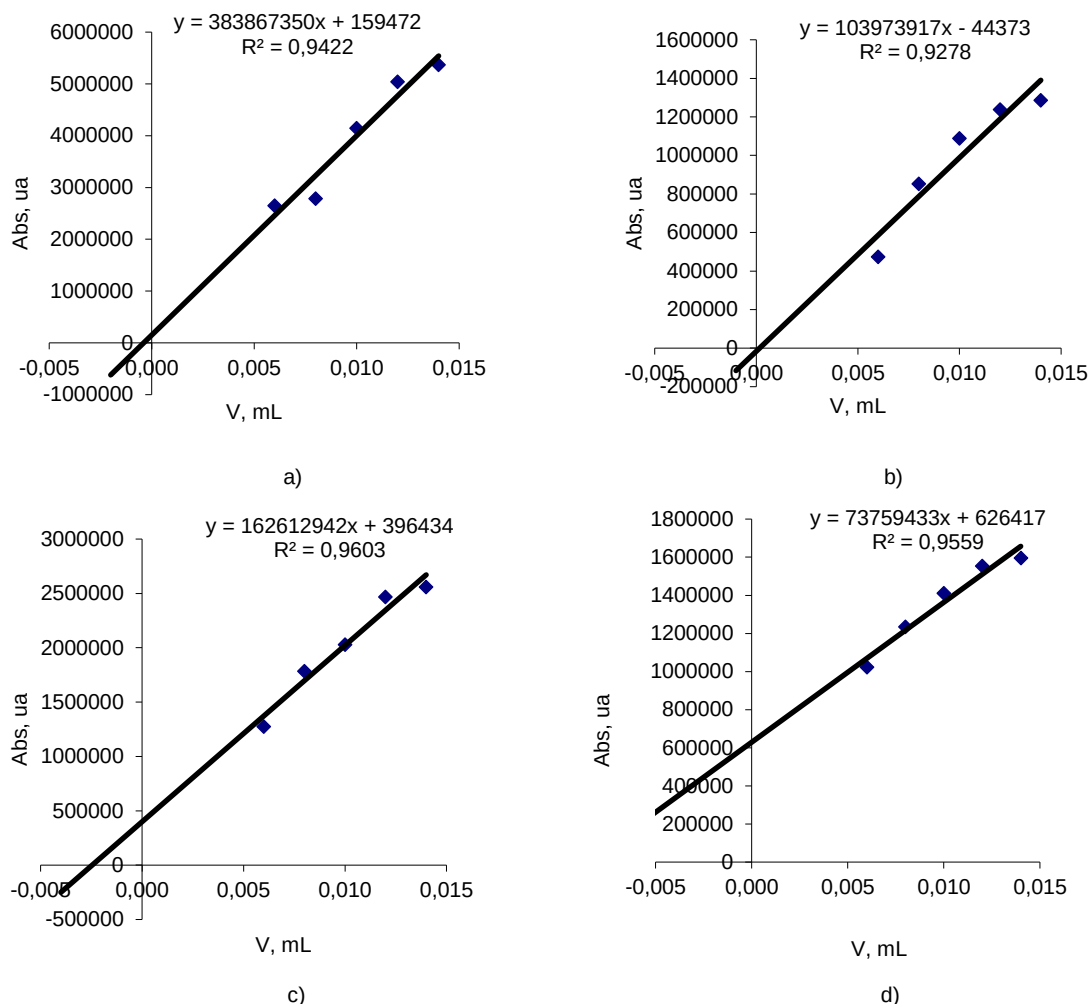


Figura 25 – Retas de adição-padrão dos 4 antibióticos obtidas por HPLC-UV em análise da água do rio Douro; a) - CFX, b) - MTZ, c) - SFX, e d) - TMP.

As concentrações da água do rio Douro para os antibióticos, considerando as taxas de recuperação: CFX – $0,05 \pm 0,19 \mu\text{g L}^{-1}$; SFX – $0,30 \pm 0,18 \mu\text{g L}^{-1}$; TMP – $0,83 \pm 0,23 \mu\text{g L}^{-1}$. Os dados da reta de adição-padrão do antibiótico MTZ não permitem calcular a concentração devido à ordenada na origem negativa. O CFX apresentou baixa linearidade comparando com os SFX e TMP.

Os valores calculados das concentrações dos antibióticos são semelhantes aos que se encontram nos outros trabalhos científicos.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

No trabalho apresentado pretendeu-se desenvolver, otimizar e validar o método *multi-test* da determinação e quantificação dos quatro antibióticos Ciprofloxacina, Metronidazol, Sulfametoxazol e Trimetoprim pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção UV- visível e o uso da técnica de Extração em Fase Sólida para pré-concentração dos analitos em amostra de água do rio Douro.

O processo de desenvolvimento iniciou-se com as análises de cromatografia líquida dos padrões dos antibióticos em separado para encontrar as condições operacionais que permitiriam uma boa separação cromatográfica dos quatro antibióticos numa única solução. Durante o desenvolvimento foram avaliadas duas colunas de fase reversa Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™ C18 (150 mm; 2,1 mm; 5 µm) e Thermo Scientific™ Acclaim™ 120 C18 (150 mm; 4,6 mm; 3 µm) com diferente diâmetro interno e diferente tamanho das partículas, mas com o mesmo comprimento. Também foram avaliados os constituintes de fase móvel, taxa de fluxo e o pH. Constatou-se que a coluna Acclaim™ 120 com diâmetro maior, mas, com menor tamanho das partículas de empacotamento, é mais apropriada para estes compostos. Foi também avaliada e confirmada a influência do pH, tendo-se concluído que com a coluna Acclaim™ 120 o pH ótimo para separação é 3,6.

Com a otimização das condições de execução da cromatografia líquida, foi possível desenvolver um método com elevada sensibilidade, em que no ensaio por HPLC os 4 antibióticos Ciprofloxacina, Metronidazol, Sulfametoxazol e Trimetoprim podem ser analisados em 20 minutos.

Os picos cromatográficos foram verificados com os espectros UV-VIS e confirmados com os artigos científicos encontrados. A análise da espectrometria de massa foi feita em modo de injeção direta e também serviu como confirmação dos analitos. Unicamente o Metronidazol apresentou dificuldade de ionização em ambos os modos (positivo e negativo).

No processo de validação do método foi feita a avaliação dos diferentes parâmetros que se iniciou com a construção das retas de calibração no intervalo de concentrações 0,001 – 5 ppm. Depois da rejeição da concentração mínima de 0,001 ppm da reta de calibração do CFX (foi conseguido obter sinal analítico para essa concentração só para o CFX), pela avaliação da linearidade pelo teste das áreas

normalizadas, nas retas de calibração no intervalo de concentração 0,5 – 5,0 ppm foi obtida boa linearidade e confirmada com o coeficiente de correlação ($R^2 > 0,999$).

Também foi avaliada a homogeneidade das variâncias em cada conjunto dos resultados para a concentração mínima e máxima no sinal obtido pelo HPLC e confirmou-se que não há diferença significativa entre elas em todos os antibióticos. Já na avaliação da precisão (repetibilidade) o antibiótico Trimetoprim apresentou coeficiente de variação maior do que critério definido. Na avaliação dos valores usados para cálculos de repetibilidade do TMP foi concluído que devido ao aumento da temperatura no laboratório no dia da execução dos ensaios poderia ter lugar a influência dessa temperatura na estabilidade de solução-padrão e/ou funcionamento do equipamento HPLC.

Na recolha da água para análise considerou-se que a água pode apresentar mais interesse se for recolhida num período sem chuva, pelo menos 2 - 3 dias antes da recolha. Uma outra condição que se considerou importante foi a descarga do efluente da ETAR, que faz serviço na zona onde se situa o Hospital Santo António e que provavelmente feita na maré-alta, por que nenhum dia foi observada a descarga na maré-baixa. Por isso considerou-se que a melhor altura deverá ser quando o nível do mar tem tendência de descida com metade da sua amplitude para minimizar a quantidade de sais existentes na água de mar.

A técnica de Extração em Fase Sólida foi usada na preparação da amostra de água do rio Douro, onde foi utilizado o sistema *Vacuum Manifold* com controlo da pressão e fluxo de passagem da amostra. Foram feitos ensaios em duplicado para avaliar a recuperação dos analitos. As taxas dos antibióticos recuperados variam num intervalo 80 - 103 %. Na análise de água do rio Douro depois da preparação da amostra pela técnica SPE, devido à existência da matriz complexa que provocou o aumento da linha de base, foi usado o método da adição-padrão, para o cálculo das concentrações dos antibióticos. Os antibióticos Ciprofloxacina, Sulfametoxazol e Trimetoprim foram encontrados em quantidades ($\mu\text{g L}^{-1}$) $0,05 \pm 0,19$ (CFX); $0,30 \pm 0,18$ (SFX); $0,83 \pm 0,23$ (TMP). Para o Metronidazol a ordenada na origem é negativa, o que mostra a incapacidade de o detetar nesta matriz. Com a matriz da amostra não foi possível obter boa linearidade para Ciprofloxacina e o erro é grande.

Com a perspetiva de implementação do método desenvolvido considera-se fazer análises de água do rio Douro nos próximos meses, para ver a dinâmica nas concentrações dos antibióticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Revista da Faculdade de Letras 129 ALEXANDER FLEMING (1881-1995) HISTÓRIA Porto, III Série, vol. 6, 2005, pp. 129-151
2. Pharmaceutical Manufacturing Market Size, Share & Trends Analysis Report By Molecule Type, By Drug Development Type, By Formulation, By Routes of Administration, By Sales Channel, By Age Group, And Segment Forecasts, 2021 – 2028
3. Van Boeckel, T. P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B. T., Levin, S. A., & Laxminarayan, R. (2014). Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(8), 742–750. doi:10.1016/s1473-3099(14)70780-7
4. Tim aus der Beek, T., Weber, F. A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., & Küster, A. (2016). Pharmaceuticals in the environment--Global occurrences and perspectives. *Environmental toxicology and chemistry*, 35(4), 823–835. <https://doi.org/10.1002/etc.3339>
5. Emily E. Burns, Laura J. Carter, Jason Snape, Jane Thomas-Oates & Alistair B.A. Boxall (2018) Application of prioritization approaches to optimize environmental monitoring and testing of pharmaceuticals, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 21:3, 115-141, DOI: 10.1080/10937404.2018.1465873
6. www.statista.com/statistics/783145/pharmaceutical-sector-growth-forecast-worldwide-by-country/
7. Lienert, J., Bürki, T., & Escher, B. I. (2007). Reducing micropollutants with source control: substance flow analysis of 212 pharmaceuticals in faeces and urine. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 56(5), 87–96. <https://doi.org/10.2166/wst.2007.560>
8. Ternes, T. A., & Joss, A. (Eds.). (2006). Human pharmaceuticals, hormones and fragrances. The challenge of micropollutants in urban water management. <https://doi.org/10.2166/9781780402468>
9. Keast, G., Johnston, R., Unicef Handbook on Water Quality. UNICEF. 2008.
10. Pollution: causes, effects, and control. Roy M. Harrison (5th ed.). Cambridge. 2013. ISBN 978-1-78262-560-5. OCLC 1007100256.
11. Von Sperling, M. (2015). "Wastewater Characteristics, Treatment and Disposal". *Water Intelligence Online*. 6: 9781780402086. doi:10.2166/9781780402086. ISSN 1476-1777.
12. Zabotto Alessandro, 2019, Estudos sobre impactos ambientais: uma abordagem contemporânea, book, 978-85-7170-009-3

13. Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia, Diretiva 2000/60/CE. Jornal Oficial da União Europeia, 2000. www.apambiente.pt
14. Lei 58/2005, Diário da República de 29 de dezembro de 2005. www.apambiente.pt
15. O Decreto-Lei n.º 236/98 www.apambiente.pt
16. O Decreto-Lei n.º 103/2010 www.apambiente.pt
17. Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia, Diretiva 2008/105/CE. Jornal Oficial da União Europeia, 2008. www.apambiente.pt
18. O Decreto-Lei n.º 243/2011 www.apambiente.pt
19. O Decreto-Lei n.º 152/2017 www.apambiente.pt
20. O Decreto-Lei n.º 306/2007 www.apambiente.pt
21. Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia, Diretiva 2001/39/UE. Jornal Oficial da União Europeia, 2013. www.apambiente.pt
22. Verlicchi, P., Al Aukidy, M., & Zambello, E. (2012). Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment--a review. *The Science of the total environment*, 429, 123–155. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.028>
23. Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Galletti, A., Petrovic, M., & Barceló, D. (2012). Hospital effluent: investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *The Science of the total environment*, 430, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.055>
24. Kosma, C. I., Kapsi, M. G., Konstas, P. G., Trantopoulos, E. P., Boti, V. I., Konstantinou, I. K., & Albanis, T. A. (2020). Assessment of multiclass pharmaceutical active compounds (PhACs) in hospital WWTP influent and effluent samples by UHPLC-Orbitrap MS: Temporal variation, removals and environmental risk assessment. *Environmental research*, 191, 110152. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110152>
25. Paíga, P., Correia, M., Fernandes, M. J., Silva, A., Carvalho, M., Vieira, J., Jorge, S., Silva, J. G., Freire, C., & Delerue-Matos, C. (2019). Assessment of 83 pharmaceuticals in WWTP influent and effluent samples by UHPLC-MS/MS: Hourly variation. *The Science of the total environment*, 648, 582–600. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.129>
26. Burton, F.L., Tchobanoglous, G., Tsuchihashi, R., Stensel, H.D., Metcalf & Eddy, I., *Wastewater Engineering: Treatment and Resource Recovery*, 9780073401188, 2013, McGraw-Hill Education
27. Diário da República. Portaria n.º 108/2013, de 15 de março de 2013.
28. Gould K (March 2016). "Antibiotics: from prehistory to the present day". *The*

- Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 71 (3): 572–5. doi:10.1093/jac/dkv484. PMID 26851273.
29. Gualerzi CO, Brandi L, Fabbretti A, Pon CL (4 December 2013). Antibiotics: Targets, Mechanisms and Resistance. John Wiley & Sons. p. 1. ISBN 978-3-527-33305-9.
30. Zhang GF, Liu X, Zhang S, Pan B, Liu ML. Ciprofloxacin derivatives and their antibacterial activities. Eur J Med Chem. 2018 Feb 25;146:599-612. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.01.078. Epub 2018 Feb 4. PMID: 29407984.
31. Wilson, C. O., Gisvold, O., Block, J. H., & Beale, J. M. (2004). Wilson and Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
32. Simms-Cendan, J. S. (1996). Metronidazole. Primary Care Update for Ob/Gyns, 3(5), 153–156. [https://doi.org/10.1016/1068-607X\(96\)00016-9](https://doi.org/10.1016/1068-607X(96)00016-9)
33. Capitan-Vallvey, L. F., Ariza, A., Checa, R., & Navas, N. (2002). Determination of five nitroimidazoles in water by liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 978(1–2), 243–248. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01355-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01355-9)
34. Sanco/3400/2005, European Commission Staff Working Document on the Implementation of National Residue Monitoring Plans in the Member States in 2004, Annex 21–22, 2005.
35. Petri W.A., Jr. (2015). Sulfonamides, trimethoprim-sulfamethoxazole, quinolones, and agents for urinary tract infections. Brunton L.L., & Chabner B.A., & Knollmann B.C.(Eds.), Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12e. McGraw Hill. <https://accessanesthesiology.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1613§ionid=102163156>
36. NP EN ISSO/IEC 17025:2017. Requisitos Gerais de competência para laboratórios de ensaios de calibração, 2017.
37. RELACRE, Guia Relacre 28 – Amostragem em Águas. 2017
38. Skoog, Douglas A.; Holler, F. James; Crouch, Stanley R. (2007). Principles of Instrumental Analysis (6th ed.). Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole. pp. 169–173. ISBN 978-0-495-01201-6.
39. Collins, C. H., Michael Tswett e o “nascimento” da Cromatografia. Scientia Chromatographica 2009, 1, 7-20.
40. Maldaner, L.; Jardim, I., O estado da arte da cromatografia líquida de ultraeficiência. Química Nova 2009, 32, 214-222.
41. Srivastava, B.; Sharma, B. K.; Baghel, U. S., Ultra Performance Liquid

- Chromatography (UPLC): A Chromatography Technique. International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance 2010, 2, 19-25
42. Colin F. Poole; The essence of chromatography, Elsevier Science, B, V, 2003. ISBN: 0444501983
43. https://pt.m.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:HPLC_esquema.png
44. Ettre, L. S., The Birth of Partition Chromatography. LCGC North America 2001, 19, 506-512.
45. Beesley, T. E., Evolution of Chromatography: One Scientist's 51-Year Journey. Lc Gc North America 2010, 28, 960-971.
46. Kienitz, H. Einführung, in Massenspektrometrie; Kienitz, H., editor; Verlag Chemie: Weinheim, 1968.
47. Gross J.H. (2004) Introduction. In: Mass Spectrometry. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-36756-X_1
48. Campíns-Falcó, P., Sevillano-Cabeza, A., Herráez-Hernández, R., Molins-Lagua, C., Moliner-Martínez, Y., & Verdú-Andrés, J. (2012). Solid-Phase Extraction and Clean-Up Procedures in Pharmaceutical Analysis. Encyclopedia of Analytical Chemistry. doi:10.1002/9780470027318.a1920.p
49. Hennion, M.-C. (1999). Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 856(1-2), 3–54. doi:10.1016/s0021-9673(99)00832-8
50. Sadutto, D., & Picó, Y. (2020). Sample Preparation to Determine Pharmaceutical and Personal Care Products in an All-Water Matrix: Solid Phase Extraction. Molecules, 25(21), 5204. doi:10.3390/molecules25215204
51. Campíns-Falcó, P., Sevillano-Cabeza, A., Herráez-Hernández, R., Molins-Lagua, C., Moliner-Martínez, Y., & Verdú-Andrés, J. (2012). Solid-Phase Extraction and Clean-Up Procedures in Pharmaceutical Analysis. Encyclopedia of Analytical Chemistry. doi:10.1002/9780470027318.a1920.p
52. Riley Christopher M. 340; Development and validation of analytical methods. ISBN: 0- 08042792-8 Ludwig Huber; Validation and Qualification in Analytical Laboratories, CRC Press LLC, 1999. ISBN: 1-57491-080-9
53. D. Brynn Hibbert; Quality Assurance for the Analytical Chemistry Laboratory, Oxford University Press, 2007. ISBN: 978-0-19-516212-7
54. Paul De Bièvre and Helmut Günzler (Eds); Validation in Chemical Measurement, Springer, 2010. ISBN: 978-3-642-05867-7
55. Associação de Laboratórios Acreditados de Lisboa, "Guia RELACRE 13 - Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química," RELACRE, Lisboa, 2000.

56. www.ipac.pt/docs/publicdocs/requisitos/OGC001_GuiaAplicacao17025_v20181231.pdf
57. Cassiano N, al e. 2009. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Química Nova* 32:1021-30
58. ISO 8466-1:1990 Water quality — Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics — Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function, www.iso.org
59. Miller, J. N. (James N.), 1943— Statistics and chemometrics for analytical chemistry / James N. Miller and Jane C. Miller. — 5th ed. p. cm. Includes bibliographical references. ISBN 0-13-129192-0 (pbk.)
60. RELACRE, Guia Relacre 13: Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química. 2000
61. Omotola, E. O., & Olatunji, O. S. (2020). Quantification of selected pharmaceutical compounds in water using liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry (LC-ESI-MS). *Heliyon*, 6(12), e05787. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05787>
62. Sun, L., Chen, L., Sun, X., Du, X., Yue, Y., He, D., Xu, H., Zeng, Q., Wang, H., & Ding, L. (2009). Analysis of sulfonamides in environmental water samples based on magnetic mixed hemimicelles solid-phase extraction coupled with HPLC-UV detection. *Chemosphere*, 77(10), 1306–1312. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.09.049>
63. Iglesias, A., Nebot, C., Miranda, J. M., Vázquez, B. I., & Cepeda, A. (2012). Detection and quantitative analysis of 21 veterinary drugs in river water using high-pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Environmental science and pollution research international*, 19(8), 3235–3249. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-0830-3>
64. Errayess, S. A., Lahcen, A. A., Idrissi, L., Marcoaldi, C., Chiavarini, S., & Amine, A. (2017). A sensitive method for the determination of Sulfonamides in seawater samples by Solid Phase Extraction and UV-Visible spectrophotometry. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 181, 276–285. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.03.061>
65. Brenner, C. G. B., Mallmann, C. A., Arsand, D. R., Mayer, F. M., & Martins, A. F. (2010). Determination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim and Their Metabolites in Hospital Effluent. *CLEAN - Soil, Air, Water*, 39(1), 28–34. doi:10.1002/clen.201000162
66. Nagaraja, P., Yathirajan, H.S., Sunitha, K.R., & Vasantha, R.A. (2002). A new, sensitive, and rapid spectrophotometric method for the determination of sulfa drugs. *Journal of AOAC International*, 85 4, 869-74

67. Wagil, M., Maszkowska, J., Białk-Bielińska, A., Caban, M., Stepnowski, P., & Kumirska, J. (2015). Determination of metronidazole residues in water, sediment and fish tissue samples. *Chemosphere*, 119, S28–S34. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.12
68. Hafez, Hani & Elshanawany, A.A. & Abdelaziz, L.M. & Mohram, M.S. (2015). Design of experiment utilization to develop a simple and robust RP-UPLC technique for stability indicating method of ciprofloxacin hydrochloride and metronidazole in tablets. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*. 10. 84-105.
69. Zhou, Z., Jiang, J.Q. Detection of ibuprofen and ciprofloxacin by solid-phase extraction and UV/Vis spectroscopy. *J Appl Spectrosc* 79, 459–464 (2012). <https://doi.org/10.1007/s10812-012-9623-1>
70. Fonte: pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2764; 4173; 5329; 5578
71. Frank M. Snowden é Andrew Downey Orrick Professor Emérito de História e História da Medicina na Universidade de Yale. Além de Epidemias e Sociedade, é autor de *The Conquest of Malaria: Italy, 1900-1962* e *Naples in the Time of Cholera, 1884-1911*.
72. García-Campaña, A.M., Gámiz-Gracia, L., Lara, F.J. et al. Applications of capillary electrophoresis to the determination of antibiotics in food and environmental samples. *Anal Bioanal Chem* 395, 967–986 (2009). <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2867-9>
73. Francisco J. Lara, Ana M. García-Campaña, Christian Neusüss, Fermín Alés-Barrero, Determination of sulfonamide residues in water samples by in-line solid-phase extraction-capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, Volume 1216, Issue 15, 2009, Pages 3372-3379, ISSN 0021-9673, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.01.097>.
74. Wen, Y., Li, J., Zhang, W. and Chen, L. (2011), Dispersive liquid–liquid microextraction coupled with capillary electrophoresis for simultaneous determination of sulfonamides with the aid of experimental design. *ELECTROPHORESIS*, 32: 2131-2138. <https://doi.org/10.1002/elps.201100142>
75. D. N. Ermolenko, S. A. Eremin, A. A. Mart'ianov, A. V. Zherdev & B. B. Dzantiev (2007) A New Generic Enzyme Immunoassay for Sulfonamides, *Analytical Letters*, 40:6, 1047-1062, DOI: 10.1080/00032710701296945

ANEXO 1

A União Europeia adotou uma política global para garantir e permitir a qualidade das águas subterrâneas e superficiais da Europa, criando a Diretiva Quadro de Água (DQA), um diploma legislativo, que introduziu o nível universal europeu para a gestão, proteção e preservação de todas as águas subterrâneas e superficiais nos países membros. A implementação e cumprimento dos objetivos desta Diretiva foi transposta para o nível nacional através dos Lei da Água e os Decretos-Lei que estabelecem os valores e critérios de qualidade de modo a proteger o ambiente aquático e assegurar a qualidade da água em função dos seus fins.

O quadro apresentado em baixo pretende mostrar os diplomas legislativos relativamente às águas em Portugal.

Diretiva Quadro de Água (DQA)	91/271/CEE 21 de maio	
	98/83/CE 3 de novembro	
	2000/60/CE, 23 de outubro	
	2008/105/CE, 16 de dezembro	
	2013/39/EU, 12 de agosto	
Lei da Água	58/2005 29 de dezembro	Estabelece o enquadramento para a gestão das águas superficiais, designadamente as águas interiores, de transição e costeiras, e das águas subterrâneas. Alterada pelos Decretos-Lei n.ºs 245/2009, de 22 de setembro; 60/2012, de 14 de março e 130/2012, de 22 de junho e pelas Leis n.º 42/2016, de 28 de dezembro e n.º 44/2017, de 19 de junho.
Águas Residuais Urbanas		
Decreto- Lei	152/97, 19 de junho	transpõe a Diretiva 91/271/CEE do Conselho Europeu, de 21 de maio de 1991, aprovando as disposições aplicáveis à recolha, tratamento e descarga de águas residuais urbanas no meio

		aquático assim como a lista de identificação de zonas sensíveis e de zonas menos sensíveis para o território continental.
	77/2021, 27 de agosto	procede à 7. ^a alteração do quadro aplicável às zonas sensíveis relativas ao tratamento de águas residuais urbanas
Portaria	188/2021, 8 de setembro	identifica as novas zonas sensíveis e menos sensíveis.
Normas de Qualidade Ambiental		
Decreto-Lei	236/98, 1 de agosto	estabeleceu um conjunto de valores de parâmetros e substâncias, definindo Valor Máximo Recomendado (VMR) e Valor Máximo Admissível (VMA) para a água que se aplica ao consumo humano, águas aquícolas, águas balneares e águas de rega. Esse diploma estabelece que a água destinada para consumo não deve trazer o risco à saúde do consumidor, ser agradável ao paladar dos consumidores e não deve causar a destruição do sistema de abastecimento. Ainda se esclarece sobre os valores VMR e VMA: VMR é o valor que, deve ser respeitado ou não excedido e o VMA é o valor, que não deve ser ultrapassado, pelo risco de contaminação da água.
	103/2010, 24 de setembro (revoga 236/98)	transpõe DQA 2008/105/CE respetivo a alguns parâmetros das águas superficiais, nomeadamente, cádmio, chumbo, hidrocarbonetos dissolvidos ou emulsionados, hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, mercúrio, níquel, pesticidas totais, bifenilos policlorados, substâncias extraídas com clorofórmio. Estabelece as normas de qualidade ambiental, com a finalidade de controlar a poluição das águas superficiais. Nos compostos considerados como contaminantes ambientais

		estão incluídos os subprodutos de desinfecção da água de consumo, nomeadamente: diclorometano, pentaclorobenzeno, triclorobenzenos e clorofórmio.
	218/2015, 7 de outubro (altera 103/2010)	transpõe a DQA n.º 2013/39/EU, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 12 de agosto de 2013.
Água para Consumo Humano		
Decreto- Lei	243/2001, 5 de setembro	transpõe para ordem jurídica interna a Directiva n.º 98/83/CE de 3 de novembro e definiu que no caso dos resultados obtidos não conformes, relativamente aos valores paramétricos fixados, devem ser comunicados pela entidade gestora às autoridades competentes para investigar e assegurar a tomada de medidas de ações corretivas, para segurança da qualidade da água.
	306/2007, 27 de agosto (altera 243/2001)	estabelece o regime da qualidade da água destinada ao consumo humano.
	152/2017, 7 de dezembro (revogou 243/2001, altera 306/2007)	transpõe DQA 2013/39/EU estabelecendo os requisitos legais de qualidade da água destinada ao consumo humano, com o objetivo de proteger a saúde humana dos efeitos nocivos resultantes da contaminação eventual, assegurar a sua disponibilidade e definir as obrigações e valores relativos à garantia dos parâmetros da qualidade da água fornecida ao consumidor, o programa de controlo da qualidade da água, o procedimento quando há incumprimento e as regras de aptidão dos laboratórios de ensaios, estabelecendo ainda os critérios de repartição da responsabilidade pela gestão de um sistema de abastecimento público de água para consumo humano, quando a última é partilhada por mais do que uma entidade gestora.

	Revisão da Diretiva relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano	Em 16 de dezembro de 2020 foi adotada a revisão da Diretiva 2020/2184 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro, relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano (reformulação). A diretiva entrou em vigor em 12 de janeiro de 2021 e os Estados-Membros têm agora dois anos para a transpor para a legislação nacional.
--	--	---

ANEXO 2

Tabela 16 - Dados obtidos para as curvas de calibração dos antibióticos CFX, MTZ, SFX e TMP.

Ciproxloxacina, CFX		Metronidazol, MTZ	
Concentração (mg L ⁻¹)	Área	Concentração (mg L ⁻¹)	Área
0,001	74692	0,001	-
0,50	503002	0,50	377142
1,00	954526	1,00	787157
1,50	1405025	1,50	1168681
2,00	1982506	2,00	1560105
2,50	2471415	2,50	1960674
3,00	2922526	3,00	2335622
3,50	3437755	3,50	2721206
4,00	3879253	4,00	3084194
4,50	4440696	4,50	3477871
5,00	4851968	5,00	3854026

Sulfametozaxol, SFX		Trimetoprim, TMP	
Concentração (mg L ⁻¹)	Área	Concentração (mg L ⁻¹)	Área
0,001	-	0,001	-
0,50	232444	0,50	161370
1,00	490077	1,00	325176
1,50	726826	1,50	506207
2,00	953641	2,00	666165
2,50	1227631	2,50	854321
3,00	1472953	3,00	1026562
3,50	1730242	3,50	1209846
4,00	1970404	4,00	1383491
4,50	2198450	4,50	1553652
5,00	2417845	5,00	1729807

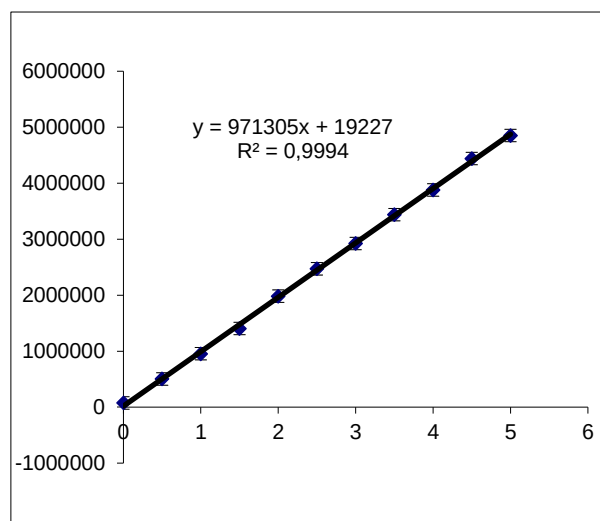


Figura 26 – Reta de calibração obtida em análise por HPLC para CFX incluindo a concentração 0,001 ppm da solução-padrão.

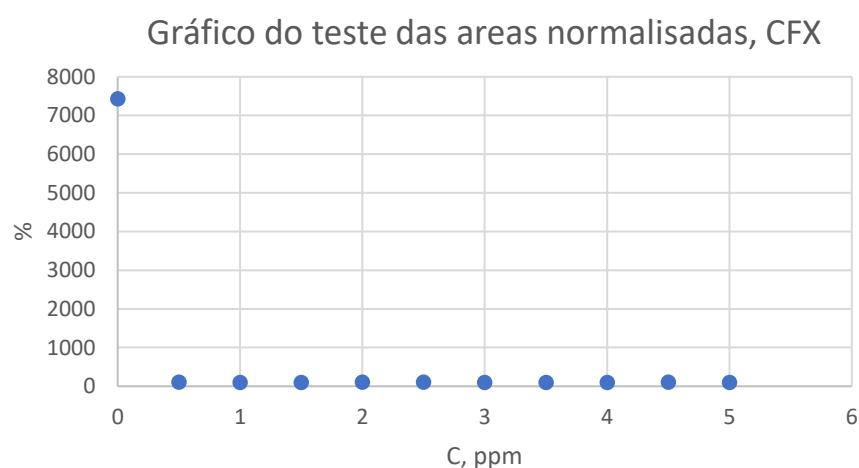


Figura 27 – O gráfico obtido no teste das áreas normalizadas para o HPLC do antibiótico CFX, incluindo a concentração 0,001 ppm da solução-padrão.

Tabela 17– Dados para avaliação da homogeneidade de variâncias dos 4 antibióticos para análises por HPLC.

CFX		MTZ		SFX		TMP	
min	máx	min	máx	min	máx	min	máx
510475	4850949	377426	3856520	223968	2429121	164993	1748203
502424	4862976	377255	3857373	239935	2415010	155091	1728052
496107	4841979	376746	3848185	233130	2399151	164027	1713287
503876	4862680	386337	3853014	228778	2410752	161140	1730081
493878	4857157	384134	3850197	230133	2403820	141657	1742631
510038	4862893	392118	3849453	229003	2420587	143611	1742102
504329	4844300	384413	3855394	224350	2406318	141900	1735861
497833	4854087	388484	3852622	231268	2406837	141010	1714613
500865	4861600	384303	3849039	231607	2426221	144487	1730767

	505824	4861289	390872	3848232	229781	2414139	143404	1737650
S_m^2	30704085		31096834,4		20352272		100238430	
S_M^2		62680266		12165705,4		95661253		132961665
F_{exp}	2,04		2,56		4,7		1,33	

Tabela 18 – Dados para avaliação da precisão (repetibilidade) dos 4 antibióticos para análises por HPLC.

	CFX	MTZ	SFX	TMP
	min	min	min	min
	510475	377426	223968	164993
	502424	377255	239935	155091
	496107	376746	233130	164027
	503876	386337	228778	161140
	493878	384134	230133	141657
	510038	392118	229003	143611
	504329	384413	224350	141900
	497833	388484	231268	141010
	500865	384303	231607	144487
	505824	390872	229781	143404
Sr	5541	5576	4511	10012
media	502565	384209	230195	150132
CV	1,1	1,5	2,0	6,7