

# **Desenvolvimento de um sistema de remoção de antibióticos para aquicultura**

**Susana Andreia Mendes Tavares Moreno**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

## **Engenharia Química**

**Orientadora:** Professora Doutora Isabel Maria Delgado Jana Marrucho Ferreira

**Orientadora Externa:** Doutora Karolina Zalewska Patrício

### **Júri**

**Presidente:** Professora Doutora Carla Isabel Costa Pinheiro

**Orientadora:** Professora Doutora Isabel Maria Delgado Jana Marrucho Ferreira

**Vogal:** Professora Doutora Maria Rosinda da Costa Ismael

**Dezembro de 2020**



*Para o meu irmão Igor Mendes Tavares*



## **Agradecimentos**

Neste projeto tive o apoio fundamental de pessoas e entidades que acreditaram em mim desde o início.

Agradeço imensamente o apoio e atenção, às minhas orientadoras de estágio, Professora Doutora Isabel Maria Marrucho do Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa, e Doutora Karolina Zalewska Patrício da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Ao Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa e à Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa, pela disponibilidade das instalações académicas, laboratoriais, dos fármacos e solventes que me permitiram realizar este projeto da melhor forma possível.

Ao meu pai Gaudêncio, à minha mãe Celestina, ao meu marido Admilson e a minha bebé ainda por nascer Gabriela, que são a minha base em tudo na vida e acompanharam a minha luta.

À restante família, amigos verdadeiros e colegas de laboratório.

A Deus, que mesmo nas alturas em que pensei em desistir transmitiu-me a força necessária para avançar.



## Resumo

Este trabalho teve como objetivo apresentar 2 metodologias experimentais à escala laboratorial, para possível aplicação real no contexto da aquicultura, de forma a remover antibióticos na descarga deste tipo de sistema, usando solventes eutéticos como C8:C10, C8:C12, C10:C12, Mentol:C8, Mentol:C10, Mentol:C12, Timol:C8, Timol:C10, Timol:Mentol e [N8881]Br:C10. Como método de análise, utilizou-se a espectrofotometria de UV-vis.

Inicialmente, determinou-se a solubilidade aparente de 3 fármacos [enrofloxacina (ENR), cloranfenicol (CLO) e norfloxacina (NOR)] de forma a avaliar se os solventes mais solúveis seriam os melhores extratores. Verificou-se que a enrofloxacina é mais solúvel em C8:C10 e Timol:C10 com valor idêntico de 0,117 g ENR/g solvente; o cloranfenicol é mais solúvel em [N8881]Br:C10 com valor de 0,154 g CLO/g solvente; e a norfloxacina é mais solúvel em Timol:C8 e Timol:C10 respetivamente com valores de solubilidade aparente de 0,249 e 0,242 g NOR/g solvente.

Numa primeira abordagem experimental utilizou-se a extração líquido-líquido otimizando as condições para soluções aquosas de antibiótico de concentração 10 ppm, agitação de fases de 300 rpm durante 15 minutos em banho de água a 25°C, repouso de 48 horas e centrifugação durante 3 horas da fase aquosa. O [N8881]Br:C10 com valor de 99,69% e o C8:C10 com valor de 98,90% foram os melhores extratores para a enrofloxacina. Os solventes [N8881]Br:C10 e Mentol:C12 extraíram melhor o cloranfenicol com valores respetivos de 99,69 e 98,98% de extração, e o C10:C12 extraiu eficazmente a norfloxacina com valor de 99,45%.

Numa segunda abordagem experimental, com mais vantagens em relação à primeira em particular dos parâmetros de tempo de trabalho e diminuição da massa de solvente, utilizou-se a impregnação dos solventes C10:C12 e [N8881]Br:C10 em sólidos porosos. Otimizou-se as condições para soluções aquosas de antibiótico de concentração 10 ppm, 524 membranas de diâmetro 0,2 cm com massa aproximada de solvente de 0,105 gramas, e agitação de 300 rpm durante 15 minutos em banho de água a 25°C, e verificou-se que as melhores eficiências de extração foram obtidas para o C10:C12 extraíndo respetivamente 82,92 e 84,1% de enrofloxacina e norfloxacina, e 58,0% de extração do cloranfenicol utilizando o [N8881]Br:C10.

Por último, foi possível reutilizar em 3 ciclos de extração os fármacos em estudo e reciclar o solvente C10:C12 com valor de 99,7% por extração líquido-líquido para o caso da enrofloxacina. Demonstrou-se ser possível a remoção completa de todos os antibióticos em 2 ciclos de extração e a reutilização do solvente [N8881]Br:C10 em 5 ciclos quando impregnado em suporte, para o caso do cloranfenicol.

**Palavras-chaves:** aquicultura, antibiótico, solvente eutético, extração, impregnação





## Abstract

This work aimed to present 2 experimental methodologies on a laboratory scale, for possible real application in aquaculture, in order to remove antibiotics in the discharge of this type of system, using eutectic solvents as C8: C10, C8: C12, C10: C12, Menthol: C8, Menthol: C10, Menthol: C12, Thymol: C8, Thymol: C10, Thymol: Menthol and [N8881] Br: C10. As a method of analysis, UV-vis spectrophotometry was used.

Initially, the solubility of 3 drugs [enrofloxacin (ENR), chloramphenicol (CLO) and norfloxacin (NOR)] was determined in order to assess whether the most soluble solvents would be the best extractors. It was found that enrofloxacin shows better solubility in C8: C10 and Thymol: C10 with an identical value of 0.117 g ENR / g solvent; chloramphenicol is more soluble in [N8881] Br: C10 with a value of 0.154 g CLO / g solvent; and norfloxacin in Thymol: C8 and Thymol: C10 respectively with apparent solubility values of 0.249 and 0.242 g NOR / g solvent.

In the first experimental approach, liquid-liquid extraction was used, optimizing the conditions for aqueous solutions of 10 ppm the antibiotic, stirring 300 rpm for 15 minutes in a 25 °C water bath, performing separation after 48 hours and centrifugation during 3 hours of the aqueous phase. The [N8881] Br: C10 with a value of 99.69% and C8: C10 with a value of 98.90% were the best extractors for enrofloxacin. The best solvents to extract chloramphenicol were [N8881] Br: C10 and Menthol: C12 with respective values of 99.69 and 98.98% of extraction, and C10: C12 effectively extracted norfloxacin with a value of 99.45%.

In a second experimental approach, with more advantages in relation to the first, in particular of the working time and reduction of the solvent mass, the impregnation of the solvents C10: C12 and [N8881] Br: C10 in porous solids was used. The optimum conditions were aqueous solutions of antibiotic with concentration 10 ppm, 524 membranes with a diameter of 0.2 cm with an approximate solvent mass of 0.105 grams, and stirring at 300 rpm for 15 minutes in a water bath at 25 °C. It was found that the best extraction efficiencies were obtained for C10: C12 extracting 82.92 and 84.1% of enrofloxacin and norfloxacin, respectively, and 58.0% of chloramphenicol extraction using [N8881] Br: C10.

Finally, it was possible to reuse the drugs in 3 extraction cycles and recycle the solvent C10: C12 with a value of 99.7% by liquid-liquid extraction in the case of enrofloxacin. The complete removal of all antibiotics was possible in 2 extraction cycles and the reuse of the solvent [N8881] Br: C10 in 5 cycles when impregnated in support, for the case of chloramphenicol.

**Keywords:** aquaculture, antibiotic, eutectic solvent, extraction, impregnation



# Índice

Agradecimentos.....	iv
Resumo .....	vi
Abstract .....	viii
Índice .....	x
Lista de figuras .....	xiv
Lista de tabelas .....	xx
Lista de abreviaturas .....	xxii
1. Introdução.....	1
1.1. Aquicultura em tanques com recirculação .....	1
1.1. Componentes principais do sistema de recirculação para a aquicultura.....	3
1.2. Utilização de antibióticos na aquicultura .....	7
1.3. Fontes e destino da poluição por antibióticos na água .....	10
1.4. Análise quantitativa de antibióticos na aquicultura .....	11
1.5. Legislação e limite máximo residual de antibióticos na aquicultura.....	11
1.6. Tecnologias utilizadas para remoção/degradação de antibióticos de águas residuais provenientes da aquicultura .....	16
1.6.1. Remoção de antibióticos da água .....	17
1.6.1.1. Adsorção .....	17
1.6.1.2. Extração líquido-líquido .....	19
1.6.1.3. Membranas de osmose inversa/Nanofiltração .....	19
1.6.1.4. Zonas húmidas construídas .....	20
1.6.2. Degradação de antibióticos da água.....	21
1.6.2.1. Eletroxidação.....	21
1.6.2.2. Tecnologia fotocatalítica.....	21
1.6.2.3. Fotodegradação pela luz solar .....	23
1.7. Utilização de solventes alternativos: DES.....	24
1.7.1. Importância de definição inequívoca de DES .....	24
1.7.2. Importância do diagrama de fases sólido-líquido.....	25
1.8. Objetivos e identificação do problema .....	27

1.8.1.	Tipo de aquicultura em estudo: espécies de peixes .....	28
1.8.2.	Solventes eutéticos utilizados no trabalho .....	29
2.	Metodologia .....	30
2.1.	Análise .....	30
2.1.1.	Espetrofotometria de ultravioleta-visível (UV-vis) .....	30
2.2.	Experimental.....	31
2.2.1.	Preparação dos solventes eutéticos .....	31
2.2.1.1.	Materiais, equipamentos e reagentes .....	31
2.2.1.2.	Procedimento experimental.....	32
2.2.2.	Curvas de calibração dos antibióticos.....	33
2.2.2.1.	Materiais, equipamentos e reagentes .....	33
2.2.2.2.	Procedimento experimental.....	33
2.2.3.	Solubilidade aparente dos antibióticos nos solventes eutéticos .....	35
2.2.3.1.	Materiais, equipamentos e reagentes .....	35
2.2.3.2.	Procedimento experimental.....	35
2.2.4.	Extração líquido-líquido dos antibióticos com solventes eutéticos .....	36
2.2.4.1.	Materiais, equipamentos e reagentes .....	36
2.2.4.2.	Procedimento experimental.....	36
2.2.4.3.	Reutilização do solvente eutético .....	37
2.2.4.4.	Reciclagem do solvente eutético.....	38
2.2.5.	Impregnação de solventes eutéticos em suporte poroso e extração.....	39
2.2.5.1.	Materiais, equipamentos e reagentes .....	39
2.2.5.2.	Procedimento experimental.....	40
2.2.5.3.	Extração por etapas .....	41
2.2.5.4.	Reutilização do solvente eutético .....	42
3.	Resultados e discussão .....	43
3.1.	Traçado da curva de calibração dos antibióticos .....	43
3.2.	Solubilidade aparente dos antibióticos nos solventes eutéticos .....	43
3.3.	Otimização das condições de extração líquido-líquido .....	48
3.3.1.	Concentração inicial de solução stock de antibiótico.....	49
3.3.2.	Reutilização e reciclagem do solvente eutético .....	55

3.4.	Otimização das condições de impregnação de solventes no suporte poroso .....	57
3.4.1.	Tempo de equilíbrio.....	59
3.4.2.	Quantidade de membrana.....	60
3.4.3.	Dimensões da fase impregnada.....	61
3.4.4.	Extração por etapas .....	64
3.4.5.	Reutilização do solvente eutético .....	66
3.4.6.	Concentração da solução stock inicial .....	68
4.	Conclusão.....	71
4.1.	Perspetivas de trabalho futuro .....	72
	Referências bibliográficas .....	74
	Anexos.....	a
	Anexo A – Preparação dos solventes eutéticos.....	a
	Anexo B – Curva de calibração dos antibióticos.....	b
	Anexo B1 – Enrofloxacina .....	b
	Anexo B2 – Cloranfenicol.....	c
	Anexo B3 – Norfloxacina.....	d
	Anexo C – Cálculos da percentagem de extração para o método de extração líquido-líquido e	
	Anexo D – Espectro de absorção obtido pela extração líquido-líquido dos solventes eutéticos	
	em água ultrapura .....	f
	Anexo E – Espectros de absorção obtidos pela extração líquido-líquido para os solventes	
	Timol:ácido e Timol:Mentol .....	g
	Anexo F – Espectros de absorção da extração líquido-líquido de soluções aquosas de	
	antibióticos de 5 ppm em solventes .....	h
	Anexo G – Espectros de absorção obtidos na extração líquido-líquido de soluções aquosas de	
	antibióticos de 10 ppm em solventes .....	i
	Anexo H – Espectros de absorção na reutilização de solvente pela extração líquido-líquido ....	j
	Anexo I – Espectros de absorção da reciclagem de solvente pela extração líquido-líquido.....	k
	Anexo J – Espectro de absorção da solução em branco na impregnação de solvente C10:C12	
	em água ultrapura .....	l
	Anexo K – Cálculos da percentagem de extração de antibióticos pela impregnação de	
	solventes em suporte poroso .....	m
	Anexo L – Espectros de absorção obtidos na impregnação de solventes para ENR, CLO e NOR	
	de 10 ppm.....	n

Anexo M – Espectros de absorção na otimização do tempo de equilíbrio dos antibióticos com solventes impregnados em suporte poroso .....	o
Anexo N – Espectro de absorção na otimização da quantidade de suporte poroso impregnado em solvente .....	p
Anexo O – Espectros de absorção na otimização da dimensão de membrana e massa de solvente na impregnação em suporte poroso .....	q
Anexo P – Espectros de absorção obtidos para os solventes Timol:Mentol e Timol:Carvacrol impregnados em suporte poroso, para cloranfenicol a 10 ppm .....	r
Anexo Q – Espectros de absorção da extração por etapas dos antibióticos pela impregnação de solventes em suporte poroso .....	s
Anexo R – Espectros de absorção na reutilização de solventes eutéticos pela impregnação em suporte poroso.....	t
Anexo S – Espectro de absorção obtido na reutilização de solvente C10:C12 impregnado em suporte poroso, para norfloxacin de concentração 2 ppm .....	u

## Lista de figuras

Figura 1 – Exemplo de sistema com recirculação para a aquicultura em tanques. Fonte: J. Bregnballe, A Guide to Recirculation Aquaculture, FAO (2015). <sup>[1]</sup> .....	1
Figura 2 – Parâmetros que afetam o crescimento de um peixe na aquicultura. Adaptado de J. Bregnballe, A Guide to Recirculation Aquaculture, FAO (2015). <sup>[1]</sup> .....	2
Figura 3 – Sistema básico de recirculação para aquicultura: filtração mecânica, tratamento biológico e aeração. Adaptado de J. Bregnballe, A Guide to Recirculation Aquaculture, FAO (2015). <sup>[1]</sup> .....	2
Figura 4 – Esquema de um sistema de recirculação para a aquicultura. Adaptado de Ranjan et al. (2019) <sup>[4]</sup> .....	3
Figura 5 – Tipos de tanques na aquicultura. Fonte: J. Bregnballe, A Guide to Recirculation Aquaculture, FAO (2015). <sup>[1]</sup> .....	3
Figura 6 – Drumfilter. Fonte: J. Bregnballe, A Guide to Recirculation Aquaculture, FAO (2015). <sup>[1]</sup> .....	4
Figura 7 – Biofiltros de leito móvel (A) e biofiltros de leito fixo (B). Fonte: J. Bregnballe, A Guide to Recirculation Aquaculture, FAO (2015). <sup>[1]</sup> .....	5
Figura 8 – Trickling filter envolto num revestimento de plástico azul para eliminar respingos no chão. Fonte: J. Bregnballe, A Guide to Recirculation Aquaculture, FAO (2015). <sup>[1]</sup> .....	5
Figura 9 – Cone de oxigénio para dissolver oxigênio puro em alta pressão. Fonte: J. Bregnballe, A Guide to Recirculation Aquaculture, FAO (2015). <sup>[1]</sup> .....	6
Figura 10 – Sistemas de tratamento UV fechado (A) e aberto (B). Fonte: J. Bregnballe, A Guide to Recirculation Aquaculture, FAO (2015). <sup>[1]</sup> .....	7
Figura 11 – Fontes de poluição por antibióticos na água. Adaptado de Danner et al. (2019) <sup>[9]</sup>	10
Figura 12 – Aplicação de adsorção magnética de fase sólida. Adaptado de Faleye et al. (2017) <sup>[15]</sup> .....	19
Figura 13 – Zona húmidas construídas: sistema de fluxo de superfície vertical. Adaptado de Gorito et al. (2018) <sup>[22]</sup> .....	20
Figura 14 – Esquema de processo de eletroxidação. Adaptado de Soto et al. (2018) <sup>[3]</sup> .....	21
Figura 15 – Esquema de transferência de cargas e possível mecanismo de fotocatalise de amostra de ZnSnO <sub>3</sub> . Fonte: Dong et al. (2020) <sup>[23]</sup> .....	22
Figura 16 – Contador rotativo de oxidação avançado equipado com zeólito/compósitos de TiO <sub>2</sub> . Adaptado: Nomura et al. (2020) <sup>[25]</sup> .....	23
Figura 17 – Diagrama de fases sólido-líquido de uma mistura eutética genérica. Fonte: Florindo et al. (2019) <sup>[30]</sup> .....	25
Figura 18 – Proposta de sistema de remoção de antibióticos para a aquicultura .....	28
Figura 19 – Espectrofotómetro UV-vis utilizado no laboratório (Marca: Shimadzu UV Spectrophotometer, Modelo: UV-1800) .....	30
Figura 20 – Intensidade da luz que passa pela célula de amostra do espectrofotómetro UV-vis. Fonte: Shimadzu. <sup>[38]</sup> .....	30

Figura 21 – Preparação das soluções padrões de antibiótico em água ultrapura.....	34
Figura 22 – Aspeto (A) e esquema ilustrativo (B) de extração líquido-líquido de cloranfenicol com o solvente [N8881]Br:C10, e separação de fases orgânica e aquosa.....	37
Figura 23 – Reutilização de solvente eutético pela extração líquido-líquido.....	37
Figura 24 – Reciclagem de solvente eutético pela extração líquido-líquido.....	38
Figura 25 – Mistura mecânica (A), divisão de fases após centrifugação (B) e separação de solvente reciclado do carvão ativado com seringa e filtro de politetrafluoroetileno hidrofóbico (C). .....	39
Figura 26 – Aspeto da membrana PVDF sem (A) e com (B) impregnação de solvente eutético. .....	40
Figura 27 – Sistema de vácuo utilizado no laboratório para impregnação de solvente eutético em membranas de PVDF.....	40
Figura 28 – Membranas de PVDF impregnadas em solvente eutético, com diâmetro de 0,2 cm. .....	41
Figura 29 – Extração por etapas do antibiótico pela impregnação de solventes em suporte poroso. .....	41
Figura 30 – Reutilização de solventes eutéticos por impregnação em sólidos porosos. ....	42
Figura 31 – Solubilidade aparente dos antibióticos em estudo nos solventes eutéticos. Todos os resultados foram medidos a 25°C e pressão atmosférica, à exceção do Timol que foi medido a 50°C. Azul: enrofloxacin. Laranja: cloranfenicol. Verde: norfloxacin. ....	44
Figura 32 – Especificação da enrofloxacin (A) ( $pK_{a1} = 5.9$ e $pK_{a2} = 8.0$ ) e norfloxacin (B) ( $pK_{a1} = 6,2$ e $pK_{a2} = 8.3$ ) em função do pH, com as estruturas moleculares. Fonte: Mejía et al. (2017) [48]. Otalvaro et al. (2019) [49].....	46
Figura 33 – Ação das espécies de cloranfenicol. Fonte: Li et al. (2018) [50].....	46
Figura 34 – Estrutura química de enrofloxacin (A), cloranfenicol (B) e norfloxacin (C) evidenciando os diferentes grupos funcionais. Fonte: PubChem [43], [44], [45].....	47
Figura 35 – Fase aquosa de extração líquido-líquido antes (A) e depois (B) de centrifugação a 6000 rpm durante 3 horas.....	48
Figura 36 – Gráfico de eficiência de extração dos antibióticos em solução aquosa de concentração 5 ppm pelos solventes eutéticos, através da extração líquido-líquido. Azul: enrofloxacin. Laranja: cloranfenicol. Verde: norfloxacin. ....	50
Figura 37 – Gráfico de eficiência de extração dos antibióticos em solução aquosa de concentração 10 ppm pelos solventes eutéticos através da extração líquido-líquido. Azul: enrofloxacin. Laranja: cloranfenicol. Verde: norfloxacin. ....	52
Figura 38 – Gráfico de eficiência de extração da enrofloxacin, comparando diferentes concentrações em solução de 5 e 10 ppm para cada solvente eutético. Azul claro – C8:C10; Laranja – C8:C12; Cinzento – C10:C12; Amarelo – Men:C8; Roxo – Men:C10; Verde – Men:C12; Azul escuro – [N8881]Br:C10.....	54
Figura 39 – Gráfico de eficiência de extração de cloranfenicol, comparando diferentes concentrações em solução de 5 e 10 ppm para cada solvente eutético. Laranja – C8:C10;	



Amarelo – C8:C12; Verde claro – C10:C12; Vermelho – Men:C8; Castanho – Men:C10; Roxo – Men:C12; Azul – [N8881]Br:C10. ....	54
Figura 40 – Gráfico de eficiência de extração da norfloxacin, comparando diferentes concentrações em solução de 5 e 10 ppm para cada solvente eutético. Laranja – C8:C10; Azul claro – C8:C12; Amarelo – C10:C12; Verde escuro – Men:C8; Azul escuro – Men:C10; Castanho – Men:C12; Verde claro – [N8881]Br:C10. ....	54
Figura 41 – Gráfico de reutilização e reciclagem de C10:C12 pela extração líquido-líquido obtido para a enrofloxacin de concentração de 10 ppm. Azul escuro: ciclos de extração 1, 2 e 3 na reutilização do solvente; Azul claro: reciclagem de solvente. ....	55
Figura 42 – Gráfico de eficiência de extração da norfloxacin de 10 ppm pelo solvente C10:C12 impregnado em suporte poroso, em função do tempo de equilíbrio. Laranja: 5 minutos de equilíbrio; Verde: 15 minutos de equilíbrio; Azul: 30 minutos de equilíbrio. ....	59
Figura 43 – Gráfico de eficiência de extração para diferentes quantidades de membrana impregnada em C10:C12 para extração de norfloxacin de solução aquosa de 10 ppm. Azul claro: ensaio 1 para 34 membranas; Azul escuro: ensaio 2 para 34 membranas; Laranja claro: ensaio 1 para 51 membranas; Laranja escuro: ensaio 2 para 51 membranas. ....	60
Figura 44 – Gráfico de eficiência de extração de norfloxacin de 10 ppm, utilizando 34 membranas de diâmetro 0,5 cm e 262 e 524 membranas de diâmetro 0,2 cm impregnadas em C10:C12. Azul claro: ensaio 1 para 34 membranas; Azul escuro: ensaio 2 para 34 membranas; Laranja claro: ensaio 1 para 262 membranas; Laranja escuro: ensaio 2 para 262 membranas; Verde claro: ensaio 1 para 524 membranas; Verde escuro: ensaio 2 para 524 membranas. ...	62
Figura 45 – Estrutura química do timol (A), mentol (B) e carvacrol (C). Fonte: PubChem <sup>[55]</sup> , <sup>[56]</sup> , <sup>[59]</sup> . ....	63
Figura 46 – Gráfico de eficiência de extração por etapas em 2 ciclos dos antibióticos pelos solventes eutéticos impregnados em suporte poroso. Azul: enrofloxacin. Laranja: cloranfenicol; Verde: norfloxacin. ....	64
Figura 47 – Gráfico de eficiência de extração de antibiótico 10 ppm na reutilização de solvente impregnado em suporte. Azul: enrofloxacin; Laranja: cloranfenicol; Verde: norfloxacin. ....	66
Figura 48 – Estrutura química do brometo de metiltrioctilamônio. Fonte: PubChem <sup>[57]</sup> . ....	66
Figura 49 – Gráfico de eficiência de extração de norfloxacin de 10 ppm na reutilização em 3 ciclos do solvente C10:C12 impregnado em suporte poroso. ....	68
Figura 50 – Gráfico do efeito da percentagem de extração de norfloxacin para diferentes concentrações de solução aquosa de antibiótico. Verde escuro: concentração de 10 ppm; Verde claro: concentração de 2 ppm. ....	69
Figura 51 – Espetro de absorção (A) e curva de calibração (B) para a enrofloxacin. Preto: solução stock de enrofloxacin de 10 ppm, Azul: padrão de 2 ppm, Amarelo: padrão de 4 ppm, Verde: padrão de 6 ppm, Vermelho escuro: padrão de 8 ppm, Cinzento: padrão de 10 ppm. ....	b
Figura 52 – Espetro de absorção (A) e curva de calibração (B) para cloranfenicol. Preto: solução stock de cloranfenicol de 10 ppm, Vermelho: padrão de 2 ppm, Verde: padrão de 4 ppm, Azul escuro: padrão de 6 ppm, Azul claro: padrão de 8 ppm, Roxo: padrão de 10 ppm. ....	c

Figura 53 – Espectro de absorção (A) e curva de calibração (B) para a norfloxacin. Preto: solução stock de norfloxacin de 10 ppm, Azul: padrão de 2 ppm, Vermelho: padrão de 4 ppm, Verde: padrão de 6 ppm, Roxo: padrão de 8 ppm, Cinzento: padrão de 10 ppm..... d

Figura 54 – Espectro de absorção obtido pela extração líquido-líquido dos solventes eutéticos em água ultrapura. Cinzento – Men:C12; Amarelo – Men:C10; Azul escuro – C10:C12; Preto – C8:C10; Verde – Men:C8; Rosa – Tim: Men; Vermelho – C8:C12; Azul claro – Tim:C10; Violeta – Tim:C8. .... f

Figura 55 – Espectros de absorção da enrofloxacin (A) e cloranfenicol (B) pela extração líquido-líquido em solventes de Timol:ácido e Timol:Mentol. (A) Preto – solução stock de enrofloxacin 5 ppm; Verde – Tim:C8; Laranja – Tim:C10; Roxo – Tim:Men. (B) Preto - solução stock de cloranfenicol 5 ppm; Azul – Tim:C8; Vermelho – Tim:C10; Verde – Tim: Men. .... g

Figura 56 – Espectros de absorção obtidos na extração líquido-líquido da enrofloxacin (A), cloranfenicol (B) e norfloxacin (C) de concentração 5 ppm para diferentes solventes eutéticos. (A) Preto – solução stock de ENR 5 ppm; Azul escuro – C8:C10; Roxo – C8:C12; Verde – C10:C12; Cinzento – Mentol:C8; Azul claro – Mentol:C10; Rosa – Mentol:C12; Amarelo – [N8881]Br:C10. (B) Preto – solução stock de CLO 5 ppm; Vermelho – C8:C10; Azul – C8:C12; Verde claro – C10:C12; Roxo – Mentol:C8; Verde escuro – Mentol:C10; Cinzento – Mentol:C12; Violeta – [N8881]Br:C10. (C) Preto – solução stock de NOR 5 ppm; Vermelho – C8:C10; Azul – C8:C12; Verde claro – C10:C12; Verde escuro – Mentol:C8; Cinzento – Mentol:C10; Roxo – Mentol:C12; Amarelo – [N8881]Br:C10. .... h

Figura 57 – Espectros de absorção obtidos na extração líquido-líquido da enrofloxacin (A), cloranfenicol (B) e norfloxacin (C) de concentração 10 ppm para diferentes solventes eutéticos. (A) Preto – solução stock de ENR 10 ppm; Vermelho – C8:C10; Azul escuro – C8:C12; Verde – C10:C12; Verde escuro – Mentol:C8; Cinzento – Mentol:C10; Azul claro – Mentol:C12; Violeta – [N8881]Br:C10. (B) Preto – solução stock de CLO 10 ppm; Vermelho – C8:C10; Azul escuro – C8:C12; Verde claro – C10:C12; Cinzento – Mentol:C8; Azul claro - Mentol:C10; Verde escuro – Mentol:C12; Violeta – [N8881]Br:C10. (C) Preto – solução stock de NOR 10 ppm; Vermelho – C8:C10; Cinzento – C8:C12; Verde claro – C10:C12; Azul – Mentol:C8; Amarelo – Mentol:C10; Verde escuro – Mentol:C12; Roxo – [N8881]Br:C10. .... i

Figura 58 – Espectros de absorção obtidos na reutilização de solvente pela extração líquido-líquido da enrofloxacin (A), cloranfenicol (B) e norfloxacin (C) de concentração 10 ppm. (A) Preto: solução stock de enrofloxacin 10 ppm; Azul: ensaio 1; Vermelho: ciclo 1; Verde: ciclo 2; Cinzento: ciclo 3. (B) Preto: solução stock de cloranfenicol 10 ppm; Vermelho: ensaio 1; Azul: ciclo1; Cinzento: ciclo 2; Castanho: ciclo 3. (C) Preto: solução stock de norfloxacin 10 ppm; Azul claro: ensaio 1; Vermelho: ciclo 1; Verde: ciclo 2; Azul escuro: ciclo 3. .... j

Figura 59 – Espectros de absorção obtidos na reciclagem de solvente pela extração líquido-líquido da enrofloxacin (A), cloranfenicol (B) e norfloxacin (C) de concentração 10 ppm. (A) Preto: solução aquosa de enrofloxacin 10 ppm; Vermelho: ensaio 1; Rosa: ensaio 2. (B) Preto: solução aquosa de cloranfenicol 10 ppm; Verde escuro: ensaio 1; Verde claro: ensaio 2. (C) Preto: solução aquosa de norfloxacin 10 ppm; Azul claro: ensaio 1; Azul escuro: ensaio 2. .... k

Figura 60 – Espectro de absorção de 34 membranas impregnadas em C10:C12, diâmetro 0,5 cm em contacto com água ultrapura. Preto: solução stock de norfloxacin 10 ppm; Vermelho: 34 membranas de diâmetro 0,5 cm impregnadas em C10:C12 em solução aquosa. .... l

Figura 61 – Espectros de absorção obtidos na impregnação de solventes C8:C10 e [N8881]Br:C10 para ENR 10 ppm (A), solventes C10:C12 e C8:C10 para CLO 10 ppm (B) e solvente Men:C8 para NOR 10 ppm (C). (A) Preto – solução stock de enrofloxacin 10 ppm; Laranja – C8:C10; Verde – [N8881]Br:C10. (B) Preto – solução stock de cloranfenicol 10 ppm; Rosa – C10:C12; Azul – C8:C10. (C) Preto – solução stock de enrofloxacin 10 ppm; Laranja – Men:C8. .... n

Figura 62 – Otimização das condições de agitação da impregnação em suporte poroso – 15 minutos de agitação, 300 rpm, banho-maria de 25°C, para a norfloxacin 10 ppm em 34 membranas impregnadas em solvente C10:C12. Preto: solução stock de norfloxacin de 10 ppm; Laranja: 5 minutos de agitação; Azul: 15 minutos de agitação; Rosa: 30 minutos de agitação... o

Figura 63 – Otimização da quantidade de suporte poroso impregnado em solvente, para a norfloxacin de 10 ppm em 51 membranas de C10:C12, nas condições de 15 minutos de agitação a 300 rpm em banho de água a 25 °C. Preto: solução stock de norfloxacin de 10 ppm; Verde: ensaio 1; Violeta: ensaio 2. .... p

Figura 64 – Otimização das condições de diâmetro, massa e quantidade de membrana: (A) 34 membranas, (B) 262 membranas e (C) 524 membranas ambas de diâmetro 0,2 cm, impregnadas em C10:C12 para a extração de norfloxacin de uma solução aquosa de 10 ppm. (A) Preto: solução stock de enrofloxacin 10 ppm; Azul: ensaio 1; Roxo: Ensaio 2. (B) Preto: solução stock de cloranfenicol 10 ppm; Vermelho: ensaio 1; Azul: ensaio 2. (C) Preto: solução stock de norfloxacin 10 ppm; Vermelho: ensaio 1; Azul: ensaio 2. .... q

Figura 65 – Espectros de absorção dos solventes Timol:Mentol (A) e Timol:Carvacrol (B) impregnados em suporte, para cloranfenicol 10 ppm. (A) Preto: solução stock de cloranfenicol 10 ppm; Vermelho: ensaio 1; Azul: ensaio 2. (B) Preto: solução stock de cloranfenicol 10 ppm; Azul: ensaio 1; Roxo: ensaio 2. .... r

Figura 66 – Ciclos de extração por etapas para a enrofloxacin (A), cloranfenicol (B) e norfloxacin (C), em soluções aquosas de 10 ppm, pela impregnação de solventes em suporte poroso. (A) Preto: solução stock de enrofloxacin 10 ppm; Vermelho: ciclo 1; Azul: ciclo 2; Verde: ciclo 3. (B) Preto: solução stock de cloranfenicol 10 ppm; Vermelho: ciclo 1; Azul: ciclo 2; Verde: ciclo 3; (C) Preto: solução stock de norfloxacin 10 ppm; Vermelho: ciclo 1; Azul: ciclo 2; Verde: ciclo 3. .... s

Figura 67 – Reutilização de solventes eutéticos em soluções aquosas de 10 ppm de enrofloxacin (A), cloranfenicol (B) e norfloxacin (C) por impregnação de solventes em suporte poroso. (A) Preto: solução stock de enrofloxacin 10 ppm; Vermelho: ciclo 1; Azul: ciclo 2; Verde: ciclo 3. (B) Preto: solução stock de cloranfenicol 10 ppm; Vermelho: ciclo 1; Azul: ciclo 2; Verde: ciclo 3; Cinzento: ciclo 4; Roxo: ciclo 5; Azul claro: ciclo 6. (C) Preto: solução stock de norfloxacin 10 ppm; Vermelho: ciclo 1; Azul escuro: ciclo 2; Azul claro: ciclo 3. .... t

Figura 68 – Espectro de absorção obtido na reutilização de solvente C10:C12 impregnado em suporte poroso, para norfloxacin de concentração 2 ppm. Preto: solução stock de norfloxacin 2 ppm; Vermelho: ciclo 1; Azul: ciclo 2; Verde: ciclo 3..... U

## Lista de tabelas

Tabela 1 – Dados de produção da aquicultura, em milhões de toneladas, de 2006 (FAO 2006) e 2016 (FAO 2016) dos quinze principais países mundiais. Adaptado de Lulijwa et al. (2019) <sup>[7]</sup> ..	8
Tabela 2 – Resumo da quantidade de estudos publicados referentes aos antibióticos utilizados nos principais produtores mundiais entre 2008 e 2018. Adaptado de Lulijwa et al. (2019) <sup>[7]</sup> .....	9
Tabela 3 – Antibióticos usados na aquicultura em alguns países. Adaptado de P.H. Serrano, FAO (2015). <sup>[7]</sup> .....	9
Tabela 4 – Antibióticos autorizados para utilização na aquicultura. Adaptado de P.H. Serrano, FAO (2005). <sup>[8]</sup> .....	11
Tabela 5 – Antibióticos proibidos para animais destinados à produção de alimentos. Adaptado de P.H. Serrano, FAO (2005). <sup>[8]</sup> .....	12
Tabela 6 – Interdição de utilização de antibióticos para uso em medicina veterinária. Adaptado de P.H. Serrano, FAO (2005). <sup>[8]</sup> .....	13
Tabela 7 - Resumo da Diretiva 96/23/CE relativa aos produtos da aquicultura. Adaptado de Morris et al. (2012) <sup>[13]</sup> .....	14
Tabela 8 – Valores de LMR para antibióticos na UE. Adaptado de Samanidou et al. (2007) <sup>[14]</sup>	15
Tabela 9 – Resumo das técnicas para remoção/degradação de antibióticos de águas residuais provenientes da aquicultura. ....	16
Tabela 10 – Razão molar dos solventes eutéticos estudados. Fonte: Florindo et al. (2019) <sup>[36]</sup>	29
Tabela 11 – Materiais e equipamentos utilizados para a preparação de solventes eutéticos. ..	31
Tabela 12 – Reagentes utilizados para a preparação de solventes eutéticos. ....	32
Tabela 13 – Materiais e equipamentos utilizados para a construção da curva de calibração. ..	33
Tabela 14 – Compostos farmacêuticos utilizados para a construção das curvas de calibração. ....	33
Tabela 15 – Volume de soluções padrões de 2, 4, 6, 8 e 10 ppm partindo de solução stock de 10 ppm de antibiótico. ....	34
Tabela 16 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para a solubilidade dos antibióticos em solventes eutéticos. ....	35
Tabela 17 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados na extração líquido-líquido dos antibióticos em solventes eutéticos.....	36
Tabela 18 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados na impregnação de solventes em suporte poroso.....	39
Tabela 19 – Reta de calibração e coeficiente de correlação para cada antibiótico.....	43
Tabela 20 - Desvio de comprimento de onda no máximo de absorção entre o ensaiado e o da literatura.....	43
Tabela 21 – Resultados obtidos para a solubilidade aparente dos antibióticos em estudo nos solventes eutéticos. Todos os resultados foram medidos a 25°C e pressão atmosférica, à exceção do timol que foi medido a 50°C.....	44

Tabela 22 – Solubilidade dos antibióticos em água e Log P (ou Log Kow). Fonte: Drugbank [42] e PubChem [43], [44], [45].	45
Tabela 23 – Solubilidade em água e Log P (ou Log Kow) dos compostos individuais usados para preparar solventes eutéticos. Fonte: PubChem [51], [52], [5], [56], [57]. Chemicalbook [53]. Chemspider [54]. Chemsrsc [53].	47
Tabela 24 – Resultados de extração líquido-líquido obtidos pelo espectro de absorção para a enrofloxacin, cloranfenicol e norfloxacin para concentração de 5 ppm.	51
Tabela 25 – Resultados de extração líquido-líquido obtidos pelo espectro de absorção para a enrofloxacin, cloranfenicol e norfloxacin para concentração de 10 ppm.	53
Tabela 26 – Resultados de reutilização e reciclagem de solvente eutético pela extração líquido-líquido obtidos pelo espectro de absorção para a enrofloxacin, cloranfenicol e norfloxacin de concentração de 10 ppm.	56
Tabela 27 – Resultados obtidos na otimização do tempo de equilíbrio na extração de norfloxacin 10 ppm com solvente C10:C12 impregnado em suporte poroso.	60
Tabela 28 – Resultados obtidos na otimização da quantidade de membrana impregnada em C10:C12 para a extração de norfloxacin de uma solução aquosa de 10 ppm.	61
Tabela 29 – Resultados obtidos na otimização das condiçoes de membrana impregnada em C10:C12 para norfloxacin 10 ppm.	63
Tabela 30 – Resultados obtidos na extração por etapas de enrofloxacin, cloranfenicol e norfloxacin 10 ppm através de impregnação de solvente em suporte poroso.	65
Tabela 31 – Resultados obtidos na reutilização do solvente impregnado em suporte, para enrofloxacin, cloranfenicol e norfloxacin 10 ppm.	67
Tabela 32 – Resultados obtidos na reutilização do solvente C10:C12 impregnado em suporte, para norfloxacin em solução aquosa de 2 ppm.	69
Tabela 33 – Cculos para a massa de solvente eutético a ser preparado.	a
Tabela 34 – Resultados obtidos para o traçdo da curva de calibração da enrofloxacin.	b
Tabela 35 – Resultados obtidos para o traçdo da curva de calibração para cloranfenicol.	c
Tabela 36 – Resultados obtidos para o traçdo da curva de calibração da norfloxacin.	d

## Lista de abreviaturas

C8 – Ácido octanóico

C10 – Ácido decanóico

C12 – Ácido dodecanóico

CLO – Cloranfenicol

CW – Constructed Wetland

DES – Deep Eutectic Solvent

ENR – Enrofloxacin

ETAR's – Estações de Tratamento de Águas Residuais

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations

HBDs – Hydrogen Bond Donors

HBAs – Hydrogen Bond Acceptors

LLE – Liquid-Liquid Extraction

Men – Mentol

MS – Mass Spectrometry

NOR – Norfloxacin

PVDF – Fluoreto de Polivinilideno

RAS – Re-circulated Aquaculture System

SLE – Solid Liquid Equilibrium

Tim – Timol

UHPLC – Ultra-High Pressure Liquid Chromatography





# 1. Introdução

## 1.1. Aquicultura em tanques com recirculação

A criação de organismo aquático em ambiente controlado tem enorme importância na conservação de espécies em risco e abastecimento de peixe a nível mundial. Diversas áreas da aquicultura são praticadas como a marinha, piscicultura e moluscos, em diferentes tipos como extensivo, semi-intensivo e intensivo.

A aquicultura em tanques no que concerne à piscicultura é baseada no uso de filtros mecânicos e biológicos acoplados a um sistema de recirculação (RAS, do inglês Re-circulated Aquaculture System) (figura 1). Sistemas de cultivo intenso podem usar cerca de 300 L água nova/kg peixe produzido por ano, enquanto que os sistemas de ar livre usam cerca de 3 m<sup>3</sup> água nova/kg peixe por ano e sistemas tradicionais usam cerca de 30 m<sup>3</sup> água nova/kg peixe por ano. <sup>[1]</sup>

Do ponto de vista ambiental, a RAS é benéfica, uma vez que a água é um recurso escasso em muitas regiões do Mundo. Existe redução de patógenos, uma vez que as doenças invasivas do ambiente exterior são minimizadas, reduzindo assim a utilização de antibióticos. Este tipo de aquicultura torna mais fácil e barata a remoção de nutrientes excretados pelos peixes, sendo a descarga de água muito menor do que o descarregado numa piscicultura tradicional. <sup>[1]</sup>



Figura 1 – Exemplo de sistema com recirculação para a aquicultura em tanques. Fonte: J. Bregnballe, A Guide to Recirculation Aquaculture, FAO (2015). <sup>[1]</sup>

Num sistema de RAS é necessário tratar a água continuamente para remover os resíduos excretados pelo peixe e adicionar oxigénio para manter o peixe vivo. Apresenta como vantagens a eliminação total ou parcial das condições externas, e o controlo dos parâmetros de produção como a temperatura da água, níveis de oxigénio ou a luz do dia, fornecendo condições ideais para o peixe (figura 2). <sup>[1]</sup>

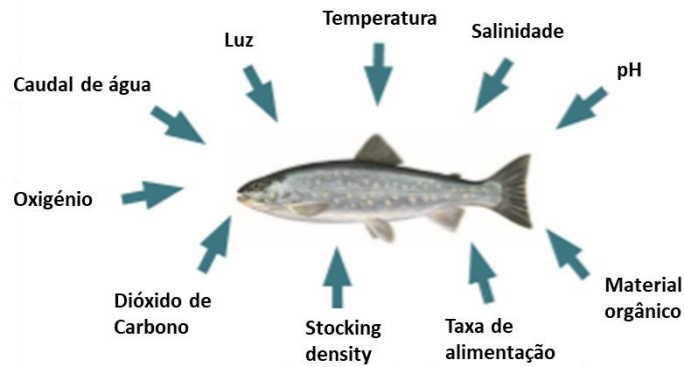


Figura 2 – Parâmetros que afetam o crescimento de um peixe na aquicultura. Adaptado de J. Bregnballe, *A Guide to Recirculation Aquaculture*, FAO (2015).<sup>[1]</sup>

As possíveis desvantagens dos RAS incluem maior investimento de capital, aumento de energia e requisitos de gestão mais qualificados. Embora os RAS's sejam ambientalmente saudáveis em termos de conservação de água, existe a produção de um efluente alto em sólidos, nutrientes e carência bioquímica de oxigênio (BOD), que podem ter impactos ambientais adversos se não for efetuada uma gestão adequadamente.<sup>[2]</sup>

Estudos realizados pela FAO em 2002 previram um aumento de 40,5% na produção mundial de aquicultura até 2030. Uma quantidade significativa de antibióticos é usada para manter essa alta produção, com o principal objetivo de prevenir e tratar infecções, bem como promover o crescimento animal.<sup>[3]</sup>

Num sistema básico de recirculação (figura 3), tal como o sugerido por Bregnballe (2015)<sup>[1]</sup>, na saída dos tanques de peixes, a água flui para um filtro mecânico e posteriormente para um filtro biológico, antes de ser removido o dióxido de carbono e a água devolvida aos tanques de peixes. Este é o princípio básico da recirculação na aquicultura, que pode ser considerada a forma mais ecológica de produzir peixes a um nível comercialmente viável.<sup>[1]</sup>

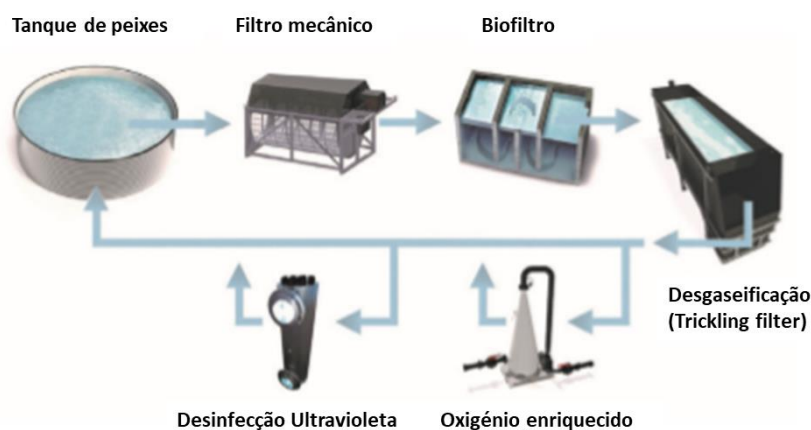


Figura 3 – Sistema básico de recirculação para aquicultura: filtração mecânica, tratamento biológico e aeração. Adaptado de J. Bregnballe, *A Guide to Recirculation Aquaculture*, FAO (2015).<sup>[1]</sup>

Várias outras instalações podem ser adicionadas, como oxigenação com oxigênio puro, desinfecção por ultravioleta ou desinfecção por ozono, regulação automática do pH, troca de calor, desnitrificação, etc. [1]

Ranjan *et al.* (2019) [4] propuseram um projeto de sistema de recirculação para a aquicultura para peixes tropicais marinhos, com os seguintes componentes (figura 4): tanque de criação de peixes, câmara coletora de ovos, bomba elétrica, filtro de areia, *skimmer* e filtro biológico. [4]

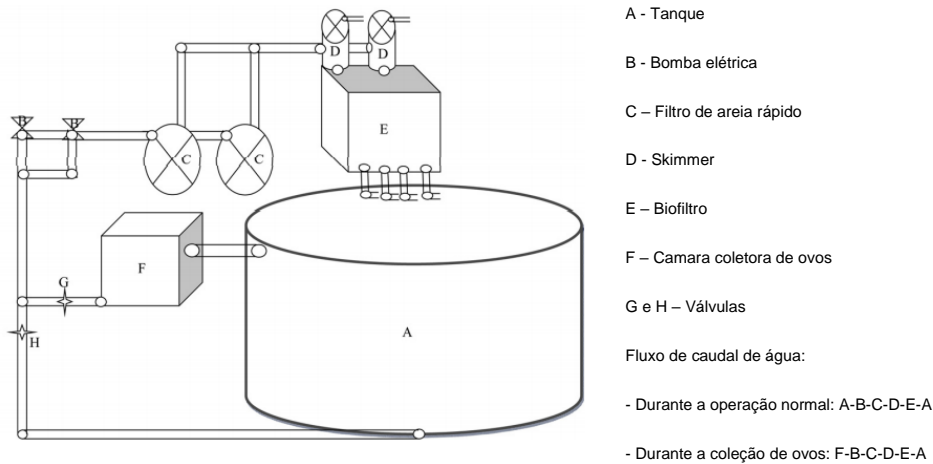


Figura 4 – Esquema de um sistema de recirculação para a aquicultura. Adaptado de Ranjan *et al.* (2019) [4]

## 1.1. Componentes principais do sistema de recirculação para a aquicultura

### Tanque de peixes

Ranjan *et al.* (2019) [4] usaram um tanque circular de concreto de 8 m de diâmetro e 2,5 m de profundidade no estudo de RAS. [4] Outros tipos de tanques podem ser considerados como circular, D-ended raceway, Raceway type, conforme figura 5. [1]

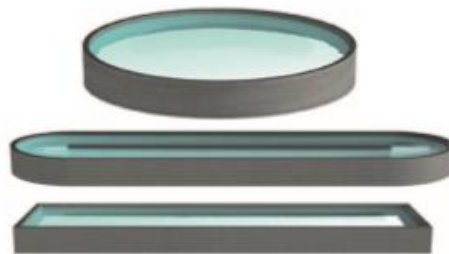


Figura 5 – Tipos de tanques na aquicultura. Fonte: J. Bregnballe, *A Guide to Recirculation Aquaculture*, FAO (2015). [1]

### Filtro mecânico

Ranjan *et al.* (2019) <sup>[4]</sup> utilizaram filtros rápidos de areia branca, de partícula de 2 mm de tamanho, para remover os resíduos sólidos em suspensão com mais de 60 µm de partícula. <sup>[4]</sup>

Bregnballe (2015) <sup>[1]</sup> propõe a utilização de um tambor – drumfilter – como filtro mecânico, tipicamente para tamanhos de partículas de 40 a 100 µm, conforme figura 6. <sup>[1]</sup>



Figura 6 – Drumfilter. Fonte: J. Bregnballe, *A Guide to Recirculation Aquaculture*, FAO (2015). <sup>[1]</sup>

De acordo com o esquema representado na figura 6: <sup>[1]</sup>

1. A água a ser filtrada entra no tambor;
2. A água é filtrada através dos elementos de filtro do tambor. A diferença no nível da água dentro/fora do tambor é a força motriz da filtração;
3. Os sólidos são retidos nos elementos do filtro;
4. A água dos bocais de enxague é pulverizada do lado de fora dos elementos do filtro. O material orgânico rejeitado é lavado dos elementos filtrantes para uma bandeja;
5. A lama flui junto com a água por gravidade, saindo do filtro que sai da piscicultura para tratamento externo de águas residuais. <sup>[1]</sup>

### Filtro biológico

Um tanque de cimento armado de 2 toneladas de capacidade foi usado por Ranjan *et al.* (2019) <sup>[4]</sup> como tanque de filtro biológico, preenchido com biosferas e conchas (0,8 m<sup>3</sup>) para o desenvolvimento de bactérias envolvidas no processo de nitrificação. O tanque foi construído num nível ligeiramente elevado (0,5 m) permitindo que a água do tanque do filtro biológico passe diretamente para o tanque de peixes. <sup>[4]</sup>

A saída de água situa-se no fundo do tanque do filtro biológico com quatro tubos de PVC de 2 polegadas de diâmetro e ajustada num ângulo de 45°, dos quais a água cai livremente por gravidade para o tanque de peixes. <sup>[4]</sup>

Bregnballe (2015) <sup>[1]</sup> recomenda como ponto de ajuste um pH entre 7,0 - 7,5 no filtro biológico e refere que os dois fatores principais que afetam o pH no sistema de recirculação de água são o CO<sub>2</sub> do peixe e a atividade biológica do biofiltro (figura 7). <sup>[1]</sup>

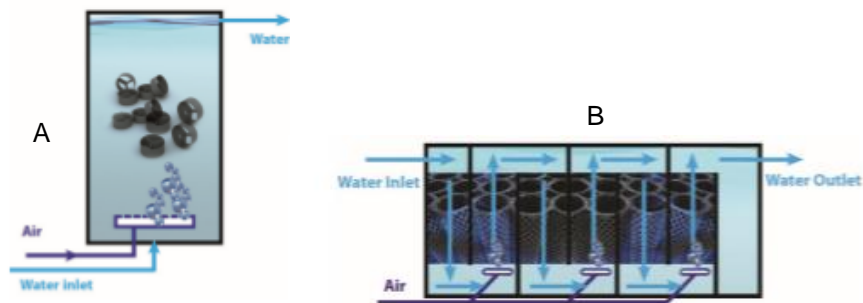


Figura 7 – Biofiltros de leito móvel (A) e biofiltros de leito fixo (B). Fonte: J. Bregnballe, *A Guide to Recirculation Aquaculture*, FAO (2015). <sup>[1]</sup>

### Desgaseificador

Antes que a água volte para os tanques de peixes, os gases acumulados prejudiciais aos peixes, devem ser removidos. Esse processo de desgaseificação é realizado por aeração da água, e o método é frequentemente chamado de *stripping*. A água contém dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) da respiração dos peixes e das bactérias do biofiltro nas concentrações mais altas, assim como azoto livre (N<sub>2</sub>). A aeração pode ser realizada bombeando ar para dentro da água, através do qual, o contato turbulento entre as bolhas de ar e a água, expulsa os gases. <sup>[1]</sup>

No desgaseificador os gases são eliminados pelo contato físico entre a água e o meio plástico empilhado numa coluna. A água é levada para o topo do filtro sobre uma placa de distribuição com orifícios e libertada através do meio plástico para maximizar a turbulência e o contato - processo de decapagem (figura 8). <sup>[1]</sup>

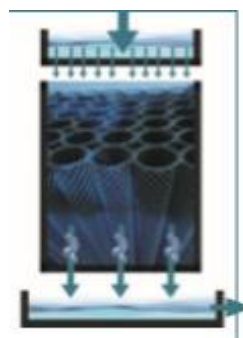


Figura 8 – Trickling filter envolto num revestimento de plástico azul para eliminar respingos no chão. Fonte: J. Bregnballe, *A Guide to Recirculation Aquaculture*, FAO (2015). <sup>[1]</sup>

### Oxigenação

Quando a água passa pelos tanques de peixes, o conteúdo de oxigênio diminui, normalmente para 70%, e o conteúdo é reduzido ainda mais no biofiltro. A aeração dessa água normalmente eleva a saturação em torno de 90%. Os níveis de saturação acima de 100% exigem um sistema usando oxigênio puro, fornecido em tanques na forma de oxigênio líquido, ou produzido num gerador de oxigênio. Existem várias maneiras de produzir água saturada de oxigênio, utilizando sistemas de cone de oxigênio de alta pressão, conforme figura 9. [1]



*Figura 9 – Cone de oxigênio para dissolver oxigênio puro em alta pressão. Fonte: J. Bregnballe, A Guide to Recirculation Aquaculture, FAO (2015). [1]*

A água e oxigênio puro são misturados sob pressão, e o oxigênio é forçado a entrar na água. No cone de oxigênio, a pressão é realizada com uma bomba, criando uma alta pressão tipicamente em torno de 1,4 bar no cone. [1]

### Desinfecção Ultravioleta

A desinfecção por ultravioleta (UV) funciona através da aplicação de luz em comprimentos de onda que destroem o DNA em organismos biológicos. O tratamento é utilizado para fins médicos e não afeta os peixes, pois o tratamento UV da água é aplicado fora da área de produção de peixes. O melhor controle é alcançado quando a filtração mecânica eficaz é combinada com uma biofiltração completa para remover efetivamente a matéria orgânica da água do processo, fazendo com que a radiação UV funcione de maneira eficiente. Para controlar bactérias e vírus, a água precisa ser tratada com aproximadamente 2000 a 10000  $\mu\text{Ws}/\text{cm}^2$  para eliminar 90% dos organismos, os fungos precisarão de 10000 a 100000  $\mu\text{Ws}/\text{cm}^2$ , e pequenos parasitas de 50000 a 200000  $\mu\text{Ws}/\text{cm}^2$ . A iluminação UV usada na aquicultura deve funcionar sob a água para proporcionar a máxima eficiência: as lâmpadas instaladas fora da água terão pouco ou nenhum efeito por causa da reflexão da superfície da água (figura 10). [1]



Figura 10 – Sistemas de tratamento UV fechado (A) e aberto (B). Fonte: J. Bregnballe, *A Guide to Recirculation Aquaculture*, FAO (2015). [1]

### Câmara coletora de ovos

Um tanque de cimento quadrado com volume de água de 1 m<sup>3</sup> pode ser usado para recolha de ovos e recirculação das águas. Esta câmara está conetada ao tanque de criação de peixes com dois tubos de PVC de 4 polegadas de diâmetro, onde a água é reenviada por meio de uma bomba elétrica. [4]

## **1.2. Utilização de antibióticos na aquicultura**

A crescente procura por produtos de peixe promoveu a intensificação da produção aquícola, levando a ampla aplicação de antibióticos para prevenção e tratamento de doenças bacterianas. O uso excessivo de antibióticos na aquicultura pode resultar na presença de antibióticos residuais em produtos comerciais de peixe e moluscos. O consumo não intencional de antibióticos pode levar ao desenvolvimento de resistência a antibióticos em bactérias patogénicas humanas. [5]

Na aquicultura, os antibióticos são geralmente administrados em alimentos revestidos à superfície ou granulados, com imersão em água ou injeção. Estes nem sempre foram usados com responsabilidade na aquicultura, e o controle do seu uso não forneceu garantia adequada da prevenção de riscos para humanos. O uso responsável de fármacos requer instruções claras dos fabricantes de medicamentos, manuseio e distribuição adequada pelos revendedores e supervisão veterinária na administração pelos produtores. [6]

Globalmente, a China lidera a produção de peixe de aquicultura, entre 2006 e 2016, muito à frente dos quinze principais países produtores da aquicultura (tabela 1), e a Noruega em 2016 na nona posição, corresponde ao país europeu com a maior produção, segundo dados da FAO. [7]

Tabela 1 – Dados de produção da aquicultura, em milhões de toneladas, de 2006 (FAO 2006) e 2016 (FAO 2016) dos quinze principais países mundiais. Adaptado de Lulijwa et al. (2019) [7]

Posição	País Produtor	Quantidade produzida		País Produtor	Quantidade produzida	
		em milhões de toneladas 2006	%		em milhões de toneladas 2016	%
1	China	39,57	69,06	China	63,72	61,44
2	Índia	3,18	5,55	Indonésia	16,62	16,02
3	Indonésia	2,48	4,33	Índia	5,70	5,50
4	Filipinas	2,09	3,65	Vietname	3,64	3,50
5	Tailândia	1,35	2,36	Filipinas	2,20	2,12
6	Vietname	1,67	2,92	Bangladesh	2,20	2,12
7	Coreia do Sul	1,28	2,23	Coreia do Sul	1,86	1,79
8	Japão	1,22	2,14	Egito	1,36	1,31
9	Bangladesh	0,89	1,56	Noruega	1,33	1,28
10	Chile	0,83	1,45	Japão	1,07	1,03
11	Noruega	0,71	1,24	Chile	1,05	1,01
12	Egito	0,60	1,04	Myanmar	1,02	0,98
13	Coreia do Norte	0,58	1,01	Tailândia	0,96	0,93
14	EUA	0,52	0,91	Brasil	0,58	0,56
15	Taiwan	0,32	0,55	Malásia	0,41	0,39
	<b>Total</b>	<b>57,30</b>	<b>100,00</b>	<b>Total</b>	<b>103,72</b>	<b>100,00</b>

O uso de antibióticos na aquicultura pode ser classificado como terapêutico, profilático ou metafilático. O uso terapêutico corresponde ao tratamento de infecções estabelecidas. Na aquicultura, antibióticos em níveis terapêuticos são frequentemente administrados por curtos períodos de tempo, via oral, a grupos de peixes que compartilham tanques. Metafilaxia é um termo usado para procedimentos de medicação em grupo, que visa tratar animais doentes e também medicar outros animais no grupo para prevenir doenças. Profilaxia significa o uso preventivo de antibióticos em animais ou grupos para impedir o desenvolvimento de infecções. A via de entrada dos antibióticos em animais aquáticos ocorre através da mistura do antibiótico com ração especialmente formulada. No entanto, os peixes não metabolizam eficazmente os antibióticos e grande parte é descartado nas fezes. Estima-se que 75% dos antibióticos alimentados pelos peixes são excretados na água. [6]

Lulijwa et al. (2019) [7] investigaram 67 antibióticos usados na aquicultura de 11 dos 15 principais países produtores, entre 2008 e 2018, resumido por classes de antibióticos na tabela 2. Descobriram que entre os 11 principais países produtores, cerca de 73% aplicavam oxitetraciclina, sulfadiazina e florfenicol, enquanto 55% usavam sulfadimetoxicina, eritromicina, amoxicilina e enrofloxacina. Em média, os países utilizaram cerca de 15 antibióticos, em que o Vietname (39) e a China (33) apresentam-se com o maior número de compostos antibióticos utilizados. [7]



Tabela 2 – Resumo da quantidade de estudos publicados referentes aos antibióticos utilizados nos principais produtores mundiais entre 2008 e 2018. Adaptado de Lulijwa et al. (2019) [7]

Classe de Antibióticos	Países mundiais com maior produção de Aquicultura	Total de estudos publicados	% Total
Nitrofuranos	Bangladesh, Vietnan, Filipinas	05	3.0
Quinolones	China, Vietnan, Filipinas, Bangladesh, Coreia do Sul, Noruega, Chile, Egito, Tailândia, Brasil	29	17.5
Beta-lactâmicos	China, Vietnan, Filipinas, Bangladesh, Coreia do Sul, Chile, Tailândia	15	9.0
Polimixina	Vietnan	01	0.6
Macrolídeos	China, Índia, Vietnan, Filipinas, Bangladesh	12	7.2
Cefalosporinas	Vietnan	01	0.6
Aminoglicosídeos	China, Vietnan, Bangladesh	08	4.8
Anfenicóis	China, Índia, Vietnan, Filipinas, Bangladesh, Coreia do Sul, Noruega, Chile, Egito, Brasil	14	8.4
Rifamicina	Vietnan, Filipinas	03	1.8
Tetraciclina	China, Vietnan, Filipinas, Bangladesh, Coreia do Sul, Chile, Tailândia, Brasil	19	11.5
Lincosamidas	China	01	0.6
Sulfonamidas	China, Índia, Vietnan, Filipinas, Bangladesh, Coreia do Sul, Noruega, Tailândia	57	34.3
Nitroimidazoles	Vietnan	01	0.6
Totais		166	100

Na Tabela 3, estão listados os antibióticos usados para fins de aquicultura em alguns países. [8]

Tabela 3 – Antibióticos usados na aquicultura em alguns países. Adaptado de P.H. Serrano, FAO (2015). [7]

País	Antibiótico	Finalidade	Modo de Aplicação
Reino Unido	Oxitetraciclina, ácido oxolínico, amoxicilina e co-trimazina	Não mencionado	
Noruega	Benzilpenicilina+, di-hidro-estreptomicina, florfenicol, flumequina, ácido oxolínico, oxitetraciclina, co-trimazina	Não mencionado	
EUA	Sulfadimetoxina e ormetoprim	Controlar a furunculose ( <i>Aeromonas salmonicida</i> ) em salmonídeos. Controlar a septicemia entérica ( <i>Edwardsiella ictaluri</i> ) no catfish	
	Oxitetraciclina	Para controlar a úlcera, furunculose, septicemia hemorrágica bacteriana e doença de <i>Pseudomonas</i> em salmonídeos. Controlar septicemia hemorrágica bacteriana e doença de <i>Pseudomonas</i> em catfish	
México	Enrofloxacina, oxitetraciclina		Suplemento na alimentação
	Oxitetraciclina	Doença de Columnaris	Suplemento na alimentação
Índia	Sulfadiazina + trimetoprim	Tipo ulcerativo e sistêmico ( <i>Aeromonas hydrophila</i> )	Pó dispersivo em água
	Clorotetraciclina	Não mencionado	
	Oxitetraciclina	Doença bacteriana de peixes e camarões	Lavagem e oral
	Eritromicina	Doença bacteriana de peixes e camarões	Lavagem
Indonésia	Estreptomicina	Doença bacteriana em camarão e peixes ornamentais	Longa lavagem
	Neomicina	Doença bacteriana em camarão e peixes ornamentais	Lavagem
	Enrofloxacina		Lavagem
Japão	Amoxicilina, ampicilina, eritromicina, ácido oxolínico, florfenicol, tianfenicol, sulfanometoxina, sulfadimetoxina		Oral
China	Sulfonamida, nistatina, penicilina, penicilina, doxiciclina, eritromicina, ácido oxolínico		Injeção, lavagem ou oral

### 1.3. Fontes e destino da poluição por antibióticos na água

Existem três principais vias de despejo de antibióticos em águas doces (figura 11): (1) efluentes das estações de tratamento de águas residuais (ETAR's), (2) fábricas e (3) criação e aquicultura de animais. Estimou-se que o consumo mundial de antibióticos esteja compreendido entre 100.000 e 200.000 toneladas por ano, sendo 50% usado para medicina veterinária e como promotor de crescimento. [9]

Em geral, entre 50 a 80% do total de antibióticos ingeridos são excretados, através de urina e fezes de animais. As taxas mais altas de excreção são observadas para a ciprofloxacina (50 a 80%) e tetraciclina (80 a 90%), enquanto menores taxas de excreção são observadas para eritromicina (5 a 10%), sulfametoxazol (15 a 30%) ou claritromicina (25%). [9]

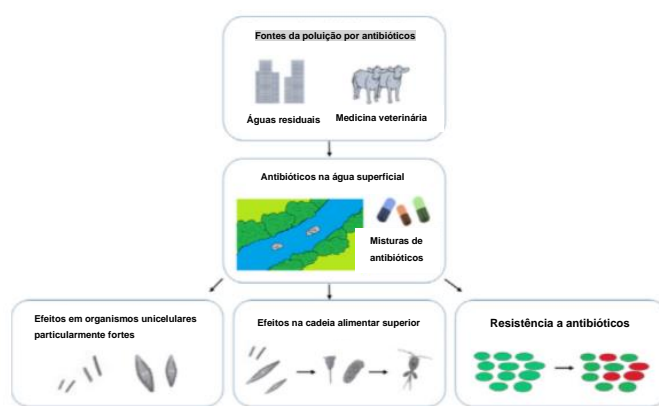


Figura 11 – Fontes de poluição por antibióticos na água. Adaptado de Danner et al. (2019) [9]

Nas águas residuais da aquicultura, os antibióticos podem ser eliminados através da retenção em lamas e/ou degradação biótica e abiótica. No entanto, a degradação é geralmente incompleta, e os antibióticos entram no meio ambiente, principalmente em águas doces. [9]

A maioria dos sistemas de recirculação de aquicultura terá um excesso de água do processo para equilibrar a água que entra e sai do sistema. Essa água é a mesma onde se encontram os peixes nos tanques, e como tal, não é poluente, a menos que a quantidade de água descarregada pelo transbordamento seja excessiva e a descarga anual nesse ponto aumente. Quanto maior a taxa de recirculação, menos água será descarregada pelo transbordamento. [1]

As águas residuais que saem do processo de recirculação geralmente vêm do filtro mecânico, onde as fezes e outras matérias orgânicas são separadas na saída do filtro de lamas. Os biofiltros de limpeza e lavagem também aumentam o volume total de águas residuais do ciclo de recirculação. [1]

## 1.4. Análise quantitativa de antibióticos na aquicultura

A utilização ampla de cromatografia líquida de alta pressão (UHPLC) para determinação de antibióticos na água, utiliza partículas de menor diâmetro (cerca de 1,7 µm) na fase estacionária e colunas curtas, permitindo assim pressões e picos mais estreitos, e conseqüentemente, menor tempo de análise. O uso de quantidades menores de solventes no UHPLC também é uma vantagem quando comparado aos métodos baseados em outras técnicas cromatográficas. Além disso, o uso de espectrometria de massa (MS) acoplado à UHPLC leva a uma diminuição do volume de solvente, maior rendimento e melhor resolução, tempo mínimo de análise, combinando separação, sensibilidade e cromatografia de alta resolução. [10]

As fases móveis mais comuns para estudos de resíduos de antibióticos usando LC-MS / MS (do inglês, Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry) são o metanol e/ou acetonitrila-água, e ácido fórmico é frequentemente adicionado em níveis baixos para facilitar a ionização, garantindo que o analito é mais básico que o solvente. [11]

## 1.5. Legislação e limite máximo residual de antibióticos na aquicultura

Os antibióticos usados na aquicultura nos Estados Unidos da América (EUA) são aprovados pelo órgão governamental responsável pela medicina veterinária: a Food and Drug Administration - FDA. Os seguintes antibióticos são autorizados para uso na aquicultura, conforme descrição na tabela 4: oxitetraciclina, florfenicol e sulfonamidas. Os regulamentos da FDA proíbem o uso de cloranfenicol em animais destinados à produção de alimentos. A Agência Canadense de Proteção à Saúde, a União Europeia (UE) e o Japão aplicam a mesma medida de proibição de cloranfenicol na alimentação. No entanto, cloranfenicol é usado na cultura de camarão na América Latina e na Ásia, onde o camarão é cultivado principalmente para exportação para os mercados europeu, japonês e norte americano. [8]

Tabela 4 – Antibióticos autorizados para utilização na aquicultura. Adaptado de P.H. Serrano, FAO (2005). [8]

Antibióticos	Tratamento para	Autoridade Reguladora
Oxitetraciclina	Furunculose em salmonídeos (salmão ou truta) causada por <i>Aeromonas salmonicida</i> Gafkemia em lagostas (causada por <i>Aerococcus viridans</i> ) Septicemia hemorrágica por <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>A. sobria</i> e <i>Pseudomonas</i> Doença de água fria em salmonídeos, causada por <i>Cytophaga psychrophilia</i> Doença de Columnaris em salmonídeos, causada por <i>Chondrococcus (Flexibacter) columnaris</i> Doença entérica de boca vermelha, causada por <i>Yersinia ruckeri</i> Indicado para o controle da doença de <i>Pseudomonas</i> em peixe-gato e salmonídeos Indicado para o controle de doença de úlcera causada por <i>Haemophilus piscium</i> de salmonídeos (salmão, truta)	USP - United States Pharmacopoeia
Florfenicol	Indicado para o tratamento de furunculose causadas por estirpes de <i>Aeromonas salmonicida</i>	USP - United States Pharmacopoeia
Sarrafloxacina	Indicado para o tratamento de furunculose, vibriose e Redmouth entérico em salmonídeos	EMA - European Medicines Agency (UE)
Eritromicina	No tratamento da doença renal bacteriana ( <i>Renibacterium salmoninarum</i> ) e streptococcosis no Japão	GESAMP (IMO/FAO/UNESCO-IOC/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP) - Grupo de peritos sobre aspectos científicos da proteção ambiental marinha
Sulfonamidas	Contra furunculose, doença entérica de boca vermelha e vibriose	GESAMP (IMO/FAO/UNESCO-IOC/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP) - Grupo de peritos sobre aspectos científicos da proteção ambiental marinha

Na Noruega, país europeu com a maior produção de peixe para a aquicultura, o uso de antibióticos requer uma prescrição do veterinário para fins terapêuticos, sendo vendidos em farmácias ou em fornecedores autorizados pela Agência Norueguesa de Medicamentos, com a obrigação de indicar a quantidade de antibióticos utilizados e manter registos de prescrições. [12]

Na tabela 5 apresenta-se dois dos antibióticos utilizados neste trabalho e o motivo pelo qual o seu uso é proibido em alguns países como EUA e Canadá, para animais destinados à produção de alimentos. A enrofloxacin (ENR) pertence ao grupo das quinolonas e pode biotransformar-se em ciprofloxacina, e representam um grupo de antibióticos sintéticos usados na medicina humana e veterinária, e são utilizados no tratamento de septicemia ou doenças de pele. [12]

O amfenicol mais representativo é cloranfenicol (CLO), que é um antibiótico de amplo espectro e um inibidor da síntese proteica que é eficaz contra uma ampla gama de microrganismos e tem sido amplamente utilizado desde os anos 50 para tratar animais produtores de alimentos. O CLO tem sido associado a efeitos tóxicos graves, incluindo depressão da medula óssea. É particularmente grave na anemia aplástica, e independente da dose é fatal. O conhecido risco de doenças do sangue e propriedades carcinogénicas do CLO, e a ausência de níveis seguros de resíduos, levou a UE a proibi-lo para uso veterinário. O CLO também é proibido em muitos outros países, incluindo EUA, Canadá, Austrália, Japão e China. Não foi estabelecido nenhum limite máximo residual para este antibiótico. Apesar dessa proibição legal, o CLO pode ser detetado em vários alimentos de origem animal, incluindo produtos da aquicultura. É importante controlar resíduos de CLO em alimentos de origem animal e necessário desenvolver métodos sensíveis para a sua deteção e quantificação. As técnicas devem detetar a presença do composto no nível mínimo exigido de limite de desempenho (MRPL) (0,3 mg/kg, em todos os alimentos de origem animal). [12]

Tabela 5 – Antibióticos proibidos para animais destinados à produção de alimentos. Adaptado de P.H. Serrano, FAO (2005). [8]

Antibiótico	Proibição de utilização em animais destinados a produção de alimentos	Razão	Espetro de ação contra microrganismos	Nomes de marcas comuns para uso veterinário
Cloranfenicol	Argentina Canadá União Europeia Japão Estado Unidos da América	Induz anemia aplástica humana	Amplamente espectro Eficaz contra: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Aerobacter aerogenes</i> , espécies de <i>Salmonella</i> , espécies de <i>Pseudomonas</i> , bactérias anaeróbicas	Azramycine S125 Azramycine S250 Chloromycetin Chlor Palm 125 Chlor Palm 250 Duricol Karomycin Palmitate 125 Karomycin Palmitate 250 Novochlorocap
Enrofloxacin	Estado Unidos da América Canadá	O uso é limitado pelo desenvolvimento da resistência bacteriana	Amplamente espectro Bactericida em concentrações relativamente baixas, altamente bio-disponível após administração oral na maioria das espécies, e consegue boa penetração nos tecidos e fluidos corporais	Baytril Baytril 100

De acordo com a Agência Europeia de Avaliação de Medicamentos (EMA, do inglês European Medicines Agency, formalmente conhecida como European Agency for the Evaluation of Medicinal Products), vários antibióticos não se encontram disponíveis para uso em medicina veterinária conforme apresentado na tabela 6, onde se inclui o cloranfenicol, e é dada sugestão de antibióticos alternativos para a sua substituição. [8]

Tabela 6 – Interdição de utilização de antibióticos para uso em medicina veterinária. Adaptado de P.H. Serrano, FAO (2005). [8]

Antibiótico	Indicação	Espécies	Exemplo de alternativa
<b>Cefuroxima</b>	Tratamento da mastite clínica em bovinos em lactação	Gado	Existem vários medicamentos disponíveis contra mastite
<b>Cloranfenicol</b>	Tratamento de infecções bacterianas (contra amplo espectro de bactérias)	Gado, porcos, aves de capoeira	Tianfenicol; Florfenicol; Amoxicilina
<b>Nistatina</b>	Tratamento da candidíase	Aves de capoeira	Natamicina

Um dos princípios mais relevantes da legislação europeia, especificamente na Diretiva 2001/82/CE, alterada pela Diretiva da Comissão 2009/9/CE e pelo Regulamento 470/2009, é a garantia de que os alimentos de origem animal não incluem resíduos de medicamentos que podem induzir efeitos nocivos à saúde humana do ponto de vista toxicológico, farmacológico ou microbiológico. A lei, reconhecendo a importância do uso de produtos farmacêuticos nessas atividades, enfatiza que a saúde pública em segurança deve ser a primeira preocupação. O Regulamento Nº 470/2009 do Parlamento e do Conselho Europeu (CE, 2009b) descreve os procedimentos para o estabelecimento de limites de resíduos de substâncias farmacologicamente ativas em produtos alimentares de origem animal. Este documento descreve as regras e procedimentos que estabelecem a concentração máxima de um resíduo de um fármaco permitida em alimentos de origem animal: o Limite Máximo de Resíduos (LMR). [12]

O Regulamento da UE 37/2010 classificou as substâncias farmacologicamente ativas em relação aos limites máximos, ordenado por ordem alfabética. Os antibióticos, como medicamentos veterinários permitidos, estão incluídos no grupo B e muitos têm dados disponíveis sobre LMR. [12]

Na UE, os regimes de amostragem para produtos da aquicultura são prescritos na Diretiva 96/23/CE (CE, 1996). Os resíduos preocupantes são divididos no grupo A e no grupo B. O grupo A inclui substâncias com efeito anabolizante e substâncias para as quais um LMR não pode ser definido. O grupo B inclui medicamentos veterinários, como antibióticos e contaminantes. [12]

Na UE, os regimes de amostragem para produtos da aquicultura são prescritos na Diretiva 96/23/CE, cobrindo a situação em que o animal foi criado na UE. Inspeções podem ser realizadas em qualquer ponto de produção, por autoridades dos países membros, permitindo que sejam tomadas medidas corretivas envolvendo o produtor – tabela 7. [13]

*Tabela 7 - Resumo da Diretiva 96/23/CE relativa aos produtos da aquicultura. Adaptado de Morris et al. (2012) [13]*

**Resumo da Diretiva 96/23 / CE relativa aos produtos da aquicultura**

- Uma amostra é definida como um ou mais peixes, de acordo com o tamanho do peixe em questão e os requisitos do método analítico. O número mínimo de amostras coletadas cada ano é de pelo menos 1 por 100 toneladas da produção anual.
- Os compostos procurados e as amostras selecionadas para análise são escolhidas de acordo com o uso provável de substâncias e a proporção de substâncias do grupo A e do grupo B.
- As substâncias do grupo A têm um efeito anabólico e são substâncias não autorizadas para as quais não existe um LMR. Essas substâncias incluem nitrofuranos, cloranfenicol, dimetridazol e metronidazol. A amostragem para este grupo de substâncias deve incluir um terço do total de amostras colhidas para análise por ano.
- As substâncias do grupo B são medicamentos veterinários, incluindo substâncias utilizadas para fins veterinários e contaminantes. Essas substâncias incluem corantes e organofosforados. Amostragem para este grupo de substâncias deve incluir dois terços do total de amostras colhidas para análise por ano..

Para proteger a saúde humana dos resíduos potencialmente prejudiciais de antibióticos, a UE estabeleceu LMR's seguros para substâncias autorizadas para outros medicamentos veterinários em animais produtores de alimentos (Regulamento CEE 2377/90 da UE), que descreve o procedimento para o estabelecimento de LMR para medicamentos veterinários em alimentos para animais. As orientações técnicas e os critérios de desempenho para o controle de resíduos, no âmbito da Diretiva 96/23/CE, são explicados na Decisão da Comissão 657/2002/CE, relativa ao desempenho de métodos analíticos para a determinação de resíduos orgânicos, e contaminantes em animais vivos e produtos animais. De acordo com as regulamentações, não há obrigação de usar métodos padronizados no controle de resíduos de animais produtores de alimentos. Em vez disso, é aplicada uma abordagem de critérios, que estabelece características de desempenho, limites e condições que devem ser observados pelos métodos analíticos. [14]

Nos EUA, os antibióticos proibidos para uso em animais na aquicultura incluem cloranfenicol, dimetridazol, furazolidona (exceto para uso tópico aprovado), nitrofurazona (exceto para uso tópico aprovado) e fluoroquinolonas. Na Tabela 8 encontra-se os valores de LMR para antibióticos encontrados na UE. [14]

Tabela 8 – Valores de LMR para antibióticos na UE. Adaptado de Samanidou et al. (2007) [14]

Classe de Antibiótico Antibiótico	Espécie animal	Limite Máximo Residual LMR (µg/kg)
<b>Sulfonamidas</b>	Todas as espécies produtoras de alimentos	O total de resíduos combinados de todas as substâncias do grupo sulfonamida não deve exceder 100 µg/kg
<b>Penicilinas</b>		
Amoxicilina	Todas as espécies produtoras de alimentos	50
Cloxacilina	Todas as espécies produtoras de alimentos	300
<b>Quinolonas</b>		
Enrofloxacina	Todas as espécies produtoras de alimentos, exceto bovinos, ovinos, caprinos, suínos, coelhos e aves de capoeira	Soma de enrofloxacina e ciprofloxacina não deve exceder 100 µg/kg
Flumequina	Peixe de barbatana	600
Ácido Oxolínico	Peixe de barbatana	100
Sarafloxacina	<i>Salmonidae</i>	30
<b>Macrólídeos</b>		
Eritromicina	Todas as espécies produtoras de alimentos	200
<b>Florfenicol</b>	Peixe de barbatana	1000
<b>Tetraciclina</b>		
Clortetraciclina	Todas as espécies produtoras de alimentos	100
<b>Nitrofuranos</b>	Não é possível fixar níveis máximos	

Na China, desde 2003, várias reformas tentam melhorar a segurança alimentar e regular a indústria chinesa da aquicultura, proibindo alimentos que contenham ou sejam contaminados por substâncias tóxicas e prejudiciais à saúde humana e alimentos que contenham parasitas patogênicos, microrganismos ou quantidade de toxina microbiana que exceda a tolerância prescrita pelo Estado Chinês. No entanto, o modelo chinês não considera os estágios iniciais da produção na sua estrutura regulatória. Outro problema é a escassez de inspetores oficiais para acompanhar o vasto número de pequenos e grandes produtores, e a proteção do governo local aos produtores que juntos, podem diminuir a eficácia do processo de inspeção. Apesar dos esforços da China, nos últimos anos, para garantir a segurança alimentar e a confiança do consumidor, relatórios de antibióticos medicamento importantes, como tetraciclina e detecções de antibióticos veterinários ilegais como cloranfenicol, nas águas chinesas sugerem que a aplicação do regulamento é negligente. [12]

## 1.6. Tecnologias utilizadas para remoção/degradação de antibióticos de águas residuais provenientes da aquicultura

Na Tabela 9 encontra-se as tecnologias utilizadas na remoção e degradação de antibióticos de águas residuais provenientes da aquicultura, especificando vantagens e desvantagem, a concentração de antibióticos usados no efluente e após tratamento e a taxa de remoção.

Tabela 9 – Resumo das técnicas para remoção/degradação de antibióticos de águas residuais provenientes da aquicultura.

	Vantagens	Desvantagens	Antibiótico utilizado	Conc. antibiótico no efluente	Conc. antibiótico após tratamento	Taxa de remoção	Referência Bibliográfica	
Técnicas de remoção de antibióticos na Aquicultura	Carvão ativado	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Baixa eficiência de remoção</li> <li>- Adsorventes difíceis de reciclar e regenerar</li> <li>- Pequenos depósitos de carvão na água</li> </ul>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Cloranfenicol</li> <li>2. Furazolidona</li> <li>3. D-cicloserina</li> </ol>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1. 25 mg/L</li> <li>2. 25 mg/L</li> <li>3. 25 mg/L</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1. 32,3 mg/g</li> <li>2. 29,3 mg/g</li> <li>3. 9,4 mg/g</li> </ul>		[18]	
	Adsorção							
	Zeólito La-Z	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rentável</li> <li>- Poroso</li> <li>- Eficaz para peneirar</li> <li>- Aplicabilidade à troca iônica</li> <li>- Resistência a ácidos</li> <li>- Capacidade p/ forte ligação com água</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Zeólitos são caros e difíceis de preparar</li> </ul>	Clortetraciclina	5 mg/L	98,4% 127,55 mg/g máximo adsorção	[19]	
	Fibras de carbono ativado	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Novo</li> <li>- Eficiente</li> <li>- Grande área de superfície específica</li> </ul>		Sulfanilamida		94% 209 mg/g máximo adsorção	[20]	
	Membranas de Osmose Inversa/Nanofiltração	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aceitabilidade ambiental</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>Sulfametoxazol</li> <li>Trimetoprima</li> <li>Ciprofloxacina</li> <li>Dexametasona</li> <li>Febantel</li> </ul>		> 95%	[21]	
Extração	Líquido-Líquido	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Respeito pelo meio ambiente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Período de extração demorada</li> <li>- Procedimento extenso</li> <li>- Uso de material de vidro dispendioso</li> <li>- Grande quantidade de solvente necessário na extração</li> </ul>				[15]	
	Magnética de fase sólida	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reutilização das partículas magnéticas</li> </ul>					[15]	
	Zonas húmidas construídas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Baixo custo</li> <li>- Operação e manutenção simples</li> <li>- Respeito pelo meio ambiente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Poucos estudos</li> </ul>		100 ng/L	Perto dos 100%	[22]	
Técnicas de degradação de antibióticos na Aquicultura	Electrooxidação	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ausência de produção de lamas</li> <li>- Fácil automação</li> <li>- Possibilidade de degradar o meio orgânico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Consumo de energia</li> </ul>	Cloranfenicol	0,5 mg/L efluente	98,7%	[3]	
	Fotocatalisador de ZnSnO <sub>3</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reduz a atividade antibacteriana dos efluentes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Risco de corrosão</li> </ul>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ciprofloxacina</li> <li>2. Sulfamonometoxina</li> <li>3. Rodamina B</li> </ol>		<ul style="list-style-type: none"> <li>1. 85,9%</li> <li>2. 37,5%</li> <li>3. 48,3%</li> </ul>	[23]	
	Tecnologia Fotocatalítica							
	Fotocatalisador de nanomateriais de TiO <sub>2</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Grande área de superfície</li> <li>- Alta resistência magnética</li> <li>- Propriedades químicas estáveis</li> <li>- Alta capacidade de absorção de luz</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pequena área disponível de TiO<sub>2</sub> em comparação com o uso em solução</li> </ul>					[24]
	Adsorção e Fotocatálise com zeólitos HSZ-385/compostos de TiO <sub>2</sub>			Sulfamonometoxina	100 µg/L			[25]
Fotodegradação pela luz solar	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fonte natural de luz</li> <li>- Baixo custo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Presença de cálcio e magnésio na aquicultura marinha</li> <li>- Origem de subprodutos tóxicos</li> </ul>	Oxitetraciclina	4 mg/L		96%	[26]	



### 1.6.1. Remoção de antibióticos da água

As estações de tratamento de águas residuais demonstram baixa capacidade de remoção de antibióticos. Adicionalmente, o uso de lamas das ETAR's como fertilizantes com componentes antibióticos ativos também contribui para a liberação de antibióticos no solo. [15]

#### 1.6.1.1. Adsorção

A adsorção continua a ser a tecnologia mais usada na remoção de micropoluentes em estações de tratamento de água, sendo o carvão ativado o adsorvente mais utilizado, oferecendo um bom desempenho na remoção de micropoluentes da água. [16]

O material adsorvente é colocado na água poluída, e gradualmente ocorre a adsorção dos micropoluentes na superfície do adsorvente. Este método não é destrutivo para os antibióticos, pois simplesmente separa os poluentes da água, sendo um processo simples, económico, seguro, controlável e eficiente. [17]

A chave desta tecnologia é a seleção do material de adsorção que proporciona uma maior eficiência. Outros adsorventes, como por exemplo biomassa de fontes variadas, têm baixo custo e toxicidade, além de excelente biocompatibilidade e não causam poluição secundária às fontes de água. Yang *et al.* (2018) [17] modificaram quimicamente estes materiais, e introduziram nanomateriais magnéticos, que proporciona uma fácil separação, podendo até haver reciclagem dos materiais. Os nanomateriais magnéticos apresentam como vantagens a grande área de superfície, alta resistência magnética e propriedades químicas estáveis. [17]

#### Adsorção com carvão ativado granular

O carvão ativado à base de palha de milho granular com diâmetro de 1-2 mm é um adsorvente eficiente com bom potencial de aplicação na remoção de três antibióticos: furazolidona (FZD), D-cicloserina (DCL), e cloranfenicol (CLO). Apresenta como vantagem a fácil separação e recuperação. [18]

De acordo com os estudos efetuados por Cheng *et al.* (2017) [18], a preparação do carvão ativado granular consiste na secagem ao ar por 1 mês, sendo posteriormente colocado num forno elétrico a 500°C por 2 h e depois a 700°C por 2 h. Após o aquecimento, a palha de milho foi colocada num forno de ativação para tratamento fisicamente ativado por vapor sobre-aquecido a alta temperatura (600°C; 2,0 MPa) por 2 h. Finalmente, foi obtido um tipo de carvão ativado granular (GAC). [18]

A taxa de remoção dos três antibióticos pelo GAC seguiu a ordem: FZD > CLO > DCL. Os dados de carvão ativado em três antibióticos foram mais consistentes com a equação de Langmuir, e os valores máximos de adsorção de carvão ativado para os três antibióticos foram 32,3, 29,3 e 9,356 mg/g para CLO, FZD e DCL. Em conclusão, o GAC poderia ser usado como um adsorvente ecológico para a remoção de antibióticos das águas residuais. [18]

### Adsorção com zeólitos modificados de lantânio

Os zeólitos naturais tornaram-se um tipo de material vulgarmente utilizado em processos de adsorção, devido às suas características particulares, baixo custo-benefício, elevada porosidade, eficaz para peneirar, aplicabilidade à troca iónica, resistência a ácidos e capacidade de ligação forte com a água. O lantânio é um elemento considerado ecologicamente correto, pois é relativamente abundante na crosta terrestre, e, portanto, mais barato do que outros elementos, e com características vantajosas de ser atóxico e com baixo impacto ambiental. [19]

O zeólito modificado de lantânio (La-Z) foi usado por Yu *et al.* (2020) [19] para adsorver a clorotetraciclina (CTC) de águas residuais da aquicultura. A taxa de remoção atingiu 98,4%, sendo a capacidade do adsorvente de 6,15 mg/g, a concentração inicial de CTC foi de 5 mg/L, o tempo de adsorção foi de 20 minutos e o pH fixado em 7. A concentração inicial de CTC teve a maior influência no processo de adsorção. [19]

### Adsorção com fibras de carbono ativado

A fibra de carvão ativado (ACF) é um adsorvente novo e eficiente. Comparando com o carvão ativado granular tradicional, o ACF possui uma grande área de superfície específica e microporos ricos. Tem sido amplamente utilizado na indústria química, proteção ambiental, catálise, medicina, indústria eletrónica, higiene alimentar e outros campos. Yang *et al.* (2019) [20], usaram o ACF modificado com ácido sulfúrico, como um adsorvente para sulfanilamida (SA) em águas residuais da aquicultura. [20]

O tempo de extração foi de 60 minutos e um baixo valor de pH foi favorável para a adsorção. A cinética da adsorção revela que se trata de uma cinética de pseudo-segunda ordem. A isotérmica de adsorção evidencia que a adsorção ocorre segundo um modelo de Langmuir, com capacidade de 209 mg/L. A termodinâmica mostrou que o processo de adsorção de SA é uma reação espontânea e exotérmica. [20]

### Adsorção magnética de fase sólida

No método de adsorção magnética de fase sólida, partículas magnéticas são usadas como adsorventes, e estão dispersas nas soluções de amostra a adsorver. [18] Um íman externo é aplicado para as partículas magnéticas com os poluentes adsorvidos e separa-os da fase líquida, como mostra a figura 12. [15]

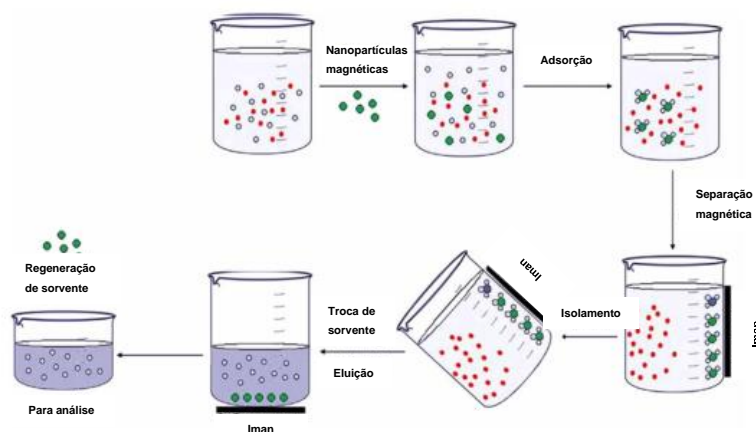


Figura 12 – Aplicação de adsorção magnética de fase sólida. Adaptado de Faleye et al. (2017) [15]

As partículas magnéticas frequentemente usadas são nanopartículas de ferrite ou óxido de ferro  $Fe_3O_4$ , partículas à base de sílica usados na purificação de DNA ou nanopartículas revestidas de alumina para separação de metais de água. A reutilização das partículas magnéticas é garantida regenerando-as através da lavagem com solvente orgânico como metanol. [15]

### 1.6.1.2. Extração líquido-líquido

Este processo de extração utiliza solventes imiscíveis com a água para separar e extrair os micropoluentes existentes na água com base na sua solubilidade relativa. O uso de um pequeno volume de solvente no LLE (do inglês, Liquid-Liquid Extraction) melhora a eficiência e respeita o meio ambiente. Apresenta como desvantagens: período de extração demorado e grande quantidade de solvente necessário na extração. [15]

Um bom conhecimento das propriedades físico-químicas dos antibióticos (analito) é uma condição importante na preparação da amostra. A constante de dissociação ácida  $pK_a$  é um indicador da propriedade ácido-base dos antibióticos e determina a taxa de ionização que permite o ajuste do pH da amostra para a extração. O coeficiente de partição,  $\log P$ , é um indicador do balanço hidrofiliicidade/hidrofobicidade de uma substância, e é diretamente proporcional à sua solubilidade nas duas fases água e octanol. Antibióticos com alto  $\log P$  são hidrofóbicos, e baixo  $\log P$  são hidrofílicos. A constante de dissociação ácida e o coeficiente de partição são orientadores de selecção do solvente a escolher para o método de extração. [15]

### 1.6.1.3. Membranas de osmose inversa/Nanofiltração

Dolar et al. (2012) [21] estudaram a aplicação de membranas de osmose inversa (RO) e nanofiltração (NF) para remoção de resíduos de antibióticos (sulfametoxazol, trimetoprim,

ciprofloxacina, dexametasona e febantel). De acordo com os resultados obtidos atingiu-se um alto nível de retenção > 95% de todos os antibióticos selecionados. [21]

RO e NF foram reconhecidas como as principais tecnologias de tratamento de água para o século 21, devido à sua alta eficácia de separação e aceitabilidade ambiental. Dolar *et al.* (2012) [21] usaram duas membranas RO e quatro NF, a uma pressão de trabalho de 15 bar e velocidade de fluxo cruzado de 300 mL/min nas membranas de osmose. Uma grande eficiência de remoção de todos os antibióticos estudados foi alcançada para membranas XLE e NF90. [21]

#### 1.6.1.4. Zonas húmidas construídas

As zonas húmidas construídas (CW) ganharam crescente atenção nos últimos anos, principalmente devido ao baixo custo, operação/manutenção simples e respeito pelo meio ambiente – figura 13. Contudo, estudos sobre a aplicação destes sistemas para remover micropoluentes de efluentes da aquicultura ainda são escassos. [22]



Figura 13 – Zona húmidas construídas: sistema de fluxo de superfície vertical. Adaptado de Gorito *et al.* (2018) [22]

Este sistema mostra potencial na eliminação de tipos específicos de contaminantes, como sólidos suspensos totais (TSS), matéria orgânica, nutrientes e metais. Recentemente, vários estudos também relataram resultados promissores para a remoção de micropartículas, nomeadamente pesticidas, medicamentos veterinários, e compostos industriais. [22]

Gorito *et al.* (2018) [22] obtiveram remoções de quase 100% para os fármacos claritromicina, fluoxetina e norfluoxetina, demonstrando o potencial dos CWs para eliminar a maioria de micropoluentes presentes em amostras de efluentes da aquicultura.

## 1.6.2. Degradação de antibióticos da água

### 1.6.2.1. Eletroxidação

A eletroxidação apresenta-se como uma opção para a remoção de antibióticos, compostos secundários e outros compostos orgânicos e inorgânicos de águas residuais da aquicultura. As vantagens deste processo são a ausência de produção de lamas, fácil automação e a possibilidade de degradar o meio orgânico. Esta abordagem pode eliminar antibióticos residuais no efluente da aquicultura, diminuindo a resistência bacteriana e os efeitos sobre o meio ambiente e restaurar a qualidade da água suficientemente alta para fins não potáveis. [3]

Foram efetuados estudos sobre a eficiência da eletroxidação na remoção do antibiótico cloranfenicol usando um eletrodo Ti revestido com  $\text{PbO}_2$  ( $\text{Ti/PbO}_2$ ) num reator descontínuo agitado, conforme esquematizado na figura 14. [3]

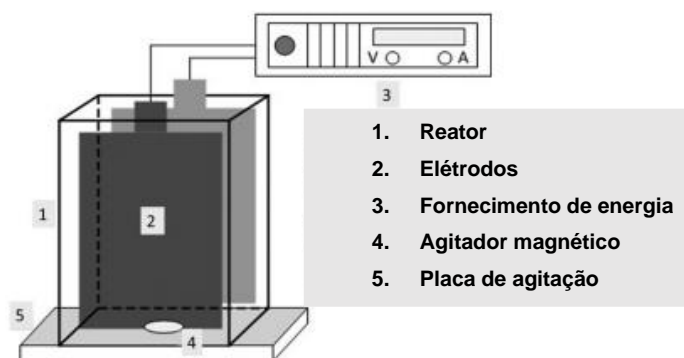


Figura 14 – Esquema de processo de eletroxidação. Adaptado de Soto et al. (2018) [3]

A oxidação direta e indireta são as duas principais formas de degradação de poluentes na célula de eletroxidação. Oxidação direta ocorre na superfície do eletrodo, e é geralmente atribuída a radicais do grupo hidroxilo  $\text{OH}^\cdot$  gerados pela oxidação da água e adsorvidos na superfície. Por outro lado, a oxidação indireta ocorre na solução a granel. Romero-Soto et al. (2018) [3] verificaram que a remoção de cloranfenicol com esta técnica foi de 98,7% e o consumo de energia de  $4,65 \text{ kW}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-3}$ . [3]

### 1.6.2.2. Tecnologia fotocatalítica

Existem deficiências na separação de antibióticos da água por adsorção. Para maximizar a eficiência de separação de antibióticos em água, a tecnologia fotocatalítica tem vindo a ganhar atenção generalizada. Considera-se o material de biomassa e a tecnologia de filtração por membrana como pré-tratamento de águas residuais e, em seguida, combina-se reação físico-química, fotocatalise e outras tecnologias para finalmente alcançar o tratamento ideal das águas residuais. [17]

### Fotocatalisador de ZnSnO<sub>3</sub>

Dong *et al.* (2020) [23] estudaram amostras de águas residuais que foram degradadas pela adição de 0,5 g/L de ZnSnO<sub>3</sub>, e as taxas de remoção de ciprofloxacina e sulfamonometoxina atingiram 85,9% e 37,5% após 100 minutos de radiação solar estimulada, respectivamente (figura 15). [23]

Foi preparada uma camada dupla oca de ZnSnO<sub>3</sub> sintetizado via co-precipitação para degradação fotocatalítica eficiente de águas residuais com antibióticos. A estrutura oca facilita a adsorção de moléculas de corante e fornece uma plataforma melhor para a interação direta entre moléculas de corante e fotocatalisadores. [23]

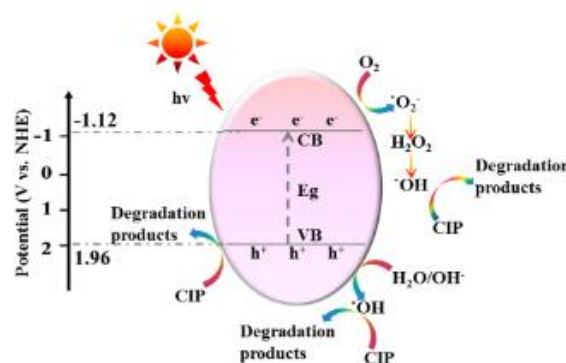


Figura 15 – Esquema de transferência de cargas e possível mecanismo de fotocatalise de amostra de ZnSnO<sub>3</sub>. Fonte: Dong *et al.* (2020) [23]

### Fotocatalisador de nanomateriais de TiO<sub>2</sub>

O dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) tem sido amplamente utilizado como fotocatalisador no tratamento de águas residuais farmacêuticas, devido à sua excelente atividade fotocatalítica, ampla disponibilidade, grande área de superfície e alta capacidade de absorção de luz. [24]

Do *et al.* (2020) [24] estudaram o processo fotocatalítico de degradação de cinco antibióticos usando nanotubos de TiO<sub>2</sub> e os introduziram em nanofios usando o método de anodização, degradando eficaz e rapidamente os antibióticos sob irradiação UV-vis a 120 mW/cm<sup>2</sup> usando 100 W de lâmpada de xénon e obtiveram mais de 95% de remoção em 20 minutos. Doxiciclina, sulfametoxazol, oxitetraciclina, lincomicina e sulfametazina foram encontradas com altas concentrações médias entre 22,6 e 76,8 ng.mL<sup>-1</sup>, enquanto ampicilina e amoxicilina surgem com baixas concentrações médias abaixo de 0,8 ng.mL<sup>-1</sup> nas amostras de água da aquicultura. [24]

### Adsorção e Fotocatalise com zeólitos HSZ-385/compostos de TiO<sub>2</sub>

Nomura *et al.* (2020) [25] desenvolveram um contador rotativo de oxidação avançado (RAOC) equipado com folhas de zeólito/TiO<sub>2</sub>. No RAOC, a metade inferior do disco é submersa em água para adsorção e a metade superior do disco é iluminada com uma lâmpada UV para fotocatalise. Investigaram o mecanismo de remoção da sulfametazina, tendo obtido uma remoção de 96% na

água, degradado durante 3 h de tratamento, e a sua transformação em produtos pelo RAOC. Os subprodutos relativamente hidrofóbicos gerados pela sulfametazina degradante são capturados na folha de compostagem por causa da interação hidrofóbica do zeólito HSZ-385. [25]

Conforme figura 16, duas folhas de zeólito/TiO<sub>2</sub>, foram fixadas num disco de aço inoxidável com diâmetro de 24 cm e o disco foi colocado num tanque em escala de laboratório (25×7×14,5 cm). A folha de compósito consistiu em zeólito, TiO<sub>2</sub> e fibra de polietileno tereftalato. A parte inferior do disco (45% da área do disco) foi submersa em água para adsorção, enquanto a parte superior do disco (55% da área do disco) foi exposta ao ar. A parte superior do disco estava iluminada com uma fonte de luz UVA (350 – 400 nm) para decomposição fotocatalítica. [25]

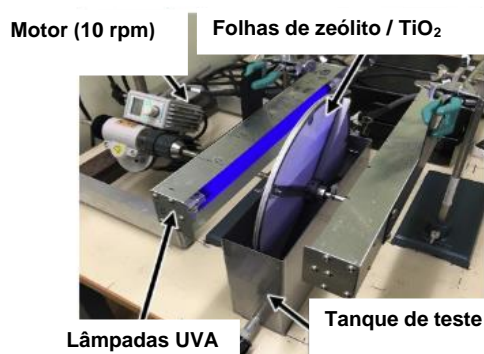


Figura 16 – Contador rotativo de oxidação avançado equipado com zeólito/compósitos de TiO<sub>2</sub>. Adaptado: Nomura et al. (2020) [25]

### 1.6.2.3. Fotodegradação pela luz solar

A oxitetraciclina (OTC) pertencente à classe das tetraciclina é um antibiótico de amplo espectro autorizado para uso na aquicultura europeia. A sua fotodegradação tem sido amplamente estudada em soluções aquosas sintéticas, algumas vezes recorrendo a métodos e sem eficácia comprovada em águas naturais. Leal et al. (2016) [26] estudaram a possibilidade de aplicar a fotodegradação solar para remoção de OTC a águas da aquicultura marinha. [26]

As principais vantagens da fotodegradação é o fato de usar a luz solar como fonte natural de luz e o baixo custo, comparativamente com a radiação UV. Como limitação, a presença de cálcio e magnésio foi indicado como afetando a fotodegradação de OTC, uma vez que são dois dos principais constituintes da água do mar. [26]

De acordo com os resultados apresentados, o tempo necessário para 96% da degradação de OTC nas águas da aquicultura deve ser 230 min (aproximadamente). De acordo com vários estudos, uma maior concentração inicial de OTC diminui a sua cinética da fotodegradação. Para além disso, existe uma influência significativa dos iões da água do mar. [26]

## 1.7. Utilização de solventes alternativos: DES

As vantagens da substituição dos solventes convencionais por solventes alternativos são inegáveis e viabilizam inúmeros processos de separação. Sendo um dos 12 princípios da Química Verde, a utilização de solventes seguros, não tóxicos, biocompatíveis e de fontes renováveis estão a revolucionar a química e a engenharia química. Em particular, os solventes eutéticos (profundos – com grande depressão do ponto de fusão – ou não) apresentam-se com enorme potencial, não só pelo fato de poderem ser facilmente sintetizados, apenas por mistura e aquecimento, mas também permitem o desenho fácil das suas propriedades físico-químicas apenas por combinação criteriosa dos seus constituintes. [27]

### 1.7.1. Importância de definição inequívoca de DES

Embora, Abbott *et al.* em 2003 [28], tenha definido DES como misturas eutéticas que exibem uma grande depressão na temperatura de fusão do ponto eutético em relação às dos componentes puros, alguns autores têm usado o acrónimo DES para designar qualquer mistura eutética independentemente da depressão da temperatura de fusão correspondente ao ponto eutético. Para identificar um DES, os seus diagramas de fases devem ser conhecidos, a fim de comparar a depressão real da temperatura com a prevista para a mistura ideal, e definir gamas de composição nas quais estes solventes estão no estado líquido em temperaturas operacionais. Martins *et al.* (2019) [29] referiram que o estabelecimento de ligações por pontes de hidrogénio entre os componentes do DES não deve ser usado para definir ou caracterizar um DES, pois isso abrangeria muitas misturas ideais. Aliás, estes investigadores referem que os DES não são compostos novos, nem compostos pseudo-puros, mas sim misturas. Para que um "solvente eutético profundo" - DES, seja significativamente diferente de qualquer outra mistura eutética e conceda algum significado ao qualificativo "profundo", um "solvente eutético profundo" deve ser definido como uma mistura de compostos puros para os quais a temperatura do ponto eutético está abaixo do da mistura líquida ideal. [29]

Na figura 17, é apresentado um diagrama de fases sólido-líquido de uma mistura eutética genérica, evidenciando uma grande depressão no ponto de fusão. Como a magnitude da depressão do ponto de fusão depende das interações entre os componentes da mistura, um DES é obtido apenas para uma mistura com grande desvio da idealidade (geralmente pelo estabelecimento de uma grande rede de ligações de hidrogénio ou pela presença de compostos carregados). [30]



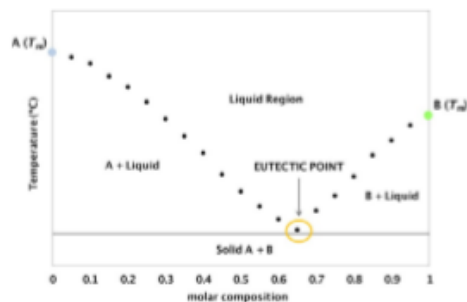


Figura 17 – Diagrama de fases sólido-líquido de uma mistura eutética genérica. Fonte: Florindo et al. (2019) [30]

As diferentes faixas de composições e temperaturas para as quais está disponível uma fase líquida homogênea, mostram que o trabalho numa temperatura fixa (normalmente temperatura ambiente) e/ou composição fixa (composições de mistura eutética e faixa de temperatura de trabalho) podem ser selecionados para corresponder as propriedades importantes do DES. [30]

No entanto, muitos componentes de origem natural têm vindo a ser usados na preparação de novos DES, os NADES (do inglês, Natural Deep Eutectic Solvents). A importância da utilização destes componentes de fontes renováveis, não tóxicos e biocompatíveis, com depressões na temperatura de fusão do ponto eutético é inegável. Uma das principais vantagens dos DES reside no seu método de preparação direto, pois consiste em simplesmente misturar e aquecer HBD's (do inglês, Hydrogen Bond Donors) e HBA's (do inglês, Hydrogen Bond Acceptors). Várias estratégias foram propostas para a preparação dos DES, sendo o aquecimento a preferida, mas outras como moagem ou dissolução dos componentes num solvente apropriado (normalmente água) seguido da sua evaporação também foram relatadas. Deve enfatizar-se, a baixa estabilidade térmica da maioria dos compostos naturais, que pode resultar na formação de produtos de degradação indesejados quando o método de aquecimento é usado, devendo ser usado o método da moagem em alternativa. [30]

### 1.7.2. Importância do diagrama de fases sólido-líquido

Até 2015, apenas tinham sido propostos DES hidrofílicos, formados por compostos hidrofóbicos. Em 2015, a equipa de Kroon e a equipa de Marrucho propuseram quase em simultâneo DES hidrofóbicos, embora os primeiros sejam baseados em sais de amónio quaternários, e portanto, apresentem grande depressões da temperatura de fusão, enquanto que os segundo são baseados em terpenóides, como o mentol, sendo apenas solventes eutéticos. Os solventes eutéticos hidrofóbicos – subclasse de DES – com base em fontes renováveis naturais foram estudados por Florindo *et al.* (2019) [30] combinando o mentol e vários ácidos gordos naturais de cadeia longa, assim como outros compostos à base de terpenóides, como o mentol e timol combinados com vários ácidos carboxílicos. Florindo *et al.* (2019) [30] verificaram também que a hidrofobicidade de DES depende da hidrofobicidade dos componentes individuais e DES formados usando um composto hidrofílico e um hidrofóbico não são estáveis na água, pois o

componente hidrofílico lixivia a fase aquosa de acordo com a sua solubilidade em água. [30] Ao contrário dos solventes eutéticos profundos, esses novos solventes eutéticos apresentaram baixas viscosidades (5-100 cP) e densidades inferiores à água, como pode ser avaliado pela densidade e viscosidade a 293,15 K a 353,15 K e em condições de pressão atmosférica, independentemente do teor de água. [31]

Outro aspeto relevante da definição de um DES é declarado por Martins *et al.* (2019) [29], além da sua depressão de temperatura de fusão, é a sua composição. Associar a composição do ponto eutético à formação de um complexo, ou o argumento de que uma composição eutética é próxima de uma proporção estequiométrica são noções erradas. A composição eutética resulta da interseção de duas curvas de fusão que são dominadas pelas propriedades de fusão, mais do que as interações entre HBD: HBA e, portanto, nenhum significado estequiométrico pode ser atribuído à composição eutética, que pode assumir qualquer valor dependendo de uma interação complexa entre as propriedades de fusão e os desvios à idealidade. Com base na nova definição proposta, para rotular adequadamente uma mistura eutética como simples ou profunda, o diagrama de fases do SLE (do inglês, Solid-Liquid Equilibrium) deve estar disponível e as propriedades de fusão dos compostos puros devem ser conhecidas para traçar a curva de solubilidade ideal. [29]

#### Solvente Eutético Ureia / Colina

No início do terceiro milénio, misturas eutéticas de ureia e colina (cloreto de hidroxietiltrimetilamónio) foram estudadas como solventes líquidos à temperatura ambiente, com propriedades incomuns. Misturas de amidas com sais de amónio formam eutéticos de baixo ponto de fusão, com a vantagem de serem sustentáveis, biodegradáveis e a possibilidade de uma grande variedade de compostos poder ser produzido a partir de materiais prontamente disponíveis. [28]

Abbott *et al.* (2003) [28] verificaram que o eutético ocorre na proporção 2:1 (ureia: colina) com uma temperatura de fusão de 12°C, consideravelmente mais baixo do que a temperatura de fusão dos compostos constituintes puros, 302°C para a colina e 133°C para a ureia. Este método de formação de líquidos a partir da mistura de sólidos à temperatura ambiente não se limita ao cloreto de colina, mas outros sais de amónio quaternários exibem a mesma propriedade. Mais, à medida que a simetria do catião diminui, o ponto de fusão das misturas diminui, e que em geral compostos capazes de doar ou aceitar eletrões ou prótons para formar ligações de hidrogénio apresentam altas solubilidades. Para além disso, os solventes capazes de formar fortes ligações de hidrogénio com iões cloreto tendem a ser miscíveis, altamente condutores (entre 1 mS.cm<sup>-1</sup> a 30°C), confirmando que as espécies iónicas estão dissociadas no líquido e podem se mover independentemente. [29]

## Solventes Eutéticos de Ácido Carboxílico / Cloreto de Colina

Ao contrário dos líquidos iônicos à temperatura ambiente, os solventes eutéticos profundos são fáceis de preparar em estado puro, não reativos à água, muito biodegradáveis e as propriedades toxicológicas dos componentes são bem caracterizadas. [32]

Abbott *et al.* (2004) [32] concentraram-se em misturas de ácido carboxílico com cloreto de colina e caracterizaram o comportamento de fase que pode ser simplesmente modelado levando em consideração a fração molar do ácido carboxílico na mistura; fluidez uma vez que os líquidos iônicos tendem a ser mais viscosos que os líquidos moleculares; e a condutividade em função da composição e do tipo de ácido carboxílico. [32]

Neste estudo foi formado um eutético com composição molar de 67% de ácido, sendo necessária 2 moléculas de ácido carboxílico para complexar cada íon de cloreto, de maneira análoga ao sistema ureia/cloreto de colina. É também evidente que em geral quanto menor o peso molecular do ácido carboxílico, maior a depressão do ponto de fusão. [32]

### **1.8. Objetivos e identificação do problema**

Um dos problemas atuais das águas residuais é a presença de micropoluentes, cuja eliminação é deficiente nas estações de tratamento de águas residuais, o que torna a busca por técnicas de tratamento de água eficientes, ecológicas e baratas uma prioridade, dada a indispensabilidade deste recurso na humanidade.

Neste trabalho pretende-se desenvolver um sistema de remoção de antibióticos com recirculação para a aquicultura, em particular a piscicultura, de espécies de peixe como gold fish (*Carassius auratus L.*), robalo europeu (*dicentrarchus labrax*), flatfish (*solea senegaleusis*), zebrafish (*Danio rerio*), enguia europeia (*European gloss eel Anguilla*), utilizando solventes eutéticos à base de terpenos (timol e mentol), ácidos carboxílicos (ácido octanóico, ácido decanóico e ácido dodecanóico), e sal de amônio quaternário (brometo de metiltrioctilamônio) com o objetivo de garantir uma elevada percentagem de remoção dos antibióticos enrofloxacina, cloranfenicol e norfloxacina, e posteriormente a reutilização destes solventes no sistema, evitando assim a retirada excessiva e o consumo de água nos tanques de peixes.

Genericamente, um sistema básico de recirculação para a piscicultura apresenta como componentes principais: tanque de peixes, filtro mecânico, filtro biológico, desgaseificação, oxigenação e desinfecção. Neste estudo propõe-se a substituição ou acoplar após o filtro biológico, um sistema de extração com solventes eutéticos, por forma a remover os antibióticos, de acordo com o esquema da figura 18.

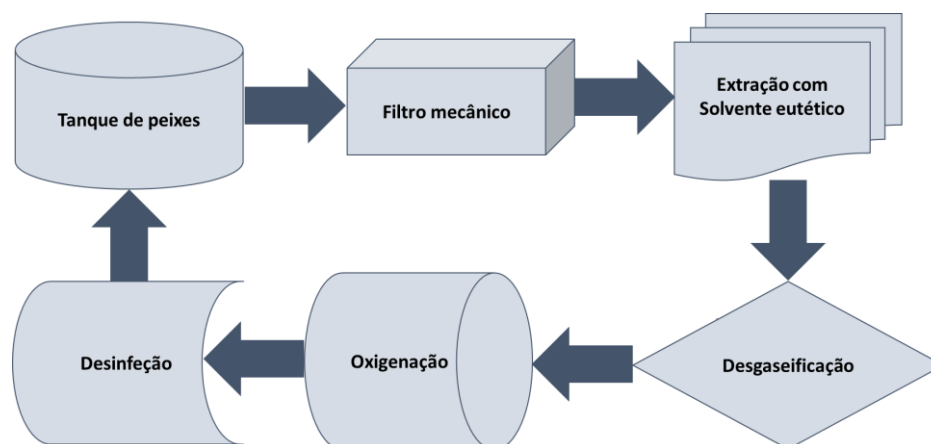


Figura 18 – Proposta de sistema de remoção de antibióticos para a aquicultura

### 1.8.1. Tipo de aquicultura em estudo: espécies de peixes

Goldfish (*Carassius auratus*) é uma espécie de ciprinídeo de água doce comumente usada em ensaios ecotoxicológicos, empregada em experimentos realizados por Diniz *et al.* (2010) [34] de fornecedores comerciais como a Piscicultura de Avis, em Portugal, avaliando os efeitos tóxicos de efluentes das fábricas de celulose que processam eucalipto, neste tipo de espécie. Antes do início dos ensaios, os peixes são colocados em tanques de 400 litros de poliestireno por 2 semanas, num sistema de circuito fechado com água da torneira sem cloro, a um pH de  $7,1 \pm 0,2$  e temperatura de  $16 \pm 1^\circ\text{C}$  e com aeração contínua suficiente para manter o oxigênio dissolvido sempre superior a 6 mg/L. [33]

Costa *et al.* (2010) [34] estudaram os efeitos de contaminantes em linguado senegalês, *Solea senegalensis* Kaup, expostos a sedimentos coletados no estuário do Sado (Portugal), e analisados quanto a contaminantes metálicos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e organoclorados, além da matéria orgânica total, potencial redox e fração fina. O linguado senegalês é um teleósteo bentônico de importante valor para as pescas e aquicultura no sul da Europa. A espécie habita os fundos marinhos de áreas costeiras, especialmente estuários, que funcionam como áreas de criação e amamentação, onde se alimenta de pequenos invertebrados. [34]

Tendo em consideração o status de conservação ameaçada da enguia europeia (*Anguilla anguilla*) e a vulnerabilidade das fases iniciais da vida dos peixes a contaminantes, Figueiredo *et al.* (2018) [35] expusemos enguias de vidro através da água, a uma concentração ambientalmente relevante ( $120 \text{ ng.L}^{-1}$ ) de lantânio (La) por 7 dias. O objetivo foi estudar o acúmulo e a eliminação de La no corpo das enguias e subseqüentemente, a quantificação de acetilcolinesterase (AChE), peroxidação lipídica e maquinaria enzimática antioxidante. A acumulação atingiu o pico após 72 horas de exposição a La, diminuindo depois mesmo em exposição contínua. [35]

As enguias são espécies catadromosas que apresentam um ciclo de vida compreendendo duas fases distintas da vida (oceânica e continental). Enguias adultas do Oceano Atlântico migram

para o mar dos Sargaços (região do Atlântico Norte) para se reproduzir e morrer. As larvas em formato de folha translúcido crescem ao longo do trajeto transatlântico até à costa da Europa com aproximadamente 1-2 anos, metamorfando em enguias de vidro. Apresentam elevado interesse económico e aumento da procura à escala global, constituindo uma iguaria altamente apreciada nos países do sudeste asiático e europeu. Como representantes de ecossistemas aquáticos diferentes, do oceano a rios e lagos, as enguias são consideradas bons bioindicadores e podem ser usadas como alertas para avaliar a contaminação ambiental, devido à sua capacidade de incorporar poluentes do ambiente circundante. [35]

### 1.8.2. Solventes eutéticos utilizados no trabalho

Embora a pesquisa por solventes eutéticos profundos (DES, do inglês Deep Eutectic Solvent) seja uma base para este trabalho, utiliza-se apenas o termo “solvente eutético”, para definir a mistura de 2 compostos que apresentam uma temperatura de fusão inferior à temperatura de cada composto isolado, não sendo garantia que a temperatura de fusão dessas misturas apresente um abaixamento significativo, como nos estudos publicados sobre o surgimento de DES's.

Foram utilizados 10 solventes eutéticos, cuja razão molar estabelecida na tabela 10, foi conforme estudos realizados por Florindo *et al.* (2019) [36] no desenvolvimento de DES's hidrofóbicos neutros e iónicos como extratores da ciprofloxacina.

Tabela 10 – Razão molar dos solventes eutéticos estudados. Fonte: Florindo *et al.* (2019) [36]

Solvente Eutético	Abreviatura	Razão Molar
Ácido octanóico: Ácido decanóico	C8: C10	1:1
Ácido octanóico: Ácido dodecanóico	C8: C12	3:1
Ácido decanóico: Ácido dodecanóico	C10: C12	2:1
Timol: Ácido octanóico	Tim: C8	1:1
Timol: Ácido decanóico	Tim: C10	1:1
Mentol: Ácido octanóico	Men: C8	1:2
Mentol: Ácido decanóico	Men: C10	1:2
Mentol: Ácido dodecanóico	Men: C12	2:1
Timol: Mentol	Tim: Men	1:2
Brometo de Metiltriocetilamónio: Ácido decanóico	[N8881]Br:C10	1:2

## 2. Metodologia

### 2.1. Análise

#### 2.1.1. Espectrofotometria de ultravioleta-visível (UV-vis)

Neste trabalho foi utilizado para análise da presença de antibióticos em soluções aquosas um espectrofotômetro de duplo feixe, marca: Shimadzu UV Spectrophotometer, modelo: UV-1800 (figura 19) com alta resolução de 1 nm, utilizando um sistema ótico de precisão Czerny-Turner. O modo fotométrico permitiu ler a absorvância em vários comprimentos de onda (nm), assim como identificar os máximos para cada determinação, tratando-se de um método expedito. [37]



Figura 19 – Espectrofotômetro UV-vis utilizado no laboratório (Marca: Shimadzu UV Spectrophotometer, Modelo: UV-1800)

Para cada comprimento de onda de luz que passa pelo espectrofotômetro, a intensidade da luz que passa pela célula de amostra é medida. A intensidade da luz que entra na amostra é geralmente referida como  $I_0$ . A intensidade da luz que passa pela célula de amostra e emergindo do outro lado é normalmente designada por  $I_1$  (figura 20). [38]

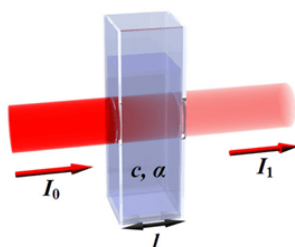


Figura 20 – Intensidade da luz que passa pela célula de amostra do espectrofotômetro UV-vis. Fonte: Shimadzu. [38]

Da percentagem da razão desses dois valores  $(I_1 / I_0) * 100$ , obtém-se um valor de percentagem de transmissão (% T). O valor de % T é uma medida da luz que passa pela amostra para atingir

o detector. Se  $I_1$  for menor que  $I_0$ , então a amostra absorveu parte da luz incidente, que é depois convertido em absorvância da amostra, dado pelo o símbolo, A ou Abs. A absorvância é uma medida da quantidade de luz que desaparece (interage) com a amostra. A Lei de Lambert-Beer é a relação entre a absorvância em função da concentração da amostra  $c$ , o coeficiente de extinção da amostra ' $a$ ', comprimento do caminho da amostra  $L$ ,  $I_0$  e  $I_1$  segundo equação 1: [38]

$$A = -\log_{10}(I_1/I_0) = a \times b \times c \quad (1)$$

Uma absorvância de 0 significa que nenhuma luz daquele comprimento de onda particular foi absorvida pela amostra. A intensidade da luz que entra e sai da amostra são as mesmas, então a razão  $I_1 / I_0$  é 1, logo  $-\log_{10}$  de 1 é zero. Uma absorvância de 1 ocorre quando 90% da luz num determinado comprimento de onda foi absorvida, o que significa que a intensidade é 10% do que seria. Nesse caso,  $I_1 / I_0$  é  $10/100 = 0,1$  e  $-\log_{10}$  de 0,1 é 1. Absorvância é uma escala logarítmica em que um aumento de 1 unidade na escala de absorvância se traduz num fator de redução de 10 na escala de % T. Conforme o valor de % T diminui, o valor de absorvância aumenta. [38]

## 2.2. Experimental

### 2.2.1. Preparação dos solventes eutéticos

#### 2.2.1.1. Materiais, equipamentos e reagentes

Nas tabelas 11 e 12 encontram-se os materiais e equipamentos utilizados na preparação de solventes eutéticos.

*Tabela 11 – Materiais e equipamentos utilizados para a preparação de solventes eutéticos.*

<b>Materiais</b>	<b>Equipamentos</b>
Banho termostático com água como fluido refrigerante (50°C)	Balança analítica (Erro: 0,01 g; Marca: OHAUS Adventurer, Modelo: AX223M)
Espátula	Placa de aquecimento e agitação (Marca: Heidolph)
Frasco de vidro com tampa	
Magnetos	

Tabela 12 – Reagentes utilizados para a preparação de solventes eutéticos.

Reagentes							
	Fórmula química	Massa molar (g/mol)	CAS	Pureza	Densidade (g/mL)	Marca	Perigo
Acido octanóico (C8)	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	144,21	124-07-2	99%	0,9109	Acros Organics	Corrosivo
Acido decanóico (C10)	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> CO <sub>2</sub> H	172,27	334-48-5	99%	0,8930	Alfa Aesar	Irritante
Acido dodecanóico (C12)	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	200,32	143-07-7	98%	0,8830	Sigma Aldrich	Corrosivo
Mentol	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	156,27	89-78-1	95%	0,8900	Sigma Aldrich	Corrosivo, irritante
Timol	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	150,22	89-83-8	99%	0,9650	Sigma Aldrich	Corrosivo, irritante, tóxico para o meio ambiente
Carvacrol	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	150,22	499-75-2	99%	0,9760	Sigma Aldrich	Corrosivo, irritante
Brometo de metiltrioctilamónio ((N8881)Br)	[CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>2</sub> ] <sub>3</sub> N(Br)CH <sub>3</sub>	448,61	35675-80-0	97%	1,0390	Sigma Aldrich	Irritante

### 2.2.1.2. Procedimento experimental

Conforme cálculos auxiliares do anexo A, pesou-se 2 gramas de cada solvente eutético, numa balança analítica, para frascos de vidro e colocou-se em banho-maria a 50°C durante 1 hora, com agitação a 500 rpm. De seguida, desligou-se a placa de aquecimento e deixou-se arrefecer lentamente. Deixou-se em repouso por 1 dia, confirmando-se a obtenção de uma mistura homogénea líquida.



## 2.2.2. Curvas de calibração dos antibióticos

### 2.2.2.1. Materiais, equipamentos e reagentes

Nas tabelas 13 e 14 encontram-se listados os materiais e equipamentos usados para construção da curva de calibração.

Tabela 13 – Materiais e equipamentos utilizados para a construção da curva de calibração.

Materiais	Equipamentos
Balões volumétricos de 5 e 100 mL	Balança analítica (Erro: 0,1 mg; Marca: Mettler Toledo; Modelo: MS205DU)
Espátula	Espectrofotômetro (Marca: Shimadzu UV Spectrophotometer, Modelo: UV-1800)
Esguicho	Placa de aquecimento e agitação (Marca: Heidolph)
Magnetos	

Tabela 14 – Compostos farmacêuticos utilizados para a construção das curvas de calibração.

Reagentes							
	Fórmula química	Massa molar (g/mol)	CAS	Pureza	Marca	Comprimento de onda no máximo de absorção (nm)	Perigo
Enrofloxacina	$C_{10}H_{22}FN_3O_3$	359,4	93106-60-6	≥ 98%	Alfa Aesar	273	Irritante, perigo para a saúde e ambiente
Cloranfenicol	$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$	323,1	56-75-7	≥ 98%	Sigma Aldrich	277,2	Perigo para a saúde
Norfloxacina	$C_{16}H_{18}FN_3O_3$	319,33	70458-96-7	≥ 98%	Alfa Aesar	271	Corrosivo, irritante, perigo para a saúde

### 2.2.2.2. Procedimento experimental

Preparou-se uma solução stock de cada um dos antibióticos de aproximadamente 10 ppm em água ultrapura, e soluções padrões de 2, 4, 6, 8 e 10 ppm partindo da solução stock e diluiu-se com água ultrapura, conforme dados da tabela 15, e figura 21.

Tabela 15 – Volume de soluções padrões de 2, 4, 6, 8 e 10 ppm partindo de solução stock de 10 ppm de antibiótico.

Balões volumétricos de 5 mL	Volume de solução stock de antibiótico 10 ppm retirado para a preparação de cada solução padrão (mL)
	Balão volumétrico de 100 mL
Padrão de 2 ppm	1
Padrão de 4 ppm	2
Padrão de 6 ppm	3
Padrão de 8 ppm	4
Padrão de 10 ppm	5

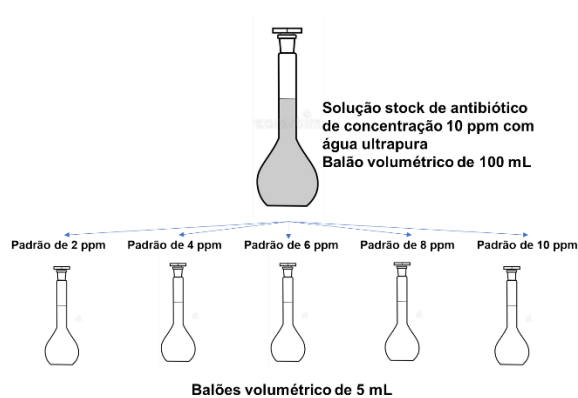


Figura 21 – Preparação das soluções padrões de antibiótico em água ultrapura.

Procedeu-se à leitura de absorvância no espectrofotômetro, para comprimento de onda correspondente ao pico de absorvância máxima de cada antibiótico, conforme valores da tabela 14 (enrofloxacinina = 273 nm, cloranfenicol = 277,2 nm e norfloxacinina = 271 nm) e traçou-se a curva de calibração para coeficiente quadrático superior a 0,99 por regressão linear.

## 2.2.3. Solubilidade aparente dos antibióticos nos solventes eutéticos

### 2.2.3.1. Materiais, equipamentos e reagentes

Na tabela 16 encontra-se os materiais, equipamentos e reagentes para avaliação da solubilidade aparente dos antibióticos em solventes eutéticos.

*Tabela 16 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para a solubilidade dos antibióticos em solventes eutéticos.*

<b>Materiais</b>	<b>Equipamentos</b>	<b>Reagentes</b>
Banho de água (25°C)	Balança analítica (Erro: 0,01 g; Marca: OHAUS Adventurer, Modelo: AX223M)	Antibiótico
Espátula	Placa de aquecimento e agitação (Marca: Heidolph)	Solvente eutético
Frasco de vidro com tampa		
Magneto		

### 2.2.3.2. Procedimento experimental

Para avaliar a solubilidade aparente dos antibióticos nos solventes eutéticos hidrofóbicos, adicionou-se pequenas quantidades de antibióticos, cerca de 1 mg/2 g de solvente, à temperatura de 25°C, por utilização de um banho-maria de água.

As soluções foram agitadas vigorosamente entre cada adição de antibiótico, durante 1 hora e a 400 rpm, onde se observou mistura homogênea. Este procedimento foi repetido até ao ponto de saturação (mistura heterogênea, equilíbrio sólido-líquido) ser detetado visualmente. Posteriormente, agitou-se nas mesmas condições anteriores, durante 24 horas a 25°C em banho-maria de etilenoglicol, para confirmação da saturação, caso contrário uma nova adição/agitação foi repetida. Considerou-se o valor da solubilidade o ponto anterior ao da precipitação. A adição de pequenas quantidades reveste-se da maior importância, pois afeta diretamente esta propriedade.

## 2.2.4. Extração líquido-líquido dos antibióticos com solventes eutéticos

### 2.2.4.1. Materiais, equipamentos e reagentes

Na tabela 17 encontra-se os materiais, equipamentos e reagentes utilizados para a extração líquido-líquido dos antibióticos em solventes eutéticos.

*Tabela 17 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados na extração líquido-líquido dos antibióticos em solventes eutéticos*

<b>Materiais</b>	<b>Equipamentos</b>	<b>Reagentes</b>
Balões volumétricos de 100 mL	Balança analítica (Erro: 0,1 mg; Marca: Mettler Toledo; Modelo: MS205DU)	Água ultrapura Milli-Q
Espátula	Centrífuga (Marca: IKA mini G S000)	Antibiótico
Frasco de vidro com tampa	Espetrofotômetro (Marca: Shimadzu UV Spectrophotometer, Modelo: UV-1800, 240V)	Solvente eutético
Filtro de seringa de politetrafluoroetileno hidrofóbico com um tamanho de poro de 0,45 µm	Placa de aquecimento e agitação (Marca: Heidolph)	
Magneto		
Papel de filtro		
Seringa e agulha		

### 2.2.4.2. Procedimento experimental

Preparou-se solventes eutéticos nas proporções indicadas no anexo A, e soluções de cada um dos antibióticos em água com a concentração de 10 ppm, aproximadamente. Cada um dos solventes eutéticos foi colocado em contato com a solução aquosa de cada um dos antibióticos, tendo sido utilizada a proporção de 1:1 em massa. Agitou-se, a uma velocidade de 300 rpm, durante 15 minutos, à temperatura ambiente. Deixou-se em repouso por um período de 48 horas para garantir a separação completa das fases (figura 22 A) pois embora a separação fosse fácil e rápida na maioria dos solventes, para certos casos como por exemplo o [N8881]Br:C10 foi necessário mais tempo para ela ocorrer.

Com uma seringa e agulha retirou-se a fase aquosa, inferior (figura 22 B) e posteriormente, centrifugou-se por pelo menos 3 horas a uma velocidade de 6000 rpm, e mediu-se a concentração de antibiótico na fase aquosa, usando espectroscopia UV-vis.

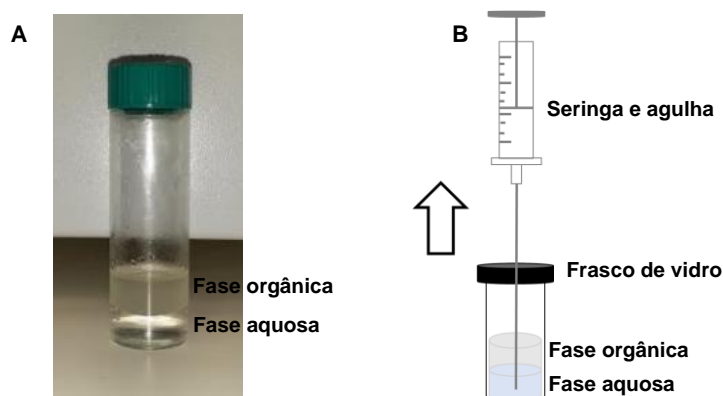


Figura 22 – Aspecto (A) e esquema ilustrativo (B) de extração líquido-líquido de cloranfenicol com o solvente [N8881]Br:C10, e separação de fases orgânica e aquosa.

### 2.2.4.3. Reutilização do solvente eutético

A fase rica no solvente eutético (fase superior), se necessário deverá ser diluída para análise através do espectrofotômetro de UV-vis.

Para avaliar a reutilização dos solventes eutéticos nos ciclos subsequentes, após a extração e separação, a fase superior ou rica no solvente eutético foi exposta novamente a uma solução aquosa com antibiótico fresca, na mesma proporção de massa (1:1). Este procedimento foi repetido três vezes, correspondente a 3 ciclos de extração (figura 23).

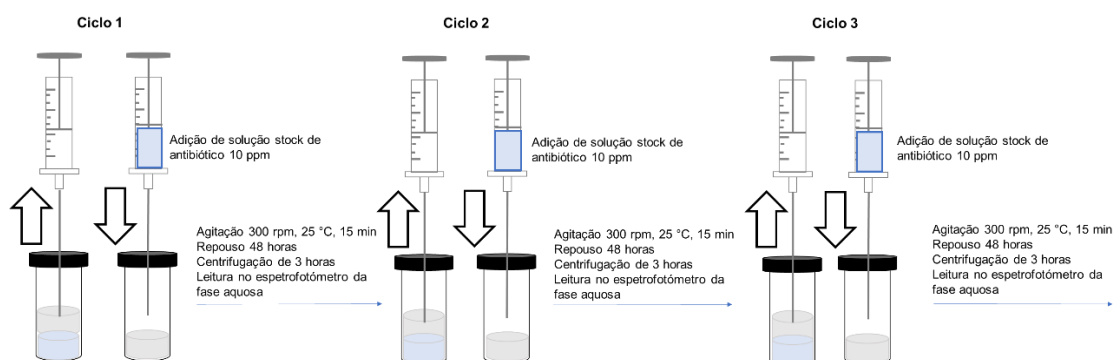


Figura 23 – Reutilização de solvente eutético pela extração líquido-líquido.

#### 2.2.4.4. Reciclagem do solvente eutético

Para reciclar o solvente eutético contendo antibiótico, utilizou-se adsorção com carvão ativado para remover o antibiótico do solvente (figura 24). A fase rica em solvente contendo antibiótico foi misturada durante 15 minutos a 300 rpm numa placa de agitação com 0,1 g de carvão ativado num tubo para centrifugação à temperatura ambiente (figura 25 – A), e posteriormente centrifugada durante 1 hora a 6000 rpm (figura 25 – B).

A fase superior límpida foi filtrada, usando um filtro de seringa de politetrafluoroetileno hidrofóbico com um tamanho de poro de 0,45 µm para garantir a remoção completa do carvão ativado da fase de solvente eutético, de acordo com a figura 25 – C.

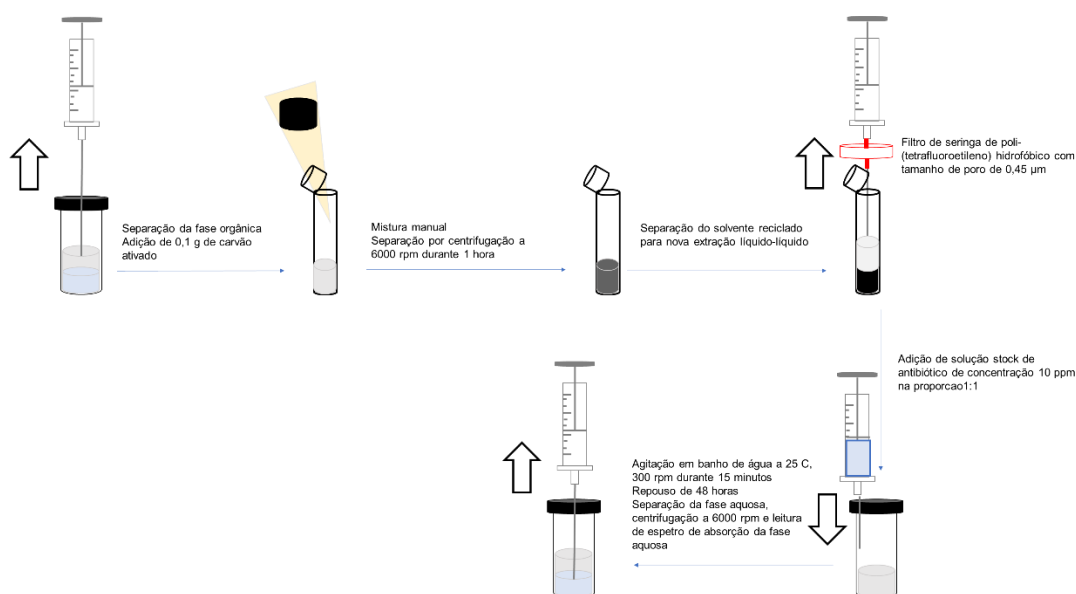


Figura 24 – Reciclagem de solvente eutético pela extração líquido-líquido.

Por fim, a fase reciclada de solvente foi transferida para um frasco de vidro, para nova extração líquido-líquido, adicionando-se solução stock de antibiótico de concentração 10 ppm na proporção 1:1. Agitou-se a mistura num banho de água a 25°C, e 300 rpm durante 15 minutos. Deixou-se em repouso durante 48 horas, e separou-se a fase aquosa, inferior. Centrifugou-se durante 90 minutos a 6000 rpm, e determinou-se o espectro de absorção.

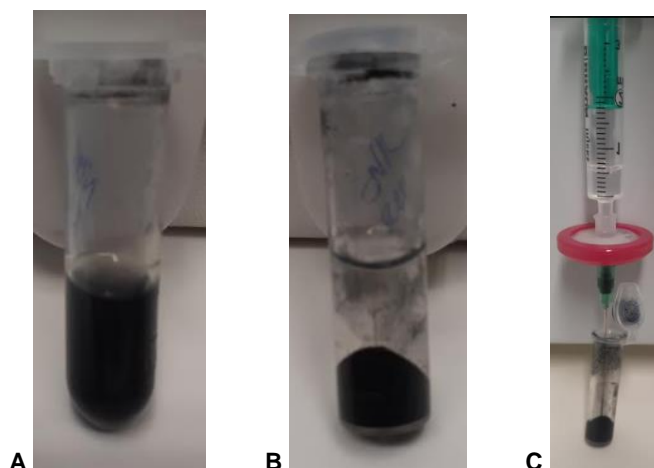


Figura 25 – Mistura mecânica (A), divisão de fases após centrifugação (B) e separação de solvente reciclado do carvão ativado com seringa e filtro de politetrafluoroetileno hidrofóbico (C).

## 2.2.5. Impregnação de solventes eutéticos em suporte poroso e extração

### 2.2.5.1. Materiais, equipamentos e reagentes

Na tabela 18 encontra-se os materiais, equipamentos e reagentes utilizados na impregnação de solventes eutéticos em suporte poroso.

Tabela 18 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados na impregnação de solventes em suporte poroso.

<b>Materiais</b>	<b>Equipamentos</b>	<b>Reagentes</b>
Balões volumétricos de 100 mL	Balança analítica (Erro: 0,1 mg; Marca: Mettler Toledo; Modelo: MS205DU)	Água ultrapura Milli-Q
Espátula	Espectrofotômetro (Marca: Shimadzu UV Spectrophotometer, Modelo: UV-1800)	Antibiótico
Frascos de vidro com tampa	Placa de aquecimento e agitação (Marca: Heidolph)	Solvente eutético
Magneto	Sistema de vácuo	
Membranas de PVDF - fluoreto de polivinilideno - hidrofóbicas		
Micropipeta		
Vidro de relógio		

### 2.2.5.2. Procedimento experimental

Pesou-se uma membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno) hidrofóbica com poros de diâmetro 0,22  $\mu\text{m}$  antes (figura 26 – A) e após impregnação com solvente eutético, para confirmação de aumento de massa. O propósito da impregnação é a preparação de microfases de solvente eutético. A impregnação pode ser também verificada por observação uma vez que a membrana fica translúcida, o que significa a permanência do solvente na membrana, conforme apresentado na figura 26 – B. A compatibilidade da membrana com o solvente a impregnar é uma propriedade vital para o sucesso desta impregnação.

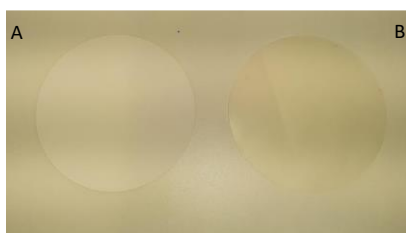


Figura 26 – Aspeto da membrana PVDF sem (A) e com (B) impregnação de solvente eutético.

Colocou-se a membrana a impregnar num vidro de relógio, e num sistema de vácuo por 1 hora para garantir que todo o ar foi removido dos poros da membrana e facilitar a sua impregnação com o solvente eutético em causa. Como observado na figura 27, o sistema utilizado tem como componentes principais: um exsiccador onde se coloca a membrana a impregnar num vidro de relógio; uma bomba de vácuo equipada com uma *trapp* e um reservatório de azoto líquido. Após 1 hora em vácuo, injetou-se 2 mL de solvente eutético na superfície da membrana, deixando a impregnar por mais 1 hora. No final, retirou-se o excesso de solvente da membrana com papel de limpeza e procedeu-se à sua pesagem para quantificar o solvente eutético impregnado. O restante solvente que permanece no vidro de relógio, pode ser reaproveitado para uma nova impregnação, sem necessidade de utilizar solvente fresco, uma vez que se consegue recuperar cerca de 0,5-1 mL de solvente.

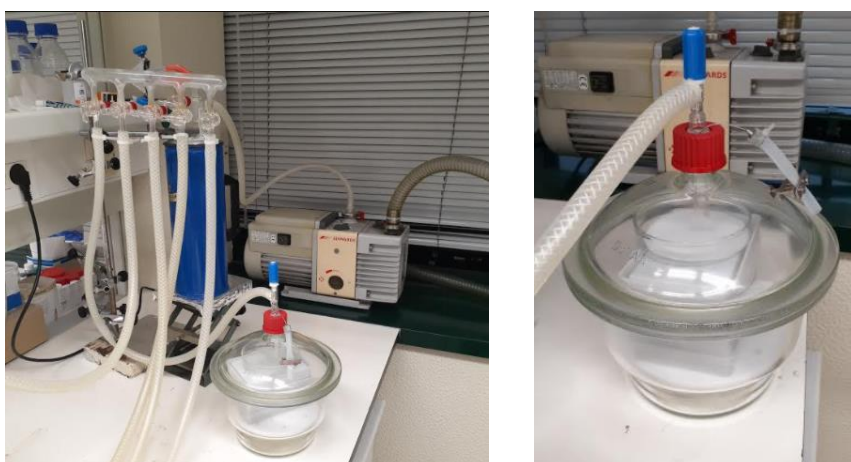


Figura 27 – Sistema de vácuo utilizado no laboratório para impregnação de solvente eutético em membranas de PVDF.



A fim de se utilizar esta membrana nos frascos de pequenas dimensões, perfurou-se a membrana com um molde de forma a obter membranas com diâmetro de 0,2 cm (figura 28).



Figura 28 – Membranas de PVDF impregnadas em solvente eutético, com diâmetro de 0,2 cm.

Para a extração, adicionou-se num tubo de vidro 2 mL de solução stock de antibiótico, 524 membranas de PVDF impregnadas em solvente eutético de 0,2 cm de diâmetro, e um magneto e levou-se a agitar em banho-maria de 25°C e a 300 rpm durante 15 minutos. Efetuou-se de imediato a leitura dos espectros de absorção num espectrofotómetro UV-vis.

Recomenda-se em caso de não utilização das membranas impregnadas no próprio dia, o seu armazenamento em caixa de petri. A colocação em estufa a 40°C, evapora o solvente da membrana.

### 2.2.5.3. Extração por etapas

Após o procedimento descrito em 2.2.5.2. que corresponde ao ciclo 1 de extração, retirou-se por completo a solução aquosa de antibiótico do frasco de vidro, e transferiu-se para um novo frasco com 524 membranas novas, conforme figura 29. Levou-se a agitar em banho-maria a 25°C e 300 rpm durante 15 minutos. Posteriormente, efetuou-se a leitura de espectro de absorção no espectrofotómetro, correspondente ao ciclo 2. Para o ciclo de extração 3, a solução aquosa restante do frasco de vidro do ciclo 2, foi transferida para um novo frasco com 524 membranas de PVDF novas. Agitou-se a solução em banho-maria a 25°C e 300 rpm durante 15 minutos, e observou-se o espectro de absorção.

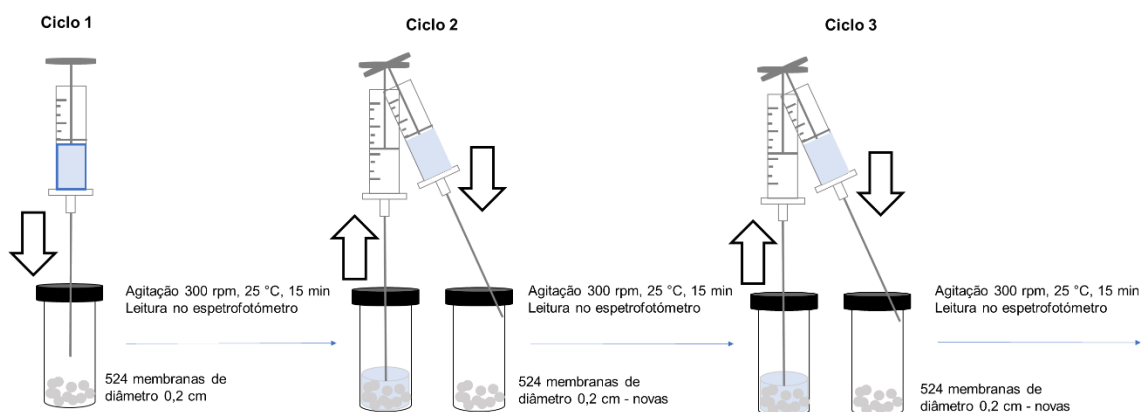


Figura 29 – Extração por etapas do antibiótico pela impregnação de solventes em suporte poroso.

#### 2.2.5.4. Reutilização do solvente eutético

Para a reutilização do solvente eutético, seguiu-se o procedimento descrito em 2.2.5.2, que corresponde ao ciclo 1. Posteriormente, a solução aquosa de antibiótico restante no frasco, foi completamente retirada com uma micropipeta, e adicionou-se 2 mL de solução aquosa com antibiótico fresca. Agitou-se a solução em banho-maria a 25°C e 300 rpm durante 15 minutos, e determinou-se o espectro de absorção, que corresponde ao ciclo 2, conforme figura 30.

Do frasco correspondente ao ciclo 2, rejeitou-se por completo a solução aquosa restante com uma micropipeta, e adicionou-se nova solução aquosa fresca de antibiótico. Agitou-se a solução em banho-maria a 25°C e 300 rpm durante 15 minutos, e determinou-se o espectro de absorção.

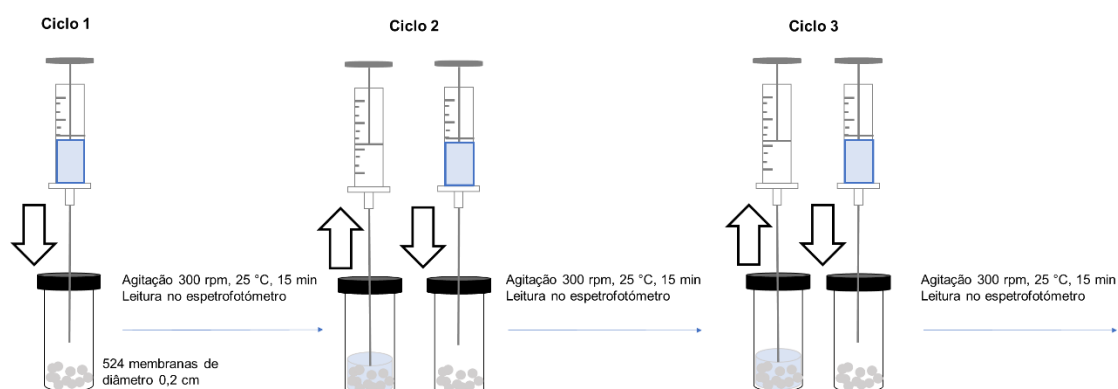


Figura 30 – Reutilização de solventes eutéticos por impregnação em sólidos porosos.

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Traçado da curva de calibração dos antibióticos

Para traçar a curva de calibração dos antibióticos, utilizaram-se 5 soluções padrões com concentração conhecida e obtidas a partir de uma solução stock com concentração também conhecida, e analisou-se os espectros de absorção, registrando-se os valores de absorvância e por regressão linear conforme anexo B e tabela 19, obteve-se as equações e coeficientes de correlação. Verifica-se bom ajuste com os coeficientes na ordem dos 0,99.

Tabela 19 – Reta de calibração e coeficiente de correlação para cada antibiótico.

Antibiótico	Comprimento de onda no máximo de absorção	Reta de calibração	Coefficiente de correlação
Enrofloxacin	273,0	Abs = 0,0643 x Conc (ppm)	0,989
Cloranfenicol	277,2	Abs = 0,0360 x Conc (ppm)	0,995
Norfloxacin	271,0	Abs = 0,1085 x Conc (ppm)	0,993

Os comprimentos de onda do máximo de absorção estão próximos com a literatura como se pode comparar com valores listados na tabela 20, e indicação do respectivo desvio.

Tabela 20 - Desvio de comprimento de onda no máximo de absorção entre o ensaiado e o da literatura.

Antibiótico	Comprimento de onda no máximo de absorção	Desvio
Enrofloxacin	275,0 <sup>[39]</sup>	1,4
Cloranfenicol	278,0 <sup>[40]</sup>	0,6
Norfloxacin	273,0 <sup>[41]</sup>	1,4

#### 3.2. Solubilidade aparente dos antibióticos nos solventes eutéticos

A aparente solubilidade dos 3 antibióticos, enrofloxacin, cloranfenicol e norfloxacin, nos solventes eutéticos encontra-se listada na tabela 21 e representada na figura 31. De salientar que este resultado é a soma das massas adicionadas de forma progressiva aos solventes eutéticos antes de ocorrer precipitação.

Tabela 21 – Resultados obtidos para a solubilidade aparente dos antibióticos em estudo nos solventes eutéticos. Todos os resultados foram medidos a 25°C e pressão atmosférica, à exceção do timol que foi medido a 50°C.

Solventes Eutéticos (Razão molar)	Solubilidade g ENR / g solvente	Solubilidade g CLO / g solvente	Solubilidade g NOR / g solvente
C8: C10 (1:1)	0,117	0,003	0,006
C8: C12 (3:1)	0,086	0,004	0,004
C10: C12 (2:1)	0,013	0,005	0,010
Mentol: C8 (1:2)	0,111	0,010	0,150
Mentol: C10 (1:2)	0,105	0,004	0,004
Mentol: C12 (2:1)	0,061	0,007	0,033
Timol: C8 (1:1)	0,052	0,017	0,249
Timol: C10 (1:1)	0,117	0,011	0,242
Timol: Mentol (1:2)	0,077	0,028	0,006
Timol (2 gramas)	-	0,075	-
[N8881]Br: C10 (1:2)	0,005	0,154	0,005

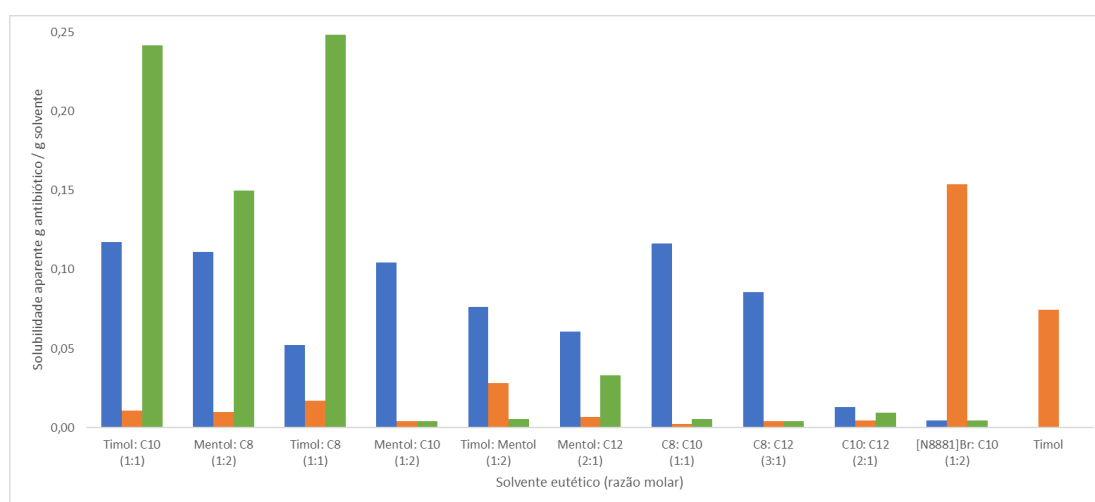


Figura 31 – Solubilidade aparente dos antibióticos em estudo nos solventes eutéticos. Todos os resultados foram medidos a 25°C e pressão atmosférica, à exceção do Timol que foi medido a 50°C. Azul: enrofloxacina. Laranja: cloranfenicol. Verde: norfloxacina.

De uma maneira geral pode-se afirmar que os três compostos farmacêuticos estudados têm uma solubilidade da mesma ordem de grandeza nos solventes eutéticos estudados. Pode-se também concluir que a enrofloxacina é solúvel numa gama mais alargada de solventes, enquanto que cloranfenicol e a norfloxacina apenas solúveis em alguns destes solventes.

Verifica-se que a enrofloxacina é mais solúvel nos solventes C8:C10 e Timol:C10 com um valor semelhante de 0,117 g ENR/g solvente e muito pouco solúvel no solvente [N8881]Br:C10 com um valor de 0,005 g ENR/g solvente. A ordem decrescente de solubilidade aparente é a seguinte:

C8:C10 = Tim:C10 > Men:C8 > Men:C10 > C8:C12 > Tim:Men > Men:C12 > Tim:C8 >

C10:C12 > [N8881]Br:C10

O cloranfenicol apresenta um máximo de solubilidade para o solvente [N8881]Br:C10 com um valor de 0,154 g CLO/g solvente, e um mínimo de 0,003 g CLO/g solvente para o C8:C10, sendo insolúvel nos solventes ácido:ácido e mentol:ácido. Devido aos baixos valores nesta classe de

solventes, determinou-se a solubilidade aparente utilizando apenas Timol a 50°C, com um valor final de 0,075 g CLO/g solvente. A ordem decrescente de solubilidade aparente é a seguinte:

[N8881]Br:C10 > Timol > Tim:Men > Tim:C8 > Tim:C10 > Men:C8 > Men:C12 > C10:C12 >  
Men:C10 = C8:C12 > C8:C10

A norfloxacin apresenta um máximo de solubilidade para os solventes Timol:C8 e Timol:C10 com um valor respetivamente de 0,249 e 0,242 g NOR/g solvente, e um mínimo de 0,004 g NOR/g solvente para o C8:C12. A ordem decrescente de solubilidade aparente é a seguinte:

Tim:C8 > Tim:C10 > Men:C8 > Men:C12 > C10:C12 > C8:C10 = Tim:Men >  
[N8881]Br:C10 > C8:C12 = Men:C10

Tudo leva a crer que os solventes onde cada um dos fármacos é mais solúvel, serão os que terão melhor eficiência de extração, ou seja, o C8:C10 e Timol:C10 possivelmente terão melhores extrações para a enrofloxacin; o solvente [N8881]Br:C10 conseguirá extrair melhor o cloranfenicol; e para a norfloxacin, os melhores extratantes serão o Mentol:C8, Timol:C8 e Timol:C10. Nos capítulos seguintes, em particular na impregnação de solvente em suporte poroso, verifica-se que esta assunção é apenas confirmada no caso do cloranfenicol, ou seja, o solvente [N8881]Br:C10 apresenta melhores eficiências de extração, e muito pelo contrário nos casos da enrofloxacin e norfloxacin verifica-se que o mesmo solvente C10:C12, com solubilidades muito baixas para a enrofloxacin e com solubilidade intermédia para a norfloxacin, apresenta melhores percentagens de extração.

Na tabela 22 apresenta-se a solubilidade dos 3 antibióticos em água, assim como o log P (ou Log Kow) [42], [43], [44], [45]. O cloranfenicol é o fármaco mais solúvel em água dos 3 em estudo com uma solubilidade de 2,50 mg/mL a 25°C, o que provavelmente é devido à presença de vários grupos funcionais polares na sua estrutura química conforme imagem 34 – B, e a enrofloxacin o menos solúvel com valor de 0,054 mg/mL a 25°C (figura 34 – A) podendo indicar ser um composto apolar quando em contato com a água polar, o que dificulta as ligações entre estes compostos.

Tabela 22 – Solubilidade dos antibióticos em água e Log P (ou Log Kow). Fonte: Drugbank [42] e PubChem [43], [44], [45]

Antibiótico	Solubilidade em água (mg/mL a 25°C)	Log P (ou Log Kow)
Enrofloxacin	0,054	0,58
Cloranfenicol	2,50	1,14
Norfloxacin	0,28	0,46

A solubilidade do antibiótico em solução aquosa também depende do pH. A enrofloxacin e a norfloxacin sofrem reações de protonação-desprotonação quando em solução aquosa. A pH abaixo de 6,2 a NOR existe principalmente na forma catiónica (NFXH<sup>+</sup>). Com o aumento do pH é atingida a primeira etapa de desprotonação, na faixa de pH entre 6,2 e 8,3 onde predomina a forma zwitteriônica ou neutra de NOR (NFX<sup>±</sup>); a segunda desprotonação ocorre a pH acima de 8,3 onde a NOR na forma aniônica prevalece (NFX<sup>-</sup>). [46]

A pH abaixo de 5,9 a ENR existe na forma catiónica (ENRH<sub>2</sub><sup>+</sup>) e com o aumento do pH é atingida a primeira etapa de desprotonação, na faixa de pH entre 5,9 e 8,0 onde predomina a forma zwitteriônica ou neutra de ENR (ENRH<sup>±</sup>); a segunda desprotonação ocorre a pH acima de 8,0 onde a ENR aniônica surge (ENR<sup>-</sup>). [47]

Assim sendo, nos ensaios realizados neste trabalho prevê-se que prevaleça as formas zwitteriônicas de ENR e NOR (ENRH<sup>±</sup> e NFXH<sup>±</sup> respectivamente) a pH 7, ou seja, são globalmente neutras quando em solução aquosa, conforme figura 32 – A e B.

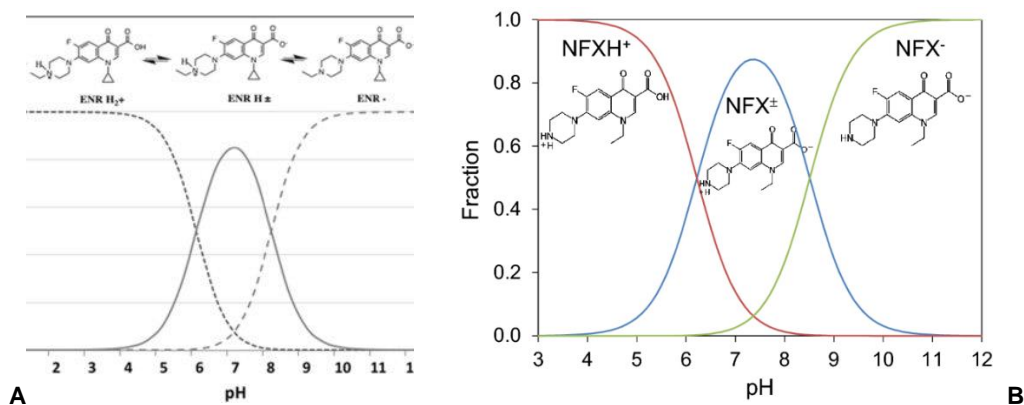


Figura 32 – Especificação da enrofloxacin (A) ( $pK_{a1} = 5.9$  e  $pK_{a2} = 8.0$ ) e norfloxacin (B) ( $pK_{a1} = 6.2$  e  $pK_{a2} = 8.3$ ) em função do pH, com as estruturas moleculares. Fonte: Mejía et al. (2017) [48], Otalvaro et al. (2019) [49]

No caso de cloranfenicol a influência do pH para que ocorra extração eficiente deve ocorrer abaixo do seu pka de 11,3 ou seja, abaixo deste valor este composto encontra-se protonado e, portanto, neutro conforme figura 33. [50]

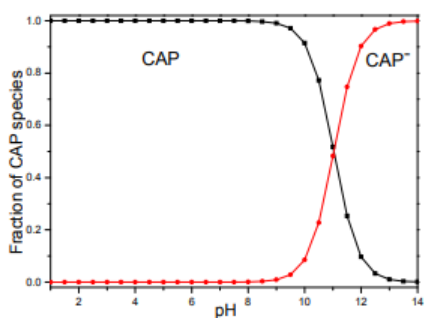


Figura 33 – Ação das espécies de cloranfenicol. Fonte: Li et al. (2018) [50]

O coeficiente de partição octanol-água (tabela 22) é mais significativo no caso de cloranfenicol com um valor de 1,14 tendo assim, maior afinidade para a água por ser um fármaco hidrofóbico proporcionalmente à sua solubilidade alta em água. Outro fato, conforme figura 34 – B, é que este composto dos 3 em estudo, apresenta apenas 1 anel aromático, sendo assim proporcional à maior solubilidade em água.

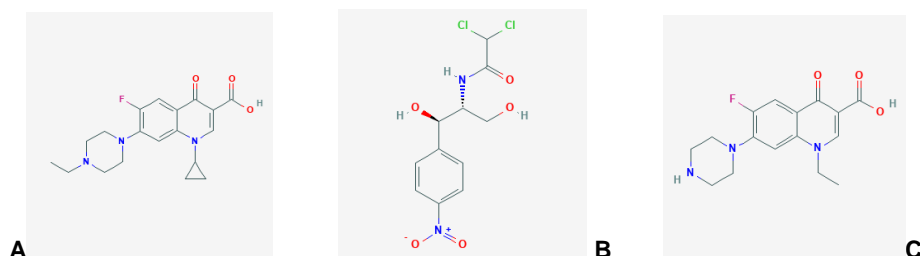


Figura 34 – Estrutura química de enrofloxacin (A), cloranfenicol (B) e norfloxacin (C) evidenciando os diferentes grupos funcionais. Fonte: PubChem [43], [44], [45]

Dos compostos utilizados para preparar os solventes eutéticos neste trabalho, e de acordo com dados da tabela 23, verifica-se que o ácido decanóico é o composto mais insolúvel em água, logo a mistura deste com o ácido dodecanóico pouco solúvel em água, poderá originar um solvente com grande capacidade de extração dos antibióticos, como nos casos da enrofloxacin e norfloxacin, verificada em particular no método proposto de impregnação de solvente em sólidos porosos.

Não foi encontrado um valor de solubilidade do brometo de metiltrioctilamônio em água mas sendo entre todos, o composto com maior Log P (5,52) prevê-se que, ao ser adicionado ao ácido decanóico praticamente insolúvel em água, o solvente originado [N8881]Br:C10, terá alguma afinidade com a água, logo será entre todos os solventes o mais hidrofílico, e portanto um fraco extratante para a ENR e NOR, mas um bom extratante para o CLO, o que é demonstrado no capítulo de impregnação. A utilização deste solvente como extratante é dificultada pela elevada viscosidade deste composto, nunca se tendo conseguido uma boa mistura entre o solvente e a fase aquosa.

Tabela 23 – Solubilidade em água e Log P (ou Log Kow) dos compostos individuais usados para preparar solventes eutéticos. Fonte: PubChem [51], [52], [5], [56], [57], Chemicalbook [53], Chemspider [54], Chemsrsc [53].

Composto	Solubilidade em água (mg/mL a 25°C)	Log P (ou Log Kow)
Ácido octanóico	0,789	3,05
Ácido decanóico	0,062	4,09
Ácido dodecanóico	0,15	5,29
Timol	0,90	3,30
Mentol	0,42	3,20
Brometo de metiltrioctilamônio	-	5,52

### 3.3. Otimização das condições de extração líquido-líquido

Vários aspetos das extrações tiveram que ser otimizados, de forma a melhorar o procedimento de extração, diminuir a contaminação das fases e aumentar a extração dos fármacos em estudo nos solventes eutéticos.

Em particular, verificou-se que a contaminação das fases é um problema uma vez que alguns dos componentes usados na preparação dos solventes eutéticos podem atuar como surfactantes, pois possuem longas cadeias hidrofóbicas e cabeças hidrofílicas. Assim, uma velocidade de agitação elevada de 1000 rpm não é aconselhável, uma vez que pode existir a formação de emulsão, e por vezes a formação de 3 fases após repouso. Neste sentido, e seguindo o trabalho realizado por Florindo *et al.* (2019) [36], usou-se uma velocidade de agitação de 300 rpm ao longo de todo o trabalho. O tempo de agitação também foi um parâmetro testado tendo-se verificado que basta uma agitação de 15 minutos no contato entre o solvente eutético e a solução aquosa de antibiótico. Inicialmente, o tempo de agitação testado foi de 1 hora, o que é excessivo para a extração líquido-líquido, podendo formar emulsões e separação em 3 fases.

Para diminuir a contaminação das fases, verificou-se também que o tempo de repouso das duas fases após a extração (entre 12 a 24 horas) não era suficiente. Neste sentido, testou-se um tempo de repouso de 48 horas, de forma a existir a completa separação de fases orgânica e aquosa. No entanto, verificou-se que a fase aquosa ainda se encontrava turva (figura 35 – A) após esse período. Para garantir a separação completa de fases orgânica e aquosa, a fase inferior – aquosa – foi retirada por meio de uma seringa e agulha, e centrifugada durante pelo menos 3 horas a uma velocidade de 6000 rpm. Após este procedimento obteve-se uma fase aquosa límpida que pode ser lida no espectrofotómetro, conforme figura 35 – B.



Figura 35 – Fase aquosa de extração líquido-líquido antes (A) e depois (B) de centrifugação a 6000 rpm durante 3 horas.



De forma a avaliar a contaminação da fase aquosa pelos solventes eutéticos, ensaiou-se extrações na proporção 1:1, adicionando os solventes em água ultrapura, nas condições de agitação a 300 rpm durante 15 minutos em banho de água a 25°C. Por observação dos espectros do anexo D, verifica-se elevada contaminação dos solventes na fase aquosa principalmente na zona inferior a 300 nm, coincidindo com os comprimentos de onda dos 3 antibióticos estudados ao longo do trabalho. Esta situação terá grande influência nos resultados apresentados no capítulo seguinte quando efetuou-se extrações líquido-líquido, de forma a que os solventes extraíssem antibiótico de uma solução aquosa, uma vez que comprova-se a passagem efetiva de solvente para a fase aquosa.

Por outro lado, verificou-se que alguns solventes eutéticos utilizados neste trabalho como extratantes, nomeadamente Timol:ácido e Timol:Mentol, embora hidrofóbicos, apresentam alguma solubilidade em água, contaminando-a. Analisando os espectros do anexo E, verifica-se que existe grande passagem destes solventes para a fase aquosa, através da presença das bandas do grupo aromático do timol, e das bandas dos ácidos muito pronunciadas na zona de comprimentos de onda inferiores a 300 nm, uma vez mais coincidente com a zona de comprimento de onda dos 3 antibióticos em estudo. Desta forma, estes solventes foram rejeitados nos ensaios subsequentes.

### **3.3.1. Concentração inicial de solução stock de antibiótico**

#### Concentração inicial de solução stock de antibiótico de 5 ppm

A análise dos espectros de absorção UV-vis correspondentes a cada uma das soluções aquosas de antibiótico que foram usadas na extração líquido-líquido com o solvente eutético (Anexo F), revela a existência de vários picos, para além dos correspondentes a cada um dos antibióticos. Estes picos são provavelmente devidos à presença de pequenas quantidades de solvente eutético na solução, embora estes solventes tenham uma solubilidade muito baixa em água. Na figura 36 e tabela 24 encontram-se listados os valores das eficiências de extração para os 3 antibióticos em estudo com os diversos solventes.

Constata-se que as eficiências de extrações para os 3 antibióticos em estudo, são elevadas, acima dos 90%. Tal como foi mencionado anteriormente, o facto de existirem picos do solvente na região do UV-vis onde os compostos farmacêuticos absorvem pode contribuir indiretamente para estes valores elevados e, portanto, estes valores podem não ser tão elevados. Por outro lado, apenas para a enrofloxacinina se obteve concentrações ajustadas à curva de calibração, inferiores a 5 ppm, concentração essa menor do que a da solução stock analisada, e que o mesmo não acontece para o cloranfenicol e a norfloxacinina, ou seja, a contaminação do solvente eutético é mais relevante para o CLO e NOR.

Afim de verificar a importância desta contaminação da água pelo extratante, prepararam-se soluções dos 3 antibióticos com uma concentração no valor de 10 ppm, de acordo com a figura 37, tabela 25 e anexo G.

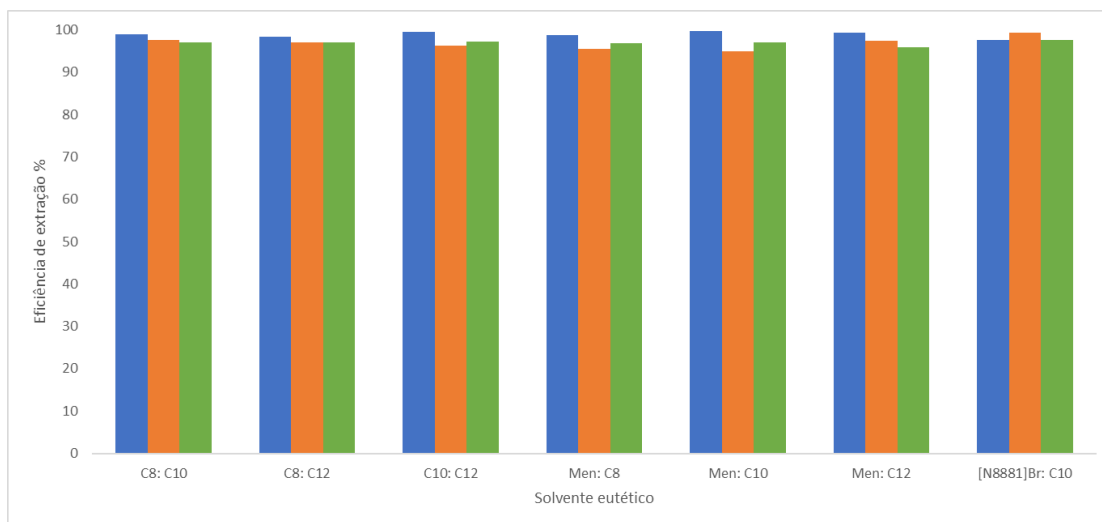


Figura 36 – Gráfico de eficiência de extração dos antibióticos em solução aquosa de concentração 5 ppm pelos solventes eutéticos, através da extração líquido-líquido. Azul: enrofloxacina. Laranja: cloranfenicol. Verde: norfloxacina.

Tabela 24– Resultados de extração líquido-líquido obtidos pelo espectro de absorção para a enrofloxacin, cloranfenicol e norfloxacin para concentração de 5 ppm.

Resultados obtidos pelo espectro de absorção para a enrofloxacin [Absorvância = 0,0643 x Concentração (ppm)]							
Solvente eutético	C8:C10	C8:C12	C10:C12	Mentol:C8	Mentol:C10	Mentol:C12	[N8881]Br:C10
Razão Molar	1:1	3:1	2:1	1:2	1:2	2:1	1:2
Massa de ENR na solução stock 5 ppm (g)				0,0049			0,0053
Absorvância	0,1831	0,2600	0,0767	0,2106	0,0509	0,1020	0,4161
Concentração (ppm) obtido na curva de calibração	2,85	4,04	1,19	3,28	0,79	1,59	2,07
Massa de ENR que ficou na solução aquosa (g)	0,00577	0,00822	0,00242	0,00656	0,00162	0,00325	0,01297
Massa de ENR extraída pelo solvente (g)	0,48423	0,48178	0,48758	0,48344	0,48838	0,48675	0,51703
% Extração	98,82	98,32	99,51	98,66	99,67	99,34	97,55
Resultados obtidos pelo espectro de absorção para a cloranfenicol [Absorvância = 0,0360 x Concentração (ppm)]							
Massa de CLO na solução stock 5 ppm (g)				0,0052			0,0057
Massa total solvente eutético (g)	2,022	2,062	2,223	2,016	2,048	2,061	2,074
Massa de solução de CLO 5 ppm adicionada ao solvente (g)	2,277	2,048	2,050	2,051	2,039	2,110	2,005
Absorvância	0,1945	0,2733	0,3361	0,4161	0,4720	0,2342	0,0720
Concentração (ppm) obtido na curva de calibração	5,40	7,59	9,34	11,56	13,11	6,51	2,00
Massa de CLO que ficou na solução aquosa (g)	0,01230	0,01555	0,01914	0,02371	0,02673	0,01373	0,00401
Massa de CLO extraída pelo solvente (g)	0,50770	0,50455	0,50086	0,49629	0,49327	0,50627	0,56599
% Extração	97,63	97,01	96,32	95,44	94,86	97,36	99,30
Resultados obtidos pelo espectro de absorção para a norfloxacin [Absorvância = 0,1085 x Concentração (ppm)]							
Massa de NOR na solução stock 5 ppm (g)				0,0053			0,0045
Massa total solvente eutético (g)	2,035	2,030	2,122	2,121	2,124	2,105	2,355
Massa solução de NOR 5 ppm adicionada ao solvente (g)	2,059	2,042	2,033	2,086	2,039	2,040	2,072
Absorvância	0,8395	0,8315	0,7753	0,8730	0,8654	1,1415	0,5922
Concentração (ppm) obtido na curva de calibração	7,74	7,66	7,15	8,05	7,98	10,52	5,46
Massa de NOR que ficou na solução aquosa (g)	0,01593	0,01565	0,01453	0,01678	0,01626	0,02146	0,01131
Massa de NOR extraída pelo solvente (g)	0,51407	0,51435	0,51547	0,51322	0,51374	0,50854	0,43869
% Extração	96,99	97,05	97,26	96,83	96,93	95,95	97,49

### Concentração inicial de solução stock de antibiótico de 10 ppm

Os melhores resultados foram obtidos para uma concentração de 10 ppm de solução stock de antibiótico, de acordo com os espectros de absorção do anexo G e da figura 37 e tabela 25. As melhores eficiências de extração foram obtidas para o caso da norfloxacina, que no geral se situam acima dos 98% para todos os solventes analisados.

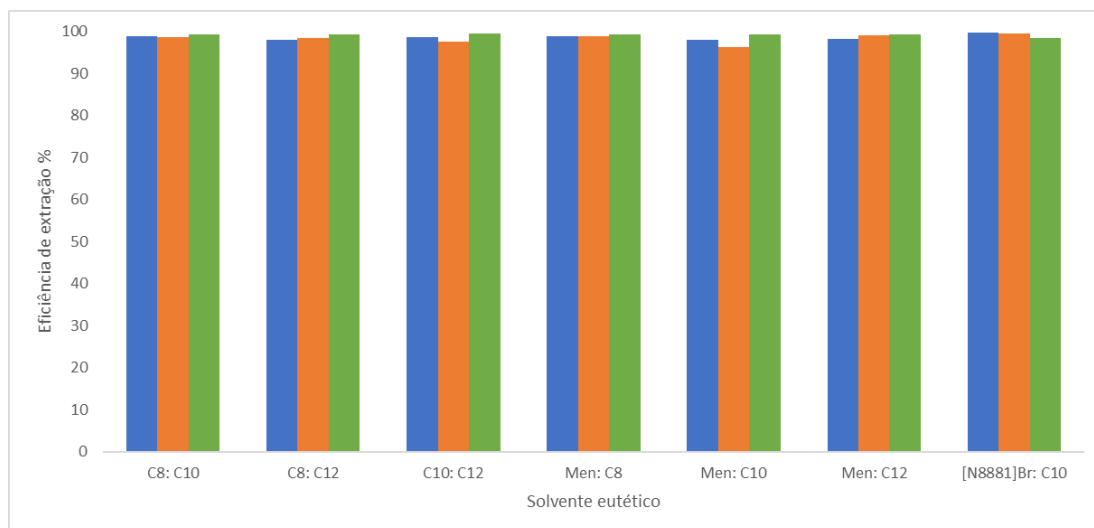


Figura 37 – Gráfico de eficiência de extração dos antibióticos em solução aquosa de concentração 10 ppm pelos solventes eutéticos através da extração líquido-líquido. Azul: enrofloxacina. Laranja: cloranfenicol. Verde: norfloxacina.

Tabela 25 – Resultados de extração líquido-líquido obtidos pelo espectro de absorção para a enrofloxacin, cloranfenicol e norfloxacin para concentração de 10 ppm.

Resultados obtidos pelo espectro de absorção para a enrofloxacin [Absorvância = 0,0643 x Concentração (ppm)]							
Solvente eutético	C8:C10	C8:C12	C10:C12	Mentol:C8	Mentol:C10	Mentol:C12	[N8881]Br:C10
Razão Molar	1:1	3:1	2:1	1:2	1:2	2:1	1:2
Massa de ENR na solução stock 10 ppm (g)	0,0105						
Massa total solvente eutético (g)	2,094	2,072	2,014	2,121	2,097	2,060	2,052
Massa de solução de ENR 10 ppm adicionada ao solvente (g)	2,097	2,044	2,030	2,017	2,018	2,030	2,060
Absorvância	0,3531	0,6796	0,4962	0,3721	0,6576	0,5799	0,1026
Concentração (ppm) obtido na curva de calibração	5,49	10,57	7,72	5,79	10,23	9,02	1,60
Massa de ENR que ficou na solução aquosa (g)	0,0115	0,0216	0,0157	0,0117	0,0206	0,0183	0,0033
Massa de ENR extraída pelo solvente (g)	1,0385	1,0284	1,0343	1,0383	1,0294	1,0317	1,0467
% Extração	98,90	97,97	98,51	98,89	98,03	98,26	99,69
Resultados obtidos pelo espectro de absorção para a cloranfenicol [Absorvância = 0,0360 x Concentração (ppm)]							
Massa de CLO na solução stock 10 ppm (g)	0,0115						
Massa total solvente eutético (g)	2,096	2,017	2,056	2,178	2,264	2,090	2,011
Massa de solução de CLO 10 ppm adicionada ao solvente (g)	2,006	2,028	2,030	2,016	2,027	2,038	2,044
Absorvância	0,2785	0,3074	0,5000	0,2619	0,7667	0,2069	0,0896
Concentração (ppm) obtido na curva de calibração	7,74	8,54	13,89	7,28	21,30	5,75	2,49
Massa de CLO que ficou na solução aquosa (g)	0,0155	0,0173	0,0282	0,0147	0,0432	0,0117	0,0051
Massa de CLO extraída pelo solvente (g)	1,1345	1,1327	1,1218	1,1353	1,1068	1,1383	1,1499
% Extração	98,65	98,49	97,55	98,72	96,25	98,98	99,56
Resultados obtidos pelo espectro de absorção para a norfloxacin [Absorvância = 0,1085 x Concentração (ppm)]							
Massa de NOR na solução stock 10 ppm (g)	0,0116						
Massa total solvente eutético (g)	2,041	2,134	2,093	2,084	2,133	2,046	2,068
Massa solução de NOR 10 ppm adicionada ao solvente (g)	2,042	2,077	2,066	2,018	2,036	2,048	2,052
Absorvância	0,4514	0,4513	0,3364	0,4348	0,5210	0,4796	0,9737
Concentração (ppm) obtido na curva de calibração	4,16	4,16	3,10	4,01	4,80	4,42	8,97
Massa de NOR que ficou na solução aquosa (g)	0,0085	0,086	0,0064	0,0081	0,0098	0,0091	0,0184
Massa de NOR extraída pelo solvente (g)	1,1515	1,1514	1,1536	1,1519	1,1502	1,1509	1,1416
% Extração	99,27	99,26	99,45	99,30	99,16	99,22	98,41

Nas figuras 38, 39 e 40 compara-se as eficiências de extração para cada antibiótico, para concentração de solução de 5 e 10 ppm, nos 7 solventes utilizados.

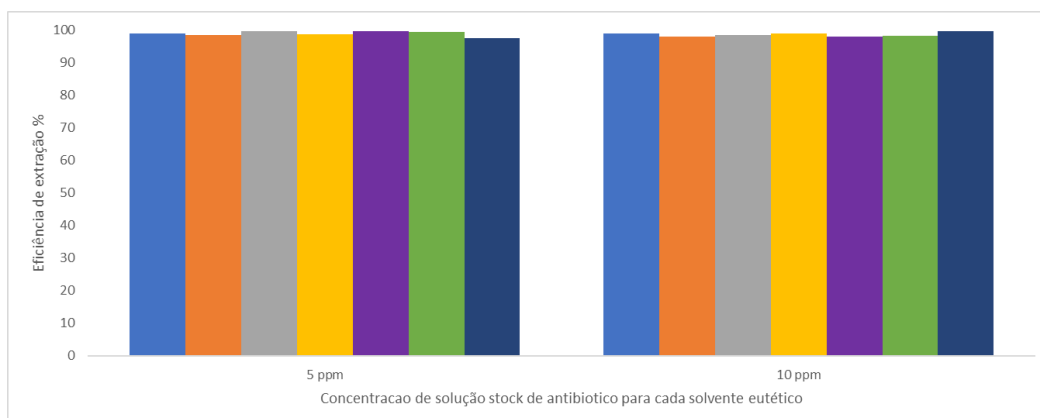


Figura 38 – Gráfico de eficiência de extração da enrofloxacin, comparando diferentes concentrações em solução de 5 e 10 ppm para cada solvente eutético. Azul claro – C8:C10; Laranja – C8:C12; Cinzento – C10:C12; Amarelo – Men:C8; Roxo – Men:C10; Verde – Men:C12; Azul escuro – [N8881]Br:C10.

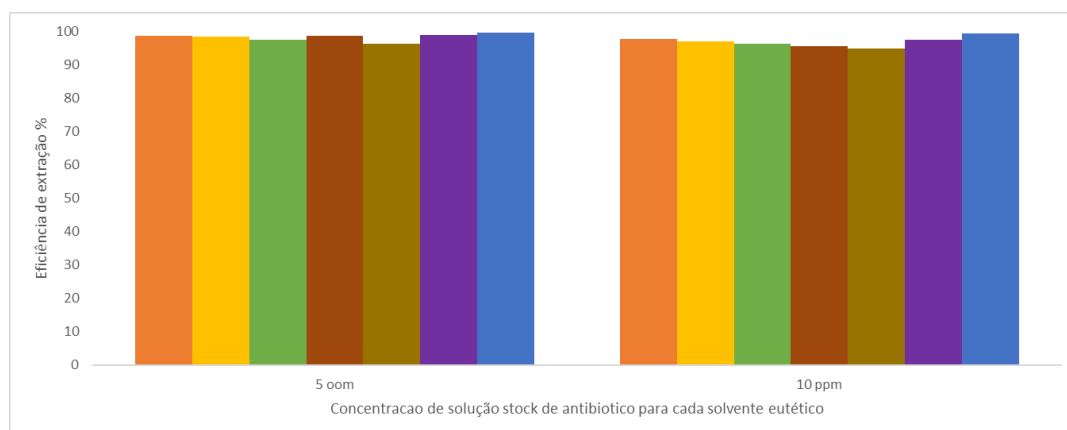


Figura 39 – Gráfico de eficiência de extração de cloranfenicol, comparando diferentes concentrações em solução de 5 e 10 ppm para cada solvente eutético. Laranja – C8:C10; Amarelo – C8:C12; Verde claro – C10:C12; Vermelho – Men:C8; Castanho – Men:C10; Roxo – Men:C12; Azul – [N8881]Br:C10.

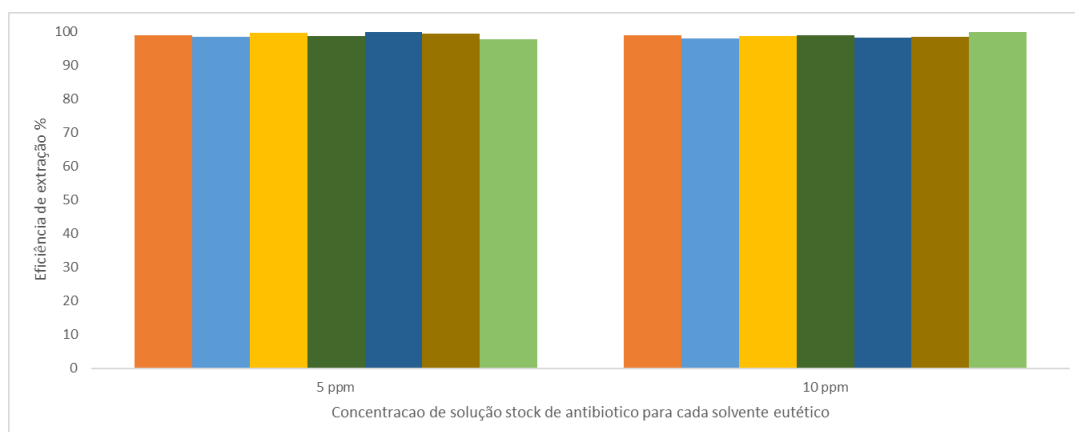


Figura 40 – Gráfico de eficiência de extração da norfloxacin, comparando diferentes concentrações em solução de 5 e 10 ppm para cada solvente eutético. Laranja – C8:C10; Azul claro – C8:C12; Amarelo – C10:C12; Verde escuro – Men:C8; Azul escuro – Men:C10; Castanho – Men:C12; Verde claro – [N8881]Br:C10.

Globalmente, não existe significativa diferença nas percentagens de extração dos antibióticos para diferentes solventes quando se altera a concentração de solução de fármaco de 5 para 10 ppm.

### 3.3.2. Reutilização e reciclagem do solvente eutético

Na reutilização do solvente por extração líquido-líquido e segundo figura 41, tabela 26 e anexo H, apenas obtiveram-se melhores resultados para a enrofloxacina de 10 ppm, em que foram realizados 3 ciclos de extração e reutilização com solvente C10:C12. Como se pode ver na figura 41 a eficiência de extração diminui apenas ligeiramente, apresentando o valor de 98,7% para o ciclo 1; 98,9% para o ciclo 2 e 92,7% para o ciclo 3. Após a reciclagem do solvente C10:C12, conseguiu-se recuperar a eficiência de extração obtida inicialmente para a enrofloxacina, 99,7% – anexo I. Assim, pode-se concluir sobre a viabilidade da eficiência de reutilização e da reciclagem deste extratante.

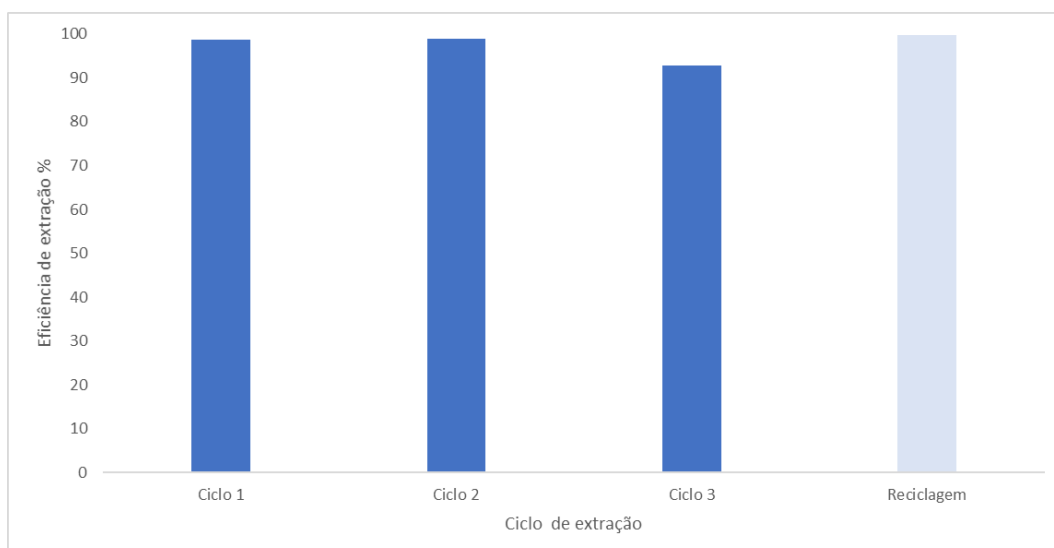


Figura 41 – Gráfico de reutilização e reciclagem de C10:C12 pela extração líquido-líquido obtido para a enrofloxacina de concentração de 10 ppm. Azul escuro: ciclos de extração 1, 2 e 3 na reutilização do solvente; Azul claro: reciclagem de solvente.

Tabela 26 – Resultados de reutilização e reciclagem de solvente eutético pela extração líquido-líquido obtidos pelo espectro de absorção para a enrofloxacin, cloranfenicol e norfloxacin de concentraçõ de 10 ppm.

Antibiótico	Enrofloxacin				Cloranfenicol				Norfloxacin			
	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Recicl.	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Recicl.	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Recicl.
Solvente eutético	C10:C12				[N8881]Br:C10				C10:C12			
Razão Molar	2:1				1:2				2:1			
Massa de antibiótico na soluçõ stock 10 ppm (g)	0,0106				0,0130				0,0101			
Massa total solvente eutético (g)	2,177				2,154				2,242			
Massa de soluçõ de antibiótico 10 ppm adicionada ao solvente (g)	2,203				2,042				2,034			
Absorvãcia	0,3891	0,3376	2,2488	0,0790	0,3891	0,3376	2,2488	0,8485	0,8118	1,4638	1,9879	3,7731
Concentraçõ (ppm) obtido na curva de calibraçõ	6,05	5,25	34,97	1,23	1,94	5,33	41,74	23,57	7,48	13,49	18,32	34,78
Massa de antibiótico que ficou na soluçõ aquosa (g)	0,0133	0,0116	0,0770	0,0027	0,0699	0,1920	0,0852	0,0481	0,0152	0,0274	0,0373	0,0707
Massa de antibiótico extraído pelo solvente (g)	1,0467	1,0484	0,9830	1,0573	1,2960	1,2891	1,2148	1,2519	0,9948	0,9826	0,9727	0,9393
% Extraçõ	98,74	98,91	92,73	99,74	99,70	99,16	93,44	96,30	98,49	97,28	96,31	93,00



### **3.4. Otimização das condições de impregnação de solventes no suporte poroso**

Pretende-se neste capítulo avaliar e comparar uma metodologia de extração alternativa à extração líquido-líquido e que utilize os mesmos solventes. Assim, os solventes eutéticos foram impregnados num suporte inerte e poroso, membranas de PVDF hidrofóbicas, para a extração dos fármacos de soluções aquosas. Esta tecnologia deve conseguir superar as principais desvantagens da extração líquido-líquido, a seguir listadas:

- o grande tempo de repouso necessário para a completa separação de fases orgânica e aquosa, no total de 48 horas;
- a solubilidade dos solventes na água, que embora reduzida afeta a determinação correta da eficiência de extração, e ainda a contaminação da água;
- a elevada massa necessária para efetuar a extração líquido-líquido, de 2 gramas de solvente para 2 gramas de solução aquosa de fármaco;
- a elevada viscosidade de alguns solventes como [N8881]Br:C10.

Testou-se inicialmente a solubilidade do solvente C10:C12 impregnado no suporte poroso em água ultrapura (anexo J) tendo-se verificado que não existe passagem de ácidos decanóico ou dodecanóico para água, pela ausência de bandas características destes ácidos no espectro de UV-vis (comprimento de onda inferiores a 270 nm), podendo-se afirmar que o solvente permanece impregnado no suporte, provavelmente devido a ter uma maior afinidade para o suporte hidrofóbico do que para a água. Encontra-se assim ultrapassada uma das desvantagens da extração líquido-líquido.

Neste capítulo verifica-se também a grande redução do tempo de contato entre o solvente e o antibiótico na extração para apenas 15 minutos, deixando de existir repouso de fases de 48 horas como otimizado no método de extração líquido-líquido. Para além disso, o procedimento de centrifugação da fase aquosa para leitura de espectro UV-vis foi completamente eliminado, uma vez que foi possível obter uma solução límpida e de fácil leitura no espectrofotómetro por simples decantação. Assim, de uma metodologia de preparação dos solventes e obtenção das fases de extração no tempo total de cerca de 52 horas, foi possível reduzir substancialmente esse mesmo tempo para cerca de 3 horas de trabalho efetivo em laboratório, permitindo assim obter mais resultados num menor tempo.

Outro ponto de grande importância neste novo método e apresentado nos capítulos seguintes, é o fato de existir uma redução significativa do solvente utilizado, que inicialmente foi de 2 gramas passando a cerca de 0,105 gramas, ou seja, foi possível reduzir a quantidade de solvente em 95% com a sua impregnação em suporte poroso. Mais ainda, dos 95% de solvente restante após a impregnação, pode admitir-se que cerca de metade é desperdiçado porque é retirado da membrana o excesso de solvente com papel de limpeza, e a outra metade permanece no vidro

de relógio, conseguindo-se por vezes recuperar entre 0,5-1 mL de solvente, que pode ser depois reaproveitado para nova impregnação, sem necessidade de utilizar solvente fresco.

Entre os resultados obtidos para a extração líquido-líquido com concentração de antibiótico de 10 ppm, ou seja, selecionaram-se os solventes cuja a eficiência de extração foi a mais elevada, ensaiaram-se extrações, nas mesmas condições, utilizando esses mesmos solventes impregnados em suporte poroso para diâmetro inicial de 0,5 cm. Pelos espetros do anexo L e com suportes circulares de diâmetro 0,5 cm e agitação em banho de água a 25°C e 300 rpm durante 15 minutos, obtiveram-se baixas percentagens de extração. Por exemplo, para a enrofloxacin utilizando o solvente C8:C10 a eficiência de extração foi de 10,8%; para cloranfenicol com os solventes C10:C12 com o valor 5,22% e C8:C10 com o valor de 5,42%; e para a norfloxacin com o solvente Mentol:C8 com o valor de 14,06%. Embora o solvente C8:C10 fosse inicialmente o solvente onde a enrofloxacin é mais solúvel (0,117 g ENR/g solvente), ele apresenta baixa percentagem de extração quando o solvente é impregnado. Assim sendo, estes solventes foram rejeitados nos capítulos seguintes para otimização das condições de extração e os solventes C10:C12 para extrair a enrofloxacin e norfloxacin, e o [N8881]Br:C10 para extrair cloranfenicol foram considerados como os melhores resultados pelo método de impregnação de solvente em suporte, com a vantagem de apresentarem uma boa capacidade de extração entre os 60-80% e não contaminam a solução aquosa de antibióticos, ou seja, os solventes permanecem na membrana e não passam para a solução aquosa do fármaco.

### 3.4.1. Tempo de equilíbrio

Efetou-se ensaios para tempos de agitação de 5, 15 e 30 minutos para a extração de norfloxacin de uma solução aquosa de 10 ppm, mantendo a velocidade de agitação em 300 rpm, e temperatura controlada a 25°C. Inicialmente, utilizou-se membranas de PVDF impregnadas com C10:C12 com diâmetro de 0,5 cm, por corte com um molde em uma membrana de maiores dimensões. Utilizaram-se 34 membranas com massa aproximada de solvente de 0,105 g. Os resultados estão sumariados na figura 42, na tabela 27 e anexo M. Verifica-se que não existe variação significativa entre a percentagem de norfloxacin extraída aos 15 e 30 minutos, 50,2% e 52,1%, respetivamente. Assim sendo, neste capítulo vão ser utilizados os solventes eutéticos que proporcionaram melhores eficiências da extração líquido-líquido para cada um dos fármacos em estudo e 15 minutos de agitação a 300 rpm à temperatura controlada de 25°C.

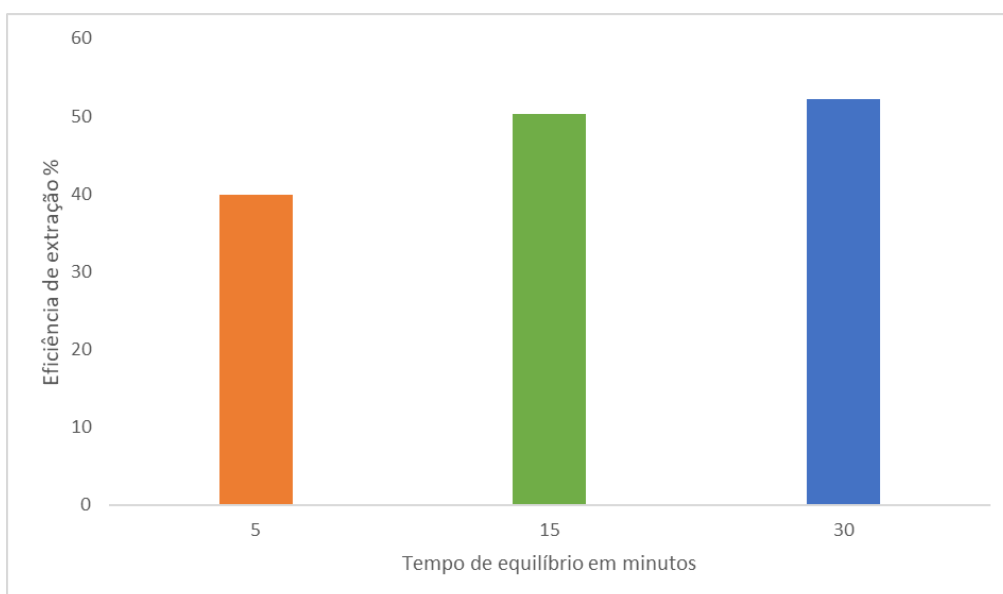


Figura 42 – Gráfico de eficiência de extração da norfloxacin de 10 ppm pelo solvente C10:C12 impregnado em suporte poroso, em função do tempo de equilíbrio. Laranja: 5 minutos de equilíbrio; Verde: 15 minutos de equilíbrio; Azul: 30 minutos de equilíbrio.

Tabela 27 – Resultados obtidos na otimização do tempo de equilíbrio na extração de norfloxacina 10 ppm com solvente C10:C12 impregnado em suporte poroso.

Tempo de equilíbrio (minutos)	5	15	30
Massa de NOR na solução stock 10 ppm (g)		0,0099	
Absorvância	0,6462	0,5349	0,5142
Concentração obtida pela curva de calibração (ppm)	5,96	4,93	4,74
Massa de NOR que ficou em 2 mL de solução aquosa de 10 ppm (g)	0,0060	0,0049	0,0047
Massa de NOR extraída pelo solvente C10:C12 (g)	0,0039	0,0050	0,0052
% Extração	39,84	50,20	52,13

### 3.4.2. Quantidade de membrana

Outra situação avaliada na membrana impregnada foi se o aumento da quantidade de 34 para 51 membranas ambas de diâmetro 0,5 cm teria ou não influência na eficiência de extração (figura 43, tabela 28). Em princípio seria de esperar um aumento da percentagem de extração devido ao aumento da quantidade de solvente, mas pelo contrário, conforme os espectros de absorção do anexo N, e mantendo as condições de equilíbrio definidas, não existe praticamente influência na extração aquando do aumento da quantidade de membranas, ou seja, a máxima extração foi obtida. Assim sendo, como condição ótima de quantidade de membrana de diâmetro 0,5 cm o valor de 34 círculos com massa total de solvente impregnada de 0,105 g foi mantido no capítulo seguinte, apenas alterando-se outras condições como o diâmetro da membrana.

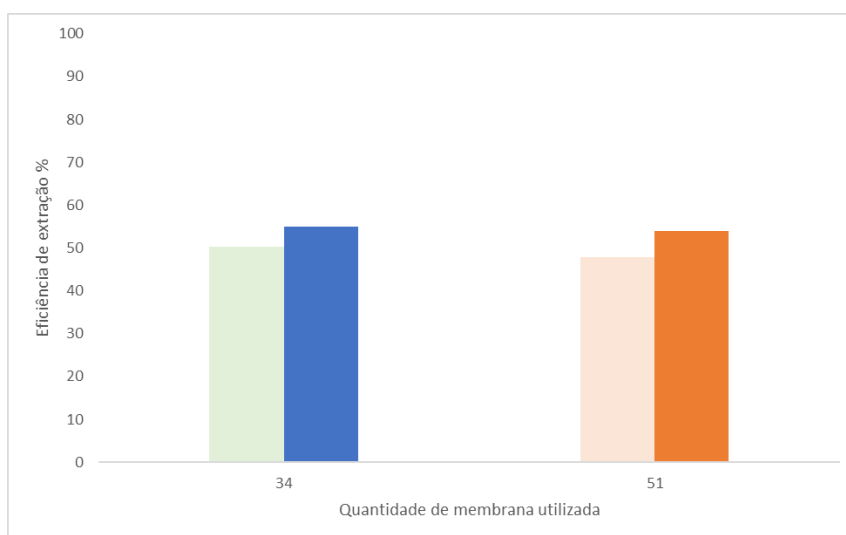


Figura 43 – Gráfico de eficiência de extração para diferentes quantidades de membrana impregnada em C10:C12 para extração de norfloxacina de solução aquosa de 10 ppm. Azul claro: ensaio 1 para 34 membranas; Azul escuro: ensaio 2 para 34 membranas; Laranja claro: ensaio 1 para 51 membranas; Laranja escuro: ensaio 2 para 51 membranas.

Tabela 28 – Resultados obtidos na otimização da quantidade de membrana impregnada em C10:C12 para a extração de norfloxacin de uma solução aquosa de 10 ppm.

Quantidade de membrana adicionada à solução de antibiótico	34		51	
Massa de NOR na solução stock 10 ppm (g)	0,0099			
Absorvância	0,5349	0,5605	0,4846	0,4946
Concentração obtida pela curva de calibração (ppm)	4,93	5,17	4,47	4,56
Massa de NOR que ficou em 2 mL de solução aquosa de 10 ppm (g)	0,0049	0,0052	0,0045	0,0046
Massa de NOR extraída pelo solvente C10:C12 (g)	0,0050	0,0047	0,0054	0,0053
% Extração	50,20	47,82	54,89	53,95

### 3.4.3. Dimensões da fase impregnada

O tamanho da fase impregnada é um fator essencial na extração com microfases, pois quanto maior for a área superficial da fase impregnada mais rápida e eficientemente vai ocorrer a extração. Para otimização do tamanho da fase porosa impregnada, foi utilizada uma solução aquosa de norfloxacin com concentração de 10 ppm. Foram preparadas membranas impregnadas de diâmetro 0,5 cm com massa total média de solvente eutético igual a 0,105 g, e com diâmetro de 0,2 cm com massa média de solvente de 0,055 e 0,125 g. Foram efetuadas extrações com 34 membranas de 0,5 cm de diâmetro, e 262 e 524 membranas de 0,2 cm de diâmetro impregnadas com C10:C12. Tal como se pode verificar na figura 44, tabela 29 e anexo O, 34 membranas de 0,5 cm de diâmetro contêm aproximadamente a mesma massa de solvente que 524 membranas de 0,2 cm de diâmetro. Verifica-se assim que é possível aumentar a percentagem de extração da norfloxacin em solução aquosa de 10 ppm, utilizando o mesmo solvente C10:C12, de 50,2% (34 membranas) para cerca de 79% (524 membranas) quando se diminui o tamanho da fase porosa impregnada, mantendo constante a massa de solvente utilizado.

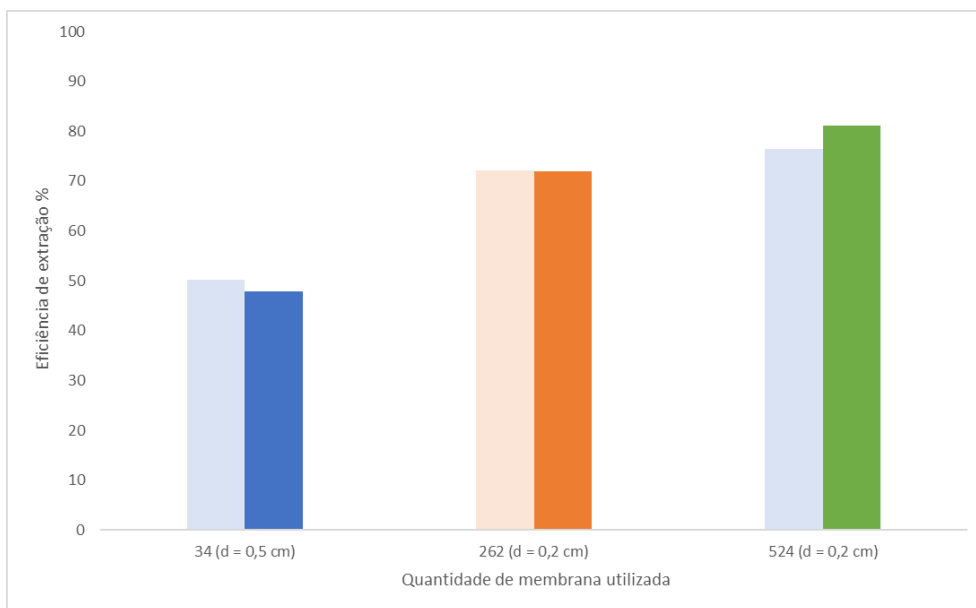


Figura 44 – Gráfico de eficiência de extração de norfloxacina de 10 ppm, utilizando 34 membranas de diâmetro 0,5 cm e 262 e 524 membranas de diâmetro 0,2 cm impregnadas em C10:C12. Azul claro: ensaio 1 para 34 membranas; Azul escuro: ensaio 2 para 34 membranas; Laranja claro: ensaio 1 para 262 membranas; Laranja escuro: ensaio 2 para 262 membranas; Verde claro: ensaio 1 para 524 membranas; Verde escuro: ensaio 2 para 524 membranas.

Tabela 29 – Resultados obtidos na otimização das condições de membrana impregnada em C10:C12 para norfloxacin 10 ppm.

Resultados de percentagem de extração						
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4
Quantidade de membrana	34		262		524	
Diâmetro aproximado de cada bola (cm)	0,5			0,2		
Massa média de 20 membranas em branco (g)			0,00027			
Massa total de C10:C12 impregnado em X membranas (g)	0,10642	0,10325	0,05442	0,05613	0,12766	0,12280
Absorvância	0,5349	0,5605	0,3152	0,3167	0,2452	0,1969
Concentração obtida pela curva de calibração (ppm)	4,93	5,17	2,91	2,92	2,26	1,81
Massa de NOR que ficou em 2 mL de solução aquosa de 10 ppm (g)	0,0049	0,0052	0,0029	0,0029	0,0023	0,0018
Massa de NOR extraída pelo solvente C10:C12 (g)	0,0050	0,0047	0,0075	0,0075	0,0073	0,0078
% Extração	50,20	47,82	72,07	71,93	76,46	81,10

Com o objetivo de verificar o comportamento dos solventes Timol:Mentol e Timol:Carvacrol na extração de cloranfenicol de 10 ppm – anexo P – e comparando com a extração líquido-líquido, os espectros apresentam grande interferência dos grupos aromáticos destes compostos, coincidente com a zona de comprimento de onda do cloranfenicol. Para além disso, o timol passa para a solução aquosa, não sendo garantida a sua efetiva impregnação em sólido poroso. Conforme figura 45 – A e 45 – C, a presença de anel aromático pode permitir a maior afinidade do timol e carvacrol com a água do que com cloranfenicol.

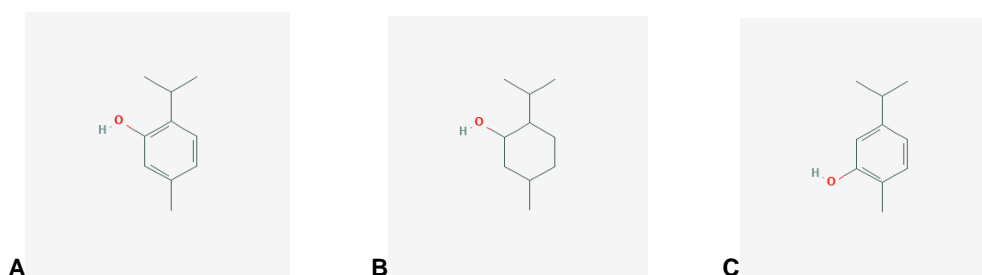


Figura 45 – Estrutura química do timol (A), mentol (B) e carvacrol (C). Fonte: PubChem [55], [56], [59].

### 3.4.4. Extração por etapas

Na extração por etapas é possível averiguar quantos ciclos de extração são necessários para atingir a remoção completa do antibiótico da fase aquosa pelo solvente eutético. Assim, para as condições otimizadas de 524 membranas de diâmetro 0,2 cm e temperatura controlada de 25°C, agitação de 300 rpm durante 15 minutos, para os 3 antibióticos em estudo – ENR, CLO e NOR – bastam 2 ciclos de extração para permitir a completa extração dos antibióticos em solução aquosa de 10 ppm, com os respectivos solventes eutéticos, ou seja, C10:C12 para a enrofloxacinina e norfloxacinina e [N8881]Br:C10 para o cloranfenicol, de acordo com os dados da figura 46 e tabela 30. Os espectros para estes ensaios encontram-se no anexo Q.

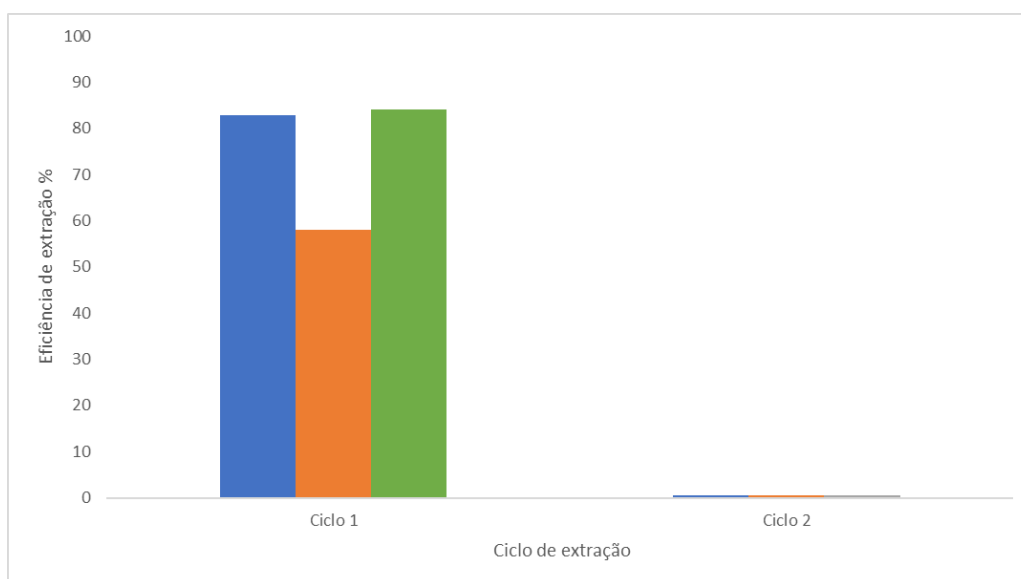


Figura 46 – Gráfico de eficiência de extração por etapas em 2 ciclos dos antibióticos pelos solventes eutéticos impregnados em suporte poroso. Azul: enrofloxacinina. Laranja: cloranfenicol; Verde: norfloxacinina.

Contrariamente ao verificado na extração líquido-líquido, não se verificaram interferências do solvente na determinação dos fármacos em água, indicando a ausência de *leaching* dos solventes para a água. Está assim demonstrada a validade deste novo método, mais rápido e reprodutível em condições laboratoriais.



Tabela 30 – Resultados obtidos na extração por etapas de enrofloxacin, cloranfenicol e norfloxacin 10 ppm através de impregnação de solvente em suporte poroso.

<b>Enrofloxacin por solvente C10:C12 impregnado</b>		
	Ciclo 1	Ciclo 2
Massa total de C10:C12 impregnado em 524 membranas (g)	0,17040	0,18361
Absorvância	0,1153	0,1386
Concentração obtida pela curva de calibração (ppm)	1,79	2,16
Massa de ENR que ficou em 2 mL de solução aquosa de 10 ppm (g)	0,00179	0,00216
Massa de ENR extraída pelo solvente C10:C12 (g)	0,00871	0
% Extração	82,92	0

<b>Cloranfenicol por solvente [N8881]Br:C10 impregnado</b>		
	Ciclo 1	Ciclo 2
Massa total de [N8881]Br:C10 impregnado em 524 membranas (g)	0,16550	0,16681
Absorvância	0,1617	0,2413
Concentração obtida pela curva de calibração (ppm)	4,49	6,70
Massa de CLO que ficou em 2 mL de solução aquosa de 10 ppm (g)	0,00449	0,00670
Massa de CLO extraída pelo solvente [N8881]Br:C10 (g)	0,00621	0
% Extração	58,02	0

<b>Norfloxacin por solvente C10:C12 impregnado</b>		
	Ciclo 1	Ciclo 2
Massa total de [N8881]Br:C10 impregnado em 524 membranas (g)	0,16532	0,17690
Absorvância	0,2035	0,2114
Concentração obtida pela curva de calibração (ppm)	1,86	1,95
Massa de NOR que ficou em 2 mL de solução aquosa de 10 ppm (g)	0,00188	0,00195
Massa de NOR extraída pelo solvente C10:C12 (g)	0,00992	0
% Extração	84,11	0

### 3.4.5. Reutilização do solvente eutético

Na reutilização do solvente eutético impregnado em sólidos porosos verifica-se que o solvente C10:C12 apresenta melhores resultados de extração da enrofloxacina e norfloxacina. Verifica-se ainda que nas condições otimizadas, apresentam um comportamento semelhante entre eles, com grande decaimento de percentagem de extração entre ciclos, num total de 3 ciclos. Verifica-se assim que deve ser rejeitado o ciclo 3 devido a baixa percentagem de extração de 5,90% de ENR e 17,8% de NOR, e podem ser considerados apenas os ciclos 1 (82,5% ENR e 73,2% NOR) e ciclo 2 (66,5% ENR e 46,5% NOR) na reutilização do C10:C12.

O solvente [N8881]Br:C10 que permite a extração com eficiência mais elevada do cloranfenicol, apresenta grande capacidade de reutilização, uma vez que em 5 ciclos consecutivos consegue manter o valor de extração em cerca de 60%, decaindo apenas no ciclo 6 para 36,4%, conforme apresentado na figura 47, tabela 31 e nos espectros de absorção do anexo R.

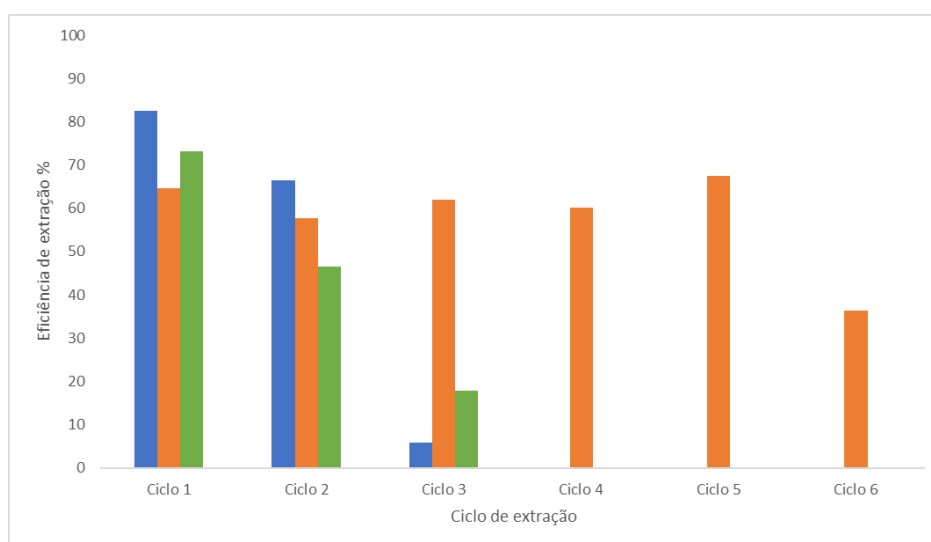


Figura 47 – Gráfico de eficiência de extração de antibiótico 10 ppm na reutilização de solvente impregnado em suporte. Azul: enrofloxacina; Laranja: cloranfenicol; Verde: norfloxacina.

A longa cadeia do composto [N8881]Br (figura 48) confere-lhe uma grande afinidade para a suporte e não se verificando o *leaching* deste composto para a água, evitando assim a formação de emulsões que ocorriam na extração líquido-líquido. A reutilização em 5 ciclos mantendo praticamente idêntico o valor de percentagem de extração pode ser garantia da grande afinidade do [N8881]Br para o cloranfenicol.

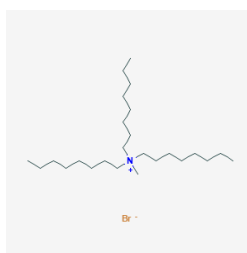


Figura 48 – Estrutura química do brometo de metiltrioctilamônio. Fonte: PubChem [57].

Tabela 31 – Resultados obtidos na reutilização do solvente impregnado em suporte, para enrofloxacina, cloranfenicol e norfloxacina 10 ppm.

<b>Enrofloxacina por solvente C10:C12 impregnado</b>			
	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3
Massa total de C10:C12 impregnado em 524 membranas (g)	0,17101		
Absorvância	0,1179	0,2263	0,6353
Concentração obtida pela curva de calibração (ppm)	1,83	3,52	9,88
Massa de ENR que ficou em 2 mL de solução aquosa de 10 ppm (g)	0,00183	0,00352	0,00988
Massa de ENR extraída pelo solvente C10:C12 (g)	0,00867	0,00698	0,00062
% Extração	82,54	66,48	5,90

<b>Cloranfenicol por solvente [N8881]Br:C10 impregnado</b>						
	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4	Ciclo 5	Ciclo 6
Massa total de [N8881]Br:C10 impregnado em 524 membranas (g)	0,19517					
Absorvância	0,1361	0,1630	0,1467	0,1537	0,1252	0,2451
Concentração obtida pela curva de calibração (ppm)	3,78	4,53	4,08	4,27	3,48	6,81
Massa de CLO que ficou em 2 mL de solução aquosa de 10 ppm (g)	0,00378	0,00453	0,00408	0,00427	0,00348	0,00681
Massa de CLO extraída pelo solvente [N8881]Br:C10 (g)	0,00692	0,00617	0,00663	0,00643	0,00722	0,00389
% Extração	64,67	57,68	61,92	60,10	67,50	36,37

<b>Norfloxacina por solvente C10:C12 impregnado</b>			
	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3
Massa total de C10:C12 impregnado em 524 membranas (g)	0,16468		
Absorvância	0,3421	0,6849	1,0523
Concentração obtida pela curva de calibração (ppm)	3,15	6,31	9,70
Massa de NOR que ficou em 2 mL de solução aquosa de 10 ppm (g)	0,00315	0,00631	0,00970
Massa de NOR extraída pelo solvente C10:C12 (g)	0,00865	0,00549	0,00210
% Extração	73,28	46,50	17,81

### 3.4.6. Concentração da solução stock inicial

De forma a aproximar os ensaios laboratoriais de uma situação real de aplicação à descarga de água da aquicultura para remoção de antibiótico, efetuaram-se experimentos reduzindo a concentração da solução stock de antibiótico de 10 ppm para 2 ppm. De referir que esta redução para 2 ppm foi a máxima possível, devido ao erro sempre associado na pesagem de antibiótico na balança analítica utilizada (Erro: 0,1 mg; Marca: Mettler Toledo; Modelo: MS205DU). Uma redução maior desta concentração estaria associada a um maior erro. Por outro lado, também na quantificação da extração ter-se-ia que utilizar uma técnica de quantificação com um limite de concentração mais baixo que o UV-vis. Contava-se ter neste trabalho acesso a um aparelho de LC-MS/MS que permitiria descer significativamente a gama de concentrações, até ng/mL, utilizadas na aquicultura. No entanto, por motivos alheios á nossa vontade, tal não aconteceu.

Os resultados obtidos para a extração de norfloxacina de uma solução aquosa de 2 ppm, nas condições otimizadas de 524 membranas de diâmetro 0,2 cm impregnadas em solvente C10:C12, agitação em banho de água a 25°C, 300 rpm durante 15 minutos, encontram-se na figura 49, tabela 32 e anexo S. Verifica-se que ao diminuir a concentração da solução de antibiótico existe perda da eficiência de extração para 56,0% ou seja, é necessária uma maior massa de solvente eutético impregnado para extrair fármaco deste tipo de sistema para a aquicultura, onde a concentração de antibiótico na zona de descarga é na ordem por exemplo dos ng/mL.

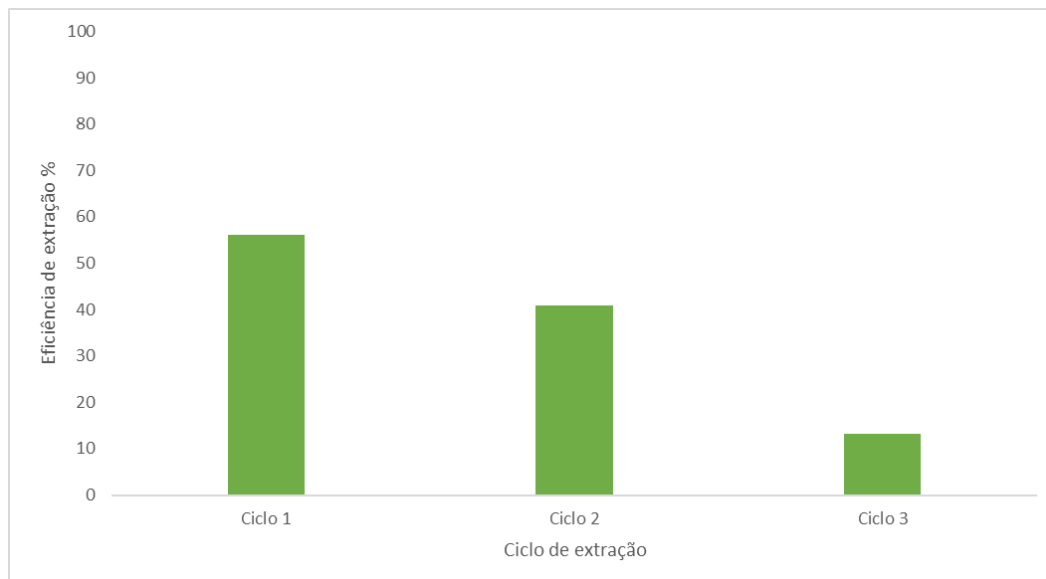


Figura 49 – Gráfico de eficiência de extração de norfloxacina de 10 ppm na reutilização em 3 ciclos do solvente C10:C12 impregnado em suporte poroso.

Tabela 32 – Resultados obtidos na reutilização do solvente C10:C12 impregnado em suporte, para norfloxacinina em solução aquosa de 2 ppm.

<b>Norfloxacinina por solvente C10:C12 impregnado</b>			
	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3
Massa total de C10:C12 impregnado em 524 membranas (g)		0,19635	
Absorvância	0,1240	0,1670	0,2451
Concentração obtida pela curva de calibração (ppm)	1,14	1,54	2,26
Massa de NOR que ficou em 2 mL de solução aquosa de 2 ppm (g)	0,00114	0,00154	0,00226
Massa de NOR extraída pelo solvente C10:C12 (g)	0,00146	0,00106	0,00034
% Extração	56,04	40,80	13,12

Permanece válida a possibilidade de utilizar o solvente em pelo menos 3 ciclos, tendo obtido eficiências de extração no ciclo 1 de 56,0 %, ciclo 2 de 40,8% e ciclo 3 de 13,1%, sendo desprezável o ciclo 3 devido a baixa percentagem de extração da norfloxacinina pelo solvente.

Na figura 50 apresenta-se a comparação entre as eficiências de extração para concentrações de solução de norfloxacinina de 10 e 2 ppm, nas condições experimentais ótimas de 524 membranas de 0,2 cm impregnadas em C10:C12, agitação em banho-maria de 25°C a 300 rpm durante 15 minutos. Verifica-se a diminuição da percentagem de extração da NOR pelo solvente C10:C12 de 84% para 56% quando se diminui a concentração da solução aquosa de 10 para 2 ppm.

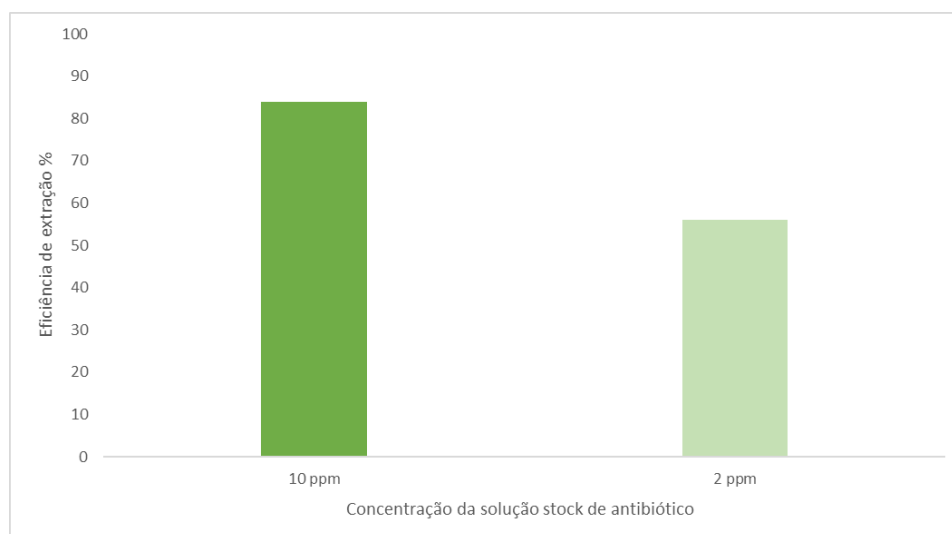


Figura 50 – Gráfico do efeito da percentagem de extração de norfloxacinina para diferentes concentrações de solução aquosa de antibiótico. Verde escuro: concentração de 10 ppm; Verde claro: concentração de 2 ppm.

Assim sendo, é necessário efetuar uma projeção da quantidade de solvente a ser necessário para extração eficaz dos antibióticos para a aquicultura para concentrações em ng/mL, aplicada a estas novas condições reais, o que demonstra a limitação do método de impregnação de solvente em sólido poroso. Por exemplo, para o caso da enrofloxacinina, em que o limite residual máximo não deve exceder o valor de 100 µg/kg, e sabendo que para cada 2 mL (aproximadamente 0,002 kg) de solução aquosa de ENR de 10 ppm foi necessário 0,105 gramas (em 524 membranas de diâmetro 0,2 cm) de solvente C10:C12 para obter 82,9% de extração de

ENR, seria então necessário cerca de 53 gramas de solvente em 1 kg de água contendo no máximo 100 µg de ENR, para extrair a maior quantidade possível deste antibiótico na descarga da aquicultura. Uma vez que estes materiais podem ser reutilizados, este valor descera para cerca de metade.

## 4. Conclusão

No final deste trabalho experimental conclui-se que a solubilidade aparente dos antibióticos em solventes eutéticos, é o parâmetro mais relevante para fazer uma triagem inicial por forma a descartar os solventes com menor eficiência de extração dos fármacos. Assim sendo, em princípio, conclui-se que os solventes com maior solubilidade nos fármacos, consequentemente os extraem melhor: para a enrofloxacina, o C8:C10 e Timol:C10 (0,117 g ENR/g solvente); para o caso do cloranfenicol o melhor extrator será o [N8881]Br:C10 (0,154 g CLO/g solvente); e para a norfloxacina o Timol:C8 (0,249 g NOR/g solvente) e Timol:C10 (0,242 g NOR/g solvente). No entanto, a relação entre a solubilidade e a eficiência de extração apenas foi válida para cloranfenicol no solvente [N8881]Br:C10.

Pelo método de extração líquido-líquido, otimizado para as condições de solução aquosa de antibiótico com concentração de 10 ppm, agitação de fases em banho de água a 25°C, durante 15 minutos a 300 rpm, repouso de fases de 48 horas, centrifugação da fase aquosa em 3 horas a 6000 rpm, obteve-se percentagens de extração para todos os solventes acima dos 98% para a norfloxacina. No entanto, estes resultados estão sobrevalorizados, uma vez que se comprovou a efetiva passagem dos solventes para a fase aquosa.

O método de impregnação de solventes em sólidos porosos apresenta vantagens em relação a extração líquido-líquido, sendo elas:

- redução do tempo de trabalho experimental de cerca de 52 horas para 3 horas;
- redução da massa de solvente utilizado de 2 gramas para cerca de 0,105 gramas, com reaproveitamento do solvente restante da impregnação para novo ensaio;
- eliminação da passagem de solvente para a fase aquosa de antibiótico.

Otimizando as condições pelo método de impregnação para soluções aquosas de antibiótico com concentração de 10 ppm, 524 membranas de 0,2 cm de diâmetro impregnadas com 0,105 g de solvente, agitação em banho de água a 25°C durante 15 minutos a 300 rpm, e leitura imediata do espectro de absorção, conclui-se que os melhores extratores e percentagens de extração da enrofloxacina e norfloxacina foram respetivamente com o C10:C12 de 82,9% e 84,1%, e o para o cloranfenicol com o [N8881]Br:C10 com um valor de 58,0%. Apenas para o caso de cloranfenicol é confirmada a ideia inicial de que o solvente que apresenta maior solubilidade do fármaco, [N8881]Br:C10, será o melhor extrator.

A aplicação dos resultados obtidos por impregnação de solvente em suporte para o contexto real, deve ser devidamente dimensionada, uma vez que se concluiu que a diminuição da concentração de antibiótico em soluções aquosas traduz-se em perda de eficiência de extração, sendo esta a principal limitação do método de impregnação. Para o caso da norfloxacina, numa solução inicial de 10 ppm diminui-se a percentagem de extração de 84,1% para 56% com o decréscimo da concentração da solução para 2 ppm. Assim, é necessária uma maior quantidade

de solvente para extrair fármacos em muito baixas concentrações. Assim, esta tecnologia aqui desenvolvida teria uma maior viabilidade após um passo de concentração, onde a concentração de fármaco já fosse mais elevada.

Por fim, conclui-se que é possível a reutilização e reciclagem dos solventes por extração líquido-líquido, com os melhores resultados para o caso de soluções aquosas de enrofloxacin reutilizando o solvente C10:C12 em 3 ciclos com percentagens de extração de 98,7% para o ciclo 1; 98,9% para o ciclo 2 e 92,7% para o ciclo 3 e a reciclagem do mesmo solvente apresentou uma eficiência de extração de ENR em 99,7%. Por impregnação do solvente em membrana, são suficientes 2 ciclos para extrair por completo os 3 antibióticos em estudo, sendo um ótimo indicador na extração por etapas. O solvente [N8881]Br:C10 revelou grande capacidade de reutilização em 5 ciclos para o caso do cloranfenicol, embora de todos os solventes este seja o menos sustentável entre os 10 estudados.

#### **4.1. Perspetivas de trabalho futuro**

No geral, conclui-se que a abordagem de impregnação de solventes eutéticos em sólidos porosos apresenta mais benefícios do que a extração líquido-líquido na remoção de antibióticos de soluções aquosas, e sugere-se o reforço dos métodos de análise em equipamentos mais sofisticados como o LC-MS/MS, que combina a capacidade de separação física da cromatografia líquida com a capacidade de análise de massa por espectrometria de massa, permitindo assim diminuir os fármacos presentes em água até ordem de concentração de ng/mL, igualando as condições encontradas nas descargas da aquicultura.

Recomenda-se cuidados acrescidos no emprego de antibióticos, devendo efetuar-se soluções aquosas frescas no próprio dia de trabalho, em particular no caso da enrofloxacin que é o composto mais sensível à temperatura ambiente. Não é garantia de sucesso dos resultados obtidos, o uso de soluções aquosas de fármacos quando armazenados há vários dias. Tanto quanto possível, os fármacos em estudo devem estar armazenados a baixas temperaturas. Basta que esta solução esteja mal preparada inicialmente para comprometer toda a operação levando a desperdício de reagentes, tempo e percentagens de extração de antibióticos fora de contexto.

É importante o estudo atempado dos gráficos de equilíbrio sólido-líquido dos solventes antes da aplicação em laboratório, como prova de que efetivamente está garantida a presença de um DES, evidenciado pelo grande abaixamento da temperatura de fusão, em comparação com as temperaturas de fusão de cada composto individualmente.

Para continuação do trabalho realizado, propõe-se a projeção de aplicação de extração de antibióticos no contexto real da aquicultura, assim como alargar os ensaios a outros fármacos importantes nestes sistemas e a outros solventes eutéticos.





## Referências bibliográficas

- [1] J. Bregnballe, A Guide to Recirculation Aquaculture, FAO and EUROFISH, 2015, <http://www.fao.org/3/a-i4626e.pdf>. Acedido a 05/05/2020.
- [2] R.C. Summerfemt, C.R. Penne, Septic Tank Treatment of the Effluent from a Small-Scale Commercial Recycle Aquaculture System, *North American Journal of Aquaculture* 69 (2007) 59–68.
- [3] I.C.R. Soto, O. Dia, L.A.L. Soto, P. Drogui, G. Buelna, L.M.D. Tenorio, R.G.U. Mercado, P.G. Moroyoqui, Degradation of Chloramphenicol in Synthetic and Aquaculture Wastewater Using Electrooxidation, *Journal of Environmental Quality* 47 (2018) 805–811.
- [4] R. Ranjan, S. Megarajan, B. Xavier, S.S. Raju, S. Ghosh, A. Gopalakrishnan, Design and performance of recirculating aquaculture system for marine finfish broodstock development, *Aquacultural Engineering* 85 (2019) 90–97.
- [5] G. Fedorova, V. Nebesky, T. Randak, R. Grabic, Simultaneous determination of 32 antibiotics in aquaculture products using LC-MS/MS, *Chemical Papers* 68 (2014) 29–36.
- [6] R.C. Okocha, I.O. Olatoye, O.B. Adedeji, Food safety impacts of antimicrobial use and their residues in aquaculture, *Public Health Reviews* 39:21 (2018) 1–21.
- [7] R. Lulijwa, E.J. Rupia, A.C. Alfaro, Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers, *Reviews in Aquaculture*, Wiley Publishing Asia Pty Ltd (2019) 1–24.
- [8] P.H. Serrano, Responsible use of antibiotics in aquacultures, *Food and Agriculture Organization of the United Nations* 469 (2005) 1–110.
- [9] M.C. Danner, A. Robertson, V. Behrends, J. Reiss, Antibiotic pollution in surface fresh waters: Occurrence and effects; *Science of the Total Environment* 664 (2019) 793–804.
- [10] C.I.L. Justino, K.R. Duarte, A.C. Freitas, T.S.L. Panteleitchouk, A.C. Duarte, T.A.P.R. Santos, Contaminants in aquaculture: Overview of analytical techniques for their determination, *Trends in Analytical Chemistry* 80 (2016) 293–310.
- [11] T.C.M.V. Do, D.Q. Nguyen, T.D. Nguyen, P.H. Le, Development and Validation of a LC-MS/MS Method for Determination of Multi-Class Antibiotic Residues in Aquaculture and River Waters, and Photocatalytic Degradation of Antibiotics by TiO<sub>2</sub> Nanomaterials, *Catalysts* 10, 356 (2020) 1–19.
- [12] L. Santos, F. Ramos, Analytical strategies for the detection and quantification of antibiotic residues in aquaculture fishes: A review, *Trends in Food Science & Technology* 52 (2016) 16–30.

- [13] D.J. Morris, A.J. Gray, J.F. Kaya, G. Gettinbya, EU sampling strategies for the detection of veterinary drug residues in aquaculture species: Are they working? *Drug Test, Analysis* 4 (2012) 1–9.
- [14] V.F. Samanidou, E.N. Evaggelopoulou, Analytical strategies to determine antibiotic residues in fish – Review, *Journal of Separation Science* 30 (2007) 2549–2569.
- [15] A.C. Faleye, A.A. Adegoke, K. Ramluckan, F. Bux, T.A. Stenström, Identification of antibiotics in wastewater: current state of extraction protocol and future perspectives, *Journal of Water and Health* 15 (2017) 982–1003.
- [16] C. Florindo, L.C. Branco, I.M. Marrucho, Development of hydrophobic deep eutectic solvents for extraction of pesticides from aqueous environments, *Fluid Phase Equilibria* 448 (2017) 135–142.
- [17] X. Yang, S. You, Y. Shi, Q. Yang, X. Ning, The research about the removal of antibiotic pollutants in water pollution by adsorption materials and photocatalytic materials, *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* 186 (2018) 1–5.
- [18] X. Cheng, C. Zheng, Q. Lu, J. Liu; Q. Wang, Y. Fan, J. Zhang, Adsorption of Furazolidone, D-Cycloserine, and Chloramphenicol on Granular Activated Carbon Made from Corn Stover, *Journal of Environmental Engineering* 145 (2017) 04019038 1–11.
- [19] R. Yu, X. Yu, B. Xue, J. Liao, W. Zhu, S. Tian, Adsorption of chlortetracycline from aquaculture wastewater using modified zeolites, *Journal of Environmental Science and Health Part A - Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 55 (2020) 573–584.
- [20] H. Yang, X. Yu, L. Wang, M. Guo, J. Liu, Adsorption of Sulfanilamide from Aquaculture Wastewater Using Modified Activated Carbon Fiber: Equilibrium, Kinetic and Thermodynamic. Specific and Informative: Surface Modification, *Surface Engineering and Applied Electrochemistry* 55 (2019) 684–691.
- [21] D. Dolar, A. Vukovic, D. Asperger, K. Kosutic, Efficiency of RO/NF membranes at the removal of veterinary antibiotics, *Water Science Technology* 65 (2012) 317–323.
- [22] A.M. Gorito, A.R. Ribeiro, C.R. Gomes, C.M.R. Almeida, A.M.T. Silva, Constructed wetland microcosms for the removal of organic micropollutants from freshwater aquaculture effluents, *Science of the Total Environment* 644 (2018) 1171–1180.
- [23] S. Dong, L. Cui, W. Zhang, L. Xia, S. Zhou, C. K. Russell, M. Fan, J. Feng, J. Sun, Double-shelled ZnSnO<sub>3</sub> hollow cubes for efficient photocatalytic degradation of antibiotic wastewater, *Chemical Engineering Journal* 384 (2020) 123279.
- [24] T.C.M.V. Do, D.Q. Nguyen, T.D. Nguyen, P. H. Le, Development and Validation of a LC-MS/MS Method for Determination of Multi-Class Antibiotic Residues in Aquaculture and River

Waters, and Photocatalytic Degradation of Antibiotics by TiO<sub>2</sub> Nanomaterials, *Catalysts* 10, 356 (2020) 1–19.

[25] Y. Nomura, S. Fukahori, T. Fujiwara, Removal of sulfamonomethoxine and its transformation byproducts from fresh aquaculture wastewater by a rotating advanced oxidation contactor equipped with zeolite/TiO<sub>2</sub> composite sheets, *Process Safety and Environmental Protection* 134 (2020) 161–168.

[26] J.F. Leal, V.I. Esteves, E.B.H. Santos, Use of sunlight to degrade oxytetracycline in marine aquaculture's waters, *Environmental Pollution* 213 (2016) 932–939.

[27] D.J.G.P. van Osch, C.H.J.T. Dietz, J. van Spronsen, M.C. Kroon, F. Gallucci, M. van S. Annaland, R. Tuinier, A Search for Natural Hydrophobic Deep Eutectic Solvents Based on Natural Components, *American Chemical Society Sustainable Chemistry & Engineering* 7 (2019) 2933–2942.

[28] A.P. Abbott, G. Capper, D.L. Davies, R.K. Rasheed, V. Tambyrajah, Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures, *Chemical Communications - Royal Society of Chemistry* 9 (1) (2003) 70–71.

[29] M.A.R. Martins, S.P. Pinho, J.A.P. Coutinho, Insights into the Nature of Eutectic and Deep Eutectic Mixtures, *Journal of Solution Chemistry* 48 (2019) 962–982.

[30] C. Florindo, L.C. Branco, I.M. Marrucho, Quest for Green-Solvent Design: From Hydrophilic to Hydrophobic (Deep) Eutectic Solvents, *ChemSusChem* 12 (2019) 1549–1559.

[31] B.D. Ribeiro, C.I.S. Florindo, L. Iff, M.A. Coelho, I.M. Marrucho, Novel Menthol-based Eutectic Mixtures: Hydrophobic Low Viscosity Solvents, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 3,10 (2015) 2469–2477.

[32] A.P. Abbott, D. Boothby, G. Capper, D.L. Davies, R.K. Rasheed, Deep eutectic solvents formed between Choline Chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids, *Journal of the American Chemical Society* 126 (2004) 9142–9147.

[33] M.S. Diniz, I. Pere, L. Castro, A.C. Freitas, T.A.P.R. Santos, R. Pereira, A.C. Duarte, Impact of a secondary treated bleached Kraft pulp mill effluent in both sexes of goldfish (*Carassius auratus* L.), *Journal of Environmental Science and Health Part A* 45 (2010) 1858–1865.

[34] P.M. Costa, S. Caeiro, M.S. Diniz, J. Lobo, M. Martins, A.M. Ferreira, M. Caetano, C. Vale, T.A. DelValls, M.H. Costa, A description of chloride cell and kidney tubule alterations in the flatfish *Solea senegalensis* exposed to moderately contaminated sediments from the Sado estuary (Portugal), *Journal of Sea Research* 64 (2010) 465–472.

[35] C. Figueiredo, T.F. Grilo, C. Lopes, P. Brito, M. Diniz, M. Caetano, R. Rosa, J. Raimundo, Accumulation, elimination and neuro-oxidative damage under lanthanum exposure in glass eels (*Anguilla anguilla*), *Chemosphere* 206 (2018) 414–423.

- [36] C. Florindo, F. Lima, L.C. Branco, I.M. Marrucho, Hydrophobic Deep Eutectic Solvents: A Circular Approach to Purify Water Contaminated with Ciprofloxacin, *American Chemical Society Sustainable Chemistry & Engineering* 7 (2019) 14739–14746.
- [37] Instruction manual – Operation Guide UV-1800 Shimadzu Spectrophotometer, Shimadzu Corporation Kyoto Japan – Analytical e Measuring Instruments Division; 206-97042A, Feb. 2008.
- [38] <https://www.ssi.shimadzu.com/products/uv-vis-spectrophotometers/faqs/light-and-theory.html>. Acedido a 26/12/2020.
- [39] S. Shokrolahi, M. Farhadian, N. Davari, Degradation of Enrofloxacin antibiotic in contaminated water by ZnO/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Zeolite nanophotocatalyst, *Journal of Applied Research in Water and Wastewater* 12 (2019) 150-155.
- [40] Wankhede SB, Prakash A and Chitlange SS, Simultaneous spectrophotometric estimation of norfloxacin and ornidazole in table dosega form, *International Journal of ChemTech Research* 1, (2009) 937-940.
- [41] [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/c7795pis.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/c7795pis.pdf). Acedido a 31/12/2020.
- [42] <https://go.drugbank.com/drugs/DB11404>. Acedido a 26/12/2020.
- [43] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Enrofloxacin>. Acedido a 26/12/2020.
- [44] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chloramphenicol>. Acedido a 26/12/2020.
- [45] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Norfloxacin>. Acedido a 26/12/2020.
- [46] S.D.J. Sierra, J.S. Agredo, E.H. Calderon, R.A.T. Palma, Elimination of the antibiotic norfloxacin in municipal wastewater, urine and seawater by electrochemical oxidation on IrO<sub>2</sub> anodes, *Science of the Total Environment* (2016) 1-11.
- [47] J.O. Otalvaro, M. Avena, M. Brigante, Adsorption of norfoxacin on a hexagonal mesoporous silica: isotherms, kinetics and adsorbent reuse, *Adsorption* 25 (2019) 1375–1385.
- [48] M.J. M. Mejía, I. Sato, S. Rath, Sorption mechanism of enrofloxacin on humic acids extracted from Brazilian soils, *Environmental Science and Pollution Research* (2017) 1–12.
- [49] J.O. Otalvaro, M. Avena, M. Brigante, Adsorption of norfoxacin on a hexagonal mesoporous silica: isotherms, kinetics and adsorbent reuse, *Adsorption* 25 (2019) 1375–1385.
- [50] Y. Li, J. Zhang, H. Liu, Removal of Chloramphenicol from Aqueous Solution Using Low-Cost Activated Carbon Prepared from *Typha orientalis*, *Water* 10, 351 (2018) 1-16.
- [51] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Decanoic-acid>. Acedido a 26/12/2020.
- [52] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Octanoic-acid>. Acedido a 26/12/2020.

[53] [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB1669961.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB1669961.htm). Acedido a 26/12/2020.

[54] <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.3756.html>. Acedido a 26/12/2020.

[55] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Thymol>. Acedido a 26/12/2020.

[56] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Menthol>. Acedido a 26/12/2020.

[57] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methyltrioctylammonium-bromide>. Acedido a 26/12/2020.

[58] [https://www.chemsrc.com/en/cas/35675-80-0\\_416899.html](https://www.chemsrc.com/en/cas/35675-80-0_416899.html). Acedido a 26/12/2020.

[59] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carvacrol>. Acedido a 26/12/2020.



## Anexos

### Anexo A – Preparação dos solventes eutéticos

Na preparação dos solventes eutéticos teve-se em conta a massa molar de cada componente individual, com o propósito de determinar a massa molar média dos 2 componentes, de acordo com cálculos efetuados na tabela 33, dada pela seguinte expressão:

Massa molar do solvente eutético =

$$\frac{[\text{Razão molar} \times \text{Massa molar}]_{\text{componente 1}} + [\text{Razão molar} \times \text{Massa molar}]_{\text{componente 2}}}{\text{Razão molar}_{\text{componente 1}} + \text{Razão molar}_{\text{componente 2}}} \quad (2)$$

Após a obtenção da massa molar de cada solvente eutético, foi possível determinar a massa de cada componente a pesar individualmente, de forma a que a massa total de solvente a ser usado neste trabalho, fosse de 2 gramas, de acordo com as seguintes expressões:

$$\text{Fator} = \frac{\text{Massa molar do solvente eutético}}{2 \text{ gramas}} \quad (3)$$

$$\text{Massa do componente 1 ou 2} = \frac{\text{Fator} \times [\text{Razão molar} \times \text{Massa molar}]_{\text{componente 1 ou 2}}}{\text{Razão molar}_{\text{componente 1}} + \text{Razão molar}_{\text{componente 2}}} \quad (4)$$

Tabela 33 – Cálculos para a massa de solvente eutético a ser preparado.

	Razão Molar	Comp 1	Comp 2	Massa molar solvente eutético (g/mol)	Massa do componente 1 a pesar (g)	Massa do componente 2 a pesar (g)	Massa total do solvente eutético (g)
<b>C8: C10</b>	1:1	C8	C10	158,24	0,91137	1,08863	
<b>C8: C12</b>	3:1	C8	C12	158,24	1,36703	0,63297	
<b>C10: C12</b>	2:1	C10	C12	181,61	1,26466	0,73534	
<b>Mentol: C8</b>	1:2	Mentol	C8	148,23	0,70283	1,29717	
<b>Mentol: C10</b>	1:2	Mentol	C10	166,93	0,62409	1,37591	
<b>Mentol: C12</b>	2:1	Mentol	C12	170,95	1,21881	0,78119	
<b>Timol: C8</b>	1:1	Timol	C8	147,22	1,02041	0,97959	2,00000
<b>Timol: C10</b>	1:1	Timol	C10	161,24	0,93165	1,06835	
<b>Timol: Mentol</b>	1:2	Timol	Mentol	154,25	0,64924	1,35076	
<b>Timol: Mentol</b>	1:1	Timol	Mentol	153,25	0,98026	1,01974	
<b>Timol: Carvacrol</b>	1:1	Timol	Carvacrol	150,22	1,00000	1,00000	
<b>[N8881]Br: C10</b>	1:2	[N8881] Br	C10	264,38	1,13124	0,86876	



## Anexo B – Curva de calibração dos antibióticos

### Anexo B1 – Enrofloxacin

Tabela 34 – Resultados obtidos para o traçado da curva de calibração da enrofloxacin.

Solução stock de 10 ppm de enrofloxacin (1 mg / 100 mL água)		Soluções padrões de enrofloxacin		
		Padrão de 2 ppm	Padrão de 4 ppm	Padrão de 6 ppm
Massa de enrofloxacin (g)	0,00099	Padrão de 2 ppm	1	0,1051
Comprimento de onda (nm)	273	Padrão de 4 ppm	2	0,2245
Absorvância (pico)	0,7409	Padrão de 6 ppm	3	0,3825
		Padrão de 8 ppm	4	0,5356
		Padrão de 10 ppm	5	0,6464

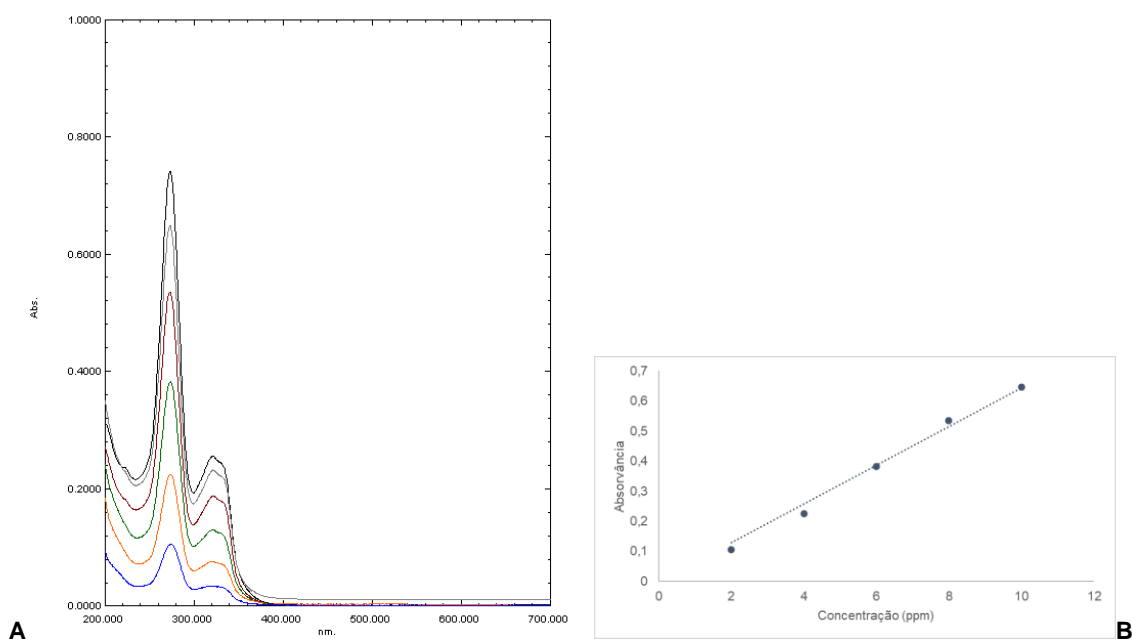


Figura 51 – Espectro de absorção (A) e curva de calibração (B) para a enrofloxacin. Preto: solução stock de enrofloxacin de 10 ppm, Azul: padrão de 2 ppm, Amarelo: padrão de 4 ppm, Verde: padrão de 6 ppm, Vermelho escuro: padrão de 8 ppm, Cinzento: padrão de 10 ppm.

## Anexo B2 – Cloranfenicol

Tabela 35 – Resultados obtidos para o traçado da curva de calibração para cloranfenicol.

Solução stock de 10 ppm de cloranfenicol (1 mg / 100 mL água)		Soluções padrões de cloranfenicol		
			Volume de solução stock de cloranfenicol retirado (mL) (mL / 5 mL de água)	Absorvância (pico)
Massa de cloranfenicol (g)	0,00105	Padrão de 2 ppm	1	0,0632
Comprimento de onda (nm)	277,2	Padrão de 4 ppm	2	0,1324
Absorvância (pico)	0,3784	Padrão de 6 ppm	3	0,2170
		Padrão de 8 ppm	4	0,2869
		Padrão de 10 ppm	5	0,3672

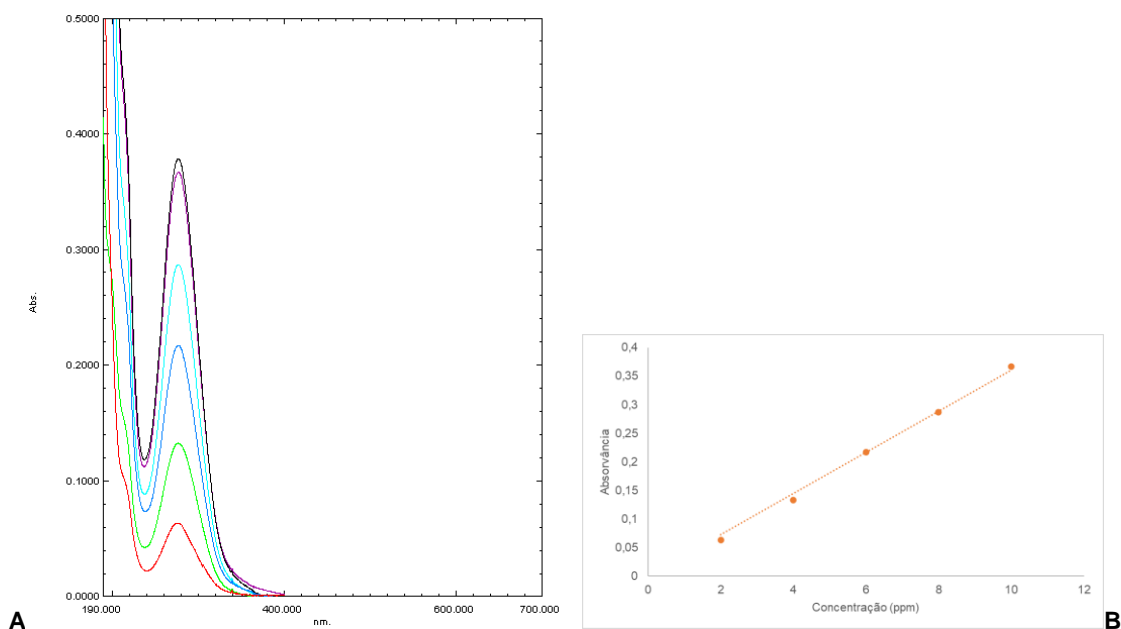


Figura 52 – Espectro de absorção (A) e curva de calibração (B) para cloranfenicol. Preto: solução stock de cloranfenicol de 10 ppm, Vermelho: padrão de 2 ppm, Verde: padrão de 4 ppm, Azul escuro: padrão de 6 ppm, Azul claro: padrão de 8 ppm, Roxo: padrão de 10 ppm.

## Anexo B3 – Norfloxacin

Tabela 36 – Resultados obtidos para o traçado da curva de calibração da norfloxacin.

Solução stock de 10 ppm de norfloxacin (1 mg / 100 mL água)	Soluções padrões de norfloxacin			
	Volume de solução stock de norfloxacin retirado (mL)	Absorvância (pico)	Volume de solução stock de norfloxacin retirado (mL / 5 mL de água)	
Massa de norfloxacin (g)	0,00100	Padrão de 2 ppm	1	0,2207
Comprimento de onda (nm)	271	Padrão de 4 ppm	2	0,4705
Absorvância (pico)	1,0792	Padrão de 6 ppm	3	0,6755
		Padrão de 8 ppm	4	0,8713
		Padrão de 10 ppm	5	1,0527

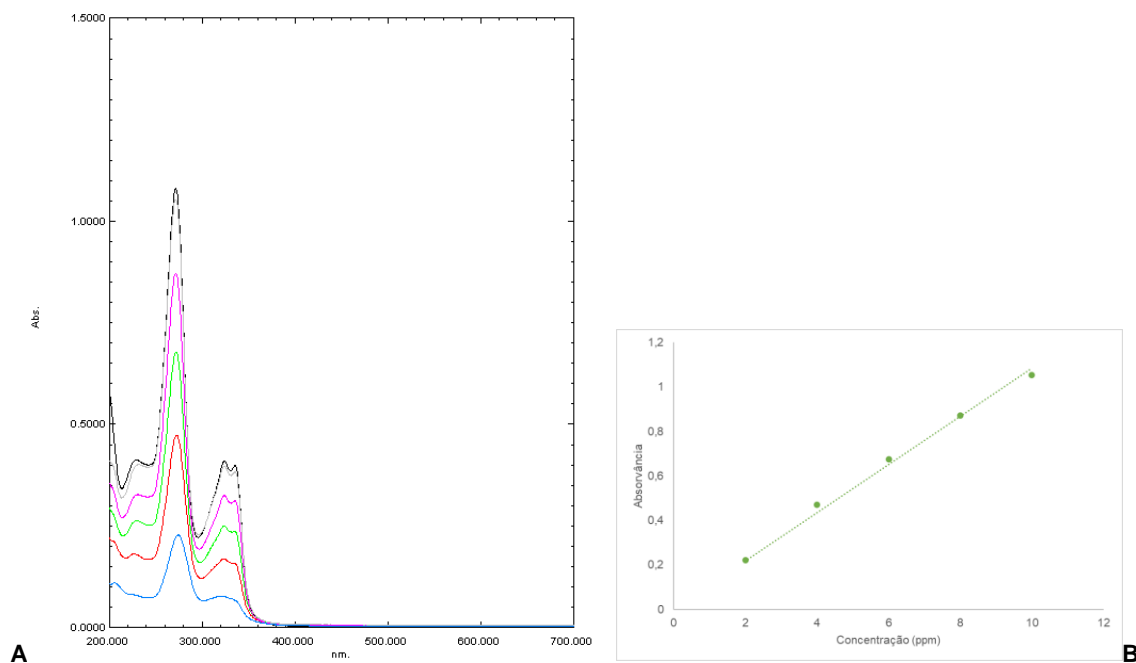


Figura 53 – Espectro de absorção (A) e curva de calibração (B) para a norfloxacin. Preto: solução stock de norfloxacin de 10 ppm, Azul: padrão de 2 ppm, Vermelho: padrão de 4 ppm, Verde: padrão de 6 ppm, Roxo: padrão de 8 ppm, Cinzento: padrão de 10 ppm.

## Anexo C – Cálculos da percentagem de extração para o método de extração líquido-líquido

Apresenta-se de seguida os cálculos efetuados para determinação da percentagem de extração:

- A concentração em ppm de cada antibiótico presente na fase aquosa analisada, foi obtida pelas expressões obtidas por regressão linear, onde

$$\text{Concentração obtida pela curva de calibração da fase aquosa (ppm)} = \frac{\text{Absorvância}}{\text{declive}} \quad (5)$$

A massa de antibiótico que ficou na fase aquosa é dada por:

$$\text{Massa de antibiótico na fase aquosa (g)} = \text{Massa de solução de antibiótico adicionada ao solvente} * \text{Concentração obtida na curva de calibração} * 0.001 \quad (6)$$

A massa extraída de antibiótico na fase orgânica, ou seja, na fase rica em solvente eutético – superior – é calculado por:

$$\text{Massa extraída de antibiótico na fase orgânica (g)} = (\text{Massa de antibiótico na solução stock} * 1000) - \text{Massa de antibiótico na fase aquosa (g)} \quad (7)$$

Por fim, a percentagem de extração do antibiótico pelo solvente eutético é dada por:

$$\% \text{ Extração de antibiótico pelo solvente eutético} = \frac{\text{Massa extraída de antibiótico na fase orgânica (g)}}{(\text{Massa de antibiótico na solução stock} * 1000)} * 100 \quad (8)$$

## Anexo D – Espectro de absorção obtido pela extração líquido-líquido dos solventes eutéticos em água ultrapura

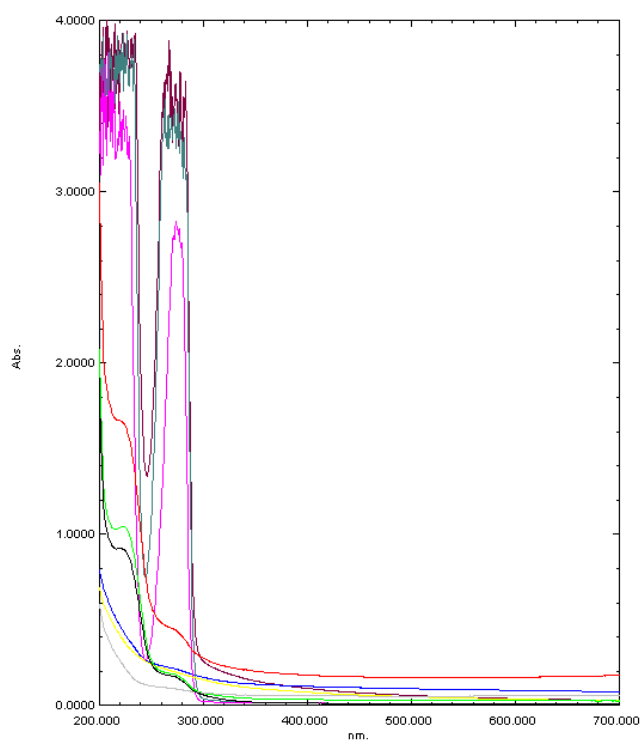


Figura 54 – Espectro de absorção obtido pela extração líquido-líquido dos solventes eutéticos em água ultrapura. Cinzento – Men:C12; Amarelo – Men:C10; Azul escuro – C10:C12; Preto – C8:C10; Verde – Men:C8; Rosa – Tim: Men; Vermelho – C8:C12; Azul claro – Tim:C10; Violeta – Tim:C8.

## Anexo E – Espectros de absorção obtidos pela extração líquido-líquido para os solventes Timol:ácido e Timol:Mentol

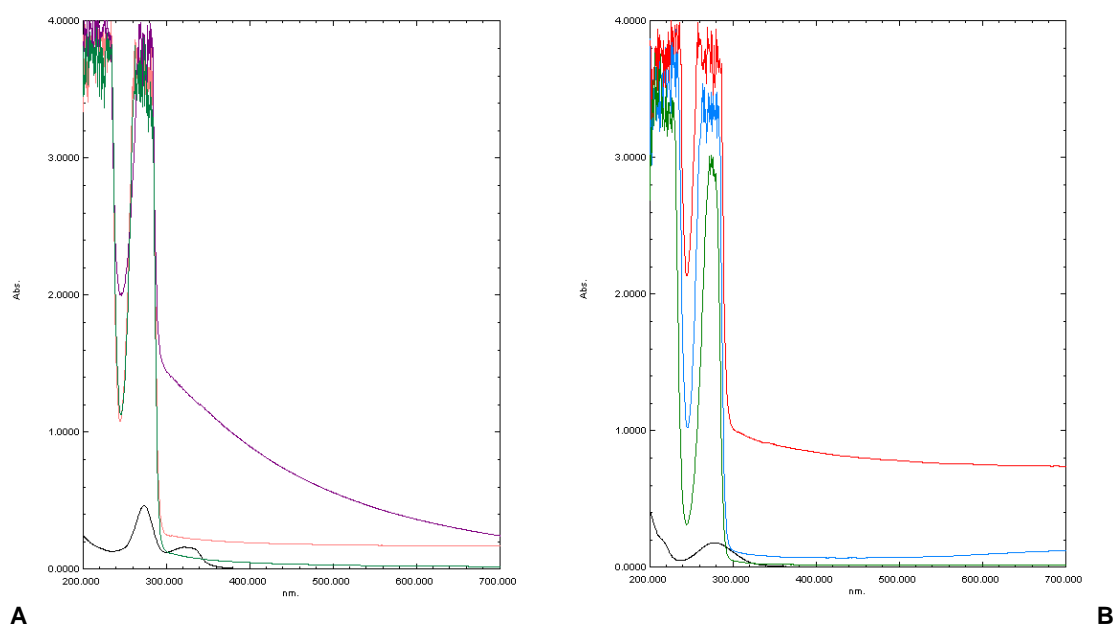


Figura 55 – Espectros de absorção da enrofloxacin (A) e cloranfenicol (B) pela extração líquido-líquido em solventes de Timol:ácido e Timol:Mentol. (A) Preto – solução stock de enrofloxacin 5 ppm; Verde – Tim:C8; Laranja – Tim:C10; Roxo – Tim:Men. (B) Preto - solução stock de cloranfenicol 5 ppm; Azul – Tim:C8; Vermelho – Tim:C10; Verde – Tim: Men.

## Anexo F – Espectros de absorção da extração líquido-líquido de soluções aquosas de antibióticos de 5 ppm em solventes

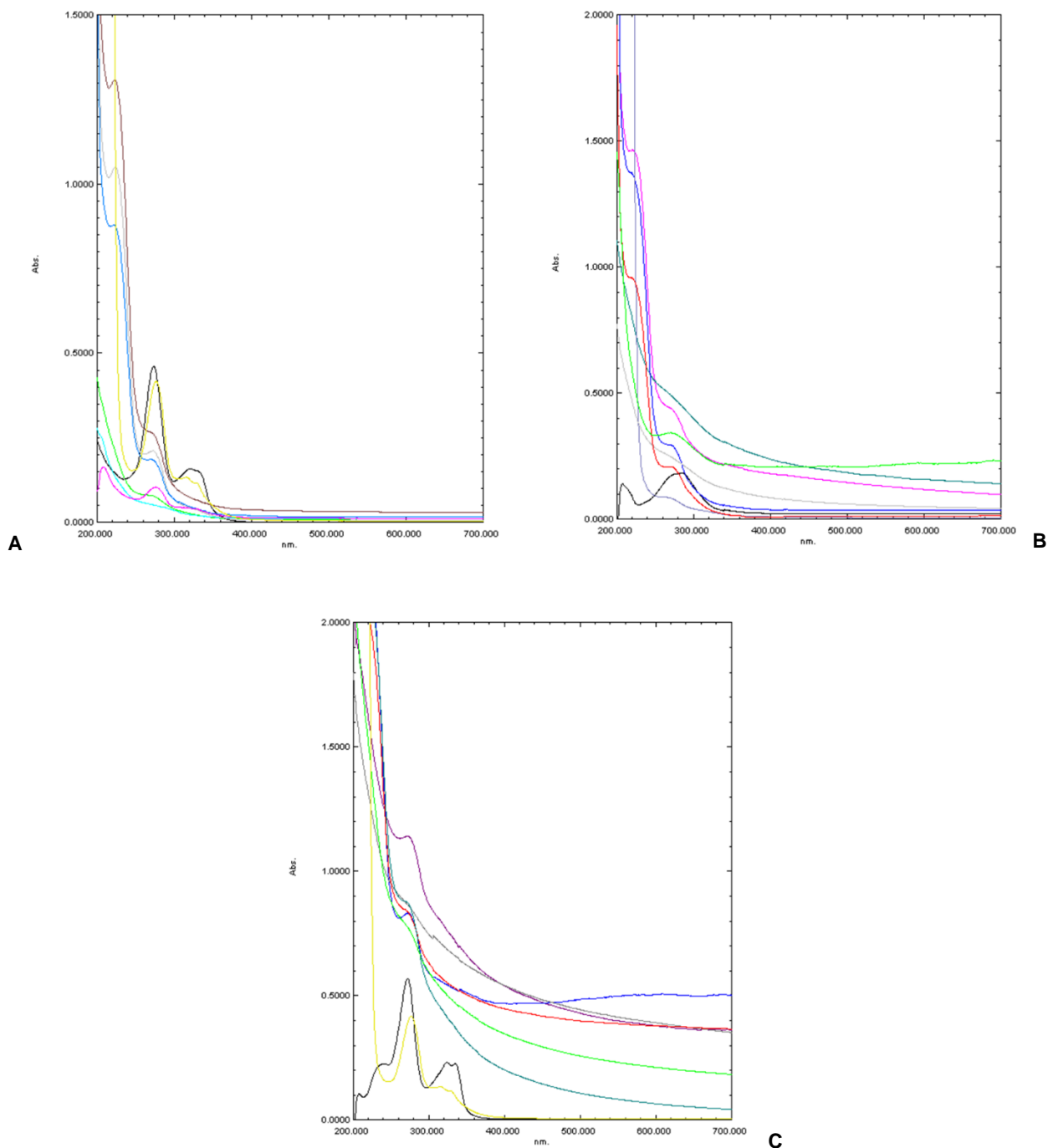


Figura 56 – Espectros de absorção obtidos na extração líquido-líquido da enrofloxacin (A), cloranfenicol (B) e norfloxacin (C) de concentração 5 ppm para diferentes solventes eutéticos. (A) Preto – solução stock de ENR 5 ppm; Azul escuro – C8:C10; Roxo – C8:C12; Verde – C10:C12; Cinzento – Mentol:C8; Azul claro – Mentol:C10; Rosa – Mentol:C12; Amarelo – [N8881]Br:C10. (B) Preto – solução stock de CLO 5 ppm; Vermelho – C8:C10; Azul – C8:C12; Verde claro – C10:C12; Roxo – Mentol:C8; Verde escuro – Mentol:C10; Cinzento – Mentol:C12; Violeta – [N8881]Br:C10. (C) Preto – solução stock de NOR 5 ppm; Vermelho – C8:C10; Azul – C8:C12; Verde claro – C10:C12; Verde escuro – Mentol:C8; Cinzento – Mentol:C10; Roxo – Mentol:C12; Amarelo – [N8881]Br:C10.

## Anexo G – Espectros de absorção obtidos na extração líquido-líquido de soluções aquosas de antibióticos de 10 ppm em solventes

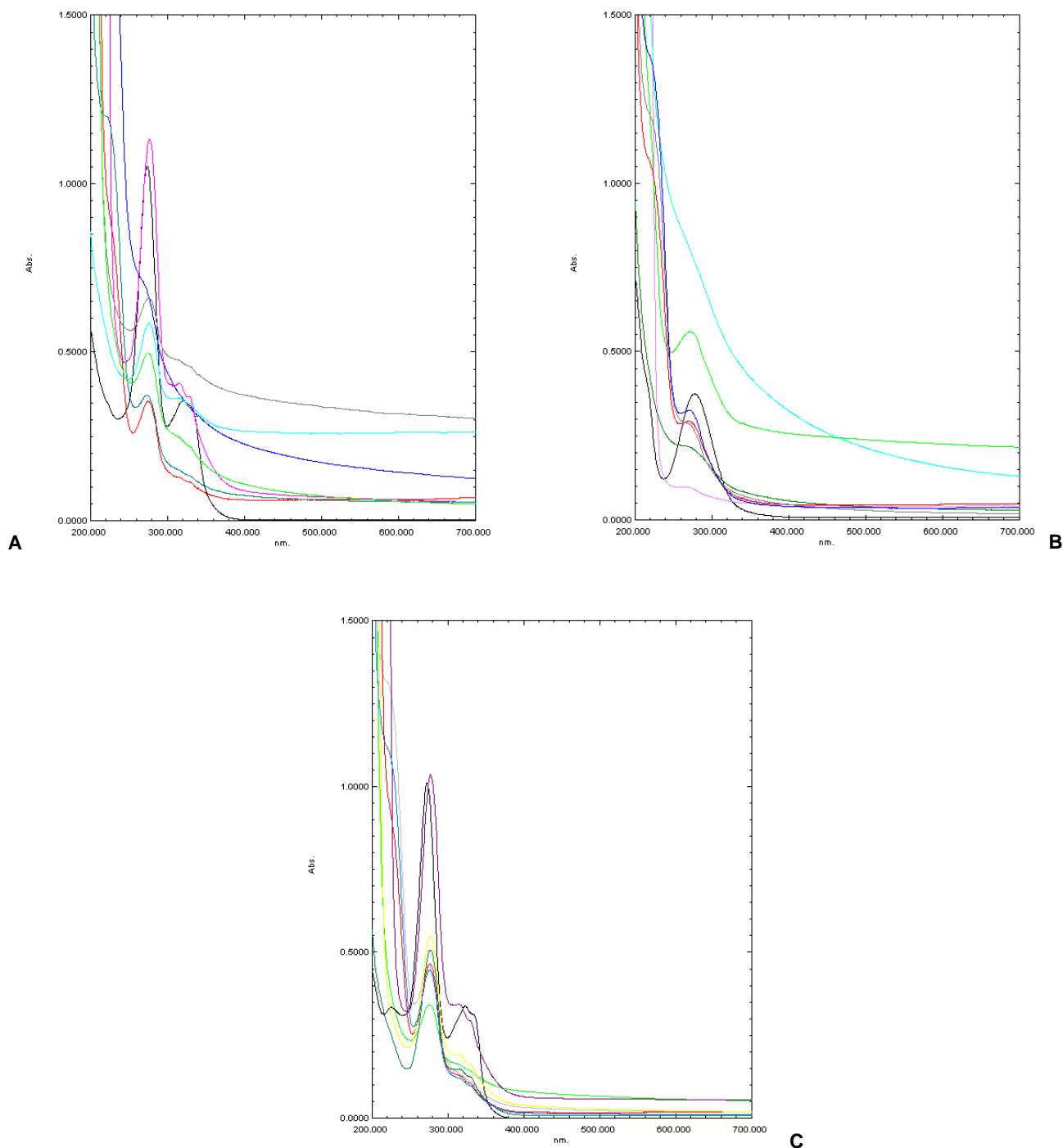


Figura 57 – Espectros de absorção obtidos na extração líquido-líquido da enrofloxacin (A), cloranfenicol (B) e norfloxacin (C) de concentração 10 ppm para diferentes solventes eutéticos. (A) Preto – solução stock de ENR 10 ppm; Vermelho – C8:C10; Azul escuro – C8:C12; Verde – C10:C12; Verde escuro – Mentol:C8; Cinzento – Mentol:C10; Azul claro – Mentol:C12; Violeta – [N8881]Br:C10. (B) Preto – solução stock de CLO 10 ppm; Vermelho – C8:C10; Azul escuro – C8:C12; Verde claro – C10:C12; Cinzento – Mentol:C8; Azul claro – Mentol:C10; Verde escuro – Mentol:C12; Violeta – [N8881]Br:C10. (C) Preto – solução stock de NOR 10 ppm; Vermelho – C8:C10; Cinzento – C8:C12; Verde claro – C10:C12; Azul – Mentol:C8; Amarelo – Mentol:C10; Verde escuro – Mentol:C12; Roxo – [N8881]Br:C10.



## Anexo H – Espectros de absorção na reutilização de solvente pela extração líquido-líquido

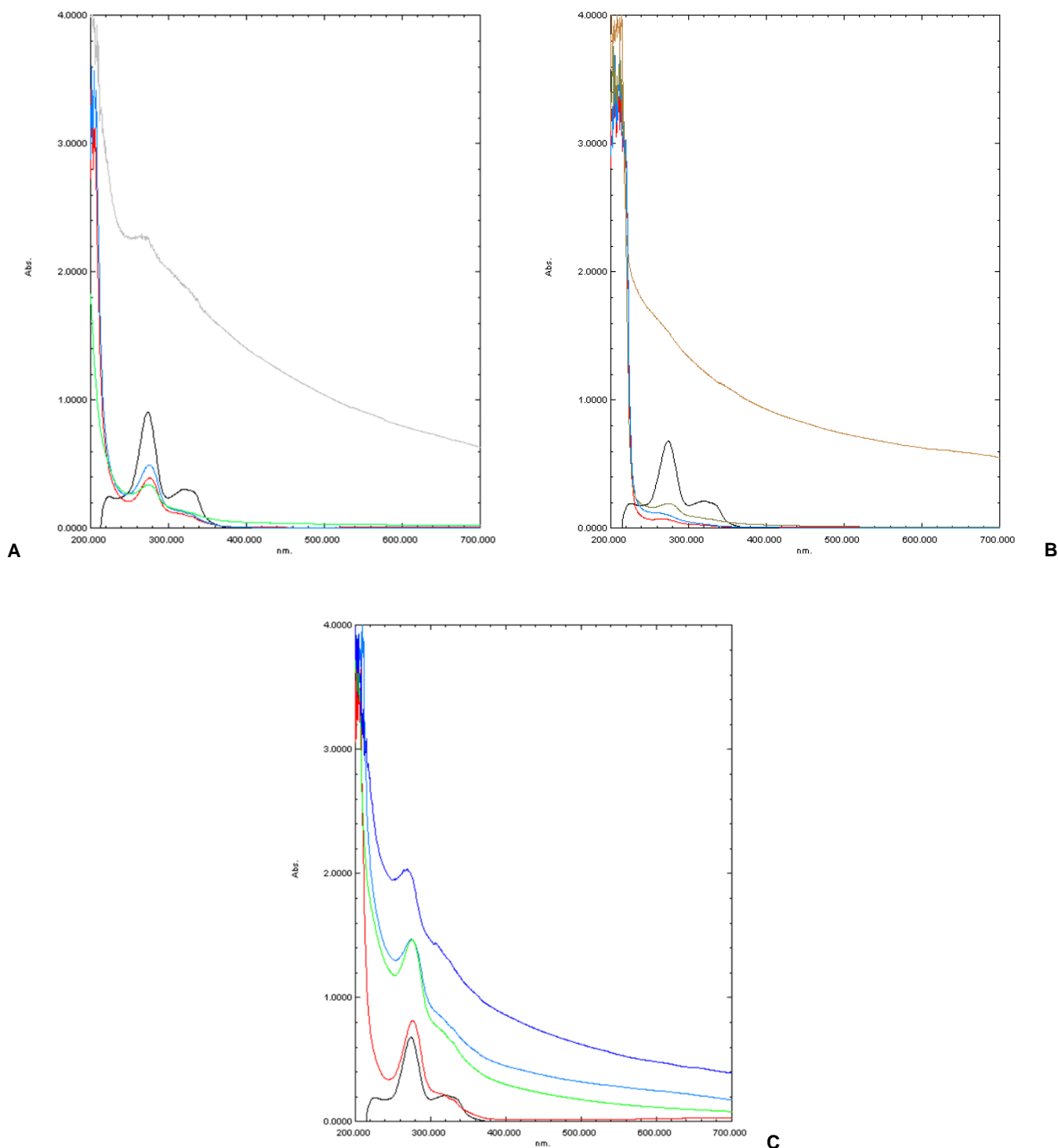


Figura 58 – Espectros de absorção obtidos na reutilização de solvente pela extração líquido-líquido da enrofloxacin (A), cloranfenicol (B) e norfloxacin (C) de concentração 10 ppm. (A) Preto: solução stock de enrofloxacin 10 ppm; Azul: ensaio 1; Vermelho: ciclo 1; Verde: ciclo 2; Cinzento: ciclo 3. (B) Preto: solução stock de cloranfenicol 10 ppm; Vermelho: ensaio 1; Azul: ciclo 1; Cinzento: ciclo 2; Castanho: ciclo 3. (C) Preto: solução stock de norfloxacin 10 ppm; Azul claro: ensaio 1; Vermelho: ciclo 1; Verde: ciclo 2; Azul escuro: ciclo 3.

## Anexo I – Espectros de absorção da reciclagem de solvente pela extração líquido-líquido

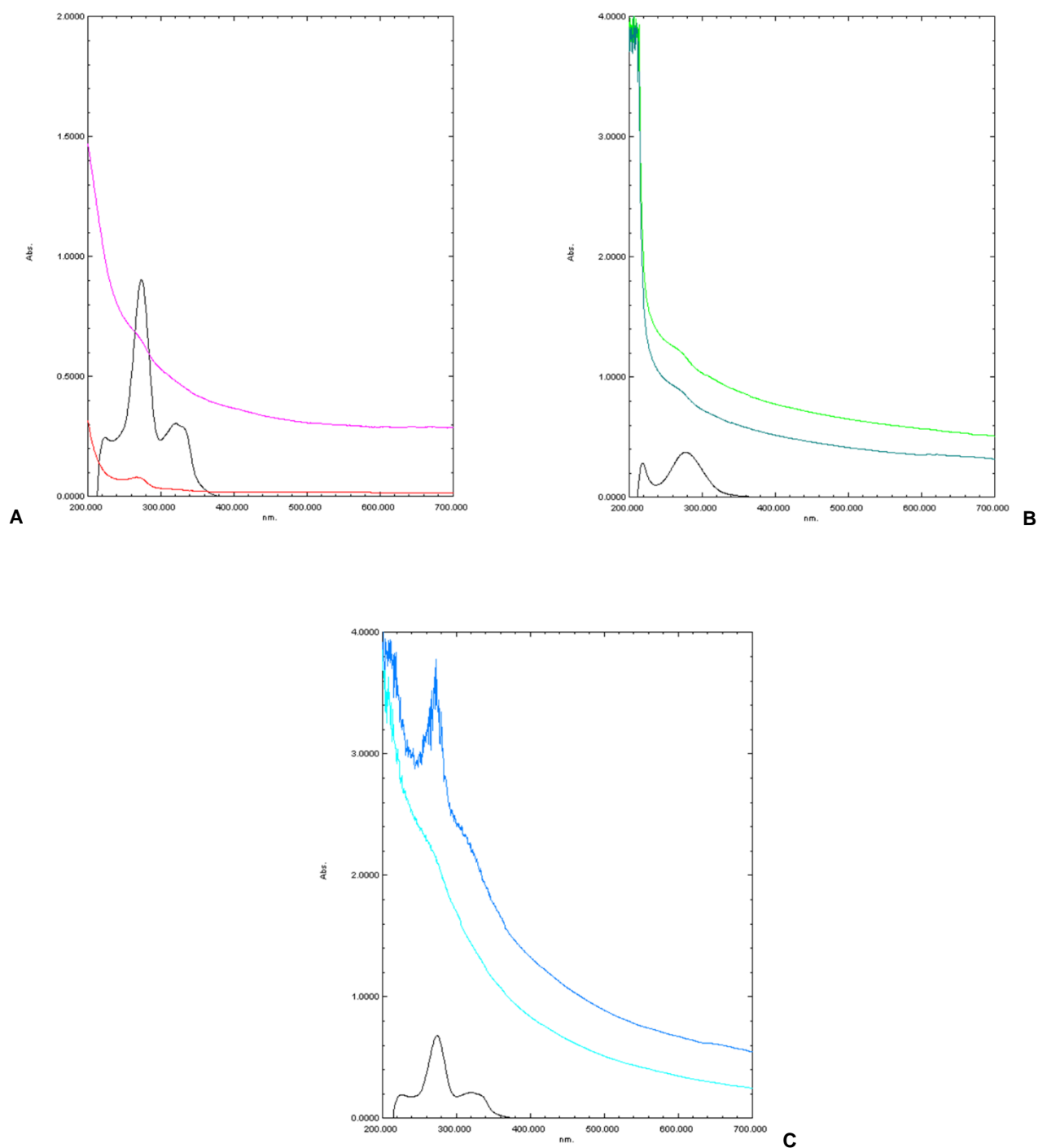


Figura 59 – Espectros de absorção obtidos na reciclagem de solvente pela extração líquido-líquido da enrofloxacin (A), cloranfenicol (B) e norfloxacin (C) de concentração 10 ppm. (A) Preto: solução aquosa de enrofloxacin 10 ppm; Vermelho: ensaio 1; Rosa: ensaio 2. (B) Preto: solução aquosa de cloranfenicol 10 ppm; Verde escuro: ensaio 1; Verde claro: ensaio 2. (C) Preto: solução aquosa de norfloxacin 10 ppm; Azul claro: ensaio 1; Azul escuro: ensaio 2.

## Anexo J – Espectro de absorção da solução em branco na impregnação de solvente C10:C12 em água ultrapura

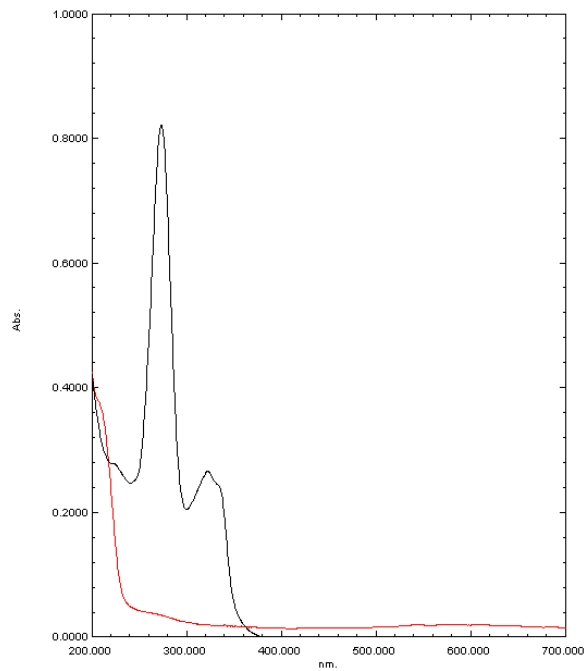


Figura 60 – Espectro de absorção de 34 membranas impregnadas em C10:C12, diâmetro 0,5 cm em contacto com água ultrapura. Preto: solução stock de norfloxacin 10 ppm; Vermelho: 34 membranas de diâmetro 0,5 cm impregnadas em C10:C12 em solução aquosa.

## Anexo K – Cálculos da percentagem de extração de antibióticos pela impregnação de solventes em suporte poroso

Para o cálculo da percentagem de extração dos antibióticos em solventes eutéticos pelo método experimental de impregnação em suporte porosos, foram utilizadas as seguintes equações:

A concentração em ppm de cada antibiótico presente na fase aquosa analisada, foi obtida pelas expressões obtidas por regressão linear do anexo A, e tal como descrito na equação 5,

$$\text{Concentração obtida pela curva de calibração da fase aquosa (ppm)} = \frac{\text{Absorvância}}{\text{declive}} \quad (5) = (9)$$

A massa de antibiótico que ficou na solução aquosa é dada por:

$$\text{Massa de antibiótico na fase aquosa (g)} = \text{Densidade da água} * \text{Concentração obtida na curva de calibração} * 0,001 \quad (10)$$

A massa extraída de antibiótico pelas membranas impregnadas em solvente eutético, é dado por:

$$\text{Massa extraída de antibiótico pelas membranas impregnadas em solvente (g)} = \text{Massa de antibiótico na solução stock} - \text{Massa de antibiótico que ficou na solução aquosa} \quad (11)$$

Por fim, a percentagem de extração do antibiótico pelo solvente eutético é dada por:

$$\% \text{ Extração de antibiótico pelo solvente eutético} = \frac{\text{Massa extraída de antibiótico pelas membranas impregnadas em solvente (g)}}{(\text{Massa de antibiótico na solução stock})} * 100 \quad (12)$$

## Anexo L – Espectros de absorção obtidos na impregnação de solventes para ENR, CLO e NOR de 10 ppm

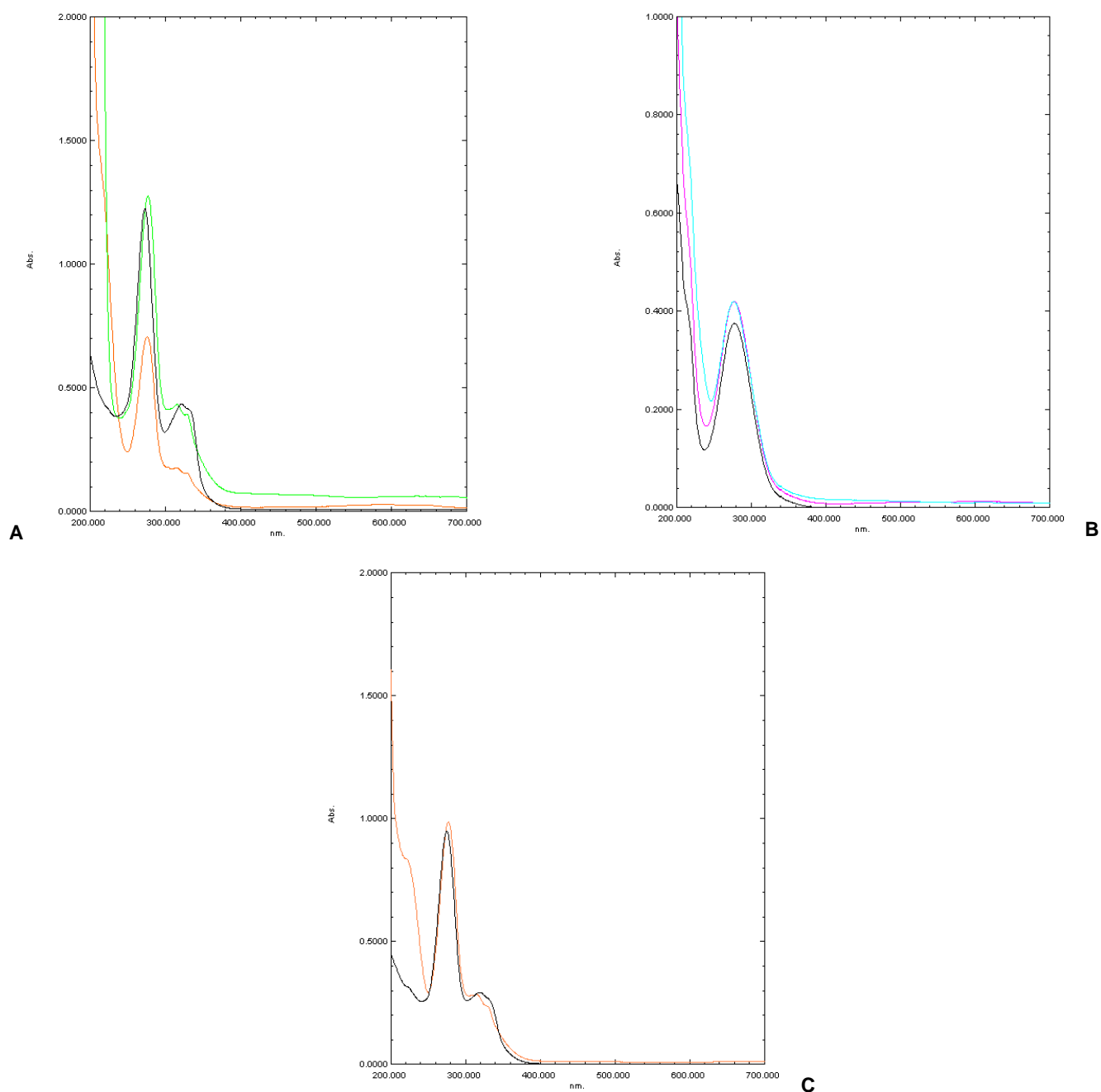


Figura 61 – Espectros de absorção obtidos na impregnação de solventes C8:C10 e [N8881]Br:C10 para ENR 10 ppm (A), solventes C10:C12 e C8:C10 para CLO 10 ppm (B) e solvente Men:C8 para NOR 10 ppm (C). (A) Preto – solução stock de enrofloxacin 10 ppm; Laranja – C8:C10; Verde – [N8881]Br:C10. (B) Preto – solução stock de cloranfenicol 10 ppm; Rosa – C10:C12; Azul – C8:C10. (C) Preto – solução stock de enrofloxacin 10 ppm; Laranja – Men:C8.

## Anexo M – Espectros de absorção na otimização do tempo de equilíbrio dos antibióticos com solventes impregnados em suporte poroso

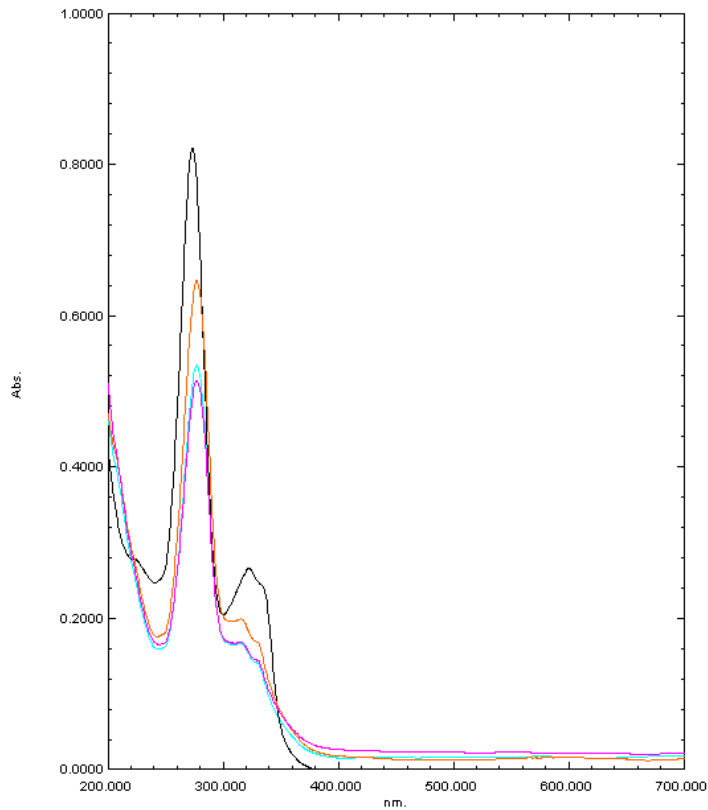


Figura 62 – Otimização das condições de agitação da impregnação em suporte poroso – 15 minutos de agitação, 300 rpm, banho-maria de 25°C, para a norfloxacina 10 ppm em 34 membranas impregnadas em solvente C10:C12. Preto: solução stock de norfloxacina de 10 ppm; Laranja: 5 minutos de agitação; Azul: 15 minutos de agitação; Rosa: 30 minutos de agitação.

## Anexo N – Espectro de absorção na otimização da quantidade de suporte poroso impregnado em solvente

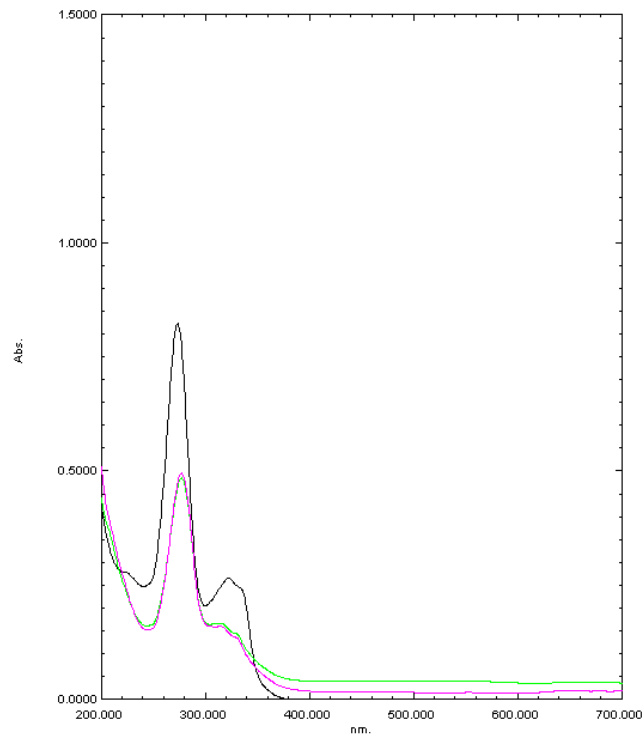


Figura 63 – Otimização da quantidade de suporte poroso impregnado em solvente, para a norfloxacina de 10 ppm em 51 membranas de C10:C12, nas condições de 15 minutos de agitação a 300 rpm em banho de água a 25 °C. Preto: solução stock de norfloxacina de 10 ppm; Verde: ensaio 1; Violeta: ensaio 2.

## Anexo O – Espectros de absorção na otimização da dimensão de membrana e massa de solvente na impregnação em suporte poroso

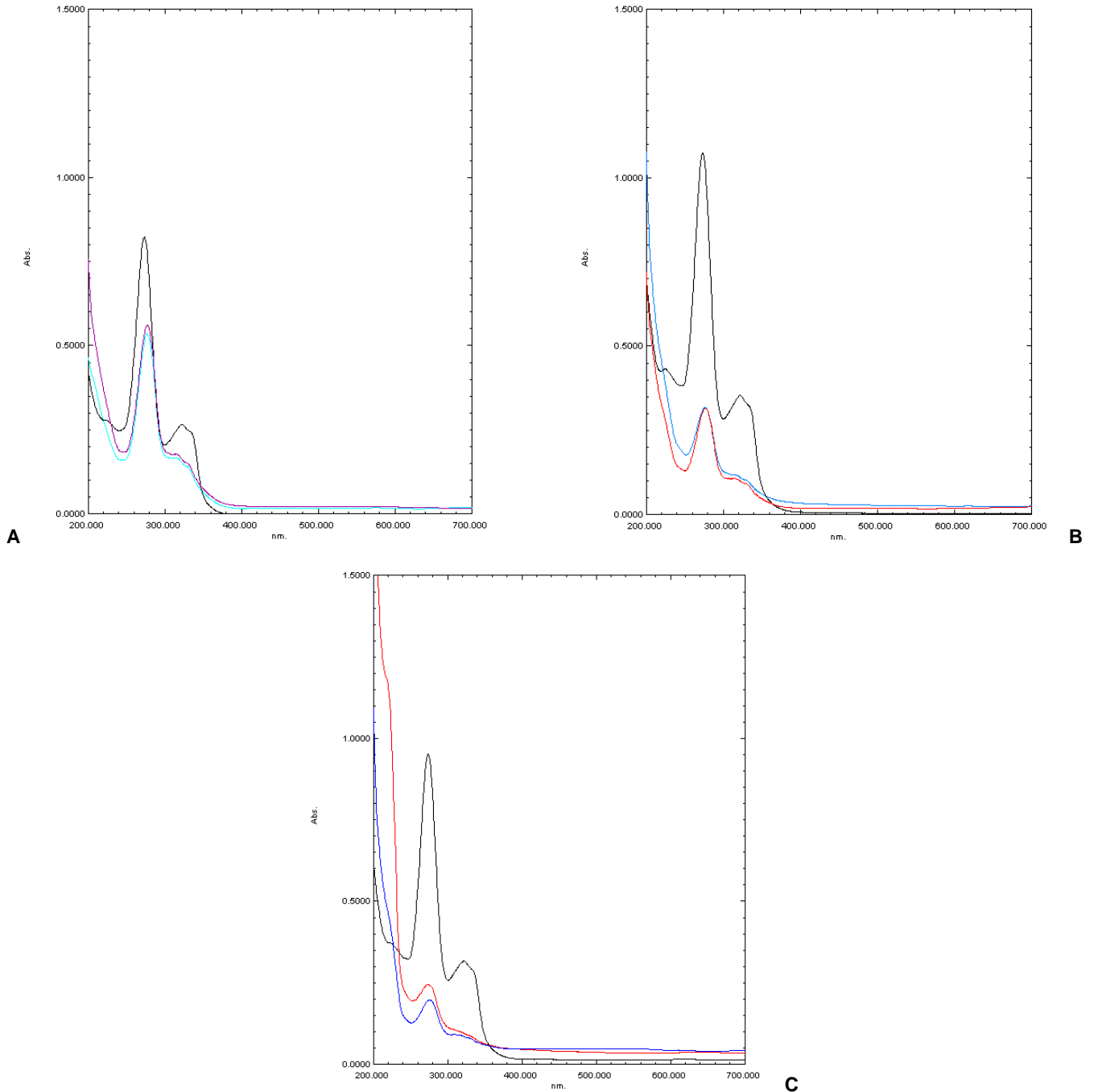
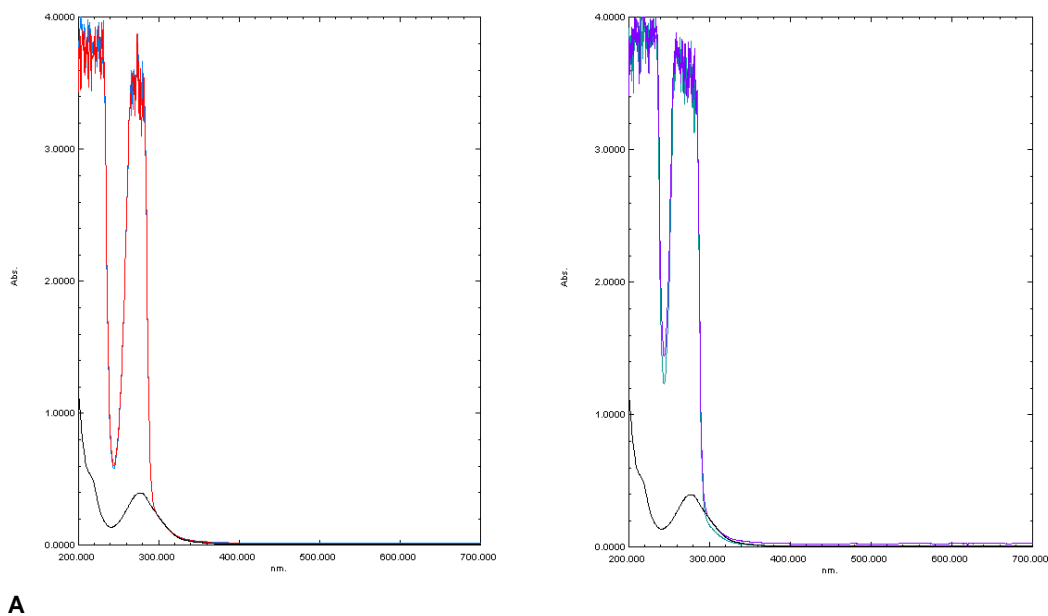


Figura 64 – Otimização das condições de diâmetro, massa e quantidade de membrana: (A) 34 membranas, (B) 262 membranas e (C) 524 membranas ambas de diâmetro 0,2 cm, impregnadas em C10:C12 para a extração de norfloxacin de uma solução aquosa de 10 ppm. (A) Preto: solução stock de enrofloxacin 10 ppm; Azul: ensaio 1; Roxo: Ensaio 2. (B) Preto: solução stock de cloranfenicol 10 ppm; Vermelho: ensaio 1; Azul: ensaio 2. (C) Preto: solução stock de norfloxacin 10 ppm; Vermelho: ensaio 1; Azul: ensaio 2.



**Anexo P – Espectros de absorção obtidos para os solventes Timol:Mentol e Timol:Carvacrol impregnados em suporte poroso, para cloranfenicol a 10 ppm**



**A** **B**  
*Figura 65 – Espectros de absorção dos solventes Timol:Mentol (A) e Timol:Carvacrol (B) impregnados em suporte, para cloranfenicol 10 ppm. (A) Preto: solução stock de cloranfenicol 10 ppm; Vermelho: ensaio 1; Azul: ensaio 2. (B) Preto: solução stock de cloranfenicol 10 ppm; Azul: ensaio 1; Roxo: ensaio 2.*

## Anexo Q – Espectros de absorção da extração por etapas dos antibióticos pela impregnação de solventes em suporte poroso

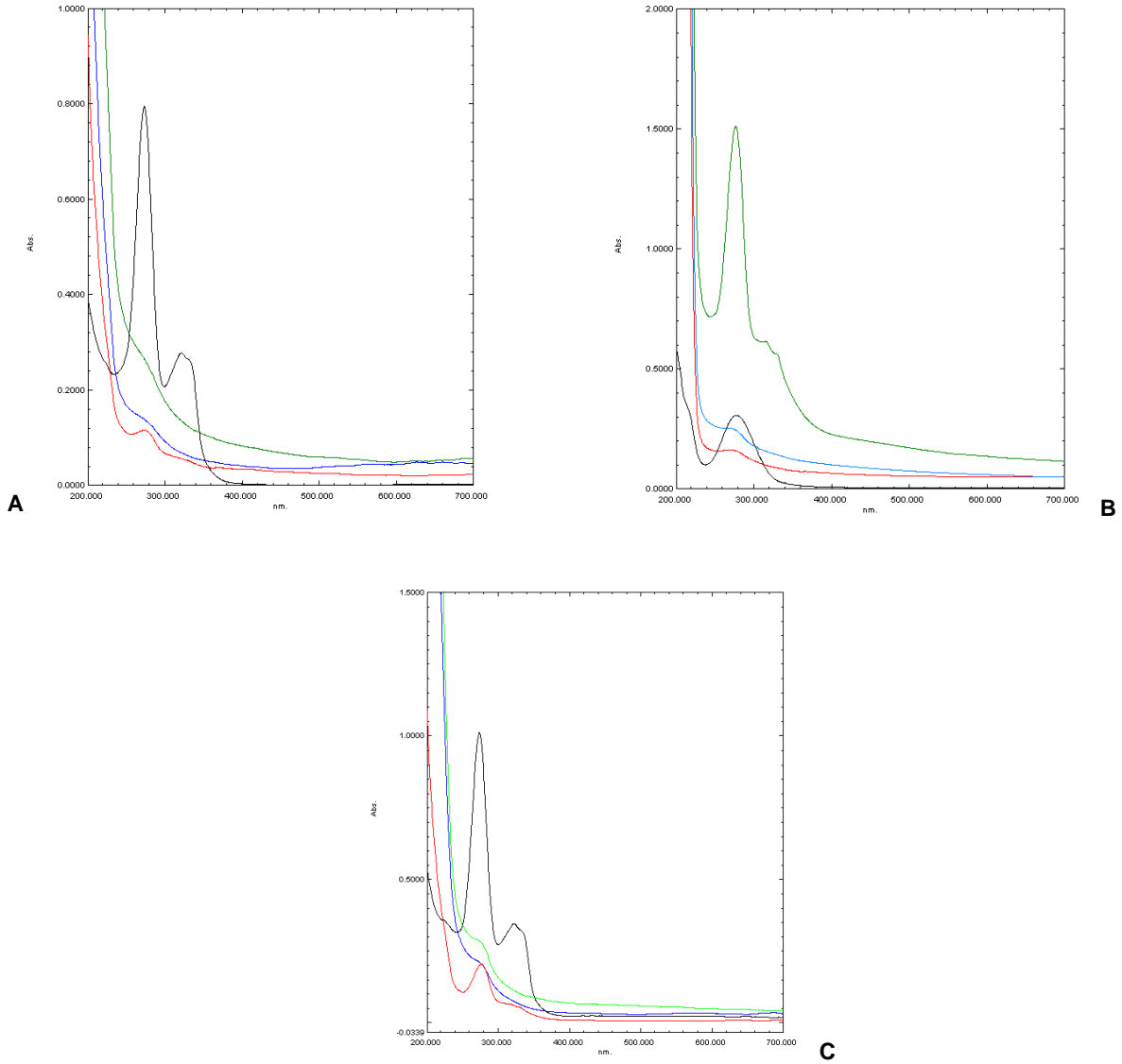


Figura 66 – Ciclos de extração por etapas para a enrofloxacin (A), cloranfenicol (B) e norfloxacin (C), em soluções aquosas de 10 ppm, pela impregnação de solventes em suporte poroso. (A) Preto: solução stock de enrofloxacin 10 ppm; Vermelho: ciclo 1; Azul: ciclo 2; Verde: ciclo 3. (B) Preto: solução stock de cloranfenicol 10 ppm; Vermelho: ciclo 1; Azul: ciclo 2; Verde: ciclo 3; (C) Preto: solução stock de norfloxacin 10 ppm; Vermelho: ciclo 1; Azul: ciclo 2; Verde: ciclo 3.

## Anexo R – Espectros de absorção na reutilização de solventes eutéticos pela impregnação em suporte poroso

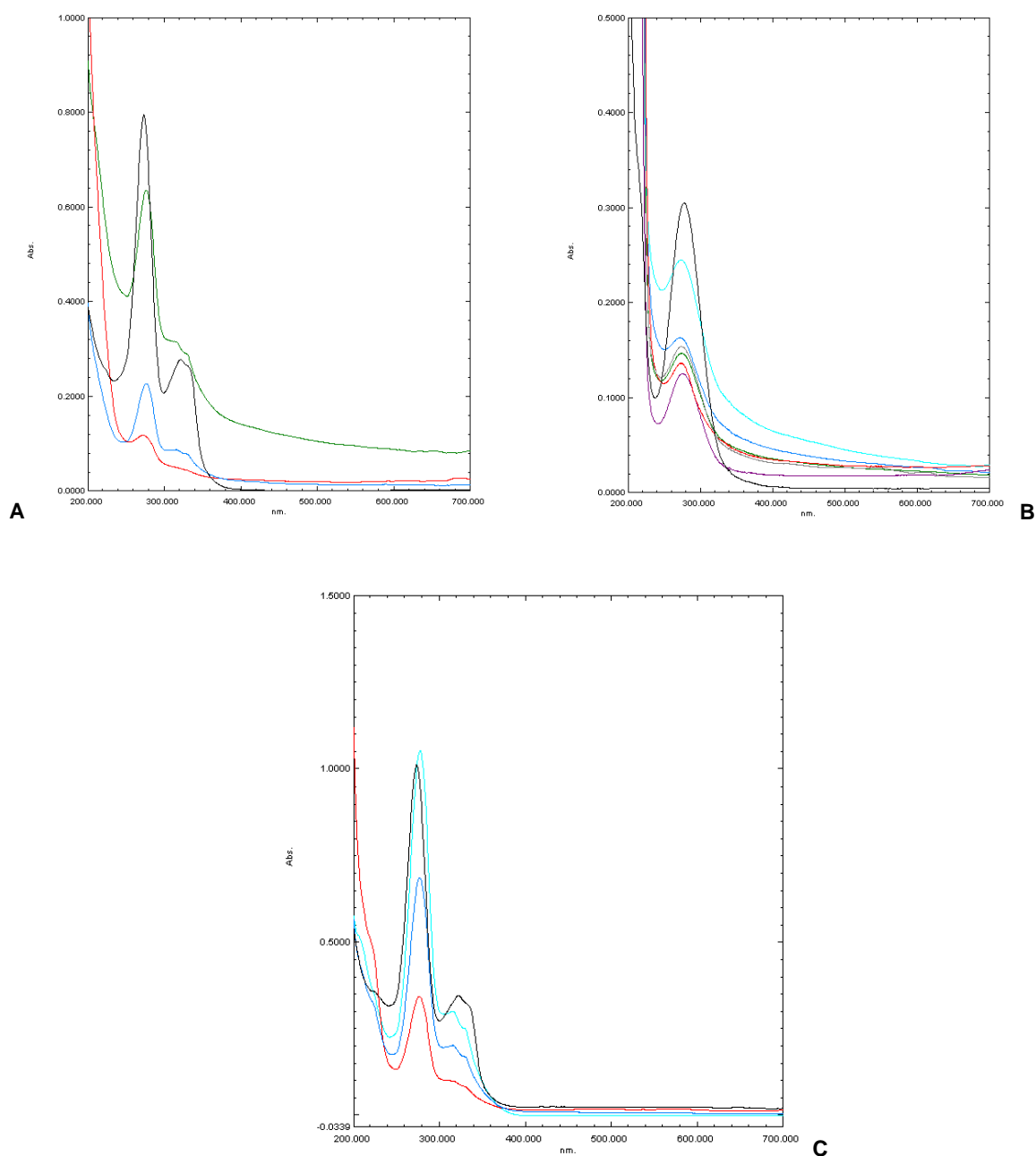
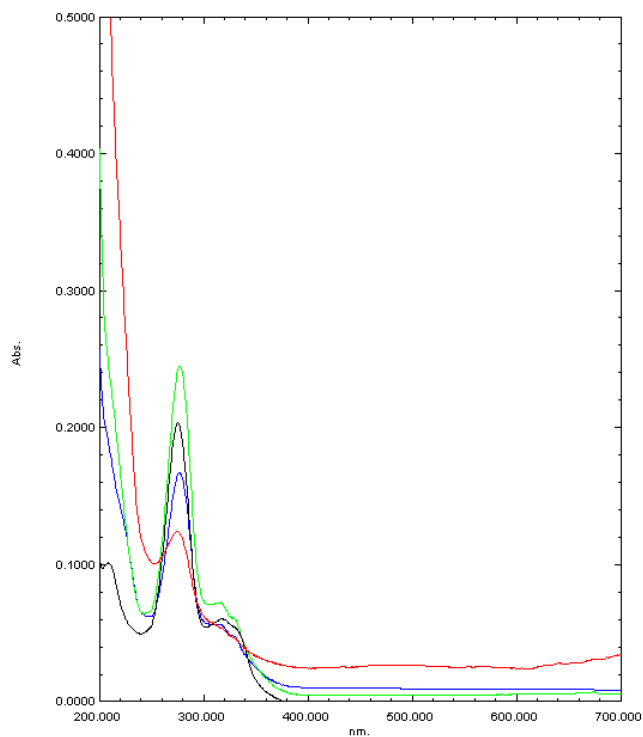


Figura 67 – Reutilização de solventes eutéticos em soluções aquosas de 10 ppm de enrofloxacin (A), cloranfenicol (B) e norfloxacin (C) por impregnação de solventes em suporte poroso. (A) Preto: solução stock de enrofloxacin 10 ppm; Vermelho: ciclo 1; Azul: ciclo 2; Verde: ciclo 3. (B) Preto: solução stock de cloranfenicol 10 ppm; Vermelho: ciclo 1; Azul: ciclo 2; Verde: ciclo 3; Cinzento: ciclo 4; Roxo: ciclo 5; Azul claro: ciclo 6. (C) Preto: solução stock de norfloxacin 10 ppm; Vermelho: ciclo 1; Azul escuro: ciclo 2; Azul claro: ciclo 3.

**Anexo S – Espectro de absorção obtido na reutilização de solvente C10:C12 impregnado em suporte poroso, para norfloxacinina de concentração 2 ppm**



*Figura 68 – Espectro de absorção obtido na reutilização de solvente C10:C12 impregnado em suporte poroso, para norfloxacinina de concentração 2 ppm. Preto: solução stock de norfloxacinina 2 ppm; Vermelho: ciclo 1; Azul: ciclo 2; Verde: ciclo 3.*