

MESTRADO INTEGRADO EM ENGENHARIA DO AMBIENTE 2015/2016

**Avaliação do método de extração *QuEChERS* para a
quantificação de ANTIBIÓTICOS NOS SOLOS**

ANA ISABEL ALMEIDA LEITE

Dissertação submetida para obtenção do grau de

MESTRE EM ENGENHARIA DO AMBIENTE

Orientador académico: Lúcia Maria da Silveira Santos
(Professor Auxiliar do Departamento de Engenharia Química da Faculdade de
Engenharia da Universidade do Porto)

setembro, 2016

*“Penso noventa e nove vezes e nada descubro;
deixo de pensar, mergulho em profundo silêncio -
e eis que a verdade se me revela.”*

Albert Einstein

Agradecimentos

Quero agradecer a todas as pessoas que me apoiaram neste percurso um pouco atribulado, mas com um final feliz.

Primeiramente, quero agradecer à minha orientadora académica, Professora Lúcia Santos, pelo grande apoio numa fase complicada, pela sua disponibilidade para tirar qualquer dúvida. Graças à sua dedicação e perseverança fui capaz de desenvolver e ampliar os meus conhecimentos e começar a apreciar uma área de química antes não muito apelativa para mim.

Também pretendo agradecer de forma especial à Engenheira Sara Ramos por todo o apoio e disponibilidade para me ajudar com as dúvidas que surgem no momento em laboratório e como me ajudou a compreender certos conceitos bastante desconhecidos anteriormente, e ao Engenheiro Leandro Figueiredo pela sua paciência e ajuda com afamado *HPLC* e pela agradável companhia naquelas semanas de agosto a ouvir a rádio RFM.

Não posso de deixar de demonstrar a minha gratidão a todos os membros do laboratório E201, pelo auxílio prestado e o carinho transmitido. Um enorme abraço para a minha colega de curso Paula Penêda, por toda ajuda prestada, pela experiência partilhada, por toda a paciência que teve comigo. Paulinha um muito obrigado!

Obviamente não posso esquecer os meus pais, Manuel Leite e Emília Almeida, família e amigos que me apoiaram e foram fonte de força e inspiração nos momentos mais difíceis. Peço desculpa por não nomear mais pessoas mas tinha medo de ser injusta com alguém, só posso garantir que não podia ter melhores pessoas ao meu lado neste longo percurso que é a Vida.

Este trabalho foi financiado pelos projetos POCI-01-0145-FEDER-006939 - Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia - LEPABE e NORTE-01-0145-FEDER-000005 - LEPABE-2-ECO-INNOVATION, financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do COMPETE2020 - Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e Programa Operacional Regional do Norte (NORTE2020) e por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia I.P.



UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu
de Desenvolvimento Regional

Fundação para a Ciência e a Tecnologia
CENTRO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO

Resumo

Há mais de quatro décadas que os antibióticos são utilizados de forma massiva na medicina humana e veterinária para o tratamento de doenças infecciosas provocadas por diversos microrganismos. No entanto estes fármacos têm baixos tempos de residência nos organismos e são excretados para o meio ambiente tanto na forma de metabolitos como na sua forma parental, contaminando águas e solos. Os níveis de concentração destes compostos têm vindo a aumentar cada vez mais tornando-se uma grande preocupação para a comunidade científica e, por isso, tem vindo a crescer o número de estudos realizados neste tema.

A primeira parte o deste trabalho foi otimizar o método de extração *QuEChERS* para a determinação e quantificação de três antibióticos - a sulfametoxazol, o cloranfenicol e metronidazol - fármacos que são ou foram, até ao momento muito utilizados para o tratamento de humanos e animais. Todas as amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (*HPLC*) com detetor de arranjo de díodos (*DAD*). Primeiramente foram testadas diversas condições como diferentes solventes de extração, diferentes tempos de agitação na fase extrativa e de *clean-up*, presença ou ausência do banho de ultrassons, entre outras. Após esta fase considerou-se que as condições ótimas para este trabalho foram, como solvente de extração uma solução com acetonitrilo e metanol nas mesmas proporções, baixo tempo de agitação, a presença de um banho de ultrassons e como adsorventes de limpeza da amostra o PSA e o C₁₈. Neste ensaio obtiveram-se recuperações médias de cerca de 58% para o metronidazol, 30% para a sulfametoxazol e de 54% para o cloranfenicol.

A segunda parte deste estudo constituiu na validação do método analítico desenvolvido. As curvas de calibração respeitaram todos os parâmetros para serem consideradas válidas. A precisão do método foi avaliada pela repetibilidade (4,4 - 9,0%) e pela precisão intermédia (4,3 - 9,0%). As recuperações dos antibióticos em estudo, na amostra de solo usada, variaram entre 39 e 72%.

Com este trabalho foi possível concluir que o método de extração *QuEChERS* é apropriado para a determinação e quantificação de antibióticos no solo. Um método simples, rápido, de baixo custo, preciso e exato na análise dos três antibióticos. No entanto é importante que esta temática continue a ser estudada pois existem um grande leque de fatores que podem influenciar os resultados que ainda não foram estudados.

É de extrema importância que as instituições governamentais apliquem medidas com o intuito de diminuir a presença dos antibióticos no meio ambiente para combater o percurso para o qual a sociedade se encaminha neste momento, que é para uma era pré-antibiótico, onde uma simples infeção pode causar a morte de um ser vivo.

Palavras Chave: antibióticos; medicina humana; medicina veterinária; extração *QuEChERS*; *HPLC-DAD*; resistência microbiana; ambiente; solos.

Abstract

For more than four decades that antibiotics are used in massive form in human and veterinary medicine for the treatment of infectious diseases caused by various microorganisms. However, these drugs have low residence times in organisms and are excreted into the environment both in the form of metabolites such as parental form, contaminating water and soil. The concentration levels of these compounds have been growing becoming a major concern to the scientific community and, therefore, has been growing the number of studies on this topic.

The first part of this work was to optimize the QuEChERS extraction method for determination and quantification of three antibiotics - the sulfamethoxazole, chloramphenicol and metronidazole - drugs that are or have been, so far widely used for the treatment of humans and animals. All samples were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) with detector of diodes arrangement (DAD). First were tested various conditions as different extraction solvents, different times of unrest in extractive and clean-up phase, presence or absence of the ultrasons bath, among others. After this stage it was considered that the optimum conditions for this work were, as extraction solvente, a solution with acetonitrile and methanol in the same proportions, low time of agitation, the presence of a ultrasound bath and as adsorbents sample cleaning the PSA and the C18. This assay obtained average recoveries of approximately 58% to metronidazole, 30% to sulfamethoxazol and 54% to chloramphenicol

The second part of this study has been on analytical method validation developed. Calibration curves respected all the parameters to be considered valid. The precision of the method was evaluated for repeatability (4.4-9.0%) and intermediate precision (4.3-9.0%). Recoveries of antibiotics, in the sample of soil used, varied between 39 and 72%.

With this work it was possible to conclude that the extraction QuEChERS method is suitable for the determination and quantification of antibiotics in the soil. A simple, fast, low cost, accurate and precise analysis of three antibiotics. However it is important that this issue should continue to be studied as there are a wide range of factors that can influence the results that have not yet been studied.

It is extremely important that government institutions apply measures in order to decrease the presence of antibiotics in the environment to combat the route for which the society is heading right now, which is to an era without antibiótics where a simple infection can cause the death of a living being.

Declaração

Declaro, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

Ana Isabel Almeida Leite

Índice

1	Enquadramento.....	1
2	Introdução	3
2.1	Antibióticos na Saúde Humana.....	3
2.1.1	Revisão histórica.....	3
2.1.2	Padrões de Consumo	4
2.2	Antibióticos na Veterinária	6
2.2.1	Revisão Histórica.....	6
2.2.2	Padrões de consumo	7
2.3	Principais classes de Antibióticos	8
2.4	Problemática dos Antibióticos no Meio Ambiente.....	10
2.4.1	Fontes de contaminação.....	10
2.4.2	Transporte e Destino dos antibióticos.....	12
2.4.3	Problemática da resistência	15
2.4.4	Legislação Aplicada	16
2.5	Possíveis Técnicas de Redução dos Antibióticos no Ambiente	16
2.6	Estudo de Caso	19
2.6.1	Antibióticos em estudo	19
2.6.2	Método analítico aplicado.....	23
3	Estado de Arte	27
4	Materiais e Métodos	35
4.1	Materiais e Reagentes.....	35
4.2	Métodos de Análise	35
4.2.1	Método Instrumental	35
4.2.2	Amostragem	37
4.2.3	Método de Extração	37
4.3	Armazenamento, Destino e Tratamento de Resíduos	39
5	Resultados e Discussão.....	41

5.1	Otimização do método de <i>QuEChERS</i>.....	41
5.2	Validação do Método Analítico	46
5.2.1	Linearidade e limites de detecção e quantificação	47
5.2.2	Precisão	48
5.2.3	Exatidão.....	49
6	Conclusões.....	51
7	Limitações e Trabalho Futuro	53
A.	Anexos: Materiais e Métodos	63
B.	Anexos: Resultados	65

Índice de Tabelas

<i>Tabela 1 - Principais classes de antibióticos, propriedades físico-químicas e estrutura química...</i>	9
<i>Tabela 2 - Medidas não legislativas a aplicar para redução de antibióticos no ambiente</i>	17
<i>Tabela 3 - Principais medidas legislativas passíveis de aplicação que potenciem a redução dos antibióticos no ambiente</i>	18
<i>Tabela 4 - Propriedades físico-químicas do Metronidazol.....</i>	20
<i>Tabela 5 - Propriedades físico-químicas do antibiótico sulfametoxazol.....</i>	21
<i>Tabela 6 - Propriedades físico-químicas do cloranfenicol.....</i>	22
<i>Tabela 7 - Métodos de Extração e deteção de antibióticos de solos e lamas</i>	31
<i>Tabela 8 - Tabela resumo das condições alteradas ao longo dos ensaios realizados</i>	38
<i>Tabela 9 - Condições ótimas operatórias dos procedimentos experimentais testados.....</i>	41
<i>Tabela 10 - Resultados obtidos nos ensaios 1 e 2.....</i>	42
<i>Tabela 11 - Resumo dos resultados obtidos nos ensaios 3 e 4.....</i>	42
<i>Tabela 12 - Resultados obtidos nos ensaios 5 a 8.....</i>	43
<i>Tabela 13 - Valores de recuperação média obtidos nos ensaios 9 a 12</i>	45
<i>Tabela 14 - Parâmetros analíticos das retas de regressão dos antibióticos analisados</i>	47
<i>Tabela 15 - Parâmetros analíticos, desvio padrão do declive e origem, dos compostos em estudo</i>	48
<i>Tabela 16 - Resultados obtidos no estudo da precisão do método analítico</i>	48
<i>Tabela 17 - Resultados obtidos para a exatidão do método</i>	49
<i>Tabela 18 - Calendarização do procedimento experimental.....</i>	63
<i>Tabela 19 - Formas de especiação dos compostos em estudo nos valores de pH ocorridos nos ensaios</i>	65

Índice de Figuras

<i>Figura 1 - Barra cronológica da descoberta dos antibióticos e surgimento da resistência a estes fármacos.....</i>	<i>3</i>
<i>Figura 2 - Consumo mundial de antibióticos por classe no ano 2000 e 2010</i>	<i>4</i>
<i>Figura 3 - Representação gráfica comparativa do consumo de antibióticos na comunidade em Portugal e na União Europeia</i>	<i>5</i>
<i>Figura 4 - Principais classes de antibióticos consumidos em Portugal no ano de 2012</i>	<i>6</i>
<i>Figura 5 - Principais consumidores de antibióticos para a produção de produtos de origem animal no mundo, em 2010 e projeções para 2030</i>	<i>7</i>
<i>Figura 6 - Distribuição do total de antibióticos vendidos para uso veterinário em 23 países europeus no ano 2013.</i>	<i>8</i>
<i>Figura 7 - Resumo esquemático das vias de contaminação geradas pela produção de antibióticos e seu consumo pelo ser humano</i>	<i>11</i>
<i>Figura 8 - Apresentação esquemática das principais vias de contaminação originadas pelo uso de antibióticos na veterinária e agricultura</i>	<i>12</i>
<i>Figura 9 - Esquema ilustrativo dos fenómenos de lixiviação e escoamento superficial de antibióticos para o meio aquático.....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 10 - Imagem representativa do fenómeno de resistência a antibióticos</i>	<i>15</i>
<i>Figura 11 -Estrutura química, Massa molecular, Diagrama de especiação e respetivos pKa do metronidazol.....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 12 - Equilíbrio de ionização do metronidazol.....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 13 - Estrutura química, Massa molecular e diagrama de especiação da sulfametoxazol....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 14 - Equilíbrio de ionização da sulfametoxazol</i>	<i>21</i>
<i>Figura 15 - Estrutura química, massa molecular e respetivo pKa do cloranfenicol.....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 16 - Equilíbrio de ionização do cloranfenicol</i>	<i>22</i>
<i>Figura 17 - Estrutura do PSA</i>	<i>24</i>
<i>Figura 18 - Representação esquemática de um HPLC</i>	<i>25</i>
<i>Figura 19 - Gradiente de Eluição usado nas análises cromatográficas</i>	<i>36</i>
<i>Figura 20 - Representação esquemática do procedimento de QuEChERS.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 21 - Cromatogramas exemplo dos ensaios 7 (acima), sem C₁₈, e 8, com C₁₈.....</i>	<i>44</i>

Figura 22 - Cromatograma exemplo obtido após a análise em HPLC-DAD de uma solução padrão de 250 µg/L dos analitos estudados..... 46

Figura 23 - Representação gráfica das curvas de calibração para os compostos em estudo..... 47

Notação e Glossário

a	Declive da curva de calibração
b	Interceção da curva de calibração
C _{Oct}	Concentração de contaminante em octanol
C _s	Concentração de contaminante no solo
C _w	Concentração de contaminante em água
K _d	Coefficiente de distribuição
K _{oc}	Coefficiente de partição carbono orgânico-água
K _{OW}	Coefficiente de partição octanol-água
pK _a	Constante de dissociação ácida
S/N	<i>Signal-to-noise ratio</i> (em português, rácio sinal-ruído)
s _a	Desvio-padrão do declive
s _b	Desvio-padrão da interceção
ts _a	Intervalo de confiança do declive
ts _b	Intervalo de confiança da interceção

Lista de Siglas

ACN	Acetonitrilo
APA	Agência Portuguesa do Ambiente
C ₁₈	<i>Octadecyl bonded silica</i>
CAP	Cloranfenicol
DAD	<i>Diode array detector</i> (em português, detetor de arranjo de díodos)
DDD	Dose Diária Definida
DGAV	Direção Geral de Alimentação e Veterinária
DGV	Direção Geral de Veterinária
DHD	Dose Diária definida por 1000 habitantes/dia
dSPE	<i>Dispersive solid phase extraction</i> (em português, micro-extração em fase sólida)
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESI	<i>Electrospray ionization</i> (em português, ionização electrospray)
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
EU	União Europeia
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
HLB	<i>Hydrophilic-lipophilic balance</i>
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> (em português, cromatografia líquida de alta eficiência)
LC	<i>Liquid chromatography</i> (em português, cromatografia líquida)
LOD	<i>Limit of detection</i> (em português, limite de deteção)
LOQ	<i>Limit of quantification</i> (em português, limite de quantificação)
mAU	<i>Mili arbitrary unit</i>
Mcllvaine	<i>Tampão composto por hidrogeno fosfato dissódico e ácido cítrico</i>
MeOH	Metanol
METRO	Metronidazol
MIP	<i>Molecularly imprinted polymers</i>
MS	<i>Mass spectrometry</i> (em português, espetrometria de massa)
Na ₂ Cit	<i>Citrato dissódico</i>

Na ₂ EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico
NaCit	Citrato de sódio
ND	<i>No detection</i>
NQ	<i>Not quantifiable</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
pK _a	Constante de acidez
PSA	<i>Primary secondary amine</i>
PTFE	<i>Politetrafluoretileno</i>
<i>QuEChERS</i>	<i>Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe</i>
R	Coeficiente de correlação
RSD	<i>Relative Standard derivation</i> (em português, desvio - padrão relativo)
SPE	<i>Solid phase extraction</i> (em português, extração em fase sólida)
SULFA	Sulfametoxazol
TCA	Ácido tricloroacético

1 Enquadramento

Doenças infecciosas foram a principal causa de morte em todo mundo no início do século XX. Atualmente são consideradas como a segunda principal causa de morte nos países em desenvolvimento, no caso dos países desenvolvidos encontra-se classificada em terceiro lugar. Por este motivo, há mais de 50 anos que produtos naturais têm sido usados no combate de infeções provocadas por bactérias e fungos. Metabolitos de certos microrganismos e plantas permitiram que a esperança média de vida passasse para o dobro ao longo do século passado, revolucionando a medicina (Demain 2009).

Atualmente, os antibióticos, naturais ou sintéticos, são usados para o tratamento de seres humanos e animais para combater doenças infecciosas, pois estes são fármacos bastante eficientes mesmo em baixas concentrações, no entanto, o seu tempo de residência no organismo é baixo, sendo excretados do organismo maioritariamente na sua forma parental ou na forma de metabolitos. (Thiele-Bruhn 2003).

O consumo de antibióticos em todo o mundo tem vindo a aumentar de forma preocupante, entre 2000 e 2010 este aumentou mais de 30%, e a classe de antibióticos mais consumida foram as penicilinas de largo-espectro. Os três países mais consumidores, em 2010, foram a Índia, China e EUA. Relativamente à situação Portuguesa, durante vários anos o consumo destes fármacos encontrou-se acima da média europeia, no entanto, desde 2013 este comportamento inverteu-se, estando sempre abaixo da média da EU. Tal como a nível mundial, as penicilinas foram a classe mais consumida em Portugal, em 2012, representando 55% do consumo total no país (CDDEP 2015; European Centre for Disease Prevention and Control 2014; Van Boeckel *et al.* 2014).

Com o uso indevido dos antibióticos surgiram dois principais problemas: (i) um aumento da resistência aos antibióticos por parte de microrganismos patogénicos, provocando um grave problema para a saúde pública, pois, infeções que *à priori* eram de fácil tratamento podem tornar-se intratáveis; (ii) a contaminação do meio ambiente com este tipo de fármacos, que de certa forma contribui para o aumento do fenómeno de resistência, provocando alterações nas comunidades microbianas, com a morte das bactérias não resistentes e a transferência de genes de resistência para microrganismos patogénicos (Kemper 2008; Thiele-Bruhn 2003).

Ultimamente a ocorrência de antibióticos tanto no meio aquático como no meio terrestre tem sido estudada, no entanto, nos solos estes estudos são mais escassos embora, recentemente, tenham-se observado elevadas concentrações neste meio devido, essencialmente à aplicação de fertilizantes contaminados com estes fármacos e devido ao elevado uso de antibióticos na criação de animais para consumo humano (Jechalke *et al.* 2014). Pelos motivos referidos, cada vez mais aumenta a importância de reduzir o consumo destes fármacos e surgem países a apresentar normas que limitem a emissão destes compostos para o meio ambiente.

2 Introdução

2.1 Antibióticos na Saúde Humana

2.1.1 Revisão histórica

As doenças infecciosas foram a principal causa de morte em todo mundo no início do século XX, no entanto, há mais de 50 anos que os produtos naturais têm sido usados no combate de infecções provocadas por bactérias e fungos. A descoberta da ação seletiva de certos metabolitos secundários produzidos por microrganismos sobre bactérias patogênicas e fungos determinou o início da era dos antibióticos. O primeiro antibiótico clinicamente útil foi descoberto por Alexander Fleming em 1928, metabolito produzido pelo fungo *Penicillium notatum*. No entanto, só 15 anos depois foi possível realizar a sua purificação, isolamento e estudo da estrutura química. Este trabalho foi realizado por Howard Florey, Norman Heatley, Ernst Chain, e Edward Abraham na Universidade de Oxford (Demain 2009).

A descoberta dos antibióticos, Arsfenamina, Sulfamidocrisiodina e a penicilina, foram exemplos para trabalhos futuros nesta área de estudo. Os passos seguidos por outros investigadores resultaram no aparecimento de um grande número de novos antibióticos. O período compreendido entre 1950 e 1970 foi considerado a era de ouro da descoberta de novas classes de antibióticos. Desde então não foram descobertos novos grupos destes fármacos (Aminov 2010).

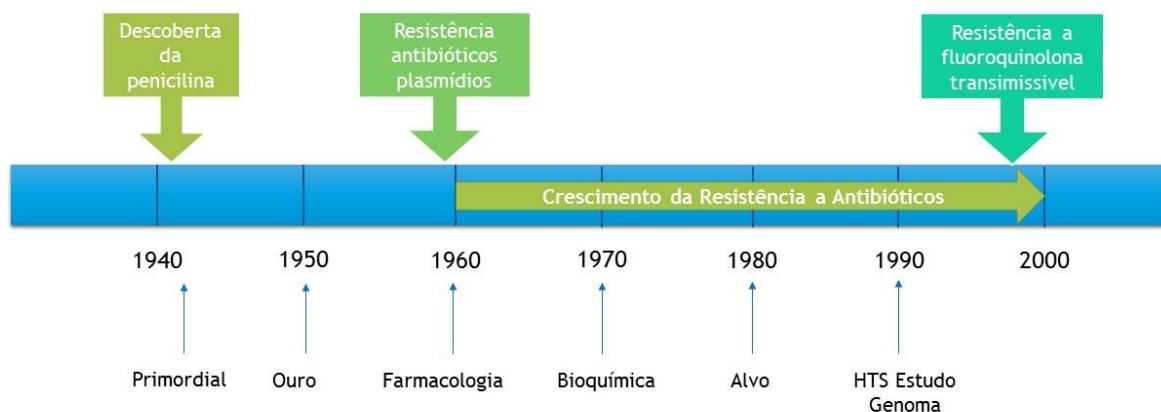


Figura 1 - Barra cronológica da descoberta dos antibióticos e surgimento da resistência a estes fármacos (adaptado de Davies and Davies 2010).

Descrevendo de forma resumida a cronologia apresentada, Figura 1, apenas em 1940 foi realizado a purificação e isolamento da penicilina como referido anteriormente. Nos anos 40 surgiu a era primordial dos antibióticos com a descoberta das sulfonamidas para quimioterapia. A época de ouro inicia-se em 1950, onde são descobertos a maioria dos antibióticos conhecidos e usados atualmente. Nos anos 60 foram realizados estudos que permitissem entender e melhorar o uso de antibióticos ao nível da dosagem e administração, também foram detetados os primeiros fenômenos

de resistência. No período de 1970 a 1990, foram realizados estudos bioquímicos com o objetivo de compreender as reações bioquímicas e mecanismos de resistência, estudos genéticos em que o principal alvo foi projetar novos compostos e por fim a realização de uma metodologia de sequenciamento do genoma para prever os principais alvos para a incorporação de testes de rastreio de resistência (Davies and Davies 2010).

2.1.2 Padrões de Consumo

Como referido anteriormente, os antibióticos possibilitaram a redução da mortalidade por doenças infecciosas comuns e, desde a sua descoberta, tornaram-se essenciais em intervenções médicas (Laxminarayan *et al.* 2013; Martinez 2009). No entanto, o aparecimento de microrganismos multirresistentes a antibióticos tanto na comunidade humana como animal tornou-se uma preocupação a nível mundial (WHO 2015). Por este motivo, é importante perceber as tendências espaciais e temporais no consumo de antibióticos para prever novas ameaças de infeções multi-resistentes (Van Boeckel *et al.* 2014).

Em todo mundo, entre 2000 e 2010, o consumo global de antibióticos aumentou mais de 30%, de aproximadamente 50 mil milhões de unidades *standard* em 2000 para mais de 70 mil milhões no ano de 2010. (Unidades *Standard* (SU), unidade de volume definida IMS Health Incorporated; é uma medida de volume padrão baseada na menor dose detetável administrada a um paciente, dependente do formato do fármaco (comprimido, ampola)) (CDDEP 2015; Van Boeckel *et al.* 2014).

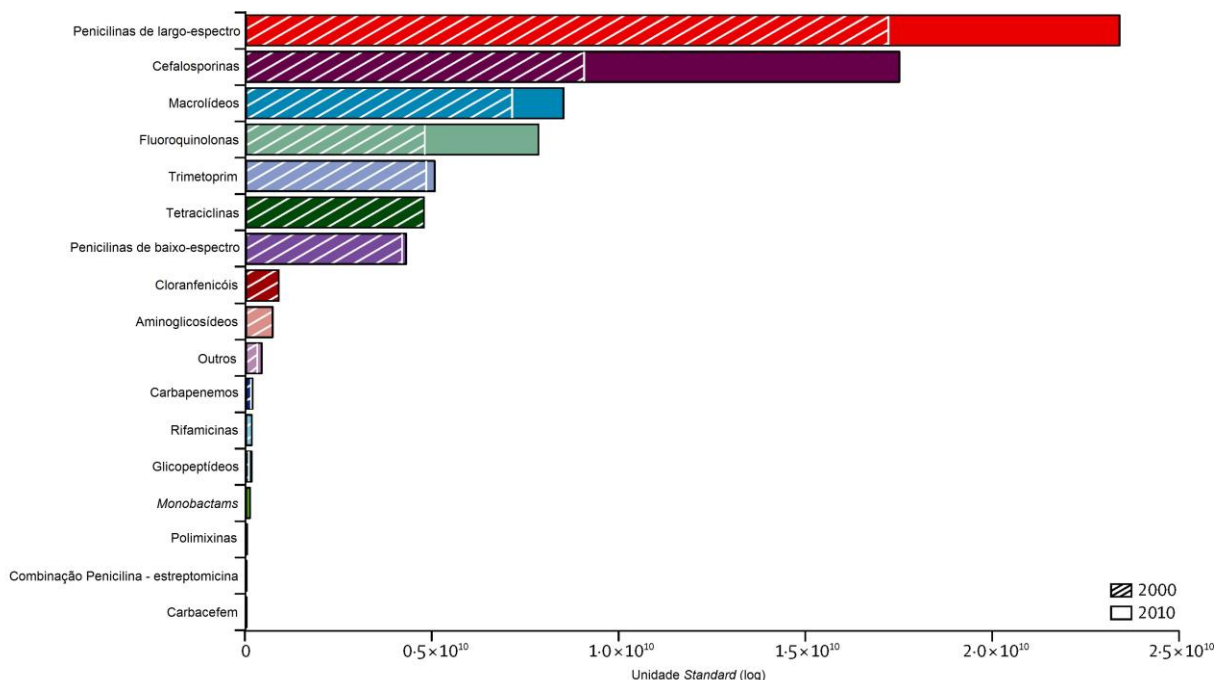


Figura 2 - Consumo mundial de antibióticos por classe no ano 2000 e 2010 (adaptado Van Boeckel *et al.* 2014)

Como é possível observar na Figura 2, as cefalosporinas e as penicilinas de largo-espectro representam 55% do total de antibióticos consumidos a nível mundial em 2010, um aumento de 41% relativamente a 2000. Os maiores consumidores de antibióticos em todo o mundo em 2010 foram a

Índia, China e EUA, por ordem de maior consumo, no entanto, o maior consumidor *per capita* foi os EUA, sendo administradas vinte e duas SU por pessoa (CDDEP 2015; Van Boeckel *et al.* 2014).

Abordando o caso português, o consumo de antibióticos pela comunidade durante vários anos manteve-se acima dos valores médios registados na Europa, apesar da tendência decrescente estabelecida desde 2006 (Direção-Geral da Saúde 2016). Segundo a *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), em 2012, Portugal encontrava-se em nono lugar, de trinta países europeus, com maior consumo de antibióticos.

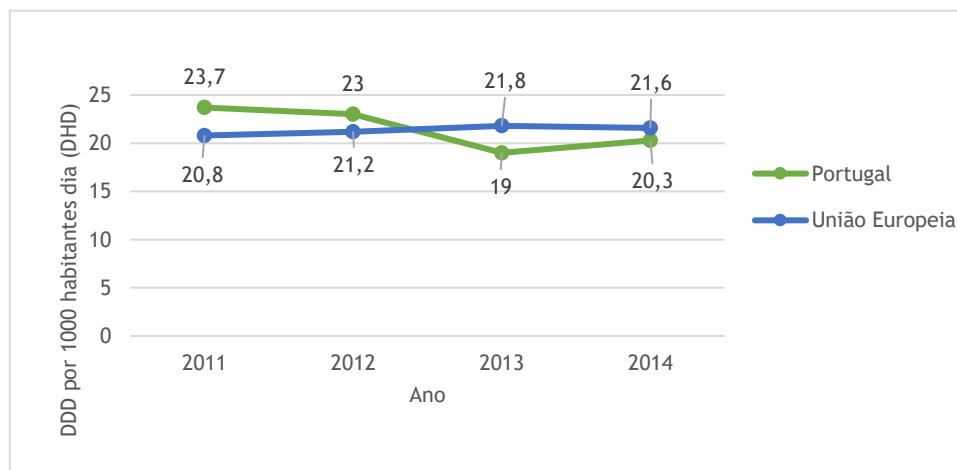


Figura 3 - Representação gráfica comparativa do consumo de antibióticos na comunidade em Portugal e na União Europeia (Direção-Geral da Saúde 2016)

Entre 2011 e 2014 foi possível observar um decréscimo do consumo de antibióticos em Portugal, comportamento contrário ao observado na EU, onde se visualizou um crescimento no consumo destes fármacos (Figura 3).

Como já foi referido, a nível de mundial a classe de antibióticos mais consumida são as penicilinas, pertencentes a classe dos beta-lactâmicos, em Portugal esta tendência verifica-se representando 55% do total de antimicrobianos consumidos (Figura 4). A segunda classe de antibióticos mais consumidos são os macrolídeos (*European Centre for Disease Prevention and Control* 2014).

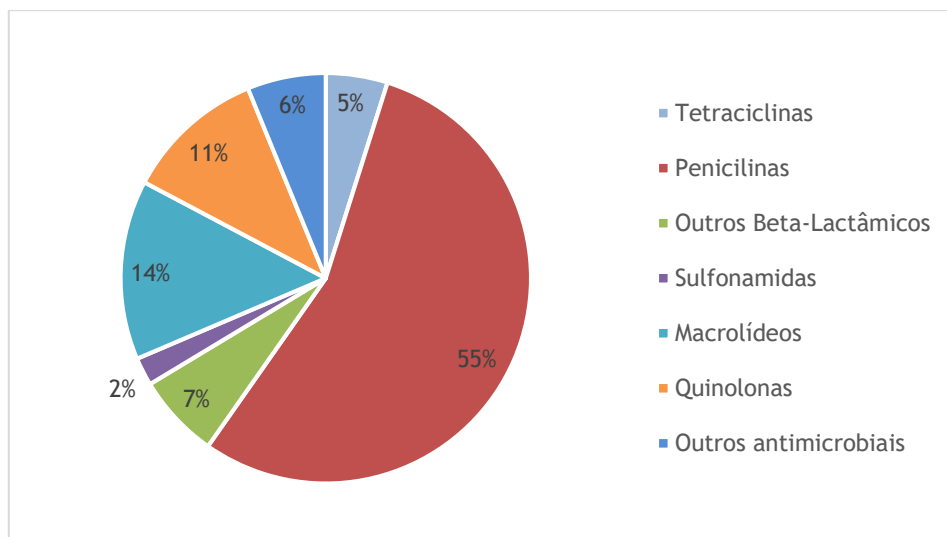


Figura 4 - Principais classes de antibióticos consumidos em Portugal no ano de 2012 (European Centre for Disease Prevention and Control 2014)

2.2 Antibióticos na Veterinária

2.2.1 Revisão Histórica

Os antibióticos veterinários são administrados em animais como procedimento terapêutico, com os principais objetivos: prevenção e controle de doenças e promoção do seu crescimento (Tasho and Cho 2016). Em 1951, nos Estados Unidos da América (EUA) a FDA, *Food and Drug Administration*, aprovou o uso destes medicamentos como aditivos em ração animal sem prescrição veterinária e nos anos subsequentes, cada estado europeu aprovou as suas regulações nacionais relativamente ao uso de antibióticos na alimentação animal. O uso destes foi permitido nos estados membros da União Europeia (UE) durante os últimos 50 anos (Castanon 2007).

O efeito promotor de crescimento provocado pelos antibióticos foi descoberto na década de 1940 por Moore *et al.* 1946 e Jukes *et al.* 1950. Nestes estudos observou-se uma impulsão no crescimento de animais que foram alimentados com rações que continham micélio de *Streptomyces aureofaciens* contaminado com resíduos de clortetraciclina. O mecanismo de ação destes fármacos como promotores de crescimento encontra-se relacionado com a comunidade microbiana intestinal (Castanon 2007; Dibner and Richards 2005).

Em 1951 surge um dos primeiros relatórios sobre resistência a antibióticos na produção de animais realizado por Starr and Reynolds. Outros investigadores relataram a presença de resistência à tetraciclina em frangos quando alimentados com rações com promotores de crescimento (Dibner and Richards 2005).

Os fenómenos de resistência em animais que foram relatados ao longo dos anos e a ocorrência de transmissão de genes de resistência entre a microbiota animal e humana levou a UE a impedir o uso de antibióticos como promotores de crescimento a partir de 1 de janeiro de 2016 (Castanon 2007).

2.2.2 Padrões de consumo

O consumo global de antibióticos na produção de animais foi de aproximadamente sessenta e três mil toneladas no ano de 2010. As projeções indicam que este valor pode crescer até 67% em 2030, representando uma quantidade de mais de cento e cinco mil toneladas de antibióticos consumidos. Cerca de dois terços deste crescimento global deve-se ao aumento do número de animais produzidos para produção de alimentos de origem animal (Van Boeckel *et al.* 2015).

Em 2010, os cinco países com maiores cotas de consumo de antimicrobianos no mundo foram a China, EUA, Brasil, Índia e Alemanha. Segundo as projeções para 2030, os maiores consumidores serão a China, EUA, Brasil, Índia e México (Figura 5) (Van Boeckel *et al.* 2015).

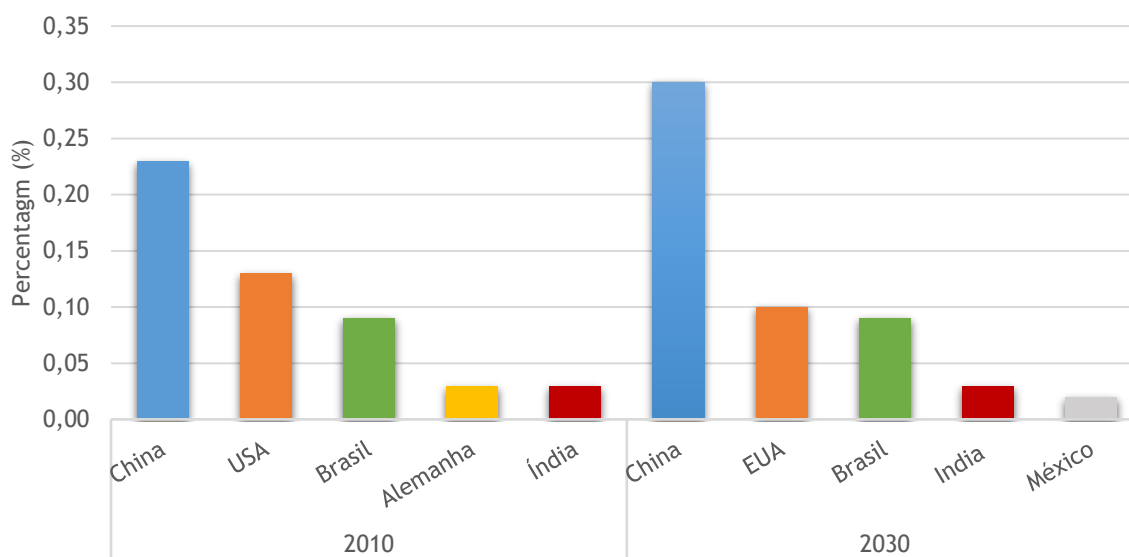


Figura 5 - Principais consumidores de antibióticos para a produção de produtos de origem animal no mundo, em 2010 e projeções para 2030 (CDDEP 2015 baseado Van Boeckel *et al.* 2014)

A nível europeu, durante o ano 2013 foram consumidos no total mais de oito mil toneladas de antibióticos para a produção de artigos de origem animal. Os três maiores consumidores europeus destes fármacos a nível veterinário são primeiramente Espanha, com dois mil duzentos e três toneladas, seguidos da Alemanha, com mil e quinhentos e trinta e quatro toneladas e, por fim, a Itália, com mil trezentas e vinte e sete toneladas (European Medicines Agency 2013).

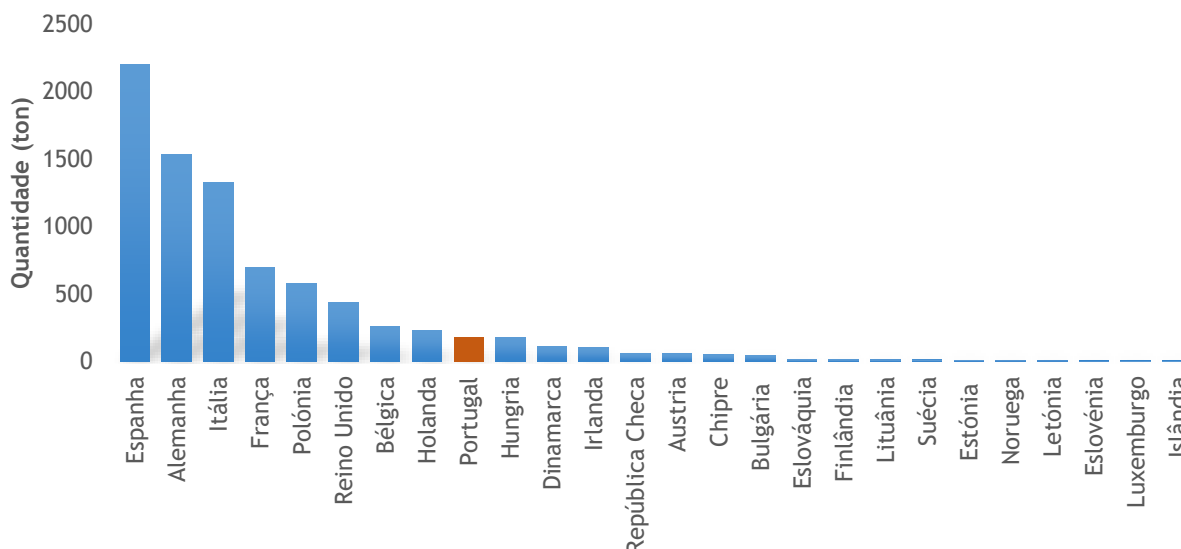


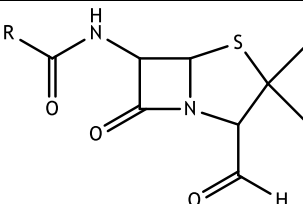
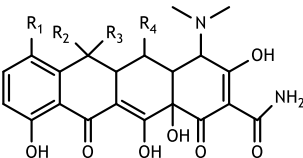
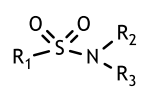
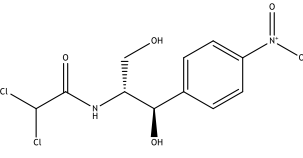
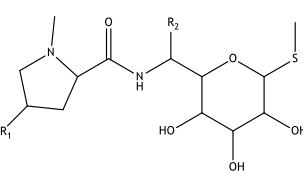
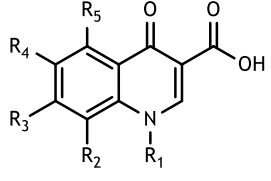
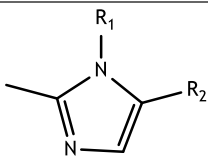
Figura 6 - Distribuição do total de antibióticos vendidos para uso veterinário em 23 países europeus no ano 2013 (European Medicines Agency 2013).

Portugal encontra-se entre os dez países mais consumidores de antibióticos para uso veterinário, usando cerca de cento e oitenta toneladas no ano de 2013 (Figura 6). Importante salientar que 70% dos antibióticos vendidos na veterinária são relativos a apenas três classes: tetraciclina, macrolídeos e penicilinas. Durante o ano referente foram vendidas cerca de setenta toneladas de tetraciclina, que representam 39% do total de vendas, cerca de trinta e quatro toneladas de penicilinas e aproximadamente vinte e três toneladas de macrolídeos que retratam 19 e 13%, respetivamente, do total de microbianos vendidos para veterinária em Portugal (DGAV 2013).

2.3 Principais classes de Antibióticos

A definição amplamente usada para antibiótico é a seguinte: os antibióticos são compostos orgânicos naturais, semissintéticos ou totalmente sintéticos que podem inibir o crescimento, a atividade metabólica ou destruir totalmente bactérias através de reações bioquímicas (Demain 2009; Du and Liu 2012; Thiele-Bruhn 2003). Existem diferentes critérios de classificação destes fármacos que são as seguintes: **origem/fonte**, **espectro de ação**, **mecanismos de ação**, **efeito na bactéria** e **estrutura química**. Para este estudo considerou-se de interesse abordar a classificação dos antibióticos segundo a sua estrutura química, pois, compostos que pertencem ao mesmo grupo têm comportamentos semelhantes. Na Tabela 1 estão apresentadas as principais características físico-químicas das principais classes de antibióticos existentes até à data e as suas estruturas químicas gerais (Carvalho and Santos 2016; Chu and Fernandes 1989; DrugBank 2016; He 2014; Homem and Santos 2011; Reeves 2011; Thiele-Bruhn 2003; Wang *et al.* 2016)

Tabela 1 - Principais classes de antibióticos, propriedades físico-químicas e estrutura química

Classe de antibióticos	S (25 °C) (mg/L)	Log K _{ow}	pK _{a1} / pK _{a2} / pK _{a3} / pK _{a4}	Estrutura Química Geral/Comentários
B- Lactâmicos	22-10100	0,9-2,9	2,7	 <p>Classe representativa: Penicilinas; compostas por um anel de tiazolidina unido a 4 amidas cíclicas, um anel β-lactâmico, um carboxilo livre e um ou mais grupos amino.</p>
Tetraciclinas	230-52000	-1,3-0,5	3,3/7,7/9,3	 <p>Constituídas por núcleos lineares de carboxamidas naftalenos fundidos, podendo ser compostas por 4 a 6 anéis</p>
Sulfonamidas	7,5-1500	-0,1-1,7	2-3/ 4,5-10,6	 <p>Formadas por um grupo funcional sulfonil ligado a um grupo amina</p>
Aminoglicosídeos	10-500000	-8,1- -0,8	6,9-8,5	<p>A sua estrutura geral consiste em dois ou mais grupos amino açúcares ligados a um anel central de hexose por ligações glicosídeas.</p>
Cloranfenicol	2500	1,14	11	 <p>Principal composto representativo do grupo dos anfenicóis. Contem um grupo funcional ácido carboxílico amida secundária.</p>
Macrolídeos	0,45-15	1,6-3,1	7,7-8,9	 <p>Compostos por uma longa cadeia lactona macrocíclica, constituídos geralmente por 12, 14 ou 16 membros, ligados a um ou mais açúcares</p>
Glicopeptídeos	>1000	-	5,0	<p>Constituídos por um glicosilado cíclico ou por um peptídeo policíclico. Compreendem ligações entre açúcares e aminoácidos.</p>
Quinolonas	3,2-17790	-0,02-3,9		 <p>As quinolonas são caracterizadas por um núcleo quinolino substituído nas posições 1, 5, 6, 7 e 8. As fluoroquinolonas possuem um C6 fluorino ligado ao anel (substitui R4).</p>
Imidazóis	6,3-407	-0,0-3,9	2,4	 <p>Os imidazóis possuem um imidazólico livre unido a outros anéis aromáticos por ligações C-N.</p>

2.4 Problemática dos Antibióticos no Meio Ambiente

Neste subcapítulo serão abordadas as principais fontes de inserção de antibióticos no meio ambiente, os principais destinos e as consequências geradas, salientando a problemática da resistência, com o surgimento destes medicamentos como um poluente nos meios terrestres e aquáticos. Estes, atualmente, são considerados, poluentes emergentes devido ao seu uso massivo e detecção destes em diversos compartimentos ambientais.

2.4.1 Fontes de contaminação

Os fármacos abordados ao longo deste trabalho são amplamente usados no tratamento de doenças infecciosas tanto no ser humano como em animais. Por este motivo as vias de disseminação destes compostos são várias, dependendo do uso aplicado.

De uma forma geral, as principais vias de introdução de antibióticos no meio ambiente são as seguintes: o processo de produção destes, o consumo pela comunidade e hospitais, uso no tratamento de animais, utilização na agricultura e aquicultura.

A produção de antibióticos tem sido considerada uma via de pouca importância, no entanto, recentemente, em alguns países asiáticos foi possível observar concentrações elevadas de certos antibióticos em efluentes de unidades fabris de fabrico de antibióticos. Nos países desenvolvidos, a produção destes fármacos provocam uma contribuição significativa na concentração total de antibióticos encontrada em vários afluentes de estações de tratamento de águas residuais (ETAR) (Kummerer 2009; Larsson *et al.* 2007). É de salientar que as ETAR não têm capacidade de remover estes fármacos dos efluentes, onde é possível observar concentrações embora baixas, mas que são continuamente lançadas no meio ambiente (Le-Minh *et al.* 2010).

O uso de antibióticos na saúde humana é uma das principais fontes de contaminação destes compostos. Os principais utilizadores são a comunidade em geral e os hospitais. Ao contrário do esperado, os hospitais não são as principais fontes de contaminação, considerando apenas o uso na medicina. O uso de antibióticos em unidades de saúde representa cerca 6% do total de antibióticos consumidos na Europa (European Centre for Disease Prevention and Control 2014; Schuster *et al.* 2008).

Estes compostos quando ingeridos são metabolizados, no entanto, dependendo das características do antibiótico, uma percentagem da dose administrada é excretada pelo organismo sem sofrer qualquer alteração, esta pode variar entre 10 a 90%. Os compostos na sua forma original podem ser excretados nas fezes e na urina, no entanto, é de salientar que certos metabolitos, compostos mais solúveis em água, são excretados pelas vias já referidas. Estes podem conter ainda alguma atividade antimicrobiana e atingindo o solo podem voltar à sua forma parental através de reações químicas (Kummerer 2003; Thiele-Bruhn 2003).

A Figura 7 resume de forma esquemática a entrada de antibióticos no meio ambiente através o consumo humano e produção destes.



Figura 7 - Resumo esquemático das vias de contaminação geradas pela produção de antibióticos e pelo seu consumo

Além das vias de contaminação referidas anteriormente devido ao uso destes fármacos na medicina humana, a medicina veterinária também é causadora de diversas vias de contaminação devido ao seu uso para o tratamento e prevenção de doenças em animais para produtos de origem animal, na agricultura e aquacultura.

Na criação de animais existem duas formas principais destes fármacos atingirem o meio ambiente, numa via direta onde os animais de pastoreio excretam fezes contaminadas diretamente nos solos onde se encontram, ou segundo uma via indireta, a utilização de fertilizantes de origem animal contaminados em campos agrícolas. Tal como acontece com o ser humano, só uma fração da dose de antibiótico administrada é metabolizada, portanto, tanto em fezes como em fertilizantes é possível encontrar estes fármacos na sua forma original ou sob a forma de metabolitos e produtos de degradação que, como já referido anteriormente, podem manter algum poder antimicrobiano (Kemper 2008; Tasho and Cho 2016).

A contaminação de terrenos agrícolas com antibióticos não é causada apenas pela utilização de fertilizantes contaminados. Estes fármacos também podem ser usados para o controlo de doenças bacterianas em frutas de elevado valor, vegetais e plantas ornamentais. No entanto é uma via pouco representativa (McManus *et al.* 2002).

Por fim, outra fonte de introdução de antibióticos no meio ambiente é o processo de aquacultura. Neste processo, os agentes antimicrobianos são usados exclusivamente para propósito terapêutico, no entanto são aplicados diretamente no meio aquático (Serrano 2005). A Figura 8 apresenta de forma esquemática as principais vias de contaminação devido ao uso de antibióticos na medicina veterinária e agricultura.

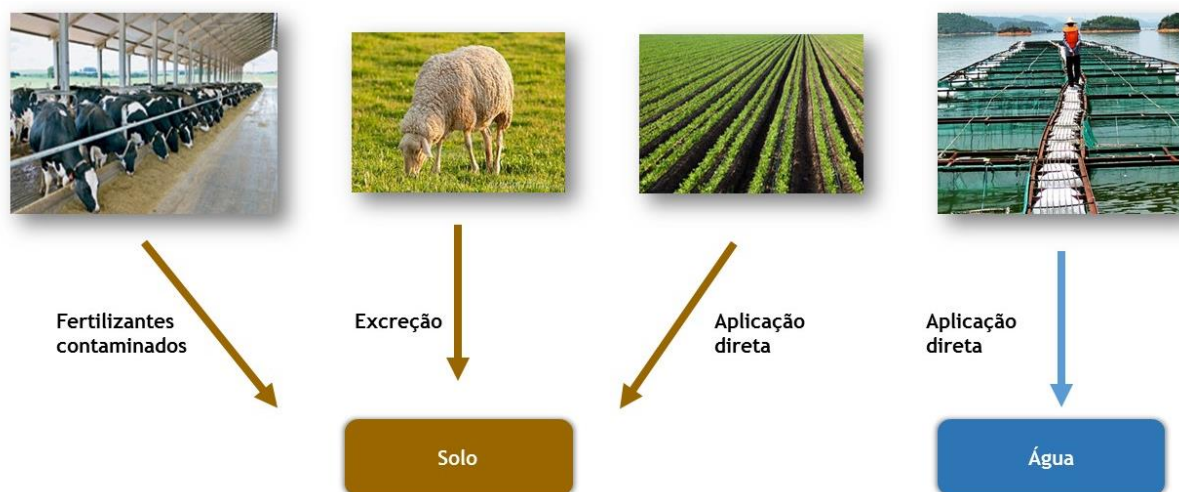


Figura 8 - Apresentação esquemática das principais vias de contaminação originadas pelo uso de antibióticos na veterinária e agricultura

2.4.2 Transporte e Destino dos antibióticos

No subcapítulo anterior foram referidas as principais fontes de contaminação de antibióticos no meio ambiente, mas é importante também salientar quais os fenômenos que estes compostos sofrem quando atingem os meios terrestre e aquático. Ao longo desta secção serão abordados especificamente os processos físico-químicos que dominam o transporte e destino dos compostos em estudo. A ocorrência de determinado fenômeno depende das propriedades físico-químicas do antibiótico, das condições climáticas presentes e uma grande variedade de outros fatores ambientais (Kemper 2008; Thiele-Bruhn 2003).

Um dos principais destinos destes fármacos é o solo, neste meio um dos fenômenos que ocorre com elevada frequência é o processo de sorção/dessorção. Este fenômeno depende das propriedades físico-químicas dos antibióticos, das condições climáticas, tipo de solo, percentagem de matéria orgânica entre outros fatores (Srinivasan *et al.* 2014). Os antibióticos são compostos orgânicos que possuem diversos grupos funcionais facilitando o processo de adsorção com partículas do solo. Muitos destes compostos são substâncias polares, pouco solúveis em água por este motivo fortemente retidos pelos solos. Referindo de forma mais minuciosa algumas características, o pH do solo é um fator que influencia o fenômeno de sorção pois o pH do meio afeta a ionização de diversos compostos, os compostos podem encontrar-se na sua forma protonada, desprotonada ou neutra, afetando assim o tipo de ligação existente com a matéria mineral dos solos (Leal *et al.* 2013).

Outras características que afetam a capacidade de sorção dos antibióticos aos solos é o **coeficiente de distribuição (Kd)**, o **coeficiente de partição octanol-água (Kow)**, o **coeficiente de partilha carbono orgânico (Koc)** e a **solubilidade** em água dos mesmos. Através das equações apresentadas seguidamente é possível calcular os coeficientes referidos (Equações 1 e 2).

$$K_d = \frac{C_s}{C_w} \quad (1)$$

$$K_{ow} = \frac{C_{oct}}{C_w} \quad (2)$$

$$K_{oc} = \frac{C_c}{C_w} \quad (3)$$

C_w - Concentração do composto na água; C_s - concentração no solo; C_{oct} - Concentração em octanol; C_c - Concentração de contaminante adsorvido pelo carbono orgânico

O coeficiente de distribuição define a afinidade de composto à fase sólida e define a mobilidade deste no meio ambiente. Quanto maior o valor de K_d do composto menor é a sua capacidade de movimento no meio maior a capacidade de sorção no solo. O coeficiente octanol-água é uma forma de medida da hidrofobicidade do composto. A maioria das classes de antibióticos têm valores relativamente baixos de $\log K_{ow}$, como é possível observar na Tabela 1, indicando que estes compostos são relativamente pouco hidrofóbicos. O coeficiente de partição água - carbono orgânico indica a fração de composto que se encontra adsorvido pelo carbono orgânico, sendo também um indicativo da hidrofobicidade de um composto. Por fim é importante salientar a solubilidade destes compostos em água excede o valor de 1 g/L, portanto na sua maioria são compostos hidrofílicos assim a sua entrada no meio aquático é relativamente fácil, como é explicado nesta secção mais à frente (Kim *et al.* 2011; Sarmah *et al.* 2006).

O solo é constituído por sedimentos não consolidados, que podem ser de origem orgânica ou inorgânica em que as propriedades variam significativamente dependendo da sua localização, logo os contaminantes têm comportamentos diferentes em terrenos diferentes. Propriedades físicas como o pH, a porosidade, a densidade, a humidade podem influenciar a distribuição dos compostos no meio terrestre. A textura do solo, isto é, a dimensão da fração inorgânica do solo, que se encontra dividida em quatro classificações: argila, partículas minerais microscópicas de natureza coloidal; silte, sedimentos finos de minerais provenientes da rocha-mãe; areia e gravilha, partículas intermédias a grosseiras também provenientes da rocha-mãe; também é um fator determinante para a compreensão do comportamento dos contaminantes nos solos. Por exemplo, um solo composto por uma elevada percentagem de argilas, sedimentos que contêm na sua superfície vários grupos funcionais e com elevada área superficial, têm uma elevada capacidade de se ligarem com compostos polares por ligações de hidrogénio. Devido a sua microporosidade e força das ligações os contaminantes ficam altamente adsorvidos na superfície dos sedimentos, dificultando o processo de desorção (Fiúza 2009).

Além dos fenómenos já referidos, existem potenciais vias de transferência de antibióticos para atmosfera e hidrosfera. A volatilização destes compostos para atmosfera é pouco relevante pois uma das suas características são as baixas pressões de vapor. A contaminação do meio aquáticos deve-se em parte a ocorrência do fenómeno de escoamento superficial, dispersando estes compostos até linhas de água superficiais, ou o fenómeno de lixiviação que ocorre por vias de escoamento preferenciais, no entanto é restringido a determinadas classes de antibióticos pois a maioria é retida na fração superficial dos solos (Figura 9). Desta forma é possível afirmar que os solos podem ser considerados como uma via de contaminação do ambiente aquático (Du and Liu 2012; Jechalke *et al.* 2014).



◆ Moléculas de antibióticos e seus metabolitos

Figura 9 - Esquema ilustrativo dos fenômenos de lixiviação e escoamento superficial de antibióticos para o meio aquático.

Nos solos também podem ocorrer fenômenos de degradação de antibióticos, este processo pode ser de origem biológica e/ou abiótica. A decomposição de antibióticos por fotodegradação, processo abiótico, não têm grande influência pois estes podem estar protegidos nas lamas de depuração ou fertilizantes e a radiação solar não tem capacidade de penetrar nestes. Diretamente nos solos, este processo só tem alguma preponderância na camada superficial, pois, os feixes de luz apenas conseguem penetrar nos primeiros centímetros de solo. A degradação nos solos é governada essencialmente por atividade microbiana, essencialmente reações enzimáticas que leva a hidroxilação e descarboxilação oxidativa, alterando o composto parental. No entanto, algumas destas reações são reversíveis, o que significa que a degradação não é total (Kemper 2008).

Estes compostos como estão presentes nos diferentes elementos do planeta Terra, principalmente na hidrosfera e litosfera, podem ser introduzidos na biosfera. O fenômeno mais comum é a acumulação de antibióticos espécies vegetais. Este fenômeno deve-se essencialmente ao uso de fertilizantes contaminados com estes fármacos de forma continuada e a sua transferência para os solos. Alguns estudos já realizados detetaram a presença de antibióticos em várias espécies vegetais (Kumar *et al.* 2005). Segundo Kang *et al.* 2013 foram detetados os antibióticos em estudo, como por exemplo, a clorotetraciclina, nos onze vegetais utilizados no trabalho, como espinafre, tomate, alface, cebola, entre outros.

Ultimamente, também têm sido realizados estudos com o objetivo de compreender os efeitos provocados em plantas na presença de antibióticos. A fitotoxicidade destes fármacos nas plantas depende essencialmente da espécie em questão e o tipo de antibiótico em estudo, e foi identificado que o processo de bioacumulação é o principal causador do fenômeno de fitotoxicidade em plantas (Du and Liu 2012).

2.4.3 Problemática da resistência

O problema mais grave que se tem vindo a observar há vários anos e que tem preocupado a comunidade mundial foi o surgimento, disseminação e persistência da resistência aos antibióticos (Carvalho and Santos 2016).

A resistência a antibióticos pode ser adquirida através de diversos mecanismos, como mutações genéticas por parte subpopulações de bactérias que podem ser transferidas a outros microrganismos que concedendo-lhes a capacidade de sobreviver e crescer na presença de antibióticos em concentrações terapêuticas que normalmente inibem ou destroem os microrganismos. Apesar de este ser um fenómeno natural, o problema tem vindo a piorar devido a diversos fatores, principalmente o uso inapropriado de antibióticos, várias vezes de forma excessiva, tanto no ser humano como em animais e conseqüentemente a sua presença e acumulação no ambiente terrestre e aquático (Bbosa *et al.* 2014; Rodríguez-Rojas *et al.* 2013). Na Figura 10 encontra-se representado, de forma simples, o comportamento das bactérias na presença de antibióticos.



Figura 10 - Imagem representativa do fenómeno de resistência a antibióticos

Ao longo dos tempos, as bactérias têm sofrido a pressão de diversas classes de antibióticos surgindo assim bactérias patogénicas multirresistentes, que não respondem a nenhum antibiótico mesmo os de largo-espectro causando doenças infecciosas incuráveis (Davies and Davies 2010).

O reconhecimento deste fenómeno como um problema sério e de preocupação global para a medicina humana e veterinária só se iniciou no início do século XXI. Atualmente, a resistência a antibióticos é descrita como uma ameaça apocalíptica para o planeta pois a era pré-antibióticos pode voltar a surgir, onde doenças infecciosas comuns não têm tratamento e podem causar a morte a milhares de pessoas e animais. De acordo com os últimos dados, nos EUA vinte e três mil pessoas por ano faleceram devido a infeções provocadas por bactérias multirresistentes e na EU esta questão já causou a morte a vinte e cinco mil pessoas por ano (Alanis 2005; Bartlett *et al.* 2013; O'Neill 2014).

2.4.4 Legislação Aplicada

Segundo a Comissão Europeia, apenas alguns Estados-Membros da EU têm uma legislação específica para a proteção dos solos. Até ao momento não existe um conjunto de regras completo e coerente realizado pela União com o objetivo de proteger o meio terrestre. No entanto, existem políticas aplicadas à agricultura, água, resíduos, produtos químicos e de prevenção da poluição industrial que indiretamente contribui para a proteção solos, mas estas medidas têm outros objetivos e âmbitos de ação e por si só não podem garantir a proteção de todo solo na Europa (BIO Intelligence Service 2013; European Commission 2015).

Em Portugal, o governo pretendia emitir legislação relativa a contaminação dos solos até Junho de 2016. Este pacote legislativo já se encontra preparado desde janeiro, realizado pela Agência Portuguesa do Ambiente (APA). Este documento, designado de PROsolos, apresenta uma lista de várias atividades potencialmente contaminadoras que terão de cumprir a futura Lei. Neste âmbito a APA pretende desenvolver um atlas de qualidade do solo, onde estará presente informação sobre os locais contaminados, atividades potencialmente contaminadoras e técnicas de remediação adotadas (Santiago 2016).

Pesquisa realizada recentemente permitiu verificar que este documento ainda não se encontra publicado em Diário da República.

2.5 Possíveis Técnicas de Redução dos Antibióticos no Ambiente

Atualmente é de extrema importância encontrarem-se medidas, normas, por parte de todos os países que promovam a redução da concentração destes compostos no meio ambiente. Estas medidas podem ser aplicadas em diversas fases do ciclo de vida dos antibióticos, desde a sua produção, seu consumo e deposição. No entanto é fundamental um papel preponderante por parte do governo de cada país. Deste modo nas tabelas seguintes será possível encontrar várias medidas que podem ser aplicadas para atingir o objetivo pretendido e encontram-se divididas em dois grupos: medidas não legislativas e medidas legislativas.

Tabela 2 - Medidas não legislativas a aplicar para redução de antibióticos no ambiente

Medida	Caracterização
Desenvolvimento do conceito “farmácia verde” e adaptar a produção ao consumo.	<ul style="list-style-type: none"> - Promover investigações para o desenvolvimento de medicamentos “verdes”; - Desenvolvimento de tecnologias e processos mais “amigos” do ambiente na produção dos mesmos; - Adequar o tamanho das embalagens com a necessidade do consumidor.
Implantar sistemas de recolhas de medicamentos não usados	<ul style="list-style-type: none"> - Valorizar o papel dos farmacêuticos na recolha de medicamentos não usados; - Fornecer informação aos pacientes sobre a importância da recolha dos medicamentos inutilizados; - Salientar os benefícios da estruturação de um sistema de recolha de medicamentos veterinários em colaboração com profissionais agrícolas e veterinários; - Desenvolver e publicar normas europeias para auxiliar a implementação de esquemas de recolha
Criar técnicas de separação na fonte e tratamento de águas residuais	<ul style="list-style-type: none"> - Garantir a manutenção de estruturas de saneamento e estações de tratamento de águas residuais de forma adequada; - Desenvolver técnicas de tratamento avançadas capazes de degradar estes compostos, como por exemplo: processos de oxidação avançada, tratamento biológico
Envolvimento da sociedade e profissionais através da sensibilização e educação	<ul style="list-style-type: none"> - Integração de considerações ambientais na formação de profissionais de saúde; - Incluir aspetos ambientais no folheto/rótulo do produto; - Organização de campanhas de sensibilização e avaliar a eficiência destas
Consolidar o conhecimento existente e promoção de atividades investigação	<ul style="list-style-type: none"> - Acesso a dados à priori confidenciais a autoridades ambientais, de forma a que compreendam na totalidade as características do medicamento; - Criação de uma base de dados da EU para a coleta de dados não confidenciais gerados por processos de pesquisa; - Melhorar e consolidar estratégias de monitorização; - Envolver o setor privado na conceção de campanhas de monitorização; - Realizar um inventário dos laboratórios de pesquisa e métodos usados para a monitorização de fármacos

Na Tabela 3 encontram-se algumas soluções legislativas para tornar possível o objetivo pretendido, no entanto é importante salientar que em certos casos, as ações não legislativas podem ser consideradas mais adequadas, necessárias ou até indispensáveis como passo preparatório para uma resposta legislativa.

Tabela 3 -Principais medidas legislativas passíveis de aplicação que potenciem a redução dos antibióticos no ambiente

Medida	Caracterização
ALTERAÇÕES NA LEGISLAÇÃO DA EU SOBRE A AUTORIZAÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE MEDICAMENTOS (DIRETIVA 2001/83/CE - MEDICINA HUMANA; 2001/82/CE - MEDICINA VETERINÁRIA)	
Processo de autorização de venda	<ul style="list-style-type: none"> - Criação de sistema de monitorização dos medicamentos fora de validade, baseado no sistema já existente para outros químicos; - Criação de um procedimento de recolha e avaliação substâncias ativas de medicamentos, criando ordens de prioridade de substâncias para avaliar;
Avaliação de risco Ambiental	<ul style="list-style-type: none"> - Revisão dos requisitos científicos da Avaliação de Risco, incluindo: Revisão dos limites de ação e certos modelos de cálculo, ter em conta os metabolitos na fase inicial.
Medidas de Mitigação do Risco e fármaco-vigilância	<ul style="list-style-type: none"> - Alteração da legislação da EU sobre medicamentos, com o objetivo de monitorizar dados que podem ser usados para avaliação após autorização de comercialização, que poderia acompanhar uma revisão das medidas de mitigação
OUTROS DOCUMENTOS LEGISLATIVOS DA EU RELEVANTES PARA O PROBLEMA REFERIDO	
Fabrico/Produção	<ul style="list-style-type: none"> - Estabelecer certificações ambientais para infraestruturas de produção de fármacos como forma de avaliação da viabilidade dos processos; - Corrigir a legislação existente para incluir limites de emissão para as substâncias ativas de medicamentos; - Promover a inovação através da redução de taxas e impostos para medicamentos verdes, ou financiamento para o desenvolvimento de ensaios ecotoxicológicos;
Tratamento de Resíduos	<ul style="list-style-type: none"> - Informar as autoridades competentes da necessidade de classificar os resíduos farmacêuticos como resíduo perigoso; - Alteração da legislação europeia relativa aos resíduos (Diretiva 2008/98/CE) para classificar os resíduos em questão como resíduo perigoso e incluir a sua lista de prioridades;
Monitorização e controlo dos resíduos de fármacos no ambiente	<ul style="list-style-type: none"> - Inclusão de uma referência direta na Diretiva Quadro da Água (Diretiva 2000/60/CE) para a Avaliação de Risco Ambiental realizada no âmbito da legislação da EU existente para os medicamentos (Diretivas 2001/82/CE e 2001/83/CE) - Incluir, também na diretiva quadro da água, os compostos ativos dos fármacos, como um grupo pertencente à lista de principais poluentes; - Incentivar a pesquisa para adquirir um maior conhecimento

Estas são as principais medidas passíveis de aplicação de forma a promover uma redução da concentração de fármacos, de forma mais específica os antibióticos, no meio ambiente. No entanto existem muito outras medidas que devem ser aplicadas de forma organizada e continua para ser possível atingir o objetivo em comum.

2.6 Estudo de Caso

A ocorrência de antibióticos nas diversas matrizes do ambiente, como já referido anteriormente, tem acontecido cada vez com mais frequência estando presentes nos solos, base de este estudo, meio aquático, desde linhas de água superficiais e subterrâneas, nos sedimentos e nos efluentes hospitalares e urbanos. Nos últimos dois casos apresentados as estações de tratamento têm uma capacidade reduzida para degradar estes compostos, pois o seu principal foco é reduzir a carga orgânica existente no efluente e não especificamente a remoção de fármacos (Aquino 2013; Batchu *et al.* 2014; Homem *et al.* 2010).

A maioria dos antibióticos conhecidos até ao momento é usada tanto na medicina humana como veterinária, como por exemplo, estreptomina, amoxiciclina, metronidazol, clorotetraciclina, tetraciclina, sulfametoxazol, lipopeptídeos, cloranfenicol, entre outros. No entanto existem certos antibióticos que são apenas de uso veterinário como é exemplo, tilosina, apramicina, timicosina (AGISAR 2011). Neste estudo, considerou-se importante estudar três antibióticos que fossem usados em ambas as medicinas, pois a problemática associada a estes afeta as duas vias de medicina. Outro fator que influenciou a escolha, foi o facto de existirem disponíveis, no laboratório o metronidazol, que pertence à classe dos nitroimidazóis, a sulfametoxazol, uma sulfonamida e o cloranfenicol, composto mais representativo dos anfenicóis, que cumprem a característica referida.

2.6.1 Antibióticos em estudo

2.6.1.1 Propriedades físico-químicas e biológicas

Metronidazol

O metronidazol é um antibiótico da classe dos nitroimidazóis e classificado como um antibacteriano e antiprotozoário e com propriedades anti inflamatórias e é um dos antibióticos mais importantes para o tratamento de doenças infecciosas no ser humano como em animais. Altamente usado no tratamento de infeções provocadas por bactérias anaeróbias, doença de Crohn, entre outras. Como já referido este composto é usado no tratamento de humanos e é muito utilizado como aditivo na alimentação de peixes e aves, acumulando-se em animais, águas de aquacultura e efluentes industriais da indústria da carne. Estudos até ao momento indicam que este fármaco tem potencial mutagénico e carcinogénico com o aumento da sua concentração nos organismos. As suas propriedades físico-químicas como a sua baixa biodegradabilidade e alta solubilidade em água dificultam a sua remoção por métodos tradicionais de tratamento de águas elevando assim a importância do estudo deste antibiótico nos diversos compartimentos ambientais (Ammar *et al.* 2016; Bendesky *et al.* 2002; Fang *et al.* 2011; Wang *et al.* 2016). Na figura e tabela seguinte encontra-se a estrutura molecular, o diagrama de especiação e as propriedades físico-químicas do Metronidazol.

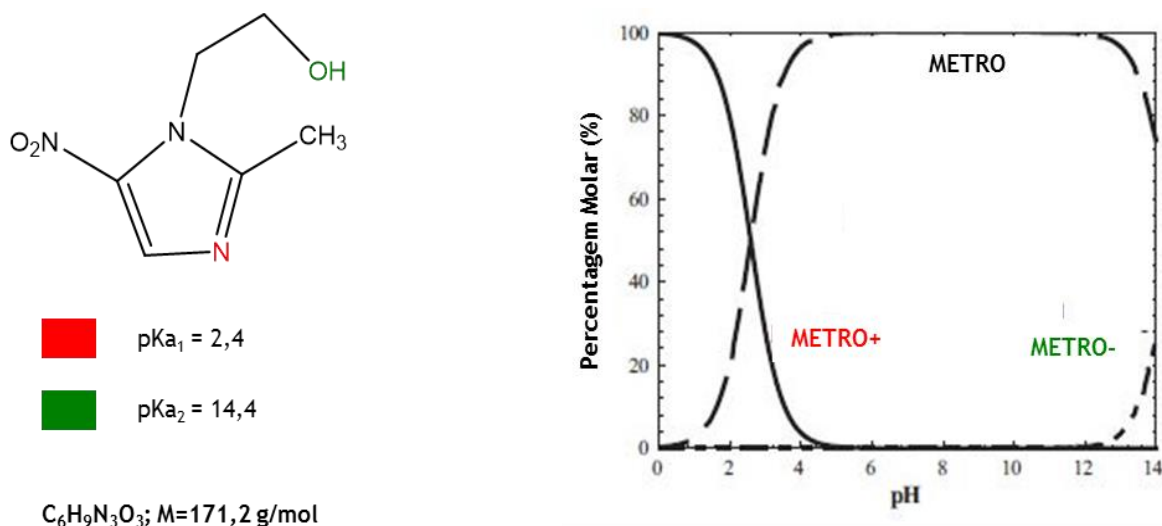


Figura 11 - Estrutura química, Massa molecular, Diagrama de especiação e respetivos pKa do metronidazol (Carrales-Alvarado *et al.* 2014)

Tabela 4 - Propriedades físico-químicas do Metronidazol (Carrales-Alvarado *et al.* 2014; Fang *et al.* 2011; Pereira *et al.* 2012)

Solubilidade em Água (mg/L)	pKa	Log K_{ow}	K_{oc} (L/g)	K_d (L/kg)
9500	$\text{pKa}_1 = 2,58$ $\text{pKa}_2 = 14,44$	-0,02	38-56	0,2-0,7

Na Figura 12 encontra-se representada o equilíbrio de ionização do metronidazol.

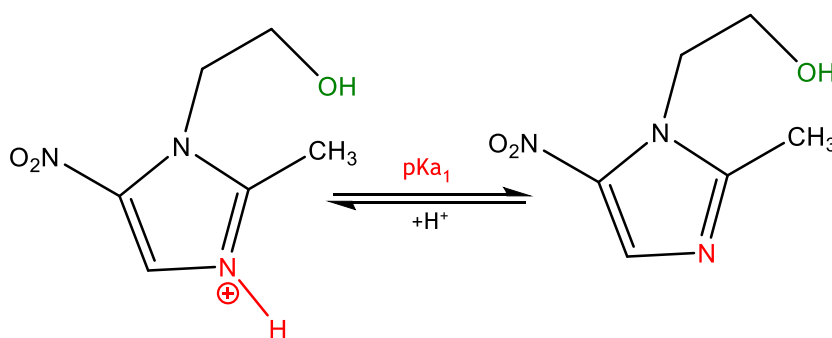


Figura 12 - Equilíbrio de ionização do metronidazol

Sulfametoxazol

A sulfametoxazol é um antibiótico pertencente ao grupo das sulfonamidas com propriedades bacteriostáticas e comumente utilizada para o tratamento de infeções do sistema urinário. Esta classe de antibióticos encontra-se muito presente na medicina humana e veterinária, devido, essencialmente, ao seu relativo baixo custo e à sua elevada eficiência na prevenção e tratamento de doenças infecciosas (Çalışkan and Göktürk 2010; Morel *et al.* 2014).

Importante salientar que cerca de 90% das sulfonamidas são excretas do organismo ao final de um a dois dias, dependendo da massa e características do organismo, e lançadas no meio ambiente. A solubilidade da sulfametoxazol é altamente dependente do pH, devido aos efeitos

provocados na especiação da mesma. Outra característica interessante deste antibiótico é o facto de este não ser biodegradável em condições anaeróbias, por este motivo, o fenómeno de biodegradação não afetará de forma representativa os resultados obtidos em estudos de quantificação de sulfa nos solos (Kurwadkar *et al.* 2007). Vários estudos recentes detetaram este antibiótico em diversas matrizes, como em vários solos, águas e estrumes (Morel *et al.* 2014). Segundo He 2014 foram detetadas sulfonamidas em estrumes da criação de suínos num intervalo de concentração de 0,01-29 mg/ Kg de amostra. Nas Figura 13, 14 e Tabela 5 encontram-se presentes a estrutura química, diagrama de especiação e propriedades físico-químicas da sulfametoxazol.

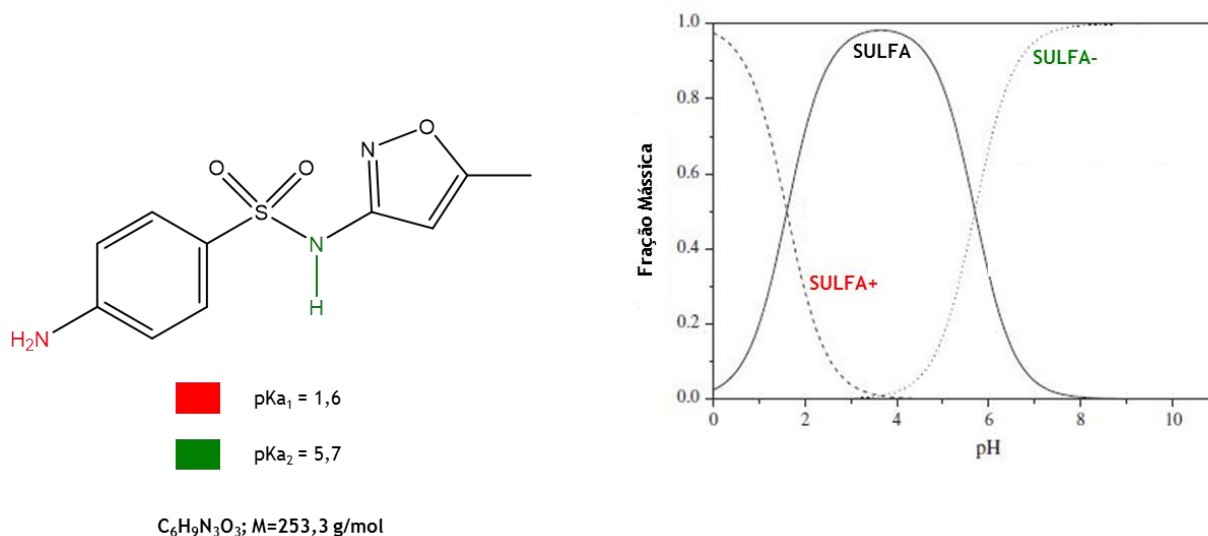


Figura 13 - Estrutura química, Massa molecular e diagrama de especiação da sulfametoxazol (Qi *et al.* 2014; Teixeira *et al.* 2012)

Tabela 5 - Propriedades físico-químicas do antibiótico sulfametoxazol (Aquino 2013; Kurwadkar *et al.* 2007; Qi *et al.* 2014; Teddy 2014)

Solubilidade em Água (mg/L)	pKa	Log K_{ow}	K_{oc} (L/g)	K_d (L/kg)
610	$\text{pKa}_1 = 1,6$ $\text{pKa}_2 = 5,7$	0,89	56-530	0,23-38

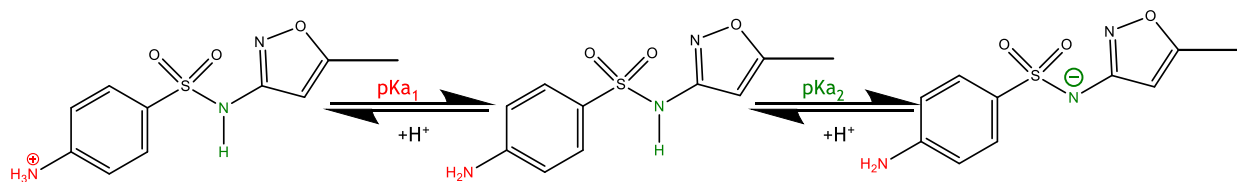


Figura 14 - Equilíbrio de ionização da sulfametoxazol (Qi *et al.* 2014; Teixeira *et al.* 2012)

Cloranfenicol

O cloranfenicol, composto mais representativo da família dos anfenicóis, é um antibiótico natural com propriedades bacteriostáticas, foi o primeiro antibiótico produzido em massa e muito eficiente no tratamento de doenças infecciosas como a febre tifóide. No passado foi amplamente usado tanto no tratamento de seres humanos como de animais, mas atualmente, este encontra-se banido da indústria alimentar e muito pouco usado na medicina humana. No entanto este ainda é usado em alguns países asiáticos, e infecções oftálmicas ainda são tratadas exclusivamente por este composto (Hanekamp and Bast 2015; Hanekamp and Kwakman 2010).

Estudos realizados, na China, encontraram este composto no meio ambiente em grandes quantidades devido ao seu anterior uso extensivo e cerca de 5 a 10% deste antibiótico é excretado do organismo sem sofrer qualquer processo de metabolismo, portanto na sua forma parental. Embora se encontre banido da indústria alimentar, o cloranfenicol ainda é usado de forma ilegal neste setor devido ao fácil acesso e baixo custo (Lin *et al.* 2010; Mitchell *et al.* 2015; Qi *et al.* 2014). Nas seguintes figuras e tabelas estão apresentadas as principais características físico-químicas, a estrutura química, massa molecular e respetivo pKa do cloranfenicol (Tabela 6; Figura 15; Figura 16).

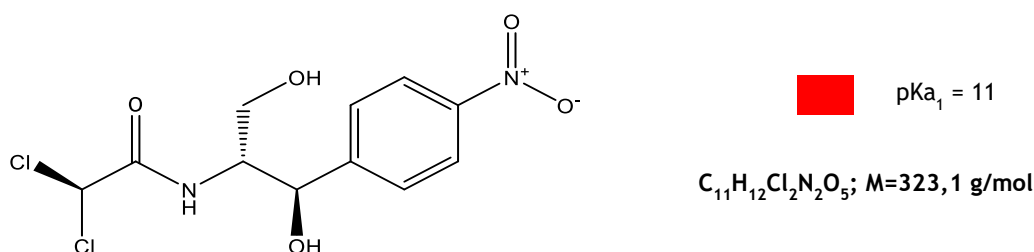


Figura 15 - Estrutura química, massa molecular e respetivo pKa do cloranfenicol (Nie *et al.* 2014)

Tabela 6 - Propriedades físico-químicas do cloranfenicol (Kumar *et al.* 2005; Nie *et al.* 2014; Qiang and Adams 2004)

Solubilidade em Água (mg/L)	pKa	Log K _{ow}	K _{oc} (L/g)	K _d (L/kg)
2500	pKa ₁ = 11,0	1,14	ND	0,2-0,4

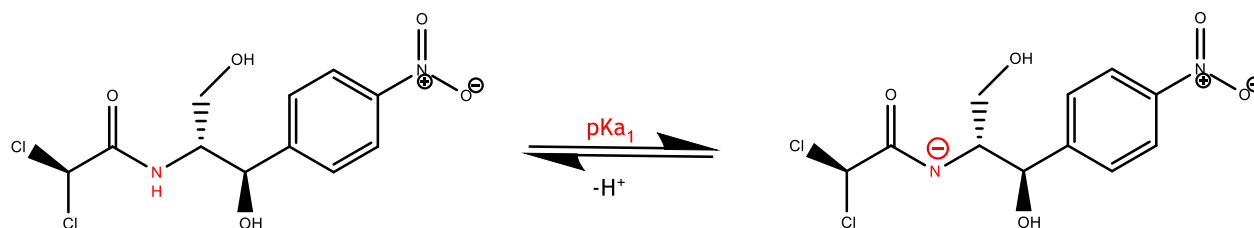


Figura 16 - Equilíbrio de ionização do cloranfenicol

2.6.2 Método analítico aplicado *QuEChERS/HPLC-DAD*

Neste subcapítulo encontram-se descritos de uma forma mais pormenorizada o método de extração dos antibióticos no solo e o método instrumental de análise, no entanto, é do conhecimento geral que existem outros métodos de extração e instrumentais para o mesmo fim. No Capítulo três serão apresentados vários estudos que demonstram esse facto.

2.6.2.1 Método de extração *QuEChERS*

Ao longo deste trabalho o método de extração usado foi o método de *QuEChERS*, sendo esta palavra o acrónimo para *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe*, que, por si só, representam as principais características deste método, pois, é considerado rápido, fácil, de baixo custo, eficiente, robusto e seguro, criado inicialmente para a deteção de resíduos de pesticidas em frutas e vegetais (Anastassiades *et al.* 2003; Vera *et al.* 2013). Este procedimento foi criado e apresentado pela primeira vez por Anastassiades *et al.* 2003.

Neste procedimento existem duas fases principais: a fase de extração ou partição e a fase de *clean-up* ou extração em fase sólida dispersiva (Anastassiades *et al.* 2003). Na fase de extração, encontram-se duas etapas principais que devem ser otimizadas para a obtenção dos melhores resultados. Primeiramente, a escolha de solvente é uma das principais decisões a tomar e deve-se ter em atenção aspetos como: cobertura do espectro de análise desejado (desde compostos polares a apolares); a seletividade deve ser garantida na fase em questão; garantir a remoção da água; custo e segurança; impacto ambiental, entre outros. O acetonitrilo é o solvente mais utilizado até ao momento, mas nem sempre com este são garantidas boas recuperações, por isso, existem outras opções, tais como: Acetato de etilo, acetona, metanol (Vera *et al.* 2013).

Após a adição do solvente de extração são adicionados sais para induzir a separação de fases. Normalmente são adicionados cloreto de sódio, para facilitar a separação de compostos polares, para obtenção de melhores recuperações, no entanto depende sempre da natureza do solvente de extração usado, e sulfato de magnésio que é um composto com função de exsicante, contendo a capacidade de se ligar a grandes quantidades de água, este deve ser colocado em excesso garantindo a saturação da água. Após a adição dos sais é importante a realização de um processo de agitação para garantir a não formação de aglomerados com $MgSO_4$, pois este tem uma grande capacidade quelante (Anastassiades *et al.* 2003; Vera *et al.* 2013).

Após a fase de extração a amostra em estudo necessita de uma fase de *clean-up*. Tradicionalmente nesta etapa é utilizada uma extração em fase sólida dispersiva (*d-SPE*), esta tem como princípio o uso destes sorbentes para remoção de interferentes e garantir que os compostos de interesse se mantêm na fase líquida. Nesta fase os principais sorbentes utilizados são o *Primary secondary amine* (PSA), com elevado efeito quelante, devido a presença de aminas primárias e secundárias (Figura 17), e tem capacidade para remover compostos polares, como ácidos gordos entre outros; e o C18, eficiente como sorbente em fase reversa e remove essencialmente compostos

apolares. Após a transferência do sobrenadante para estes sais é necessário, de seguida, agitar a amostra para facilitar este processo (Caldas *et al.* 2011; Vera *et al.* 2013).

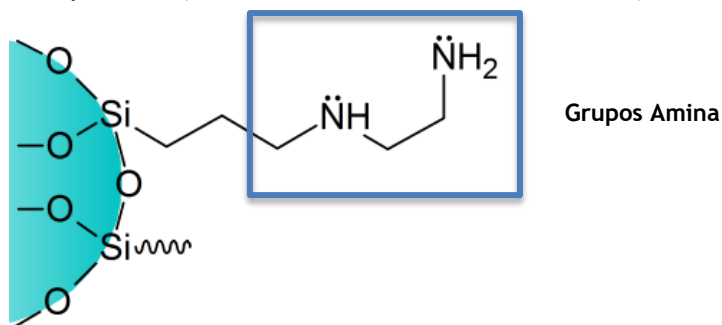


Figura 17 - Estrutura do PSA

2.6.2.2 Análise por HPLC -DAD

Neste trabalho o método utilizado para quantificar os antibióticos foi a cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de arranjo de díodo, DAD.

A cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvida no final dos anos sessenta, desde a década passada que tem sido o método escolhido para análise de uma grande variedade de compostos. Descrevendo de forma sucinta este método, primeiramente, ocorre a injeção de uma pequena porção da amostra que é arrastada por uma corrente líquida, denominada de fase móvel, esta passa por uma coluna, coluna cromatográfica, que contém partículas como enchimento e que é chamado de fase estacionária. O fenómeno de separação da mistura nos diferentes componentes depende do grau de retenção de cada componente com a coluna. Isto significa que compostos que tenham uma maior afinidade com o conteúdo da coluna será eluído mais tarde e compostos com menor afinidade serão eluídos mais cedo. O espaço temporal entre a injeção e a deteção do composto é denominado de tempo de retenção (NTCI 1990).

Um equipamento de HPLC deve ser composto por um reservatório para a fase móvel; uma bomba de alta pressão para distribuição do solvente; injetor, que introduz a amostra no fluxo da fase móvel que se circula continuamente na coluna cromatográfica; coluna, como referido é a fase estacionária; detetor, que permite distinguir os analitos em estudo, tubagem de alta pressão e acessórios para interligar todos os componentes. Na figura seguinte encontra-se uma representação esquemática desde equipamento (Waters 2016).

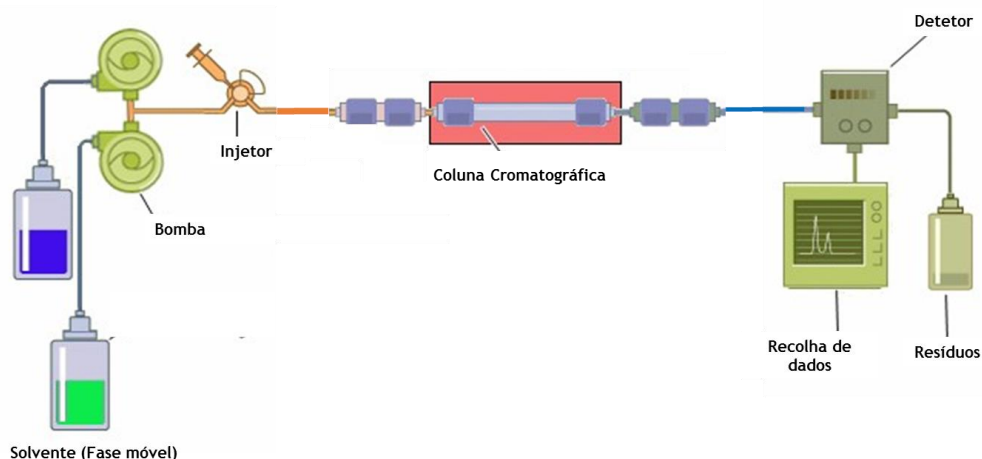


Figura 18 - Representação esquemática de um HPLC (adaptado de Waters 2016)

Neste projeto, como referido, o detetor utilizado foi *DAD*, este deteta a absorção de um composto na região visível à região ultravioleta tal como o detetor de radiação *UV-Vis*. Este último apenas contém um receptor para um único comprimento de onda, no entanto, o *DAD* tem múltiplos receptores que permitem a obtenção de diversos comprimentos de onda ao mesmo tempo, esta é a principal vantagem do *DAD*. O principal objetivo é que os espectros sejam medidos em pequenos intervalos de tempo, um segundo ou menos, com a circulação contínua do solvente. Se a medição for realizada a um comprimento de onda fixo, os componentes são identificados através do seu tempo de retenção, se ocorrer um pequeno desvio deste tempo poderá complicar a identificação dos compostos de interesse. Por este motivo, o *DAD* pode ser usado para identificar os componentes através de uma comparação de espectros (HITACHI 2016).

3 Estado de Arte

Os antibióticos, nos últimos anos, têm sido considerados poluentes emergentes devido ao seu uso massivo e contínua emissão no meio ambiente, estes podem também ser considerados semi-persistentes, não pelo facto de terem grandes tempos de semi-vida, mas devido a descarga continua destes no meio ambiente, não tendo este a capacidade de os degradar à mesma taxa em que são introduzidos. Estes são compostos não-voláteis e hidrofílicos. Por este motivo, são necessários métodos de analíticos que devem ser otimizados para garantir que os resultados obtidos são confiáveis.

Neste capítulo serão apresentados alguns dos estudos realizados até ao momento relacionados com a ocorrência de antibióticos em solos, lamas e estrumes e metodologias de deteção permitindo um perspetiva abrangente do trabalho realizado e efetuar uma análise comparativa dos mesmos. Na Tabela 7 estão apresentados de forma resumida os estudos que serão discutidos de seguida, os métodos de extração e deteção utilizados em cada situação e principais resultados obtidos.

Guo *et al.* 2016 realizou o estudo para a quantificação e identificação de 26 antibióticos veterinários em amostras de estrumes provenientes de suiniculturas onde foram comparados dois métodos de extração, *QuEChERS* e *SPE*, e utilizaram como método de separação e deteção *LC-MS/MS*. Foram incluídos antibióticos da classe das tetraciclina, sulfonamidas, macrolídeos, floroquinolonas entre outros. O método de extração apresentado encontra-se dividido em dois passos principais. Primeiro a amostra sofre um processo de pré-tratamento da amostra antes do processo de extração por si só. O procedimento de separação líquido-sólido em fase dispersiva foi o seguinte: adição do *QuEChER I* com 4 g $MgSO_4$ e 1 g $NaCl$, foi retirado 2 mL de sobrenadante e adicionado ao *QuEChER I* que continha 40 mg PSA e 20 mg C_{18} . No caso do processo de *SPE*, primeiramente o sobrenadante foi concentrado, através da evaporação de parte do sobrenadante num evaporador rotativo, foi levado a centrífuga e de seguida filtrado. O adsorvente presente nos cartuchos foi Oasis HLB, estes foram condicionados com Metanol e água ultrapura e lavados com água. A eluição dos compostos foi realizada com acetonitrilo acidificado. Por fim, os extratos foram analisados em *LC-MS/MS*. Neste estudo foram obtidas recuperações entre 61,39 e 105,65% para a maioria dos compostos exceto para sulfoquinaxalina, 55,7 - 56,8%, e para valnemulina, 33,7 - 37,7%. Sendo este um estudo comparativo, foi possível concluir que foram obtidas melhores recuperações para praticamente todos os antibióticos através do método de *QuEChERS*.

Em Sollicet *et al.* 2016 os principais objetivos do projeto foram, em primeiro lugar, desenvolver um método analítico capaz de quantificar e identificar antibióticos veterinários e os seus produtos de degradação em dejetos, solos e amostras de água; estudar a distribuição destes em solos e águas de drenagem; e uma pequena avaliação do potencial toxicológico no ambiente. Neste caso só será apresentado o método analítico aplicado às amostras de solo. Neste estudo o procedimento de extração utilizado foi o *SPE*. O adsorvente, polímero de fase inversa *strata - X*, foi acondicionado

com uma solução composta por metanol, padrão McIlvaine e água, depois lavado com água e metanol na proporção 90:10, por fim, as amostras foram eluídas recorrendo a uma solução de metanol com 0,1% de HCOOH. Para a identificação e quantificação dos analitos recorreram a cromatografia líquida com detetor *HESI-HRMS*. A fase móvel era constituída por água acidificada com 0,1% de HCOOH e metanol acidificado na mesma quantidade que a água. Neste projeto, nas amostras de solo obtiveram recuperações que variaram entre os 40 e os 111%

Outro estudo em que foram analisadas amostras de estrume proveniente de suiniculturas foi em Meersche *et al.* 2016. Neste caso foram avaliadas amostras de solo que continham dejetos de suínos. Estas amostras foram sujeitas a um processo extrativo simples, onde, primeiro, a amostra era fortificada com os antibióticos em estudo, era adicionado o solvente de extração, acetonitrilo com 6% de TCA, de seguida estas sofriam processos homogeneização e separação física das fases líquida e sólida. Após este processo as amostras eram concentradas em corrente de azoto, depois reconstituídas numa solução de água e acetonitrilo (80:20, v/v) acidificado com 0,1% de ácido fórmico, voltavam a sofrer um processo de agitação, depois eram colocadas num banho de ultrassons, filtradas e diluídas. O método instrumental aplicado para a deteção dos 8 antibióticos em estudo foi *HPLC-MS/MS*, constituída por uma coluna cromatográfica Kinetex C₁₈ e uma fase móvel composta por uma solução com água e metanol acidificada com ácido fórmico e com formato de amónio, fase A, e por outra que contém Acetonitrilo também acidificado com ácido fórmico, fase B. Para os compostos em estudo neste projeto foram obtidas recuperações no intervalo de 94 a 106%.

Ao comparar estes três primeiros estudos foi possível verificar que foram obtidas percentagens de recuperação semelhantes mesmo tendo sido utilizadas técnicas de extração bastante diferentes umas das outras. Nestes três estudos foram estudadas amostras de dejetos de suínos tornando interessante esta comparação. Outro facto interessante é que determinados fármacos foram analisados nos três estudos, como por exemplo, a oxitetraciclina.

No projeto realizado por Wei *et al.* 2015 foi estudado a ocorrência de treze antibióticos veterinários em amostras de solos fertilizados com fertilizantes de origem animal. As amostras de solo foram obtidas a diferentes profundidades para compreender o comportamento destes fármacos em profundidade. O procedimento aplicado foi *SPE* e foram seguidos os seguintes passos: primeiro foi realizado o pré-tratamento da amostra, depois os cartuchos de Oasis HLB foram condicionados com uma solução composta por MeOH e padrão McIlvaine, a lavagem destes foi com água ultrapura e a eluição foi realizada com o auxílio de uma solução de ácido oxálico em metanol, por fim a amostra é seca numa corrente de azoto e reconstituída em fase móvel. O método para a determinação e quantificação dos compostos analisados foi *HPLC-MS/MS*, composto por uma fase móvel, constituída por água e acetonitrilo acidificado com ácido fórmico, e uma fase estacionária, formada por uma coluna Agilent Zorbax RX-C₈. Foram obtidas recuperações no intervalo de 50,3 a 80,7%

Cerqueira *et al.* 2014 foi outro projeto realizado no mesmo âmbito dos trabalhos apresentados até agora e que serviu de base para o desenvolvimento do trabalho experimental realizado nesta

dissertação. Neste estudo foi aplicado o método de *QuEChERS* a amostras de lamas produzidas no tratamento de água potável. O passo inicial deste método extrativo foi a adição do solvente de extração, MeOH:ACN (1:1) acidificado com ácido acético, seguido de agitação, depois foram adicionados os sais para facilitar o fenômeno de partição, 4 g MgSO₄ + 1 g NaCl, voltando a agitar, de seguida o sobrenadante é adicionado ao adsorvente PSA, voltando a agitar a amostra, passando por um processo de centrifugação, recolheu-se o sobrenadante e filtrou-se os extratos. Estes foram analisados em UPLC - MS/MS ESI. Neste projeto as recuperações obtidas encontram-se no intervalo entre os 50 e os 95%.

Analisando estes estudos em conjunto, verificou-se que no método extrativo *SPE* o adsorvente dos cartuchos mais usado foi o Oasis HLB, exceto em Sollic et al. 2016, já descrito anteriormente, e Li et al. 2015, que usou dois adsorventes em série: SAX + Oasis HLB, par a extração de antibióticos em solos provenientes de terrenos agrícolas. Independente do adsorvente usado e de todo o processo extrativo averiguou-se que as recuperações obtidas são semelhantes. Tal como na maioria dos estudos o método de determinação e quantificação em Li et al. 2015 foi *UPLC - MS/MS*.

Nos estudos apresentados observou-se que todos os métodos analíticos aplicados são compostos por uma fase extrativa, outra de limpeza da amostra e por fim de deteção/quantificação. Os métodos de extração mais comuns foram *SPE* e *QuEChERS*, permitindo realizar uma análise comparativa destes dois métodos. Como é possível visualizar na tabela abaixo o método de quantificação dos compostos mais utilizado foi o *HPLC* e o detetor mais comum foi espectrómetro de massa, pois este permite uma identificação mais precisa dos analitos em estudo, no entanto este detetor não se encontrava disponível no laboratório, por isso optou-se por um detetor *DAD*.

Tabela 7 - Métodos de Extração e detecção de antibióticos de solos e lamas

Local	Compostos	Pré-Tratamento	Método de Extração	Método Instrumental	Concentração obtida (µg/kg)	Parâmetros analíticos (LOD e LOQ) (µg/kg) Recuperação (%)	Referência
ÁSIA							
China	CTC; TC; OTC; DC; SMD; SMM; SQ; SM2; SMZ; SCZ; TIL; KIL; ERY; ROX; TYL; TUL; ENX; NOR; CIP; ENR; DIF; SAR; TIA; VAL; LIN; CLI	1 g de lamas de suínos; Spike 20 mL MeOH:ACN: 0,1 M EDTA-McIlvaine (12,5/37,5/50 v/v); Vórtex Ultrassonicação Centrifuga Extração do sobrenadante	d-SPE (QuEChERS) QuEChER I: 4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl 2 mL de sobrenadante QuEChER II: 40 mg PSA + 20 mg C ₁₈ SPE Evaporação Adição 6 mL 0,1% ácido fórmico em água Centrifugação Filtração Adsorvente: Oasis HLB 3cc/mg Condicionamento: MeOH+ água ultrapura Lavagem: água ultrapura Eluição: ACN acidificado Secagem N ₂ Adição ACN: 0,1% ácido fórmico (20/80, v/v)	LC-MS/MS Fase Móvel: ACN e 0,1% de ácido fórmico em água Fase Estacionária: Coluna Agilent Eclipse XDB-C ₁₈	CTC=11,3-5325 TC=8-140 OTC=ND-110 DC<LOQ-400 SMM=ND-1,3 SMZ=0,5-4475 SCZ=ND-1 TIL=2,3-14400 KIL=ND-2,7 TUL=ND-447 ENR=ND-162 CIP=ND-33,3 SAR=ND-184 TIA=ND-59,2 VAL=ND-2,3 LIN=ND-10 CLI=ND-8,7 SMD;SQ;SMZ; ERY;ROX;ENO; NOR;DIF=ND	LOQ=0,05-5,91 LOD=0,01-1,86 R>0,996 33,7-105,65%	(Guo <i>et al.</i> 2016)
	SDZ; SMZ; SMR; SDX; SQ; OTC; TC; CTC; DC; CIP; ENR; FF; CY	3 g de solo 9 mL de MeOH + 1 mL de 0,1 M Na ₂ EDTA - McIlvaine (pH=6) Agitação em vórtex Ultrassonicação Centrifugação	SPE Adsorvente: Oasis HLB (6 mL, 500 mg) Condicionamento: MeOH+ 0,1 M Na ₂ EDTA - McIlvaine (pH=4) Lavagem: água ultrapura Eluição: 0,01 M ácido oxálico em MeOH Secagem em corrente de N ₂ Reconstituição com fase móvel	HPLC-MS/MS ESI Fase estacionária: coluna Agilent Zorbax RX-C ₈ Fase móvel: Fase A - Água acidificada Fase B - ACN acidificado ambos com 0,1% de ácido fórmico	CY=3,7-52,8 SDZ=ND-682 SMZ=15,3-1688 SMR=1,6-1784 SQX=ND OTC=34,4-3676 TC=13-10207 CTC=22-86567 DOX=9-76,5 CPFX=9,0-7220 ERFX=ND-3059 FF=4,0-11,4	LOQ=2-7 50,3-80,7	(Wei <i>et al.</i> 2015)

	SMR; SMZ; SDZ; SM; SDM; SMR; TC; OTC; CTC; NOR; CIP; ENR; LOM; ETM; ROX	2 g solo ACN + ácido cítrico Agitação em Vórtex Ultrassonicação Centrifugação Concentração em evaporador rotativo Diluição (100 mL de água ultrapura)	SPE Adsorvente: SAX (6 mL, 500 mg) + Oasis HLB (6 mL, 500 mg) Condicionamento: MeOH+ água ultrapura Lavagem: água ultrapura Eluição: MeOH Secagem em N ₂ Adição de padrão interno Reconstituição em MeOH: H ₂ O (1:1) Filtração	UPLC-MS/MS Fase estacionária: Coluna ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ Fase móvel: Fase A - H ₂ O + 0,1% ácido fórmico Fase B-MeOH	ΣSAs=ND-13 ΣTCs=13-430 ΣQNs=7,7-649 ΣMLs=ND-5,7	R>0,99 LOD= 0,2-5	(Li <i>et al.</i> 2015)
China	ENR; CIP; NOR; LOM	1 g solo 5 mL solução aquosa MgNO ₃ (50%) + 4% de amônia aquosa Agitação por vórtex Ultrassonicação Centrifugação Concentração em evaporador rotativo	SPE Adsorvente: Oasis HLB (3 mL/60 mg) Condicionamento: MeOH+ água <i>Milli-Q</i> Lavagem: água <i>Milli-Q</i> Eluição: ACN acidificado (1%) Secagem em N ₂ (0,1 mL) Reconstituição em 0,1% sol ácido fórmico + 0,1% ácido fórmico em ACN (90:10, v/v)	HPLC-MS/MS Fase estacionária: Coluna Agilent Eclipse Plus C ₁₈ Fase móvel: ACN+H ₂ O (10:90, v/v, com 0,1% ácido fórmico)	ENR=0,02-24,4 CIP=ND-42,0 NOR=0,14-17,9 LOM=0,02-11	R ² >0,999 LOQ = 0,004-0,011 LOD=0,001-0,003 67-88%	(Wu <i>et al.</i> 2014)
	SMZ; SDX; SCP; CAP; OTC; TC; CTC; LIN; OFL; CIP; PEF	1,0 g de solo liofilizado ACN + 0,1 M EDTA-McIlvaine (1:1) Agitação em Vórtex Ultrassonicação Centrifugação Evaporação em evaporador rotativo	SPE Adsorvente: Oasis HLB 3cc/mg Eluição: MeOH Secagem N ₂ Reconstituição em MeOH	LC-MS/MS Fase estacionária: Coluna Agilent ZORBAX C ₁₈ (150 mm x 2,1 mm; 3 μm) Fase móvel: Fase A - ACN Fase B - 0,5% ácido fórmico	OTC=<LOD-2683 TC=2,5-105 CTC=ND-1079 SMZ=0,03-0,9 SDO=ND-9,1 SCP=0,18-2,5 CAP=ND-1,1 OFL=<LOD-1,6 PEF=ND-<LOD CIP=0,19-0,8 LIN=ND-0,18	LOD foi determinado	(Hu <i>et al.</i> 2010)

AMÉRICA

Canadá	AMX; TMP; LIN; SDX; CFT; TYL; PEG; TC; 4- ETC; ATC; 4- EATC; 4-ECTC; DC; DEC; OTC; MC; CTC; SPI	2 g solo Tampão EDTA-McIlvaine adicionado Agitação em vórtex Ultrasonicação Centrifugação Filtração Acidificação (c/ ácido cítrico) EDTA adicionado (0,1 M) pH = 5	SPE Adsorvente: polímero de fase inversa Strata-X Condicionamento: MeOH, H ₂ O e Tampão McIlvaine Lavagem: H ₂ O:MeOH (90:10, v/v) Eluição: MeOH c/ 0,1% de HCOOH Evaporação em corrente de N ₂ Recuperação com H ₂ O	UHPLC-MS/MS Fase estacionária: Coluna Kinetex C18 Fase móvel: Fase A - H ₂ O c/ 0,1% HCOOH Fase B - MeOH c/ 0,1% HCOOH	TMP<LOQ-37 LCM<LOQ SFX<LOQ TC<LOQ-17 4 ETC<LOQ-16 ATC=ND-152 4-EATC=ND-1020 OTC<LOQ MC=ND DEC=ND-<LOQ 4-EDC=ND-154 DC<LOQ-46 CTC<LOQ-333 4-ECTC=ND-145 ICT=ND-34 4-EICT=ND-66	R ² = 0,961-0,999 LOQ =3,5-25 LOD = 1,0-7,4 40-111%	(Sollicet <i>et al.</i> 2016)
Brasil	AMI; AZA; CBP; CFT; CTM; DLZ; FLP; GFZ; GBA; CTZ; LDC; MBZ; METRO; MIZ; NSL; PDS; PPL; SMZ; TEO; TMP	10 g de lamaz	QuEChERS Solvente ACN acidificado c/ CH ₃ COOH Agitação manual Agitação em vórtex QuEChERS I: 4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl Agitação Manual Agitação em vórtex QuEChERS II: 300 mg MgSO ₄ + 125 mg PSA Agitação em vórtex Centrifugação Recolha sobrenadante Filtração	UPLC-MS/MS ESI Sistema UPLC Acquity Ultra	Não detetados	LOQ = 0,5-10 LOD = 0,15-0,6 R ² = 0,98-0,99 50-95%	(Cerqueira <i>et al.</i> 2014)
EUROPA							
Bélgica	CFT; CLTA; CLTB; DC; OTC; SDZ; TMP; TYL A	2 g solo (± de estrume de suínos)	Método Extrativo Simples Fortificação ACN + 6% de TCA Homogeneização Agitação Centrifugação Secagem em N ₂ Reconstituição: H ₂ O:ACN (80:20, v/v) + 0,1% de ácido fórmico Agitação Ultrasonicação Filtração	HPLC-MS/MS Fase estacionária: Coluna Kinetex C18 Fase móvel: Solvente A - H ₂ O:ACN (95:5) + Ácido Fórmico (0,5%) + Formato de Amônio (0,1%) Solvente B - MeCN + Ácido Fórmico (0,1%)	CTF=ND CLTA=ND-48600 CLTB=ND-40800 DC=ND-22760 OTC=ND-2029 SFZ=ND-2980 TMP<LOQ-6 TYL A=ND-NQ	LOQ = 3,5-67,3 LOD = 1,1-20,2 R>0,969 94-106%	(Meersche <i>et al.</i> 2016)

Espanha	PIP; ENX; NOR; CIP; OFL; ENR; DIF; MAR; DAN; SAR; CIN; LOM; MOX; NAL; OXO; FLU; PIR	1 g de composto Agitação em vórtex Fortificação Agitação em vórtex pH = 3	SALLE - d - SPE ACN: ácido m-fosfórico (1%, 7:3, v/v) adicionado QuEChERS I: 3 g NaCl Agitação Centrifugação QuEChERS II: 300 mg PSA+600 mg MgSO4 Agitação Centrifugação Evaporação (corrente de N2) Recuperação (formato de amónio: MeOH (1:1, v/v)) Centrifugação	UHPLC LC-MS ESI Fase estacionária: ACQUITY UPLC BEH™ Coluna C18 Fase móvel: Fase A - Formato de amónio Fase B - MeOH	MOX=ND-79,5 MAR=ND-13,9 OFL=10,7-719,2 ENR=9,0-674,4 CIP=152-836 NOR=ND-131 PIR=ND-6,1 CIN=ND-9,60 OXO=ND-18,4 FLU=ND-5,8 NAL=ND-23	R ² =0,0993-0,999 LOQ=0,5E-3-1,5E-3 LOD=0,2E-3-0,5E-3 95,3-106%	(Dorival-García <i>et al.</i> 2015)
Portugal	IBP; HIBP; CIBP	10/7,5/5 g de solo Fortificação Agitação em Vórtex (1,2,3,4,5,10 min)	QuEChERS Solventes: ACN; ACN:MeOH (60:40; 50:50; 40:60, v/v); MeOH; m-hexano-acetona (1:1); acetato de etilo; acetona; QuEChERS I: 6 g MgSO4 + 1,5 g CH3COONa QuEChERS II: 4 g MgSO4 + 1 g NaCl QuEChERS III: 6 g MgSO4 + 1,5 g NaCl + 1,5 NaCit + 0,750 g Na2Cit QuEChERS IV: 4 g MgSO4 + 1 g NaCl + 1 NaCit + 0,50 g Na2Cit Ultrassonicação Centrifugação Recolha do sobrenadante Evaporação em corrente de N ₂ Recuperação em ACN Filtração	LC-FLD Fase estacionária: Coluna Luna C18 Fase móvel: ACN e H2O ultrapura	IBP e HIBP=ND CIBP=46,1	LOQ = 6,10-22,4 R ² = 0,999 79,5-101%	(Bragança <i>et al.</i> 2012)

Legenda: 4-epianidrotetraciclina (4-EATC); 4-epiclorotetraciclina (4-ECTC); 4-epitetraciclina (4-ETC); Ácido Nalidíxico (NAL); Ácido Ocolínico (OXO); Ácido Pipemídico (PIP); Ácido Piromídico (PIR); Amitriptilina (AMI); Amoxicilina (AMX); Azatioprina (AZA); Benzilpenicilina (PEG); Carbamazepina (CBP); Carboxi-ibopropeno (CIBP); Ceftiofur (CFT); Cetoconazol (CTZ); Cinoxacina (CIN); Ciprofloxacina (CIP); Ciromazina (CY); Claritromicina (CTM); Clindamicina (CLI); Cloranfenicol (CAP); Clorotetraciclina (CTC); Colistina A (CLT A); Colistina B (CLT B); Danofloxacin (DAN); Demeclociclina (DEC); Difluoxacina (DIF); Dilitazem (DLZ); Doxicilina (DC) Enoxacina (ENX); Enrofloxacin (ENR); Eritromicina (ERY); floranfenicol (FF); Furazepam (FLP); Gemfibrozil (GZF); Glibenclamida (GBA); Hidroxi-ibopropeno (HIBP); Ibopropeno (IBP); Kitasamicina (KIL); Lidocaina (LDC); Lincomicina (LIN); Lomefloxacina (LOM); Flumequina (FLU); Marbofloxacina (MAR); Mebendazol (MBZ); Metronidazol (METRO); Micanazole (MIZ); Minociclina (MC); Moxifloxacina (MOX); Nimesulida (NSL); Norfloxacina (NOR); Ofloxacina (OFL); Oxitetraciclina (OTC); Pefloxacina (PEF); Prednisona (PDS); Propranolol (PPL); Roxitromicina (ROX); Sarafloxacina (SAR); Spiramicina (SP); Sulfaclopiridazina (SCP); Sulfaclozina (SCZ); Sulfadiazina (SDZ); Sulfadimetoxina (SDM); Sulfadimidina (SM2); Sulfadoxina (SDX); Sulfamater (SM); Sulfamarazina (SMR) Sulfametoxazol (SMZ); Suldametoxidiazina (SMD); Sufamonometoxina (SMM); Teofilina (TEO); Tetraciclina (TC); Tiamulina (TIA); Tilmicosina (TIL); Tilosina (TYL); Tilosina A (TYL A); Tremetoprim (TMP); Tulatromicina (TUL); Valnemulina (VAL)

4 Materiais e Métodos

4.1 Materiais e Reagentes

Os padrões de referência dos compostos em estudo, metronidazol (> 98%), sulfametoxazol (> 98%) e cloranfenicol (> 99%) foram fornecidos pela Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha). O acetonitrilo e o metanol, solventes utilizados em *HPLC*, provêm da empresa VMR (Fontenay-sous-Bois, France). A água ultrapura, utilizada ao longo do trabalho experimental, foi tratada através de um sistema purificador (3 L/h) da Elix Essential Water cedido pela Merck Millipore (Beeston, Reino Unido). O ácido ortofosfórico, com pureza de 85%, foi produzido na VMR (Fontenay-sous-Bois, France).

No ensaio de *QuEChERS*, os compostos usados foram os seguintes; sulfato de magnésio, fornecido pela empresa Panreac ITW Companies (Darmstadt, Alemanha), PSA-Sílica (100 mg), DSC-18, produzidos pela Supelico (Bellefonte, USA) e cloreto de sódio (pureza (%)=99,5) provem da E. Merck (Darmstadt, Alemanha). Além destes, os filtros de PTFE (2 µm) foram fornecidos por VMR (EUA) e o ácido acético (99,8%) foi produzido pela E. Merck (Darmstadt, Alemanha).

4.2 Métodos de Análise

4.2.1 Método Instrumental

4.2.1.1 Instrumentação

As análises em cromatografia foram realizadas usando um sistema Hitachi (Tóquio, Japão) constituído por uma bomba L-7100 (*Merck Hitachi*), um injetor *Rheodyne (Rohnert Park, EUA)* modelo 7725 (100 µL *loop*) e um detetor *DAD L-7450 A (Merck Hitachi)*. A separação cromatográfica foi executada numa pré-coluna *Purospher RP-18e* (4 x 4 mm) fornecida por *Merck* (Darmstadt, Alemanha) e numa coluna *RP-18e* (250 x 4 mm, 5 µm de tamanho de partícula). Os constituintes da fase móvel foram água com pH dois ajustado com ácido fosfórico (A) e acetonitrilo (B), utilizados segundo um gradiente de eluição descrito de seguida; durante os primeiros sete minutos foi definido 10% de B, de seguida aumentou-se para 35% ao longo de três minutos e manteve-se estas condições ao longo de oito minutos, depois este valor subiu para 50% durante sete minutos, por fim o valor de B volta ao valor inicial (10%) durante 15 minutos permitindo que a coluna analítica atinja o equilíbrio antes do começo da corrida seguinte. No total a corrida tem um tempo de duração de 30 minutos. Na figura seguinte encontra-se representado o gradiente de eluição na forma gráfica.

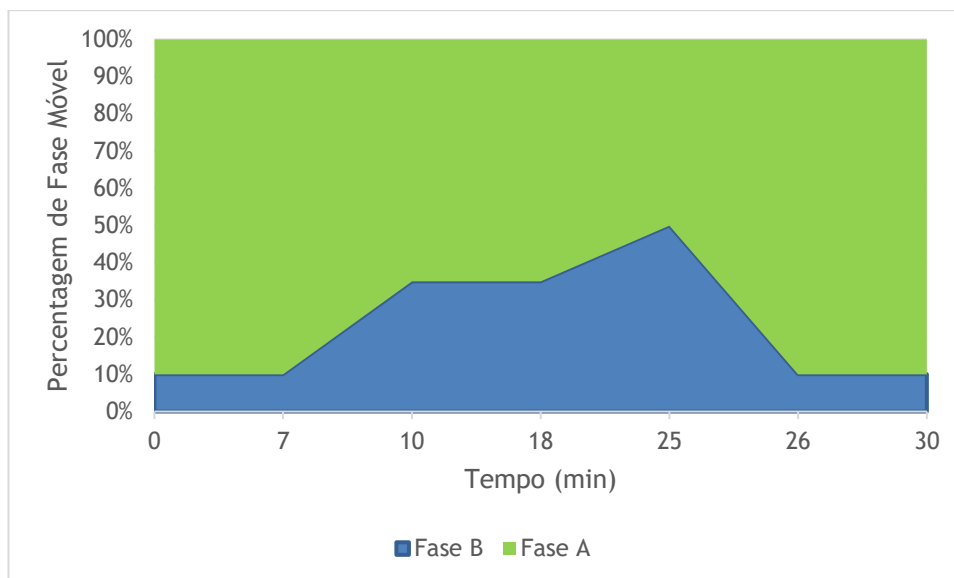


Figura 19 - Gradiente de Eluição usado nas análises cromatográficas

O volume injeção considerado foi 100 μ L e todas as análises foram realizadas à temperatura ambiente. O caudal da fase móvel considerado foi 0,8 mL/min. Para identificação dos antibióticos foi necessária a comparação com padrões, tendo em consideração o tempo de retenção em LC e o espectro UV de cada analito. A absorção destes compostos em radiação UV foi monitorizada ao longo de um intervalo de comprimentos de onda compreendidos entre 170 e 900 nm. Desta forma foi possível concluir que os analitos eram detetados a um comprimento de onda de 280 nm. Os resultados foram recolhidos e analisados pelo *software* HSM D-7000 (versão 3.1) para HPLC. Para quantificação dos compostos foi efetuada uma calibração externa.

4.2.1.2 Validação do Método Analítico

A validação do método analítico foi executada em termos de linearidade, repetibilidade, precisão intermédia e exatidão.

As soluções *mix* para cada ensaio experimental foram preparadas diariamente com a diluição pretendida em água ultrapura a partir de soluções *stock* metronidazol (200 mg/L), sulfametoxazol (222 mg/L) e cloranfenicol (248 mg/L) conservadas em água ultrapura e 50% de metanol mantidas a uma temperatura de -20 °C.

A linearidade foi avaliada para seis pontos da curva de calibração para o metronidazol, sete pontos para a sulfametoxazol e oito pontos para o cloranfenicol. Para estes compostos, os limites de deteção (*LOD*) e os limites de quantificação (*LOQ*) foram calculados por uma média ($n=6$, METRO; $n=7$, SULFA; $n=8$, CAP) rácio sinal-ruído (*S/N*) entre 3 e 10, respetivamente. A repetibilidade foi avaliada através do desvio-padrão relativo (*RSD*, %) da extração de seis amostras fortificadas a três níveis de concentração diferentes ($n=6$). A exatidão foi analisada pelo método de adição de seis extrações a três níveis de concentração ($n=6$) e a precisão intermédia foi determinada como sendo o *RSD* de extrações em duplicado a três níveis de concentração diferentes em três dias consecutivos ($n=6$). As recuperações foram determinadas através da comparação da resposta instrumental obtida

para as amostras com a resposta obtida na injeção de padrões com as concentrações esperadas no ensaio. A fórmula de cálculo usada foi a seguinte (Equação 4):

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{A_{\text{obtida}}}{A_{\text{esperada}}} \times 100 \quad (4)$$

4.2.2 Amostragem

O processo de amostragem foi realizado num pequeno quintal no centro da cidade do Porto (Calçada da Póvoa, 41°09'25.0"N 8°35'51.6"W) a uma profundidade variável entre os 10-20 cm e a recolha foi composta por duas quantidades equivalentes colhidas em dois pontos diferentes para com o objetivo de eliminar possíveis erros. O solo tinha um aspeto escuro, altamente mineralizado, pois tratava-se de uma zona de cultivo de legumes e plantações de árvores de fruto. A recolha foi realizada no dia 2 de julho do corrente ano.

4.2.3 Método de Extração

Nestes ensaios o método de extração usado foi *QuEChERS*, onde o procedimento geral foi já explicado num subcapítulo anterior. Primeiro definiu-se um protocolo, este foi baseado no procedimento realizado por Penêda (2016), com algumas alterações na fase de adição do *spike*, e foram testadas diferentes condições, como tempos de agitação no vórtex, as massas de sorventes entre outras, correspondentes aos ensaios 1 a 4. No entanto, por motivos explicados no capítulo seguinte, optou-se por testar o procedimento utilizado por Cerqueira *et al.* (2014) com algumas alterações. O procedimento geral realizado foi o seguinte: num tubo de Falcon com 4 g de solo foi adicionado 100 µL da solução *mix* com os antibióticos em estudo com uma concentração de 2,5 mg/L, homogeneizou-se a amostra com a solução com o auxílio do vórtex e deixou-se em repouso durante 5 minutos. Após o tempo de repouso adicionou-se 10 mL de solvente de extração e de seguida os tubos foram levados ao vórtex e ao ultrassons. Depois da fase de extração iniciou-se a fase de *clean-up* da amostra com a adição do *QuEChER 1*, composto por MgSO₄ e NaCl, ao tubo com solo, novamente estes sofreram um processo agitação e seguidamente foram centrifugados a 4000 rpm durante 10 minutos. Após a primeira fase de limpeza, foi removido o sobrenadante de tubo e foi adicionado ao *QuEChER 2*, que continha MgSO₄, PSA-Sílica e DSC-18. Posteriormente, estes foram agitados e centrifugados nas condições referidas anteriormente. Por fim, foi removido de novo o sobrenadante e este foi filtrado num filtro de PTFE de 0,2 µm e as amostras foram evaporadas até à *secura* em corrente de azoto. Nesta ultima fase, estas foram reconstituídas em um mililitro de uma solução constituída por água ultrapura e metanol (75:25, v/v) e foram analisadas em *HPLC-DAD*. A figura seguinte apresenta o procedimento geral realizado ao longo de todo este trabalho.

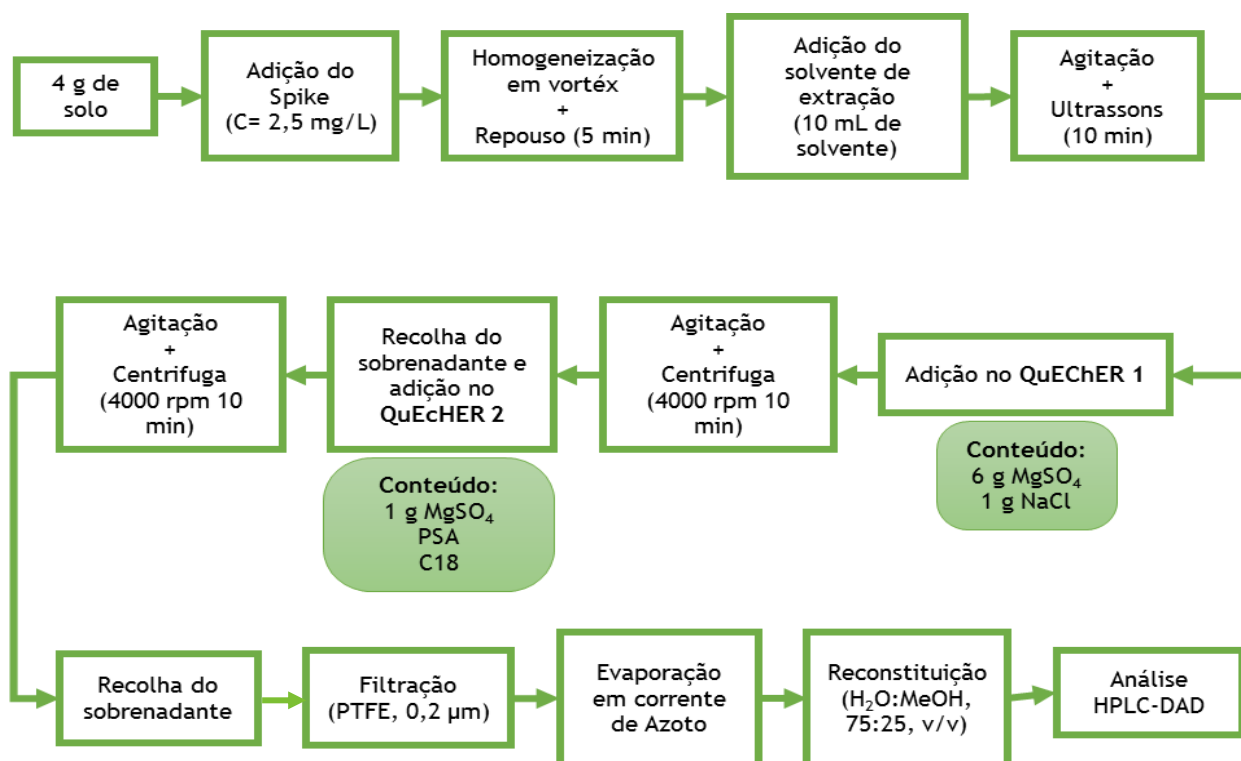


Figura 20 - Representação esquemática do procedimento de *QuEChERS*

Os parâmetros que foram alterados relativamente ao procedimento base encontram-se resumidos no formato de tabela (Tabela 8).

Tabela 8 - Tabela resumo das condições alteradas ao longo dos ensaios realizados

Ensaio	Agitação (min) (extração/clean-up)	Solvente de extração	Ultrassons (min)	<i>QuEChER 2</i>
1	2/2			1 g MgSO ₄ + 300 mg PSA + 150 mg C18
2	4/4			1 g MgSO ₄ + 150 mg PSA + 150 mg C18
3	2/2	ACN/MeOH (1:1)	10	1 g MgSO ₄ + 75 mg PSA + 150 mg C18
4				300 mg MgSO ₄ + 125 mg PSA
5		ACN acidificado (10 mL de solvente + 100 µL CH ₃ COOH)	-	300 mg MgSO ₄ + 125 mg PSA + 150 mg de C18
6			10	300 mg MgSO ₄ + 125 mg PSA + 150 mg de C18
7			-	300 mg MgSO ₄ + 125 mg SiO ₂ + 150 mg de C18
8			10	300 mg MgSO ₄ + 125 mg PSA + 150 mg de C18
9				300 mg MgSO ₄ + 125 mg SiO ₂ + 150 mg de C18
10	1'15''/1'15''	ACN/MeOH (1:1)		300 mg MgSO ₄ + 125 mg PSA + 150 mg de C18
11			10	300 mg MgSO ₄ + 125 mg SiO ₂ + 150 mg de C18
12		ACN/MeOH (40:60 v/v)		300 mg MgSO ₄ + 125 mg PSA + 150 mg de C18

4.3 Armazenamento, Destino e Tratamento de Resíduos

Os resíduos líquidos gerados ao longo dos ensaios experimentais eram considerados soluções orgânicas constituídas por acetonitrilo, metanol, ácido acético, e quantidades vestigiais de antibióticos. Além destes foram produzidos resíduos sólidos como filtros de *PTFE* e amostras de solo contaminadas com $MgSO_4$, PSA-Sílica, NaCl e DSC-18.

Todos os resíduos produzidos neste projeto foram armazenados em recipientes fechados devidamente rotulados e guardados nos locais reservados para esse efeito onde não existem fontes de luz e/ou ignição para mais tarde sofrerem o devido tratamento pelo Sistema de Gestão Ambiental da FEUP (EcoFEUP).

5 Resultados e Discussão

5.1 Otimização do método de *QuEChERS*

Para cumprir um dos objetivos desta dissertação, primeiro foi necessário encontrar quais as condições ótimas operatórias de extração e *clean-up* de uma amostra de solo fortificada com os antibióticos em estudo.

Os métodos mais descritos na literatura para a extração de antibióticos dos solos é a extração em fase sólida (*SPE*) e o método de *QuEChERS*, já descritos anteriormente. No entanto, concluiu-se que o método de *SPE* não era viável para este trabalho, pois, segundo Penêda (2016), este método mostrou-se ineficaz, nas condições usadas, para a remoção dos antibióticos. Como alternativa a este método, optou-se pelo método de *QuEChERS*, cujo procedimento geral aplicado encontra-se representado na Figura 20.

O método de *QuEChERS* foi testado por Penêda (2016), tendo sido testadas algumas condições operatórias, como por exemplo, diferentes solventes de extração. Como ponto de partida deste trabalho optou-se por testar as condições ótimas obtidas por Penêda (2016), que se encontram representadas na tabela seguinte.

Tabela 9 - Condições ótimas operatórias dos procedimentos experimentais testados (Penêda 2016)

Agitação (min) (extração/clean-up)	Solvente de Extração	Ultrassons (min)	<i>QuEChER</i> 1	<i>QuEChER</i> 2
2/2	ACN:MeOH (1:1)	10	6 g MgSO ₄ + 1 g NaCl	1 g MgSO ₄ + 300 mg PSA + 150 mg C18

A este procedimento experimental foi introduzida uma alteração: considerou-se que seria mais correto a aplicação do *spike* na amostra, isto é, antes da adição do solvente de extração porque os antibióticos em estudo são compostos polares por isso têm mais afinidade com o solvente do que com a amostra, não demonstrando o processo de adsorção dos antibióticos no solo que ocorre no meio ambiente.

Além da alteração referida, considerou-se que seria interessante estudar a influência do tempo de agitação nas fases de extração e *clean-up*, por isso foi realizado um segundo ensaio experimental foram testados quatro minutos de agitação nas fases referidas. Em todos os ensaios realizados ao longo deste trabalho foram realizados controlos ao processo, ensaios que não continham amostra de solo, com o objetivo de perceber se a fase de limpeza da amostra tem a capacidade de remover os compostos em estudo. Os resultados obtidos nos ensaios 1 e 2 foram os seguintes:

Tabela 10 - Resultados obtidos nos ensaios 1 e 2

	Composto	pH/T(°C)	Amostra (Solo)		Controlo ao Processo
			Recuperação Média (%)	Coefficiente de Variação (%)	Recuperação Média (%)
2 min de agitação Ensaio 1	METRO		40,8	5,0	68,4
	SULFA	6,6/20	30,8	0,9	50,2
	CAP		48,9	2,6	88,9
4 min de agitação Ensaio 2	METRO		43,1	3,7	55,1
	SULFA	6,6/20	36,5	4,2	40,1
	CAP		52,5	15,4	54,3

Analisando os resultados obtidos verificou-se que as recuperações obtidas no controlo do processo diminuem com o aumento do tempo de agitação, indicando que este aumento favorece a remoção dos antibióticos em estudo por parte dos adsorventes utilizados na fase de *clean-up*.

Como os compostos em estudo relativamente polares, considerou-se que o adsorvente PSA teria uma grande afinidade com os antibióticos em questão. Nestes ensaios, ao valor de pH usado, o metronidazol e o cloranfenicol encontram-se na forma neutra e a sulfa encontra-se desprotonada (Anexo B). Os três compostos podem ligar-se ao PSA sob a forma de ligações de hidrogénio ou dipolo-dipolo, no entanto, como a sulfametoxazol se encontra carregada negativamente este pode interagir com moléculas catiónicas, como por exemplo, metais pesados e nutrientes, dificultando a extração desta. O aumento do tempo de agitação poderá, eventualmente, favorecer este fenómeno impossibilitando a continuação dos compostos na fase líquida. Mesmo ocorrendo esta diminuição das recuperações do controlo no ensaio 2, observou-se um pequeno aumento das recuperações na amostra de solo.

Avaliando os resultados obtidos nos ensaios 1 e 2 concluiu-se que o aumento do tempo de agitação não favorece a extração dos compostos em estudo e por este motivo para os ensaios seguintes manteve-se o tempo de vórtex de dois minutos. Nos ensaios 3 e 4, para perceber qual a influência da massa de PSA-Sílica na fase de *clean-up*, foram testadas 150 mg e 75 mg de PSA, respetivamente. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11 - Resumo dos resultados obtidos nos ensaios 3 e 4

	Composto	pH/T(°C)	Amostra (Solo)		Controlo ao Processo
			Recuperação Média (%)	Coefficiente de Variação (%)	Recuperação Média (%)
150 mg de PSA Ensaio 3	METRO		49,7	3,9	69,7
	SULFA	6,7/21	27,7	3,1	47,2
	CAP		35,5	12,0	53,9
75 mg de PSA Ensaio 4	METRO		49,7	2,4	69,0
	SULFA	6,7/21	30,0	0,9	42,4
	CAP		36,5	0,9	50,5

Analisando os resultados obtidos e comparando com os resultados do ensaio 1 verificou-se que com a redução da massa do adsorvente PSA-Sílica não se obteve uma melhoria na recuperação média no controlo do processo, os valores são muito semelhantes nos três ensaios (1,3 e 4). Para a amostra não se verificou um aumento das recuperações, tal como no controlo ao processo os resultados

mantiveram-se muito semelhantes entre os três ensaios. Desta forma, é possível concluir que este adsorvente não influenciou de forma positiva os resultados.

Em resumo, os resultados obtidos nestes primeiros quatro ensaios não foram muito satisfatórios, por isso, foi decidido alterar o procedimento aplicado. Após uma pesquisa bibliográfica considerou-se que o procedimento experimental apresentado por Cerqueira *et al.* (2014), aplicado a amostras de lamas produzidas no tratamento de água potável para a extração de fármacos e compostos de produtos de cuidado pessoal, poderia ser aplicado neste estudo. Este procedimento encontra-se na Tabela 7. Neste trabalho foi necessário realizar algumas alterações a este procedimento. As modificações foram as seguintes: (i) após o *QuEChER* 1, foi removido todo o sobrenadante, não apenas 2 mL; (ii) depois do processo de filtração do sobrenadante, a amostra foi levada à secura em corrente de azoto e reconstituída em 1 mL de uma solução composta por água ultrapura e metanol (75:25. v/v).

Como se pode verificar, neste estudo, na fase de extração as amostras não foram colocadas no ultrassons e na fase de *clean-up* não foi adicionado nenhum adsorvente apolar para remover interferentes apolares. Por estas razões, nos seguintes ensaios foi testado a influência do ultrassons no processo de extração. Além do parâmetro referido, foi considerado que deveria ser testado se a presença ou ausência de um adsorvente apolar, neste caso C18, teria alguma influência na análise dos picos cromatográficos dos compostos de interesse. Nestes ensaios o solvente de extração usado foi acetonitrilo acidificado com ácido acético. Pretendia-se compreender a influência da presença ou ausência de metanol e o efeito do meio estar acidificado facilitar o processo de extração. Os resultados obtidos nos ensaios 5 a 8 estão presentes na Tabela 12.

Tabela 12 - Resultados obtidos nos ensaios 5 a 8

	Composto	pH/T (°C)	Amostra (Solo)		Controlo ao Processo	
			Recuperação Média (%)	Coefficiente de Variação (%)	Recuperação Média (%)	Coefficiente de Variação (%)
S/ ultrassons	METRO		31,3	1,2	56,8	14,5
S/ C ₁₈	SULFA	2,4/21	9,1	4,8	47,0	9,6
Ensaio 5	CAP		22,5	3,8	56,7	8,4
C/ ultrassons	METRO		33,0	8,7	58,2	1,0
S/ C ₁₈	SULFA	2,4/21	11,8	12,0	53,1	1,6
Ensaio 6	CAP		24,0	18,8	52,4	3,2
S/ ultrassons	METRO		38,0	0,7	58,6	3,6
C/ C ₁₈	SULFA	2,2/21	14,2	6,7	49,8	7,1
Ensaio 7	CAP		28,9	3,1	51,9	0,4
C/ ultrassons	METRO		36,5	3,4	59,7	2,8
C/ C ₁₈	SULFA	2,2/21	14,3	4,3	48,6	1,0
Ensaio 8	CAP		29,1	3,2	56,7	2,6

Observando os resultados obtidos nestes ensaios foi possível verificar que a presença/ausência de ultrassons não influencia o processo de extração, pois como é possível analisar na tabela acima, as recuperações médias obtidas nos ensaios 5 e 7, sem ultrassons, são muito semelhantes às obtidas nos ensaios 6 e 8, com ultrassons. No entanto, como as amostras utilizadas ao longo de todo trabalho não são representativas, considerou-se importante a manutenção do processo de ultrassons na fase de extração porque em amostras reais pode facilitar o processo de

extração dos analitos em estudo. Importante salientar que, usando como solvente de extração acetonitrilo acidificado, observou-se que as recuperações médias dos antibióticos na amostra baixaram, portanto foi possível concluir que a ausência de metanol prejudicou o processo de extração, o que é compreensível porque sendo este um solvente mais polar facilita a interação com os compostos estudados.

Por fim, foi avaliado o efeito da ausência de C18. Como já foi referido, este adsorvente tem como principal função remover interferentes apolares existentes na amostra. A ausência deste adsorvente poderia provocar dificuldades na identificação dos picos cromatográficos dos três compostos em estudo. Na figura seguinte encontram-se representados dois cromatogramas obtidos a partir da análise em *HPLC-DAD* de extratos de amostras do ensaio 7 e 8, sem e com C18 respectivamente.

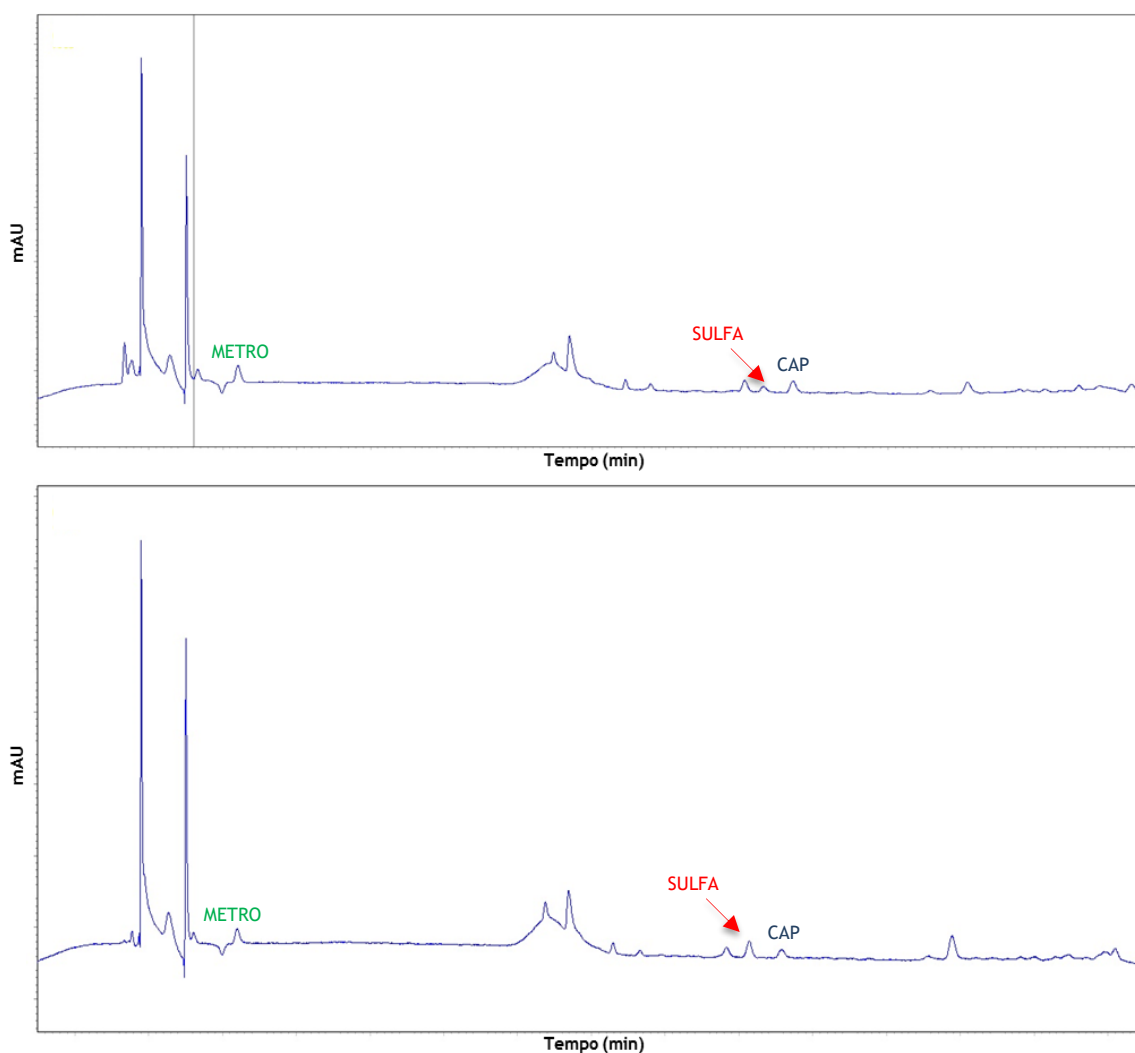


Figura 21 - Cromatogramas exemplo dos ensaios 6 (acima), sem C₁₈, e 8, com C₁₈

Examinando os dois cromatogramas confirmou-se que não existe qualquer dificuldade em detetar os picos dos analitos, no entanto, o solo utilizado neste estudo encontra-se altamente mineralizado, contendo uma baixa percentagem de interferentes comparativamente com uma amostra real, por esta razão considerou-se que se deve manter no *QuEChER 2* o adsorvente C18.

Como na literatura existente referiam a utilização de diferentes porções de acetonitrilo e metanol como solvente de extração, nos últimos ensaios realizados foram testadas diferentes percentagens de metanol presentes no solvente de extração. Nos ensaios 9 e 10 testou-se ACN/MeOH uma proporção de 50:50 em volume e nos ensaios 11 e 12 testou-se ACN/MeOH (40:60, v/v). Além da alteração do solvente de extração, nos ensaios 10 e 12 o sorbente PSA foi substituído por sílica (SiO₂), com o objetivo de compreender se a utilização de um composto mais polar facilitaria a limpeza da amostra, isto é, sendo a sílica um composto mais polar teria uma maior afinidade com os interferentes existentes de forma a melhorar a recuperação média obtida no controlo do processo (ensaio sem amostra).

Tabela 13 - Valores de recuperação média obtidos nos ensaios 9 a 12

Composto	pH/T (°C)	Amostra (Solo)		Controlo ao Processo	
		Recuperação Média (%)	Coefficiente de Variação (%)	Recuperação Média (%)	Coefficiente de Variação (%)
ACN/MeOH (50:50, v/v) PSA Ensaio 9	METRO	57,2	1,6	78,9	4,7
	SULFA	29,9	6,8	60,8	7,2
	CAP	53,5	7,6	63,3	3,8
ACN/MeOH (50:50, v/v) SiO ₂ Ensaio 10	METRO	48,3	9,7	68,4	2,1
	SULFA	35,3	10,0	55,7	7,5
	CAP	68,9	5,0	73,2	0,3
ACN/MeOH (40:60, v/v) PSA Ensaio 11	METRO	39,4	12,2	82,0	2,7
	SULFA	30,5	25,5	52,5	4,0
	CAP	44,7	18,2	63,4	1,4
ACN/MeOH (40:60, v/v) SiO ₂ Ensaio 12	METRO	35,6	32,6	58,0	5,1
	SULFA	37,7	11,3	63,1	2,7
	CAP	51,7	5,9	63,8	0,6

Pela análise dos resultados obtidos, presentes na Tabela 13, foi possível concluir que uma maior quantidade de metanol não favorece o processo de extração, nos ensaios 11 e 12 obtiveram-se recuperações inferiores comparativamente aos outros dois ensaios apresentados na tabela acima. Estes resultados confirmam os resultados encontrados anteriormente na literatura (Bragança *et al.* 2012). Relativamente ao uso da sílica como adsorvente para a limpeza da amostra, não se observou uma diferença significativa, isto é, comparando, por exemplo, os ensaios 9 e 10, onde foi utilizado o mesmo solvente de extração e foi alterado o sorbente, não se encontrou uma melhoria significativa nas recuperações médias dos antibióticos nas amostras e tendo em consideração o controlo ao processo também não se verificou uma melhoria significativa das percentagens de recuperação, excetuando no caso do cloranfenicol onde se notou um aumento de cerca de 10%.

Avaliando em conjunto todos os resultados obtidos nesta fase, foi possível concluir que os melhores ensaios foram dos ensaios 9 e 10, no entanto, no ensaio 9 verificou-se menores coeficientes de variação dando uma perspetiva de que este fosse mais preciso do que o ensaio 10. Por estas razões considerou-se que o procedimento mais adequado para sofrer o processo de validação seria o ensaio 9.

5.2 Validação do Método Analítico

Após o processo de otimização das condições do procedimento de *QuEChERS* para a extração dos antibióticos estudados foi necessário validar esta metodologia utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada de detetor por arranjo de díodos (*HPLC-DAD*).

O tempo de retenção e o espectro UV dos compostos foram utilizados para identificar os compostos de interesse. Desta forma é possível observar na figura seguinte um cromatograma obtido a partir da injeção direta de uma solução padrão composta por metronidazol, sulfametoxazol e cloranfenicol.

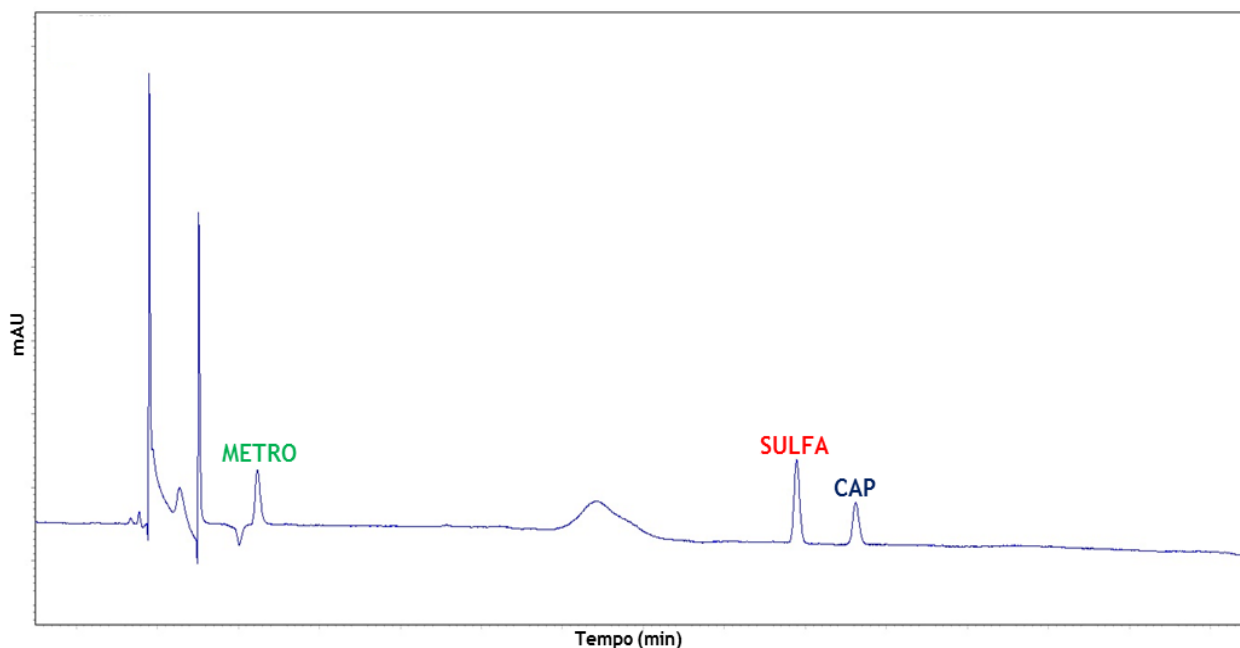


Figura 22 - Exemplo de um cromatograma obtido após a análise em *HPLC-DAD* de uma solução padrão de 250 µg/L dos analitos estudados

Com as condições cromatográficas definidas e apresentadas anteriormente, o tempo de retenção para o metronidazol foi de 5,6 minutos, da sulfametoxazol foi de 19,3 minutos e do cloranfenicol foi de 20,4 minutos aproximadamente, pois estes valores variavam consoante a temperatura do laboratório porque o *HPLC* não possui forno. Esta variação dos tempos de retenção pode ocorrer devido ao facto de que os compostos podem ser menos adsorvidos à fase estacionária a temperaturas mais elevadas, logo, são eluídos a tempos de retenção mais baixos. No entanto, sempre que foram realizadas análises de amostras foi injetado uma solução padrão *mix*, que continha os três compostos em estudo, que permitia observar com melhor clareza os tempos de retenção de cada analito, evitando possíveis erros na identificação dos picos.

5.2.1 Linearidade e limites de detecção e quantificação¹

A reta de calibração para a METRO foi efetuada a 6 níveis de concentração, na gama de 50-500 µg/L, para a SULFA foi realizada a 7 níveis, na gama de 20-500 µg/L, e por fim para o CAP foi efetuada a 8 níveis de concentração, na gama 100-1000 µg/L. As análises das soluções padrão foram realizadas em duplicado. Na Figura 23 encontram-se representadas as três curvas de calibração para os antibióticos estudados.

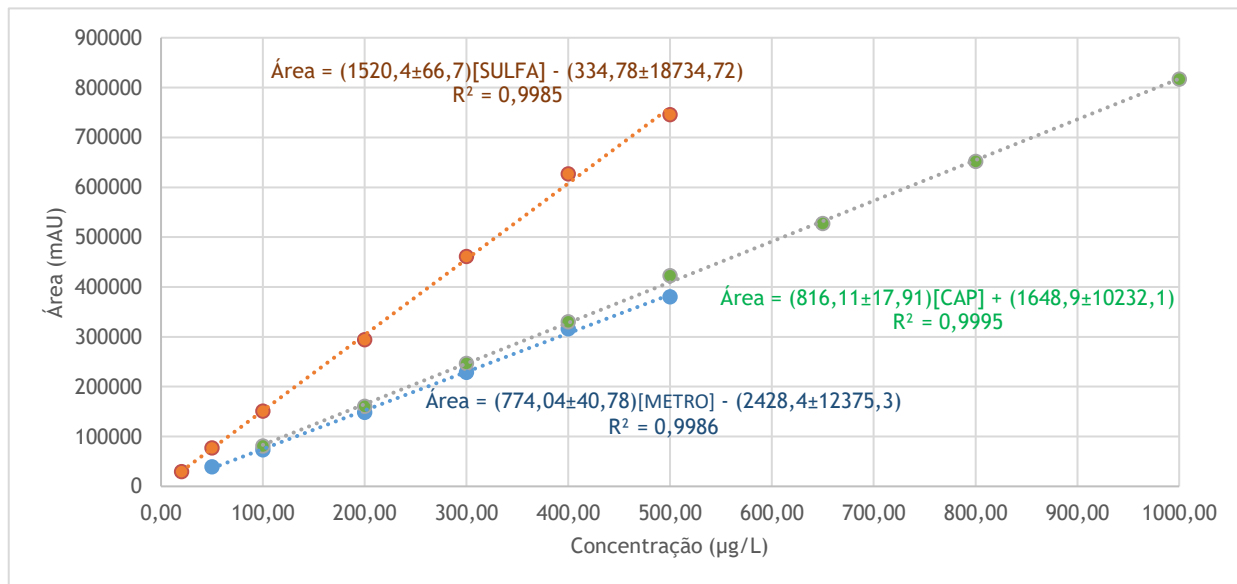


Figura 23 - Representação gráfica das curvas de calibração para os compostos em estudo

Na seguinte tabela estão apresentados os principais parâmetros analíticos para os analitos em estudo. Para determinação do declive, interceção e coeficiente de correlação das retas de regressão foi aplicado o método dos mínimos quadrados. Os limites de quantificação e detecção foram calculados através da média do rácio sinal/ruído de 10 e 3, respetivamente.

Tabela 14 - Parâmetros analíticos das retas de regressão dos antibióticos analisados

Composto	Gama de linearidade	Declive $\pm t_{s_a}$ (mAU.L.µg ⁻¹)	Interceção $\pm t_{s_b}$ (mAU)	Coefficiente de correlação	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
METRO n=6	50-500	774±41	-2428±12735	0,9993	14	47
SULFA n=7	20-500	1520±67	-335±18735	0,9993	5	17
CAP n=8	100-1000	816±18	1649±10232	0,9998	18	60

t_{s_a} - intervalo de confiança para o declive (8 graus de liberdade; nível de confiança de 95%); t_{s_b} - intervalo de confiança para a interceção (8 graus de liberdade; nível de confiança de 95%);

Este método instrumental mostrou-se mais sensível na detecção da sulfametoxazol do que dos outros dois antibióticos, metronidazol e cloranfenicol, pois a curva de calibração deste composto apresenta um maior declive.

¹ As curvas de calibração apresentadas foram realizadas pela Eng^a. Ana Isabel Carvalho

Em laboratório, uma curva de calibração é considerada válida se respeitar os três critérios seguintes: (i) desvio-padrão relativo do declive ($\frac{s_a}{a} \times 100$) inferior a 5%; (ii) conter a origem ($b - s_b < 0 < b + s_b$); (iii) o coeficiente de correlação deve ser superior 0,995. Os resultados obtidos para os três compostos para os parâmetros referidos encontram-se na tabela abaixo (Miller and Miller 2010).

Tabela 15 - Parâmetros analíticos, desvio padrão do declive e origem, dos compostos em estudo

Análito	Desvio padrão do declive	Origem
	($s_a/a \times 100$)	($b - s_b < 0 < b + s_b$)
METRO	1,90	-14803,7<0<9946,9
SULFA	1,71	-19069,5<0<18399,4
CAP	0,90	-8583,2<0<11880,7

Todos os critérios mencionados anteriormente foram cumpridos em todas as curvas de calibração dos antibióticos em estudo. Também se verificou que os coeficientes de correlação são superiores a 0,995, apresentados na Tabela 14, demonstrando uma boa linearidade nas gamas de concentração estudadas. Desta forma foi possível afirmar que as curvas de calibração são válidas e passíveis de utilização para análise de amostras onde estejam presentes estes compostos.

5.2.2 Precisão

A precisão de um método pode ser definida como o grau de proximidade entre resultados, referentes a uma mesma amostra. Neste caso foi determinado a precisão intermédia e a repetibilidade para avaliar a o método analítico ótimo referido no Subcapítulo 5.1. A precisão intermédia exprime a variação das condições laboratoriais, neste estudo está representada pelo desvio-padrão relativo (*RSD*) da injeção de amostras extraídas em duplicado, a três níveis de concentração, alterando o dia de extração. A repetibilidade expõe a precisão existente num curto espaço de tempo nas mesmas condições de operação, esta foi também estimada pelo desvio-padrão relativo de seis extrações para cada nível de concentração apresentado, nas mesmas condições experimentais realizadas no mesmo dia. Os resultados obtidos encontram-se na tabela apresentada abaixo (Tabela 16).

Tabela 16 - Resultados obtidos no estudo da precisão do método analítico

Análito	Repetibilidade (<i>RSD</i> , %) (n=6)			Precisão Intermédia (<i>RSD</i> , %) (n=6)		
	125	250	500	125	250	500
Concentração ($\mu\text{g/L}$)						
METRO	6,2	5,0	4,5	4,5	6,1	4,3
SULFA	4,8	4,4	4,8	9,0	5,6	5,4
CAP	9,0	5,9	4,4	7,8	5,2	5,2

Através da análise da Tabela 16 verifica-se que o valor de *RSD* tendencialmente diminui com o aumento da concentração este comportamento é expectável, pois a precisão aumenta com o aumento da concentração. As gamas de precisão obtidas foram de 4,4 a 9,0% e 4,3 a 9,0% para a precisão intra-dias e inter-dias, respetivamente. Para que um método seja considerado válido o valor de *RSD* (%) deve ser inferior a 5%, neste caso este valor é ultrapassado principalmente no valor de concentração mais baixo, onde valor mais elevado observado foi de 9%, no entanto para as concentrações mais elevadas este valor é excedido ligeiramente, diferença próxima de 1%. Como a

precisão diminui com a diminuição da concentração e nos restantes resultados o valor de 5% foi excedido ligeiramente considerou-se que o método de extração era preciso.

5.2.3 Exatidão

A exatidão de um método analítico representa o grau de concordância entre o valor real e o valor de referência. Neste trabalho, a exatidão foi estimada através da determinação da recuperação obtida após um ensaio experimental, com o propósito de avaliar a adequabilidade do método para a identificação dos antibióticos-alvo em amostras reais. A exatidão do método foi determinada utilizando um solo bastante mineralizado, como já referido anteriormente, que foi fortificado a três níveis de concentração diferentes e sofreu um processo de extração e *clean-up* nas condições operatórias ótimas apresentadas no Subcapítulo 5.1. Os resultados obtidos encontram-se presentes na tabela seguinte.

Não foram visíveis picos cromatográficos dos antibióticos em estudo no branco (solo não fortificado).

Tabela 17 - Resultados obtidos para a exatidão do método

Analíto	Recuperação ± RSD (%) (n=6)			
	125	250	500	Média
Concentração (µg/L)				
METRO	72±6	59±5	53±5	61±5
SULFA	35,4±5	39±4	39±5	38±5
CAP	44±9	51,3±6	50±4	49±6

Como é possível observar foram obtidas boas recuperações, superiores a 50% para a maioria dos analítos em estudo, excetuando para a sulfametoxazol que só apresentou recuperações próximas dos 40%. Nas concentrações mais baixas observa-se maiores *RSD*, como por exemplo, para o cloranfenicol obteve-se um desvio-padrão médio de 9% para a concentração de 125 µg/L. No entanto para as restantes situações obteve-se *RSD* relativamente baixos e recuperações razoáveis, por este motivo é possível afirmar que o procedimento analítico aplicado permite uma deteção exata dos antibióticos em amostras representativas.

6 Conclusões

Os antibióticos, como é do conhecimento geral, são utilizados de forma massiva pela sociedade atual e a sua presença e concentração nos diversos compartimentos ambientais, como o solo, sedimentos, água, tem aumentado cada vez mais, sendo denominados de poluentes emergentes. Por este motivo é essencial o desenvolvimento de metodologias que permitam a detecção e quantificação destes compostos no meio ambiente.

Neste projeto foi realizado um estudo para a otimização do método extrativo *QuEChERS* para a quantificação de três antibióticos, o metronidazol, a sulfametoxazol e o cloranfenicol em amostras de solo. Foram testadas diferentes condições experimentais, como diferentes solventes extração, alteração do tempo de agitação, a presença ou ausência da etapa de ultrassonicação, diferentes sorbentes na fase de limpeza da amostra, entre outros fatores. Através da análise dos resultados obtidos concluiu-se que as condições ótimas para este caso em particular foram as seguintes: uso de uma solução com acetonitrilo e metanol (50:50, v/v) como solvente de extração, tempo de agitação de um minuto e quinze segundos, presença de ultrassonicação e a quantidade de adsorventes foi 125 mg de PSA e 150 g C₁₈. Neste ensaio obtiveram-se recuperações médias de 57,2% para o metronidazol, 29,9% para a sulfametoxazol e 53,5% para o cloranfenicol.

Após o processo de otimização do método experimental procedeu-se a validação do método analítico ótimo para análise dos compostos em estudo em *HPLC-DAD*. Os coeficientes de correlação das curvas de calibração para os três antibióticos foram iguais ou superiores a 0,9993, o que demonstra uma boa linearidade nas gamas de concentração apresentadas já. Os limites de detecção variaram entre 5 µg/L para a sulfametoxazol e 18 µg/L para o cloranfenicol. Relativamente à repetibilidade e precisão intermédia do procedimento não se obtiveram valores superiores a 9,0%. Obtiveram-se boas recuperações nos três níveis de concentração estudados com baixos desvios padrão relativos, o que suporta a aplicabilidade deste método a amostras reais.

Atendendo a que supostamente as concentrações dos antibióticos em solos reais deverão ser mais baixas que os valores de concentração usados neste estudo, deveremos considerar que os resultados deste trabalho poderão ser usados como uma ferramenta útil, não para aplicar a todas as situações reais, mas como um método de *screening*, ou seja, como uma triagem, antes da utilização de métodos mais dispendiosos e muitas vezes inexistentes em alguns laboratórios, como por exemplo, a utilização do *LC-MS*.

Outro fator importante é a necessidade de encontrar estratégias que permitam a diminuição destes compostos no ambiente, estas podem ser medidas legislativas ou não e que devem ser aplicadas nas diversas fases do ciclo de vida dos antibióticos. Daí também a importância de realizar cada vez mais estudos para compreender o comportamento, distribuição destes compostos nos diversos compartimentos ambientais.

7 Limitações e Trabalho Futuro

As principais limitações encontradas ao longo deste trabalho foram essencialmente a limitação de tempo para a realização de mais ensaios para testar a influência de outras condições que não foram possíveis testar, como outros adsorventes. Também não foi possível testar o método analítico validado em amostras reais para confirmar a sua aplicabilidade em exemplares representativos.

Outro pequeno fator limitativo foi a partilha de equipamento *HPLC-DAD*, não sendo possível, realizar a análise das amostras no final do procedimento experimental. Além das limitações já referidas, o tempo de secagem da amostra foi outro dos problemas encontrados pois não era possível realizar a secagem no mesmo dia em que se executava a extração.

Neste estudo teria sido interessante utilizar o *LC-MS* pois permitiria uma melhor identificação dos antibióticos analisados, no entanto, este encontrava-se indisponível no tempo de realização deste projeto.

Além do trabalho realizado seria bastante interessante estudar a sua aplicabilidade em outros antibióticos, para perceber se o método de determinação e quantificação aplicado neste projeto será ou não abrangente a outros compostos farmacêuticos. Outro parâmetro importante a analisar é a influência das características do solo, como a granulometria, a percentagem de argila, o seu pH, no processo extrativo dos antibióticos.

O estudo da mobilidade dos antibióticos em diversas matrizes ambientais, incluindo as plantas e vegetais, seria outro tema de estudo bastante importante. Permitiria compreender a distribuição destes compostos no meio ambiente e plantas, explicando, assim, a forma como estes compostos entram na cadeia alimentar.

É deveras importante a aplicação de medidas que possibilitem a diminuição destes compostos no meio ambiente, para tentar combater um dos graves problemas que tem vindo a afetar a sociedade atual que é a resistência aos antibióticos.

Referências

- AGISAR. (2011). Critically Important Antimicrobials for Human Medicine - 3rd Revision 2011. *World Health Organization*, 1-38. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77376/1/9789241504485_eng.pdf
- Alanis, A. J. (2005). Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research*, 36(6), 697-705. doi:10.1016/j.arcmed.2005.06.009
- Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*, 1(DEC), 1-7. doi:10.3389/fmicb.2010.00134
- Ammar, H. B., Brahim, M. Ben, Abdelhédi, R., & Samet, Y. (2016). Enhanced degradation of metronidazole by sunlight via photo-Fenton process under gradual addition of hydrogen peroxide. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 420, 222-227. doi:10.1016/j.molcata.2016.04.029
- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., & Schenck, F. J. (2003). Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “ Dispersive Solid-Phase Extraction ” for the Determination of Pesticide Residues in Produce.
- Aquino, S. De. (2013). Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. *Eng Sanit ...*, 187-204. doi:10.1590/S1413-41522013000300002
- Bartlett, J. G., Gilbert, D. N., & Spellberg, B. (2013). Seven ways to preserve the Miracle of antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 56(10), 1445-1450. doi:10.1093/cid/cit070
- Batchu, S. R., Panditi, V. R., O’Shea, K. E., & Gardinali, P. R. (2014). Photodegradation of antibiotics under simulated solar radiation: Implications for their environmental fate. *Science of the Total Environment*, 470-471, 299-310. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.09.057
- Bbosa, G. S., Mwebaza, N., Odda, J., Kyegombe, D. B., & Ntale, M. (2014). Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. *Health*, 6(5), 410-425. doi:10.4236/health.2014.65059
- Bendesky, A., Menéndez, D., & Ostrosky-Wegman, P. (2002). Is metronidazole carcinogenic? *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 511(2), 133-144. doi:10.1016/S1383-5742(02)00007-8
- BIO Intelligence Service. (2013). Study on the environmental risks of medicinal products, (December), 310.
- Bragança, I., Plácido, A., Paíga, P., Domingues, V. F., & Delerue-Matos, C. (2012). QuEChERS: A new sample preparation approach for the determination of ibuprofen and its metabolites in soils. *Science of the Total Environment*, 433, 281-289. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.06.035
- Caldas, S. S., Atia, C., Bolzan, M., Fagundes, C., & Primel, E. G. (2011). Evaluation of a Modified QuEChERS Extraction of Multiple Classes of Pesticides from a Rice Paddy Soil by LC-APCI-MS/MS. *J. Agric. Food Chem*, 59, 11918-11926. doi:10.1021/jf202878s
- Çalışkan, E., & Göktürk, S. (2010). Adsorption Characteristics of Sulfamethoxazole and Metronidazole on Activated Carbon. *Separation Science and Technology*, 45(2), 244-255.

doi:10.1080/01496390903409419

- Carrales-Alvarado, D. H., Ocampo-Pérez, R., Leyva-Ramos, R., & Rivera-Utrilla, J. (2014). Removal of the antibiotic metronidazole by adsorption on various carbon materials from aqueous phase. *Journal of Colloid and Interface Science*, *436*, 276-285. doi:10.1016/j.jcis.2014.08.023
- Carvalho, I. T., & Santos, L. (2016). Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environment International*. doi:10.1016/j.envint.2016.06.025
- Castanon, J. I. R. (2007). History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters in European Poultry Feeds. *Poult Sci*, *86*(11), 2466-2471. doi:10.3382/ps.2007-00249
- CDDEP. (2015). State of the world's antibiotics, 2015, CDDEP: Washington, D. C.
- Cerqueira, M. B. R., Guilherme, J. R., Caldas, S. S., Martins, M. L., Zanella, R., & Primel, E. G. (2014). Evaluation of the QuEChERS method for the extraction of pharmaceuticals and personal care products from drinking-water treatment sludge with determination by UPLC-ESI-MS/MS. *Chemosphere*, *107*, 74-82. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.03.026
- Chu, D., & Fernandes, P. (1989). Structure-activity relationships of the fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* *33*. doi:0.1128/AAC.33.2.131
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *74*(3), 417-433. doi:10.1128/MMBR.00016-10
- Demain, A. L. (2009). Antibiotics: Natural Products Essential to Human Health. *Wiley InterScience*. doi:10.1002/med.20154
- DGAV, D. G. de A. e V. (2013). Relatório Nacional De Monitorização Do Consumo De Antimicrobianos: Ano 2013 - Portugal, 1-13.
- Dibner, J. J., & Richards, J. D. (2005). Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry science*, *84*(4), 634-643. doi:10.1093/ps/84.4.634
- Direção-Geral da Saúde. (2016). Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos em números - 2015. *Programa de Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos*, 1-43.
- Dorival-García, N., Labajo-Recio, C., Zafra-Gómez, A., Juárez-Jiménez, B., & Vílchez, J. L. (2015). Improved sample treatment for the determination of 17 strong sorbed quinolone antibiotics from compost by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta*, *138*, 247-257. doi:10.1016/j.talanta.2015.03.011
- DrugBank. (2016). Chloramphenicol. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00178>. Accessed 27 August 2016
- Du, L., & Liu, W. (2012). Occurrence, fate, and ecotoxicity of antibiotics in agro-ecosystems. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, *32*(2), 309-327. doi:10.1007/s13593-011-0062-9
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2014). *Surveillance of antimicrobial consumption in Europe 2012*. doi:10.2900/32937

- European Commission. (2015). Soil. http://ec.europa.eu/environment/nature/invasivealien/index_en.htm. Accessed 8 August 2016
- European Medicines Agency. (2013). Sales of veterinary antimicrobial agents in 25 EU / EEA countries in Third ESVAC report. *European Medicines Agency*, 57. doi:EMA/236501/2013
- Fang, Z., Chen, J., Qiu, X., Qiu, X., Cheng, W., & Zhu, L. (2011). Effective removal of antibiotic metronidazole from water by nanoscale zero-valent iron particles. *Desalination*, 268(1-3), 60-67. doi:10.1016/j.desal.2010.09.051
- Fiúza, A. (2009). *Reabilitação de Solos e Aquíferos Contaminados*. Porto.
- Guo, C., Wang, M., Xiao, H., Huai, B., Wang, F., Pan, G., et al. (2016). Development of a modified QuEChERS method for the determination of veterinary antibiotics in swine manure by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1027, 110-118. doi:10.1016/j.jchromb.2016.05.034
- Hanekamp, J. C., & Bast, A. (2015). Antibiotics exposure and health risks: Chloramphenicol. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39(1), 213-220. doi:10.1016/j.etap.2014.11.016
- Hanekamp, J. C., & Kwakman, J. H. J. M. (2010). Towards Intended Normal Use (Part I): A European Appraisal of the Chloramphenicol Case and some Thoughts on the Potential of Global Harmonization of Antibiotics Regulation. *Ensuring Global Food Safety*, (September 2016), 193-208. doi:10.1016/B978-0-12-374845-4.00011-4
- He, Z. (2014). *Applied Manure and Nutrient Chemistry for Sustainable Agriculture and Environment*. http://encore.fama.us.es/iii/encore/record/C__Rb2615640__Syieldmanagement__P2,56__Orightresult__X1?lang=spi&suite=cobalt
- HITACHI. (2016). Principle and Feature of Various Detection Methods. <http://www.hitachi-hightech.com/global/products/science/tech/ana/lc/basic/course7.html>. Accessed 20 September 2016
- Homem, V., Alves, A., & Santos, L. (2010). Amoxicillin degradation at ppb levels by Fenton's oxidation using design of experiments. *Science of the Total Environment*, 408(24), 6272-6280. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.08.058
- Homem, V., & Santos, L. (2011). Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices - A review. *Journal of Environmental Management*, 92(10), 2304-2347. doi:10.1016/j.jenvman.2011.05.023
- Hu, X., Zhou, Q., & Luo, Y. (2010). Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. *Environmental Pollution*, 158(9), 2992-2998. doi:10.1016/j.envpol.2010.05.023
- Jechalke, S., Heuer, H., Siemens, J., Amelung, W., & Smalla, K. (2014). Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends in Microbiology*, 22(9), 536-545. doi:10.1016/j.tim.2014.05.005
- Jukes, T. H., Stoksat, E. L. R., Taylor, R. R., Combs, T. J., Edwards, H. M., & Meadows, G. B. (1950).

- Growth promoting effect of aureomycin on pigs. *Arch. Biochem.*, 26, 324-330.
- Kang, D. H., Gupta, S., Rosen, C., Fritz, V., Singh, A., Chander, Y., et al. (2013). Antibiotic uptake by vegetable crops from manure-applied soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(42), 9992-10001. doi:10.1021/jf404045m
- Kemper, N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*, 8(1), 1-13. doi:10.1016/j.ecolind.2007.06.002
- Kim, K. R., Owens, G., Kwon, S. I., So, K. H., Lee, D. B., & Ok, Y. S. (2011). Occurrence and environmental fate of veterinary antibiotics in the terrestrial environment. *Water, Air, and Soil Pollution*, 214(1-4), 163-174. doi:10.1007/s11270-010-0412-2
- Kumar, K., Gupta, S. C., Baidoo, S. K., Chander, Y., & Rosen, C. J. (2005). Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. *J Environ Qual*, 34(6), 2082-2085. doi:10.2134/jeq2005.0026
- Kummerer, K. (2009). The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use - present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management*, 90(8), 2354-2366. doi:10.1016/j.jenvman.2009.01.023
- Kümmerer, K. (2003). Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(12), 1203-1214. doi:10.1111/j.1469-0691.2003.00739.x
- Kurwadkar, S. T., Adams, C. D., Meyer, M. T., & Kolpin, D. W. (2007). Effects of sorbate speciation on sorption of selected sulfonamides in three loamy soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1370-1376. doi:10.1021/jf060612o
- Larsson, D. G. J., de Pedro, C., & Paxeus, N. (2007). Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials*, 148(3), 751-755. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.07.008
- Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A. K. M., Wertheim, H. F. L., Sumpradit, N., et al. (2013). Antibiotic resistance-the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(12), 1057-1098. doi:10.1016/S1473-3099(13)70318-9
- Leal, R. M. P., Alleoni, L. R. F., Tornisielo, V. L., & Regitano, J. B. (2013). Sorption of fluoroquinolones and sulfonamides in 13 Brazilian soils. *Chemosphere*, 92(8), 979-985. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.03.018
- Le-Minh, N., Khan, S. J., Drewes, J. E., & Stuetz, R. M. (2010). Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes. *Water Research*, 44(15), 4295-4323. doi:10.1016/j.watres.2010.06.020
- Li, C., Chen, J., Wang, J., Ma, Z., Han, P., Luan, Y., & Lu, A. (2015). Occurrence of antibiotics in soils and manures from greenhouse vegetable production bases of Beijing, China and an associated risk assessment. *Science of the Total Environment*, 521-522, 101-107. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.03.070

- Lin, L., Yuan, S., Chen, J., Wang, L., Wan, J., & Lu, X. (2010). Treatment of chloramphenicol-contaminated soil by microwave radiation. *Chemosphere*, 78(1), 66-71. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.09.054
- Martinez, J. L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*, 157(11), 2893-2902. doi:10.1016/j.envpol.2009.05.051
- McManus, P. S., Stockwell, V. O., Sundin, G. W., & Jones, A. L. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annual review of phytopathology*, 40(18), 443-65. doi:10.1146/annurev.phyto.40.120301.093927
- Meersche, T. van den, Pamel, E. van, Poucke, C. van, Herman, L., Heyndrickx, M., Rasschaert, G., & Daeseleire, E. (2016). Development, validation and application of an ultra high performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the simultaneous detection and quantification of five different classes of veterinary antibiotics in swine manure. *Journal of Chromatography, A*, 1429, 248-257. doi:10.1016/j.chroma.2015.12.046
- Miller, J., & Miller, L. (2010). Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. *Technometrics*, 278.
- Mitchell, S. M., Ullman, J. L., Teel, A. L., & Watts, R. J. (2015). Hydrolysis of amphenicol and macrolide antibiotics: Chloramphenicol, florfenicol, spiramycin, and tylosin. *Chemosphere*, 134, 504-511. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.08.050
- Moore, P. R., Evanson, A., Luckey, T. D., McCoy, E., Elvehjem, E. A., & Hart, E. B. (1946). Use of sulphasuccidine, streptothricin and streptomycin in nutrition studies with the chick. *J. Biol. Chem*, 165, 437-441.
- Morel, M. C., Spadini, L., Brimo, K., & Martins, J. M. F. (2014). Speciation study in the sulfamethoxazole-copper-pH-soil system: Implications for retention prediction. *Science of the Total Environment*, 481(1), 266-273. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.02.040
- Nie, M., Yang, Y., Zhang, Z., Yan, C., Wang, X., Li, H., & Dong, W. (2014). Degradation of chloramphenicol by thermally activated persulfate in aqueous solution. *Chemical Engineering Journal*, 246, 373-382. doi:10.1016/j.cej.2014.02.047
- NTCI, N. T. C. I. (1990). Note High-performance liquid chromatography, 519, 221-227. doi:10.1016/S0021-9673(01)96735-4
- O'Neill, J. (2014). Antimicrobial Resistance : Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Review on Antimicrobial Resistance*, (December), 1-16.
- Penêda, P. (2016). *Ocorrência e Persistência dos Antibióticos nos Solos*. Porto.
- Pereira, L. A., Jardim, I. C. S. F., Fostier, A. H., & Rath, S. (2012). Ocorrência, comportamento e impactos ambientais provocados pela presença de antimicrobianos veterinários em solos. *Quimica Nova*, 35(1), 159-169. doi:10.1590/S0100-40422012000100028
- Qi, C., Liu, X., Lin, C., Zhang, X., Ma, J., Tan, H., & Ye, W. (2014). Degradation of sulfamethoxazole by microwave-activated persulfate: Kinetics, mechanism and acute toxicity. *Chemical Engineering Journal*, 249(August 2014), 6-14. doi:10.1016/j.cej.2014.03.086

- Qiang, Z., & Adams, C. (2004). Potentiometric determination of acid dissociation constants (pK_a) for human and veterinary antibiotics. *Water Research*, 38(12), 2874-2890. doi:10.1016/j.watres.2004.03.017
- Reeves, P. T. (2011). Antibiotics: Groups and Properties. *Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food*, 1-60. doi:10.1002/9781118067208.ch1
- Rodríguez-Rojas, A., Rodríguez-Beltrán, J., Couce, A., & Blázquez, J. (2013). Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6-7), 293-297. doi:10.1016/j.ijmm.2013.02.004
- Santiago, A. (2016). Legislação dos Solos contaminados pode ser publicada antes de Junho. *10º Fórum Nacional De Resíduos*. <http://ambienteonline.pt/10fnr/noticias/legislacao-dos-solos-contaminados-pode-ser-publicada-antes-de-junho>. Accessed 18 August 2016
- Sarmah, A. K., Meyer, M. T., & Boxall, A. B. A. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65(5), 725-759. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.03.026
- Schuster, A., Hädrich, C., & Kümmerer, K. (2008). Flows of active pharmaceutical ingredients originating from health care practices on a local, regional, and nationwide level in Germany-is hospital effluent treatment an effective approach for risk reduction? *Water, Air, and Soil Pollution: Focus*, 8(5-6), 457-471. doi:10.1007/s11267-008-9183-9
- Serrano, P. H. (2005). *Responsible use of antibiotics in aquaculture*. *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53). Roma: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.
- Solliec, M., Roy-Lachapelle, A., Gasser, M. O., Coté, C., Généreux, M., & Sauvé, S. (2016). Fractionation and analysis of veterinary antibiotics and their related degradation products in agricultural soils and drainage waters following swine manure amendment. *Science of the Total Environment*, 543, 524-535. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.11.061
- Srinivasan, P., Sarmah, A. K., & Manley-Harris, M. (2014). Sorption of selected veterinary antibiotics onto dairy farming soils of contrasting nature. *Science of the Total Environment*, 472, 695-703. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.11.104
- Starr, M. P., & Reynolds, D. M. (1951). Streptomycin resistance of coliform bacteria from turkeys fed streptomycin. *Proceedings of the 51st General Meeting, Society of American Bacteriology*.
- Tasho, R. P., & Cho, J. Y. (2016). Veterinary antibiotics in animal waste, its distribution in soil and uptake by plants: A review. *The Science of the total environment*, 563-564(3), 366-376. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.04.140
- Teddy, A. A. (2014). Faculty of Bioscience Engineering Pressurized liquid extraction and Orbitrap mass spectrometry analysis of pharmaceutical residues in wastewater treatment plant sludge.
- Teixeira, S., Delerue-Matos, C., & Santos, L. (2012). Removal of sulfamethoxazole from solution by raw and chemically treated walnut shells. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(8), 3096-3106. doi:10.1007/s11356-012-0853-9

- Thiele-Bruhn, S. (2003). Pharmaceutical Antibiotic Compounds in Soils - A Review, (April 2003). doi:10.1002/jpln.200390023
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. a, Robinson, T. P., et al. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (16), 1-6. doi:10.1073/pnas.1503141112
- 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
- Vera, J., Correia-Sá, L., Paíga, P., Bragança, I., Fernandes, V. C., Domingues, V. F., & Deterue, C. (2013). 2013 QuEChERS and soil analysis. An Overview. *Versita*. doi:10.2478/sampre-2013-0006
- Wang, X., Du, Y., & Ma, J. (2016). Novel synthesis of carbon spheres supported nanoscale zero-valent iron for removal of metronidazole. *Applied Surface Science*, 390, 50-59. doi:10.1016/j.apsusc.2016.08.027
- Waters. (2016). How Does High Performance Liquid Chromatography Work? http://www.waters.com/waters/en_EE/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work?/nav.htm?cid=10049055 \nhttp://www.waters.com/waters/en_EE/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work?/nav.htm?cid=10049055. Accessed 20 September 2016
- Wei, R., Ge, F., Zhang, L., Hou, X., Cao, Y., Gong, L., et al. (2015). Occurrence of 13 veterinary drugs in animal manure-amended soils in Eastern China. *Chemosphere*, 144, 2377-2383. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.10.126
- WHO. (2015). Antimicrobial resistance. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>. Accessed 21 June 2016
- Wu, X. L., Xiang, L., Yan, Q. Y., Jiang, Y. N., Li, Y. W., Huang, X. P., et al. (2014). Distribution and risk assessment of quinolone antibiotics in the soils from organic vegetable farms of a subtropical city, Southern China. *Science of the Total Environment*, 487(1), 399-406. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.04.015

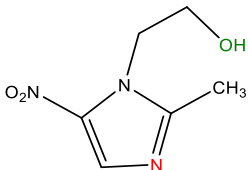
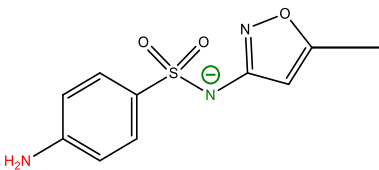
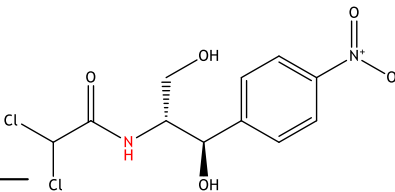
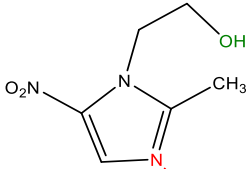
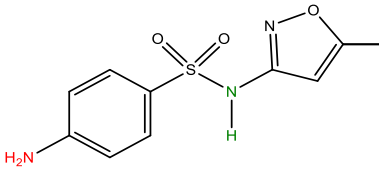
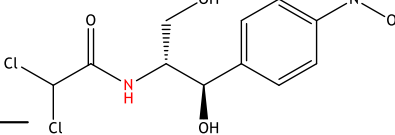
A. Anexos: Materiais e Métodos

Tabela 18 - Calendarização do procedimento experimental

Semana	Ensaio
17 - 23 de julho	1 e 2
24 - 30 de Julho	3 e 4
31 - 6 de agosto	5 a 8
21 - 27 de agosto	9 a 12

B. Anexos: Resultados

Tabela 19 - Formas de especiação dos compostos em estudo nos valores de pH ocorridos nos ensaios

Ensaio	pH	METRO	SULFA	CAP
		$pK_{a1}=2,4$ $pK_{a2}=14,4$	$pK_{a1}=1,6$ $pK_{a2}=5,7$	$pK_{a1}=11$
1 a 4, 9 a 12	7	 <p>Neutro</p>	 <p>Carregado negativamente</p>	 <p>Neutro</p>
5 a 8	2	 <p>Carregado positivamente</p>	 <p>Neutro</p>	 <p>Neutro</p>