

M 2014



IMPACTO DOS ANTIBIÓTICOS VETERINÁRIOS NA PRODUÇÃO PRIMÁRIA DOS SISTEMAS AQUÁTICOS

SÓNIA PATRÍCIA FREITAS ANDRADE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA

AO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR

DA UNIVERSIDADE DO PORTO EM

TOXICOLOGIA E CONTAMINAÇÃO AMBIENTAIS

Sónia Patrícia Freitas Andrade

Impacto dos antibióticos veterinários na produção primária dos sistemas aquáticos

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Toxicologia e Contaminação Ambientais submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Doutora Mafalda Baptista

Categoria – Pós-Doutoramento

Afiliação – Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental.

Co-orientador – Doutora Maria Clara Basto

Categoria – Professora Auxiliar

Afiliação – Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Agradecimentos

Durante a execução deste projeto várias foram as pessoas que direta ou indiretamente, de forma desprendida e genuína, me ajudaram e apoiaram. A elas o meu profundo reconhecimento e sincero agradecimento:

Às minhas supervisoras, Dra. Mafalda Baptista e Dra. Maria Clara Basto, pela oportunidade de integrar este projeto e pela orientação e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas de laboratório do CIIMAR e FCUP, por toda a ajuda disponibilizada no decorrer do trabalho laboratorial.

Aos meus pais, que me apoiaram e apoiam incondicionalmente em todas as minhas escolhas, pela imensa paciência, compreensão e carinho que sempre demonstraram e por caminharem ao meu lado neste meu percurso académico.

Aos meus irmãos e sobrinhos, pelas palavras de força e coragem, pelos bons conselhos e carinho.

Por fim, quero agradecer a todos os meus amigos especialmente, à Marta Vieira, Joana Guedes e Tânia Oliveira, pela amizade, apoio, paciência, compreensão e partilha, pela dedicação e presença constante.

Este trabalho foi parcialmente financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) através do projeto PEst-C/MAR/LA0015/2013 e pelo projeto ECORISK (NORTE-07-0124-FEDER-000054), co-financiado pelo Programa Operacional Regional do Norte (ON.2 – O Novo Norte), integrado no Quadro de Referência Estratégico Nacional (QREN), e financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (Feder).

O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade dos antibióticos veterinários, minociclina, oxitetraciclina, tetraciclina, enrofloxacina e ceftiofur, para um organismo comum em águas doces, a cianobactéria *Microcystis aeruginosa*.

Para tal simularam-se em laboratório condições de exposição aos antibióticos que podem surgir em meio aquático. Meio de cultura Z₈ dopado com 10, 100, 1000 e 10 000 µg/L de antibióticos, foi exposto à luz artificial e mantido na ausência de luz, para estudar a possível ocorrência de fotodegradação. Meio de cultura inoculado com a cianobactéria *M. aeruginosa* foi igualmente exposto a antibióticos e a luz artificial, e os resultados foram comparados com os obtidos para as mesmas concentrações de antibióticos expostos à luz mas sem inoculação, de forma a averiguar o que acontecia à concentração de antibióticos no meio inoculado. Amostras foram recolhidas após 0,5; 3; 7; 28 e 56 horas de exposição, realizando-se a monitorização do crescimento da cianobactéria pela medição da densidade ótica do meio de cultura a 750 nm, aos mesmos tempos de exposição. Para análise dos antibióticos usou-se a extração em fase sólida, seguida de cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de díodos.

Placas de 96 poços dopadas com concentrações individuais de antibióticos (10, 100, 1000 e 10 000 µg/L) e concentrações combinadas de tetraciclina e enrofloxacina, foram expostas à luz artificial durante 168 horas, para estudar a toxicidade dos antibióticos e de misturas de antibióticos para a *M. aeruginosa*. Para análise do crescimento da cianobactéria a densidade ótica do meio de cultura foi medida inicialmente e após 168 horas de exposição.

Os resultados obtidos demonstraram que a luz artificial contribui para a degradação destes antibióticos veterinários, nas concentrações mais baixas testadas (10 e 100 µg/L). A presença de cianobactérias no meio de cultura teve influência sobre a redução da concentração dos antibióticos, principalmente nas concentrações 100 e 1000 µg/L.

A monitorização do crescimento de *M. aeruginosa* demonstrou que as tetraciclinas (minociclina, oxitetraciclina e tetraciclina) foram, dos antibióticos estudados, as mais tóxicas para a cianobactéria. Exposições combinadas de tetraciclina e enrofloxacina revelaram-se menos tóxicas para as cianobactérias do que exposições de antibióticos individuais.

Considerando a contínua entrada de antibióticos no meio aquático, e o facto de as cianobactérias estarem na base da cadeia trófica, sendo produtores primários, os resultados obtidos são importantes para a compreensão do comportamento dos antibióticos veterinários no meio ambiente e do seu impacto.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the toxicity of veterinary antibiotics, minocycline, oxytetracycline, tetracycline, enrofloxacin and ceftiofur, for a common organism in fresh water, the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*.

For that purpose, conditions that may exist in the aquatic environment were simulated in laboratory. Culture medium Z₈ doped with 10, 100, 1000 and 10 000 µg/L of antibiotics was either exposed to artificial light, or kept in the absence of light, to study the possible occurrence of photodegradation. Culture medium inoculated with cyanobacteria, and exposed to artificial light, were exposed to the antibiotics, and the results were compared with those obtained for the same concentrations of antibiotics but without inoculation, to determine what happened to the concentrations of antibiotics in the medium inoculated. Samples were collected after 0,5; 3; 7; 28 and 56 hours of exposure; the monitoring of the growth of cyanobacteria was performed by measuring the optical density of the culture medium at 750 nm, for the same exposure times. For analysis of the antibiotics solid phase extraction, followed by high performance liquid chromatography with diode array detector was employed.

96 well plates doped with individual concentrations of antibiotics (10, 100, 1000 and 10, 000 µg/L) and combined concentrations of tetracycline and enrofloxacin were exposed to artificial light for 168 hours to determine the toxicity of antibiotics and mixtures of antibiotics for *M. aeruginosa*. For analysis the growth of cyanobacteria the optical density of the culture medium was measured initially and after 168 hours of exposure.

The results demonstrated that the artificial light contributes to the degradation of these veterinary antibiotics, at the lowest concentrations tested (10 and 100 µg/L). The presence of cyanobacteria in culture medium had influence on the reduction of concentration of antibiotics, especially for 100 and 1000 µg/L.

The assessment of the growth of *M. aeruginosa* showed that tetracyclines (minocycline, oxytetracycline and tetracycline) were, of the antibiotics studied, the most toxic to cyanobacteria. Combined exposures of tetracycline and enrofloxacin were less toxic to cyanobacteria than when exposed to antibiotics individually.

Taking into account the continuous entrance of antibiotics in aquatic media, and the fact that cyanobacteria are on the bottom of the trophic chains, being primary producers,

these results contribute to the understanding of the fate and impact of veterinary antibiotics in aquatic environments.

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	v
Índice	vii
Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	xii
Lista de abreviaturas	xiii
1. Introdução	1
1.1 Poluentes ambientais emergentes	1
1.1.1 Antibióticos veterinários	2
1.1.2 Vias de exposição no meio ambiente	4
1.2 Efeitos dos antibióticos veterinários no meio aquático	6
1.3 Bioensaios de toxicidade	7
1.4 Cianobactérias	8
1.5 Metodologias analíticas	9
1.6 Objetivos	10
2. Material e Métodos	11
2.1 Material e reagentes	11
2.2 Preparação das soluções	11
2.2.1 Soluções padrão individuais e soluções padrão de trabalho	11
2.2.2 Meio de cultura Z ₈	12
2.3 Cultura de <i>Microcystis aeruginosa</i>	13
2.4 Variação da concentração dos antibióticos	13
2.4.1 Testes de fotodegradação	13
2.4.2 Testes com <i>M. aeruginosa</i>	14
2.5 Medição de antibióticos veterinários	14
2.5.1 Extração em fase sólida	14
2.5.2 Análise dos antibióticos	15
2.6 Controlo do procedimento analítico	16
2.7 Testes de toxicidade com <i>M. aeruginosa</i>	16
2.8 Tratamento de dados	17
3. Resultados	19
3.1 Controlo do procedimento analítico	19

3.2 Variação da concentração dos antibióticos em meio de cultura por ação da luz	21
3.2.1 Minociclina	21
3.2.2 Oxitetraciclina	23
3.2.3 Tetraciclina	24
3.2.4 Enrofloxacina	26
3.2.5 Ceftiofur	27
3.3 Variação da concentração dos antibióticos em meio de cultura por ação das cianobactérias	28
3.3.1 Minociclina	29
3.3.2 Oxitetraciclina	30
3.3.3 Tetraciclina	31
3.3.4 Enrofloxacina	32
3.3.5 Ceftiofur	33
3.4 Cinética da variação da concentração dos antibióticos em meio de cultura	34
3.5 Efeitos dos antibióticos no crescimento de <i>M. aeruginosa</i>	37
3.6 Efeito de misturas de antibióticos no crescimento de <i>M. aeruginosa</i>	40
4. Discussão	41
4.1 Variação da concentração dos antibióticos veterinários em meio de cultura	41
4.2 Toxicidade dos antibióticos veterinários para cianobactérias	43
5. Conclusão	45
6. Bibliografia	46

Índice de Figuras

Figura 1. Estruturas químicas dos antibióticos: (a) minociclina, (b) oxitetraciclina, (c) tetraciclina, (d) enrofloxacina e (e) ceftiofur.	3
Figura 2. Vias de exposição, destino e efeitos dos produtos farmacêuticos veterinários no meio ambiente (adaptado de Jørgensen e Halling-Sørensen, 2000).	6
Figura 3. Exemplo de um cromatograma de HPLC-DAD (padrão 5 mg/L, em 1% de ácido fórmico), apresentando os picos e tempos de retenção de minociclina (MNC), 8,5 min; oxitetraciclina (OTC), 9,8 min; tetraciclina (TET), 10,4 min; enrofloxacina (ENR), 11,0 min e ceftiofur (CEF), 13,8 min.	19
Figura 4. Retas de calibração de tetraciclina em meio de cultura Z_8 (\diamond) e em fase móvel (\square).	20
Figura 5. Percentagem de recuperação da enrofloxacina, em soluções filtradas e não filtradas (100 $\mu\text{g/L}$). As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas. .	21
Figura 6. Variação da concentração de minociclina em meio de cultura: ao abrigo da luz (\blacktriangle) e exposta à luz artificial (\blacksquare). Meio de cultura com concentração nominal de minociclina: (a) 10 $\mu\text{g/L}$, (b) 100 $\mu\text{g/L}$, (c) 1000 $\mu\text{g/L}$ e (d) 10 000 $\mu\text{g/L}$. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.	22
Figura 7. Variação da concentração de oxitetraciclina em meio de cultura: ao abrigo da luz (\blacktriangle) e exposta à luz artificial (\blacksquare). Meio de cultura com concentração nominal de oxitetraciclina: (a) 10 $\mu\text{g/L}$, (b) 100 $\mu\text{g/L}$, (c) 1000 $\mu\text{g/L}$ e (d) 10 000 $\mu\text{g/L}$. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.	24
Figura 8. Variação da concentração de tetraciclina em meio de cultura: ao abrigo da luz (\blacktriangle) e exposta à luz artificial (\blacksquare). Meio de cultura com concentração nominal de tetraciclina: (a) 10 $\mu\text{g/L}$, (b) 100 $\mu\text{g/L}$, (c) 1000 $\mu\text{g/L}$ e (d) 10 000 $\mu\text{g/L}$. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.	25
Figura 9. Variação da concentração de enrofloxacina em meio de cultura: ao abrigo da luz (\blacktriangle) e exposta à luz artificial (\blacksquare). Meio de cultura com concentração nominal de enrofloxacina: (a) 10 $\mu\text{g/L}$, (b) 100 $\mu\text{g/L}$, (c) 1000 $\mu\text{g/L}$ e (d) 10 000 $\mu\text{g/L}$. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.	26
Figura 10. Variação da concentração de ceftiofur em meio de cultura: ao abrigo da luz (\blacktriangle) e exposta à luz artificial (\blacksquare). Meio de cultura com concentração nominal de ceftiofur: (a) 10	

µg/L, (b) 100 µg/L, (c) 1000 µg/L e (d) 10 000 µg/L. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.28

Figura 11. Variação da concentração de minociclina em meio de cultura exposta a luz artificial: meio inoculado com *M. aeruginosa* (◆) e meio não inoculado (■). Meio de cultura com concentração nominal de minociclina: (a) 10 µg/L, (b) 100 µg/L e (c) 1000 µg/L. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.29

Figura 12. Variação da concentração de oxitetraciclina em meio de cultura exposta a luz artificial: meio inoculado com *M. aeruginosa* (◆) e meio não inoculado (■). Meio de cultura com concentração nominal de oxitetraciclina: (a) 10 µg/L, (b) 100 µg/L e (c) 1000 µg/L. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.30

Figura 13. Variação da concentração de tetraciclina em meio de cultura exposta a luz artificial: meio inoculado com *M. aeruginosa* (◆) e meio não inoculado (■). Meio de cultura com concentração nominal de tetraciclina: (a) 10 µg/L, (b) 100 µg/L e (c) 1000 µg/L. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.32

Figura 14. Variação da concentração de enrofloxacina em meio de cultura exposta a luz artificial: meio inoculado com *M. aeruginosa* (◆) e meio não inoculado (■). Meio de cultura com concentração nominal de enrofloxacina: (a) 10 µg/L, (b) 100 µg/L e (c) 1000 µg/L. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.33

Figura 15. Variação da concentração de ceftiofur em meio de cultura exposta a luz artificial: meio inoculado com *M. aeruginosa* (◆) e meio não inoculado (■). Meio de cultura com concentração nominal de ceftiofur: (a) 10 µg/L, (b) 100 µg/L e (c) 1000 µg/L. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.34

Figura 16. Representação de $\ln(C_t/C_0)$ em função do tempo para a minociclina no meio de cultura: meio inoculado com *M. aeruginosa* (◆) e meio não inoculado (□). Concentração nominal, C_0 , de minociclina: (a) 10 µg/L, (b) 100 µg/L e (c) 1000 µg/L. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.35

Figura 17. Representação de $\ln(C_t/C_0)$ em função do tempo para a oxitetraciclina no meio de cultura: meio inoculado com *M. aeruginosa* (◆) e meio não inoculado (□). Concentração nominal, C_0 , de oxitetraciclina: (a) 10 µg/L, (b) 100 µg/L e (c) 1000 µg/L. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.35

Figura 18. Representação de $\ln(C_t/C_0)$ em função do tempo para a tetraciclina no meio de cultura: meio inoculado com *M. aeruginosa* (◆) e meio não inoculado (□). Concentração nominal, C_0 , de tetraciclina: (a) 10 µg/L, (b) 100 µg/L e (c) 1000 µg/L. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.36

Figura 19. Representação de $\ln (C_t/C_0)$ em função do tempo para a enrofloxacin no meio de cultura: meio inoculado com <i>M. aeruginosa</i> (◇) e meio não inoculado (□). Concentração nominal, C_0 , de enrofloxacin: (a) 10 µg/L, (b) 100 µg/L e (c) 1000 µg/L. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.	36
Figura 20. Representação de $\ln (C_t/C_0)$ em função do tempo para o ceftiofur no meio de cultura: meio inoculado com <i>M. aeruginosa</i> (◇) e meio não inoculado (□). Concentração nominal, C_0 , de ceftiofur: (a) 10 µg/L, (b) 100 µg/L e (c) 1000 µg/L. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.	37
Figura 21. Correlação entre a densidade ótica e a densidade celular. Meio de cultura inoculado com <i>M. aeruginosa</i> (◇).	38
Figura 22. Curva de dose-efeito do crescimento de <i>M. aeruginosa</i> após 168 h de exposição a antibióticos. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.	39
Figura 23. Inibição do crescimento de <i>M. aeruginosa</i> após exposição a diferentes misturas de tetraciclina e enrofloxacin. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.	40

Índice de Tabelas

Tabela 1. Dados sobre os antibióticos estudados.	3
Tabela 2. Composição do meio de cultura Z8 para um volume final de 1 L de água.	12
Tabela 3. Limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) de cada antibiótico.	20
Tabela 4. EC ₅₀ (µg/L) dos antibióticos veterinários para <i>M. aeruginosa</i>	39

Listas de Abreviaturas

CEF- ceftiofur

CG - Cromatografia gasosa

CL - Cromatografia líquida

DAD - Detetor de díodos

DC – Densidade celular

DO – Densidade ótica

EC - Concentração efetiva

ENR - Enrofloxacina

ETAR - Estação de tratamento de águas residuais

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

LOD - Limite de detecção

LOQ - Limite de quantificação

MNC - Minociclina

MS - Espectrometria de massa

OTC - Oxitetraciclina

SPE - Extração em fase sólida

TET - Tetraciclina

1.1 Poluentes ambientais emergentes

O meio ambiente está constantemente a ser afetado por vários poluentes, tais como poluentes não regulamentados, apesar de serem considerados uma possível ameaça para a saúde pública e para o ambiente. Produtos farmacêuticos, juntamente com produtos de cuidado pessoal, foram recentemente identificados como produtos químicos de preocupação ambiental emergente, devido aos seus potenciais efeitos tóxicos (Li, 2014). Nestes incluem-se os antibióticos, hormonas, disruptores endócrinos e anti-inflamatórios não-esteroides e analgésicos (Kot-Wasik *et al.*, 2007).

Os produtos farmacêuticos causam maior preocupação devido aos seus potenciais efeitos tóxicos pois são compostos biologicamente ativos que podem afetar organismos não alvo (Garcia-Rodríguez *et al.*, 2014). Os mais utilizados são os antibióticos, numa escala que pode ultrapassar 100 000 toneladas/ano (Wise, 2002). Em várias partes do mundo, tais como Europa e Estados Unidos, tem sido relatada a presença de numerosas classes de antibióticos em meio aquático sendo alguns deles ambientalmente persistentes (Zhang *et al.*, 2014). Estes têm atraído cada vez mais atenção devido às suas atividades biológicas, mesmo a baixas concentrações (Pomati *et al.*, 2004).

A designação antibiótico era, originalmente, atribuída a um agente produzido por um microrganismo, com atividade biológica contra outros microrganismos. Os primeiros antibióticos conhecidos eram de origem natural mas, hoje em dia podem também ser obtidos por síntese química ou por modificação química de compostos de origem natural (Kümmerer, 2009).

Os antibióticos podem ser agrupados em famílias em função do seu mecanismo de ação, espectro de atividade ou da sua estrutura química. Existem mais de dez famílias de antibióticos, nomeadamente, tetraciclina, fluoroquinolonas, sulfonamidas, β -lactâmicos, macrólidos, aminoglicosídeos e cefalosporinas (Kümmerer, 2009; Yu *et al.*, 2012; Li, 2014).

Em geral, os antibióticos são moléculas complexas que podem ter diferentes funcionalidades, sob diferentes condições de pH, podendo surgir na forma neutra, aniónica, catiónica ou na forma zwitteriónica. As suas propriedades físico-químicas e biológicas, tais como a atividade antibiótica e a toxicidade, podem variar com o pH do meio (Kümmerer, 2009).

Os antibióticos podem ser utilizados como agentes terapêuticos humanos ou veterinários, com a finalidade de prevenir e tratar infecções microbianas (Castiglioni *et al.*, 2005), podendo também ser usados em aquacultura (Kümmerer, 2009).

A contínua entrada destes compostos no meio ambiente pode induzir efeitos adversos em organismos aquáticos e terrestres (Wille *et al.*, 2010) e também respostas a nível de ecossistemas envolvendo espécies não-alvo (Kim *et al.*, 2008).

1.1.1 Antibióticos veterinários

Um antibiótico veterinário é aquele que é usado em medicina veterinária com o objetivo de prevenir e tratar doenças, mas também pode ser utilizado como promotor de crescimento em apicultura, pecuária e piscicultura, e como aditivo alimentar (Halling-Sørensen *et al.*, 1998; Sarmah *et al.*, 2006; Zuccato *et al.*, 2010 e Li, 2014).

A maioria dos antibióticos são concebidos para inibir o crescimento bacteriano ou para atacar componentes bacterianos, tais como paredes celulares, membranas celulares ou enzimas essenciais (Liu *et al.*, 2012).

Neste trabalho, foram usados antibióticos veterinários, nomeadamente a minociclina (MNC), oxitetraciclina (OTC) e tetraciclina (TET), que pertencem à família das tetraciclinas, a enrofloxacina (ENR) que pertence à família das fluoroquinolonas e o ceftiofur (CEF) que faz parte da família das cefalosporinas. A escolha destes antibióticos deveu-se ao facto das tetraciclinas serem um dos grupos de antibióticos mais prescrito (Garrido-Mesa *et al.*, 2013), e mais frequentemente detetado em águas residuais e águas de superfície, juntamente com as fluoroquinolonas (Babić *et al.*, 2013); e da existência de poucos estudos que avaliem a toxicidade do ceftiofur sobre os organismos aquáticos. Na tabela 1 encontram-se descritos alguns dados dos antibióticos de estudo.

As tetraciclinas são muito utilizadas devido ao seu amplo espectro de ação e enorme eficácia no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-positivas e gram-negativas. Estes antibióticos têm a capacidade de se ligar à subunidade ribossomal 30S, impedindo a associação do aminoacil-tARN aos ribossomas bacterianos, inibindo a síntese de proteínas (van der Griten *et al.*, 2010; Garrido-Mesa *et al.*, 2013; González-Pleiter *et al.*, 2013).

A ENR é uma fluoroquinolona de amplo espectro de atividade contra bactérias (gram positivas e negativas) e micoplasma (Babić *et al.*, 2013). Este antibiótico tem como

proteínas alvo as enzimas ADN-girase e topoisomerase IV, que são essenciais para a duplicação e transcrição do ADN nas bactérias (Speltini *et al.*, 2010).

Tabela 1. Dados sobre os antibióticos estudados

Antibiótico	Família	CAS	Massa Molar (g/mol)	Fórmula Molecular
Minociclina	Tetraciclinas	13614-98-7	493,94	C ₂₃ H ₂₇ N ₃ O ₇ Cl
Oxitetraciclina	Tetraciclinas	2058-46-0	496,89	C ₂₂ H ₂₅ ClN ₂ O ₉
Tetraciclina	Tetraciclinas	60-54-8	444,44	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈
Enrofloxacin	Fluoroquinolonas	93106-60-6	359,40	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃
Ceftiofur	Cefalosporinas	80370-57-6	523,56	C ₁₉ H ₁₇ N ₅ O ₇ S ₃

O CEF é uma cefalosporina de terceira geração que é usado no tratamento de infecções bacterianas e em alimentação controlada de animais. Inibe a síntese da parede celular bacteriana, provocando a morte da célula (Puig *et al.*, 2007; Subbiah *et al.*, 2012).

Na Fig.1 encontram-se representadas as estruturas químicas dos antibióticos veterinários de estudo.

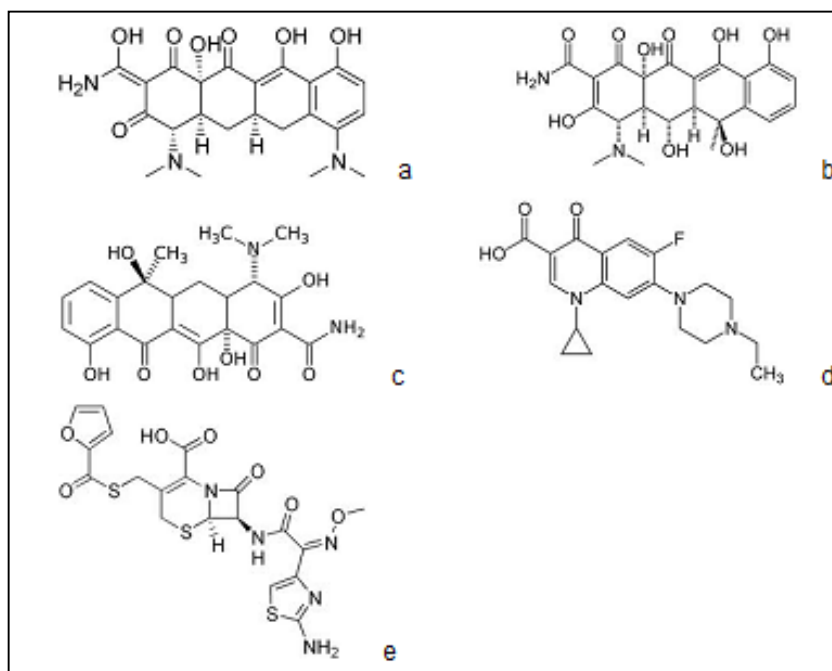


Figura 1. Estruturas químicas dos antibióticos: (a) minociclina, (b) oxitetraciclina, (c) tetraciclina, (d) enrofloxacin e (e) ceftiofur.

1.1.2 Vias de exposição no meio ambiente

Normalmente, os antibióticos têm tempos de meia-vida relativamente curtos, no entanto são considerados como "pseudo-persistentes" porque são continuamente introduzidos no ambiente, o que leva à sua presença permanente permitindo, assim, exposições crônicas (Brain *et al.*, 2005 e Li, 2014).

A presença destes produtos no ambiente depende de muitas variáveis, tais como a quantidade de produto farmacêutico produzido, a dosagem e a frequência com que é usado, as vias metabólicas empregues pelos organismos, e por fim, a eficácia do tratamento dos resíduos (Kot-Wasik *et al.*, 2007).

Os antibióticos podem não ser completamente metabolizados quer pelos humanos quer pelos animais, sendo excretados para o meio ambiente, na forma inalterada ou como metabolito ativo (Kümmerer, 2009; Chen e Guo, 2012). A percentagem de composto que é excretada na forma não-metabolizada ou como metabolito ativo pode ser em alguns casos de 90% (Pinheiro *et al.*, 2013). Para além desta introdução direta no meio ambiente (através de substâncias de excreção, tais como urina e fezes), descargas industriais, aterros e lixiviação subsequente, ou a aquacultura (Kot-Wasik *et al.*, 2007) também contribuem para a sua introdução no meio aquático.

No entanto, a principal fonte destes produtos farmacêuticos para o meio ambiente são as estações de tratamento de águas residuais (ETARs). Os antibióticos entram nas ETARs através de esgotos domésticos e hospitalares ou através de descargas industriais (Babić *et al.*, 2013). As ETARs foram projetadas para remover, entre outros, carbono e azoto, bem como para controlar a poluição microbiana (Carballa *et al.*, 2004), porém, normalmente recebem uma grande quantidade de compostos diferentes, incluindo os antibióticos, para as quais as tecnologias de tratamento não foram especificamente projetadas e, assim, estes podem ser apenas parcialmente eliminados (Li, 2014).

O fluxo de resíduos, durante o tratamento de águas residuais, é separado em dois componentes, efluentes líquidos e sólidos. Uma grande fração dos resíduos antropogénicos, incluindo numerosos produtos farmacêuticos, podem incorporar-se no componente sólido. Devido ao facto de muitos terem moderados a elevados coeficientes de partição octanol-água sofrem partição hidrofóbica ligando-se à fase sólida que é rica em matéria orgânica, durante o tratamento de águas residuais (Kinney *et al.*, 2008).

Os compostos com baixos coeficientes de partição tendem a permanecer na fase aquosa, o que favorece a sua mobilidade através da ETAR, atingindo assim o meio aquático (Carballa *et al.*, 2004). De forma a reduzir a quantidade destes compostos no meio

ambiente a otimização dos tratamentos das águas residuais poderá ser um fator importante. O tratamento mais apropriado poderá ser determinado através da monitorização das águas já tratadas e da monitorização das águas de superfície para as quais são descarregadas as águas residuais (Kot-Wasik *et al.*, 2007).

Os produtos farmacêuticos não são totalmente destruídos nas ETARs através de técnicas convencionais como a biorremediação e os processos físico-químicos, tais como a volatilização, adsorção, sedimentação e filtração. A desinfecção do efluente final é obrigatória e a cloração e/ou irradiação ultravioleta são aplicados na maioria das ETARs, porém, os antibióticos podem resistir a ambas as técnicas. No entanto, estão a ser desenvolvidos sistemas de recuperação de água avançados, como a ozonização, foto-Fenton e osmose reversa que poderão contribuir para uma maior eliminação desses poluentes emergentes (Sirés e Brillas, 2012).

Nos efluentes de ETARs têm sido detetados vários tipos de antibióticos, em concentrações na ordem dos ng/L a µg/L. Estas baixas concentrações no ambiente aquático fizeram com que estes compostos passassem despercebidos durante muitos anos (Brain *et al.*, 2005; Castiglioni *et al.*, 2005). Casos de contaminação das águas superficiais por antibióticos têm sido relatados desde 1982 (Chen e Guo, 2012). Os antibióticos que são mais frequentemente detetados em águas residuais e águas de superfície são as fluoroquinolonas, seguidos pelas sulfonamidas, tetraciclina e macrólidos (Babić *et al.*, 2013), não se encontrando níveis de ceftiofur descritos.

O destino dos produtos farmacêuticos no ambiente é determinado por processos bióticos e abióticos. Os fenómenos de fotodegradação, hidrólise e adsorção são os processos mais marcantes da eliminação abiótica dos produtos farmacêuticos (Babić *et al.*, 2013).

Existem muitos compostos farmacologicamente ativos em que a fotodegradação é a principal via de eliminação de águas de superfície (Sturini *et al.*, 2010). A fotodegradação é definida como sendo um processo pelo qual um composto é alterado por ação da luz (Lunestad *et al.*, 1995), podendo ocorrer fotodegradação direta do composto, que resulta da absorção direta de luz ou fotodegradação indireta que envolve fotossensibilizadores naturais, tais como, nitrato e ácidos húmicos, em que o composto é alterado por ação de um produto de outro composto que absorveu luz (Andreozzi *et al.*, 2003).

Estudos anteriores relatam a ocorrência de fotodegradação de antibióticos presentes em efluentes de águas residuais (Andreozzi *et al.*, 2003), em águas de superfície (Ge *et al.*, 2010), em água natural (Sturini *et al.*, 2010) e em águas residuais (Babić *et al.*, 2013). A fotodegradação de antibióticos tem sido estudada usando diferentes fontes de luz,

particularmente luz solar natural (Lunestad *et al.*, 1995), simulador de luz solar (Ge *et al.*, 2010), luz ultravioleta (Batchu *et al.*, 2014) e luz fluorescente proveniente de uma lâmpada branca fria (Robinson *et al.*, 2005).

1.2 Efeitos dos antibióticos veterinários no meio aquático

Como os antibióticos veterinários não são completamente metabolizados pelo organismo nem removidos pelas ETARs conseguem alcançar o meio ambiente, podendo desta forma afetar adversamente os organismos existentes no ambiente aquático e terrestre (Kümmerer, 2009). A Fig.2 resume as possíveis vias de exposição, o destino e os efeitos de produtos farmacêuticos veterinários no meio ambiente.

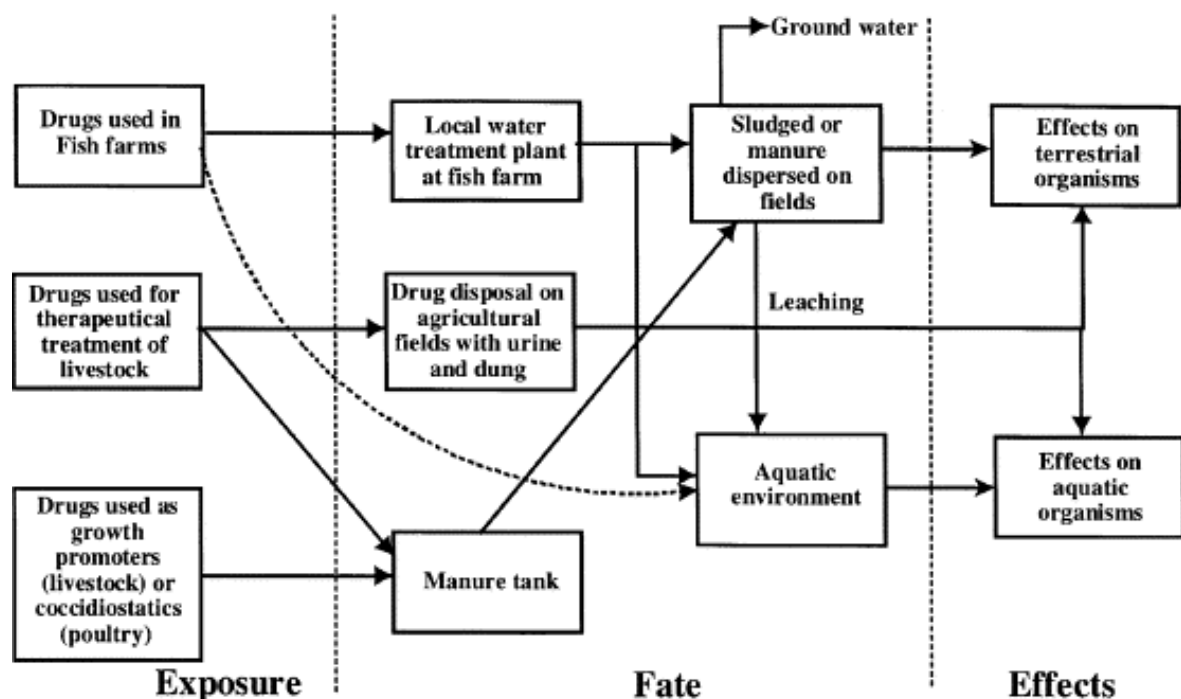


Figura 2. Vias de exposição, destino e efeitos dos produtos farmacêuticos veterinários no meio ambiente (adaptado de Jørgensen e Halling-Sørensen, 2000).

Os antibióticos veterinários libertados para o meio ambiente são motivo de grande preocupação pelas seguintes razões: (1) contaminam uma grande parte dos recursos aquáticos, (2) aceleram a proliferação da resistência a antibióticos por parte das bactérias, (3) têm efeitos negativos sobre os ecossistemas formados por bactérias, conduzindo à

inibição do crescimento ou à morte destes organismos (Yang e Carlson, 2003; Costanzo *et al.*, 2005).

A resistência das bactérias aos antibióticos já foi detetada em bactérias de águas superficiais (Ash *et al.*, 2002), água potável (Schwartz *et al.*, 2003), esgoto (Iversen *et al.*, 2002), solo agrícola (Burgos *et al.*, 2005) e de zonas de aquacultura (Kim *et al.*, 2004). Porém, as implicações desse fenómeno para a saúde humana ainda são pouco conhecidas (Zuccato *et al.*, 2010).

A maioria dos antibióticos tem elevada solubilidade, o que faz com que os organismos aquáticos sejam sensíveis aos seus efeitos (Li, 2014). Estes podem afetar tanto os produtores como os decompositores, potenciando a falência dos processos primários dos ecossistemas. Por isso é essencial avaliar o impacto dos antibióticos em ecossistemas aquáticos, sendo também necessário avaliar os efeitos destes nas espécies através de estudos de toxicidade (van der Grinten *et al.*, 2010; González-Pleiter *et al.*, 2013).

1.3 Bioensaios de toxicidade

Os bioensaios de toxicidade têm como objetivo avaliar a toxicidade de químicos sobre os organismos, através de parâmetros tais como o crescimento e sobrevivência do organismo em estudo na presença de um químico específico. Esta avaliação é feita utilizando várias condições experimentais, tais como a quantidade e a pureza do químico em estudo, entre outros (Zagatto, 2008).

Este tipo de teste é realizado em laboratório e mede os efeitos de diferentes concentrações de uma substância biologicamente ativa, possivelmente tóxica, em organismos previamente selecionados, permitindo assim a determinação da concentração efetiva (EC_x) que produz x efeito no organismo de estudo (Laitano *et al.*, 2006).

Os bioensaios podem ser usados para vários fins, tais como determinar a toxicidade dos agentes químicos; estabelecer critérios e padrões de qualidade da água; avaliar a necessidade de tratamento de águas residuais em relação aos requisitos de monitorização ambiental; avaliar a toxicidade relativa de diferentes substâncias; estabelecer limites máximos de descarga de efluentes para o ambiente aquático; avaliar a sensibilidade relativa de organismos aquáticos; auxiliar na monitorização dos programas ambientais e prever os impactos de acidentes ambientais (Zagatto, 2008; Costa *et al.*, 2008). A duração

deve ajustar-se à natureza do teste (exposição aguda ou crónica), e do tipo de organismo (a duração do ciclo de vida), e deve ser levada a cabo sob condições semelhantes às naturais (por exemplo, temperatura e pH) (Crane *et al.*, 2006).

A Agência Europeia de Avaliação dos Medicamentos (EMA) recomenda a utilização de cianobactérias em testes de efeitos tóxicos de antibióticos; sendo elas bactérias são mais suscetíveis à ação dos antibióticos. Robinson *et al.* (2005) e González-Pleiter *et al.* (2013) por meio de testes de toxicidade, constataram isso mesmo, que as cianobactérias são, em várias ordens de grandeza, mais sensíveis a este tipo de compostos do que outros organismos fotossintéticos.

Na maior parte dos trabalhos sobre toxicidade realizados, foram estudados os efeitos dos antibióticos na cianobactéria *Microcystis aeruginosa*, porque esta é uma das estirpes mais amplamente distribuídas (Liu *et al.*, 2012). Para a maioria dos antibióticos testados já há dados de ensaios de toxicidade para *M. aeruginosa*, mas para o antibiótico ceftiofur ainda não há dados de toxicidade. Ensaios de toxicidade que testem efeitos de misturas de antibióticos também estão ainda pouco descritos na literatura, apesar de para outras classes de compostos se saber que os efeitos de exposição a misturas poderão ser bastante diferentes dos efeitos de exposição a tóxicos individuais.

1.4 Cianobactérias

As cianobactérias, também conhecidas como algas verdes-azuis, estão entre os organismos pioneiros do planeta Terra. São procariotas gram-negativas; têm a particularidade de realizar a fotossíntese de forma semelhante aos organismos eucariotas (Zanchett e Oliveira-Filho, 2013) e apresentam uma ampla distribuição geográfica (Bláha *et al.*, 2009).

No meio aquático estão presentes em água doce, marinha e salobra (Bláha *et al.*, 2009) sendo importantes produtores primários. Algumas espécies conseguem fixar azoto atmosférico, contribuindo para a fertilidade do solo e da água. Porém, o seu crescimento abundante em reservatórios de água pode criar problemas práticos graves para o abastecimento de água (Bartram, 1999). O crescimento exponencial das cianobactérias ocorre devido a dois fatores principais: a eutrofização, que resulta do enriquecimento das águas em nutrientes, devido ao desenvolvimento das atividades agrícolas, industriais e urbanas; e as mudanças climáticas (Paerl e Huisman, 2008; Bláha *et al.*, 2009).

Estas florescências de cianobactérias aumentam a turbidez dos ecossistemas aquáticos, podendo levar à depleção de oxigénio devido à menor fotossíntese de plantas aquáticas, reduzindo, assim, o número de habitats de muitos peixes e invertebrados. Por outro lado, a degradação da matéria orgânica também pode levar ao esgotamento do oxigénio dissolvido na água, matando os peixes (Paerl e Huisman, 2008).

As cianobactérias também são capazes de produzir uma grande variedade de compostos nocivos e toxinas potentes (cianotoxinas), que alteram a qualidade da água e constituem uma enorme preocupação para a saúde humana (Bartram, 1999; Bláha *et al.*, 2009).

As cianobactérias são organismos propícios ao estudo do impacto dos antibióticos veterinários na produção primária dos sistemas aquáticos, uma vez que são organismos fotossintéticos, portanto produtores primários, que estão na base da cadeia trófica. Efeitos sobre o crescimento e vitalidade destes organismos podem, potencialmente, repercutir-se ao longo de toda a cadeia trófica.

1.5 Metodologias analíticas

A análise de produtos farmacêuticos constitui um grande desafio, pelas seguintes razões: há uma grande variedade de compostos farmacêuticos; a necessidade de identificar não apenas os produtos em questão, mas também seus derivados e metabolitos; a diversidade de matrizes (por exemplo, sedimentos, lamas de ETARs, águas de superfície, águas residuais e amostras biológicas); a possibilidade de interferência entre os componentes da amostra com características físico-químicas semelhantes; e a falta de normas adequadas e materiais de referência certificados (Kot-Wasik *et al.*, 2007). Todos estes factos fazem com que não exista um método analítico único para detetar todos os produtos farmacêuticos.

Quando, na década de 1990, a análise de resíduos de produtos farmacêuticos se tornou uma questão importante, a cromatografia gasosa (CG) foi a técnica cromatográfica mais aplicada, juntamente com vários procedimentos de derivatização dos analitos (Buchberger, 2007). A cromatografia gasosa e a cromatografia líquida (CL), em combinação com processos de extração e métodos de limpeza, e a derivatização proporcionaram aos analistas a oportunidade de quantificar vários produtos farmacêuticos e os seus metabolitos, a baixos níveis de concentração (Fatta-Kassinos *et al.*, 2011).

A cromatografia pode ser acoplada a diferentes tipos de detetores, tais como detetor de díodos (DAD) ou um espectrômetro de massa (MS). A CL-MS tem sido a técnica escolhida para detetar baixos níveis de produtos farmacêuticos e permite a obtenção de maior informação sobre os compostos (Fatta-Kassinos *et al.*, 2011).

No entanto a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a DAD, embora menos sensível e seletiva, é mais acessível, tendo-se tornado na principal ferramenta de análise na maioria dos laboratórios (Malintan e Mohd, 2006).

A fim de detetar a maioria dos produtos farmacêuticos, que se encontram no ambiente em concentrações muito baixas, são necessários métodos analíticos com limites de deteção (LOD) também eles muito baixos. Em muitos casos, a pré-concentração e a separação dos analitos da matriz é um pré-requisito para se chegar a um limite de deteção baixo, pelo que é necessária a preparação da amostra de modo adequado (Kot-Wasik *et al.*, 2007).

Atualmente a extração em fase sólida (SPE) é uma técnica muito usada e bem estabelecida para a preparação da amostra. De uma forma geral, a SPE é indicada para qualquer tipo de matriz que necessite de ser pré-concentrada (Tong *et al.*, 2009).

Cavenati e colaboradores utilizaram, para SPE de antibióticos, cartuchos com um polímero que é simultaneamente hidrofílico e lipofílico (HLB) (Cavenati *et al.*, 2012); no cartucho existe um sorbente com a capacidade de extrair simultaneamente analitos polares ácidos, neutros e básicos (Weigel *et al.*, 2004).

1.6 Objetivos

O objetivo deste estudo foi contribuir para a compreensão do comportamento dos antibióticos no meio ambiente, e respetivo impacto, avaliando a toxicidade de antibióticos veterinários para a cianobactéria *M. aeruginosa*. Para tal, simularam-se em laboratório condições de exposição aos antibióticos que podem surgir no meio ambiente, nomeadamente exposição à luz em meio de cultura, bem como exposição à luz em meio de cultura, inoculado com cianobactérias.

2. Material e Métodos

2.1 Material e reagentes

Na realização deste trabalho foram utilizados metanol e acetonitrilo (CHROMASOLV[®], qualidade HPLC), ácido clorídrico (37%, reagente ACS) e ácido fórmico (98%, reagente ACS), que foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (Barcelona, Espanha). O azoto (grau de pureza 99.995%) foi adquirido à Air Liquid (Madrid, Espanha). Os antibióticos veterinários usados eram de elevado grau de pureza (> 90%) e foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (Barcelona, Espanha). Outros reagentes e solventes usados tinham elevada pureza (grau analítico).

De forma a evitar possíveis contaminações, todo o material de vidro e de plástico foi lavado com água e sabão, posteriormente com água desionizada (condutividade <0,1 $\mu\text{S cm}^{-1}$), deixado durante a noite num banho de ácido clorídrico (Pronolab) a 10% (v/v), e lavado, novamente, várias vezes com água desionizada. Por fim, foi seco numa estufa a cerca de 40 °C. O material de plástico (garrafas de polycarbonato Nalgene[®] e pontas de pipetas) foi esterilizado em micro-ondas durante 10 minutos ou 5 minutos a 700 W. Os erlenmeyers de vidro, com rolhas de algodão enrolado em gaze, foram esterilizados na estufa a 170 °C, durante 1 h.

Todas as manipulações das amostras foram realizadas numa câmara de fluxo laminar classe 100, numa sala com ar filtrado de classe 100.

2.2 Preparação de soluções

2.2.1 Soluções padrão individuais e soluções padrão de trabalho

Os antibióticos veterinários utilizados neste trabalho foram a MNC, OTC, TET, ENR e CEF. Inicialmente, foram pesados 15 mg de cada um dos cinco antibióticos veterinários, que foram dissolvidos individualmente em 15 mL de metanol, obtendo-se assim uma solução com concentração final de 1 g/L.

A solução padrão de trabalho foi preparada mensalmente, tendo sido obtida por mistura de todos os antibióticos estudados. Procedeu-se à diluição em metanol de 1 mL de

padrão individual de cada um dos antibióticos num volume final de 25 mL, obtendo-se uma solução de concentração 40 mg/L (P₄₀). A solução foi mantida em frasco âmbar (protegida da luz para evitar possível fotodegradação) e armazenada num congelador a -18 °C. Esta solução padrão foi utilizada para preparar as concentrações necessárias a testar.

2.2.2 Meio de cultura Z₈

O meio de cultura usado neste trabalho foi o meio Z₈, preparado de acordo com Kotai (1972). A composição do meio Z₈ encontra-se detalhada na tabela 2. Este meio de cultura foi empregue porque é propício ao crescimento de cianobactérias e, para garantir o crescimento destes organismos sem contaminações, o meio foi esterilizado em autoclave.

Tabela 2. Composição do meio de cultura Z₈ para um volume final de 1 L de água.

Soluções	Volume
Solução I (0,467 g de NaNO ₃ ; 59 mg de Ca(NO ₃) ₂ •4H ₂ O; 0,25 g de MgSO ₄ •7H ₂ O em 1 L de água desionizada)	10 mL
Solução II (31 mg de NH ₄ Cl; 0,02 g de Na ₂ CO ₃ em 1 L de água desionizada)	10 mL
Solução III (10 mL de solução de ferro (2,8 g de FeCl ₃ •6H ₂ O em 100 mL de HCl 0,1 M); 9,5 mL de solução de EDTA (3,9 g de Na ₂ EDTA em 100 mL de NaOH 0,1 M); diluição a 1 L com água desionizada)	10 mL
Solução IV (solução de micronutrientes: 3,1 g de H ₃ BO ₃ ; 2,23 g de MnSO ₄ •4H ₂ O; 0,22 g de ZnSO ₄ •7H ₂ O; 0,088 g de (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O; 0,146 g de Co(NO ₃) ₂ •6H ₂ O; 0,054 g de VOSO ₄ •6H ₂ O; 0,474 g de Al ₂ (SO ₄) ₃ K ₂ SO ₄ •2H ₂ O; 0,198 g de NiSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ •6H ₂ O; 0,154 g de Cd(NO ₃) ₂ •4H ₂ O; 0,037 g de Cr(NO ₃) ₃ •7H ₂ O; 0,033 g de Na ₂ WO ₄ •2H ₂ O; 0,119 g de KBr; 0,083 g de KI em 1 L de água desionizada)	1 mL

2.3 Cultura de *Microcystis aeruginosa*

Neste trabalho foi usada a espécie *M. aeruginosa* (LEGE 05195), que foi isolada do reservatório do Torrão no rio Tâmega (norte de Portugal) e mantida a crescer em laboratório. As cianobactérias foram cultivadas em meio Z₈ esterilizado. Em todas as experiências, as culturas foram incubadas numa câmara de crescimento com ambiente controlado, em que a temperatura era de 22 ± 2 °C e a intensidade de luz de 18 μEm⁻² s⁻¹ (16 h luz /8 h escuridão) fornecida por uma lâmpada fluorescente branca fria.

2.4 Variação da concentração dos antibióticos

2.4.1 Testes de fotodegradação

Neste estudo, as concentrações de antibióticos veterinários testadas foram de 10, 100, 1000 e 10 000 μg/L, cada uma com três réplicas.

A cada erlenmeyer, devidamente esterilizado e descontaminado, foram adicionados 150 mL de meio de cultura Z₈ (à exceção da solução de concentração 10 μg/L em que foram adicionados 200 mL de meio Z₈) e, em seguida, procedeu-se à dopagem das amostras com o volume necessário a partir do padrão P₄₀.

Procedeu-se à exposição contínua e controlada das amostras a luz fluorescente, proveniente de uma lâmpada branca fria com intensidade de 18 μEm⁻² s⁻¹ (16 h luz /8 h escuridão), nas câmaras de crescimento, a 22 ± 2 °C, durante 56 horas. Paralelamente foram colocados controlos ao abrigo da luz, embrulhados em papel de alumínio, numa câmara escura a 22 ± 2 °C. Após 0,5; 1; 3; 7; 28 e 56 horas de exposição foi realizada a recolha das amostras e respetivos controlos.

Para a concentração de 10 μg/L foram recolhidos 200 mL e para a concentração de 100 μg/L foram recolhidos 50 mL para frascos de plástico castanho, de modo a evitar contacto com a luz após o período de exposição. As amostras foram guardadas a -18 °C até serem processadas por SPE. No caso das soluções de concentrações 1000 μg/L e 10 000 μg/L, foi retirado 1 mL de cada réplica para vials de 1,5 mL, de cor âmbar, para análise direta no HPLC. As amostras foram acidificadas com HCl 37% (pH 2) para posteriormente poderem ser tratadas por SPE (Cavenati *et al.*, 2012)

2.4.2 Testes com *M. aeruginosa*

As concentrações de antibióticos veterinários testadas neste estudo foram 10, 100 e 1000 µg/L, cada uma com três réplicas.

Para a concentração de 10 µg/L a estirpe de *M. aeruginosa* foi inoculada em frascos de erlenmeyer com 200 mL de meio de cultura Z₈. No caso das concentrações 100 e 1000 µg/L os frascos continham 150 mL de meio de cultura Z₈. Em ambos os casos, a concentração inicial de *M. aeruginosa* foi de 1x10⁶ células/mL (OCDE, 2011). Também foram expostos, em paralelo e triplicado, meios de cultura inoculados com cianobactérias sem adição de antibióticos (controles).

Os erlenmeyers foram expostos à luz nas câmaras de crescimento e, subsequentemente, monitorizados a cada 0,5; 3; 7; 28 e 56 horas de exposição. As amostras recolhidas foram filtradas por um filtro de microfibras de vidro (Whatman®, GF/G), com porosidade 0,47 µm e acidificadas com HCl (como descrito anteriormente). Recolheu-se 200 mL de amostra da concentração de 10 µg/L, 50 mL de amostra da concentração 100 µg/L e 1 mL de amostra da concentração 1000 µg/L (como descrito anteriormente).

De cada erlenmeyer foram recolhidos 3 mL, antes da filtração, para se proceder às leituras de densidade ótica (DO) a 750 nm (espectrofotómetro Unicam 5675) e contagem celular, utilizando um hemocítmetro (câmara de Neubauer). As tomas foram feitas às mesmas horas em que se monitorizou a concentração de antibióticos.

2.5 Medição de antibióticos veterinários

A concentração dos antibióticos no meio de cultura foi determinada usando técnicas adaptadas a partir da literatura (Cavenati *et al.*, 2012). Para as etapas de extração, separação, deteção e quantificação de antibióticos, a metodologia usada neste trabalho foi SPE-HPLC-DAD.

2.5.1 Extração em fase sólida

A SPE foi realizada com cartuchos do tipo Oasis HLB (60 mg, 3 cm³) (Waters Corporation Milford, MA, USA). Estes foram primeiramente condicionados com 5 mL de metanol e, em seguida, com 5 mL de água desionizada. As amostras, previamente

acidificadas a pH 2 com HCl a 37%, foram passadas através do cartucho usando um sistema de vácuo (Supelco, Espanha). Posteriormente, procedeu-se à limpeza do cartucho com 5 mL de uma mistura de metanol/água (5:95 v/v) e secou-se sob vácuo durante 30 min. A eluição das amostras foi realizada com 5 mL de metanol/ácido fórmico (94:4 v/v). Procedeu-se à evaporação da amostra, até à secura, por passagem de azoto, a uma temperatura de 35 °C. Por fim, a amostra foi redissolvida em 1 mL de ácido fórmico 1%, para posterior análise por HPLC.

De realçar que apenas as soluções de concentrações 10 e 100 µg/L necessitaram de um passo de pré-concentração, casos em que foram passados volumes de amostra de 200 mL e 50 mL, respetivamente.

2.5.2 Análise dos antibióticos

Para a análise dos antibióticos foi utilizado um HPLC Beckman Coulter (System Gold®), equipado com um detetor de díodos (DAD) (módulo 168) e um injetor automático (módulo 508). A coluna utilizada para a separação dos analitos foi Luna C18 150 mm x 4.6 mm (Phenomenex) tendo a sua temperatura sido mantida a 25 °C.

Foram utilizados dois eluentes, o eluente A (1% de ácido fórmico) e o eluente B (acetoneitrilo). O programa de gradiente usado foi: 100% de eluente A, mantendo-se as condições isocráticas durante 2 min, seguido por 9 min de um gradiente linear de 70% de eluente A. Após 3 min, as condições iniciais (100% de eluente A) eram retomadas, prosseguindo-se o reequilíbrio durante 4 min. O fluxo iniciava-se com 1,0 mL/min, durante 2 min, diminuindo para 0,8 mL/min nos 9 min seguintes e voltando a 1,0 mL/min nos últimos 3 min. O tempo de corrida, que permitiu uma separação eficiente dos antibióticos, foi de 18 min. O volume de injeção foi de 50 µL. O sinal do detetor foi monitorizado para $\lambda=280$ nm. Os eluentes utilizados no HPLC foram filtradas através de filtros de acetato com porosidade 0,45 µm (Whatman®) e desgaseificadas num banho de ultrassons durante 15 min.

Utilizando soluções de concentrações apropriadas de antibióticos (provenientes da solução padrão P₄₀), no intervalo de 0,3 a 9 mg/L, foram obtidas curvas de calibração em fase móvel (1% de ácido fórmico) e em meio de cultura Z₈.

2.6 Controlo do procedimento analítico

Devido a algumas soluções carecerem de pré-concentração e/ou de filtração prévia (caso das soluções com cianobactérias) tornou-se essencial o estudo das percentagens de recuperação dos antibióticos, após realização da filtração e passagem por SPE. Amostras dopadas, em meio de cultura Z₈, foram comparadas através da quantificação de antibióticos por análise direta, após SPE, e após filtração e SPE.

2.7 Testes de toxicidade com *M. aeruginosa*

M. aeruginosa a crescer em meio Z₈ (durante a fase de crescimento logarítmica) foi colocada em placas de 96 poços, com uma densidade ótica final de 0,1. Cada poço foi inoculado com um volume apropriado de antibiótico. O volume final em cada poço foi de 200 µL. Foram realizados testes em que as cianobactérias estiveram expostas a concentrações individuais de antibiótico de 10, 100, 1000 e 10 000 µg/L. Posteriormente, foram realizados testes em que as cianobactérias foram expostas a misturas de TET e ENR, em que se utilizaram as mesmas concentrações usadas individualmente, combinadas duas a duas. Misturam-se concentrações de TET e ENR, uma vez que pertencem aos grupos que são mais frequentemente detetados no meio aquático, sendo a TET representativa das tetraciclinas de estudo.

Para cada concentração testada foram realizadas três réplicas. Controlos consistiram em meio de cultura com as mesmas concentrações de antibióticos e sem cianobactérias, e meio de cultura sem antibióticos e com cianobactérias.

As placas foram incubadas numa câmara de crescimento a 22 ± 2 °C com intensidade de luz de $18 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ (16 h luz /8 h escuridão) (OCDE, 2011).

O crescimento da *M. aeruginosa* foi monitorizado diariamente durante 7 dias, medindo-se a DO a 750 nm, num leitor de microplacas (Biotek).

2.8 Tratamento de dados

A taxa de degradação dos antibióticos no meio de cultura foi calculada usando a equação:

$$\ln \frac{C_t}{C_0} = -Kt$$

em que C_0 é a concentração inicial de antibiótico e C_t é a concentração de antibiótico no tempo t e K uma constante.

A taxa de crescimento específica da cianobactéria *M. aeruginosa* em meio de cultura foi calculada usando a equação:

$$\mu = \left(\frac{\ln x_1 - \ln x_0}{t_1 - t_0} \right)$$

em que x_0 e x_1 são a densidade ótica inicial e final no intervalo de tempo (t).

O cálculo da percentagem de inibição do crescimento celular foi feito de acordo com a equação:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(\mu_c - \mu_t)}{\mu_c} \times 100$$

em que μ_c e μ_t são a taxa de crescimento específica no controlo e em cada concentração de antibiótico testada, respetivamente.

A determinação da inibição do crescimento durante o período de exposição, como sugerido pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE) método de ensaio 201 (OCDE, 2011), permitiu o cálculo da concentração que inibe o crescimento de 50% das células, EC_{50} .

Foi realizado um teste t de Student para verificar se existiam diferenças significativas entre as soluções em meio de cultura expostas à luz e não expostas; entre as soluções em meio de cultura expostas à luz com e sem cianobactérias, e entre as concentrações efetivas medidas ao longo do tempo e as concentrações nominais inoculadas no meio de cultura. Este teste também permitiu comparar as taxas de crescimento das cianobactérias nos controlos e nas diferentes concentrações testadas. Para os cálculos utilizou-se o SPSS 21 *software* (SPSS, USA).

3. Resultados

3.1 Controlo do procedimento analítico

As condições de HPLC usadas permitiram a separação eficiente dos antibióticos de estudo, como é visível na Fig.3.

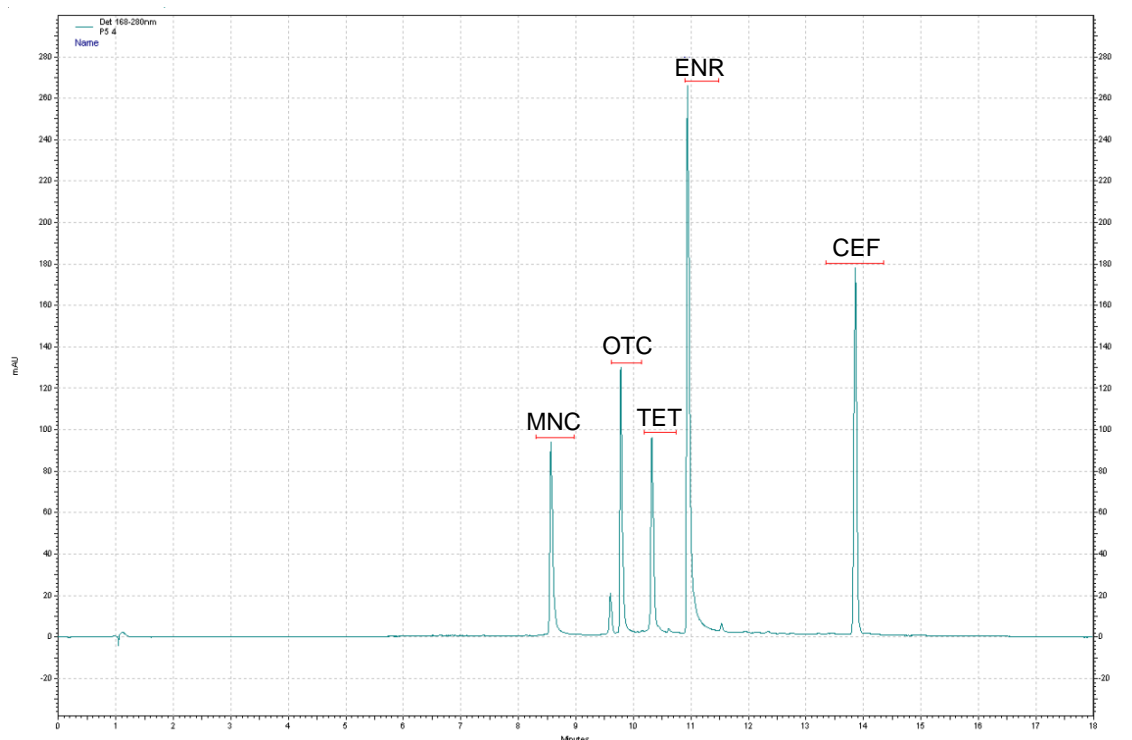


Figura 3. Exemplo de um cromatograma de HPLC-DAD (padrão 5 mg/L, em 1% de ácido fórmico), apresentando os picos e tempos de retenção de minociclina (MNC), 8,5 min; oxitetraciclina (OTC), 9,8 min; tetraciclina (TET), 10,4 min; enrofloxacina (ENR), 11,0 min e ceftiofur (CEF), 13,8 min.

Traçaram-se curvas de calibração em 1% de ácido fórmico e em meio de cultura Z_8 no intervalo de concentrações 0,3 a 9 mg/L, obtendo-se linearidade até uma concentração de 9 mg/L. Estas curvas foram significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) para os antibióticos OTC, TET e ENR (Fig. 5) pelo que se optou por utilizar a curva de calibração em meio de cultura para as soluções que foram analisadas diretamente por HPLC (1000 e 10 000 $\mu\text{g/L}$) e curvas de calibração em fase móvel para as soluções que foram processadas por SPE (10 e 100 $\mu\text{g/L}$) e, conseqüentemente, dissolvidas em 1% de ácido fórmico. Na Fig.4 apresenta-se um exemplo de retas de calibração obtidas para o antibiótico TET.

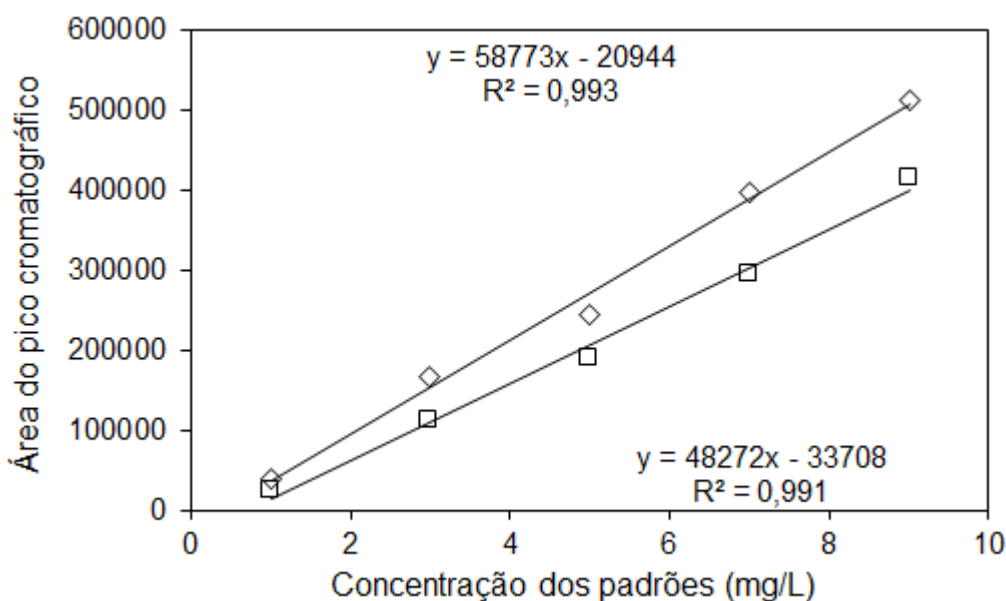


Figura 4. Retas de calibração de tetraciclina em meio de cultura Z₈ (◇) e em fase móvel (□).

Na tabela 3 encontram-se os valores dos limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) obtidos pelas curvas de calibração em fase móvel e em meio de cultura Z₈ (calculados a partir da razão sinal/ruído (S/N) de 3 e 10, respetivamente).

Tabela 3. Limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) de cada antibiótico.

Antibiótico	LOD (µg/L)		LOQ (µg/L)	
	Fase móvel	Meio de cultura Z ₈	Fase móvel	Meio de cultura Z ₈
Minociclina	0,3	69,9	1,1	233
Oxitetraciclina	100	60,6	0,5	202
Tetraciclina	0,3	63,0	1,1	210
Enrofloxacina	0,3	68,7	1,1	229
Ceftiofur	0,36	49,8	1,2	166

Eventuais perdas de antibióticos durante a SPE foram testadas. Utilizaram-se amostras dopadas que foram pré-concentradas e compararam-se os valores das percentagens de recuperação obtidos com os das amostras que foram analisadas diretamente por HPLC. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$), tal como tinha sido observado por Cavenati *et al.* (2012).

Eventuais perdas por filtração também foram testadas. As amostras que foram previamente filtradas globalmente não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre os valores para as soluções filtradas e não filtradas. Na Fig.5 apresenta-se como exemplo a enrofloxacin, para o qual foram observadas uma recuperação de $80 \pm 16\%$ nas amostras filtradas e uma recuperação de $94 \pm 15\%$ nas amostras não filtradas.

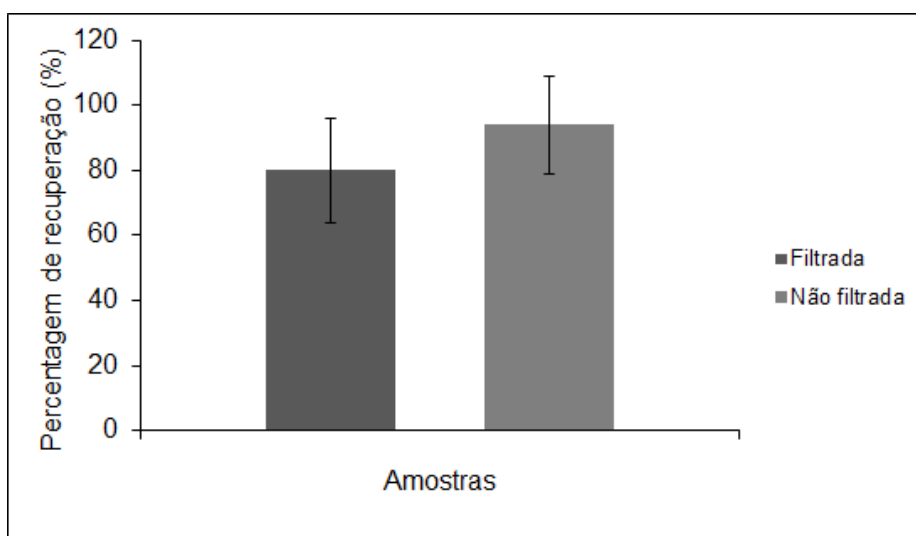


Figura 5. Percentagem de recuperação da enrofloxacin, em soluções filtradas e não filtradas ($100 \mu\text{g/L}$). As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.

3.2 Variação da concentração dos antibióticos em meio de cultura por ação da luz

A variação, com o tempo, da concentração dos antibióticos nas soluções expostas a luz artificial foi comparada com a variação da concentração dos antibióticos quando deixados ao abrigo da luz.

3.2.1 Minociclina

Na Fig.6 apresenta-se a variação da concentração de MNC em meio de cultura, exposto a luz artificial e ao abrigo da luz, ao longo do tempo.

Para a concentração 10 µg/L de MNC não se verificam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre as soluções expostas à luz e ao abrigo da luz. Após 3 h de exposição é atingido um valor inferior ao LOQ (1,1 µg/L), para as amostras expostas à luz.

Para as concentrações 100, 1000 e 10 000 µg/L de MNC não ocorrem diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre as concentrações das soluções expostas à luz e ao abrigo da luz, para nenhum tempo de exposição.

Consequentemente, a variação da concentração do antibiótico no meio de cultura não pode ser exclusivamente atribuída à fotodegradação.

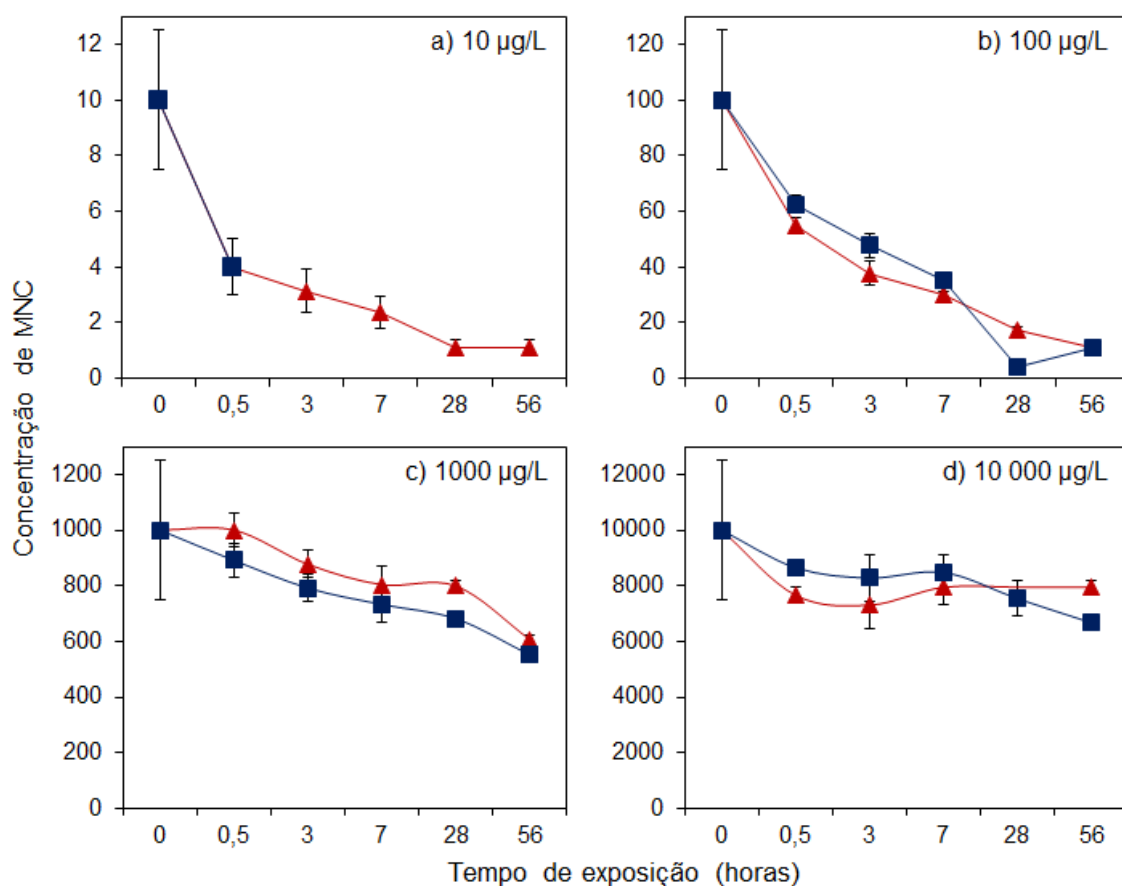


Figura 6. Variação da concentração de minociclina em meio de cultura: ao abrigo da luz (▲) e exposta à luz artificial (■). Meio de cultura com concentração nominal de minociclina: (a) 10 µg/L, (b) 100 µg/L, (c) 1000 µg/L e (d) 10 000 µg/L. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.

Tanto na presença como na ausência de luz ocorre um decréscimo da concentração de MNC ao longo do tempo, exceto para a concentração mais alta testada. Ao fim de 0,5 h, no caso da concentração nominal 10 µg/L a concentração de MNC diminuiu cerca de 60%, e no caso da concentração de 100 µg/L diminuiu cerca de 40%. Para a concentração

de 1000 µg/L observa-se apenas uma tendência de decréscimo ao longo do tempo. No caso da concentração mais alta testada não é observável variação significativa da concentração.

3.2.2 Oxitetraciclina

Na Fig.7 apresenta-se a variação da concentração de OTC em meio de cultura, exposto a luz artificial e ao abrigo da luz, ao longo do tempo.

Por análise dos valores observados para as soluções de concentração nominal 10 µg/L de OTC constata-se que ocorrem diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre as soluções expostas à luz e ao abrigo da luz, depois de 3 h de exposição, sendo menores as concentrações nas soluções expostas à luz. Às 28 h de exposição já havia sido atingido um valor inferior ao LOQ (0,5 µg/L), para as amostras expostas à luz.

Para a concentração nominal de 100 µg/L de OTC, ocorrem diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre as soluções expostas à luz e ao abrigo da luz, após 7 h de exposição, sendo menores as concentrações nas soluções expostas à luz. Às 56 h de exposição já tinha sido atingido um valor inferior ao LOQ (3,4 µg/L), para as amostras expostas à luz.

Para a concentração de 1000 µg/L não se verificam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre as concentrações das soluções expostas à luz e ao abrigo da luz, para nenhum tempo de exposição. Às 56 h de exposição já havia sido atingido um valor inferior ao LOQ (502 µg/L), para as amostras expostas à luz e ao abrigo da luz.

No caso da concentração mais elevada (10 000 µg/L) não se verificam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre as concentrações das soluções expostas à luz e ao abrigo da luz, para nenhum tempo de exposição.

Conseqüentemente, a variação da concentração do antibiótico no meio de cultura não pode ser exclusivamente atribuída à fotodegradação.

Por análise da Fig.7 verifica-se que tanto na presença como na ausência de luz ocorre um decréscimo da concentração de OTC ao longo do tempo, exceto para a concentração nominal de 10 000 µg/L. Para a concentração de 1000 µg/L observa-se apenas uma tendência de decréscimo ao longo do tempo.

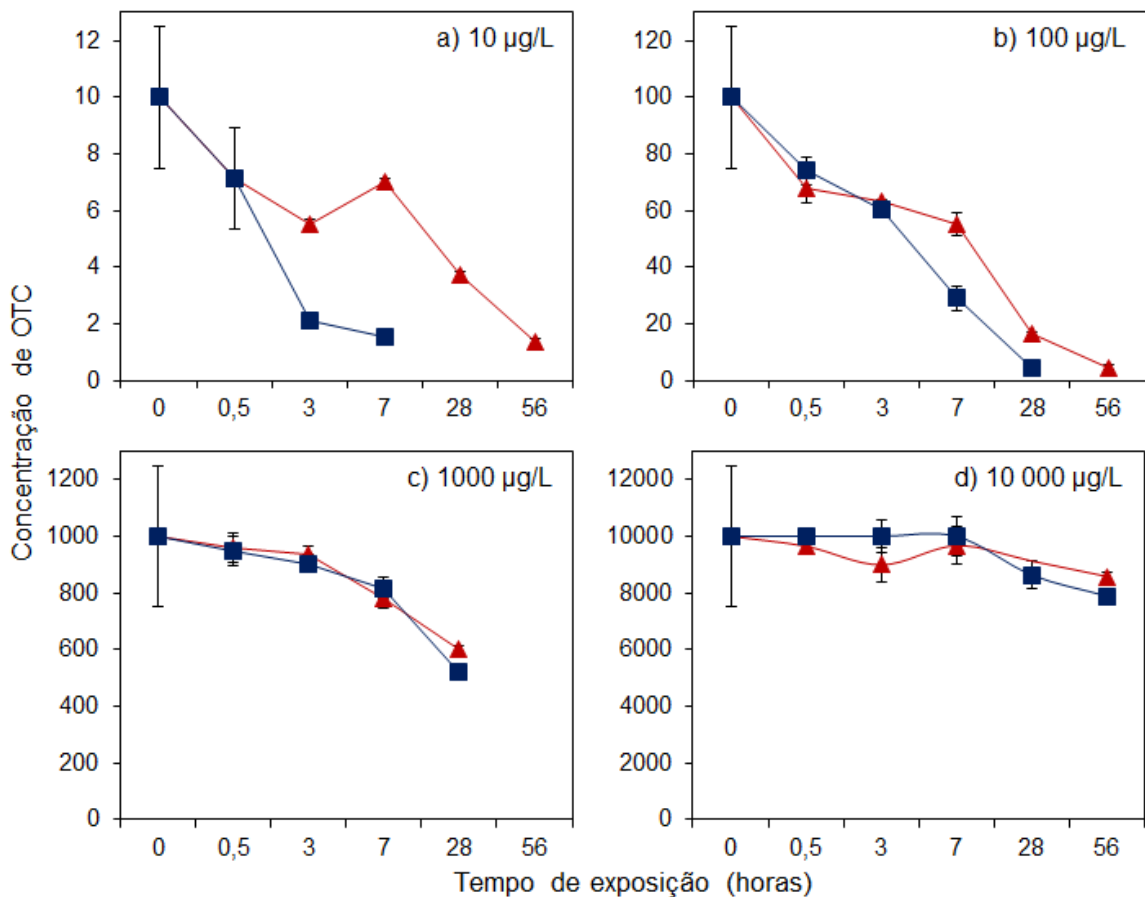


Figura 7. Variação da concentração de oxitetraciclina em meio de cultura: ao abrigo da luz (▲) e exposta à luz artificial (■). Meio de cultura com concentração nominal de oxitetraciclina: (a) 10 µg/L, (b) 100 µg/L, (c) 1000 µg/L e (d) 10 000 µg/L. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.

3.2.3 Tetraciclina

Na Fig.8 apresenta-se a variação da concentração de TET em meio de cultura, exposto a luz artificial e ao abrigo da luz, ao longo do tempo.

Os valores obtidos para a solução de concentração nominal 10 µg/L de TET exposta à luz são significativamente inferiores aos observados para as concentrações na solução ao abrigo da luz, após 3 h de exposição. Após 28 h de exposição já tinha sido atingido um valor inferior ao LOQ (1,1 µg/L), para as amostras expostas à luz.

No caso das soluções de concentração nominal 100 µg/L verificam-se diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre as concentrações das soluções expostas à luz e ao abrigo da luz, ao fim de 28 h de exposição, sendo menores as concentrações nas soluções expostas à luz.

Para as concentrações 1000 e 10 000 $\mu\text{g/L}$ de TET não se verificam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre as concentrações das soluções expostas à luz e ao abrigo da luz, para nenhum tempo de exposição.

Também, neste caso, a variação da concentração do antibiótico no meio de cultura não pode ser unicamente devida à fotodegradação.

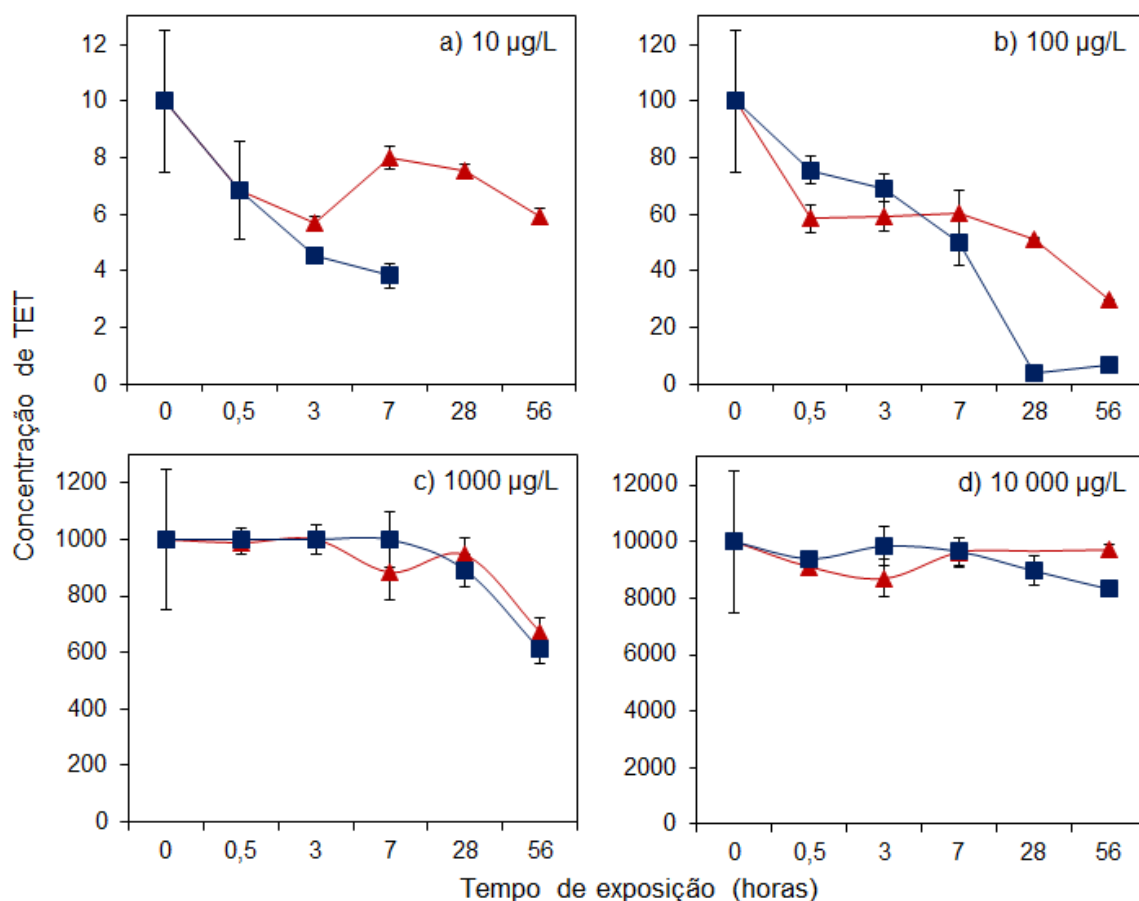


Figura 8. Variação da concentração de tetraciclina em meio de cultura: ao abrigo da luz (\blacktriangle) e exposta à luz artificial (\blacksquare). Meio de cultura com concentração nominal de tetraciclina: (a) 10 $\mu\text{g/L}$, (b) 100 $\mu\text{g/L}$, (c) 1000 $\mu\text{g/L}$ e (d) 10 000 $\mu\text{g/L}$. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.

Para as concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g/L}$ de TET observa-se que as soluções expostas à luz apresentam um decréscimo mais acentuado do que as soluções ao abrigo da luz, particularmente, após 3 e 28 h de exposição.

No caso da concentração nominal de 1000 $\mu\text{g/L}$ observa-se, tanto na presença como na ausência de luz, apenas uma tendência de decréscimo após 56 h. Porém, no caso da concentração mais alta testada não é observável variação de concentração, ao longo tempo.

3.2.4 Enrofloxacin

Na Fig.9 apresenta-se a variação da concentração de ENR em meio de cultura, exposto a luz artificial e ao abrigo da luz, ao longo do tempo.

Os valores obtidos para as soluções de concentração nominal 10 µg/L de ENR exposta à luz são significativamente inferiores aos observados para as concentrações nas soluções ao abrigo da luz, após 3 h de exposição.

Para as concentrações 100, 1000 e 10 000 µg/L de ENR não se verificam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre as concentrações das soluções expostas à luz e ao abrigo da luz, para nenhum tempo de exposição.

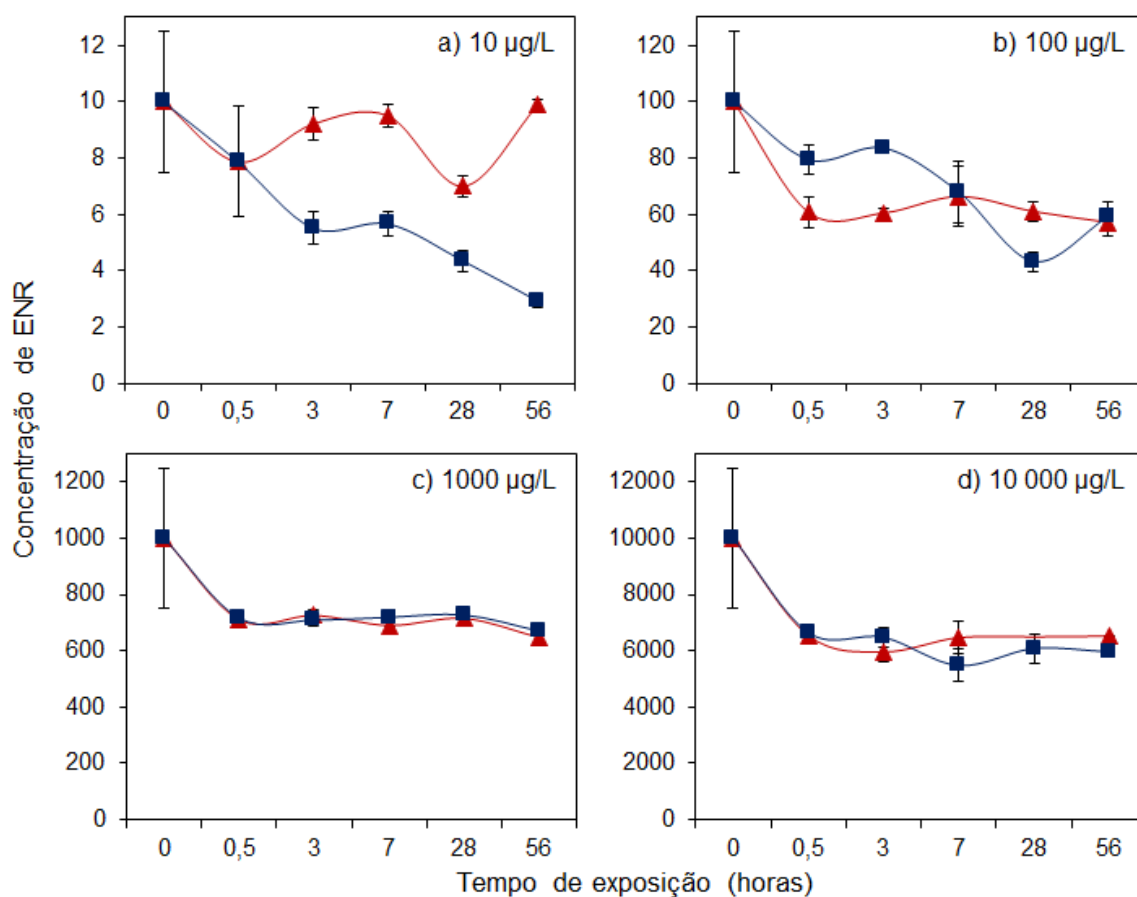


Figura 9. Variação da concentração de enrofloxacin em meio de cultura: ao abrigo da luz (▲) e exposta à luz artificial (■). Meio de cultura com concentração nominal de enrofloxacin: (a) 10 µg/L, (b) 100 µg/L, (c) 1000 µg/L e (d) 10 000 µg/L. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.

Para as soluções de concentração 10 µg/L na presença de luz observa-se um decréscimo da concentração de ENR ao longo do tempo, ao contrário do que é observado para as amostras ao abrigo da luz. Assim, excluindo o caso da concentração mais baixa

testada, não parece ocorrer variação da concentração do antibiótico no meio de cultura por ação da luz.

No caso da concentração de 100 µg/L, tanto na presença como na ausência de luz, observa-se apenas uma tendência de decréscimo da concentração, ao longo do tempo. No entanto, para as soluções de concentração nominal 1000 e 10 000 µg/L não se observam variações de concentração, ao longo do tempo.

3.2.5 Ceftiofur

Na Fig.10 apresenta-se a variação da concentração de CEF em meio de cultura, exposto a luz artificial e ao abrigo da luz, ao longo do tempo.

Para as soluções de concentração nominal 10 µg/L de CEF expostas à luz e ao abrigo da luz, verificam-se diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre os valores obtidos, após 7 h de exposição, sendo menores as concentrações nas soluções expostas à luz. Às 28 h de exposição já havia sido atingido um valor inferior ao LOQ (1,2 µg/L), para as amostras expostas à luz.

No caso das soluções de concentração nominal 100 µg/L expostas à luz e ao abrigo da luz ocorrem diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$), após 28 h de exposição, sendo menores as concentrações nas soluções expostas à luz.

Para as concentrações mais elevadas (1000 e 10 000 µg/L) de CEF não se verificam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre as soluções expostas à luz e ao abrigo da luz, para nenhum tempo de exposição.

Por análise da Fig.10 verifica-se um decréscimo da concentração de CEF para a concentração nominal 10 µg/L na presença de luz, após 7 h de exposição; para as soluções ao abrigo da luz não se verificam variações de concentração, ao longo do tempo. A variação da concentração do antibiótico no meio de cultura, não terá resultado, unicamente da fotodegradação.

No caso da concentração de 100 µg/L, observa-se um decréscimo da concentração ao longo do tempo, tanto para as soluções expostas à luz como ao abrigo da luz. No entanto, para as soluções de concentração nominal 1000 e 10 000 µg/L não se observam variações de concentração, ao longo do tempo.

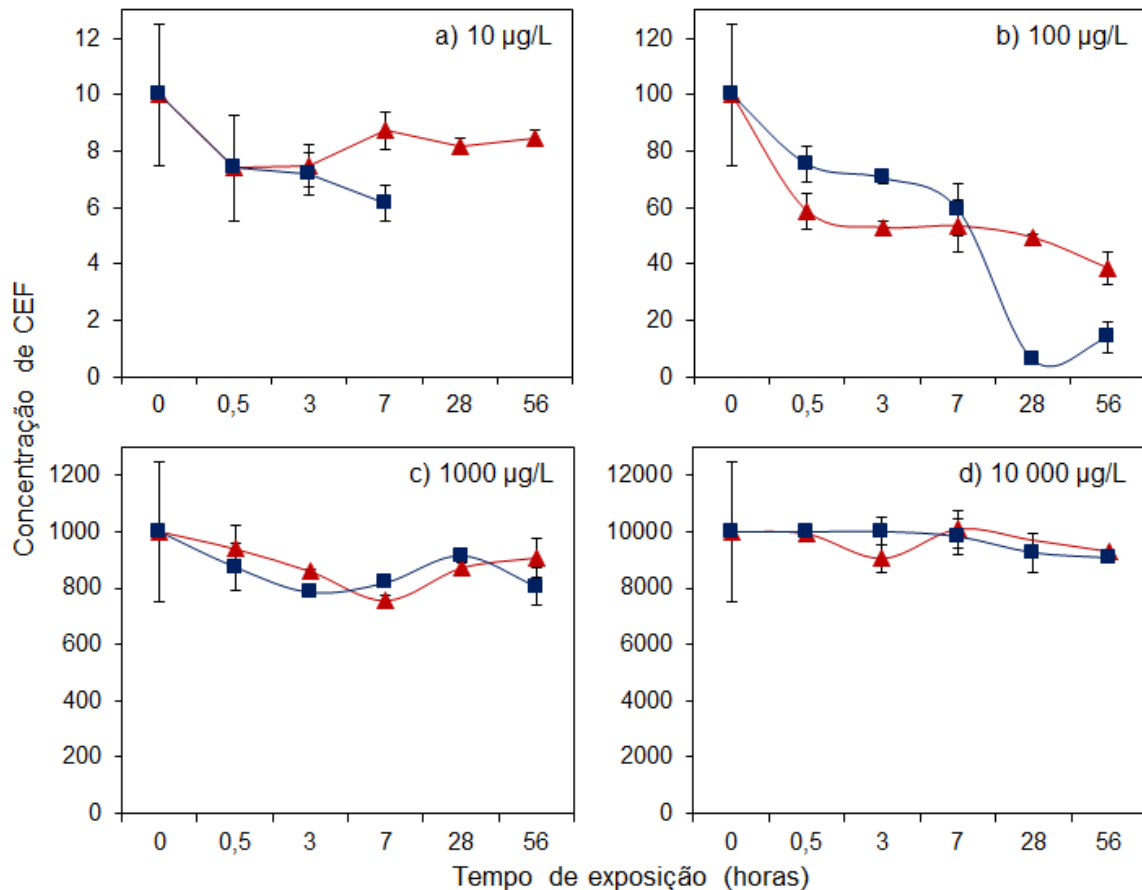


Figura 10. Variação da concentração de ceftiofur em meio de cultura: ao abrigo da luz (▲) e exposta à luz artificial (■). Meio de cultura com concentração nominal de ceftiofur: (a) 10 µg/L, (b) 100 µg/L, (c) 1000 µg/L e (d) 10 000 µg/L. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.

3.3 Variação da concentração dos antibióticos em meio de cultura por ação das cianobactérias

A variação da concentração dos antibióticos nas soluções expostas a luz artificial foi comparada com a variação da concentração dos antibióticos nas soluções expostas a luz artificial e inoculadas com cianobactérias. Para facilitar a comparação apresenta-se, de novo, os resultados da variação da concentração dos antibióticos nas soluções expostas a luz artificial.

As cianobactérias não foram expostas à concentração 10 000 µg/L porque esta concentração de antibiótico foi considerada excessiva.

3.3.1 Minociclina

Na Fig.11 apresenta-se a variação da concentração de MNC em soluções expostas a luz artificial, e em soluções expostas a luz artificial e inoculadas com cianobactérias, ao longo do tempo.

Os valores observados para a concentração nominal 10 µg/L de MNC, na solução exposta a luz artificial e inoculada, não são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) dos observados na solução não inoculada. Às 7 h de exposição das soluções com cianobactérias já tinha sido atingido um valor de concentração inferior ao LOQ (1,1 µg/L).

No caso das soluções de concentrações nominais 100 e 1000 µg/L expostas a luz artificial e inoculadas, os valores observados ao longo do tempo são significativamente mais baixos do que nas soluções não inoculadas. Para a solução de concentração 100 µg/L atingem-se valores de concentração inferiores ao LOQ (4,3 µg/L), às 7 h de exposição nas soluções com cianobactérias.

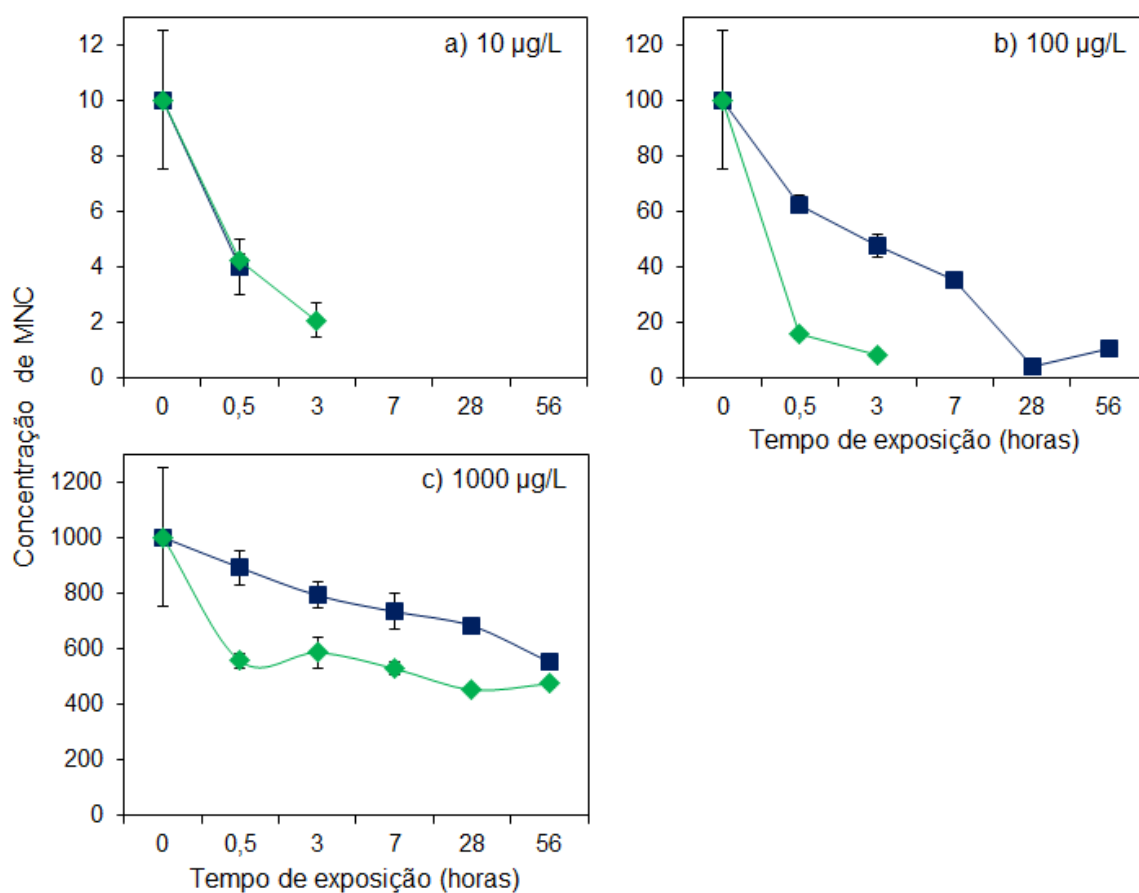


Figura 11. Variação da concentração de minociclina em meio de cultura exposta a luz artificial: meio inoculado com *M. aeruginosa* (♦) e meio não inoculado (■). Meio de cultura com concentração nominal de minociclina: (a) 10 µg/L, (b) 100 µg/L e (c) 1000 µg/L. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.

3.3.2 Oxitetraciclina

Na Fig.12 apresenta-se a variação da concentração de OTC em soluções expostas a luz artificial, e em soluções expostas a luz artificial e inoculadas com cianobactérias, ao longo do tempo.

Os valores obtidos para a solução de concentração nominal 10 µg/L de OTC exposta à luz artificial e inoculada, não são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) dos valores observados para a solução não inoculada.

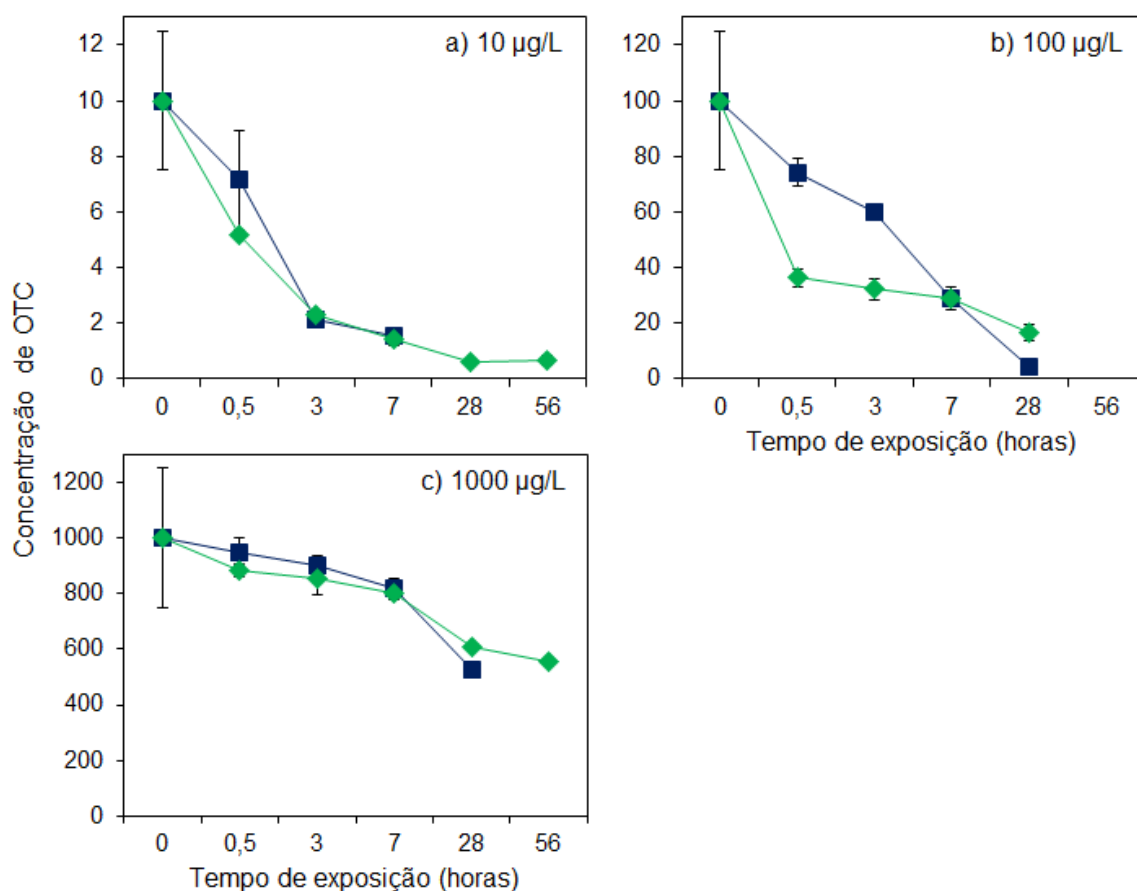


Figura 12. Variação da concentração de oxitetraciclina em meio de cultura exposta a luz artificial: meio inoculado com *M. aeruginosa* (♦) e meio não inoculado (■). Meio de cultura com concentração nominal de oxitetraciclina: (a) 10 µg/L, (b) 100 µg/L e (c) 1000 µg/L. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.

Para a concentração nominal 100 µg/L exposta à luz e inoculada, as concentrações são significativamente menores do que as obtidas na solução não inoculada, mas somente até 3 h de exposição. Às 56 h de exposição nas soluções com cianobactérias já havia sido atingido um valor de concentração inferior ao LOQ (3,4 µg/L).

Para a concentração nominal 1000 µg/L não se verificam diferenças, tal como no caso da concentração 10 µg/L de OTC, pelo que não é observável efeito da ação das cianobactérias.

3.3.3 Tetraciclina

Na Fig.13 apresenta-se a variação da concentração de TET em soluções expostas a luz artificial, e em soluções expostas a luz artificial e inoculadas com cianobactérias, ao longo do tempo.

Os valores observados para a concentração nominal 10 µg/L de TET, na solução exposta à luz e inoculada, não foram estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) dos observados na solução não inoculada, pelo que não é observável efeito da ação das cianobactérias. Às 28 h de exposição já havia sido atingido um valor concentração inferior ao LOQ (1,1 µg/L).

Para a solução de concentração nominal 100 µg/L de TET exposta à luz e inoculada, os valores obtidos são significativamente menores do que os observados para as concentrações na solução não inoculada, mas somente até 3 h de exposição.

No caso da solução de concentração nominal 1000 µg/L de TET exposta à luz e inoculada, os valores obtidos são significativamente mais baixos que os valores observados na solução não inoculada, ao longo do tempo, pelo que é observável efeito da ação das cianobactérias.

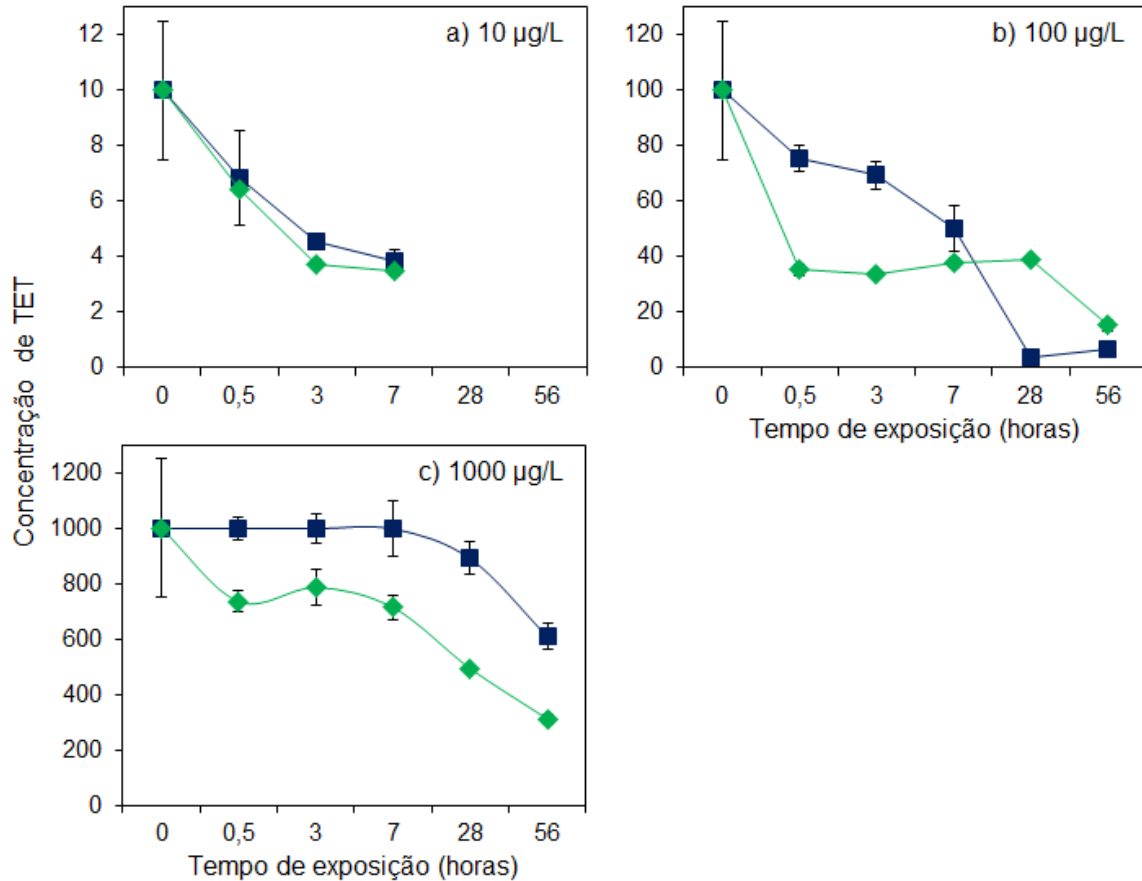


Figura 13. Variação da concentração de tetraciclina em meio de cultura exposta a luz artificial: meio inoculado com *M. aeruginosa* (◆) e meio não inoculado (■). Meio de cultura com concentração nominal de tetraciclina: (a) 10 µg/L, (b) 100 µg/L e (c) 1000 µg/L. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.

3.3.4 Enrofloxacina

Na Fig.14 apresenta-se a variação da concentração de ENR em soluções expostas a luz artificial, e em soluções expostas a luz artificial e inoculadas com cianobactérias, ao longo do tempo.

Os valores obtidos para a concentração nominal 10 µg/L de ENR exposta à luz e inoculada, não são significativamente diferentes dos valores das concentrações da solução não inoculada, pelo que não é observável efeito da ação das cianobactérias.

Para a solução de concentração nominal 100 µg/L exposta à luz e inoculada, os valores obtidos são significativamente menores do que os observados para as concentrações na solução não inoculada, mas somente até 3 h de exposição.

No caso dos valores observados para a solução de concentração nominal 1000 µg/L de ENR exposta à luz e inoculada, constata-se que são significativamente mais baixos que os valores das concentrações na solução não inoculada, ao longo do tempo, pelo que é observável efeito da presença das cianobactérias.

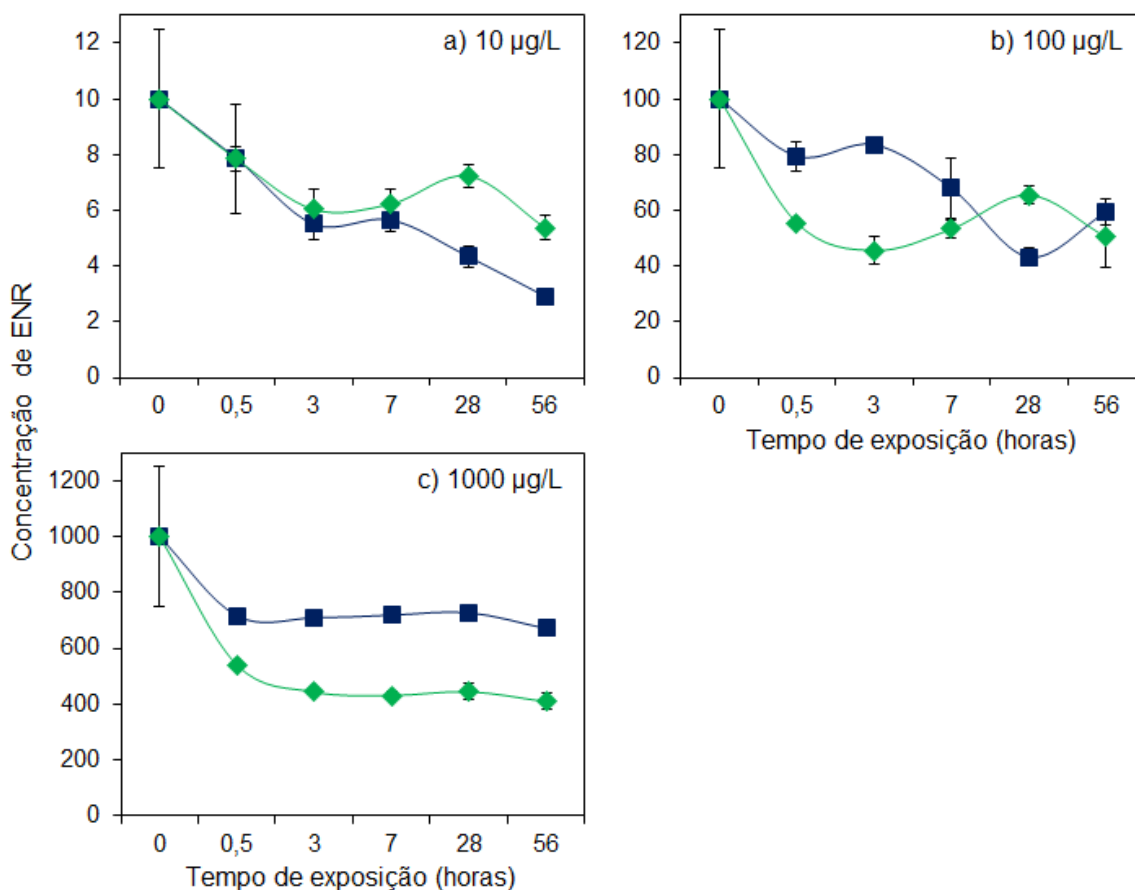


Figura 14. Variação da concentração de enrofloxacin em meio de cultura exposta a luz artificial: meio inoculado com *M. aeruginosa* (♦) e meio não inoculado (■). Meio de cultura com concentração nominal de enrofloxacin: (a) 10 µg/L, (b) 100 µg/L e (c) 1000 µg/L. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.

3.3.5 Ceftiofur

Na Fig.15 apresenta-se a variação da concentração de CEF em soluções expostas a luz artificial, e em soluções expostas a luz artificial e inoculadas com cianobactérias, ao longo do tempo.

Os valores observados nas soluções de concentração nominal 10 µg/L de CEF expostas à luz e inoculadas, não são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) dos observados na solução não inoculada.

No caso da concentração nominal 100 µg/L exposta à luz e inoculada, os valores obtidos são significativamente menores do que os observados para as concentrações na solução não inoculada, mas somente até 3 h de exposição.

Para a concentração nominal de 1000 µg/L, não é observável o efeito da ação das cianobactérias.

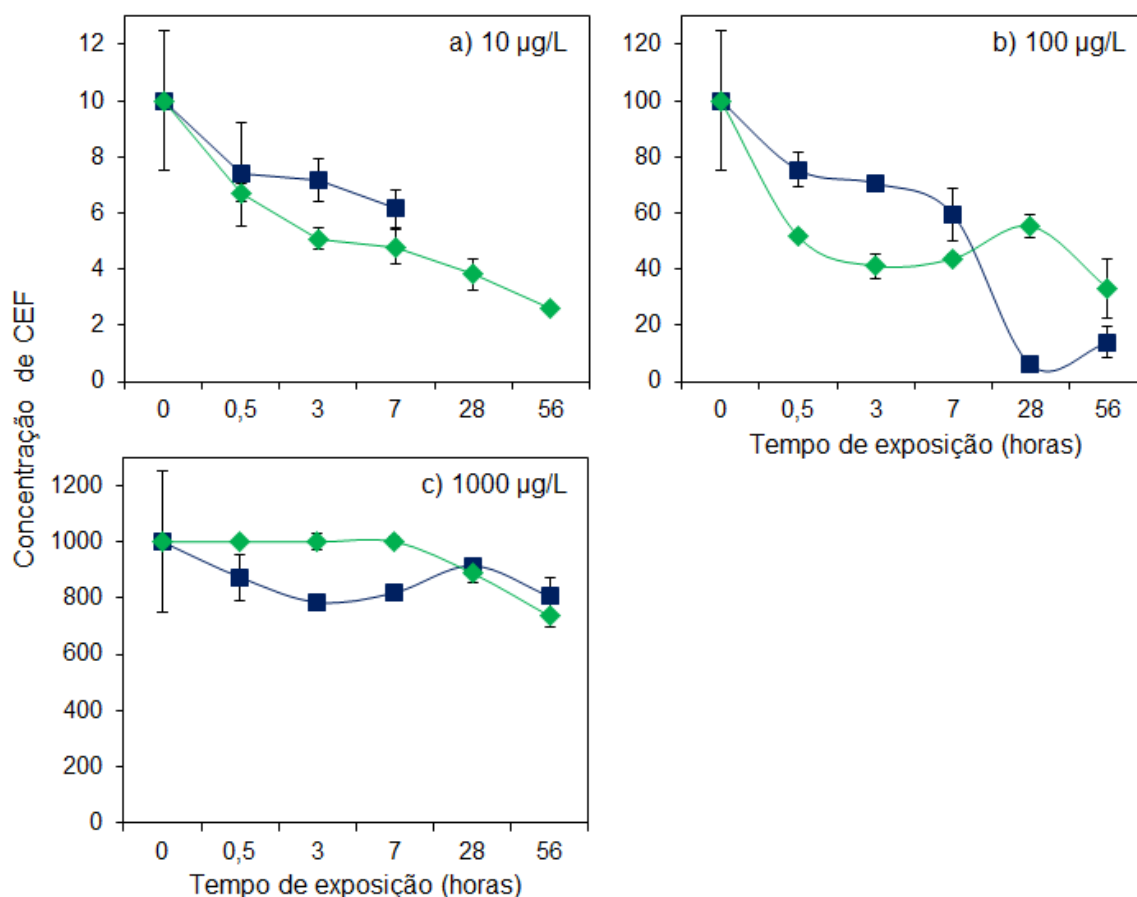


Figura 15. Variação da concentração de ceftiofur em meio de cultura exposta a luz artificial: meio inoculado com *M. aeruginosa* (♦) e meio não inoculado (■). Meio de cultura com concentração nominal de ceftiofur: (a) 10 µg/L, (b) 100 µg/L e (c) 1000 µg/L. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.

3.4 Cinética da variação da concentração dos antibióticos em meio de cultura

Foi averiguado o tipo de relação entre a variação da concentração dos antibióticos em meio de cultura e o tempo de exposição à luz. Nas Fig.16-20 apresentam-se os resultados para os diferentes antibióticos.

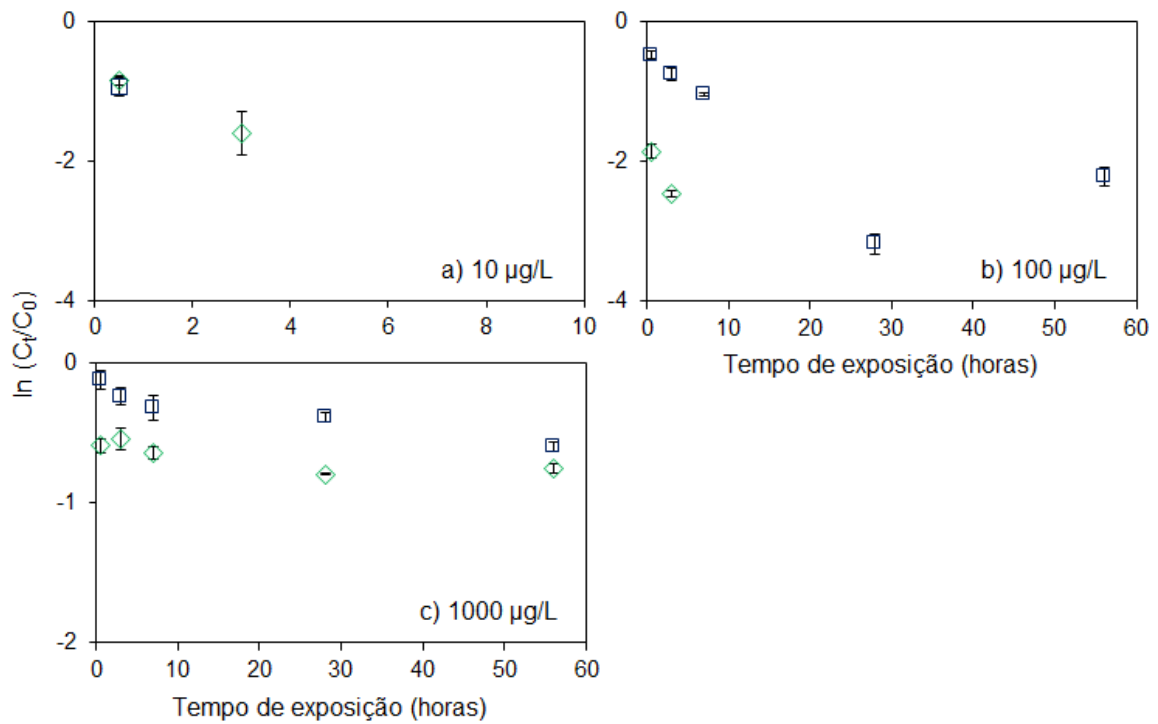


Figura 16. Representação de $\ln(C_t/C_0)$ em função do tempo para a minociclina no meio de cultura: meio inoculado com *M. aeruginosa* (\diamond) e meio não inoculado (\square). Concentração nominal, C_0 , de minociclina: (a) 10 $\mu\text{g/L}$, (b) 100 $\mu\text{g/L}$ e (c) 1000 $\mu\text{g/L}$. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.

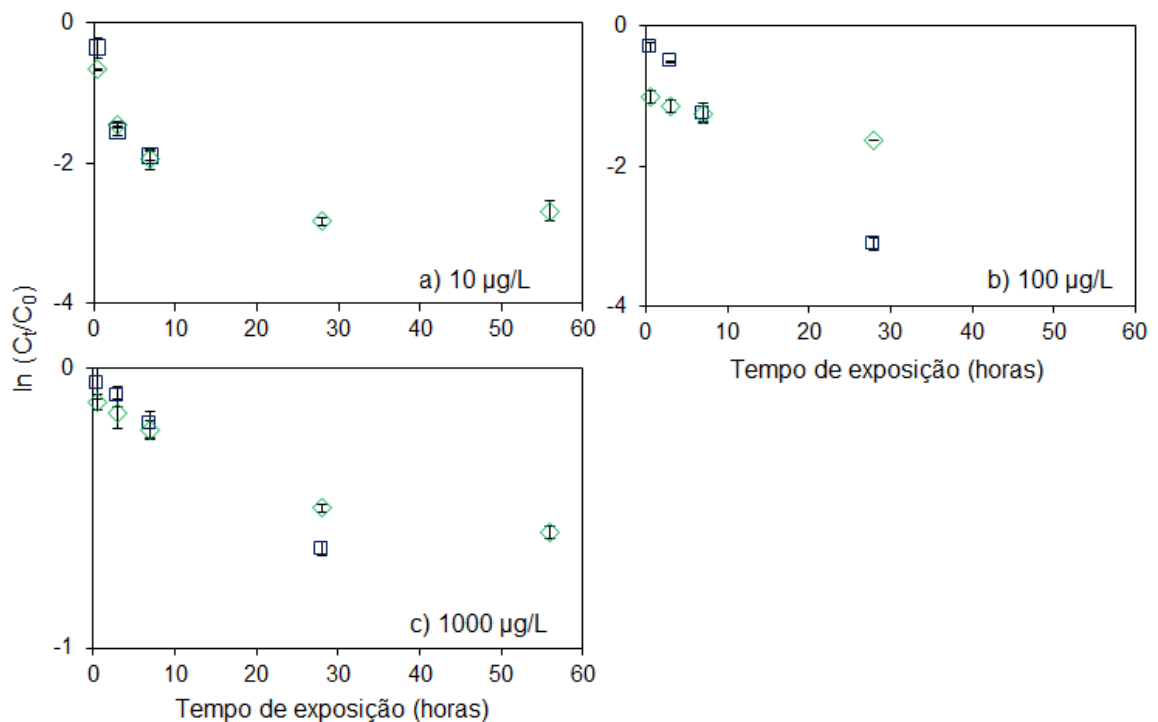


Figura 17. Representação de $\ln(C_t/C_0)$ em função do tempo para a oxitetraciclina no meio de cultura: meio inoculado com *M. aeruginosa* (\diamond) e meio não inoculado (\square). Concentração nominal, C_0 , de oxitetraciclina: (a) 10 $\mu\text{g/L}$, (b) 100 $\mu\text{g/L}$ e (c) 1000 $\mu\text{g/L}$. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.

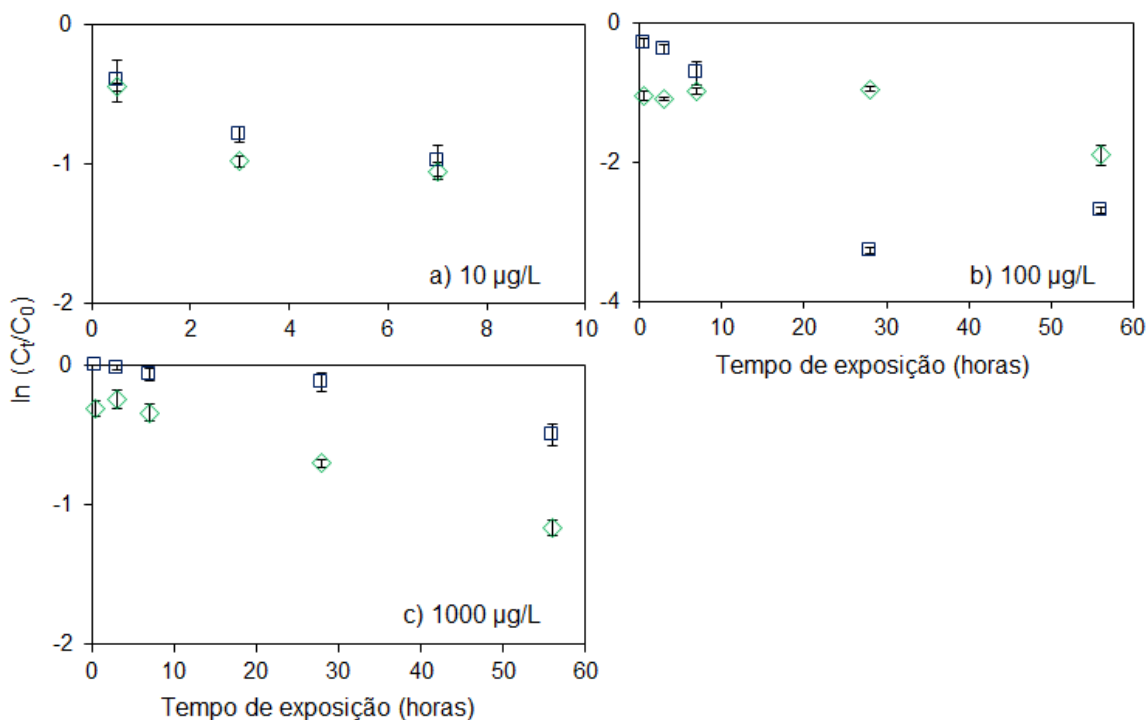


Figura 18. Representação de $\ln(C_t/C_0)$ em função do tempo para a tetraciclina no meio de cultura: meio inoculado com *M. aeruginosa* (◇) e meio não inoculado (□). Concentração nominal, C_0 , de tetraciclina: (a) 10 µg/L, (b) 100 µg/L e (c) 1000 µg/L. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.

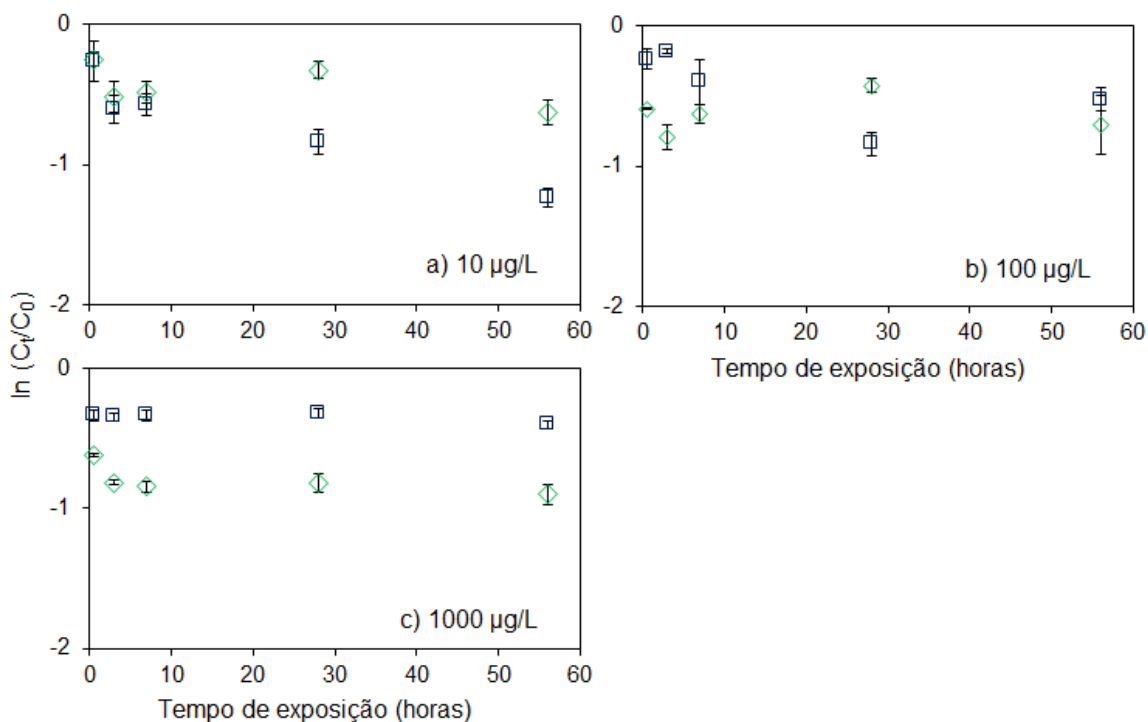


Figura 19. Representação de $\ln(C_t/C_0)$ em função do tempo para a enrofloxacina no meio de cultura: meio inoculado com *M. aeruginosa* (◇) e meio não inoculado (□). Concentração nominal, C_0 , de enrofloxacina: (a) 10 µg/L, (b) 100 µg/L e (c) 1000 µg/L. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.

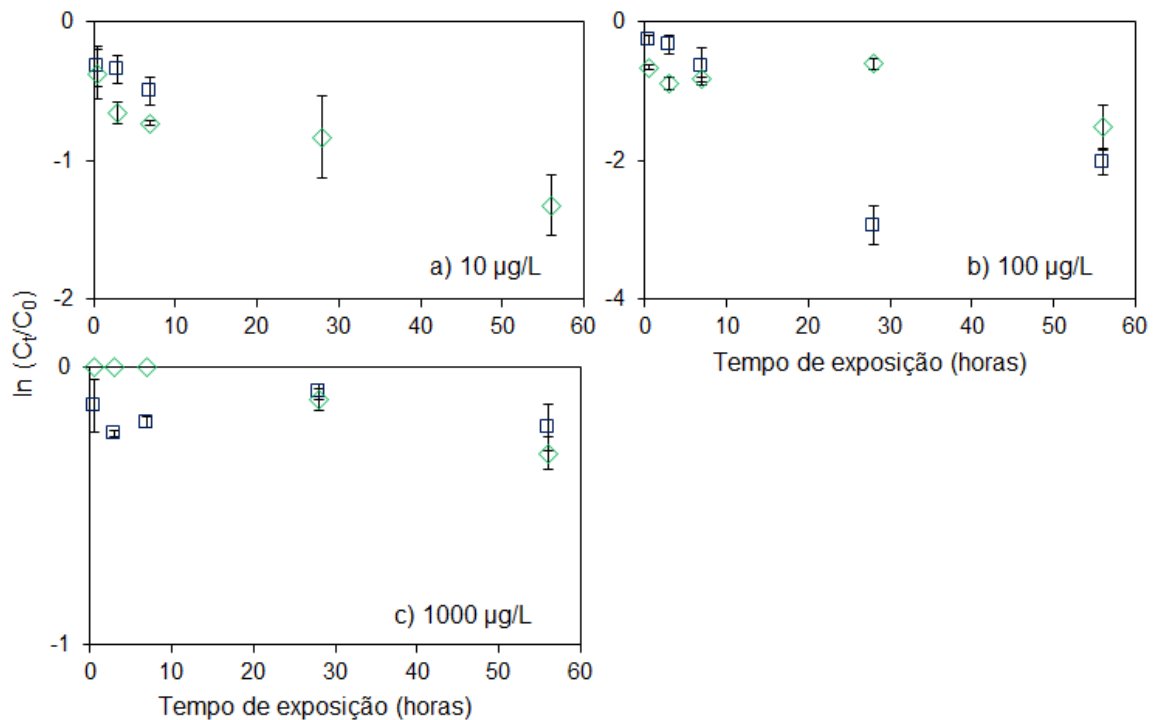


Figura 20. Representação de $\ln(C_t/C_0)$ em função do tempo para o ceftiofur no meio de cultura: meio inoculado com *M. aeruginosa* (\diamond) e meio não inoculado (\square). Concentração nominal, C_0 , de ceftiofur: (a) 10 µg/L, (b) 100 µg/L e (c) 1000 µg/L. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.

Por análise das Fig.16-20 é possível constatar que a variação das concentrações dos antibióticos veterinários com o tempo, não segue uma cinética de 1ª ordem, uma vez que a diminuição da concentração dos antibióticos não foi linear ao longo do tempo.

3.5 Efeito dos antibióticos no crescimento de *M. aeruginosa*

Para determinar o efeito que os antibióticos podem exercer sobre cianobactérias, foi monitorizado o crescimento de *M. aeruginosa*. Foram realizadas medições de densidade óptica e de densidade celular (DC). A comparação permitiu concluir que existe uma correlação satisfatória (Fig.21), pelo que a avaliação do crescimento de *M. aeruginosa* pode ser realizada apenas pela monitorização da DO a 750 nm.

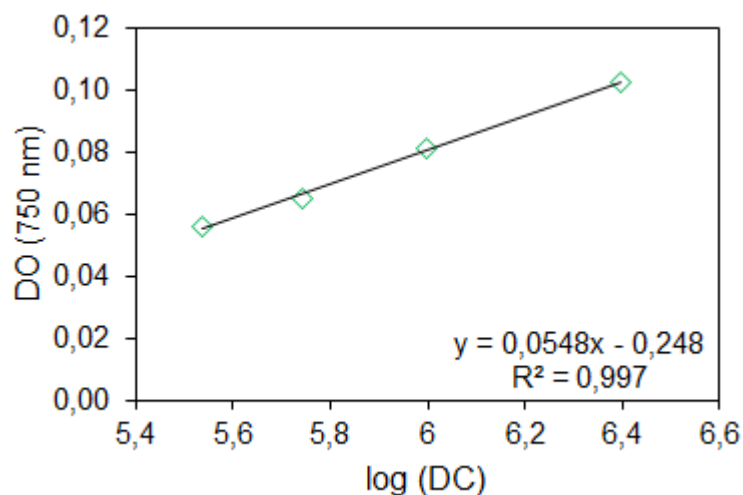


Figura 21. Correlação entre a densidade ótica e a densidade celular. Meio de cultura inoculado com *M. aeruginosa* (◇).

Os efeitos resultantes da exposição de *M. aeruginosa*, a antibióticos individuais, foram avaliados em ensaios realizados em placas de 96 poços, em que se testaram concentrações nominais de 10, 100, 1000 e 10 000 µg/L de MNC, OTC, TET, ENR e CEF.

A DO foi medida inicialmente e após 7 dias de exposição aos antibióticos, tal como descrito no protocolo da OCDE (2011). Através dos dados obtidos foi possível o cálculo da taxa de crescimento, percentagem de inibição do crescimento da cianobactéria e os valores de toxicidade dos antibióticos para a espécie em estudo.

Pela análise da Fig.22 e da tabela 4 constata-se que todos os antibióticos estudados são tóxicos para a *M. aeruginosa*, sendo a ordem de toxicidade determinada: OTC>MNC>TET>ENR>CEF.

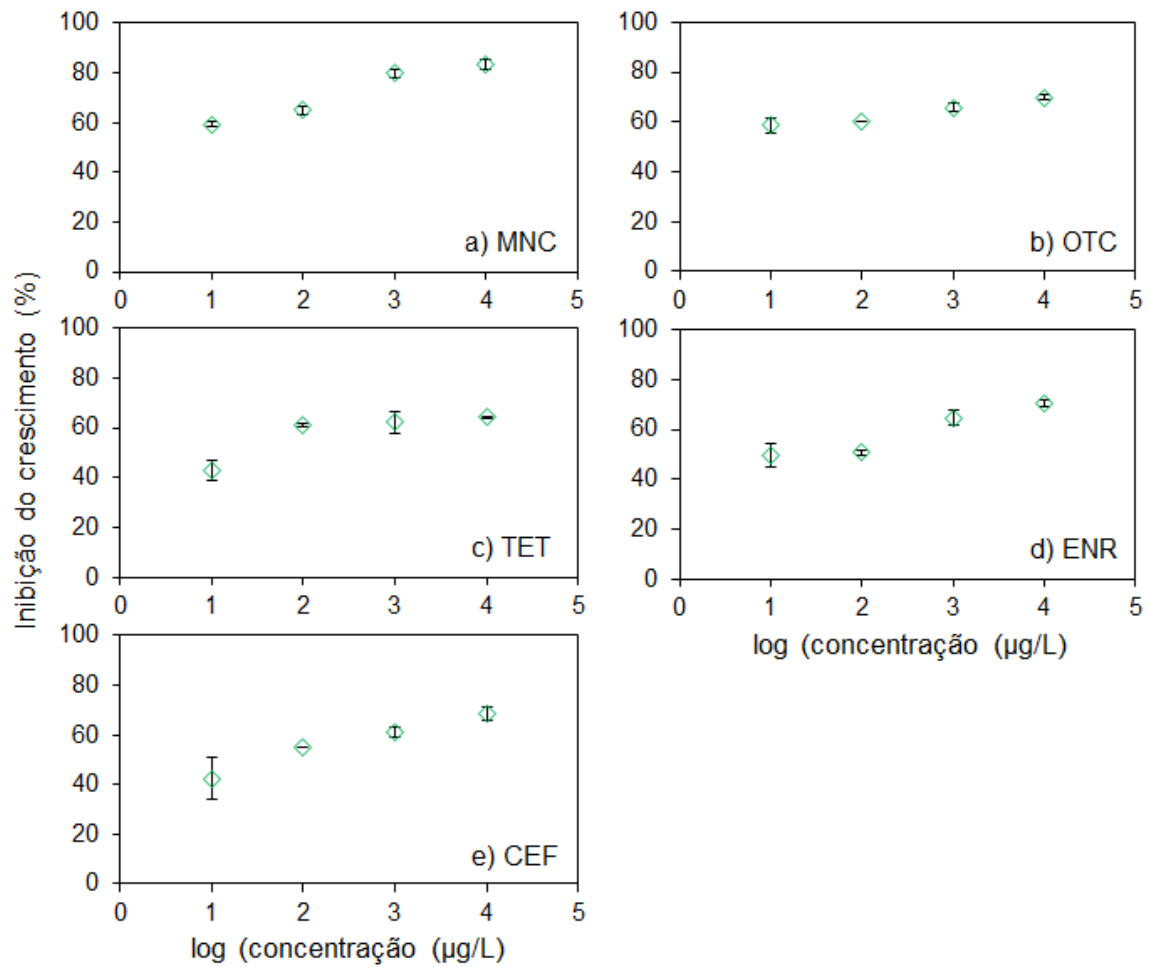


Figura 22. Curva de dose-efeito do crescimento de *M. aeruginosa* após 168 h de exposição a antibióticos. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.

Tabela 4. EC₅₀ (µg/L) dos antibióticos veterinários para *M. aeruginosa*.

Antibióticos	EC ₅₀
MNC	0,949
OTC	0,118
TET	21,0
ENR	22,1
CEF	49,3

3.6 Efeito de misturas de antibióticos no crescimento de *M. aeruginosa*

O efeito de misturas de antibióticos no crescimento de *M. aeruginosa* foram avaliados em ensaios realizados em placas de 96 poços, dopadas com misturas de tetraciclina e de enrofloxacina.

A DO foi medida após 0 horas e 7 dias de exposição e através desses valores foi possível o cálculo da taxa de crescimento e da percentagem de inibição do crescimento da cianobactéria.

Pela análise da Fig.23 constata-se que a percentagem de inibição de crescimento de *M. aeruginosa* na presença apenas de TET foi superior à percentagem de inibição de crescimento na presença das misturas de TET e ENR testadas.

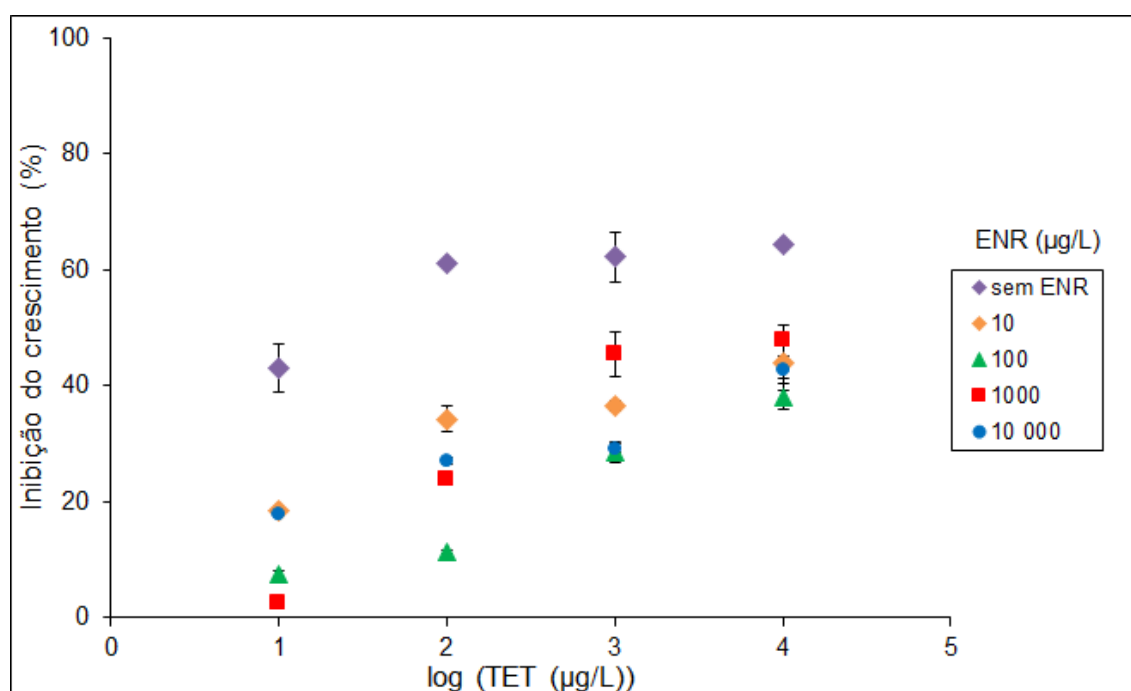


Figura 23. Inibição do crescimento de *M. aeruginosa* após exposição a diferentes misturas de tetraciclina e enrofloxacina. As barras de erro representam os desvios padrão de três réplicas.

4.1 Variação da concentração dos antibióticos veterinários em meio de cultura

Neste trabalho foi possível verificar a ocorrência da diminuição das concentrações dos antibióticos em meio de cultura quando expostos a luz artificial e ao abrigo da luz. Verificou-se, para as concentrações de 10 e 100 µg/L, um decréscimo das concentrações mais acentuado nas primeiras horas de exposição, seguindo-se um período em que a diminuição das concentrações não foi tão significativa. A diminuição da concentração dos antibióticos não foi linear ao longo do tempo. Para as concentrações de 1000 e 10 000 µg/L o decréscimo das concentrações, quando ocorreu, foi similar ao longo do tempo.

Em vários estudos com antibióticos tem sido relatada a ocorrência de fotodegradação. Andreozzi *et al.* (2003) verificou que a ofloxacina se fotodegrada após exposição a luz solar natural; Ge *et al.* (2010) e Babić *et al.* (2013) constataram que a enrofloxacinina se fotodegrada após exposição a um simulador de luz solar, bem como após exposição a luz solar natural, como verificou Sturini *et al.* (2010). Gómez-Pacheco *et al.* (2012) concluiu que a tetraciclina é fotodegrada após exposição a luz ultravioleta.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que ocorre fotodegradação nas concentrações mais baixas testadas, nomeadamente nas concentrações de 10 e 100 µg/L. Para as soluções de concentração 10 µg/L foi observável a fotodegradação dos antibióticos testados, exceto da MNC. Para a concentração 100 µg/L apenas a OTC, TET e CEF se degradaram após exposição à luz. Para as concentrações de 1000 e 10 000 µg/L não foi observável efeito de fotodegradação, para nenhum dos antibióticos testados. Isto poderá indicar que estes antibióticos não são tão suscetíveis à ação da luz em concentrações mais elevadas. Para que ocorra fotodegradação pressupõe-se que parte da luz é absorvida pelas moléculas de antibióticos, no entanto, os produtos resultantes da fotodegradação podem também absorver luz, competindo com as moléculas pelo fluxo de irradiação (Jiao *et al.*, 2008; Gómez-Pacheco *et al.*, 2012), resultando na diminuição da degradação para concentrações mais altas de antibióticos.

No entanto, os resultados obtidos mostraram também que a degradação dos antibióticos veterinários em estudo não pode ser explicada apenas pela influência da luz. Uma possível explicação para o decréscimo das concentrações dos antibióticos pode ser a ocorrência de hidrólise (Babić *et al.*, 2013) ou modificações químicas tais como, formação

de complexos dos antibióticos com íons metálicos (Chen *et al.*, 2011) que entram na composição do meio de cultura Z₈.

Muitos antibióticos são moléculas anfotéricas que possuem vários grupos funcionais ionizáveis, em que a forma predominante é a zwitteriônica para valores de pH considerados naturais no ambiente (pH 6-7) (Sarmah *et al.*, 2006). As tetraciclinas são moléculas anfotéricas. Na forma zwitteriônica tem tendência para formar agregados em soluções aquosas, sendo esta formação potenciada pela presença de íons metálicos divalentes (Sassman e Lee, 2005). Pouliquen *et al.* (2007) reportou que a hidrólise da OTC, a pH neutro é maior do que em soluções ácidas ou alcalinas.

As fluoroquinolonas a pH neutro apresentam-se na forma zwitteriônica, podendo assim formar quelatos com íons metálicos polivalentes, tais como, Ca²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Al³⁺ e Bi³⁺ (El Sayed e Chelette, 2014). Babić *et al.* (2013) constataram que as fluoroquinolonas são resistentes à hidrólise. Por outro lado, Jiang *et al.* (2010) referem que a hidrólise é provavelmente a principal via de degradação das cefalosporinas, isto porque possuem ligações amida instáveis e reativas, que são suscetíveis de hidrólise. A hidrólise das cefalosporinas é tanto maior quanto mais elevado for o pH do meio (Jiang *et al.*, 2010).

Nas condições do presente estudo, pH do meio Z₈ entre 6 e 7, pode admitir-se que as tetraciclinas e a enrofloxacin se encontravam na forma zwitteriônica, nas experiências realizadas. Pelo que o decréscimo da concentração nas soluções expostas à luz e ao abrigo da luz, ao longo do tempo, poderá ser resultado da ação da hidrólise e da complexação com íons metálicos. Relativamente ao ceftiofur uma explicação para o decréscimo verificado poderá ser a ocorrência de hidrólise. Assim, torna-se importante o estudo das vias hidrolíticas e das interações dos constituintes do meio, aquando da realização de testes de fotodegradação de antibióticos.

Com este estudo também foi possível determinar as variações ocorridas nas concentrações dos antibióticos, em meio de cultura exposto a luz artificial e inoculado com *M. aeruginosa*. Neste caso, para além da ação da luz, a acumulação interna ou a adsorção dos antibióticos às cianobactérias pode também contribuir para a diminuição da concentração dos antibióticos ao longo do tempo. Para soluções de concentração 10 µg/L não se verificou o efeito da presença das cianobactérias para nenhum dos antibióticos testados. No caso da concentração 100 µg/L, os antibióticos testados sofreram maior diminuição da concentração em meio inoculado com cianobactérias, mas somente até 3 h de exposição, exceto MNC. Relativamente, à concentração 1000 µg/L verificou-se uma maior diminuição da concentração do antibiótico no meio de cultura para MNC, TET e ENR.

A matriz do meio pode influenciar o processo de degradação dos antibióticos, devido às interações que se podem estabelecer. A matéria orgânica pode exercer influência sobre as variações de concentração dos antibióticos, ao longo do tempo. Os ácidos húmicos, a fração hidrofóbica da matéria orgânica natural, podem segundo Andreozzi *et al.* (2003) favorecer a degradação de antibióticos, tais como a ofloxacina. Belden *et al.* (2007) constatou que a ciprofloxacina adsorve rapidamente a finas partículas de matéria orgânica do meio. Por outro lado, Li *et al.* (2011) verificou que a presença de microrganismos em amostras de águas de superfície potencia a degradação de ceftiofur.

Uma vez que as concentrações mais baixas testadas neste estudo fazem parte da gama de concentrações detetadas em meio ambiente (ng/L-µg/L) (Brain *et al.*, 2005), os resultados obtidos neste trabalho indicam que a fotodegradação deve ser tida em conta aquando da quantificação destes compostos em meio aquático, particularmente para avaliação da toxicidade para organismos.

4.2 Toxicidade dos antibióticos veterinários para cianobactérias

A exposição de *M. aeruginosa* a antibióticos veterinários resultou em diminuição do crescimento celular. Na experiência em que foram testados os antibióticos isoladamente, numa gama de concentrações de 10-10 000 µg/L, as percentagens de inibição do crescimento celular variaram entre 64 e 83%. Neste estudo podemos constatar que os valores de EC₅₀ dos antibióticos analisados para a *M. aeruginosa*, para uma exposição de 7 dias, foram menores que os valores que se encontram reportados na literatura.

O valor calculado de EC₅₀ de MNC foi 0,949 µg/L, mais baixo do que o reportado por Stoichev *et al.* (2010) de 454 µg/L, obtido após 15 dias de exposição a concentrações de MNC numa gama de 20 a 1000 µg/L. O EC₅₀ de OTC obtido neste estudo foi de 0,118 µg/L, valor inferior ao obtido por Ando *et al.* (2007) de 230 µg/L numa exposição de 6 dias a concentrações de OTC numa gama de 40 a 360 µg/L, e ao obtido por Holten-Lützhøft *et al.* (1999) de 207 µg/L. No caso da TET, o valor de EC₅₀ foi de 21,0 µg/L, que é relativamente mais baixo que 90 µg/L, obtido por Halling-Sørensen (2000) para uma exposição de 7 dias numa gama de concentrações de 3 a 10 000 µg/L de TET. Relativamente, ao antibiótico ENR o valor de EC₅₀ obtido foi de 22,1 µg/L, que é mais baixo que o determinado por Robinson *et al.* (2005) de 49 µg/L, obtido após 5 dias de exposição a concentrações de ENR numa gama de 2 a 1000 µg/L. O valor calculado de EC₅₀ de CEF foi de 49,3 µg/L. É de salientar que ainda não se encontram reportados na literatura valores de EC₅₀ de CEF para a *M. aeruginosa*.

Desta forma, pode estabelecer-se a ordem de toxicidade dos antibióticos, do mais tóxico para o menos tóxico, para a espécie *M. aeruginosa*: OTC, MNC, TET, ENR e CEF. A análise dos resultados referentes à toxicidade dos antibióticos em meio de cultura permitiu concluir que as tetraciclinas são o grupo de antibióticos mais tóxicos para a espécie de estudo.

As exposições combinadas de antibióticos, nomeadamente de tetraciclina e de enrofloxacina, foram menos tóxicas para a *M. aeruginosa*, do que as exposições individuais de TET, tal como verificado em outros estudos.

Yang *et al.* (2008) investigou os efeitos combinados de antibióticos, para a espécie *Pseudokirckneriella subcapitata*, e observou efeitos aditivos em misturas binárias de sulfonamidas, efeitos sinérgicos em misturas binárias de macrólidos, e potenciais efeitos antagonistas entre diferentes classes de antibióticos. Outro estudo demonstrou que misturas de espiramicina e amoxicilina eram antagonistas (Liu *et al.*, 2014), concluindo que as interações que se estabelecem entre os antibióticos dependem não só da classe a que estes pertencem, mas também da proporção de cada um na mistura estudada.

Os resultados obtidos com este trabalho relativamente à toxicidade de misturas de antibióticos para *M. aeruginosa* sugerem que outras misturas de antibióticos deveriam ser testadas.

5. Conclusão

A fotodegradação de antibióticos veterinários, oxitetraciclina, tetraciclina, enrofloxacina e ceftiofur em meio de cultura Z₈, ocorreu para as concentrações mais baixas testadas, 10 e 100 µg/L, não se verificando fotodegradação da MNC. No meio ambiente é possível encontrar concentrações desta ordem de grandeza. Isto sugere que a fotodegradação pode contribuir para a eliminação de antibióticos veterinários no meio ambiente. A presença da cianobactéria *M. aeruginosa* no meio de cultura levou à degradação de concentrações de antibióticos, nomeadamente das concentrações 100 e 1000 µg/L.

Considerando a contínua entrada de antibióticos no meio aquático, torna-se necessário o estudo dos efeitos adversos dos antibióticos para os organismos aquáticos.

A toxicidade dos antibióticos veterinários, em meio de cultura, foi estudada em ensaios com *M. aeruginosa*, tendo os resultados obtidos demonstrado que as tetraciclina são os antibióticos mais tóxicos para a espécie. Também foram realizados testes com exposições combinadas de antibióticos TET e ENR que se revelaram menos tóxicas que os antibióticos expostos individualmente. Como as cianobactérias são produtores primários estando na base da cadeia trófica, efeitos no crescimento e vitalidade destes organismos podem repercutir-se ao longo de toda a cadeia. Os resultados obtidos são importantes para a compreensão do comportamento dos antibióticos veterinários e seu impacto sobre o meio ambiente.

Futuramente, devem ser realizados estudos que analisem não só a toxicidade individual e combinada de antibióticos veterinários, mas também a persistência destes no meio ambiente, através da análise dos metabolitos e produtos resultantes da fotodegradação, e outras transformações químicas, destes antibióticos.

6. Bibliografija

Ando, T., Nagase, H., Eguchi, K., Hirooka, T., Nakamura, T., Miyamoto, K., Hirata, K. (2007). A novel method using cyanobacteria for ecotoxicity test of veterinary antimicrobial agents. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 26: 601–606.

Andreozzi, R., Raffaele, M., Nicklas, P. (2003). Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*. 50 (10): 1319-1330.

Ash, R.J., Mauck, B., Morgan, M. (2002). Antibiotic resistance of gram-negative bacteria in rivers, United States. *Emerging infectious diseases*. 8 (7): 713-716.

Babić, S., Periša, M., Škorić, I. (2013). Photolytic degradation of norfloxacin, enrofloxacin and ciprofloxacin in various aqueous media. *Chemosphere*. 91 (11): 1635-1642.

Bartram J., Carmichael W.W., Chorus I., Jones G. Skulberg O.M. (1999). Introduction. In: *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. Chorus, I.; Bartram, J. (Eds.). Spon Press, London. 12-24

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: 299-310.

Belden, J. B., Maul, J. D., Lydy, M. J. (2007). Partitioning and photodegradation of ciprofloxacin in aqueous systems in the presence of organic matter. *Chemosphere*. 66 (8): 1390-1395.

Bláha, L., Babica, P., Maršálek, B. (2009). Toxins produced in cyanobacterial water blooms-toxicity and risks. *Interdisciplinary Toxicology*. 2 (2): 36-41.

Brain, R., A., Wilson, C., J., Johnson, D., J., Sanderson, H., Bestari, K., J., Hanson, M., L., Sibley, P., K., Solomon, K., R. (2005). Effects of a mixture of tetracyclines to *Lemna gibba* and *Myriophyllum sibiricum* evaluated in aquatic microcosms. *Environmental Pollution*. 138: 425-442.

Buchberger, W. W. (2007). Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge. *Anal. Chim. Acta*. 593 (2): 129-139.

Burgos, J. M., Ellington, B. A., Varela, M. F. (2005). Presence of multidrug-resistant enteric bacteria in dairy farm topsoil. *Journal of Dairy Science*. 88 (4): 1391-1398.

Carballa, M., Omil, F., Lema, J. M., Llompарт, M., García-Jares, C., Rodríguez, I., Gómez, M. Ternes, T. (2004). Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Research*. 38 (12): 2918-2926.

Castiglioni S., Bagnati R., Calamari D., Fanelli R., Zuccato E. (2005). A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. *Journal of Chromatography A*. 1092 (2): 206-215.

Cavenati, S., Carvalho, P. N., Almeida, C. M. R., Basto, M. C. P., Vasconcelos, M. T. S. (2012). Simultaneous determination of several veterinary pharmaceuticals in effluents from urban, livestock and slaughterhouse wastewater treatment plants using a simple chromatographic method. *Water Science & Technology*. 66 (3): 603-611.

Chen, Y., Li, H., Wang, Z., Tao, T., Hu, C. (2011). Photoproducts of tetracycline and oxytetracycline involving self-sensitized oxidation in aqueous solutions: Effects of Ca^{2+} and Mg^{2+} . *Journal of Environmental Sciences*. 23 (10): 1634-1639.

Chen, J. Q. e Guo, R. X. (2012). Assess the toxic effect of the antibiotic cefradine and its UV light degradation products on two freshwater algae. *Journal of Hazardous Materials*. 209-210:520-3.

Costa, C. R., Olivi, P., Botta, C. M., Espindola, E. L. (2008). A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*. 31 (7): 1820-1830.

Costanzo S. D., Murby J., Bates J. (2005). Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Marine Pollut. Bulletin*. 51: 218-223.

Crane, M., Watts, C., Boucard, T. (2006). Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Science of the Total Environment*. 367 (1): 23-41.

El Sayed, K.A., e Chelette, C. T. (2014). Laboratory Exercises to Teach Clinically Relevant Chemistry of Antibiotics. *American Journal of Pharmaceutical Education*. 78 (2): 1-9.

Fatta-Kassinos, D., Meric, S. Nikolaou, A. (2011). Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 399 (1): 251-275.

Fent, K., Escher, C., Caminada, D. (2006). Estrogenic activity of pharmaceuticals and pharmaceutical mixtures in a yeast reporter gene system. *Reprod. Toxicol.* 22 (2): 175-185.

Garcia-Rodríguez, A., Matamoros, V., Fontàs, C., Salvadó, V. (2014). The ability of biologically based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants - a review. *Environmental Science and Pollution Research.* 21:11708-11728.

Garrido-Mesa, N., Zarzuelo, A., Galvez, J. (2013). What is behind the non-antibiotic properties of minocycline?. *Pharmacological Research.* 67 (1): 18-30.

Ge, L., Chen, J., Wei, X., Zhang, S., Qiao, X., Cai, X., Xie, Q. (2010). Aquatic photochemistry of fluoroquinolone antibiotics: kinetics, pathways, and multivariate effects of main water constituents. *Environmental Science & Technology.* 44 (7): 2400-2405.

Gómez-Pacheco, C.V., Sánchez-Polo, M., Rivera-Utrilla, J., López-Peñalver, J.J. (2012). Tetracycline degradation in aqueous phase by ultraviolet radiation. *Chemical Engineering Journal.* 187: 89-95.

González-Pleiter, M., Gonzalo, S., Rodea-Palomares, I., Leganés, F., Rosal, R., Boltes, K., Marco, E., Fernández-Pinãs, F. (2013). Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. *Water Research.* 47 (6):2050-2064.

Halling-Sørensen, B. (2000). Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming. *Chemosphere.* 40 (7): 731-739.

Halling-Sørensen B., Nors Nielsen S., Lanzky P.F., Ingerslev F., Holten-Lützhøft H.C., Jørgensen S.E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. *Chemosphere.* 36: 357-393.

Holten-Lützhøft, H.C., Halling-Sørensen, B., Jørgensen, S.E. (1999). Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36: 1-6.

Iversen, A., Kühn, I., Franklin, A., Möllby, R. (2002). High prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Swedish sewage. *Applied and Environmental Microbiology.* 68 (6): 2838-2842.

Jiang, M., Wang, L., Ji, R. (2010). Biotic and abiotic degradation of four cephalosporin antibiotics in a lake surface water and sediment. *Chemosphere.* 80 (11): 1399-1405.

Jiao, S., Zheng, S., Yin, D., Wang, L., Chen, L. (2008). Aqueous photolysis of tetracycline and toxicity of photolytic products to luminescent bacteria. *Chemosphere*. 73 (3): 377-382.

Jørgensen, S.E., e Halling-Sørensen, B. (2000). Drugs in the environment. *Chemosphere*. 40 (7): 691-699.

Kim, S.R., Nonaka, L., Suzuki, S. (2004). Occurrence of tetracycline resistance genes tet (M) and tet (S) in bacteria from marine aquaculture sites. *FEMS Microbiology Letters*. 237 (1): 147-156.

Kim, Y., Jung, J., Kim, M., Park, J., Boxall, A., Choi, K. (2008). Prioritizing veterinary pharmaceuticals for aquatic environment in Korea. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 26(2): 167-176.

Kinney, C. A., Furlong, E. T., Kolpin, D. W., Burkhardt, M. R., Zaugg, S. D., Werner, S. L., Bossio, J. P., Benotti, M. J. (2008). Bioaccumulation of pharmaceuticals and other anthropogenic waste indicators in earthworms from agricultural soil amended with biosolid or swine manure. *Environmental Science & Technology*. 42 (6): 1863-1870.

Kotai, J. (1972) Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae, Vol. 5. Oslo, Norway: *Norw. Inst. for Water Res.* 11–69.

Kot-Wasik A., Debska J., Namiesnik J. (2007). Analytical techniques in studies of the environmental fate of pharmaceuticals and personal-care products. *Trends in Analytical Chemistry*. 26: 557-568.

Kümmerer K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. *Chemosphere* 75: 417-434.

Laitano, K. S., Matias, W. G., Belli Filho, P., Pinto, R. O. (2006). Testes de toxicidade com *Daphnia magna*: uma ferramenta para avaliação de um reator experimental UASB. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*. 1 (1): 43-47.

Li, W., C. (2014). Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environmental Pollution*. 187:193-201.

Li, Y., Niu, J. e Wang, W. (2011). Photolysis of enrofloxacin in aqueous systems under simulated sunlight irradiation: kinetics, mechanism and toxicity of photolysis products. *Chemosphere*. 85 (5): 892-897.

Liu, Y., Gao, B., Yue, Q., Guan, Y., Wang, Y., Huang, L. (2012). Influences of two antibiotic contaminants on the production, release and toxicity of microcystins. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 77: 79–87.

Liu, Y., Zhang, J., Gao, B., Feng, S. (2014). Combined effects of two antibiotic contaminants on *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Hazardous Materials*. 279: 148-155.

Lunestad, T.B., Samuelsen, O.B., Fjelde, S., Ervik, A. (1995). Photostability of eight antibacterial agents in seawater. *Aquaculture*. 134 (3): 217-225.

Malintan, N., T., e Mohd, M., A. (2006). Determination of sulfonamides in selected Malaysian swine wastewater by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1127 (1-2): 154-160.

OECD, 2011. Guidelines for Testing of Chemicals 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. OECD, Paris.

Pinheiro, A., Rosa Albano, R. M., Alves, T. C., Kaufmann, V., da Silva, M. R. (2013). Veterinary antibiotics and hormones in water from application of pig slurry to soil. *Agricultural Water Management*. 129: 1-8.

Pouliquen, H., Delépée, R., Larhantec-Verdier, M., Morvan, M. L., Le Bris, H. (2007). Comparative hydrolysis and photolysis of four antibacterial agents (oxytetracycline oxolinic acid, flumequine and florfenicol) in deionised water, freshwater and seawater under abiotic conditions. *Aquaculture*. 262 (1): 23-28.

Robinson, A. A., Belden, J. B., Lydy, M. J. (2005). Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24 (2): 423-430.

Sarmah, A. K., Meyer, M. T., Boxall, 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.

Sassman, S.A., e Lee, L.S. (2005). Sorption of three tetracyclines by several soils: assessing the role of pH and cation exchange. *Environmental Science & Technology*. 39 (19): 7452-7459.

Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B., Obst, U. (2003). Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*. 43 (3): 325-335.

Sirés, I. e Brillas, E. (2012). Remediation of water pollution caused by pharmaceutical residues based on electrochemical separation and degradation technologies: A review. *Environ. Int.* 40: 212-229.

Speltini, A., Sturini, M., Maraschi, F., Profumo, A. (2010). Fluoroquinolone antibiotics in environmental waters: sample preparation and determination. *Journal of Separation Science.* 33 (8): 1115-1131.

Stoichev, T., Baptista, M.S., Basto, M., Vasconcelos, V.M., Vasconcelos, M.T.S.D. (2011). Effects of minocycline and its degradation products on the growth of *Microcystis aeruginosa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 74 (3): 219-224.

Sturini, M., Speltini, A., Maraschi, F., Profumo, A., Pretali, L., Fasani, E., Albini, A. (2010). Photochemical degradation of marbofloxacin and enrofloxacin in natural waters. *Environmental Science & Technology.* 44 (12): 4564-4569.

Subbiah, M., Shah, D.H., Besser, T.E., Ullman, J.L., Call, D.R. (2012). Urine from treated cattle drives selection for cephalosporin resistant *Escherichia coli* in soil. *PLoS One.* 7 (11):e48919.

Paerl, H. W. e Huisman, J. (2008). Blooms like it hot. *Scien.* 320: 57.

Pomati, F., Netting, A.G., Calamari, D., Neilan, B.A. (2004). Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis sp.* *Aquat Toxicol.* 67 (4):387-96.

Puig, P., Borrull, F., Calull, M., Benavente, F., Sanz-Nebot, V., Barbosa, J., Aguilar, C. (2007). Improving the sensitivity of the determination of ceftiofur by capillary electrophoresis in environmental water samples: in-line solid phase extraction and sample stacking techniques. *Anal Chim Acta.* 587 (2):208-15.

Tong, L., Li, P., Wang, Y. Zhu, K. (2009). Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. *Chemosphere.* 74 (8): 1090-1097.

van der Grinten, E., Pikkemaat, M.G., van den Brandhof, E.J., Stroomberg, G.J., Kraak, M.H. (2010). Comparing the sensitivity of algal, cyanobacterial and bacterial bioassays to different groups of antibiotics. *Chemosphere* 80 (1):1-6.

Weigel, S., Kallenborn, R., Hühnerfuss, H. (2004). Simultaneous solid-phase extraction of acidic, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* 1023 (2): 183-195.

Wille, K., Noppe, H., Verheyden, K., Bussche, J.V., De Wulf, E., Van Caeter, P., Vanhaecke, L. (2010). Validation and application of an LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 13 pharmaceuticals in seawater. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 397 (5): 1797-1808.

Wise, R. (2002). Antimicrobial resistance: priorities for action. *J. Antimicrob. Chemoth.* 49: 585-586.

Yang, L.H., Ying, G.G., Su, H.C., Stauber, J.L., Adams, M.S., Binet, M.T. (2008). Growth-inhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 27 (5): 1201-1208.

Yang, S. e Carlson, K. (2003). Evolution of antibiotic occurrence in a river through pristine, urban and agricultural landscapes. *Water Research*. 37 (19): 4645-4656.

Yu, H., Mu, H., Hu, Y. (2012). Determination of fluoroquinolones, sulfonamides and tetracyclines multiresidues simultaneously in porcine tissue by MSPD and HPLC-DAD. *J. of Pharm. Anal.* 2 (1): 76-81.

Zagatto, P. A. (2008). *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. Rima. 478.

Zanchett, G. e Oliveira-Filho, E.C. (2013). Cyanobacteria and cyanotoxins: From impacts on aquatic ecosystems and human health to anticarcinogenic effects. *Toxins*. 5 (10): 1896-1917.

Zhang, D., Gersberg, R.M., Ng, W.J., Tan, S.K. (2014). Removal of pharmaceuticals and personal care products in aquatic plant-based systems: A review. *Environmental Pollution*. 184: 620-639.

Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Melis, M., Fanelli, R. (2010). Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*. 179 (1): 1042-1048.