

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANEAMENTO,**  
**MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS**

**UTILIZAÇÃO DE PROCESSOS BIOLÓGICOS E  
OXIDATIVOS AVANÇADOS NO TRATAMENTO  
DOS ANTIBIÓTICOS NORFLOXACINO E  
SULFATO DE GENTAMICINA PRESENTES EM  
MEIO AQUOSO**

**Lucilaine Valéria de Souza Santos**

**Belo Horizonte**  
**2014**

# **UTILIZAÇÃO DE PROCESSOS BIOLÓGICOS E OXIDATIVOS AVANÇADOS NO TRATAMENTO DOS ANTIBIÓTICOS NORFLOXACINO E SULFATO DE GENTAMICINA PRESENTES EM MEIO AQUOSO**

**Lucilaine Valéria de Souza Santos**

**Lucilaine Valéria de Souza Santos**

# **UTILIZAÇÃO DE PROCESSOS BIOLÓGICOS E OXIDATIVOS AVANÇADOS NO TRATAMENTO DOS ANTIBIÓTICOS NORFLOXACINO E SULFATO DE GENTAMICINA PRESENTES EM MEIO AQUOSO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Área de concentração: Meio Ambiente

Linha de pesquisa: Caracterização, prevenção e controle da poluição.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Liséte Celina Lange

Belo Horizonte  
Escola de Engenharia da UFMG  
2014

*“Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver.”*

*Dalai Lama*

## AGRADECIMENTOS

*“Agradeço a Deus que colocou em meu caminho pessoas especiais sem as quais seria impossível realizar este sonho.”*

## RESUMO

Nos últimos anos a comunidade científica tem demonstrado grande interesse pelos chamados "poluentes emergentes", que compreendem substâncias de diferentes classes como disruptores endócrinos, produtos farmacêuticos, drogas de abuso, conservantes, dentre outros compostos e seus respectivos metabólitos ou produtos de degradação. Os recentes avanços analíticos para detecção destes compostos permitem concluir que eles não são efetivamente eliminados em estações de tratamento de esgoto (ETEs) quando se utiliza tratamentos convencionais. Neste trabalho é apresentado um estudo do comportamento dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina frente a ensaios de biodegradabilidade aeróbicos e anaeróbicos e oxidativos avançados, assim como a avaliação da toxicidade das soluções geradas após cada tratamento e a identificação dos metabólitos/produtos de degradação gerados. Nos estudos envolvendo ensaios de biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia foram utilizadas diferentes biomassas, com e sem aclimação e observou-se que o norfloxacino não é biologicamente removido mesmo após a aclimação da biomassa. Já sulfato de gentamicina apresentou valores de degradação de até 96% com a utilização de biomassa anaeróbia. Nos estudos envolvendo processos oxidativos e oxidativos avançados foram utilizados UV, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fenton e Foto-Fenton. Os ensaios envolvendo a oxidação de Fenton e foto-Fenton foram os que obtiveram os melhores resultados tanto de degradação quanto de mineralização, para os dois antibióticos. Para o antibiótico norfloxacino obteve-se 87 e 99,7% de degradação através da utilização da oxidação de Fenton e foto-Fenton, respectivamente e para gentamicina observou-se degradação de 99% para os dois ensaios. Além dos ensaios de biodegradabilidade e oxidativos avançados este trabalho traz um estudo dos possíveis metabólitos gerados através da biotransformação realizada pelo organismo humano. Para tal, utilizou-se metaloporfirinas que são compostos capazes de mimetizar as reações que mediadas pelo citocromo P450. Observou-se que as soluções analisadas após ensaios com metaloporfirinas eram mais tóxicas que as iniciais. Estes resultados sugerem que os metabólitos formados, ou o sinergismo deles, conferem toxicidade as soluções e que processos semelhantes podem acontecer durante a etapa de excreção destes fármacos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Norfloxacino, sulfato de gentamicina, tratamentos biológicos, processos oxidativos avançados, porfirinas e espectrometria de massa.

## ABSTRACT

In the recent years the scientific community has shown great interest in the so-called "emerging pollutants", which include different classes of substances - endocrine disruptors, pharmaceuticals, drugs of abuse, preservatives, among other compounds - and their metabolites or degradation products. Recent advances in analytical detection of these compounds conclude that they are not effectively removed in sewage treatment plants (STPs) when using traditional treatment. This work presents a study of the behavior of antibiotics norfloxacin and gentamicin sulfate, facing advanced biological and oxidation treatment systems, as well as the toxicity assessment of the solutions engendered after each treatment and the identification of metabolites/degradation products generated. It investigates, likewise, aerobic and anaerobic biodegradability, using different biomasses, with and without acclimatization. It was observed that norfloxacin is not removed even after the biologically acclimatization of the biomass. Gentamicin sulfate exhibited values of up to 96% degradation using anaerobic treatment. . In studies involving oxidation processes and advanced oxidation processes were used UV, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fenton and Photo-Fenton. The tests involving the oxidation of Fenton and photo-Fenton were the ones with the best results, both degradation and mineralization for both antibiotics. With the use of norfloxacin were obtained 87 and 99,7% of degradation by using Fenton oxidation and photo-Fenton, respectively. Otherwise, with the use of gentamicin were observed degradation of 99% in the two trials. Besides biodegradability tests and advanced oxidative, this work presents a study of possible metabolites generated through biotransformation performed by the human body. To this end, were used metalloporphyrin compounds that are capable of mimicking the reactions mediated by cytochrome P450. It was observed that the solutions analyzed after metalloporphyrins assays were more toxic than the initials ones. These results suggest that metabolites formed or synergism are able to confer toxicity to the solutions. One must note that similar processes may occur during excretion of these drugs.

**KEYWORDS:** Norfloxacin, gentamicin sulfate, biological treatment and advanced oxidation processes, porphyrin, mass spectrometry.

## SUMÁRIO

|                                                                                               |       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| LISTA DE FIGURAS .....                                                                        | XII   |
| LISTA DE TABELAS .....                                                                        | XVIII |
| LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS .....                                                 | XXI   |
| <b>Capítulo 1</b> - Introdução.....                                                           | 22    |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                            | 23    |
| <b>Capítulo 2</b> - Escolha e desenvolvimento metodológico para monitoramento dos fármacos... | 25    |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                            | 26    |
| 2. OBJETIVOS.....                                                                             | 28    |
| 2.1. Objetivo geral.....                                                                      | 28    |
| 2.2. Objetivos específicos .....                                                              | 28    |
| 3. REVISÃO DA LITERATURA .....                                                                | 29    |
| 3.1. Escolha do tema– Fármacos no meio ambiente .....                                         | 29    |
| 3.2. Escolha dos fármacos .....                                                               | 31    |
| 3.2.1. Antibióticos .....                                                                     | 31    |
| 3.2.2. Resistência bacteriana .....                                                           | 33    |
| 3.2.3. Fluoroquinolonas.....                                                                  | 34    |
| 3.2.3.1. Norfloxacino.....                                                                    | 35    |
| 3.2.4. Aminoglicosídeos.....                                                                  | 36    |
| 3.2.4.1. Sulfato de Gentamicina .....                                                         | 36    |
| 3.3. Controle de antibióticos pela ANVISA – Resolução 44/2010.....                            | 37    |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                    | 39    |
| 4.1. Etapas do desenvolvimento metodológico.....                                              | 39    |
| 4.2. Elaboração dos questionários.....                                                        | 39    |
| 4.3. Submissão e avaliação dos questionários enviados a profissionais da saúde .....          | 39    |
| 4.4. Desenvolvimento metodológico para monitoramento dos fármacos.....                        | 40    |
| 4.4.1. Espectrofotometria de absorção molecular e determinação de carbono orgânico total..... | 40    |
| 4.4.2. Cromatografia líquida de alto desempenho e espectrometria de massa.....                | 40    |
| 4.4.3. Extração em fase sólida – Concentração e extração dos analitos .....                   | 41    |
| 5. RESULTADOS .....                                                                           | 42    |
| 5.1. Elaboração dos questionários.....                                                        | 42    |
| 5.2. Avaliação dos questionários .....                                                        | 43    |
| 5.3. Monitoramento dos fármacos em estudo .....                                               | 45    |
| 5.3.1. Espectrofotometria de absorção molecular .....                                         | 45    |

|                                                                                                                        |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.3.2. Cromatografia líquida de alto desempenho e extração em fase sólida .....                                        | 46        |
| 6. CONCLUSÕES .....                                                                                                    | 48        |
| <b>Capítulo 3 - Biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina.....</b> | <b>49</b> |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                                                     | 50        |
| 2. OBJETIVOS .....                                                                                                     | 51        |
| 2.1. Objetivogeral.....                                                                                                | 51        |
| 2.2. Objetivos específicos .....                                                                                       | 51        |
| 3. REVISÃO DA LITERATURA .....                                                                                         | 52        |
| 3.1. Tratamentos convencionais de efluentes na remoção de resíduos contendo fármacos .                                 | 52        |
| 3.1.1. Biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia dos fármacos .....                                                       | 53        |
| 3.1.2. Comportamento dos antibióticos durante o tratamento biológico .....                                             | 56        |
| 3.2. Efeitos tóxicos provocados pelos fármacos no meio ambiente .....                                                  | 57        |
| 3.3. Ensaio ecotoxicológicos .....                                                                                     | 59        |
| 3.3.1. Tipos de testes ecotoxicológicos .....                                                                          | 59        |
| 3.3.1.1. Teste de toxicidade aguda.....                                                                                | 60        |
| 3.3.1.2. Teste de toxicidade crônica .....                                                                             | 61        |
| 3.3.1.3. Escolha do organismo teste .....                                                                              | 61        |
| 3.3.1.4. Teste de toxicidade com <i>Allivibrio fischeri</i> .....                                                      | 61        |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                             | 65        |
| 4.1. Etapas do desenvolvimento metodológico.....                                                                       | 65        |
| 4.2. Amostragem da biomassa .....                                                                                      | 66        |
| 4.3. Aclimação da biomassa.....                                                                                        | 66        |
| 4.4. Teste de borbulhamento de O <sub>2</sub> .....                                                                    | 67        |
| 4.5. Avaliação da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia.....                                                          | 68        |
| 4.5.1. Avaliação da biodegradabilidade aeróbia – Método de Zahn-Wellens.....                                           | 68        |
| 4.5.2. Avaliação da biodegradabilidade anaeróbia – Método FIELD <i>et al.</i> , 1988.....                              | 69        |
| 4.6. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa – Identificação dos metabólitos. .... | 70        |
| 4.7. Avaliação do potencial de biodegradabilidade da biomassa – Lise Celular .....                                     | 71        |
| 4.8. Avaliação da ecotoxicidade dos compostos através da utilização de <i>Allivibrio fischeri</i> .                    | 73        |
| 4.8.1. Análise ecotoxicológica com <i>Allivibrio fischeri</i> .....                                                    | 73        |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                                        | 74        |
| 5.1. Experimentos com borbulhamento de O <sub>2</sub> .....                                                            | 74        |
| 5.2. Biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia .....                                                                      | 75        |

|                                                                                                                                                                                                                               |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.2.1. Biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia para o antibiótico norfloxacino .....                                                                                                                                           | 75        |
| 5.2.2. Biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia para o antibiótico sulfato de gentamicina                                                                                                                                       | 79        |
| 5.2.3. Identificação dos metabólitos formados durante os ensaios de biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia.....                                                                                                               | 81        |
| 5.2.3.1. Antibiótico norfloxacino .....                                                                                                                                                                                       | 81        |
| 5.2.3.2. Antibiótico sulfato de gentamicina .....                                                                                                                                                                             | 87        |
| 5.2.4. Ensaios ecotoxicológicos para os antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina .....                                                                                                                              | 93        |
| 5.2.5. Comparação entre os processos utilizados .....                                                                                                                                                                         | 93        |
| 6. CONCLUSÕES .....                                                                                                                                                                                                           | 97        |
| <b>Capítulo 4 - Avaliação dos processos oxidativos e oxidativos avançados– H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fenton e Foto-Fenton– na degradação de norfloxacino e sulfato de gentamicina ..</b> | <b>98</b> |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                                                                                                                                                            | 99        |
| 2. OBJETIVOS .....                                                                                                                                                                                                            | 100       |
| 2.1. Objetivo geral.....                                                                                                                                                                                                      | 100       |
| 2.2. Objetivos específicos .....                                                                                                                                                                                              | 100       |
| 3. REVISÃO DA LITERATURA .....                                                                                                                                                                                                | 101       |
| 3.1. A utilização de processos oxidativos avançados .....                                                                                                                                                                     | 101       |
| 3.2. Aplicação de POAs no tratamento de resíduos de fármacos .....                                                                                                                                                            | 101       |
| 3.2.1. Utilização de peróxido de hidrogênio como oxidante.....                                                                                                                                                                | 103       |
| 3.2.2. Fotólise e fotólise do peróxido de hidrogênio .....                                                                                                                                                                    | 103       |
| 3.2.3. Utilização de oxidação de Fenton .....                                                                                                                                                                                 | 105       |
| 3.2.4. Utilização de foto-Fenton –H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Fe <sup>2+</sup> /UV .....                                                                                                                                   | 107       |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                                                                                                                                    | 108       |
| 4.1. Etapas metodológicas.....                                                                                                                                                                                                | 108       |
| 4.2. Reação com peróxido de hidrogênio.....                                                                                                                                                                                   | 109       |
| 4.3. Determinação do peróxido residual .....                                                                                                                                                                                  | 109       |
| 4.4. Ensaios utilizando radiação ultravioleta – UV.....                                                                                                                                                                       | 109       |
| 4.4.1. Descrição do aparato utilizado .....                                                                                                                                                                                   | 109       |
| 4.4.2. Determinação do fluxo de radiação da lâmpada - Actinometria .....                                                                                                                                                      | 110       |
| 4.5. Ensaios utilizando radiação ultravioleta e peróxido de hidrogênio .....                                                                                                                                                  | 112       |
| 4.6. Ensaios utilizando Fenton homogêneo .....                                                                                                                                                                                | 112       |
| 4.7. Ensaios utilizando foto-Fenton homogêneo.....                                                                                                                                                                            | 115       |
| 5. RESULTADOS .....                                                                                                                                                                                                           | 116       |
| 5.1. Experimentos com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....                                                                                                                                                                     | 116       |

|                                                                                                                                                |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.1.1. Avaliação da degradabilidade dos antibióticos variando a concentração de peróxido de hidrogênio.....                                    | 116        |
| 5.2. Experimentos utilizando radiação ultravioleta.....                                                                                        | 117        |
| 5.2.1. Actinometria.....                                                                                                                       | 117        |
| 5.2.2. Fotólise do antibiótico norfloxacino .....                                                                                              | 118        |
| 5.2.3. Fotólise do antibiótico sulfato de gentamicina.....                                                                                     | 120        |
| 5.3. Experimentos utilizando UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....                                                                            | 121        |
| 5.3.1. Avaliação da degradabilidade dos antibióticos .....                                                                                     | 121        |
| 5.4. Experimentos utilizando oxidação de Fenton-(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Fe <sup>2+</sup> ).....                                        | 127        |
| 5.4.1. Avaliação da degradabilidade dos antibióticos. ....                                                                                     | 127        |
| 5.5. Avaliação da degradação dos antibióticos por foto-Fenton - (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Fe <sup>2+</sup> /UV).....                     | 130        |
| 5.6. Comparação entre os processos utilizados.....                                                                                             | 130        |
| 5.7. Identificação dos produtos de degradação formados durante o tratamento com processos oxidativos avançados.....                            | 134        |
| 5.7.1. Antibiótico norfloxacino .....                                                                                                          | 134        |
| 5.7.2. Antibiótico sulfato de gentamicina .....                                                                                                | 140        |
| 5.8. Ensaio ecotoxicológico para os antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina após utilização de processos oxidativos avançados. .... | 145        |
| 5.8.1. Análise ecotoxicológica das amostras provenientes do tratamento por UV .....                                                            | 145        |
| 5.8.2. Análise ecotoxicológica das amostras provenientes do tratamento por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....                                 | 146        |
| 5.8.3. Análise ecotoxicológica das amostras provenientes do tratamento por UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....                              | 146        |
| 5.8.4. Análise ecotoxicológica das amostras provenientes do tratamento por oxidação de Fenton.....                                             | 146        |
| 5.8.5. Análise ecotoxicológica das amostras provenientes do tratamento por foto-Fenton .....                                                   | 146        |
| 6. CONCLUSÕES.....                                                                                                                             | 151        |
| <b>Capítulo 5 - Modelagem biomimética do metabolismo oxidativo dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina.....</b>                 | <b>153</b> |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                                                                             | 154        |
| 2. OBJETIVOS.....                                                                                                                              | 155        |
| 2.1. Objetivo geral.....                                                                                                                       | 155        |
| 2.2. Objetivos específicos .....                                                                                                               | 155        |
| 3. REVISÃO DA LITERATURA .....                                                                                                                 | 156        |
| 3.1. O citocromo P450 .....                                                                                                                    | 156        |
| 3.2. Porfirinas e suas gerações .....                                                                                                          | 157        |

|                                                                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.3. Utilização de porfirinas como catalisadores da oxidação de fármacos.....                                     | 159 |
| 3.4. Ecotoxicidade dos derivados de degradação de fármacos mediados por porfirinas. ....                          | 160 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                        | 162 |
| 4.1. Etapas do desenvolvimento metodológico.....                                                                  | 162 |
| 4.2. Elaboração da curva de calibração para quantificação dos fármacos. ....                                      | 162 |
| 4.3. Escolha das porfirinas a serem estudadas .....                                                               | 162 |
| 4.4. Avaliação da ecotoxicidade dos sistemas avaliados por meio da utilização de <i>Allivibrio fischeri</i> ..... | 167 |
| 5. RESULTADOS .....                                                                                               | 168 |
| 5.1. Avaliação da eficiência de oxidação dos antibióticos.....                                                    | 168 |
| 5.2. Identificação dos metabólitos e ensaios ecotoxicológicos.....                                                | 170 |
| 5.2.1. Antibiótico norfloxacino .....                                                                             | 171 |
| 5.2.2. Antibiótico sulfato de gentamicina .....                                                                   | 177 |
| 6. CONCLUSÕES .....                                                                                               | 184 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                                  | 185 |
| APÊNDICE A - Corridas cromatográficas realizadas para o antibiótico norfloxacino .....                            | 201 |
| APÊNDICE B - Corridas cromatográficas realizadas para o antibiótico sulfato de gentamicina .....                  | 206 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>FIGURA 2.1</b> - Mercado farmacêutico mundial, valores em bilhões de dólares.....                                                                                                                                                                                                                                    | 29 |
| <b>FIGURA 2.2</b> - Possíveis rotas dos fármacos no meio ambiente. ....                                                                                                                                                                                                                                                 | 30 |
| <b>FIGURA 2.3</b> - Estrutura molecular do antibiótico norfloxacino.....                                                                                                                                                                                                                                                | 35 |
| <b>FIGURA 2.4</b> - Estrutura molecular do aminoglicosídeo sulfato de gentamicina.....                                                                                                                                                                                                                                  | 36 |
| <b>FIGURA 2.5</b> - Fluxograma demonstrando as etapas do desenvolvimento metodológico .....                                                                                                                                                                                                                             | 39 |
| <b>FIGURA 2.6</b> - Questionário enviado aos profissionais da área de saúde autorizados a prescreverem antibióticos .....                                                                                                                                                                                               | 42 |
| <b>FIGURA 2.7</b> - Profissionais que indicaram os princípios ativos estudados nesta pesquisa....                                                                                                                                                                                                                       | 43 |
| <b>FIGURA 2.8</b> - Especialidades dos médicos que responderam aos questionários. ....                                                                                                                                                                                                                                  | 43 |
| <b>FIGURA 2.9</b> - Fármacos indicados nos questionários recebidos .....                                                                                                                                                                                                                                                | 44 |
| <b>FIGURA 2.10</b> - Percentagem de indicação dos antibióticos .....                                                                                                                                                                                                                                                    | 45 |
| <b>FIGURA 2.11</b> - Espectro de absorção do antibiótico norfloxacino.....                                                                                                                                                                                                                                              | 46 |
| <b>FIGURA 2.12</b> - Desenvolvimento metodológico para o antibiótico norfloxacino. (A) Curva de calibração do antibiótico obtida em 273 nm e (B) Validação da metodologia de extração utilizando de cartuchos C <sub>18</sub> . ....                                                                                    | 47 |
| <b>FIGURA 3.1</b> - Remoção de COT durante o teste Zahn-Welles para efluentes da síntese dos fármacos (a) aciclovir (b) ácido nalidíxico (c) naproxeno e soluções sintéticas preparadas a partir de seus sais. ....                                                                                                     | 54 |
| <b>FIGURA 3.2</b> - Remoção dos fármacos (a) aciclovir, (b) ácido nalidíxico e (c) naproxeno em efluentes do processo de síntese e soluções sintéticas preparadas a partir de seus sais durante o teste Zahn-Welles. ....                                                                                               | 55 |
| <b>FIGURA 3.3</b> - Estrutura do antibiótico Penicilina G .....                                                                                                                                                                                                                                                         | 56 |
| <b>FIGURA 3.4</b> - Relação de fármacos e organismos já utilizados durante ensaios de ecotoxicidade no período de 2000 a 2014. ....                                                                                                                                                                                     | 58 |
| <b>FIGURA 3.5</b> - (a) Toxicidade aguda de 24 fármacos, expressada em valores de CE <sub>50</sub> ou CL <sub>50</sub> para diferentes tipos de organismos. (b) Toxicidade crônica de 10 fármacos, expressada em valores de Concentração de Efeito Não Observado (NOEC) e Concentração de Efeito Observado (LOEC). .... | 59 |
| <b>FIGURA 3.6</b> - Fluxograma demonstrando as etapas do desenvolvimento metodológico. ....                                                                                                                                                                                                                             | 65 |
| <b>FIGURA 3.7</b> - Monitoramento da biodegradabilidade aeróbia (a) e anaeróbia (b) dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina. ....                                                                                                                                                                        | 68 |
| <b>FIGURA 3.8</b> - Monitoramento da degradabilidade dos antibióticos através do borbulhamento de O <sub>2</sub> . (a) Antibiótico norfloxacino e (b) Antibiótico sulfato de gentamicina. ....                                                                                                                          | 74 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>FIGURA 3.9</b> - Verificação da existência de diferenças significativas entre os diferentes fluxos de O <sub>2</sub> . (a) Antibiótico norfloxacino (b) Antibiótico sulfato de gentamicina.....                                                                                      | 75 |
| <b>FIGURA 3.10</b> - Monitoramento da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do antibiótico norfloxacino. (a) Utilização de biomassa aclimatada e (b) Utilização de biomassa sem aclimação. ....                                                                                        | 76 |
| <b>FIGURA 3.11</b> - Biodegradabilidade do norfloxacino verificada nos reatores aeróbios com e sem aclimação da biomassa. Sendo: (1) biodigestor anaeróbio, (2) biodigestor anaeróbio aclimatado, (3) UASB, (4) UASB aclimatado, (5) lodos ativado e (6) lodos ativados aclimatado..... | 77 |
| <b>FIGURA 3.12</b> - Monitoramento da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do antibiótico norfloxacino por UV/Vis em 273 nm. (a) Utilização de biomassa aclimatada e (b) Utilização de biomassa sem aclimação. ....                                                                   | 77 |
| <b>FIGURA 3.13</b> - Monitoramento da concentração de norfloxacino em <i>Reatores Controles</i> com aclimação da biomassa, leitura da absorvidade molar em 273 nm.....                                                                                                                  | 78 |
| <b>FIGURA 3.14</b> - Variação da concentração de norfloxacino em função da lise celular bacteriana.....                                                                                                                                                                                 | 79 |
| <b>FIGURA 3.15</b> - Monitoramento da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do antibiótico sulfato de gentamicina. (a) Biomassa advinda de biodigestores anaeróbios (b) biomassa de reatores UASB e (c) biomassa de lodos ativados. ....                                               | 80 |
| <b>FIGURA 3.16</b> - Percentagem de biodegradabilidade verificada nos reatores com o antibiótico sulfato de gentamicina. Sendo: (1) Lodos ativados, (2) UASB, (3) Biodigestor anaeróbio, (4) Lodos ativados aclimatado, (5) UASB aclimatado e (6) Biodigestor anaeróbio aclimatado. ..  | 81 |
| <b>FIGURA 3.17</b> - Número de metabólitos verificados durante os ensaios de biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do antibiótico norfloxacino.....                                                                                                                                    | 82 |
| <b>FIGURA 3.18</b> - Intensidade de área dos metabólitos encontrados durante o processo de avaliação da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do antibiótico norfloxacino. ....                                                                                                        | 83 |
| <b>FIGURA 3.19</b> - Metabólitos encontrados após ensaios de biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia.....                                                                                                                                                                                | 86 |
| <b>FIGURA 3.20</b> - Número de metabólitos verificados durante os ensaios de biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do antibiótico sulfato de gentamicina.....                                                                                                                          | 87 |
| <b>FIGURA 3.21</b> - Intensidade de área dos metabólitos encontrados durante o processo de avaliação da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do antibiótico sulfato de gentamicina. .                                                                                                 | 88 |
| <b>FIGURA 3.22</b> - Metabólitos encontrados após ensaios de biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia para o antibiótico sulfato de gentamicina. ....                                                                                                                                     | 92 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>FIGURA 3.23</b> - Redução de luminescência em função da concentração do antibiótico em 5, 15 e 30 minutos. (a) Norfloxacino, $C_0=15$ mg/L e (b) Sulfato de gentamicina, $C_0=100$ mg/L. ....                                                                                                | 93  |
| <b>FIGURA 4.1</b> - Fluxograma demonstrando as etapas do desenvolvimento metodológico. ....                                                                                                                                                                                                     | 108 |
| <b>FIGURA 4.2</b> - Reator utilizado nos ensaios de fotodegradação.....                                                                                                                                                                                                                         | 110 |
| <b>FIGURA 4.3</b> - Monitoramento da degradabilidade do antibiótico norfloxacino (15 mg/L) utilizando $H_2O_2$ e leitura por UV/VIS em 273 nm, temperatura =28°C, pH 3.....                                                                                                                     | 116 |
| <b>FIGURA 4.4</b> - Monitoramento da degradabilidade do antibiótico sulfato de gentamicina ( $C_0=100$ mg/L) utilizando $H_2O_2$ e leitura por COT em pH 3. ....                                                                                                                                | 117 |
| <b>FIGURA 4.5</b> - Intensidade luminosa da lâmpada de vapor de mercúrio de baixa pressão de 6W de potência em função do tempo. ....                                                                                                                                                            | 118 |
| <b>FIGURA 4.6</b> - Decomposição do antibiótico norfloxacino através da radiação ultravioleta. Condições experimentais: Concentração do antibiótico: 15 mg/L; Intensidade da luz: $4,94 \cdot 10^{-05}$ Einstein/min; temperatura: 27°C; pH=7; $\lambda=273$ nm e 320 nm. ....                  | 118 |
| <b>FIGURA 4.7</b> - Comportamento do antibiótico norfloxacino através da utilização de radiação UV. (a) Espectro absorção do norfloxacino com máximo em 273 nm e do produto de degradação com máximo em 293 nm e (b) Mineralização dos norfloxacino ao longo do processo de radiação UV. ....   | 119 |
| <b>FIGURA 4.8</b> - Decomposição do antibiótico sulfato de gentamicina através da radiação ultravioleta. Condições experimentais: Concentração do antibiótico: 100mg/L; Intensidade da luz: $4,94 \cdot 10^{-05}$ Einstein/min; temperatura: 27°C; pH=7; Determinação por COT.....              | 120 |
| <b>FIGURA 4.9</b> - Decomposição do antibiótico norfloxacino através da radiação ultravioleta com peróxido de hidrogênio. Condições experimentais: Concentração do antibiótico: 15 mg/L; Intensidade da luz: $4,94 \cdot 10^{-05}$ Einstein/min; temperatura: 28°C; pH=7; $\lambda=273$ nm. ... | 121 |
| <b>FIGURA 4.10</b> - Degradação do antibiótico norfloxacino através da radiação ultravioleta com variação de pH. Condições experimentais: $C_0$ : 15 mg/L; Intensidade da luz: $4,94 \cdot 10^{-05}$ Einstein/min; temperatura: 28°C; $\lambda=273$ nm. ....                                    | 122 |
| <b>FIGURA 4.11</b> - Espectro de absorção do antibiótico norfloxacino durante o monitoramento da fotólise com peróxido de hidrogênio nas proporções de [C]:[HO <sup>-</sup> ] (a) [1]:[1], (b) [1]:[2] e (c) [1]:[3]. ....                                                                      | 123 |
| <b>FIGURA 4.12</b> - Espectro de absorção do antibiótico norfloxacino durante o monitoramento da fotólise com peróxido de hidrogênio nas proporções de [C]:[HO <sup>-</sup> ] (a) [1]:[4], (b) [1]:[5] e (c) [1]:[6]. ....                                                                      | 124 |
| <b>FIGURA 4.13</b> - Decomposição do antibiótico sulfato de gentamicina através da radiação ultravioleta com peróxido de hidrogênio. (a) Variação da concentração de $H_2O_2$ e (b)                                                                                                             |     |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Variação de pH. Condições experimentais: Concentração do antibiótico: 100mg/L; Intensidade da luz: $4,94 \cdot 10^{-05}$ Einstein/min; temperatura: 28°C; pH=7.....                                                                                                                                                           | 126 |
| <b>FIGURA 4.14</b> - Degradação e mineralização do antibiótico norfloxacino através da utilização de oxidação de Fenton. ....                                                                                                                                                                                                 | 128 |
| <b>FIGURA 4.15</b> - Gráfico de Pareto para efeitos padronizados com $\alpha = 5\%$ . ....                                                                                                                                                                                                                                    | 128 |
| <b>FIGURA 4.16</b> - Porcentagem de mineralização do antibiótico sulfato de gentamicina nos ensaios de Fenton. (a) Taxa de mineralização e (b) Gráfico de Pareto para efeitos padronizados com $\alpha = 5\%$ . ....                                                                                                          | 129 |
| <b>FIGURA 4.17</b> - Degradação dos antibióticos utilizando tratamento por foto-Fenton. (a) Antibiótico norfloxacino e (b) Sulfato de gentamicina. Condições experimentais: Concentrações iniciais: 15mg/L e 100 mg/L, respectivamente; Intensidade da luz: $4,94 \cdot 10^{-05}$ Einstein/min; temperatura: 28°C, pH 3. .... | 131 |
| <b>FIGURA 4.18</b> - Produtos de degradação encontrados após a utilização dos processos oxidativos avançados para o antibiótico norfloxacino. ....                                                                                                                                                                            | 134 |
| <b>FIGURA 4.19</b> - Intensidade de área dos produtos de degradação encontrados após a realização dos processos oxidativos avançados para o antibiótico norfloxacino. ....                                                                                                                                                    | 135 |
| <b>FIGURA 4.20</b> - Produtos de degradação identificados após a realização dos ensaios envolvendo processos oxidativos avançados para o antibiótico norfloxacino. ....                                                                                                                                                       | 139 |
| <b>FIGURA 4.21</b> - Produtos de degradação encontrados após a utilização dos processos oxidativos avançados para o antibiótico sulfato de gentamicina.....                                                                                                                                                                   | 140 |
| <b>FIGURA 4.22</b> - Intensidade de área dos produtos de degradação encontrados após a realização dos processos oxidativos avançados para o antibiótico sulfato de gentamicina. ..                                                                                                                                            | 141 |
| <b>FIGURA 4.23</b> - Produtos de degradação identificados após a realização dos ensaios envolvendo processos oxidativos avançados para o antibiótico sulfato de gentamicina. ....                                                                                                                                             | 144 |
| <b>FIGURA 4.24</b> - Porcentagem de efeito (redução de luminosidade) em função da porcentagem de concentração de efluente em 5, 15, 30 minutos em amostras submetidas a tratamento por radiação UV. (a) Antibiótico norfloxacino e (b) Antibiótico sulfato de gentamicina.....                                                | 145 |
| <b>FIGURA 4.25</b> - Porcentagem de efeito (redução de luminosidade) em função da porcentagem de concentração de efluente em 5, 15, 30 minutos em amostras submetidas a tratamento por UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . (a) Antibiótico norfloxacino e (b) Antibiótico sulfato de gentamicina.....                          | 147 |
| <b>FIGURA 4.26</b> – Dados compilados dos ensaios de ecotoxicidade para os tratamentos estudados.. ....                                                                                                                                                                                                                       | 147 |
| <b>FIGURA 5.1</b> – (a) Estrutura do citocromo P450 e (b) Sítio ativo da proteína ou grupo Heme B (protoporfirina IX). ....                                                                                                                                                                                                   | 156 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>FIGURA 5.2</b> - Exemplos de porfirinas. (a) Denominação das posições do macrociclo porfirínico, (b) Estrutura molecular da porfirina 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (H <sub>2</sub> TPP) e C) Grupo heme: tipo B, heme da hemoglobina, mioglobina Grupo heme: tipo B, heme da hemoglobina, mioglobina, peroxidase, citocromo P-450 e citocromo b; e tipo C, heme do citocromo c. .... | 158 |
| <b>FIGURA 5.3</b> - Exemplos de porfirinas. (a) Primeira geração, (b) segunda geração e (c) terceira geração.....                                                                                                                                                                                                                                                                         | 158 |
| <b>FIGURA 5.4</b> - Fluxograma demonstrando as etapas do desenvolvimento metodológico ...                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 162 |
| <b>FIGURA 5.5</b> - Porphirinas utilizadas para catalisar a oxidação dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina. (a) Mn(III)(Br <sub>8</sub> TCMPP)Cl e (b) Mn(III)(Br <sub>8</sub> TCPP)Cl. ....                                                                                                                                                                             | 163 |
| <b>FIGURA 5.6</b> - Porifinas utilizadas para catalisar a oxidação dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina. (a) Mn(III)(TCMPP)Cl e (b) Mn(III)(TCPP)Cl. ....                                                                                                                                                                                                               | 163 |
| <b>FIGURA 5.7</b> - Estrutura molecular dos oxidantes utilizados nas reações de oxidação dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina catalisadas pelas diferentes porfirinas. (a) iodosilbenzeno (PhIO) e (b) iodobenzeno diacetato PhI(OAc) <sub>2</sub> . ....                                                                                                               | 164 |
| <b>FIGURA 5.8</b> - Frascos utilizados para as reações de oxidação dos fármacos utilizando as metaloporfirinas de manganês. ....                                                                                                                                                                                                                                                          | 166 |
| <b>FIGURA 5.9</b> - Curvas de calibração utilizadas para análise das reações de oxidação dos fármacos catalisadas pelas metaloporfirinas. (a) norfloxacino e (b) sulfato de gentamicina                                                                                                                                                                                                   | 168 |
| <b>FIGURA 5.10</b> - Número de sistemas em que os metabólitos foram verificados durante os ensaios de oxidação do antibiótico norfloxacino catalisados pelas metaloporfirinas. ....                                                                                                                                                                                                       | 171 |
| <b>FIGURA 5.11</b> - Intensidade de área dos metabólitos obtidos durante os processos empregando metaloporfirinas na oxidação do antibiótico norfloxacino. ....                                                                                                                                                                                                                           | 172 |
| <b>FIGURA 5.12</b> - Metabólitos identificados após a realização dos ensaios catalíticos envolvendo porfirinas para o antibiótico norfloxacino. ....                                                                                                                                                                                                                                      | 173 |
| <b>FIGURA 5.13</b> - Metabólitos identificados após a realização dos ensaios catalíticos envolvendo porfirinas para o antibiótico norfloxacino. ....                                                                                                                                                                                                                                      | 174 |
| <b>FIGURA 5.14</b> - Metabólitos identificados após a realização dos ensaios catalíticos envolvendo porfirinas para o antibiótico norfloxacino. ....                                                                                                                                                                                                                                      | 174 |
| <b>FIGURA 5.15</b> – Dados compilados dos ensaios ecotoxicológicos para o antibiótico norfloxacino utilizando porfirinas .....                                                                                                                                                                                                                                                            | 174 |
| <b>FIGURA 5.16</b> - Número de sistemas em que os metabólitos foram verificados durante a oxidação catalítica do antibiótico sulfato de gentamicina. ....                                                                                                                                                                                                                                 | 178 |
| <b>FIGURA 5.17</b> - Intensidade de área dos metabólitos obtidos nos processos empregando metaloporfirinas na oxidação do antibiótico sulfato de gentamicina. ....                                                                                                                                                                                                                        | 178 |

|                                                                                                                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>FIGURA 5.18</b> - Metabólitos identificados após a realização dos ensaios catalíticos envolvendo porfirinas para o antibiótico sulfato de gentamicina..... | 179 |
| <b>FIGURA 5.19</b> - Metabólitos identificados após a realização dos ensaios catalíticos envolvendo porfirinas para o antibiótico sulfato de gentamicina..... | 180 |
| <b>FIGURA 5.20</b> – Dados compilados dos ensaios ecotoxicológicos para o antibiótico sulfato de gentamicina utilizando porfirinas. ....                      | 180 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 2.1</b> - Classificação das quinolonas/fluoroquinolonas de acordo com o espectro de ação .....                                                                                                                                                                                                                                     | 34 |
| <b>Tabela 3.1</b> - Constantes de sorção de alguns antibióticos pelo lodo .....                                                                                                                                                                                                                                                              | 53 |
| <b>Tabela 3.2</b> - Definições de alguns termos utilizados em testes de toxicidade.....                                                                                                                                                                                                                                                      | 61 |
| <b>Tabela 3.3</b> - Relação antibiótico/glicose utilizada durante o período de aclimação da biomassa .....                                                                                                                                                                                                                                   | 66 |
| <b>Tabela 3.4</b> - Composição das soluções de macro e micronutrientes. ....                                                                                                                                                                                                                                                                 | 67 |
| <b>Tabela 3.5</b> - Descrição dos reatores aeróbios – Biomassa lodos ativados.....                                                                                                                                                                                                                                                           | 69 |
| <b>Tabela 3.6</b> - Descrição dos reatores anaeróbios estudados.....                                                                                                                                                                                                                                                                         | 70 |
| <b>Tabela 3.7</b> - Condições analíticas utilizadas para determinação dos metabólitos gerados durante os processos de biodegradabilidade.....                                                                                                                                                                                                | 71 |
| <b>Tabela 3.8</b> - Condições cromatográficas utilizadas para determinação dos produtos de degradação/metabólitos do antibiótico norfloxacino.....                                                                                                                                                                                           | 71 |
| <b>Tabela 3.9</b> - Condições cromatográficas utilizadas para determinação de dos produtos de degradação/metabólitos do antibiótico sulfato de gentamicina. ....                                                                                                                                                                             | 71 |
| <b>Tabela 3.10</b> - Estrutura molecular dos compostos encontrados durante a avaliação da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do antibiótico norfloxacino. Biomassas utilizadas: (1) lodos ativados, (2) lodos ativados aclimatado, (3) biodigestor anaeróbio, (4) biodigestor anaeróbio aclimatado,(5) UASB e (6) UASB aclimatado.....   | 84 |
| <b>Tabela 3.11</b> - Estrutura molecular dos compostos encontrados durante a avaliação da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do antibiótico norfloxacino. Biomassas utilizadas: (1) lodos ativados, (2) lodos ativados aclimatado, (3) biodigestor anaeróbio, (4) biodigestor anaeróbio aclimatado, (5) UASB e (6) UASB aclimatado... .. | 85 |
| <b>Tabela 3.12</b> – Estrutura molecular dos compostos encontrados durante a avaliação da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do antibiótico norfloxacino. Biomassas utilizadas: (1) lodos ativados, (2) lodos ativados aclimatado, (3) biodigestor anaeróbio, (4) biodigestor anaeróbio aclimatado, (5) UASB e (6) UASB aclimatado.....  | 89 |
| <b>Tabela 3.13</b> – Estrutura molecular dos compostos encontrados durante a avaliação da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do antibiótico norfloxacino. Biomassas utilizadas: (1) lodos ativados, (2) lodos ativados aclimatado, (3) biodigestor anaeróbio, (4) biodigestor anaeróbio aclimatado, (5) UASB e (6) UASB aclimatado.....  | 90 |
| <b>Tabela 3.14</b> – Estrutura molecular dos compostos encontrados durante a avaliação da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do antibiótico norfloxacino. Biomassas utilizadas: (1)                                                                                                                                                      |    |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| lodos ativados, (2) lodos ativados aclimatado, (3) biodigestor anaeróbio, (4) biodigestor anaeróbio aclimatado, (5) UASB e (6) UASB aclimatado.....                                                                                                                                                                   | 91  |
| <b>Tabela 3.15</b> - Resultados de toxicidade (EC <sub>50</sub> ) de efluentes provenientes de tratamento por lodos ativados (aclimatados e não aclimatados).....                                                                                                                                                     | 95  |
| <b>Tabela 3.16</b> –Resumo das principais condições analíticas utilizadas e remoções observadas durante os ensaios de biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia utilizando os antibióticos (a) norfloxacino e (b) sulfato de gentamicina .....                                                                           | 95  |
| <b>Tabela 4.1</b> - Relação de trabalhos que utilizam POA para tratar resíduos de fármacos...                                                                                                                                                                                                                         | 102 |
| <b>Tabela 4.2</b> - Compostos encontrados após tratamento biológico; limite de quantificação e % de remoção por UV, UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....                                                                                                                                                            | 105 |
| <b>Tabela 4.3</b> - Relação das fórmulas moleculares possíveis para gentamicina e fórmula média utilizada. ....                                                                                                                                                                                                       | 109 |
| <b>Tabela 4.4</b> - Valores utilizados no monitoramento da degradação dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina para reação de Fenton.....                                                                                                                                                               | 113 |
| <b>Tabela 4.5</b> - Matriz do planejamento fatorial utilizada para os experimentos de Fenton homogêneo para o antibiótico norfloxacino. ....                                                                                                                                                                          | 113 |
| <b>Tabela 4.6</b> - Matriz do planejamento fatorial utilizada para os experimentos de Fenton homogêneo para o antibiótico sulfato de gentamicina. ....                                                                                                                                                                | 114 |
| <b>Tabela 4.7</b> - Relação entre as eficiências de mineralização e degradação do antibiótico norfloxacino nos ensaios de Fenton por COT e UV/Vis, respectivamente. ....                                                                                                                                              | 127 |
| <b>Tabela 4.8</b> - Eficiência de mineralização do antibiótico sulfato de gentamicina durante os ensaios oxidação de Fenton. ....                                                                                                                                                                                     | 129 |
| <b>Tabela 4.9</b> –Resumo das principais condições analíticas utilizadas e remoções observadas durante os estudos envolvendo processos oxidativos avançados (a) norfloxacino e (b) sulfato de gentamicina.....                                                                                                        | 136 |
| <b>Tabela 4.10</b> - Estrutura molecular dos compostos encontrados após a realização dos ensaios envolvendo processos oxidativos avançados para o antibiótico norfloxacino. Processos utilizados: (1) UV, (2) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , (3) UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , (4) Fenton, (5) Foto-Fenton..... | 136 |
| <b>Tabela 4.11</b> - Estrutura molecular dos compostos encontrados após a realização dos ensaios envolvendo processos oxidativos avançados para o antibiótico norfloxacino. Processos utilizados: (1) UV, (2) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , (3) UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , (4) Fenton, (5) Foto-Fenton..... | 137 |
| <b>Tabela 4.12</b> – Estrutura molecular dos compostos encontrados após a realização dos ensaios envolvendo processos oxidativos avançados para o antibiótico norfloxacino. Processos utilizados: (1) UV, (2) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , (3) UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , (4) Fenton, (5) Foto-Fenton..... | 138 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 4.13</b> - Estrutura molecular dos compostos encontrados após a realização dos ensaios envolvendo processos oxidativos avançados para o antibiótico sulfato de gentamicina. Processos utilizados: (1) UV, (2) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , (3) UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , (4) Fenton, (5) Foto-Fenton..... | 142 |
| <b>Tabela 4.14</b> - Estrutura molecular dos compostos encontrados após a realização dos ensaios envolvendo processos oxidativos avançados para o antibiótico sulfato de gentamicina. Processos utilizados: (1) UV, (2) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , (3) UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , (4) Fenton, (5) Foto-Fenton..... | 143 |
| <b>Tabela 5.1</b> - Relação das massas utilizadas para oxidação catalítica do antibiótico norfloxacino.....                                                                                                                                                                                                                     | 165 |
| <b>Tabela 5.2</b> - Relação das massas utilizadas para oxidação catalítica do antibiótico sulfato de gentamicina.....                                                                                                                                                                                                           | 166 |
| <b>Tabela 5.3</b> - Parâmetros utilizados durante as corridas cromatográficas dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina.....                                                                                                                                                                                       | 167 |
| <b>Tabela 5.4</b> – Resultados das reações de oxidação do antibiótico norfloxacino catalisadas por porfirinas de segunda e terceira gerações .....                                                                                                                                                                              | 168 |
| <b>Tabela 5.5</b> – Resultados das reações de oxidação do antibiótico sulfato de gentamicina catalisada por porfirinas de segunda e terceira gerações. ....                                                                                                                                                                     | 169 |
| <b>Tabela 5.6</b> - Eficiência de oxidação dos fármacos utilizando diferentes metaloporfirinas, como catalisadores, e oxidantes.....                                                                                                                                                                                            | 169 |
| <b>Tabela 5.7</b> - Relação dos metabólitos obtidos durante os ensaios envolvendo metaloporfirinas de manganês para o antibiótico norfloxacino. ....                                                                                                                                                                            | 175 |
| <b>Tabela 5.8</b> - Relação dos metabólitos obtidos durante os ensaios envolvendo metaloporfirinas de manganês para o antibiótico norfloxacino .....                                                                                                                                                                            | 176 |
| <b>Tabela 5.9</b> - Relação dos metabólitos obtidos durante os ensaios envolvendo metaloporfirinas de manganês para o antibiótico sulfato de gentamicina.....                                                                                                                                                                   | 182 |
| <b>Tabela 5.10</b> - Relação dos metabólitos obtidos durante os ensaios envolvendo metaloporfirinas de manganês para o antibiótico sulfato de gentamicina .....                                                                                                                                                                 | 183 |

## LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CE<sub>50</sub> - Concentração efetiva média

CENO - Concentração de efeito não observado

CEO - Concentração de efeito observado

CL<sub>50</sub> - Concentração letal média

COT - Carbono Orgânico Total

DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio

DCB - Denominação Comum Brasileira

EFS - Extração em fase sólida

ESBL - Extended-Spectrum Beta-Lactamases

ETEs - Estações de tratamento de esgotos

HPLC - High performance liquid chromatography

ICRA - Catalan Institute for Water Research

K<sub>d</sub> - Constante de sorção linear

MRSA - Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

NDIR - Non-Dispersive Infrared

OMS - Organização Mundial de Saúde

PNSSP - penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae*

POAs - Processos oxidativos avançados

SNGPC - Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados

TOF - Time of flight

UASB - Upflow Anaerobic Sludge Blanket

UV - Radiação ultravioleta

VRE - Vancomycin - resistant *Enterococci*

# Capítulo 1

---

Introdução

## 1. INTRODUÇÃO

A frequente ocorrência de fármacos no ambiente aquático e na água potável tem levantado questão sobre o seu impacto ao meio ambiente e à saúde pública. Os fármacos presentes no meio ambiente recebem continuamente extensas investigações da comunidade científica e observa-se um aumento da exigência no controle de tais substâncias por parte das agências reguladoras.

Alguns grupos de fármacos residuais merecem atenção especial, como os antibióticos. Esta classe de medicamentos tem sido muito utilizada na medicina humana e veterinária para tratar doenças infecciosas, como promotores de crescimento na produção intensiva de animais, a exemplo da criação de bovinos, aves, suínos e aquicultura, e como pesticidas para controlar infecções bacterianas em campos de cultivo (SAPKOTA *et al.*, 2008). Sendo assim, podem contaminar o solo, águas subterrâneas e superficiais.

A grande discussão sobre a importância da remoção dos antibióticos em sistemas de tratamento de efluentes se deve ao fato deles promoverem a resistência bacteriana. Vale lembrar que mesmo sendo extinta a poluição por antibióticos a população de bactérias resistentes permanece por várias gerações. De acordo com MARTINEZ (2009), vários mecanismos permitem a manutenção e, eventualmente, disseminação de genes de resistência antibiótica em ecossistemas naturais, de modo que diferentemente da contaminação por antibióticos, a poluição por genes de resistência não desaparece com a extinção da contaminação.

O comportamento e destino dos antibióticos e seus metabólitos no ambiente aquático ainda não é bem conhecido. Por se tratarem de compostos orgânicos estáveis, e na maioria das vezes recalcitrantes, as tecnologias tradicionalmente utilizadas para tratar efluentes apresentam capacidade limitada na remoção de tais compostos. No entanto, uma nova proposta de tratamento deve levar em consideração as tecnologias já empregadas, um maior conhecimento sobre o comportamento de cada classe de fármaco frente ao tratamento proposto, a formação de metabólitos durante o processo de tratamento e, finalmente, a toxicidade dos metabólitos formados, caso a tecnologia empregada não seja capaz de mineralizar totalmente o composto.

Tendo em vista a grande utilização dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina em nosso país, faz-se necessário um estudo detalhado sobre o comportamento destes fármacos frente à sistemas de tratamentos biológicos aeróbios e anaeróbios e um maior aprofundamento

sobre a eficiência de remoção destes compostos através da utilização de processos físico-químicos como os processos oxidativos avançados.

Esta Tese insere-se neste contexto, estando dividida em 5 capítulos assim estruturados:

#### *Capítulo 1 - Introdução*

#### *Capítulo 2 - Escolha e desenvolvimento metodológico para monitoramento dos fármacos.*

Nesta etapa verificou-se, juntamente aos profissionais da área da saúde, os antibióticos mais frequentemente prescritos de forma a definir os princípios ativos a serem estudados e desenvolveram-se as metodologias analíticas necessárias para o monitoramento dos fármacos escolhidos.

#### *Capítulo 3 - Biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do norfloxacino e sulfato de gentamicina.*

Neste capítulo avaliou-se o comportamento dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina, definidos no Capítulo 2 desta tese, frente a ensaios de biodegradabilidade aeróbios e anaeróbios.

#### *Capítulo 4 - Avaliação dos processos oxidativos avançados – $H_2O_2$ , UV, UV/ $H_2O_2$ , Fenton e Foto-Fenton – na degradação de norfloxacino e sulfato de gentamicina.*

Nesta etapa avaliou-se a eficiência de remoção dos antibióticos supracitados pelos processos oxidativos e oxidativos avançados -  $H_2O_2$ , UV, UV/ $H_2O_2$ , Fenton e Foto-Fenton. Além disso, fez um estudo da toxicidade das soluções utilizadas após cada processo empregado.

#### *Capítulo 5 - Modelagem biomimética do metabolismo oxidativo dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina.*

Neste capítulo avaliou-se a degradação dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina por meio de modelos biomiméticos do citocromo P450 empregando porfirinas sintéticas como catalisadores.

# Capítulo 2

---

Escolha e desenvolvimento metodológico para  
monitoramento dos fármacos

## 1. INTRODUÇÃO

Os fármacos são instrumentos de manutenção, preservação e recuperação do estado de saúde de uma população e apresentam-se como uma ferramenta importante e, na maioria das vezes, indispensável para tratamento de uma enfermidade.

Dentre os fármacos mais consumidos pode-se citar: antipiréticos, analgésicos, reguladores lipídicos, antibióticos, antidepressivos, agentes quimioterápicos e drogas contraceptivas. Após serem consumidos esses compostos são parcialmente metabolizados e excretados na urina e fezes passando a fazer parte do esgoto doméstico (TAMBOSI, 2008 e JEAN *et al.*, 2012).

A frequente ocorrência de fármacos no ambiente aquático e na água potável tem levantado a questão sobre o seu impacto ao ambiente e à saúde pública. Os efeitos adversos causados por compostos farmacêuticos incluem toxicidade aquática, desenvolvimento de resistência em bactérias patogênicas, genotoxicidade e distúrbios endócrinos (KÜMMERER, 2004).

O monitoramento de fármacos residuais no meio ambiente vem gerando grande interesse, isso devido ao fato de muitas dessas substâncias serem frequentemente encontradas em efluentes de Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) e águas naturais, em concentrações na faixa de  $\mu\text{g/L}$  e  $\text{ng/L}$ .

O comportamento e destino de fármacos e seus metabólitos no ambiente aquático ainda não é bem conhecido. A baixa volatilidade desses compostos indica que sua distribuição no meio ambiente acontecerá principalmente por meio de transporte aquoso, mas também através da cadeia alimentar e dispersão (BILA *et al.*, 2003).

Os efluentes e resíduos gerados pela indústria farmacêutica também podem ser apontados como uma porta de entrada destes fármacos para o meio ambiente quando dispostos ou tratados de forma incorreta. Nestas indústrias o tratamento usual para os efluentes é o tratamento biológico. Compostos recalcitrantes ou refratários não são biodegradados pelos organismos presentes em sistemas biológicos de tratamento nos usuais tempos de retenção hidráulica aplicados, sendo lançados nos corpos aquáticos receptores. Na verdade, a maioria das estações de tratamento de águas residuais que utilizam tratamento biológico apresenta alta eficiência de remoção de produtos farmacêuticos através de sorção e sedimentação destes produtos no lodo (JELIC *et al.*, 2011 e JIA *et al.*, 2012). Ou seja, uma parte significativa dos

fármacos apenas mudam de fase não sendo biodegradados de forma efetiva. Isso significa que os fármacos apenas adsorvidos são susceptíveis a uma nova liberação no meio ambiente após a eliminação do lodo, causando sérios problemas ambientais (MARTÍN *et al.*, 2012a e MARTÍN *et al.*, 2012b)

Alguns grupos de fármacos residuais merecem atenção especial, como os antibióticos. Esses fármacos têm sido utilizados na medicina humana e veterinária para tratar doenças infecciosas, como promotores de crescimento na produção intensiva de animais, a exemplo da criação de bovinos, aves, suínos e aquicultura, e como pesticidas para controlar infecções bacterianas em campos de cultivo (SAPKOTA *et al.*, 2008). Sendo assim, podem contaminar o solo, águas de subsolo e superficiais.

Os processos convencionais de tratamento de água e efluentes possuem capacidade limitada para remoção desses compostos persistentes, e por isso, a introdução de novas tecnologias de tratamento capazes de remover de forma eficiente estes compostos devem ser estudadas e incorporadas aos tratamentos. Vale ressaltar que estas substâncias, mesmo em baixas concentrações, são biologicamente ativas, podendo levar ao aumento da resistência bacteriana e alteração da biodiversidade e do equilíbrio de ecossistemas aquáticos (BOUKI *et al.*, 2013). Além disso, a biodegradabilidade parcial dos fármacos pode levar a geração de metabólitos ainda mais tóxicos que o composto de origem podendo, aqueles, serem mais impactantes.

Desta forma, a ciência e a engenharia tem buscado desenvolver tecnologias que promovam a remoção efetiva de fármacos, e em especial dos antibióticos, junto com outros poluentes considerados recalcitrantes. A utilização de POA (Processos Oxidativos Avançados) que são baseados na oxidação dos contaminantes pela reação com oxidantes fortes, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), tem sido muito utilizada. Um desafio inicialmente encontrado para o desenvolvimento deste trabalho foi o de definir qual ou quais seriam os antibióticos de uso mais frequente no Brasil, a que grupo de substâncias químicas pertencem e se há metodologias analíticas para efetivamente realizar o seu monitoramento. Assim, este capítulo descreve como foi realizada a escolha dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina e como se deu o desenvolvimento dos métodos analíticos para proceder com o monitoramento nos diferentes tratamentos aplicados.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1    *Objetivo geral***

Definir os antibióticos que serão estudados nesta pesquisa.

### **2.2    *Objetivos específicos***

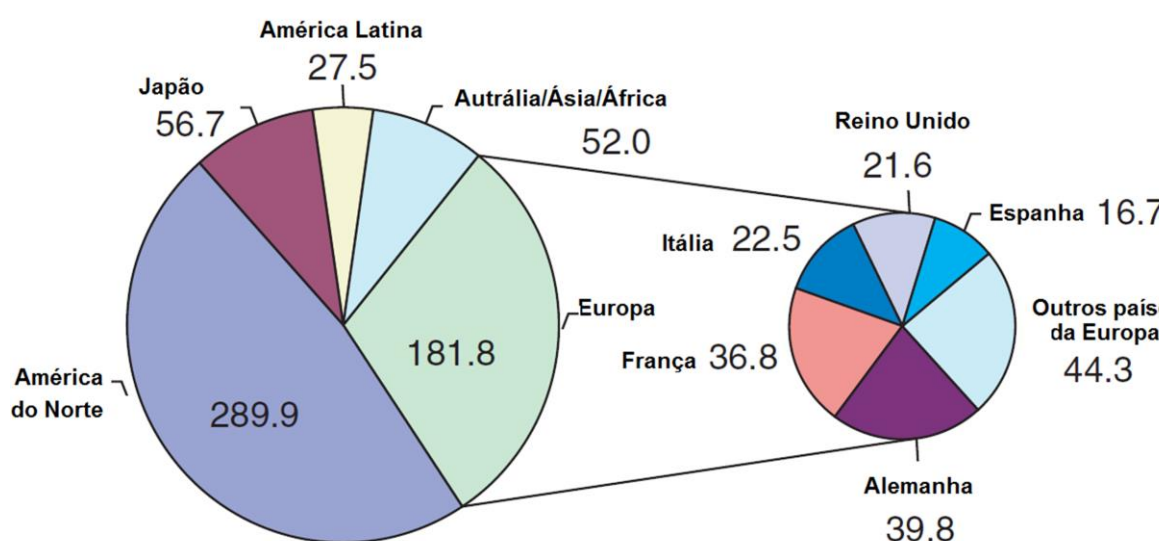
- ✓    Verificar, junto aos profissionais da área da saúde, os antibióticos mais frequentemente prescritos de forma a definir os princípios ativos a serem estudados;
- ✓    Desenvolver/adaptar metodologias analíticas para monitoramento dos fármacos escolhidos.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Escolha do tema– Fármacos no meio ambiente

Uma grande quantidade de fármacos, de diferentes classes, é produzida e consumida anualmente em todo o mundo (FIOCRUZ, 2001). Na Europa, atualmente, são utilizadas mais de 3000 formulações diferentes (TERNES *et al.*, 2009). O Brasil encontra-se entre os cinco maiores mercados farmacêuticos do mundo, com vendas anuais superiores a US\$ 10 bilhões. Na Figura 2.1 é apresentado o perfil do mercado farmacêutico mundial no ano de 2006.

**FIGURA 2.1** - Mercado farmacêutico mundial, valores em bilhões de dólares.



Fonte: Reuben, 2008.

Após serem consumidos, esses compostos são parcialmente metabolizados e excretados na urina e fezes e subsequentemente entram nas estações de tratamento de esgoto (ETEs), onde são tratados, juntamente com outros constituintes orgânicos e inorgânicos do efluente (TAMBOSI, 2008).

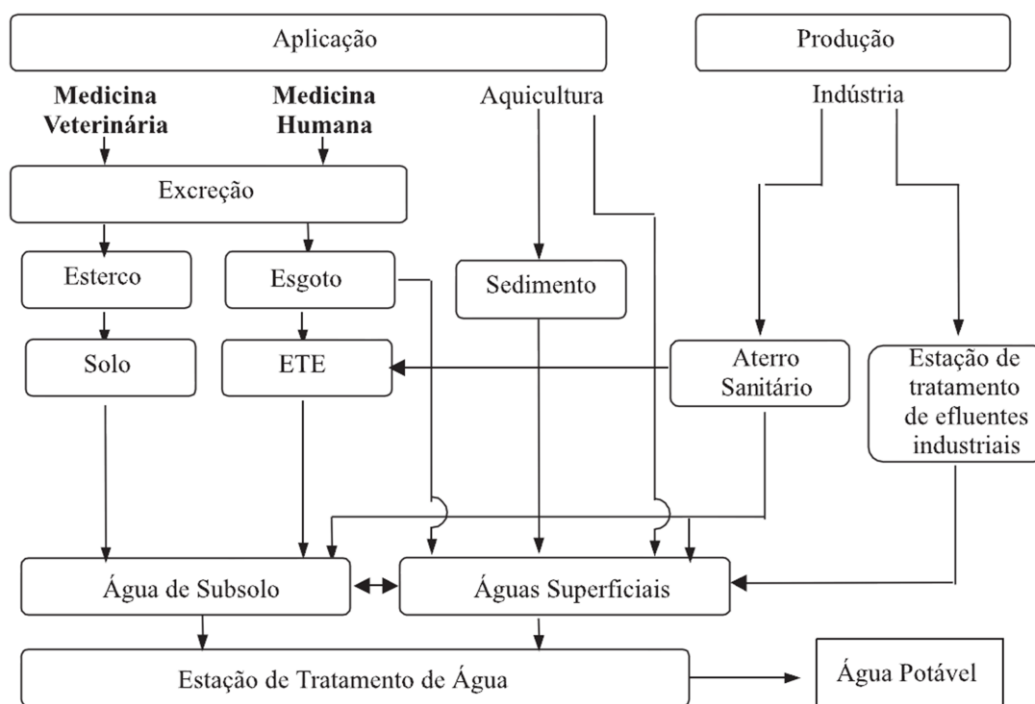
A origem da contaminação de corpos d'água por fármacos pode estar ligada aos esgotos domésticos e hospitalares, a lixiviados contaminados e a contribuição de resíduos industriais (AMINOV E MACKIE, 2007; STACKELBERG *et al.*, 2004; TERNES *et al.*, 2002). Embora alguns fármacos e seus metabólitos possam ser parcialmente removidos por meio da sorção e degradação biótica ou abiótica no meio ambiente, eles podem, eventualmente, atingir fontes de água potável (TAMBOSI, 2008). A presença de fármacos residuais e outros compostos xenobióticos na água potável é preocupante visto que pouco se sabe sobre os efeitos causados

pelo consumo, a longo prazo, de água contaminada por tais compostos (STACKELBERG *et al.*, 2004).

Estudos têm demonstrado que parte da contaminação provocada pelos poluentes emergentes pode estar vinculada a vazamentos que ocorrem nas redes de coleta de águas residuárias sendo que, a quantificação destes vazamentos ainda não é satisfatória (DE SILVA *et al.*, 2005; RUTSCH, 2008; ELLIS, 2009). A utilização de traçadores ambientais e poços de monitoramento tem sido uma alternativa para detectar os possíveis locais de infiltração e contaminação das águas subterrâneas por águas residuárias.

O comportamento e destino destas substâncias e seus metabólitos no ambiente aquático ainda não é bem conhecido. A baixa volatilidade desses compostos indica que sua distribuição no meio ambiente acontecerá principalmente por meio de transporte aquoso, mas também através da cadeia alimentar e dispersão. A Figura 2.2 apresenta um esquema que sugere possíveis caminhos de dispersão de fármacos, quando descartado no meio ambiente (BILA *et al.*, 2003).

**FIGURA 2.2 - Possíveis rotas dos fármacos no meio ambiente.**



Fonte: Bila, 2003.

De acordo com GEBHARDT e SCHRODER (2007); TAMBOSI (2008) e LÖFFLER *et al.*, (2005), a eficácia dos métodos tradicionais de tratamento não garantem uma redução significativa na concentração dos fármacos ou de seus metabólitos nos corpos d'água. Mesmo diante desse cenário, são poucos os trabalhos que abordam a contaminação de efluentes por

fármacos, sobretudo, os que analisam a importância de estudos ecotoxicológicos e identificam os produtos de transformação.

Essa situação é explicada pelo fato de que a investigação extensiva da ocorrência de fármacos no ambiente iniciou-se na década de 1990, com o aprimoramento dos métodos analíticos que possibilitaram determinar fármacos em concentrações de ng/L ou µg/L em matrizes aquosas, tais como esgotos, efluentes industriais, águas superficiais, subterrâneas e mesmo potável (LÖFFLER *et al.*, 2005, ORT *et al.*, 2010 e BAILLY *et al.*, 2013).

Dentre os fármacos frequentemente encontrados no meio ambiente destacam-se os antibióticos, sendo que no Brasil, aproximadamente, 40% de todos os medicamentos vendidos em farmácias pertencem a esta classe de fármacos. A grande importância da remoção dos antibióticos em sistemas de tratamento de efluentes e do meio ambiente se deve ao fato deles promoverem a resistência bacteriana, podendo causar o aparecimento de espécies de bactérias resistentes a vários antibióticos.

### **3.2 Escolha dos fármacos**

#### **3.2.1 Antibióticos**

Os antibióticos são substâncias químicas, naturais ou sintéticas, cuja finalidade é combater a ação de microrganismos patogênicos. Sua ação pode ser exercida através da inibição da multiplicação bacteriana (ação bacteriostática) ou através da *lise* celular bacteriana (ação bactericida). São amplamente utilizados e seu consumo anual foi estimado entre 100.000 e 200.000 t (KÜMMERER, 2003). Nos EUA, mais de 20.000 t de antibióticos são produzidos por ano sendo que cerca de 60% são utilizados para tratamento humano e 40% para uso veterinário (BROWN *et al.*, 2006).

Por se tratarem de compostos quimicamente estáveis estima-se que 50 a 90% dos antibióticos ingeridos sejam excretados de forma inalterada e passem a fazer parte do esgoto doméstico. Dependendo das quantidades utilizadas e da taxa de excreção, os antibióticos liberados no esgoto doméstico alcançam as estações de tratamento de esgoto (ETEs) e se não forem degradados chegam ao meio ambiente (KUMPEL *et al.*, 2001).

Outro aspecto importante é a utilização de antibióticos na criação de animais. Segundo PADILHA *et al.*, (2000) os antibióticos são estimulantes do crescimento, pois atuam no intestino selecionando a microflora intestinal e eliminando os microrganismos produtores de

toxinas. Isto faz com que ocorra uma melhora, em torno de 10%, no ganho de peso dos animais. Segundo CRESCE *et al.*, (2001) a utilização de antibióticos na criação de animais é mais frequente do que as indústrias revelam, sendo 40% superior ao estimado.

Nas ETEs municipais o tratamento usualmente utilizado é o tratamento biológico. Tal tratamento é incompatível com os compostos em questão pelo fato de serem tóxicos à biomassa e, portanto ocasionarem a diminuição da eficiência do processo de tratamento. Em determinados casos a aclimação da biomassa pode melhorar a eficiência, mas levará a formação de espécies resistentes o que poderá trazer riscos a saúde humana e modificação no ambiente aquático.

De acordo com LIU *et al.*, (2012) é crescente a preocupação sobre a exposição aos antibióticos presentes no meio ambiente, em longo prazo, não só em relação ao potencial tóxico aos organismos aquáticos e a seres humanos, mas também devido a seleção de bactérias resistentes a estes fármacos. Segundo HALLING-SORENSEN *et al.*, (1998) há indícios de que o desenvolvimento de resistência microbiana seja favorecido por baixas concentrações de antibióticos em águas.

Como afirmado pela Organização Mundial da Saúde, o aumento significativo de patógenos humanos com resistência a antibióticos é uma preocupação especial, não apenas no que diz respeito ao tratamento de doenças infecciosas, como também para outras patologias em que a profilaxia com antibióticos é necessária para evitar infecções oportunistas. Neste sentido, a propagação de bactérias resistentes significa que procedimentos médicos comuns, anteriormente consagrados, podem mostrar-se inúteis (OMS, 2000).

De acordo com MARTINEZ (2009), vários mecanismos permitem a manutenção e, eventualmente, disseminação de genes de resistência antibiótica em ecossistemas naturais, de modo que diferentemente da contaminação por antibióticos, a poluição por genes de resistência não desaparece com a extinção da contaminação.

Ainda de acordo com MARTINEZ (2009), com o objetivo de reduzir a seleção de bactérias resistentes à antibióticos a União Europeia banuiu o uso de antibióticos de relevância humana na agropecuária em 1998. Estes antibióticos eram utilizados como estimulantes de crescimento animal. Em 2006 a proibição foi estendida para todos os antibióticos e compostos afins. De maneira similar, vários países restringiram o uso de antibióticos na aquicultura, incluindo em suas legislações restrições à utilização destes fármacos, que são úteis no

tratamento de infecções humanas, na agropecuária. Por exemplo, a utilização de quinolonas para aquicultura foi proibido, isso porque esses antibióticos podem permanecer ativos em sedimentos por longos períodos e a resistência a um membro da família deste fármaco, geralmente confere resistência a todas as quinolonas.

### 3.2.2 Resistência bacteriana

A resistência aos antibióticos é inevitável e irreversível. Trata-se de uma consequência natural de adaptação da célula bacteriana a exposição a este grupo de fármacos. O uso intenso de antibióticos na medicina, na produção de alimentos para animais e na agricultura tem causado um aumento da resistência bacteriana a estas drogas em todo mundo, sobretudo se a exposição acontecer em concentrações sub-inibitórias (BURRIDGE *et al.*, 2010; GUARDABASSI L & KRUSE H., 2010; XU *et al.*, 2014). Além disso, vários estudos têm demonstrado que a resistência bacteriana pode ser desenvolvida em estações de tratamento de águas residuárias que utilizam tratamento biológico como tecnologia de tratamento (BOUKI *et al.*, 2013).

A resistência antimicrobiana tornou-se o principal problema de saúde pública no mundo, afetando países desenvolvidos ou não. Ela é uma inevitável consequência do uso indiscriminado de antibiótico em humanos e animais (XU *et al.*, 2014). Na Europa e na América do Norte, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Streptococcus pneumoniae* não susceptível à penicilina (PNSSP), *Enterococos* resistente à vancomicina (VRE) e *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamase de espectro ampliado (ESBL) têm emergido e se espalhado nos hospitais e nas comunidades (CASADEVALL, 1996).

De acordo com LINDSEY *et al.*, (2001) o aumento da resistência bacteriana a antibióticos pode estar associado a exposição dos microrganismos a águas contaminadas mas se o código genético para resistência estiver armazenado no plasmídeo-R, essa resistência poderá ser transferida para gerações futuras causando um impacto ainda maior.

No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) publicou a Nota Técnica Nº1 de outubro/2010 que trata das medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes. De acordo com a Nota Técnica Nº1/2010 “*Microrganismos multirresistentes são microrganismos resistentes a diferentes classes de antimicrobianos testados em exames microbiológicos. Alguns pesquisadores também definem microrganismos pan-resistentes, como aqueles com resistência comprovada in vitro a todos os antimicrobianos testados em exame*

*microbiológico*”. Esta medida foi publicada devido ao aumento dos casos de enterobactérias resistentes aos antibióticos carbapenêmicos em vários centros brasileiros.

### 3.2.3 Fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas, como o ciprofloxacino, levofloxacino, norfloxacino e ofloxacina, fazem parte de um grupo de substâncias químicas sintéticas derivadas do ácido nalidíxico com atividade antimicrobiana. Possuem extensivas aplicações tanto na medicina humana quanto veterinária, sendo consideradas importantes armas no combate a organismos Gram-negativos e Gram-positivos, e as últimas gerações destes agentes antimicrobianos chegam a ser ativas contra as bactérias anaeróbias (SILVA *et al.*, 2010). Trata-se de potentes antibacterianos sintéticos indicados para tratamento de diversas infecções do trato urinário, gastrointestinal e da pele (MARKMAN *et al.*, 2005).

As fluoroquinolonas possuem atividades bactericidas que inibem, de forma irreversível, as reações bioquímicas essenciais à vida da bactéria. São classificadas de acordo com o espectro de ação em 1ª, 2ª, 3ª e 4ª gerações, Tabela 2.1.

**Tabela 2.1** - Classificação das quinolonas/fluoroquinolonas de acordo com o espectro de ação.

| Gerações      | Quinolona                                                         | Indicações                                                                                                         |
|---------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1ª            | Ácido Nalidíxico<br>Cinoxacino                                    | Infecções do trato urinário                                                                                        |
| 2ª (Classel)  | Lomefloxacino<br>Norfloxacino<br>Enoxacino                        | Infecções do trato urinário                                                                                        |
| 2ª (Classell) | Ofloxacino<br>Ciprofloxacino                                      | Infecções complicadas do trato urinário;<br>Gastroenterite com diarreia grave; Doenças sexualmente transmissíveis; |
| 3ª            | Levofloxacino<br>Esparfloxacino<br>Gatifloxacino<br>Moxifloxacino | Infecções complicadas do trato urinário;<br>Gastroenterite com diarreia grave; Doenças sexualmente transmissíveis; |
| 4ª            | Trovafloxacino                                                    | Infecções intra-abdominais.                                                                                        |

Fonte: OLIPHANT, 2002

Por se tratarem de compostos quimicamente estáveis, as fluoroquinolonas possuem baixa taxa de biodegradação e são excretadas, quase que totalmente, em sua forma inalterada. Segundo

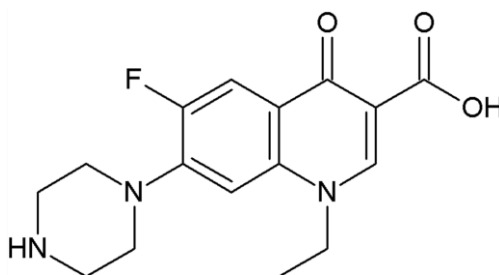
KÜMMERER *et al.*, (2000) e XU *et al.*, (2014), as fluoroquinolonas não são facilmente biodegradáveis e no meio ambiente seu mecanismo de remoção pode estar associado a adsorção no lodo durante processos de tratamentos biológicos. LINDBERG *et al.*, (2006) relataram que mais de 70% de ciprofloxacino e norfloxacinol foram detectadas após tratamento biológico e permaneceram adsorvidas ao lodo. Este estudo indicou que o lodo é o principal reservatório de fluoroquinolonas, e que estes antibióticos são potencialmente liberados para o meio ambiente através da aplicação de biossólidos em terrenos agrícolas (BELDEN *et al.*, 2007; CARDOZA *et al.*, 2005).

Por serem consideradas um fármaco de amplo espectro, o consumo de fluoroquinolonas cresce a cada ano. Na Polônia estima-se que foram consumidas 33 (trinta e três) toneladas deste fármaco no ano de 2012 e, levando em consideração os dados de 2011 e 2012, o consumo aumenta 4 (quatro) toneladas ao ano. A Polônia é a terceira colocada no ranking de consumo de fluoroquinolonas da Europa, estando atrás somente da Eslovênia e Eslováquia (EMA, 2013).

#### 3.2.3.1 Norfloxacinol

O antibiótico norfloxacinol ou norfloxacinol, Figura 2.3, é um bactericida potente de amplo espectro, utilizado principalmente no tratamento de infecções urinárias e pulmonares. Tem sido prescrito em excesso e sem necessidade, principalmente em pronto-atendimentos, onde o médico não acompanhará o caso do paciente e então opta por uma medicação mais potente.

**FIGURA 2.3** - Estrutura molecular do antibiótico norfloxacinol



### 3.2.4 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são antibióticos formados por dois ou mais açúcares aminados unidos por uma ligação glicosídica à uma hexose aminada (núcleo aminociclitol). Foram isolados pela primeira vez em 1944 por Waksman e seus colaboradores que, a partir do actinomicete (*Streptomyces griseus*), chegaram ao antibiótico estreptomicina.

Estruturalmente os aminoglicosídeos possuem radicais aminas ( $\text{NH}$ ) e hidroxilas ( $\text{OH}$ ), que conferem a estes compostos características básicas, elevada polaridade e solubilidade em água (ZEMBOWER *et al.*, 1998).

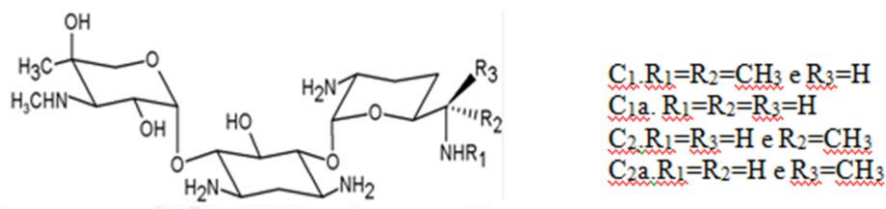
São antibióticos de grande interesse clínico devido a sua eficiência no tratamento contra bacilos Gram-negativos aeróbios, particularmente as *Enterobacteriaceae* e a *P. aeruginosa*. Geralmente são utilizados associados a outros antibióticos no tratamento de infecções graves (MONTEIRO *et al.*, 2001). Na medicina veterinária e na produção animal os aminoglicosídeos são largamente utilizados no tratamento de infecções comuns a bovinos e suínos, sendo frequentemente adicionados às rações por profilaxia e como promotores de crescimento (STEAD, 2000; PYÖRÄLÄ *et al.*, 2014).

O sulfato de gentamicina, amicacina, esteptomicina e a neomicina são representantes deste grupo de fármacos.

#### 3.2.4.1 Sulfato de Gentamicina

O sulfato de gentamicina, Figura 2.4, é um dos representantes mais expressivos dos aminoglicosídeos, sendo formado por uma mistura de substâncias C1, C1a, C2 e C2a.

**FIGURA 2.4** - Estrutura molecular do aminoglicosídeo sulfato de gentamicina



Por se tratar de um antibiótico de largo espectro, a gentamicina tem sido utilizada no tratamento de infecções sistêmicas graves provocadas por bacilos Gram-negativos.

### **3.3 Controle de antibióticos pela ANVISA – Resolução 44/2010**

A Resolução nº 44/2010, de 26 de outubro de 2010, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos.

De acordo com o Art. 2º da Resolução 44/2010 “*A dispensação de medicamentos a base de antimicrobianos de venda sob prescrição somente poderá ser efetuada mediante receita de controle especial, sendo a 1ª via - Retida no estabelecimento farmacêutico e a 2ª via - Devolvida ao Paciente, atestada, como comprovante do atendimento.*”

Com relação às prescrições de antibióticos o Art. 3º da referida resolução prevê que “*somente poderão ser dispensadas quando apresentadas de forma legível e sem rasuras, por profissionais devidamente habilitados e contendo as seguintes informações:*

*I - nome do medicamento ou da substância prescrita sob a forma de Denominação Comum Brasileira (DCB), dosagem ou concentração, forma farmacêutica, quantidade (em algarismos arábicos e por extenso) e posologia;*

*II - identificação do emitente: nome do profissional com sua inscrição no Conselho Regional ou nome da instituição, endereço completo, telefone, assinatura e marcação gráfica (carimbo);*

*III - identificação do usuário: nome completo;*

*IV - identificação do comprador: nome completo, número do documento oficial de identificação, endereço completo e telefone (se houver);*

*V - data da emissão; e*

*VI - identificação do registro de dispensação: anotação da data, quantidade aviada e número do lote, no verso.*

Tais medidas objetivam diminuir o uso de antibióticos, evitando o aparecimento de espécies de bactérias multirresistentes, principalmente no ambiente hospitalar. Os efeitos benéficos da medida estendem-se ao meio ambiente, já que acontecerá consequente diminuição na excreção desses medicamentos através da urina e fezes humanas. Além disto, ocorrerá

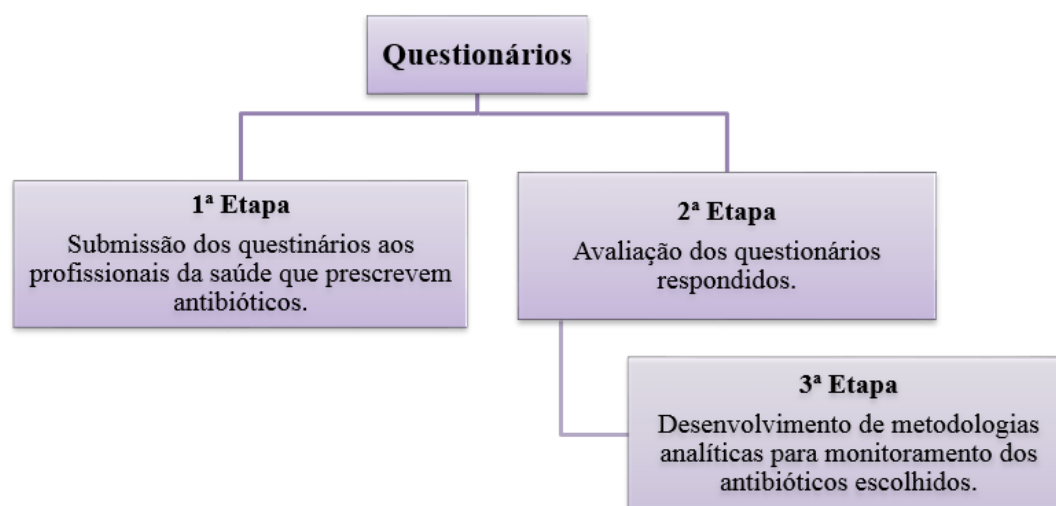
significativa diminuição da quantidade de medicamentos vencidos devido a não utilização por parte do paciente em tratamentos incompletos que não foram acompanhados pelo profissional da saúde. Outras legislações como o decreto-Lei nº 151/2005 e o regulamento (UE) N.º 37/2010 da Comissão de 22 de Dezembro de 2009 que apresentam regras para venda, administração e resíduos de antibióticos em animais também objetivam diminuir o uso indiscriminado de antibióticos evitando, assim, o aparecimento de bactérias resistentes.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Etapas do desenvolvimento metodológico

Na Figura 2.5 são apresentadas as etapas do desenvolvimento metodológico referente ao Capítulo 2.

**FIGURA 2.5** - Fluxograma demonstrando as etapas do desenvolvimento metodológico



### 4.2 Elaboração dos questionários

Tendo como objetivo o levantamento dos antibióticos mais utilizados, tanto para tratamento humano quanto animal e, portanto, os potenciais fármacos a serem encontrados no meio ambiente elaborou-se um questionário que foi enviado à profissionais autorizados a prescreverem esta medicação.

O questionário elaborado teve como principal objetivo a indicação de três princípios ativos, usualmente prescritos pelo profissional, e uma sucinta descrição da relevância deste fármaco nos tratamentos das enfermidades.

### 4.3 Submissão e avaliação dos questionários enviados a profissionais da saúde

Os questionários foram enviados por *email* ou entregues pessoalmente a 60 (sessenta) profissionais autorizados a prescreverem antibióticos sendo eles médicos, odontologistas e veterinários.

A escolha dos profissionais foi atrelada à disponibilidade para preencherem os questionários e ao envolvimento acadêmico que foi comprovado através de consulta ao Currículo Lattes.

A escolha dos princípios ativos, para estudo nessa pesquisa, levou em consideração as indicações presentes nos questionários, a possibilidade de aquisição do princípio ativo e o ineditismo do fármaco pesquisado com relação a outros trabalhos já descritos na literatura.

#### **4.4 *Desenvolvimento metodológico para monitoramento dos fármacos***

##### **4.4.1 Espectrofotometria de absorção molecular e determinação de carbono orgânico total**

Tendo sido escolhidos os antibióticos sulfato de gentamicina e norfloxacino, através das indicações dos questionários, foram desenvolvidas metodologias que permitissem monitorá-los durante os experimentos realizados.

Para o antibiótico norfloxacino foram realizadas varreduras de 200 - 900 nm utilizando espectrofotômetro Perkin Elmer, Lambda XL, onde foi determinado o comprimento de onda com máxima absorção e elaborada uma curva de calibração.

O antibiótico sulfato de gentamicina foi monitorado utilizando-se um Analisador de Carbono Orgânico Total (COT), marca Shimadzu, modelo TOC-V<sub>CPN</sub>, com amostrador automático ASI-V. O método baseia-se na dosagem da concentração de CO<sub>2</sub> formado através de oxidação via combustão da amostra a uma temperatura de aproximadamente 700°C. Para avaliação da concentração de CO<sub>2</sub> o equipamento utiliza detector de infravermelho não disperso (NDIR).

As alíquotas coletadas durante os experimentos foram filtradas em membrana de 0,45 µm de PVDF hidrofílico e acondicionadas em vials. Esses eram imediatamente levados ao laboratório para determinação da concentração de carbono orgânico dissolvido e realizadas medidas de absorvidade molar.

##### **4.4.2 Cromatografia líquida de alto desempenho e espectrometria de massa**

A fim de verificar a possibilidade do uso de cromatografia de alto desempenho na separação de uma mistura que continha o norfloxacino ou para separação e identificação de seus metabólitos, foram realizados testes para otimização da metodologia e concentração do analito presente na amostra.

Para otimização da metodologia utilizou-se um HPLC com detector UV/Vis Perkin Elmer Series 200 e uma coluna C<sub>18</sub> (Dados da coluna: comprimento 250 mm, diâmetro 4,6 mm, tamanho de partículas 5 µm, Perkin Elmer).

Trabalhou-se em temperatura ambiente utilizando uma vazão de 1mL/min com fase móvel composta por de 80 % ácido fosfórico (pH=2,8) e 20 % acetonitrila. A detecção do composto foi realizada no comprimento de onda de 273 nm e o volume de injeção utilizado foi de 20 µL. A solução de ácido fosfórico teve seu pH acertado para 2,8 utilizando-se trietilamina. A cromatografia líquida foi utilizada durante a realização dos ensaios de Fenton e foto-Fenton devido a uma faixa de absorção do sulfato ferroso muito próximo da região de absorção do norfloxacino.

Para identificação dos metabólitos/produtos de degradação foi utilizada cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa. A identificação dos metabólitos e produtos de degradação gerados nos ensaios de biodegradabilidade e por processos oxidativos avançados (Capítulos 3 e 4) foi realizada em parceria com ICRA (Catalan Institute for Water Research) localizado na cidade de Girona, Espanha durante a realização do Doutorado Sanduíche.

Já a identificação dos metabólitos gerados durante o processo de oxidação catalítica envolvendo porfirinas (Capítulo 5) foi realizada no Laboratório de Espectrometria de Massas da Escola de Engenharia da UFMG.

#### **4.4.3 Extração em fase sólida – Concentração e extração dos analitos**

Para a extração em fase sólida (EFS) foram utilizados cartuchos Oásis MCX. Os cartuchos foram condicionados passando-se 5 mL de acetonitrila e 5 mL de água ultra-pura em pH 3. Após o condicionamento, passou-se 50 mL de amostra sintética contendo 1,5 mg/L do fármaco norfloxacino. Em seguida, os analitos foram eluídos com 5 mL de acetonitrila.

A fim de comprovar a eficiência do cartucho e da fase móvel utilizada na eluição, repetiu-se este procedimento dez vezes. Em seguida os extratos foram enviados para determinação por cromatografia líquida de alto desempenho onde cada extrato foi injetado três vezes.

O sulfato de gentamicina não pode ser monitorado por HPLC\_UV/Vis devido à escassez de grupo cromóforos na molécula deste aminoglicosídeo.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Elaboração dos questionários

O questionário elaborado, Figura 2.6, continha um texto onde o problema em estudo foi apresentado, espaço para indicação de três princípios ativos e descrição de suas relevâncias nos tratamentos para os quais eram prescritos.

**FIGURA 2.6** - Questionário enviado aos profissionais da área de saúde autorizados a prescreverem antibióticos



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Escola de Engenharia  
**Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos**  
Avenida Antônio Carlos, 6627 - 4º andar - 31270-901 - Belo Horizonte -  
Brasil - Fone:

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Prezados Senhores,

Tendo em vista a pesquisa intitulada *“Biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia de antibióticos presentes no meio ambiente.”* contamos com sua colaboração na indicação de três princípios ativos que sejam amplamente prescritos e de relevância para medicina.

**Relevância da pesquisa:**  
A importância da biodegradabilidade anaeróbia e aeróbia dos fármacos no meio ambiente está no fato de que as estações de tratamento de efluentes (ETEs) utilizam processos biológicos aeróbios/anaeróbios para tratar o efluente sanitário e/ou industrial. E mesmo diante de um tratamento eficiente fármacos tem sido encontrados afluente e efluentes as ETEs demonstrando tratar de processos que não removem compostos mais refratários.

Uma vez que os processos convencionais de tratamento de água e efluentes são incapazes de eliminar completamente esses compostos persistentes, é necessário introduzir tecnologias avançadas adicionais de tratamento. Vale ressaltar que estas substâncias, mesmo em baixas concentrações, são biologicamente ativas e podem levar ao aumento da resistência bacteriana, alterando a biodiversidade e o equilíbrio de ecossistemas aquáticos. Além disso, a biodegradabilidade parcial dos compostos pode levar a metabólitos ainda mais tóxicos que o fármaco original.

Nome:  
Especialidade:  
Contato:

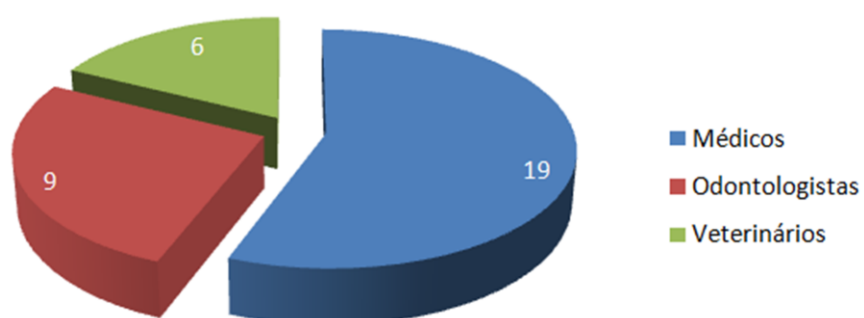
| Princípio Ativo | Relevância |
|-----------------|------------|
|                 |            |
|                 |            |
|                 |            |

Pesquisadora: MSc. Lucilaine Valéria de Souza Santos Fone:  
Email:  
Coordenadora da Pesquisa: Dr<sup>a</sup>. Liséte Celina Lange

## 5.2 Avaliação dos questionários

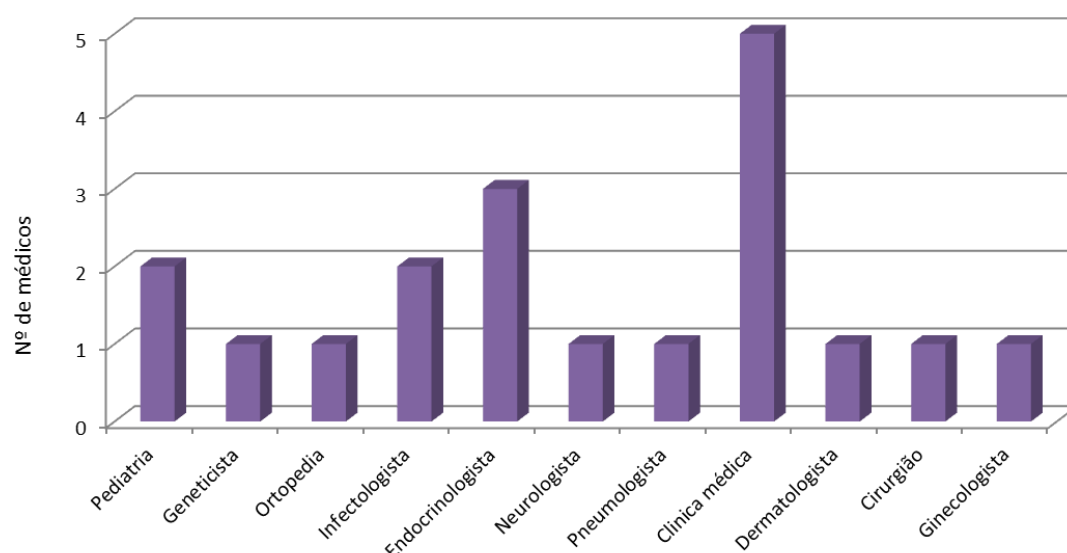
Dos 60 (sessenta) questionários enviados, 34 (trinta e quatro) retornaram contendo um total de 105 (cento e cinco) indicações de princípios ativos. Os documentos foram respondidos por médicos, odontologistas e veterinários de acordo com a Figura 2.7.

**FIGURA 2.7** - Profissionais que indicaram os princípios ativos estudados nesta pesquisa.



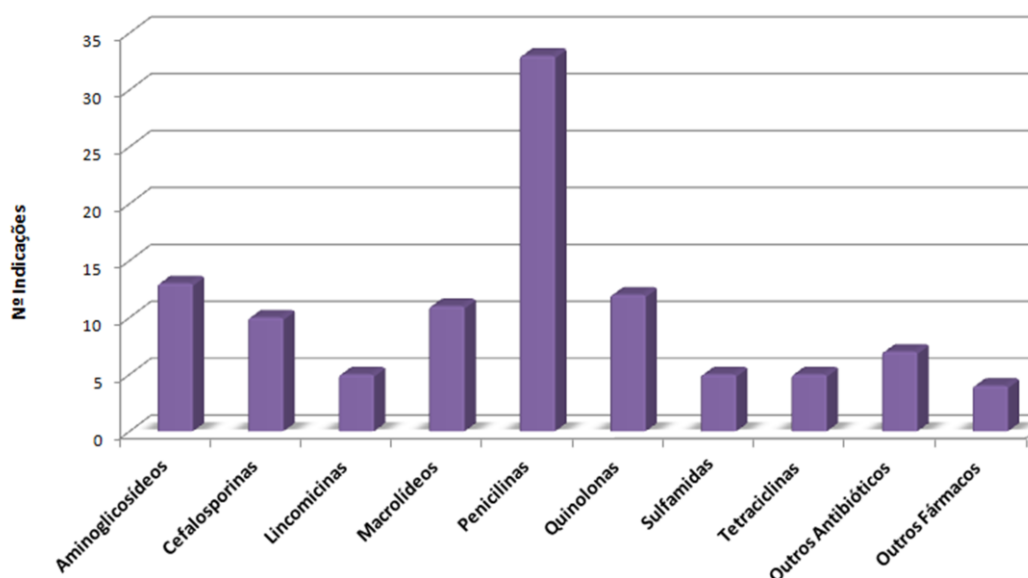
A maioria dos questionários que retornaram foram respondidos por médicos devido à contribuição dos profissionais que trabalham no Hospital João XXIII e dos professores da Escola de Medicina da UFMG. Na Figura 2.8 são identificadas as especialidades dos médicos que responderam aos questionários.

**FIGURA 2.8** - Especialidades dos médicos que responderam aos questionários.



Os princípios ativos indicados foram classificados de acordo com o grupo de antibiótico a que pertencem e são apresentados na Figura 2.9.

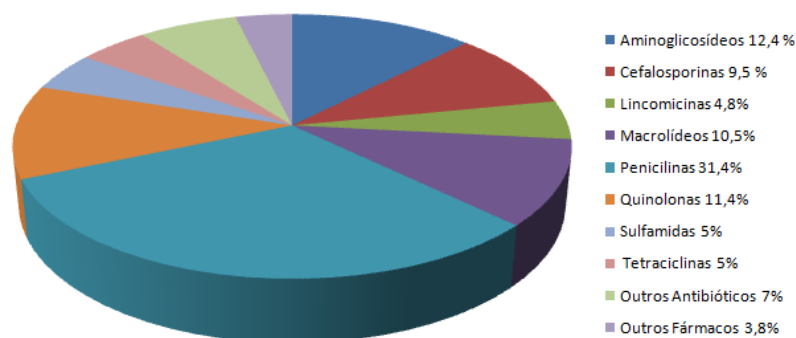
**FIGURA 2.9 - Fármacos indicados nos questionários aplicados**



Observou-se que os antibióticos mais indicados são compostos  $\beta$ -lactâmicos, das quais fazem parte as penicilinas e as cefalosporinas. Os  $\beta$ -lactâmicos constituem a primeira classe de derivados de produtos naturais utilizados no tratamento terapêutico de infecções bacterianas. Mesmo após várias décadas de descoberta da penicilina, este grupo ainda contém os agentes mais comumente utilizados (GUIMARÃES *et al.*, 2010). Em 2004 este grupo de fármacos correspondeu aos antibióticos mais vendidos em todo o mundo (VON NUSSBAUM *et al.*, 2006).

Embora 40,9% dos fármacos indicados, Figura 2.10, pertençam aos grupos das cefalosporinas e penicilinas, neste trabalho eles não serão estudados. De acordo com CAHILL *et al.*, (2004); CHA *et al.*, (2006); COSTANZO *et al.*, (2005); WATKINSON *et al.*, (2007); e ZUCCATO *et al.*, (2005), trata-se da série de antibióticos mais indicada mas que somente são detectadas em concentrações extremamente baixas devido à instabilidade do anel  $\beta$ -lactâmico presente na molécula deste grupo de compostos. Desta forma, trata-se de compostos que apresentam alta biodegradabilidade e que, portanto, podem ser removidos por processos convencionais de tratamento.

**FIGURA 2.10** - Percentagem de indicação dos antibióticos



Os próximos grupos com maior quantidade de indicações foram os aminoglicosídeos (12,4%) e as quinolonas (11,4%). Esses foram, portanto, os grupos selecionados para esse estudo.

Dentre os aminoglicosídeos e fluoroquinolonas foram escolhidos o sulfato de gentamicina e o norfloxacino, respectivamente. A escolha dos princípios ativos levou em consideração as indicações presentes nos questionários, possibilidade de aquisição do princípio ativo e ineditismo do fármaco pesquisado com relação a outros trabalhos já descritos na literatura.

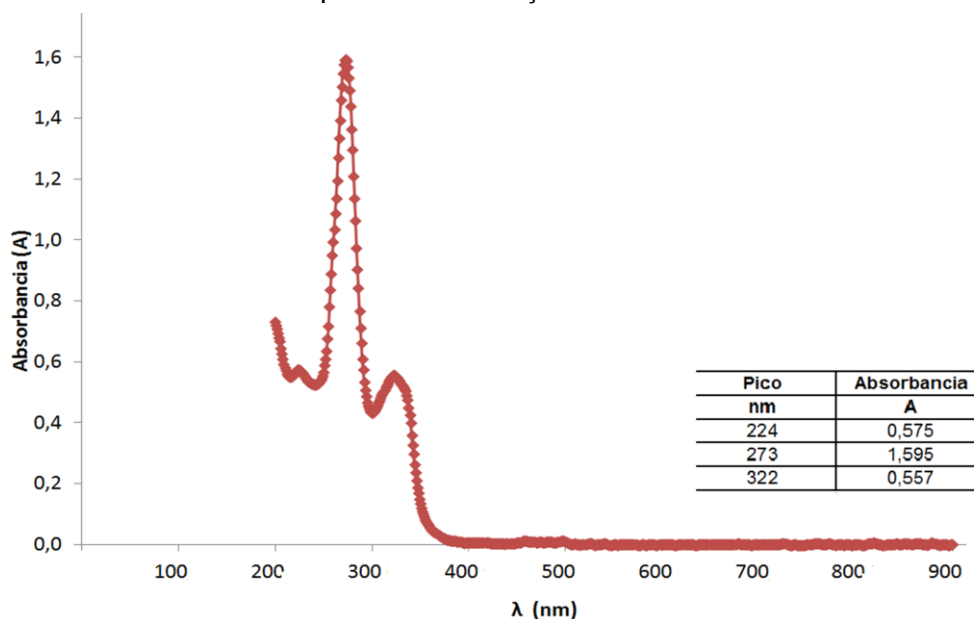
### **5.3 Monitoramento dos fármacos em estudo**

#### **5.3.1 Espectrofotometria de absorção molecular**

Na Figura 2.11 é apresentado o espectro de absorção do antibiótico norfloxacino. Observa-se que o composto absorve em três comprimentos de onda distintos, possuindo um máximo de absorção em 273 nm.

Preferencialmente será utilizado o comprimento de onda de máxima absorção para monitoramento do norfloxacino. Quando houver interferências por outras espécies químicas que também absorvam neste comprimento de onda será feita a opção por um comprimento de onda menos sensível.

**FIGURA 2.11** – Espectro de absorção do antibiótico norfloxacino.



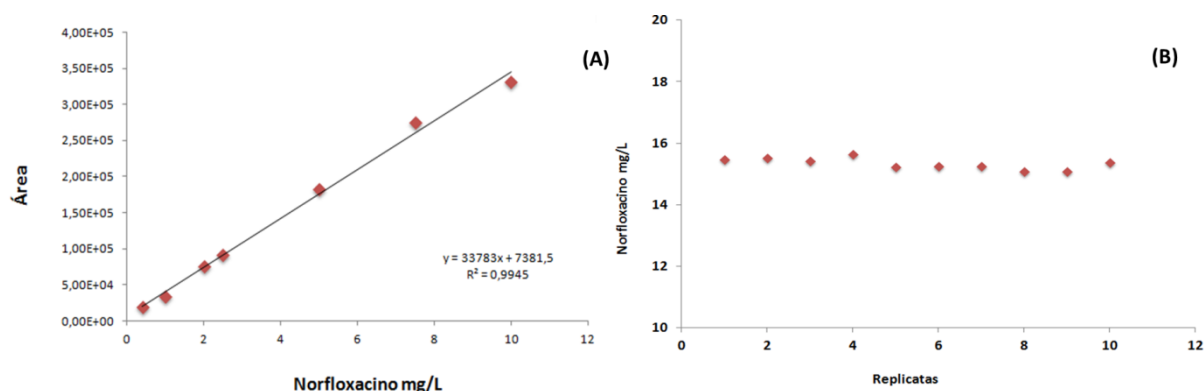
Para o antibiótico sulfato de gentamicina não foram observados picos de absorção. Segundo a Farmacopeia Portuguesa (2005) e Europeia (2005), o sulfato de gentamicina pode ser determinado por cromatografia líquida de fase reversa, porém utilizando-se um detector amperométrico com eletrodo de ouro. A Farmacopeia Americana (2005) reporta a utilização de cromatografia líquida de fase reversa com detector por ultravioleta, porém utilizando derivatização com o-ftaldeído.

Devido à impossibilidade da utilização dos métodos indicados pelas farmacopeias, o monitoramento foi realizado por determinação de carbono orgânico total e espectrometria de massas.

### 5.3.2 Cromatografia líquida de alto desempenho e extração em fase sólida

A curva obtida após a otimização da metodologia é apresentada na Figura 2.12 A. Esta curva foi adaptada ao longo dos ensaios de forma a atender as faixas de concentrações trabalhadas.

**FIGURA 2.12** - Desenvolvimento metodológico para o antibiótico norfloxacin. (a) Curva de calibração do antibiótico obtida em 273 nm e (b) Validação da metodologia de extração utilizando de cartuchos C<sub>18</sub>.



Trata-se de uma metodologia que poderá detectar concentrações até 15 mg/L, que corresponde a solubilidade máxima de norfloxacin em água. Com relação ao limite de detecção da metodologia, observa-se valores estáveis até 0,5 mg/L. Concentrações inferiores a este valor foram mensuradas através da concentração da amostra utilizando cartuchos Oasis MCX ou utilização de espectrometria de massa.

Na Figura 2.12 B são apresentados os resultados obtidos nas extrações utilizando cartuchos C<sub>18</sub> e a técnica de cromatografia líquida de alto desempenho para determinação e quantificação do antibiótico norfloxacin.

As dez extrações tiveram boa precisão e exatidão, apresentando uma média de 15,33 mg/L e desvio padrão de 0,19. Portanto, trata-se de uma técnica robusta que poderá ser utilizada para concentrar e quantificar o antibiótico em estudo.

## 6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados encontrados neste capítulo conclui-se que:

Embora o grupo de antibiótico mais indicado pela pesquisa tenha sido os que pertencem ao grupo das penicilinas o estudo destes compostos não será realizado devido a relatos na literatura de sua biodegradabilidade. No entanto, sugere-se um estudo detalhado dos produtos de degradação formados após a utilização de tratamento biológico. Tais compostos podem conferir toxicidade ao efluente tratado.

A quantificação do antibiótico norfloxacino por UV/Vis é uma alternativa rápida e viável e deverá, neste estudo, ser considerada a primeira metodologia de monitoramento. Uma segunda metodologia somente será empregada quando compostos utilizados ou formados durante as etapas de tratamento interferir na leitura ou a metodologia não possuir limite de detecção para quantificação.

Para monitoramento do sulfato de gentamicina foi utilizada a metodologia para determinação de carbono orgânico total e para isso foram utilizadas maiores concentrações deste fármaco visando minimizar os erros inerentes a metodologia.

# Capítulo 3

---

Biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia dos  
antibióticos norfloxacino e sulfato de  
gentamicina

## 1. INTRODUÇÃO

A pesquisa realizada no *Capítulo 2* demonstrou que os antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina são amplamente utilizados em nosso país. Levando em consideração que a maior parte dos fármacos consumidos é excretada de forma inalterada pelo organismo, torna-se relevante uma pesquisa aprofundada sobre o comportamento destes fármacos frente aos tratamentos usualmente empregados nas estações de tratamento de efluentes (ETE).

Nas estações de tratamento de efluentes vários processos biológicos podem ser utilizados. Cada tratamento possui características específicas o que faz com que tenham eficiências de remoções variadas em relação a um mesmo composto orgânico. Estas variações de eficiência podem estar ligadas às características da biomassa, disponibilidade de alimento, temperatura, pH, dentre outros fatores.

Diante do exposto, o *Capítulo 3* objetiva estudar o comportamento dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina quando se utiliza tratamento biológico aeróbio e anaeróbio. Além disto, o presente trabalho avaliará o efeito da aclimação da biomassa na eficiência de remoção destes fármacos.

Devido a possibilidade de formação de metabólitos, que podem ser mais tóxicos que o fármaco de origem, foi avaliada a toxicidade dos fármacos antes e após cada tratamento biológico utilizando *Allivibrio fischeri*.

Ao final do Capítulo 3 sugere-se a utilização de outras formas de tratamento visto que, os resultados encontrados durante o processo de biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia demonstraram que tanto o norfloxacino, quanto o sulfato de gentamicina não são eficientemente removidos pelos processos biológicos estudados.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 *Objetivo geral*

Avaliar a eficiência dos processos de tratamento biológico na biodegradabilidade dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina.

### 2.2 *Objetivos específicos*

- ✓ Avaliar a contribuição do borbulhamento de O<sub>2</sub> na degradabilidade dos compostos norfloxacino e sulfato de gentamicina;
- ✓ Avaliar a biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia dos antibióticos.
- ✓ Avaliar a toxicidade dos fármacos antes e após tratamento biológico utilizando o teste com *Allivibrio fischeri*;
- ✓ Identificar os principais metabólitos gerados durante a biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 *Tratamentos convencionais de efluentes na remoção de resíduos contendo fármacos*

Os métodos convencionais de tratamento de efluentes removem matéria orgânica por meio de reações bioquímicas e podem envolver, tanto microrganismos aeróbios, quanto anaeróbios. Estes processos buscam simular os processos naturais de decomposição da matéria orgânica, que ocorrem nos cursos d'água após o lançamento de um efluente. Objetivando melhorias na eficiência deste tipo de tratamento, novas etapas têm sido incorporadas aos sistemas. Um exemplo é o tratamento terciário ou “polimento”, que objetiva uma remoção adicional de poluentes antes do lançamento do efluente no corpo receptor.

Mesmo diante de um tratamento considerado eficiente alguns compostos orgânicos, recalcitrantes ou tóxicos a biomassa, como os fármacos, têm sido encontrados após o tratamento biológico. Segundo TERNES (1998), um balanço realizado entre as concentrações de fármacos na entrada e saída das plantas de tratamento de esgoto, revelou que durante o tratamento nem todos os fármacos são completamente removidos. Esta capacidade limitada para remoção ou destruição destes compostos recalcitrantes pode estar atrelada a ausência de enzimas específicas capazes de degradá-los. Estes fármacos, que não são realmente biodegradáveis, atingem os corpos receptores pelo descarte dos efluentes das ETEs, além de chegarem às plantações através do lodo quando aplicado como fertilizante (TERNES *et al.*, 2004).

A eficiência de remoção de um poluente também pode estar ligada a habilidade desta substância em interagir com as partículas sólidas, tanto naturais (argila, sedimentos, microrganismos), como as que são adicionadas ao efluente (carvão ativado, coagulantes). Essa interação determina a facilidade ou não de remoção desses compostos por processos físico-químicos (coagulação, floculação) ou processos biológicos (biodegradação).

Desta forma, verifica-se que aqueles compostos com coeficiente de adsorção baixo permanecerão na fase aquosa. No caso dos antibióticos sua permanência no meio ambiente gera preocupação devido à possibilidade da seleção de bactérias resistentes.

Sabe-se que o potencial de remoção dos antibióticos durante o processo de tratamento convencional é variável e depende do composto em questão. Durante o tratamento, os

antibióticos podem ser transformados ou removidos da fase aquosa por meio de hidrólise, biotransformação ou sorção nos lodos primários e secundários (LE-MINH *et al.*, 2010). Na Tabela 3.1 são apresentadas constantes de sorção ( $K_d$ ) de alguns antibióticos que apresentam afinidade com o lodo.

**Tabela 3.1** - Constantes de sorção de alguns antibióticos pelo lodo

| Composto       | Log $K_d$ | Condições      | Referência                      |
|----------------|-----------|----------------|---------------------------------|
| Sulfapiridina  | 2,3-2,6   | Lodos Ativados | (Gobel <i>et al.</i> , 2005b)   |
| Sulfametaxazol | 0,8-1,8   | Lodo Digerido  | (Carballa <i>et al.</i> , 2008) |
|                | 2,1-2,6   | Lodos Ativados | (Gobel <i>et al.</i> , 2005b)   |
|                | 2,2-2,7   | Lodos Ativados | (Joss <i>et al.</i> , 2005)     |
| Trimetoprim    | 2,2-2,6   | Lodos Ativados | (Gobel <i>et al.</i> , 2005b)   |
| Roxitromicina  | 1,1-1,9   | Lodo Digerido  | (Carballa <i>et al.</i> , 2008) |
|                | 2,2-2,7   | Lodos Ativados | (Joss <i>et al.</i> , 2005)     |
| Azitromicina   | 2,5-2,7   | Lodos Ativados | (Gobel <i>et al.</i> , 2005b)   |
| Claritromicina | 2,5-2,6   | Lodos Ativados | (Gobel <i>et al.</i> , 2005b)   |
| Norfloxacino   | 4.2       | Lodos Ativados | (Gobel <i>et al.</i> , 2005b)   |
| Ciprofloxacino | 4.3       | Lodos Ativados | (Gobel <i>et al.</i> , 2005b)   |
| Tetraciclina   | 3.9       | Lodos Ativados | (Kim <i>et al.</i> , 2005)      |

FONTE: Le-Minh, 2010.

Quanto maior  $K_d$  maior será a afinidade do composto pelo lodo e, portanto, menor a concentração encontrada em fase aquosa (LE-MINH *et al.*, 2010). Observa-se, portanto, que a eficiência de um processo de tratamento que contenham fármacos deve levar em consideração não somente a concentração do composto presente na fase aquosa após o tratamento, mas também, a quantidade adsorvida ao lodo formado.

### 3.1.1 Biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia dos fármacos

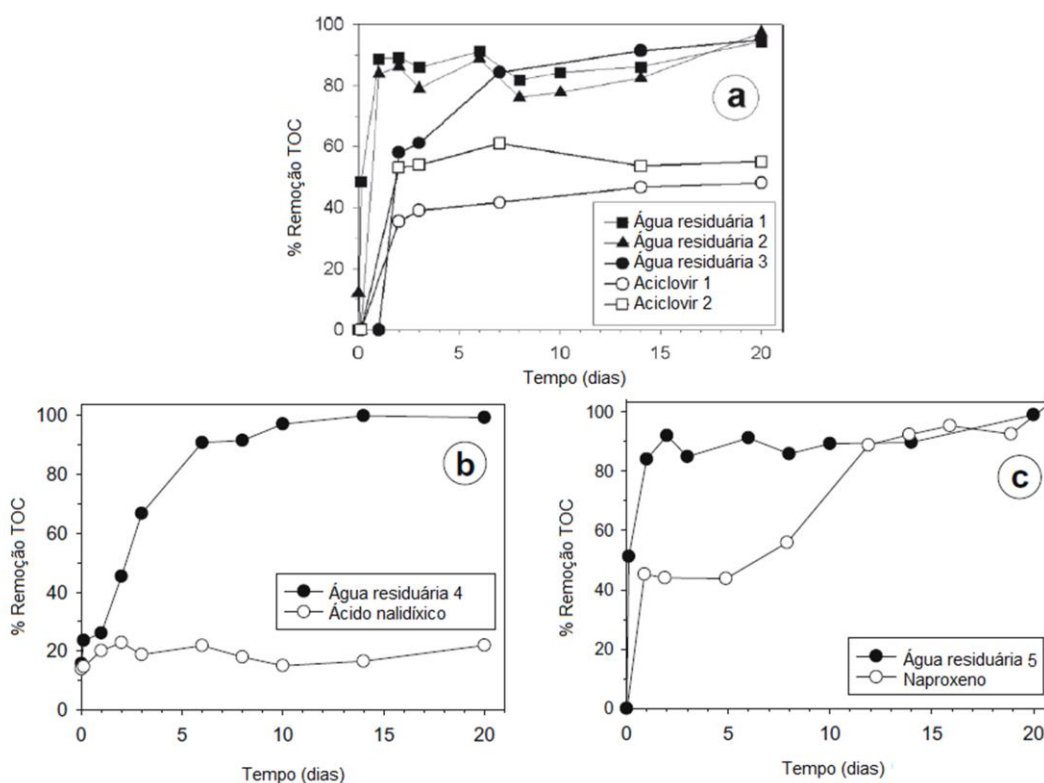
A avaliação da capacidade de remoção de fármacos por processos biológicos de tratamento é de fundamental importância, pois são tratamentos amplamente utilizados para tratar efluentes domésticos e industriais. A indicação de outra forma de tratamento deve, primeiramente, levar em consideração a eficiência do tratamento já empregado.

ZWIENER e FRIMMEL (2003) avaliaram o comportamento do ácido clofíbrico, ibuprofeno e diclofenaclo de potássio em uma estação de tratamento de esgoto piloto, operando com reatores aeróbios e anaeróbios durante 50 horas. Ambos os processos utilizados foram considerados eficientes. O tratamento anaeróbio reduziu entre 60-80% da concentração inicial

dos três fármacos. A degradação do ibuprofeno foi observada imediatamente após o início do teste revelando a capacidade inerente do lodo para degradá-lo sem a necessidade de uma fase de aclimação da biomassa. Utilizando o processo aeróbio os valores de redução foram na ordem de 95% após trinta horas.

MASCOLO *et al.*, (2010) avaliaram a biodegradabilidade aeróbia dos fármacos naproxeno (anti-inflamatório não esteroide), aciclovir (antiviral) e ácido nalidíxico (antibiótico da família das fluoroquinolonas). Os testes foram realizados de acordo com a metodologia proposta por Zahn-Wellens e apresentaram resultados variáveis dependendo da espécie estudada, Figura 3.1 e 3.2. Neste estudo foi verificado que tanto o naproxeno quanto o aciclovir podem ser considerados biodegradáveis com remoções de COT acima de 80%. Já o ácido nalidíxico demonstrou ser bastante recalcitrante com remoções inferiores a 40%.

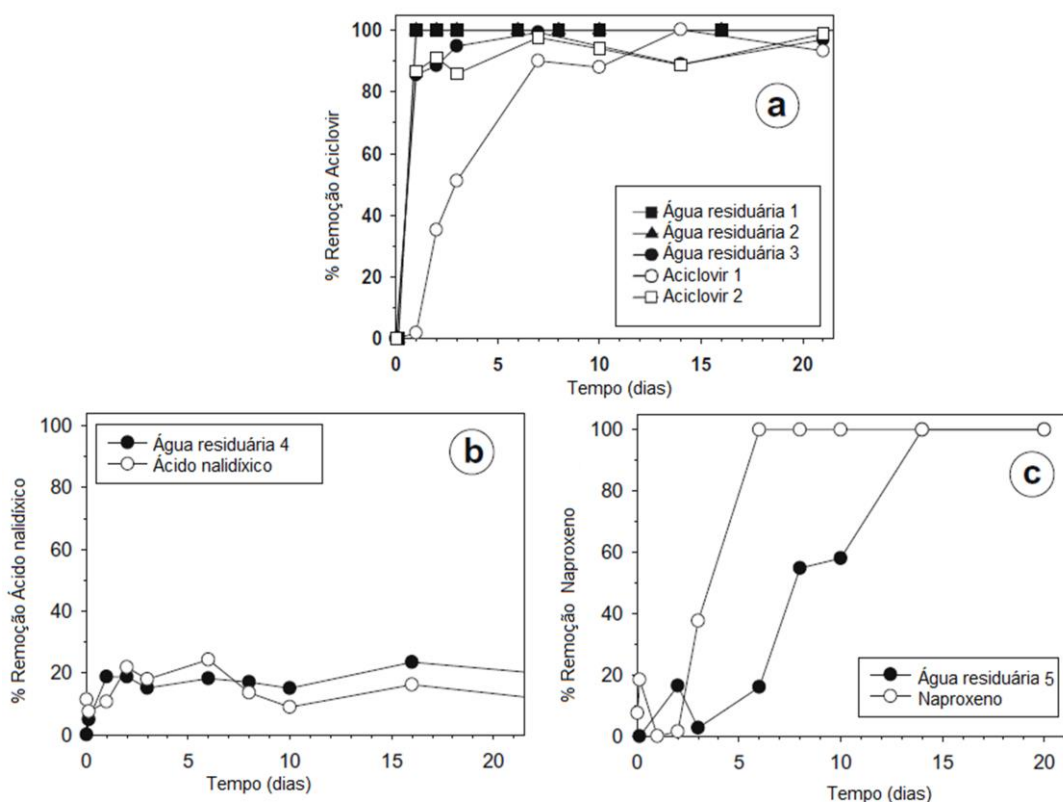
**FIGURA 3.1** - Remoção de COT durante o teste Zahn-Welless para efluentes da síntese dos fármacos (a) aciclovir (b) ácido nalidíxico (c) naproxeno e soluções sintéticas preparadas a partir de seus sais.



FONTE: Mascolo, 2010.

Neste estudo foi avaliada a biodegradabilidade aeróbia de cada solução que continha o fármaco e a biodegradabilidade dos efluentes gerados durante o processo de síntese de cada composto.

**FIGURA 3.2** - Remoção dos fármacos (a) aciclovir, (b) ácido nalidíxico e (c) naproxeno em efluentes do processo de síntese e soluções sintéticas preparadas a partir de seus sais durante o teste Zahn-Welless.



FONTE: Mascolo, 2010.

OROZCO *et al.*, (2013) e BUSER *et al.*, (1998) mostraram que a decomposição biológica de vários compostos aumenta com a idade do lodo. Isto se deve ao fato de ocorrer uma seleção natural entre os organismos presentes, fazendo com que alguns gêneros específicos de bactérias cheguem a concentrações relevantes no sistema. Outro fator pode estar vinculado à versatilidade que possuem alguns microrganismos em diversificarem suas atividades metabólicas em resposta à baixa disponibilidade de substrato. Neste caso, um aumento na remoção dos fármacos pode ser explicado devido ao alargamento do espectro enzimático e não necessariamente à comunidade microbiana presente (TERNES *et al.*, 2004).

LAJEUNESSE *et al.*, (2012) investigaram o comportamento de 14 (quatorze) antidepressivos e um anticonvulsivo durante o tratamento de efluentes utilizando 5 (cinco) tratamentos biológicos diferentes em ETES no Canadá. As concentrações dos fármacos foram determinadas afluentes e efluentes as ETES, dos quinze compostos pesquisados, treze foram detectados após o tratamento biológico. Os resultados demonstraram que as ETES possuíam

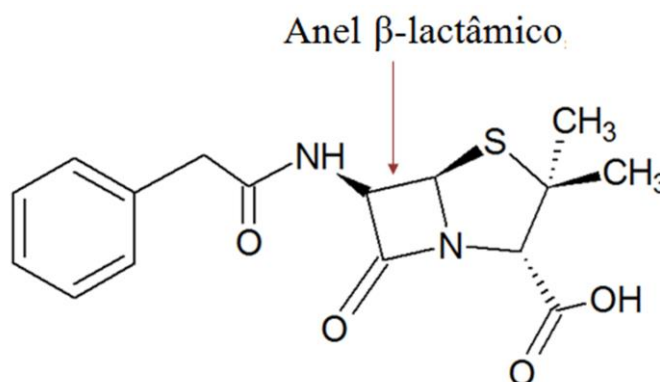
capacidade moderada na remoção dos compostos e que, portanto novas tecnologias de tratamento deveriam ser adicionadas aos processos.

### 3.1.2 Comportamento dos antibióticos durante o tratamento biológico

O efeito da exposição continua a antibióticos presentes no meio ambiente ainda é desconhecido, mas as preocupações quanto a possibilidade de aparecimento de bactérias resistentes tem levado a estudos sobre o lançamento de antibióticos no meio ambiente.

Os estudos realizados por LI *et al.*, (2008a) demonstraram a ocorrência de Penicilina G em concentrações de 153 mg/L no esgoto bruto e 1,68 mg/L em efluente biologicamente tratado. Uma série de estudos tem relatado que a presença de  $\beta$ -lactâmicos, como as penicilinas e cefalosporinas, não são geralmente detectadas em amostras de águas residuárias tratadas ou estão presentes em concentrações muito baixas, apesar de serem os antibióticos mais prescritos mundialmente (CAHILL *et al.*, 2004; CHA *et al.*, 2006; COSTANZO *et al.*, 2005; WATKINSON *et al.*, 2007; ZUCCATO *et al.*, 2005). As baixas concentrações detectadas destes antibióticos em efluentes se deve ao fato de possuírem em suas moléculas o anel  $\beta$ -lactâmico, Figura 3.3, que confere instabilidade a molécula. Trata-se de um anel de quatro membros e, portanto, tensionado que não resiste a variações de pH. Após o rompimento deste anel a molécula perde sua característica antimicrobiana e passa a ser considerada biodegradável.

**FIGURA 3.3** - Estrutura do antibiótico Penicilina G



LINDBERG *et al.*, (2005) demonstraram que as fluoroquinolonas são os antibióticos mais frequentemente detectados em efluentes e que na maioria das vezes estão acima do limite de quantificação. Em outros estudos realizados por LINDBERG *et al.*, (2006) os antibióticos norfloxacin e ciprofloxacin foram detectados em 97% e o ofloxacin em 50% das amostras

analisadas. Os estudos de MASCOLO *et al.*, (2010) corroboram com os dados supra citados visto que, concluíram que o ácido nalidíxico, uma quinolona, não poderia ser considerado biodegradável pois foi observada uma remoção de apenas 40% deste composto quando utilizado tratamento biológico aeróbio.

Já os agentes antimicrobianos classificados como macrolídeos possuem uma taxa de excreção superior a 60% em sua forma inalterada. Isto indica que o esgoto doméstico deve possuir concentrações elevadas de macrolídeos principalmente em países em que esta classe de antibiótico é altamente prescrita (GOBEL *et al.*, 2005). HIRSCH *et al.*, (1999) relataram que os macrolídeos foram encontrados em todas as ETES investigadas na Alemanha em concentrações acima de 100 ng.L<sup>-1</sup>.

Mesmo diante de processos considerados eficiente na remoção de compostos orgânicos sabe-se que os efluentes domésticos e industriais, sobretudo os oriundos da indústria farmacêutica, são o caminho de entrada de produtos farmacêuticos no ambiente (HAWKSHEAD, 2008; NAGARNAIK *et al.*, 2012).

### **3.2 Efeitos tóxicos provocados pelos fármacos no meio ambiente**

Os fármacos são projetados para atuarem em vias metabólicas e moleculares específicas de humanos e animais, mas frequentemente exibem efeitos colaterais importantes. Quando introduzidos no meio ambiente podem afetar organismos que tenham estruturas similares aos humanos, bem como organismos com estruturas distintas, em que os mecanismos de ação desses químicos são desconhecidos (FENT *et al.*, 2006).

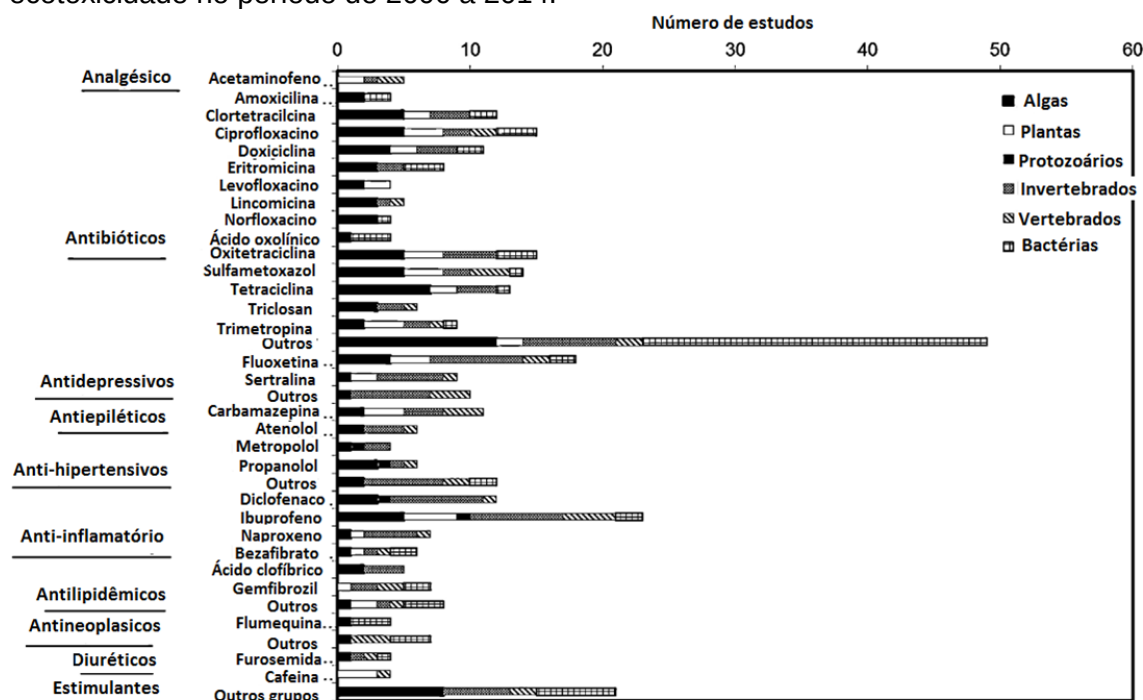
Nesse sentido, QUINN *et al.*, (2008) avaliaram o potencial tóxico de 11 (onze) fármacos sobre a cnidária *Hydra attenuata*, um microrganismo invertebrado existente nas águas doces da Europa, da Ásia e nas Américas. Os autores observaram que a regeneração do microrganismo foi inibida nas concentrações de 0,1; 5 e 1 mg/ L de genfibrozil, ibuprofeno e naproxeno, respectivamente. Por outro lado, a carbamazepina e os antibióticos sulfapiridina e oxitetraciclina estimularam a regeneração da cnidária quando aplicados em concentrações de 25, 5 e 50 mg/L, respectivamente.

Dados que corroboram com os citados são os de GUNNARSSON *et al.*, (2009), que avaliaram o efeito de exposição de efluente industrial altamente diluído (1:500) na espécie de peixe Truta Arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Os resultados mostraram influência na

expressão gênica e atividade enzimática do animal, como também na função hepática, renal, na atividade do citocromo P450 1A e alterações nos níveis de fosfato no plasma sanguíneo.

Buscando conhecer com mais clareza os efeitos de medicamentos em organismos no meio ambiente, são feitos testes ecotoxicológicos. Na Figura 3.4 é apresentada uma relação dos estudos já realizados com fármacos entre o período de 2000 a 2014.

**FIGURA 3.4** - Relação de fármacos e organismos já utilizados durante ensaios de ecotoxicidade no período de 2000 a 2014.

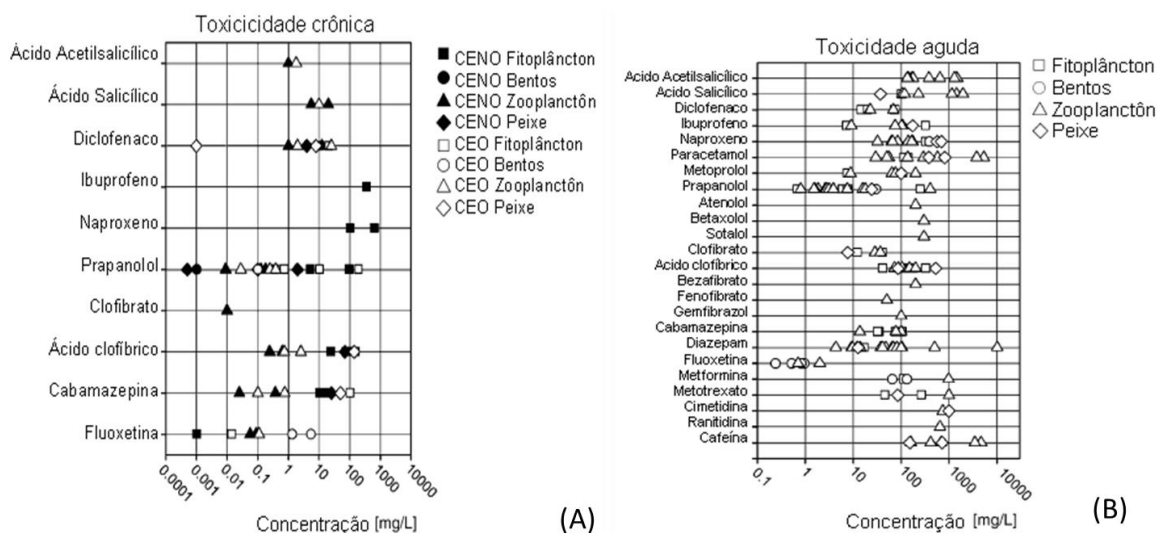


Fonte: VASQUEZ *et al.*, (2014).

De acordo com FENT *et al.*, (2006), os testes de toxicidade aguda que comparam diferentes níveis tróficos, sugerem que algas são mais sensíveis ao contato com fármacos que a *Daphnia magna*, seguidos pelos peixes. Os mesmos estudos demonstram, ainda, que as classes mais tóxicas de fármacos são antidepressivos, antibióticos e antipsicóticos. No entanto, a ação desses compostos apresenta efeitos variáveis entre os diversos filões de seres vivos. Já com relação à toxicidade crônica, os experimentos são escassos. São raros os trabalhos que buscam identificar os principais efeitos provocados pela exposição de fármacos em longo prazo ou consequências nos diferentes estágios do ciclo de vida dos organismos (FENT *et al.*, 2006). A Figura 3.5 mostra dados de toxicidade crônica e aguda compilados por FENT *et al.*, (2006) e também permite observar o amplo espectro de variação do efeito dos fármacos entre indivíduos de espécies diferentes. Evidencia, ainda, a elevada toxicidade de fármacos como a fluoxetina, que em concentrações inferiores ou próximas a 1 mg/L é capaz de causar efeito

deletério em testes de toxicidade aguda com fitoplâncton, zooplâncton, organismos bentônicos e peixes.

**FIGURA 3.5** - (a) Toxicidade aguda de 24 fármacos, expressada em valores de  $CE_{50}$  ou  $CL_{50}$  para diferentes tipos de organismos. (b) Toxicidade crônica de 10 fármacos, expressada em valores de Concentração de Efeito Não Observado (NOEC) e Concentração de Efeito Observado (LOEC).



Fonte: Adaptado de FENT *et al.*, (2006).

### 3.3 Ensaios ecotoxicológicos

Os testes ecotoxicológicos são métodos utilizados para detectar e avaliar a capacidade inerente do agente tóxico em produzir efeitos danosos em organismos vivos.

Nos países da União Europeia há normas que já exigem análises de ecotoxicidade para o monitoramento ambiental. Amplamente utilizado para diversos fins, esses testes levam em consideração o sinergismo ou antagonismo entre substâncias químicas, mensurando seus respectivos efeitos nos mais diversos ecossistemas (SILVA *et al.*, 2011).

#### 3.3.1 Tipos de testes ecotoxicológicos

Os testes de toxicidade podem ser classificados em agudos e crônicos. Esses testes diferem na duração e nas respostas finais avaliadas.

### 3.3.1.1 Teste de toxicidade aguda

Os testes de toxicidade aguda avaliam uma resposta severa e rápida dos organismos a um estímulo que se manifesta, em geral, em um intervalo de 0 a 96 h (RAND e PATROCELLI, 1985). Os efeitos tóxicos medidos em testes de toxicidade aguda incluem qualquer resposta exibida por um organismo-teste ou população resultante de um estímulo químico. Normalmente, o efeito observado é a letalidade ou alguma outra manifestação do organismo que a antecede como, por exemplo, o estado de imobilidade (COSTA *et al.*, 2008).

A avaliação ecotoxicológica aguda constitui-se, geralmente, de uma abordagem exploratória para evidenciar um problema de qualidade de corpos hídricos que recebem despejos industriais ou domésticos (BERTOLETTI e ZAGATO, 2006; MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). Esse tipo de teste também pode ser aplicado para avaliar a sensibilidade relativa de organismos aquáticos para um determinado agente tóxico isolado e as concentrações seguras de agentes químicos para preservação da vida aquática e do ambiente (RASGALLA JR *et al.*, 2002; MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008). São objetivos dos testes de toxicidade aguda identificar a variabilidade das respostas ao agente entre as diferentes espécies, identificar a toxicidade comparativa e detectar contaminações agudas. De acordo com MAGALHÃES e FERRÃO FILHO (2008), no Brasil, esses testes vêm sendo empregados com o intuito de minimizar o impacto ambiental, avaliar a eficiência de estações de tratamento, bem como requisito para obtenção e manutenção de licenças junto aos órgãos ambientais de alguns estados.

Os testes de toxicidade aguda permitem que sejam determinados por métodos estatísticos, valores de Concentração Efetiva Média (CE<sub>50</sub>) e Concentração Letal Média (CL<sub>50</sub>) (Tabela 3.2). Geralmente, os valores de concentrações efetivas e letais são expressos em relação a 50% dos organismos, uma vez que estas respostas são de fácil reprodução, podem ser estimadas com maior grau de confiabilidade e são mais significativas para serem extrapoladas para uma população (COSTA *et al.*, 2008).

**Tabela 3.2** - Definições de alguns termos utilizados em testes de toxicidade

| PARÂMETRO        | DEFINIÇÃO                                                                                                                                                                                              | TEMPO DE EXPOSIÇÃO |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| DL <sub>50</sub> | Dose Letal Média: dose de amostra que causa mortalidade de 50% dos organismos no tempo de exposição e condições do teste.                                                                              | 24 a 96 h          |
| CL <sub>50</sub> | Concentração Letal Média: concentração de amostra que causa mortalidade de 50% dos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.                                                          | 24 a 96 h          |
| CE <sub>50</sub> | Concentração Efetiva Média: concentração de amostra que causa um efeito agudo (imobilidade, por exemplo) a 50% dos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.                          | 24 ou 48 h         |
| CENO             | Concentração de Efeito Não Observado: maior concentração de agente tóxico que não causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste. | 7 dias             |
| CEO              | Concentração de Efeito Observado: menor concentração de agente tóxico que causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.         | 7 dias             |

Fonte: COSTA *et al.*, 2008

#### 3.3.1.2 Teste de toxicidade crônica

Testes de toxicidade crônica são realizados para medir os efeitos de substâncias químicas sobre espécies aquáticas por um período que pode abranger de 1/10 a todo o ciclo de vida do organismo-teste. O fato de uma substância química não produzir efeitos tóxicos sobre organismos aquáticos em testes de toxicidade aguda não indica que ela não seja tóxica para eles (COSTA *et al.*, 2008). Testes de toxicidade crônica permitem avaliar os possíveis efeitos tóxicos de substâncias químicas sob condições de exposições prolongadas a concentrações subletais, ou seja, concentrações que permitem a sobrevivência dos organismos, mas que afetam suas funções biológicas, tais como reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação.

Os testes de toxicidade crônica dependem diretamente dos resultados de toxicidade aguda, uma vez que as concentrações subletais são calculadas a partir do CL<sub>50</sub>. Comparado aos testes agudos, esses testes são mais sensíveis à elevada diluição esperada em amostras ambientais (MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008). São, portanto, comumente utilizados quando os testes de toxicidade aguda são insuficientes para caracterizar um efeito tóxico mensurável.

Os resultados obtidos em testes de toxicidade crônica são geralmente expressos como Concentração de Efeito Não observado (CENO) ou Concentração de Efeito Observado (CEO) mas também podem ser expressos como Concentração Efetiva Média (CE<sub>50</sub>).

### 3.3.1.3 Escolha do organismo teste

Observa-se que é corrente o uso de mais de um organismo nos testes ecotoxicológicos, com o intuito de avaliar a cadeia alimentar do modo menos fragmentado possível. (SILVA *et al*, 2011; KÜSTER; DORUSCH; ALTENBURGER, 2005; MARQUES, 2011; MACKEN *et al*, 2009; PARK *et al*, 2005; MANFRA, 2007; KUNGOLOS *et al*, 2004; PALMA *et al*, 2008).

Em geral, esses testes são realizados com espécies de microcrustáceos (sendo comum as espécies do gênero *Daphnia*), decompositores (igualmente comum a bactéria *Aliivibrio fischeri*) e, em alguns casos, espécies de algas ou animais.

A escolha do organismo que testa a ecotoxicidade é de extrema importância, uma vez que a ausência de resposta de uma determinada espécie a certa substância pode traduzir apenas uma resistência específica, ainda que a substância em questão seja tóxica ou danosa ao ambiente analisado.

Magalhães e Ferrão Filho (2008) citando Rand e Petrocelli (1985) afirmam que, para a escolha do organismo teste, diversos critérios devem ser observados: abundância e disponibilidade, significativa representação ecológica na biocenose, cosmopolitismo da espécie, conhecimento prévio de sua fisiologia, biologia e hábitos, estabilidade genética e uniformidade populacional, sazonalidade, sensibilidade constante e apurada, importância comercial e facilidade de cultivo em laboratório. Esses quesitos dificultam a existência de um arquétipo ideal para exames toxicológicos. Portanto, exige-se uma padronização de espécies para cada ecossistema em estudo e, ademais, não se eximiria o uso de espécies encontradas no próprio ecossistema (espécies nativas). Os autores, ainda, observando o problema da inexistência de uma espécie que represente integralmente os efeitos causados em um determinado ecossistema, recomendam utilizar três exemplares de diferentes níveis tróficos,

aumentando a probabilidade de respostas tóxicas diferenciadas, através de organismos de maior ou menor sensibilidade a certas substâncias.

Exemplo dessa recomendação foi verificado por Palma e colaboradores (2008), que avaliaram a toxicidade aguda de pesticidas na região do Alentejo, em Portugal. Os resultados indicaram que a resposta a um determinado composto é fortemente dependente da sensibilidade àquela mesma substância. Também constatou-se que as bactérias são notadamente menos resistentes a herbicidas e inseticidas do que crustáceos. Além disso, notou-se como algumas espécies - no caso, o crustáceo *Thamnocephalus platyurus* -, apresentam melhores resultados em determinados exames, a despeito de espécies já amplamente utilizadas e divulgadas no meio científico, como *Daphnia magna*, *Daphnia carinata* e *Aliivibrio fischeri*. Nesse mesmo sentido, Silva e colaboradores (2011) avaliaram a toxicidade de resíduos industriais que passaram pelo tratamento de estabilização-solidificação. Os testes com *Daphnia magna* mostraram-se mais sensíveis do que aqueles com o *Aliivibrio fischeri*, sendo ambos mais sensíveis que as algas do gênero *Scenedesmus subspicatus*.

Vale ressaltar que a seleção razoável de espécies, além da adequação e da melhor precisão, permite que se encontrem novas alternativas para organismos em franco uso nos testes ecotoxicológicos que, notadamente, são de difícil cultivo. É o caso do *T. platyurus*, alternativa à *D. magna* em análises de certas substâncias encontradas em ambientes impactados, como os pesticidas atrazina, sulfato de endosulfan e clorpirifó (PALMA *et al*, 2008) e certos metais traços, como zinco, cobre e dióxido de titânio (HEINLAAN *et al*, 2008 *apud* PALMA *et al*, 2008).

#### 3.3.1.4 Teste de toxicidade com *Aliivibrio fischeri*

O teste de toxicidade aguda por *Aliivibrio fischeri* é considerado uma alternativa eficiente devido à correlação que apresenta com outros bioensaios que utilizam peixes e invertebrados, e pela rapidez de obtenção de resultados (KAISER, 1998). Estudos de correlação entre resultados de toxicidade com *Aliivibrio fischeri* e outros organismos aquáticos, inclusive de água doce, são bastante numerosos, o que proporciona maior confiança na utilização desse microorganismo em testes ecotoxicológicos (KAISER e PALABRICA, 1991; MUNKTTRICK *et al.*, 1991; ZHAO *et al.*, 1993; KAISER *et al.* 1994). Foram esses os motivos que levaram a escolha do citado organismo para a realização dessa pesquisa.

Exemplo de pesquisa que utilizou análise com *Aliivibrio fischeri* e obteve sucesso é a de Białk-Bielin´ska e colaboradores (2011), em que avaliou-se a toxicidade de doze sulfonamidas, buscando comparar a sensibilidade da bactéria marinha luminescente com a de outros organismos, tais como algas e plantas. Nesse estudo, verificou-se que os organismos *Lemna minor* e *Scenedesmus vacuolatus* são os mais sensíveis à contaminação por esse tipo de fármaco.

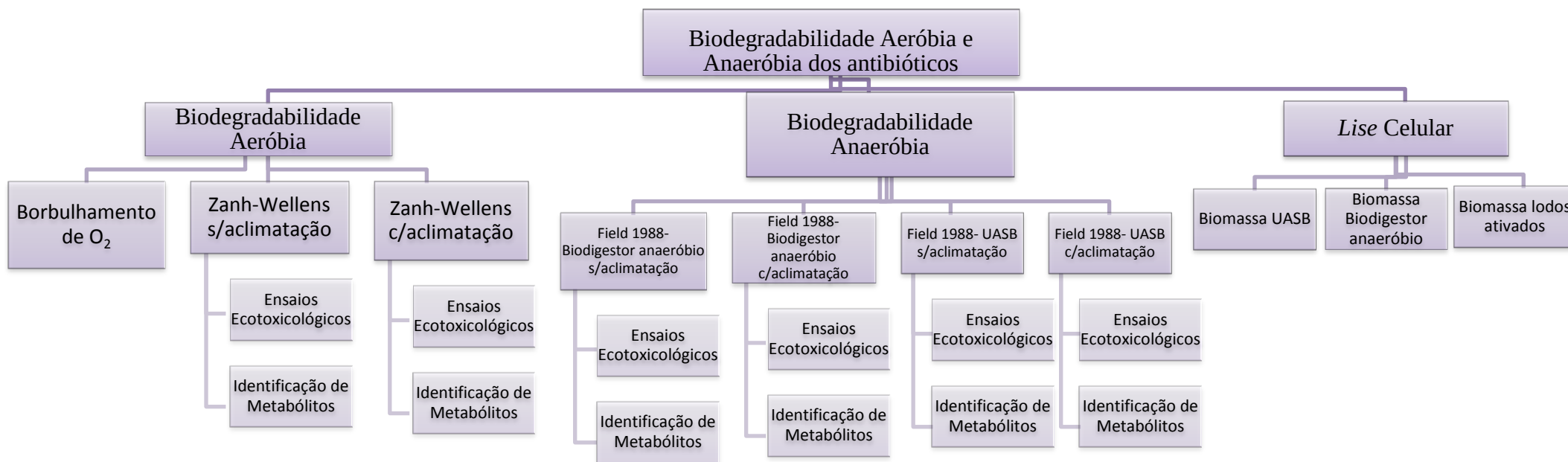
Outro trabalho que utiliza de forma exitosa a bactéria *Aliivibrio fischeri* é o de Kim e colaboradores (2007), em que os quatro fármacos mais utilizados na Coreia – acetaminofeno, carbamazepina, diltiazem e outras seis sulfonaminas – têm toxicidade testada para *Aliivibrio fischeri*, *Daphnia magna* e *Oryzias latipes*. Dentre esses organismos, o mais sensível a contaminação pelos fármacos supracitados foi a *Daphnia magna*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Etapas do desenvolvimento metodológico

Para avaliar a biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia dos antibióticos em estudo foram realizados ensaios utilizando biomassas advindas dos reatores de lodos ativados, biodigestor anaeróbio e reatores UASB, de acordo com Figura 3.6.

**FIGURA 3.6** - Fluxograma demonstrando as etapas do desenvolvimento metodológico.



## 4.2 Amostragem da biomassa

As diferentes biomassas utilizadas nas montagens dos reatores de biodegradabilidade foram coletadas na ETE Arrudas, localizada na região de Sabará, Minas Gerais. Foram coletados lodos do processo de tratamento com lodos ativados, reatores UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) e biodigestor anaeróbio de lodos.

## 4.3 Aclimação da biomassa

A biomassa aeróbia advinda do tratamento de efluentes utilizando lodos ativados foi aclimatada por, aproximadamente, nove semanas, recebendo carga crescente de cada antibiótico em estudo e decrescente de solução de glicose e nutrientes, Tabela 3.3.

Para aclimação foram montados reatores de 2L utilizando 1000 mL de lodo aeróbio devidamente lavado com água deionizada, 600 mL de solução de antibiótico/glicose de acordo com a 1ª semana de aclimação e 2 mL de cada solução de nutrientes ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4$  e tampão fosfato) preparadas em conformidade com método de DBO (APHA, 2012). Promoveu-se aeração nos reatores utilizando aeradores de aquário e acertou-se o pH para 7.

**Tabela 3.3** - Relação antibiótico/glicose e concentração de antibiótico presente em cada reator durante o período de aclimação da biomassa.

| Semana | Antibiótico/<br>Glicose | Norfloxacino<br>(mg/L) | Gentamicina<br>(mg/L) |
|--------|-------------------------|------------------------|-----------------------|
| 1ª     | 1/4                     | 3,0                    | 20,0                  |
| 2ª     | 2/3                     | 6,0                    | 40,0                  |
| 3ª     | 2/3                     | 6,0                    | 40,0                  |
| 4ª     | 3/2                     | 9,0                    | 60,0                  |
| 5ª     | 3/2                     | 9,0                    | 60,0                  |
| 6ª     | 3/2                     | 9,0                    | 60,0                  |
| 7ª     | 4/1                     | 12,0                   | 80,0                  |
| 8ª     | 4/1                     | 12,0                   | 80,0                  |
| 9ª     | 4/1                     | 12,0                   | 80,0                  |

Para aclimação da biomassa anaeróbia foram coletadas amostras do biodigestor anaeróbio utilizado na ETE Arrudas para tratar o residual de lodo gerado durante o processo de tratamento com lodos ativados e do reator UASB a uma altura de 70 cm em relação à base.

Foram montados reatores de 2L utilizando 1000 mL de cada lodo anaeróbio devidamente lavado com água deionizada, 600 mL de solução de antibiótico/glicose de acordo com a 1ª

semana de aclimação, Tabela 3.3, e 200 mL de solução de nutrientes preparada a partir das soluções de macro e micronutrientes, Tabela 3.4.

**Tabela 3.4** - Composição das soluções de macro e micronutrientes.

| Solução de Macronutrientes (L)       |                | Solução de Micronutrientes (L)                                                     |                |
|--------------------------------------|----------------|------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| Reagentes                            | Quantidade (g) | Reagentes                                                                          | Quantidade (g) |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 1,5            | FeCl <sub>3</sub> .H <sub>2</sub> O                                                | 2,00           |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 6,5            | ZnCl <sub>2</sub>                                                                  | 0,05           |
| NH <sub>4</sub> Cl                   | 5,0            | CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O                                               | 0,03           |
| Na <sub>2</sub> S.9H <sub>2</sub> O  | 0,5            | MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O                                               | 0,50           |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O | 1,0            | (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O | 0,05           |
| MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O | 1,0            | NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O                                               | 0,05           |
|                                      |                | AlCl <sub>3</sub>                                                                  | 0,05           |
|                                      |                | CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O                                               | 2,00           |
|                                      |                | H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>                                                     | 0,01           |
|                                      |                | HCl                                                                                | 1 mL           |

**Fonte:** SANTOS *et al.*, (2014).

Para o preparo da solução de nutrientes utilizou-se 2 mL da solução de micronutrientes e 200 mL da solução de macronutrientes. Estas quantidades foram transferidas para balão de 1L, que teve seu volume completado com água deionizada.

A quantidade de carbono orgânico presente no meio foi controlada através de duas coletas semanais para determinação de carbono orgânico total dissolvido. Sempre que a concentração de carbono orgânico total era inferior a 40 mg/L, 1g de glicose era acrescentado ao reator.

#### 4.4 Teste de borbulhamento de O<sub>2</sub>

Para verificação da oxidação dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina pelo oxigênio foram realizados testes com borbulhamento de O<sub>2</sub> puro em pH 7. Estes ensaios foram realizados objetivando verificar a contribuição do oxigênio fornecido durante os processos de tratamento biológico aeróbio nos tanques de aeração das ETEs.

Soluções de 10 mg/L de norfloxacino e 100 mg/L de sulfato de gentamicina foram borbulhadas por 1 hora com O<sub>2</sub> puro utilizando vazões de 1, 1,5 e 2 L/min.

Foram recolhidas alíquotas nos tempos de 0, 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos, que foram analisadas através da determinação da absortividade, em 273 nm, para o antibiótico norfloxacino e carbono orgânico total dissolvido para o sulfato de gentamicina.

A verificação da existência de diferenças significativas, em relação aos fluxos de oxigênio utilizados, foi realizada através de teste de hipóteses para múltiplas amostras independentes. Assim, utilizou-se o teste de Kruskal Wallis, seguido pelo teste não paramétrico de comparação múltipla entre grupos com  $\alpha = 0,05$ . Em todas as análises estatísticas, empregou-se o software STATISTICA 8.0.

#### **4.5 Avaliação da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia**

Para avaliação da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia foram monitorados reatores de 2L contendo os fármacos em estudo, Figura 3.7. Foram coletadas alíquotas a cada dois dias para monitoramento por COT e determinação da absortividade molar em 273 nm.

**FIGURA 3.7** - Monitoramento da biodegradabilidade aeróbia (a) e anaeróbia (b) dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina.



Para montagem dos reatores utilizou-se uma mistura de antibiótico/glicose em função da necessidade de uma segunda fonte de carbono para que os microrganismos pudessem degradar os micropoluentes.

##### **4.5.1 Avaliação da biodegradabilidade aeróbia – Método de Zahn-Wellens**

Para avaliação da biodegradabilidade aeróbia foram montados reatores a partir de uma adaptação da metodologia proposta por Zahn-Wellens (OECD, 1995).

Em cada reator foram adicionados 1,5 mL de solução de nutrientes ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4$  e tampão fosfato) preparadas em conformidade com método de DBO, lodo aeróbio aclimatado e não aclimatado, solução contendo o antibiótico em estudo e glicose, Tabela 3.5.

Foi adicionada glicose aos reatores, de forma a manter a concentração de carbono orgânico similar entre os reatores testes e reatores controles. No caso do norfloxacino, uma solução de 15 mg/L foi preparada previamente devido a dificuldade de solubilização. A escolha do valor da concentração trabalhada foi realizada em função da solubilidade máxima do norfloxacino em água que é de 15 mg/L. Ressalta-se que aos reatores Controles não foi adicionado o antibiótico, tendo sido a glicose a única fonte de carbono.

Para gentamicina optou-se por trabalhar com uma concentração de 100 mg/L, visto que o controle seria realizado unicamente por determinação de carbono orgânico dissolvido total.

**Tabela 3.5** - Descrição dos reatores aeróbios – Biomassa lodos ativados.

| Reatores Aeróbios |                       |           |                   |                     |                         |                      |
|-------------------|-----------------------|-----------|-------------------|---------------------|-------------------------|----------------------|
| Reator            | Descrição             | Aclimação | Volume Total ( L) | Conc. de Lodo( g/L) | Volume Solução DBO (mL) | Conc. Glicose (mg/L) |
| 1                 | Controle Norfloxacino | Sim       | 1,5               | 0,5                 | 1,5                     | 500                  |
| 2                 | Norfloxacino          | Sim       | 1,5               | 0,5                 | 1,5                     | 465                  |
| 3                 | Controle Gentamicina  | Sim       | 1,5               | 0,5                 | 1,5                     | 500                  |
| 4                 | Gentamicina           | Sim       | 1,5               | 0,5                 | 1,5                     | 278                  |
| 5                 | Controle              | Não       | 1,5               | 0,5                 | 1,5                     | 500                  |
| 6                 | Norfloxacino          | Não       | 1,5               | 0,5                 | 1,5                     | 465                  |
| 7                 | Gentamicina           | Não       | 1,5               | 0,5                 | 1,5                     | 278                  |

através da determinação do carbono orgânico dissolvido total e por leitura de absorvidade em comprimento de onda 273 nm.

#### 4.5.2 Avaliação da biodegradabilidade anaeróbia – Método FIELD *et al.*, 1988.

Para avaliação da biodegradabilidade anaeróbia foram montados reatores a partir de uma adaptação da metodologia proposta por FIELD *et al.*, (1988).

Em cada reator montado, Tabela 3.6, foram adicionados 200 mL de solução de nutrientes (macro e micronutrientes), lodo anaeróbio aclimatado e não aclimatado, solução contendo o antibiótico em estudo e glicose. De modo semelhante aos reatores aeróbios nos reatores Controles a glicose foi a única fonte de carbono.

**Tabela 3.6** - Descrição dos reatores anaeróbios estudados

| Reator | Descrição             | Aclimação | Volume Total ( L) | Conc. de Lodo( g/L) | Solução Nutriente (mL) | Conc. Glicose (mg/L) |
|--------|-----------------------|-----------|-------------------|---------------------|------------------------|----------------------|
| 1      | Controle Norfloxacino | Sim       | 1,5               | 0,5                 | 200                    | 500                  |
| 2      | Norfloxacino          | Sim       | 1,5               | 0,5                 | 200                    | 465                  |
| 3      | Controle Gentamicina  | Sim       | 1,5               | 0,5                 | 200                    | 500                  |
| 4      | Gentamicina           | Sim       | 1,5               | 0,5                 | 200                    | 278                  |
| 5      | Controle              | Não       | 1,5               | 0,5                 | 200                    | 500                  |
| 6      | Norfloxacino          | Não       | 1,5               | 0,5                 | 200                    | 465                  |
| 7      | Gentamicina           | Não       | 1,5               | 0,5                 | 200                    | 278                  |

Salienta-se que nesta etapa foram montados reatores para biomassas advinda dos reatores UASB e biodigestores anaeróbios, totalizando 14 reatores.

#### ***4.6 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa – Identificação dos metabólitos.***

Foram recolhidas amostras antes e após os testes de biodegradabilidade para identificação dos metabólitos ou produtos de degradação dos antibióticos pesquisados. A identificação dos compostos formados foi realizada em parceria com ICRA (Catalan Institute for Water Research) localizado na cidade de Girona, Espanha. Para isto, as amostras foram concentradas pela técnica de extração em fase sólida (EFS), utilizando cartuchos Oásis MCX.

Os cartuchos foram condicionados com 5 mL de metanol e 5 mL de água. Em seguida, alíquotas de 1000 mL de cada amostra, previamente filtradas utilizando membrana de 0,45 µm em PVDF hidrofílico, foram passadas através dos cartuchos.

Para eluição dos cartuchos contendo norfloxacino foram utilizados 4 mL de metanol e para os que continham sulfato de gentamicina 6 mL de metanol/ácido acético (10:1). A eluição foi realizada utilizando o equipamento Gilson GX- 271 Aspec. Os extratos eluídos foram levados à secura utilizando o equipamento Thermo Scientific Pierce Reacti Vap III#18826 Evaporation acoplado ao equipamento Thermo Scientific Pierce Reacti Therm III#18824 Heating Module. Após secura retomou-se o volume dos extratos que continham norfloxacino com 1,0 mL de metanol/água (25:75) e dos que continham gentamicina com 0,5 mL de metanol/ácido acético (10:1).

Os extratos obtidos foram diluídos e injetados no equipamento LTQ ORBITRAP Velos System of Thermo Scientific, com 60000 de resolução, alocado no ICR. As condições analíticas utilizadas estão descritas na Tabela 3.7.

**Tabela 3.7** - Condições analíticas utilizadas para determinação dos metabólitos gerados durante os processos de biodegradabilidade.

|                   |                   | Norfloxacino                        | Gentamicina                         |
|-------------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Coluna            | Tamanho Coluna    | C <sub>18</sub> Hypersil Gold       | UPLC® HSS T3                        |
|                   | Tamanho Partícula | 50 x 2.1 mm                         | 2,1 x 50 mm                         |
|                   |                   | 3 µm                                | 1,8 µm                              |
| Fase Móvel        |                   | Acetonitrila/Água pH 8              | Metanol/Água                        |
| Modo de Ionização |                   | Positivo/ionização por electrospray | Positivo/ionização por electrospray |
| Volume de Injeção |                   | 10 µL                               | 10 µL                               |

Por possuírem características químicas muito diferentes foi necessário a determinação de dois métodos analíticos para corrida cromatográfica dos antibióticos. Nas Tabelas 3.8 e 3.9 são apresentadas as rampas utilizadas para cada fármaco em estudo.

**Tabela 3.8** - Condições cromatográficas utilizadas para determinação dos produtos de degradação/metabólitos do antibiótico norfloxacino.

| Norfloxacino |     |      |      |                |                                       |
|--------------|-----|------|------|----------------|---------------------------------------|
| Step         | Sec | Flow | Grad | % Acetonitrila | % H <sub>2</sub> O+ Acetato de Amônio |
| 1            | 60  | 0,5  | Step | 5              | 95                                    |
| 2            | 120 | 0,5  | Ramp | 70             | 30                                    |
| 3            | 90  | 0,5  | Ramp | 100            | 0                                     |
| 4            | 6   | 0,5  | Step | 100            | 0                                     |
| 5            | 1   | 0,5  | Ramp | 5              | 95                                    |
| 6            | 143 | 0,5  | Step | 5              | 95                                    |

Para o antibiótico norfloxacino utilizou-se água em pH 8 para isso a correção do pH foi realizada utilizando-se acetato de amônio.

**Tabela 3.9** - Condições cromatográficas utilizadas para determinação de dos produtos de degradação/metabólitos do antibiótico sulfato de gentamicina.

| Sulfato de Gentamicina |     |      |      |                |                    |
|------------------------|-----|------|------|----------------|--------------------|
| Step                   | Sec | Flow | Grad | % Acetonitrila | % H <sub>2</sub> O |
| 1                      | 60  | 0,5  | Step | 0              | 100                |
| 2                      | 120 | 0,5  | Ramp | 70             | 30                 |
| 3                      | 90  | 0,5  | Ramp | 100            | 0                  |
| 4                      | 6   | 0,5  | Step | 100            | 0                  |
| 5                      | 1   | 0,5  | Ramp | 5              | 95                 |
| 6                      | 143 | 0,5  | Step | 5              | 95                 |

Para a identificação dos metabólitos foi realizada uma primeira injeção no modo *Full Scan* objetivando identificar todos os possíveis íons moleculares candidatos a metabólitos. Esta etapa envolveu a identificação dos íons moleculares prioritários (de maior intensidade), identificação de íons que foram fornecidos através da utilização do software *Mass Frontier* e

a identificação de íons moleculares já citados na literatura. Listou-se os possíveis metabólitos presentes nos extratos e realizou-se novamente a injeção das amostras no modo *MS/MS*. Os resultados obtidos após esta segunda injeção foram trabalhados utilizando os softwares Xcalibur 2.1, Sieve 2.0 e Exact Finder 2.0 e auxiliaram na elucidação molecular.

#### **4.7 Avaliação do potencial de biodegradabilidade da biomassa – Lise Celular**

A avaliação do potencial de biodegradabilidade foi realizada na presença de glicose e dos demais nutrientes necessários para montagem dos reatores de biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia.

Estes testes objetivaram avaliar o comportamento do antibiótico norfloxacino após sua incorporação pela biomassa. Ensaio anteriores, realizados pelo grupo de pesquisa, mostraram um aumento na concentração de norfloxacino após estabilização da concentração de carbono orgânico disponível nos reatores de biodegradabilidade, sugerindo que parte do norfloxacino absorvido estava sendo liberado após *lise* celular.

Para confirmação desta hipótese foram realizados testes com a biomassa aclimatada, onde a concentração de norfloxacino foi monitorada através de absortividade em 273 nm.

Para o monitoramento do norfloxacino endógeno uma alíquota de 50 mL da biomassa aclimatada com o antibiótico em estudo foi lavada com água deionizada e transferida para um frasco limpo, onde foram adicionados 50 mL de água ultrapura, solução de nutrientes e 1g de glicose. Diariamente, alíquotas de 4 mL foram coletadas, filtradas e enviadas para leitura de absortividade em 273 nm. Após leitura, a alíquota lida retornava ao frasco contendo a biomassa.

Foram monitoradas biomassas dos reatores de lodos ativados, UASB e biodigestor anaeróbio até a estabilização dos resultados encontrados.

#### **4.8 Avaliação da ecotoxicidade dos compostos através da utilização de *Allivibrio fischeri*.**

As amostras resultantes dos reatores de biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia tiveram sua ecotoxicidade determinada através da realização de ensaios ecotoxicológicos com a bactéria marinha luminescente *Allivibrio fischeri*, utilizando o equipamento MICROTOX® Model 500 Analyzer (SDI).

##### **4.8.1 Análise ecotoxicológica com *Allivibrio fischeri***

Os testes foram realizados de acordo com as determinações da norma ABNT NBR 15411-3 (setembro, 2009) e seguindo o protocolo estabelecido pelo software (MICROTOX® Omni Software, versão 4.1 do próprio equipamento MICROTOX® Model 500 Analyzer).

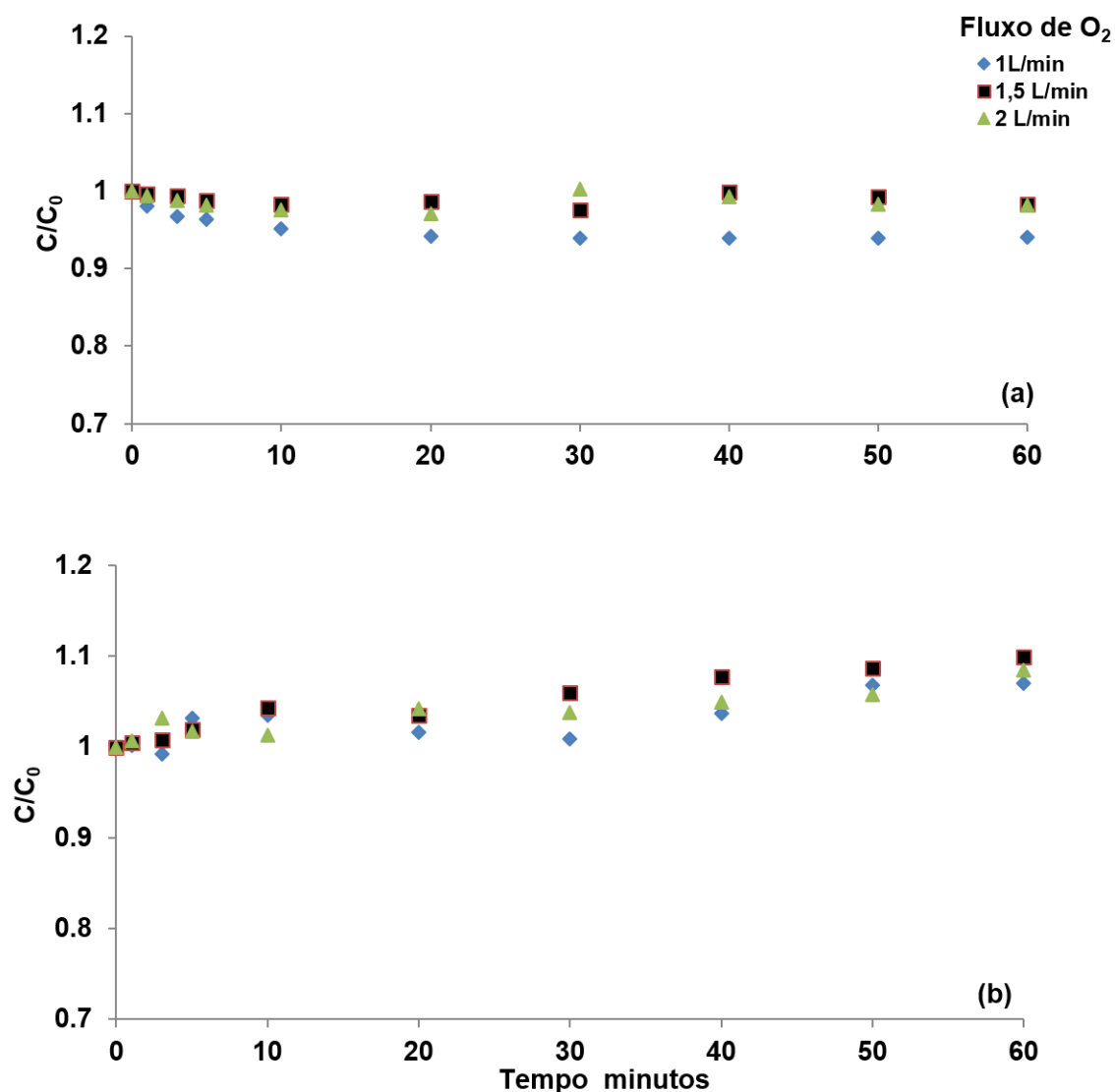
As bactérias liofilizadas utilizadas foram obtidas da SDI, e foram armazenadas à temperatura de – 20°C. A toxicidade aguda ( $EC_{50}$ ) foi determinada a partir de medições da luminescência da bactéria nos tempos 5, 15 e 30 minutos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Experimentos com borbulhamento de O<sub>2</sub>

Objetivando verificar a contribuição na oxidação dos antibióticos pelo oxigênio utilizado para aerar os reatores, foram realizados experimentos com borbulhamento de O<sub>2</sub> puro. Na Figura 3.8 são apresentados os resultados obtidos para os antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina.

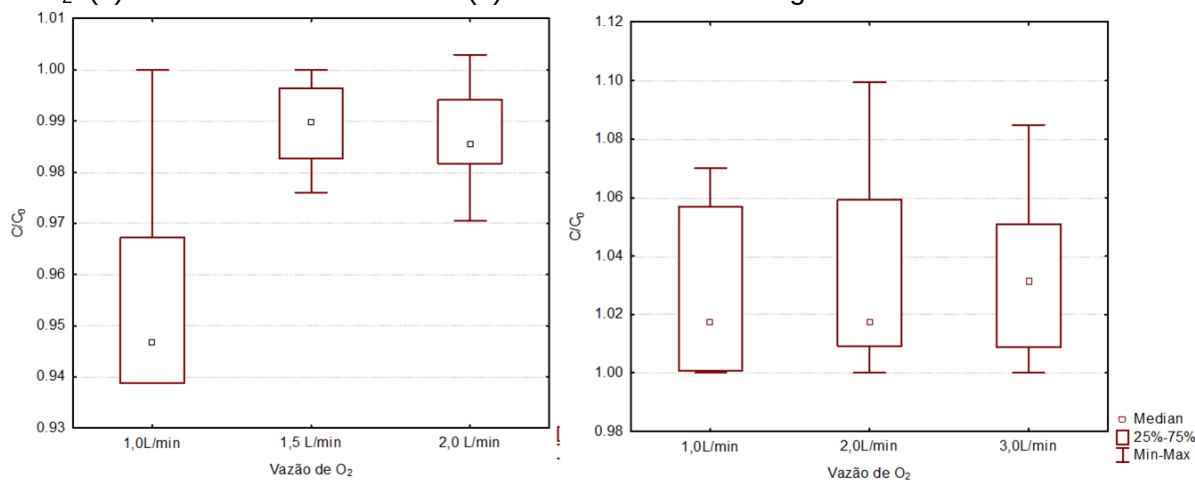
**FIGURA 3.8** - Monitoramento da degradabilidade dos antibióticos através do borbulhamento de O<sub>2</sub>. (a) Antibiótico norfloxacino e (b) Antibiótico sulfato de gentamicina.



Observa-se uma redução em torno de 6 %, na concentração do antibiótico norfloxacino quando aplicado um fluxo de 1,0 L/min. Nos demais fluxos verificam-se uma redução em torno de 2% não sendo, portanto, observadas diferenças significativas, Figura 3.9 A.

Para o antibiótico sulfato de gentamicina, Figura 3.9 B, não foi observada diferenças significativas entre os fluxos utilizados. Os resultados sugerem, portanto, que o oxigênio não contribui na oxidação deste composto.

**FIGURA 3.9** - Verificação da existência de diferenças significativas entre os diferentes fluxos de O<sub>2</sub>. (a) Antibiótico norfloxacino e (b) Antibiótico sulfato de gentamicina.

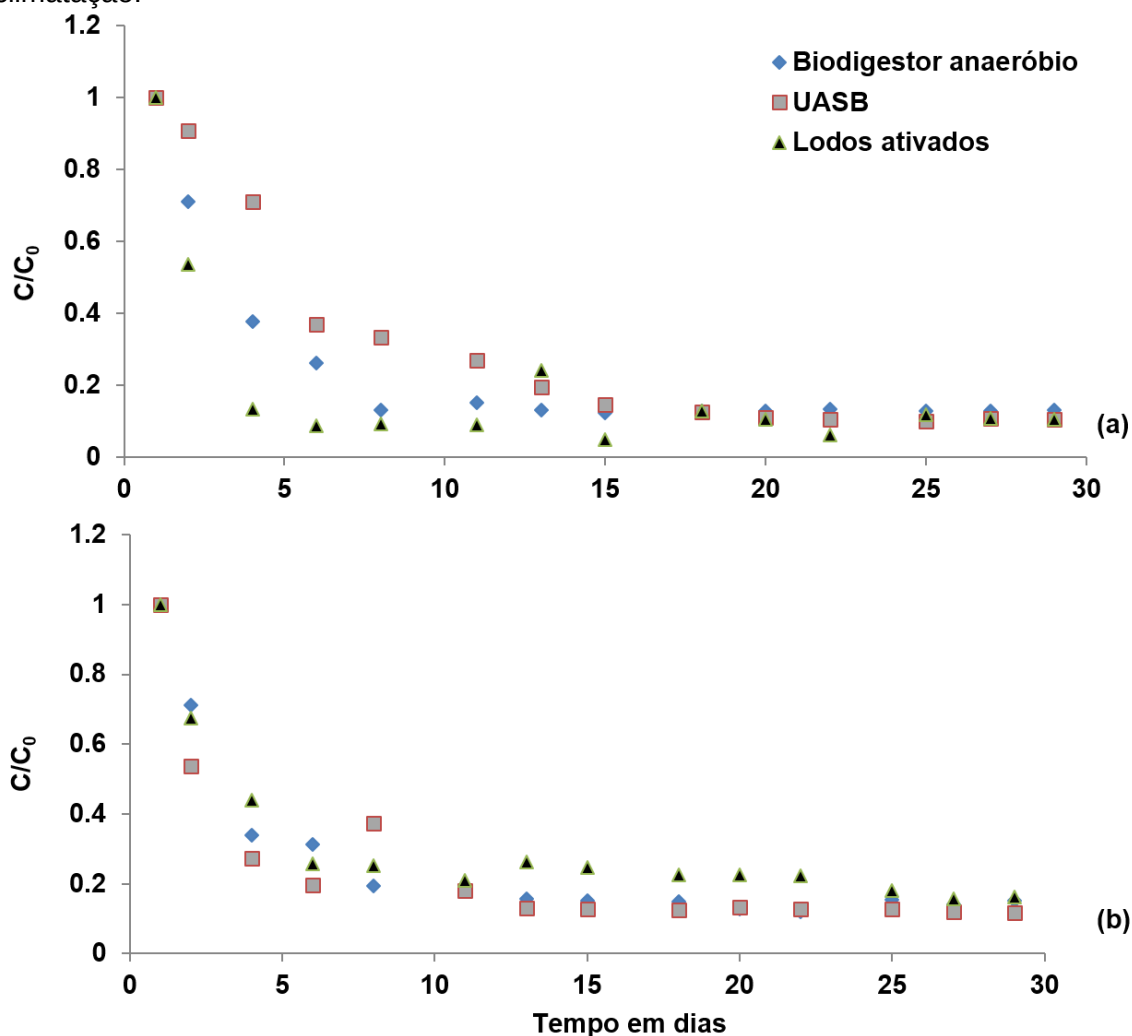


## 5.2 Biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia

### 5.2.1 Biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia para o antibiótico norfloxacino

Na Figura 3.10 são apresentados os resultados obtidos durante o processo de biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia com e sem aclimação da biomassa.

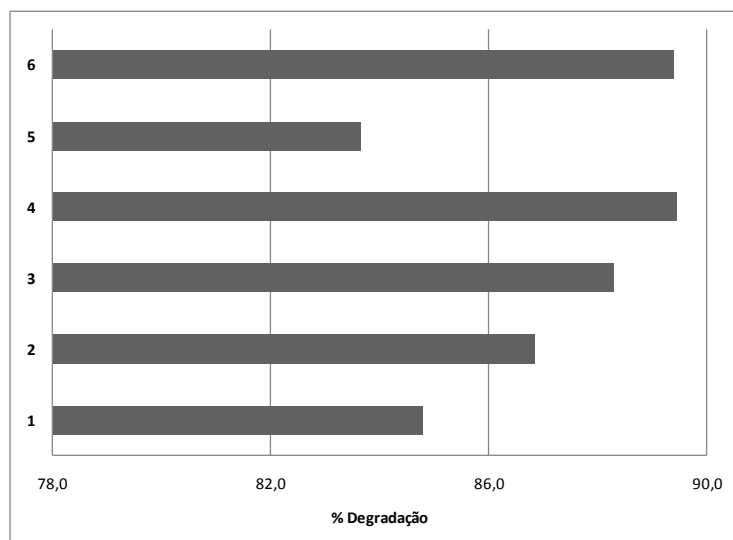
**FIGURA 3.10** - Monitoramento da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do antibiótico norfloxacino. (a) Utilização de biomassa aclimatada e (b) Utilização de biomassa sem aclimação.



Observou-se uma remoção de aproximadamente 80% de carbono orgânico total nos reatores. Esta redução de matéria orgânica está relacionada à presença de glicose que é facilmente biodegradável. Uma série de estudos tem demonstrado que a maioria dos antibióticos não são biodegradáveis sob condições aeróbicas de tratamento (KÜMMERER *et al.*, 2000; INGERSLEV *et al.*, 2001; INGERSLEV e HALLING-SØRENSEN, 2001; THIELEBRUHN, 2003; ALEXY *et al.*, 2004; GARTISER *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2008b). Estes resultados sugerem que processos semelhantes possam acontecer em ETEs onde utiliza-se tratamento biológico e são verificadas altas taxas de remoções, em termos de DQO e DBO, mas não utilizam-se técnicas para identificar a parcela de compostos não biodegradáveis.

Na Figura 3.11 pode-se observar que o processo de aclimação da biomassa não aumentou de forma consideravelmente a biodegradabilidade nos reatores.

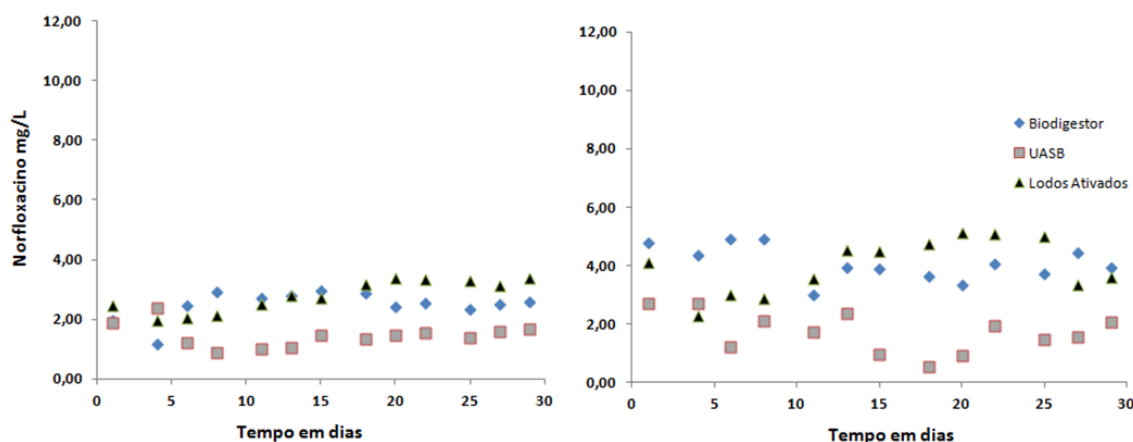
**FIGURA 3.11** - Biodegradabilidade do norfloxacinó verificada nos reatores aeróbios com e sem aclimação da biomassa. Sendo: (1) biodigestor anaeróbio, (2) biodigestor anaeróbio aclimatado, (3) UASB, (4) UASB aclimatado, (5) lodos ativados e (6) lodos ativados aclimatado.



Segundo FERNICOLA e OLIVEIRA (2002) uma mistura complexa de microrganismos pode se adaptar à presença de determinados xenobióticos e aumentar a eficiência do processo de degradação. Contudo, neste caso, observou-se um aumento discreto nesta eficiência sendo mais significativo nos reatores com lodos ativados.

Avaliando a concentração do norfloxacinó por UV/Vis é possível verificar (Figura 3.12) que o composto não foi totalmente biodegradado pelas biomassas utilizadas mesmo após o processo de aclimação.

**FIGURA 3.12** - Monitoramento da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do antibiótico norfloxacinó por UV/Vis em 273 nm. (a) Utilização de biomassa aclimatada e (b) Utilização de biomassa sem aclimação.

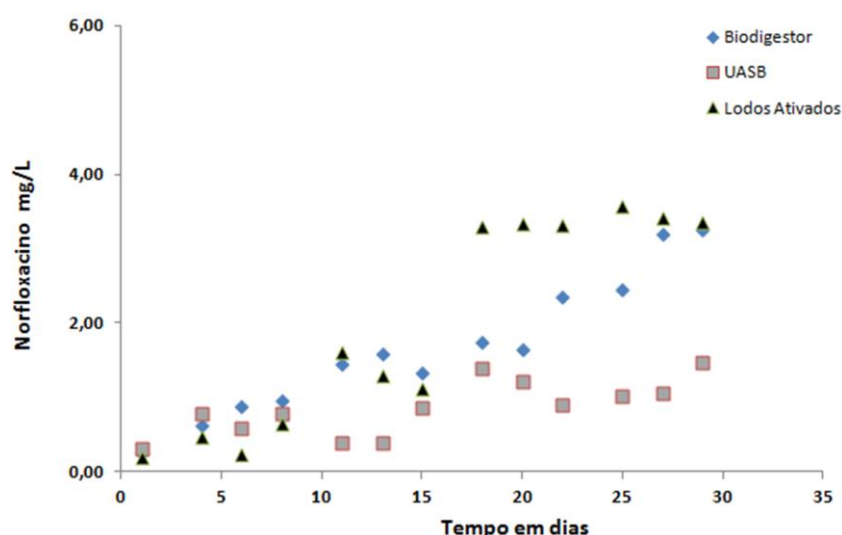


Os resultados encontrados corroboram com os estudos realizados por CRUZ *et al.*, (2012) em que norfloxacinó foi encontrado após tratamento biológico com lodos ativados, em uma

estação de tratamento de esgoto na Suíça, o que demonstra a característica refratária desta fluoroquinolona.

Observa-se, no entanto, um pequeno aumento na concentração de norfloxacinó nos reatores em que ocorreu aclimação da biomassa. Estes resultados sugerem que, em períodos com pouca disponibilidade de matéria orgânica ocorre a *lise* celular e parte do norfloxacinó absorvido é liberado para o meio reacional. Estes resultados podem ser confirmados através do monitoramento dos *Reatores Controles*, Figura 3.13, onde a presença de norfloxacinó é exclusivamente advinda da absorção prévia do antibiótico pelas bactérias no processo de aclimação.

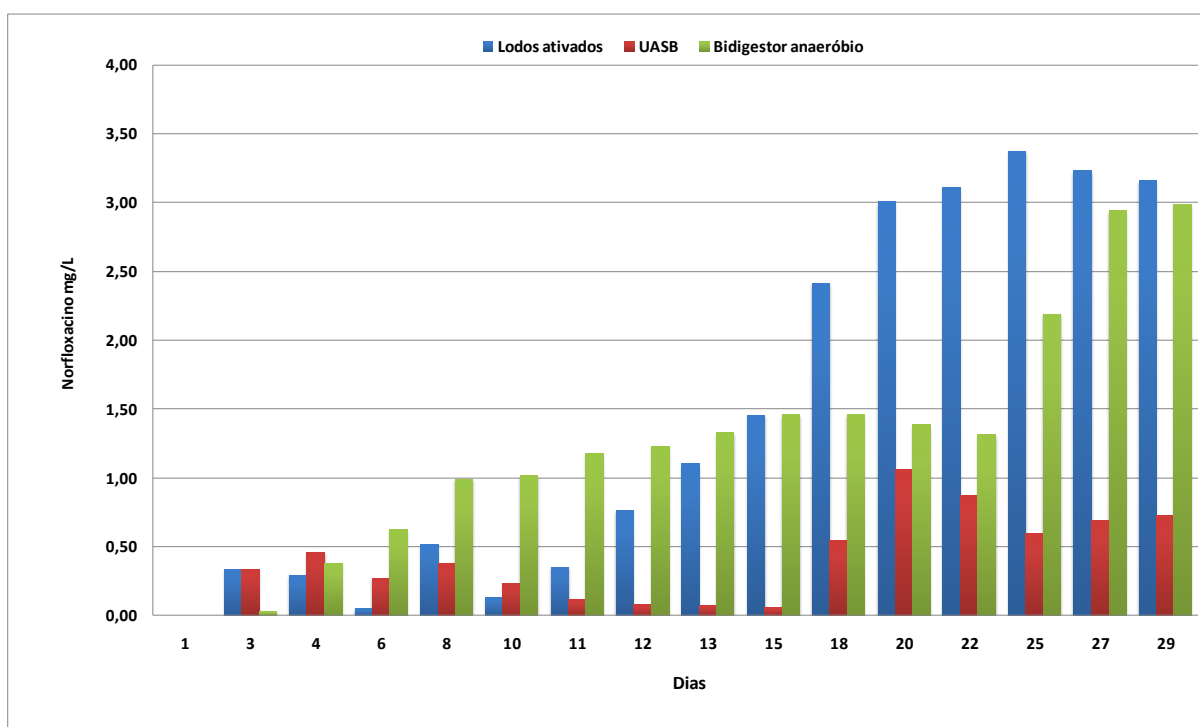
**FIGURA 3.13** - Monitoramento da concentração de norfloxacinó em *Reatores Controles* com aclimação da biomassa, leitura da absortividade molar em 273 nm.



Os resultados apresentados na Figura 3.13 foram confirmados por ensaios, realizados em triplicata, em que foram utilizadas biomassas aclimatadas. Na Figura 3.14 são apresentadas as médias dos valores encontrados nos ensaios de *lise* celular. O monitoramento foi realizado através da leitura da absortividade molar do norfloxacinó em 273 nm.

Os ensaios de *lise* celular apresentaram resultados semelhantes aos já observados nos *Reatores Controles* sendo a biomassa advinda dos reatores UASB mais eficiente na remoção do norfloxacinó. Os resultados encontrados sugerem que o norfloxacinó não é removido por processos biológicos de tratamento mesmo diante da aclimação da biomassa. A presença de fluoroquinolonas tem sido relatada por muitos estudos de monitoramento ambiental em efluentes de tratamento de águas residuárias e em águas para abastecimento humano em todo o mundo (WATKINSON *et al.*, 2009; LI e ZHANG, 2011).

**FIGURA 3.14** - Variação da concentração de norfloxacinó em função da *lise* celular bacteriana.



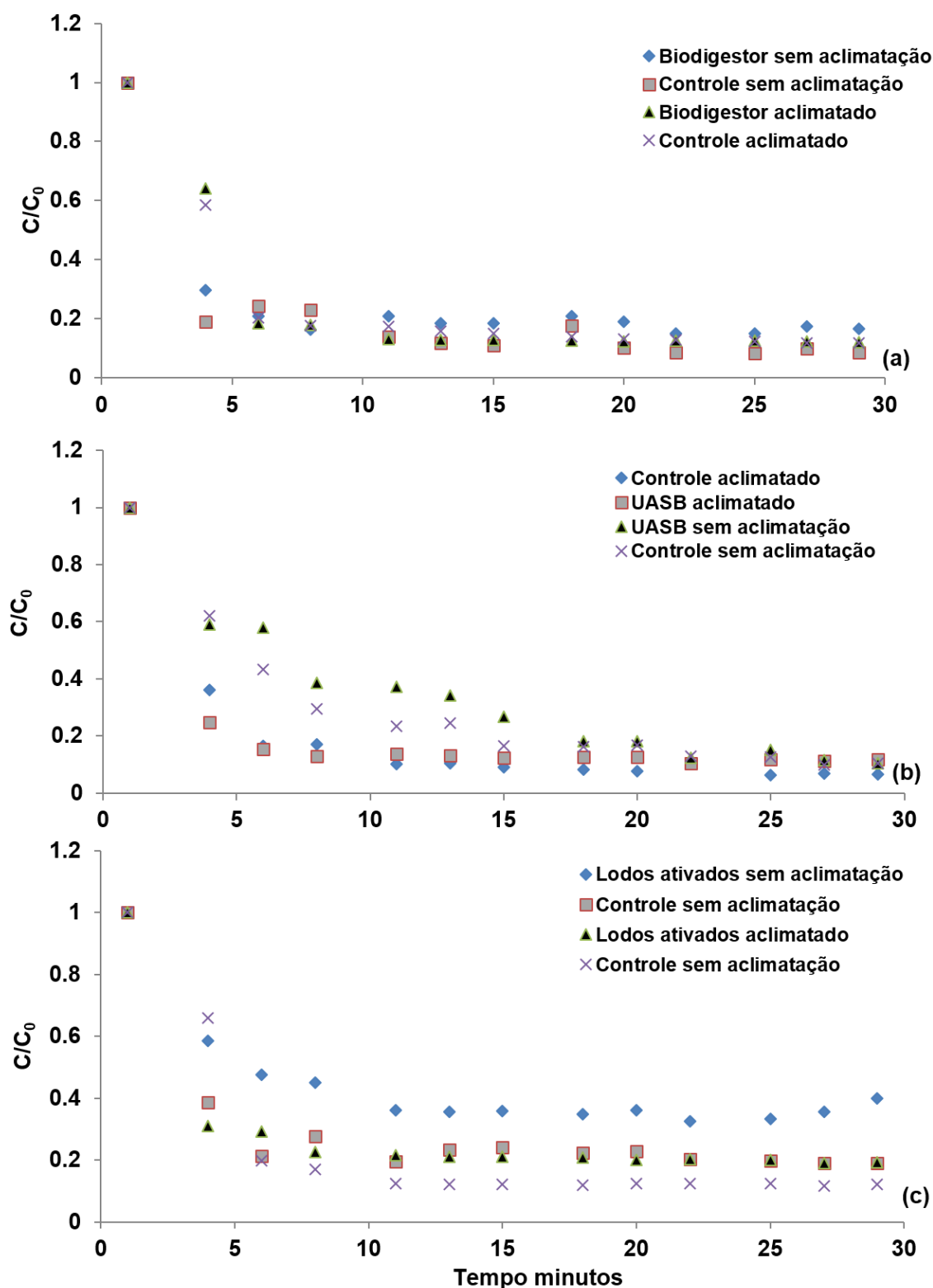
A discreta redução da concentração deste fármaco no meio líquido é devida a absorção por parte da biomassa. Salienta-se que em ambientes com pouca disponibilidade de alimento o norfloxacinó endógeno poderá ser liberado ao meio ambiente caso ocorra *lise* celular. Desta forma, este estudo conclui que apenas aconteceu uma mudança de fase e não um tratamento efetivo. Vale lembrar que embora os antibióticos sejam encontradas no meio ambiente em níveis sub-inibitórios, concentrações relativamente baixas de agentes antimicrobianos podem ainda promover a resistência bacteriana (CASTIGLIONI *et al.*, 2008).

### 5.2.2 Biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia para o antibiótico sulfato de gentamicina

Na Figura 3.15 são apresentados os resultados obtidos durante o processo de biodegradabilidade anaeróbia e aeróbia para o antibiótico sulfato de gentamicina.

Nesse caso, observou-se um comportamento semelhante ao dos reatores com norfloxacinó em que 80% do carbono orgânico total foram removidos. Nessa situação também atribuiu-se a degradação a presença de glicose que é facilmente biodegradada.

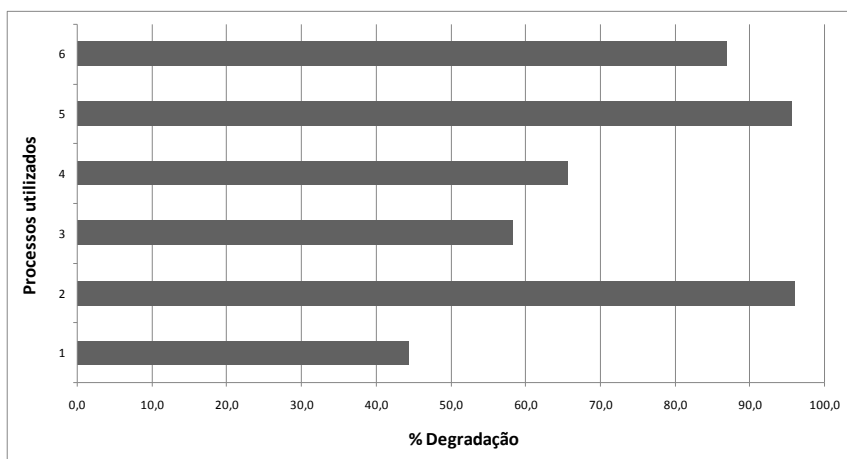
**FIGURA 3.15** - Monitoramento da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do antibiótico sulfato de gentamicina. (a) Biomassa advinda de biodigestores anaeróbios, (b) biomassa de reatores UASB e (c) biomassa de lodos ativados.



Ao avaliar a biodegradação do antibiótico de forma específica, Figura 3.16, observa-se que o processo de aclimação melhora a taxa de biodegradação deste composto. Este aumento de

biodegradabilidade é observado de forma expressiva para as biomassas advindas de reatores que trabalham com lodos ativados e biodigestores anaeróbios. Já a biomassa advinda de reatores UASB demonstrou uma eficiência de 95 % na biodegradação do sulfato de gentamicina e o processo de aclimação não alterou a eficiência de remoção.

**FIGURA 3.16** - Percentagem de biodegradabilidade verificada nos reatores com o antibiótico sulfato de gentamicina. Sendo: (1) lodos ativados, (2) UASB, (3) biodigestor anaeróbio, (4) lodos ativados aclimatado, (5) UASB aclimatado e (6) biodigestor anaeróbio aclimatado.



### 5.2.3 Identificação dos metabólitos formados durante os ensaios de biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia

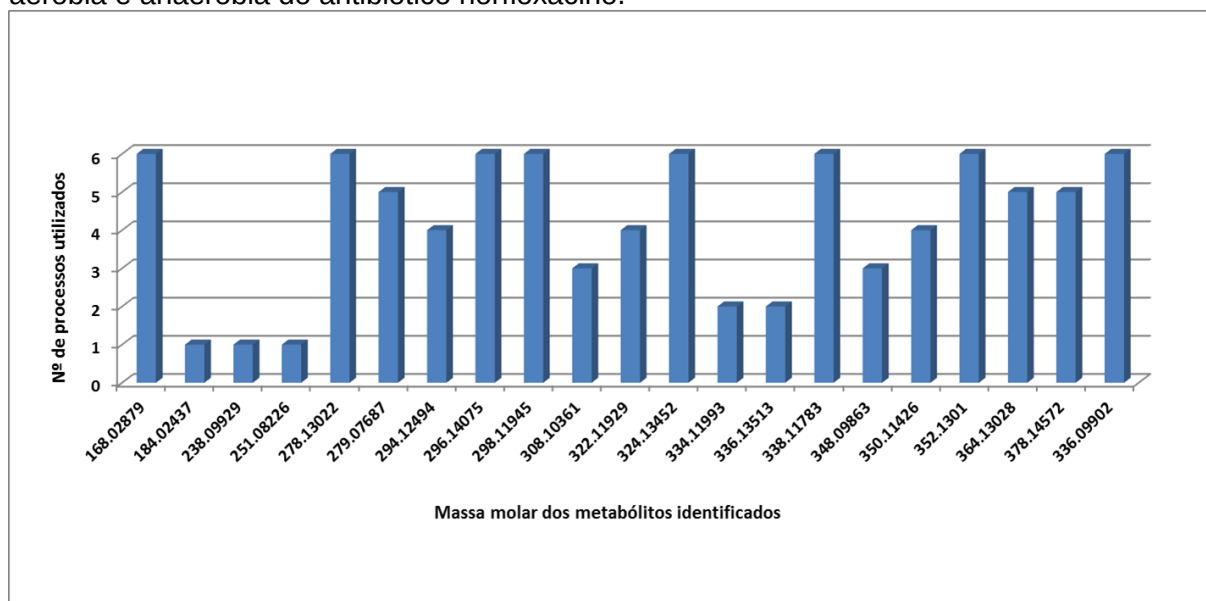
Ao utilizar tratamentos biológicos na remoção de fármacos deve-se levar em consideração a degradação bioquímica que ocorrem para cada composto, lembrando que essa degradação apresenta como resultado metabólitos que podem ser mais estáveis do que os seus compostos originais. Desta maneira, uma etapa importante e amplamente relatada pela literatura (GROSS *et al.*, 2014; PRIETO *et al.*, 2011) é a identificação dos metabolitos gerados.

Os cromatogramas gerados encontram-se nos Apêndices A e B desta Tese.

#### 5.2.3.1 Antibiótico norfloxacino

Para todos os processos utilizados foram encontrados metabólitos. Na Figura 3.17 é possível observar que alguns metabólitos podem ser observados em todos os testes de biodegradabilidade utilizados e que outros são bem específicos.

**FIGURA 3.17** - Número de metabólitos verificados durante os ensaios de biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do antibiótico norfloxacino.

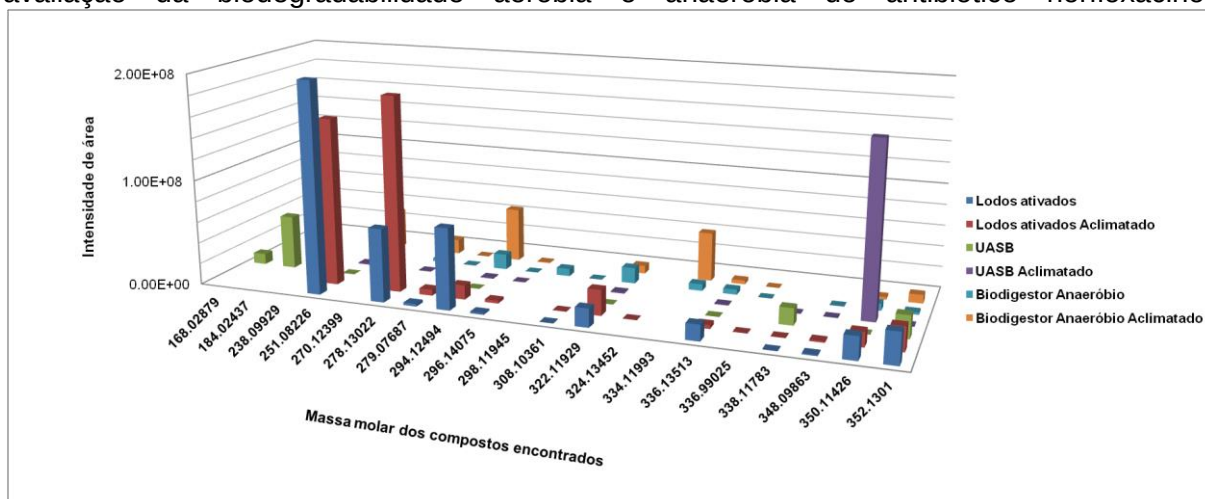


Esta diferença entre os metabólitos gerados é atribuída a via metabólica específica dos microrganismos presentes em cada biomassa estudada. Esta diferença de vias metabólicas pode, então, atribuir mais ou menos toxicidade ao efluente tratado necessitando, portanto, de uma etapa de estudo voltada para os ensaios ecotoxicológicos. A escolha por um processo de tratamento não deve ser baseada somente na eficiência de remoção, pois alguns metabólitos gerados são mais tóxicos que os compostos que lhes deram origem.

Na Figura 3.18 é possível verificar que mesmos os compostos que são encontrados em todos os ensaios de biodegradabilidade realizados estão presentes em concentrações diferentes nos diversos processos estudados. Não foi possível quantificar cada metabólito devido a ausência de padrões analíticos, mas pode-se verificar através da intensidade da área cromatográfica sua disponibilidade no meio reacional.

Observa-se que para alguns casos, como os que utilizaram lodos ativados, o processo de aclimação leva a formação de alguns subprodutos em uma intensidade menor, como pode ser verificado com os TPs (transformation products) de massa molar 251,08226 e 294,12494.

**FIGURA 3.18** - Intensidade de área dos metabólitos encontrados durante o processo de avaliação da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do antibiótico norfloxacino.



Nas Tabelas 10 e 11 são apresentadas as possíveis estruturas moleculares dos metabólitos encontrados durante os ensaios de biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia. Vários destes compostos já foram relatados na literatura e outros foram identificados durante este estudo. Nesta tabela cita-se pelo menos um trabalho que relate o TPs e os que não tiverem citações são considerados compostos inéditos.

**Tabela 3.10** - Estrutura molecular dos compostos encontrados durante a avaliação da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do antibiótico norfloxacin. Biomassas utilizadas: (1) lodos ativados, (2) lodos ativados aclimatado, (3) biodigestor anaeróbio, (4) biodigestor anaeróbio aclimatado, (5) UASB e (6) UASB aclimatado.

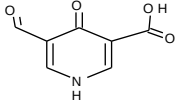
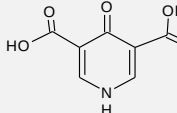
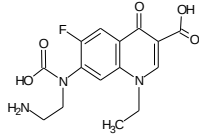
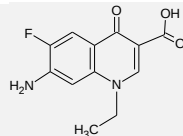
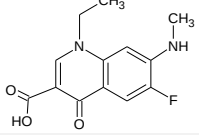
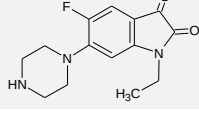
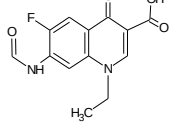
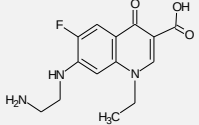
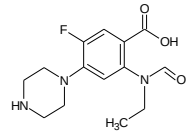
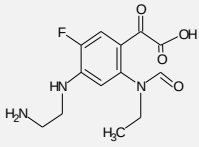
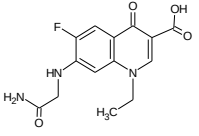
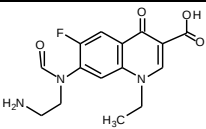
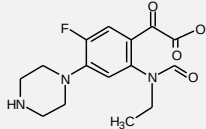
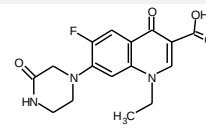
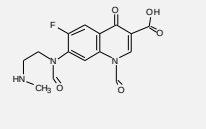
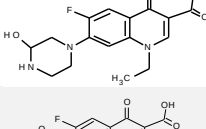
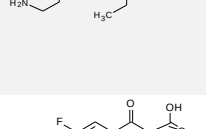
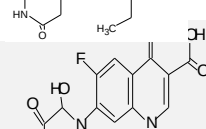
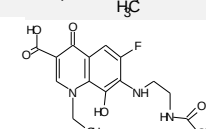
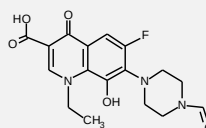
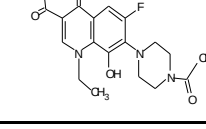
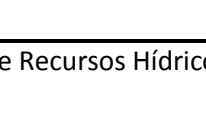
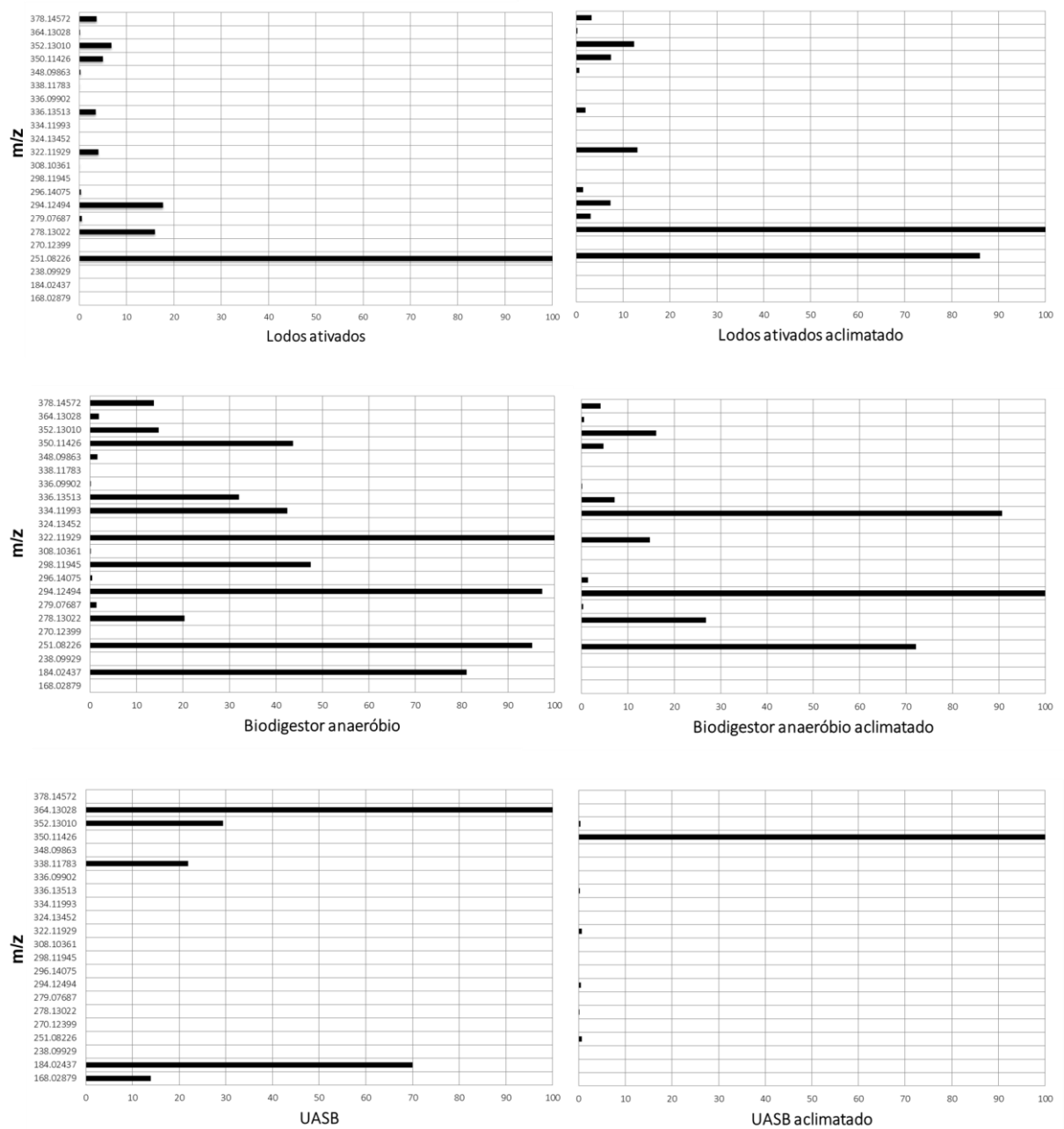
| Relação Massa/Carga (m/z) | Fórmula proposta                                                | Erro (ppm) | DBE | Nome IUPAC                                                                                     | Estrutura proposta                                                                    | Biomassa utilizada | Refs                                               |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------|------------|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|----------------------------------------------------|
| 168,02879                 | C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>4</sub>                   | -2.01      | 5,5 | 5-formyl-4-oxo-1,4-dihydropyridine-3-carboxylic acid                                           |    | 4                  | Babic <i>et al.</i> 2013                           |
| 184,02437                 | C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>5</sub>                   | +1,74      | 5,5 | 4-oxo-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylic acid                                                |    | 5                  | Babic <i>et al.</i> 2013                           |
| 238,09929                 | C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> N <sub>3</sub> F | +1.12      | 5,5 | 7-[(2-aminoethyl)(carboxy)amino]-1-ethyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid |    | 4                  | Liu <i>et al.</i> 2012                             |
| 251,08226                 | C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>  | +1.34      | 7,5 | 7-amino-1-ethyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid                          |    | Todos              | Liu <i>et al.</i> 2012                             |
| 265,09830                 | C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>  | -0.38      | 7,5 | 1-ethyl-6-fluoro-7-(methylamino)-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid                  |   | 2                  |                                                    |
| 278,13022                 | C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>2</sub>  | +1.03      | 7,5 | 1-ethyl-5-fluoro-6-(piperazin-1-yl)-1H-indole-2,3-dione                                        |  | 1, 2, 3, 4, e 6    | Liu <i>et al.</i> 2012                             |
| 279,07687                 | C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>4</sub>  | -1.30      | 8,5 | 1-ethyl-6-fluoro-7-(formylamino)-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid                  |  | 1, 2, 3, 4,        | Liu <i>et al.</i> 2012                             |
| 294,12494                 | C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>  | +0.72      | 7,5 | 7-[(2-aminoethyl)amino]-1-ethyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid          |  | Todos              | Liu <i>et al.</i> 2012 e Prieto <i>et al.</i> 2011 |
| 296,14075                 | C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>  | -1.90      | 6,5 | 2-[ethyl(formyl)amino]-5-fluoro-4-(piperazin-1-yl)benzoic acid                                 |  | Todos              | Liu <i>et al.</i> 2012                             |
| 298,11945                 | C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>  | -1,04      | 6,5 | {4-[(2-aminoethyl)amino]-2-[ethyl(formyl)amino]-5-fluorophenyl}(oxo)acetic acid                |  | 3, 4 e 5           | Liu <i>et al.</i> 2012                             |
| 308,10361                 | C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>  | -1.62      | 8,5 | 7-[(2-amino-2-oxoethyl)amino]-1-ethyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid    |  | 1, 2, 3 e 5        | Liu <i>et al.</i> 2012                             |

**Tabela 3.11** - Estrutura molecular dos compostos encontrados durante a avaliação da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do antibiótico norfloxacin. Biomassas utilizadas: 1) lodos ativados, 2) lodos ativados aclimatado, 3) biodigestor anaeróbio, 4) biodigestor anaeróbio aclimatado, 5) UASB e 6) UASB aclimatado.... *Continuação*

| Relação Massa/Carga (m/z) | Fórmula proposta                                               | Erro (ppm) | DBE  | Nome IUPAC                                                                                              | Estrutura proposta                                                                   | Biomassa utilizada | Refs                                                   |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------|------------|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------------------|
| 322.11929                 | C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> | -1.46      | 8.5  | 7-[(2-aminoethyl)(formyl)amino]-1-ethyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid           |    | Todos              | Liu <i>et al.</i> 2012                                 |
| 324.13452                 | C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>5</sub> | +1.98      | 7.5  | {2-[ethyl(formyl)amino]-5-fluoro-4-(piperazin-1-yl)phenyl}(oxo)acetic acid                              |    | 1, 3 e 4           | Liu <i>et al.</i> 2012                                 |
| 334.11993                 | C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> | +0,42      | 9.5  | 1-ethyl-6-fluoro-4-oxo-7-(3-oxopiperazin-1-yl)-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid                   |    | 5 e 6              | Liu <i>et al.</i> 2012                                 |
| 336.09902                 | C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>5</sub> | +1.76      | 7.5  | 6-fluoro-1-formyl-7-{formyl[2-(methylamino)ethyl]amino}-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid    |    | 2, 3 e 4           | Babic <i>et al.</i> 2013                               |
| 336.13513                 | C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> | -1.37      | 8.5  | 1-ethyl-6-fluoro-7-(3-hydroxypiperazin-1-yl)-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid               |  | Todos              | Liu <i>et al.</i> 2012                                 |
| 338.11783                 | C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>5</sub> | +1.28      | 7.5  | 7-[(2-aminoethyl)(carboxy)amino]-1-ethyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid          |  | 1, 2 e 6           | Liu <i>et al.</i> 2012                                 |
| 348.09863                 | C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>5</sub> | -1.14      | 10.5 | 7-(3,5-dioxopiperazin-1-yl)-1-ethyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid               |  | 1, 2, 3 e 6        | Liu <i>et al.</i> 2012                                 |
| 350.11426                 | C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>5</sub> | -1.44      | 9.5  | 1-ethyl-6-fluoro-7-(2-hydroxy-3-oxopiperazin-1-yl)-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid         |  | Todos              | Liu <i>et al.</i> 2012                                 |
| 352.13010                 | C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>5</sub> | -0.64      | 8.5  | 7-[(2-(acetylamino)ethyl)amino]-1-ethyl-6-fluoro-8-hydroxy-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid |  | 1, 2, 3, 4 e 6     | Liu <i>et al.</i> 2012<br>Parshikov <i>et al.</i> 2001 |
| 364.13028                 | C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>5</sub> | -0.13      | 9.5  | 1-ethyl-6-fluoro-7-(4-formylpiperazin-1-yl)-8-hydroxy-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid      |  | 1, 2, 3, 4 e 6     | Parshikov <i>et al.</i> 2001                           |
| 378.14572                 | C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>5</sub> | -0.67      | 9.5  | 7-(4-acetyl-piperazin-1-yl)-1-ethyl-6-fluoro-8-hydroxy-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid     |  | Todos              | Parshikov <i>et al.</i> 2001                           |

Para facilitar a visualização e permitir uma melhor interpretação dos dados encontrados na Figura 3.19 são apresentados os dados normalizados, que nos permite visualizar quais TP's podem ser mais ou menos tóxicos em relação a sua maior ou menor presença no meio reacional.

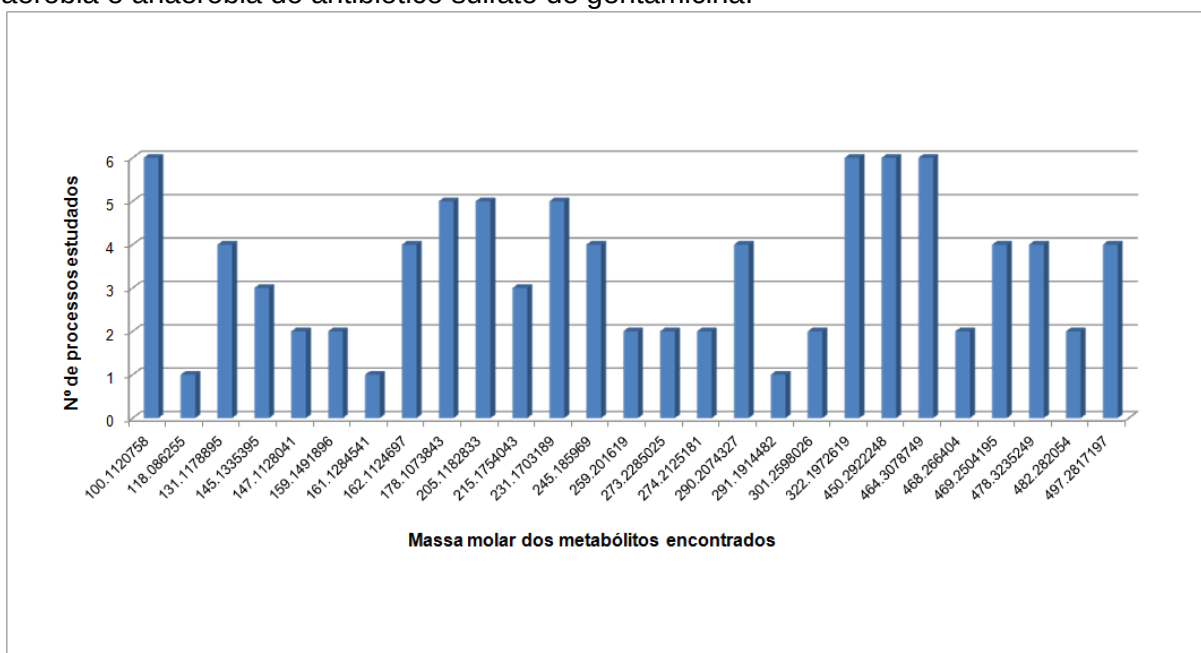
**FIGURA 3.19** - Metabólitos encontrados após ensaios de biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia para o antibiótico norfloxacino.



### 5.2.3.2 Antibiótico sulfato de gentamicina

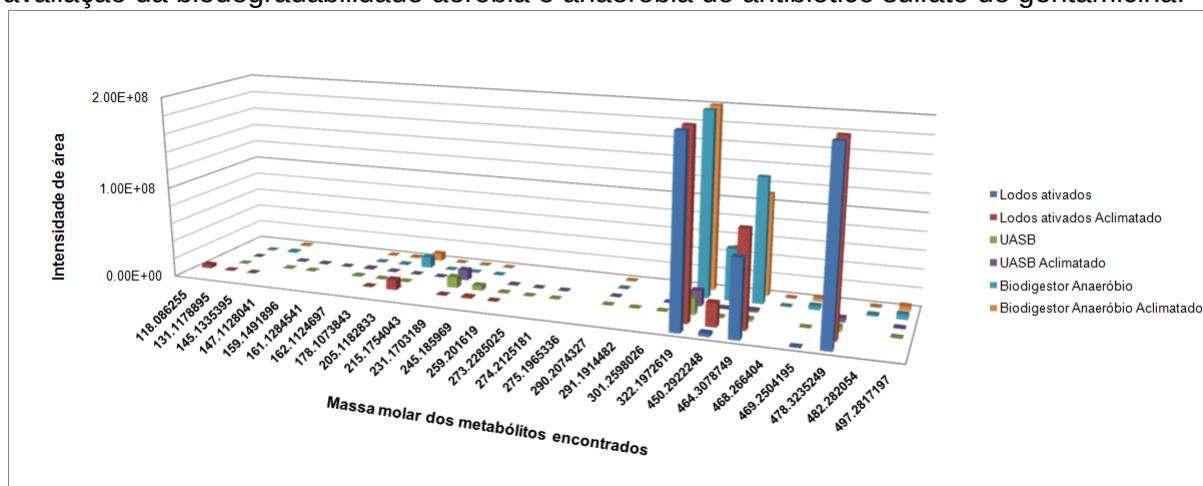
Semelhantes aos dados encontrados para o antibiótico norfloxacino, durante os ensaios de biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia para o antibiótico sulfato de gentamicina foram identificados vários TPs. Na Figura 3.20 é possível observar que alguns metabólitos podem ser observados em todos os testes de biodegradabilidade utilizados e que outros são bem específicos.

**FIGURA 3.20** - Número de metabólitos verificados durante os ensaios de biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do antibiótico sulfato de gentamicina.



Para o antibiótico sulfato de gentamicina observa-se a presença do TP 322,19726 em todos os processos estudados. Este composto já foi relatado pela literatura (LOFFTER *et al.*, 2005; LI, *et al.*, 2011) e é formado mesmo quando não se aplica nenhuma forma de tratamento. Pode-se dizer que se trata de uma decomposição natural deste antibiótico e que eventuais tratamentos utilizados simplesmente aumentam sua concentração no meio reacional. Na Figura 3.21 é possível verificar a intensidade com que os produtos de degradação estão presentes nos sistemas estudados.

**FIGURA 3.21** - Intensidade de área dos metabólitos encontrados durante o processo de avaliação da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do antibiótico sulfato de gentamicina.



Os TPs de massas molares 450,29222, 464,307875 e 478,32352 são íons moleculares do antibiótico sulfato de gentamicina, visto que este fármaco se apresenta na forma de uma mistura contendo três compostos distintos.

Nas Tabelas 12, 13e 14 são apresentadas as possíveis estruturas moleculares dos metabólitos encontrados durante os ensaios de biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia para o sulfato de gentamicina. Alguns destes compostos já foram relatados na literatura e outros foram identificados durante este estudo. Nesta tabela cita-se pelo menos um trabalho que relate o TPs e os que não tiverem citações são considerados compostos inéditos.

**Tabela 3.12** – Estrutura molecular dos compostos encontrados durante a avaliação da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do antibiótico norfloxacino. Biomassas utilizadas: (1) lodos ativados, (2) lodos ativados aclimatado, (3) biodigestor anaeróbio, (4) biodigestor anaeróbio aclimatado, (5) UASB e (6) UASB aclimatado.

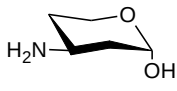
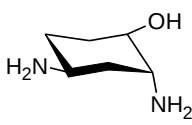
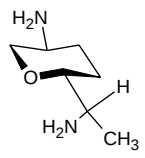
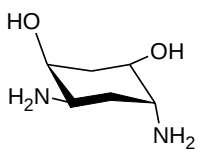
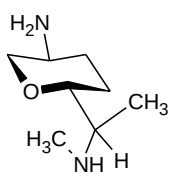
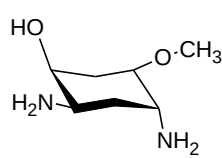
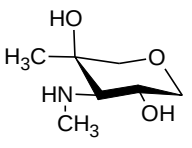
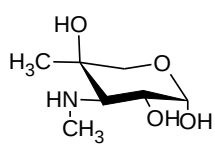
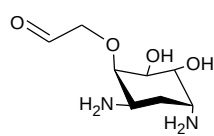
| Experimental (m/z) | Fórmula molecular proposta                                   | Erro ppm | DBE (double bond equivalents) | IUPAC name                                                      | Estrutura proposta                                                                   | Tratamento utilizado | Refs                      |
|--------------------|--------------------------------------------------------------|----------|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------------|
| 100,1120758        | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N                             | 1,14     | 0,5                           | Ciclohexanamina                                                 |   | Todos                |                           |
| 118,086255         | C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>               | -0,88    | 0,5                           | (2S)-4-aminotetrahydro-2H-piran-2-ol                            |   | 2                    |                           |
| 131,1178895        | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O              | -1,16    | 0,5                           | (2R)-2,4-diaminociclohexanol                                    |    | 1, 2, 3, 5 e 6       |                           |
| 145,1335395        | C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O              | -1,75    | 0,5                           | (6S)-6-(1-aminoetil)tetrahydro-2H-piran-3-amina                 |   | 2, 3 e 4             |                           |
| 147,1128041        | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | -0,08    | 0,5                           | (1S,4R)-4,6-diaminociclohexano-1,3-diol                         |   | 5 e 6                |                           |
| 159,1491896        | C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O              | -0,99    | 0,5                           | (6S)-6-[1-(metilamino)etil]tetrahydro-2H-piran-3-amina          |  | 5 e 6                |                           |
| 161,1284541        | C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 1,23     | 0,5                           | (1S,4R)-2,4-diamino-5-metoxiciclohexanol                        |  | 6                    | Getek <i>et al</i> , 1991 |
| 162,1124697        | C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>               | -1,14    | 0,5                           | (3R,5S)-3-metil-4-(metilamino)tetrahydro-2H-piran-3,5-diol      |  | 3, 4, 5 e 6          |                           |
| 178,1073843        | C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub>               | -1,33    | 0,5                           | 5-metil-4-(metilamino)tetrahydro-2H-piran-2,3,5-triol           |  | Todos                |                           |
| 205,1182833        | C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> | -1,70    | 1,5                           | {[(1R,4R)-4,6-diamino-2,3-dihidroxiciclohexil]oxi} acetaldehide |  | 2, 3, 4, 5 e 6       |                           |

**Tabela 3.13** – Estrutura molecular dos compostos encontrados durante a avaliação da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do antibiótico norfloxacin. Biomassas utilizadas: (1) lodos ativados, (2) lodos ativados aclimatado, (3) biodigestor anaeróbio, (4) biodigestor anaeróbio aclimatado, (5) UASB e (6) UASB aclimatado.....**Continuação.**

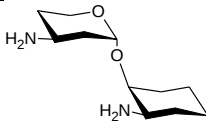
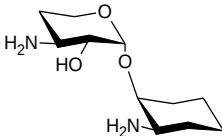
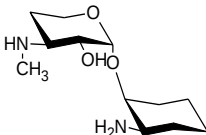
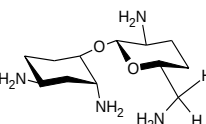
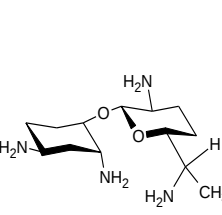
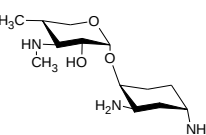
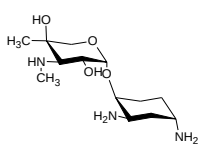
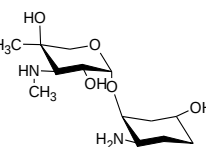
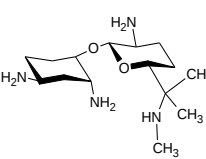
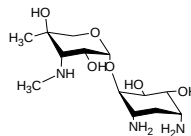
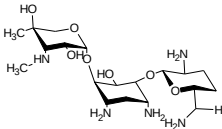
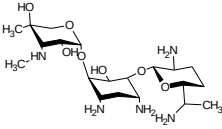
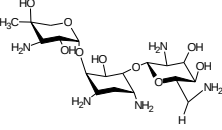
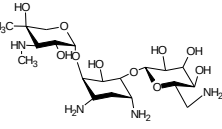
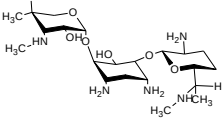
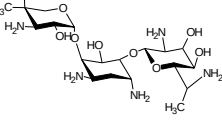
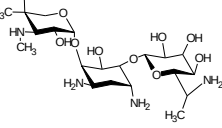
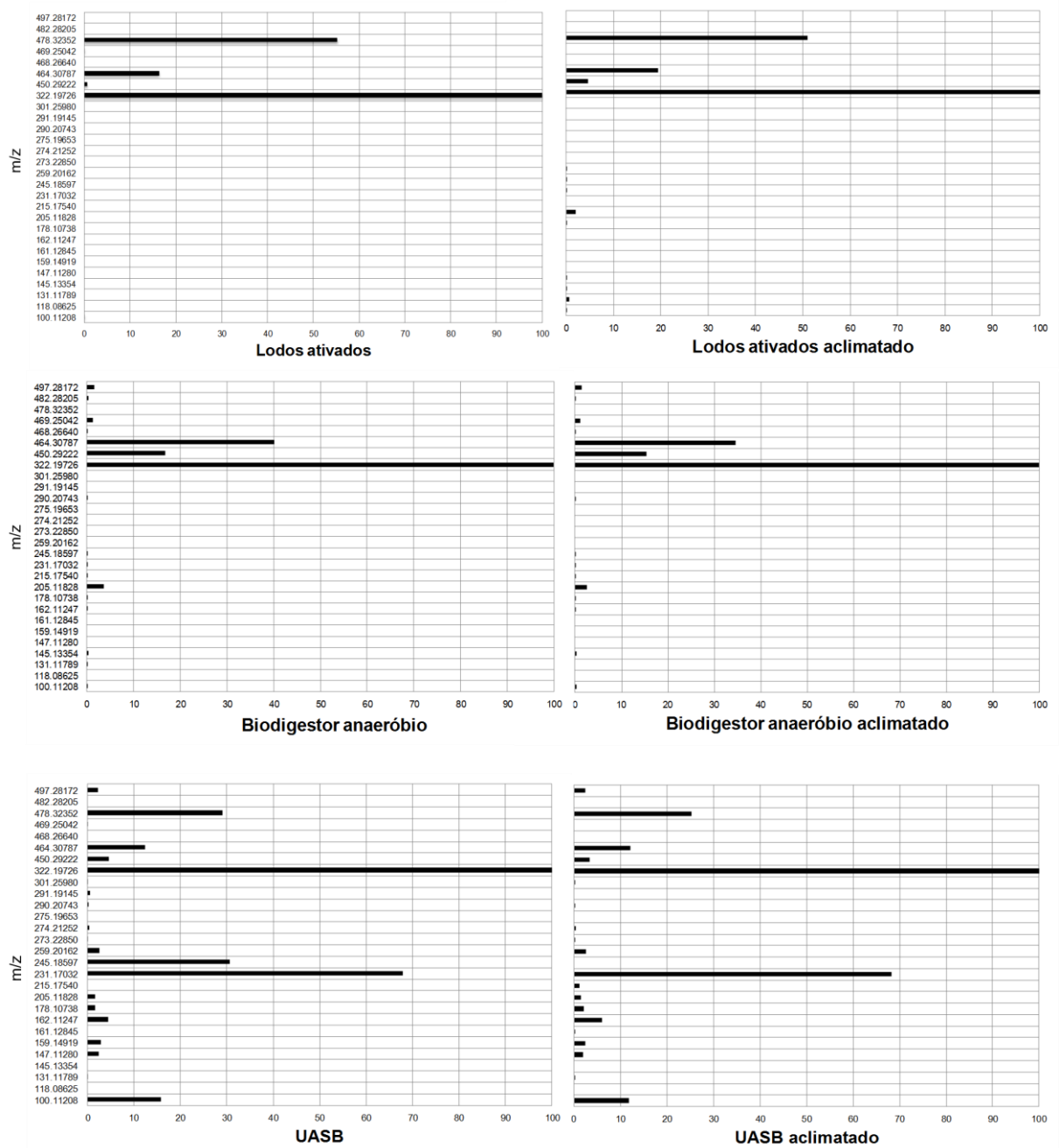
| Experimental (m/z) | Fórmula molecular proposta                                    | Erro ppm     | DBE (double bond equivalents) | IUPAC name                                                                                       | Estrutura proposta                                                                    | Tratamento utilizado | Refs                |
|--------------------|---------------------------------------------------------------|--------------|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------|
| 215,1754043        | C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 0,33         | 2,0                           | (2R)-2-[[[(1S)-2-aminociclohexil]oxi]tetra hidro-2H-piran-4-amina                                |     | 3, 4, 5 e 6          |                     |
| 231,1703189        | C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | -1,65        | 2,0                           | 6-amino-2-[[[2-aminociclohexil]oxi]ciclo hex-2-en-1-ol                                           |     | 2, 3, 4, 5 e 6       |                     |
| 245,185969         | C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | -1,53        | 2,0                           | 2-[[[2-aminociclohexil]oxi]-4-(metilamino)tetrahidro-2H-piran-3-ol                               |     | 2, 3, 4 e 5          |                     |
| 259,201619         | C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> | -0,78        | 2,0                           | (3R)-4-[[[(2R,6S)-3-amino-6-(aminometil)tetrahidro-2H-piran-2-il]oxi]ciclohexano-1,3-diamina     |    | 2, 5 e 6             |                     |
| 273,2285025        | C <sub>13</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> | -1,07        | 2,0                           | (3R)-4-[[[(2R,6S)-3-amino-6-(1-aminoetil)tetrahidro-2H-piran-2-il]oxi]ciclohexano-1,3-diamina    |   | 5 e 6                |                     |
| 274,2125181        | C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | -0,31        | 2,0                           |                                                                                                  |   | 5 e 6                |                     |
| 290,2074327        | C <sub>13</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> | -1,07        | 2,0                           | 2-[[[2,4-diaminociclohexil]oxi]-5-metil-4-(metilamino)tetrahidro-2H-piran-3,5-diol               |  | 3, 4, 5 e 6          |                     |
| 291,1914482        | C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | -0,04        | 2,0                           | 4-amino-2-[[[2-amino-5-hidroxiciclohexil]oxi]-5-metiltetrahidro-2H-piran-3,5-diol                |   | 5                    |                     |
| 301,2598026        | C <sub>15</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> | -0,325367525 | 2,0                           |                                                                                                  |   | 5 e 6                |                     |
| 322,1972619        | C <sub>13</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> | -1,12491936  | 2,0                           | 2-[[[4,6-diamino-2,3-dihidroxiciclohexil]oxi]-5-metil-4-(metilamino)tetrahidro-2H-piran-3,5-diol |  | Todos                | Loffter et al. 2003 |

**Tabela 3.14** – Estrutura molecular dos compostos encontrados durante a avaliação da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do antibiótico norfloxacin. Biomassas utilizadas: (1) lodos ativados, (2) lodos ativados aclimatado, (3) biodigestor anaeróbio, (4) biodigestor anaeróbio aclimatado, (5) UASB e (6) UASB aclimatado....**Continuação.**

| Experimental (m/z) | Fórmula molecular proposta                                     | Erro ppm | DBE (double bond equivalents) | IUPAC name           | Estrutura proposta                                                                   | Tratamento utilizado | Refs                   |
|--------------------|----------------------------------------------------------------|----------|-------------------------------|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|------------------------|
| 450,2922248        | C <sub>19</sub> H <sub>39</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>  | -0,72    | 3,0                           | Gentamicina C1a      |    | Todos                |                        |
| 464,3078749        | C <sub>20</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>  | -0,95    | 3,0                           | Gentamicina C2 e C2a |    | Todos                |                        |
| 468,266404         | C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub>  | -1,60    | 3,0                           |                      |    | 3 e 4                | Li <i>et al</i> , 2011 |
| 469,2504195        | C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub> | -0,69    | 3,0                           |                      |   | 1, 3, 4 e 5          | Li <i>et al</i> , 2011 |
| 478,3235249        | C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>  | -1,16    | 3,0                           | Gentamicina C1       |  | 1, 2, 5 e 6          |                        |
| 482,282054         | C <sub>19</sub> H <sub>39</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub>  | -1,54    | 3,0                           |                      |  | 3 e 4                | Li <i>et al</i> , 2011 |
| 497,2817197        | C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub> | -1,86    | 3,0                           |                      |  | 3, 4, 5 e 6          | Li <i>et al</i> , 2011 |

Para facilitar a visualização e permitir uma melhor interpretação dos dados encontrados na Figura 3.22, são apresentados os dados normalizados, que nos permite visualizar quais TPs podem ser mais ou menos tóxicos em relação a sua maior ou menor presença no meio reacional.

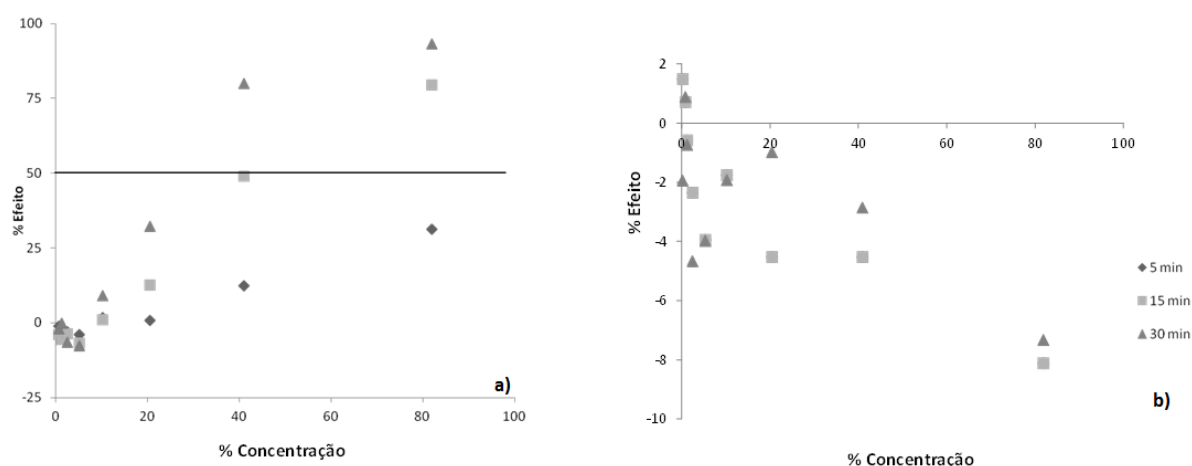
**FIGURA 3.22** - Metabólitos encontrados após ensaios de biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia para o antibiótico sulfato de gentamicina.



### 5.2.4 Ensaios ecotoxicológicos para os antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina

Na Figura 3.23 são apresentados os resultados dos ensaios ecotoxicológicos para as concentrações iniciais dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina utilizando a bactéria marinha luminescente *Allivibrio fischeri*.

**FIGURA 3.23** - Redução de luminescência em função da concentração do antibiótico em 5, 15 e 30 minutos. (a) Norfloxacino,  $C_0=15$  mg/L e (b) Sulfato de gentamicina,  $C_0=100$  mg/L.



As análises ecotoxicológicas realizadas mostraram que o norfloxacino, a 15 mg/L, apresenta efeito tóxico ao organismo testado, com o  $CE_{50}$  de 26,25% em 30 (trinta) minutos. Já o sulfato de gentamicina, a 100 mg/L, não apresentou toxicidade mesmo após 30 (trinta) minutos de exposição. Além disso, para o sulfato de gentamicina foi detectada hormesis, isso é, um desvio positivo apresentado pelo organismo-teste na presença do contaminante. Ressalta-se que a detecção da hormesis não é sinal de que o contaminante seja benéfico ao organismo, ao contrário, pode tratar-se de contaminante que se apresenta tóxico em testes de toxicidade crônica.

Nos ensaios realizados utilizando biomassa advinda dos reatores UASB, tanto com bactérias aclimatadas quanto com bactérias não aclimatadas, não foi detectada toxicidade para nenhum dos dois antibióticos. Em todos os testes, incluindo os reatores *Controles* (glicose), foi detectada a hormesis. Essa detecção provavelmente justifica-se pelo fato de ser o UASB o método mais eficaz para a remoção dos antibióticos estudados.

Já nos testes realizados com biomassa provenientes dos biodigestores anaeróbios, houve indício de toxicidade em alguns dos reatores. Isto é, o meio reacional não estava tóxico ( $CE_{50}>81,9\%$ ), mas houve efeito de inibição de luz sob as bactérias. Nesse caso, os resultados

são expressos em “maior porcentagem de efeito”, o que significa maior efeito de inibição de luz detectada. No reator com norfloxacino e biomassa sem aclimação, o maior efeito de inibição de luz observado foi de 12,99% em 30 minutos. Já no reator com norfloxacino, onde foi realizado o processo de aclimação da biomassa, esse efeito foi de 7,88% em 30 minutos, portanto menor que o observado na presença de bactérias não aclimatadas, que são menos eficientes. Ao analisar os resultados contidos na Figura 3.18 observa-se que os TPs 184.02437, 298.1194 e 348.0986 somente estão presentes nos reatores com biomassa sem aclimação e que o TP 350 está presente em uma concentração maior que no reator aclimatado.

Ressalta-se que amostras cujo resultado de toxicidade é expresso em “maior porcentagem de efeito” geralmente são tóxicas em testes de toxicidade aguda mais longos ou, ainda, em testes de toxicidade crônica.

Os reatores aeróbios foram os mais tóxicos dentre todos os avaliados, evento que pode ser justificado pela menor eficiência desse tipo de biomassa em biodegradar os antibióticos em estudo. Os resultados dos ensaios ecotoxicológicos são apresentados na Tabela 3.15.

Foi possível observar que os reatores com biomassa aclimatada apresentam toxicidade mais elevada que os reatores sem aclimação. Esse fato parece contradizer os resultados obtidos pela avaliação do tratamento biológico, que apontam a aclimação como responsável por discreta melhoria na capacidade de biodegradabilidade das bactérias. Para o antibiótico norfloxacino, entretanto, observa-se pela Figura 3.18 que os TP 251.0822 e 294.1249 aparecem em maior concentração se comparado ao reator sem aclimação. Estes resultados sugerem que estes compostos podem atribuir toxicidade ao meio reacional. Além disso, pôde-se verificar através dos ensaios de lise celular que o próprio norfloxacino endógeno é capaz de voltar ao meio reacional após um período sem disponibilidade de alimento. Esta situação é verificada ao final dos ensaios de biodegradabilidade onde a disponibilidade de alimento para os microrganismos é pequena.

Acredita-se que o comportamento do sulfato de gentamicina seja semelhante ao norfloxacino e que após um período sem disponibilidade de alimento o antibiótico endógeno possa voltar ao meio reacional. Além disso, observa-se a presença de diversos TPs que somente aparecem nos reatores aclimatados (100.1120, 118.0862, 131.1178, 145.1335, 178.1073, 205.1182, 231.1703, 245.1859 e 259.2016). Os resultados sugerem que estes compostos ou o sinergismo deles podem contribuir com a toxicidade do meio.

**Tabela 3.15** - Resultados de toxicidade (CE<sub>50</sub>) de efluentes provenientes de tratamento por lodos ativados (aclimatados e não aclimatados)

| Tratamento por Lodos Ativados |                              |                              |
|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Reator                        |                              | CE <sub>50</sub><br>(30 min) |
| Não aclimatados               | Controle                     | 58,83%                       |
|                               | Norfloxacino                 | 25,94%                       |
|                               | Gentamicina                  | 32%                          |
| Aclimatados                   | Controle (lodo Norfloxacino) | 1,31%                        |
|                               | Norfloxacino                 | 2,14%                        |
|                               | Controle (lodo Gentamicina)  | 8,55%                        |
|                               | Gentamicina                  | 3,58%                        |

É importante salientar que mesmo o efluente proveniente do reator controle (glicose) de lodos ativados é tóxico (CE<sub>50</sub> (30 min) 58,83%, embora menos que os demais. Isso sugere que a biomassa, por si só, proporciona toxicidade ao efluente.

### 5.2.5 Comparação entre os processos utilizados

Na Tabela 3.16 é apresentado um compilado das condições analíticas e eficiências de remoções encontradas durante a realização dos ensaios de biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia para os antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina.

É possível observar que cada antibiótico se comporta de maneira diferente frente aos ensaios de biodegradabilidade realizados. No caso do antibiótico norfloxacino verifica-se que se trata de um composto não biodegradável mesmo quando utiliza-se condições controladas, onde todos os nutrientes necessários para que a biomassa possa fazer a degradação da matéria orgânica estejam presentes. Já o sulfato de gentamicina pode ser degradado biologicamente atingindo taxas de remoções de até 95,7%.

**Tabela 3.16** - Resumo das principais condições analíticas utilizadas e remoções observadas durante os ensaios de biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia utilizando os antibióticos (a) norfloxacino e (b) sulfato de gentamicina.

| Processos utilizados            | Processos biológicos sem aclimação |          |                          | Processos biológicos aclimatados |          |                          |
|---------------------------------|------------------------------------|----------|--------------------------|----------------------------------|----------|--------------------------|
|                                 | Lodos ativados                     | UASB     | Biodigestores anaeróbios | Lodos ativados                   | UASB     | Biodigestores anaeróbios |
| Concentração Inicial mg/L       | 4.1                                | 2.7      | 4.8                      | 2.5                              | 1.9      | 2.0                      |
| Concentração Final mg/L UV      | 3.6                                | 2.1      | 3.9                      | 3.4                              | 1.7      | 2.6                      |
| Concentração Final mg/L HPLC/MS | 3.7                                | 2.1      | 3.9                      | 3.3                              | 1.6      | 2.7                      |
| Temperatura                     | Ambiente                           | Ambiente | Ambiente                 | Ambiente                         | Ambiente | Ambiente                 |
| Tempo                           | 30 dias                            | 30 dias  | 30 dias                  | 30 dias                          | 30 dias  | 30 dias                  |
| pH                              | 7                                  | 7        | 7                        | 7                                | 7        | 7                        |
| Relação Otimizada               | *NA                                | *NA      | *NA                      | *NA                              | *NA      | *NA                      |
| % Degradação UV/VIS 273 nm      | 12.5                               | 23       | 18                       | -35.8                            | 9.7      | -31.7                    |
| % Degradação HPLC/MS            | 10.08                              | 21.11    | 18.73                    | -30.91                           | 13.99    | -35.47                   |
| % Mineralização (COT)**         | *NA                                | *NA      | *NA                      | *NA                              | *NA      | *NA                      |

**(a)**

| Processos utilizados            | Processos biológicos sem aclimação |          |                          | Processos biológicos aclimatados |          |                          |
|---------------------------------|------------------------------------|----------|--------------------------|----------------------------------|----------|--------------------------|
|                                 | Lodos ativados                     | UASB     | Biodigestores anaeróbios | Lodos ativados                   | UASB     | Biodigestores anaeróbios |
| Concentração Inicial mg/L       | 100                                | 100      | 100                      | 100                              | 100      | 100                      |
| Concentração Final mg/L HPLC/MS | 55.7                               | 4.0      | 41.7                     | 34.4                             | 4.3      | 13.0                     |
| Temperatura                     | Ambiente                           | Ambiente | Ambiente                 | Ambiente                         | Ambiente | Ambiente                 |
| Tempo                           | 30 dias                            | 30 dias  | 30 dias                  | 30 dias                          | 30 dias  | 30 dias                  |
| pH                              | 7                                  | 7        | 7                        | 7                                | 7        | 7                        |
| Relação Otimizada               | *NA                                | *NA      | *NA                      | *NA                              | *NA      | *NA                      |
| % Degradação HPLC/MS            | 44.3                               | 96       | 58.3                     | 65.6                             | 95.7     | 87.0                     |
| % Mineralização (COT)**         | *NA                                | *NA      | *NA                      | *NA                              | *NA      | *NA                      |

**(b)**

\*NA Não se aplica

\*\* Determinação de carbono orgânico total

## 6. CONCLUSÕES

De forma geral, o Capítulo 3, alerta para importância de um estudo aprofundado sobre a remoção de cada composto independente da técnica empregada como tratamento.

Observa-se que tanto a biodegradabilidade aeróbia quanto anaeróbia alcançaram valores de remoções em torno de 80%, quando avaliou-se a concentração de carbono orgânico total. Avaliando a concentração do norfloxacino, através da absortividade molar em 273 nm, observou-se que o composto não foi totalmente biodegradado pelas biomassas utilizadas, mesmo após o processo de aclimação. As remoções máximas observadas foram de 23 e 18% ao se utilizar biomassas advindas de reatores UASB e biodigestores anaeróbios, respectivamente.

Além disto, os resultados encontrados nos reatores *Controles*, para o antibiótico norfloxacino, com aclimação de biomassa, indicam que após decaimento da matéria orgânica biodegradável (glicose) inicia-se um processo de lise celular em que parte do antibiótico já absorvido pelo microrganismo é liberado para o meio reacional. Estes resultados sugerem a inviabilidade da utilização de tratamento biológico como único sistema de tratamento, para efluentes que contenham norfloxacino.

Para o sulfato de gentamicina, observou-se que o processo envolvendo biomassas advindas de reatores UASB mostrou-se adequado obtendo-se 96% de remoção. No entanto, vale lembrar que os ensaios de biodegradabilidade possuem condições otimizadas e que os resultados encontrados podem não ser reprodutivos em escala real, onde as condições trabalhadas nem sempre são as ideais. Para as demais biomassas, os ensaios de biodegradabilidade demonstraram que o sulfato de gentamicina não é eficientemente removido. Os ensaios envolvendo biomassas advindas de reatores que trabalham com lodos ativados e biodigestores anaeróbios obtiveram valores de remoções de 65 e 87% após aclimação das biomassas.

É importante ressaltar que a utilização de processos biológicos para efluentes que contenham resíduos de antibióticos não é recomendada devido a possibilidade de geração de microrganismos resistentes. Recomenda-se a utilização de processos combinados em que a etapa físico-química possa retirar a atividade biológica do antibiótico para posterior tratamento biológico evitando, assim, a geração de bactérias resistentes.

# Capítulo 4

---

Avaliação dos processos oxidativos e oxidativos avançados–  $H_2O_2$ , UV, UV/ $H_2O_2$ , Fenton e Foto-Fenton– na degradação de norfloxacino e sulfato de gentamicina

## 1. INTRODUÇÃO

Os antibióticos são compostos quimicamente estáveis, e por isso, estima-se que 50 a 90% dos antibióticos ingeridos sejam excretados de forma inalterada e passem a fazer parte do esgoto doméstico. Dependendo das quantidades utilizadas e da taxa de excreção, os antibióticos liberados no esgoto doméstico alcançam as estações de tratamento de esgoto (ETEs) e se não forem degradados chegam ao meio ambiente (KUMPEL *et al.*, 2001).

Os resultados obtidos no Capítulo 3 sugerem que tanto o norfloxacino, quanto o sulfato de gentamicina, não são completamente degradados por processos biológicos, necessitando, portanto, de outras técnicas de tratamento.

O Capítulo 4 propõe a utilização de processos oxidativos e oxidativos avançados para degradar os antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina. Inicialmente foram utilizados processos mais simples como UV e  $H_2O_2$  e posteriormente processos combinados como UV/ $H_2O_2$ , Fenton e foto-Fenton.

Para cada processo utilizado foi realizada a identificação dos produtos de degradação e avaliada a toxicidade dos fármacos antes e após cada tratamento utilizando *Allivibrio fischeri*.

Ao final deste capítulo foi possível observar que nem sempre o melhor tratamento é o que possui maior eficiência de remoção, pois não se deve negligenciar a possibilidade de formação de produtos tóxicos durante o tratamento.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a eficiência do tratamento dos fármacos sulfato de gentamicina e norfloxacino utilizando processos oxidativos e oxidativos avançados -  $\text{H}_2\text{O}_2$ , UV, UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$ , Fenton e Foto-Fenton.

### 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a degradabilidade dos compostos norfloxacino e sulfato de gentamicina utilizando  $\text{H}_2\text{O}_2$  em diferentes concentrações.
- ✓ Avaliar a eficiência da oxidação de Fenton e foto-Fenton na degradabilidade dos compostos norfloxacino e sulfato de gentamicina.
- ✓ Avaliar a eficiência da utilização de radiação UV na degradabilidade destes dois compostos.
- ✓ Avaliar a eficiência da utilização do processo combinado UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$  na degradação dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina.
- ✓ Identificar os produtos de degradação formados após cada processo empregado utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa.
- ✓ Avaliar toxicidade das soluções antes e após os tratamentos realizados utilizando o teste com *Allivibrio fischeri*.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 A utilização de processos oxidativos avançados

A remoção de poluentes orgânicos recalcitrantes presentes no meio ambiente tem mostrado ser um grande desafio devido à capacidade limitada das tecnologias tradicionais utilizadas para tratar efluentes e resíduos industriais.

Na busca por tecnologias eficientes de tratamento, os Processos Oxidativos Avançados (POAs) tem tido seu merecido destaque. Tais processos têm sido propostos como uma alternativa aos processos biológicos, especialmente no tratamento de efluentes contendo compostos biologicamente recalcitrantes. São tecnologias extremamente eficientes para destruição de compostos orgânicos de difícil degradação e, muitas vezes, presentes em baixas concentrações (DEZOTTI, 2003).

Os POAS envolvem a geração de radicais hidroxilas ( $\bullet\text{OH}$ ), um forte oxidante, que destrói as moléculas orgânicas presentes em diversas matrizes aquosas. O sucesso deste processo está baseado no fato de que as constantes de reação para as reações entre os radicais  $\bullet\text{OH}$  e muitos poluentes orgânicos são altas. Essas reações de oxidação são de 1 milhão a 1 bilhão de vezes mais rápidas do que as encontradas com outros oxidantes químicos (DEZOTTI, 2008).

#### 3.2 Aplicação de POAs no tratamento de resíduos de fármacos

As ETEs, geralmente, não atingem uma remoção completa dos produtos farmacêuticos e, por isso, comportam-se como uma importante fonte de liberação destes compostos para o meio ambiente (FENG *et al.*, 2013). Observa-se, portanto, uma busca por tecnologias eficientes para degradação destes compostos objetivando elevar a qualidade dos efluentes tratados.

Os POAs são tecnologias de tratamento úteis na remoção de compostos que sejam tóxicos aos microrganismos ou que não possam ser biologicamente degradados. Estes processos têm sido muito utilizados no tratamento de efluentes industriais contendo resíduos de fármacos. Na Tabela 4.1 são apresentados alguns trabalhos recentemente publicados que utilizaram um ou mais processos oxidativos avançados para degradar fármacos.

**Tabela 4.1** - Relação de trabalhos que utilizam POA para tratar resíduos de fármacos.

| <b>Fármaco</b>       | <b>POA</b>                                                                                                                                          | <b>Referência</b>                  |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Ácido Clofibrato     | O <sub>3</sub>                                                                                                                                      | Quero-Pastor <i>et al</i> , 2014   |
| Ácido Mefenâmico     | UV, UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                                                                                | Cruz <i>et al</i> , 2012           |
|                      | O <sub>3</sub> /UV                                                                                                                                  | Chang <i>et al</i> , 2012          |
| Amoxicilina          | UV, UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                                                                                | Jung <i>et al</i> , 2012           |
|                      | Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV                                                                                                 | Elmolla <i>et al</i> , 2011        |
| Bezafibrato          | UV, UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                                                                                | Cruz <i>et al</i> , 2012           |
|                      | UV                                                                                                                                                  | Deng <i>et al</i> , 2013           |
| Carbamazepina        | UV, UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                                                                                | Cruz <i>et al</i> , 2012           |
|                      | Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                                                                     | Mohapatra <i>et al</i> , 2013      |
| Ciprofloxacino       | UV, UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                                                                                | Cruz <i>et al</i> , 2012           |
| Citalopram           | UV, O <sub>3</sub> , Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                                                | Hösing <i>et al</i> , 2012         |
| Diazepam             | Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV                                                                                   | Valcárcel <i>et al</i> , 2012      |
| Diclofenaco          | UV, UV/TiO <sub>2</sub> , UV/TiO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                                        | Bagal <i>et al</i> , 2014          |
|                      | O <sub>3</sub> /UV/TiO <sub>2</sub>                                                                                                                 | Aguinaco <i>et al</i> , 2012       |
|                      | UV, UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                                                                                | Cruz <i>et al</i> , 2012           |
| Fluoxetina           | Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                                                                     | Li <i>et al</i> , 2012             |
|                      | O <sub>3</sub> , TiO <sub>2</sub> , O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , TiO <sub>2</sub> /O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Méndez-Arriaga <i>et al</i> , 2011 |
| 17 α-Etinilestradiol | O <sub>3</sub>                                                                                                                                      | Larcher <i>et al</i> , 2012        |
|                      | Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV                                                                                                 | Frontistis <i>et al</i> , 2011     |
| Ibuprofeno           | UV, UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                                                                                | Cruz <i>et al</i> , 2012           |
|                      | O <sub>3</sub>                                                                                                                                      | Quero-Pastor <i>et al</i> , 2014   |
| Iodoprimida          | UV, UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                                                                                | Cruz <i>et al</i> , 2012           |
| Naproxeno            | Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                                                                     | Li <i>et al</i> , 2012             |
|                      | UV, UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                                                                                | Cruz <i>et al</i> , 2012           |
| Norfloxacino         | UV, UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                                                                                | Cruz <i>et al</i> , 2012           |
|                      | Bi <sub>2</sub> WO <sub>6</sub> /Solar                                                                                                              | Chen e Chu, 2012                   |
|                      | TiO <sub>2</sub> /UV                                                                                                                                | Chen <i>et al</i> , 2012           |
| Pacetamol            | O <sub>3</sub>                                                                                                                                      | Liu <i>et al</i> , 2012            |
|                      | Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV                                                                                                 | Trovó <i>et al</i> , 2012          |
|                      | TiO <sub>2</sub> , CuO/TiO <sub>2</sub> /Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>                                                                             | Horáková <i>et al</i> , 2012       |
| Sulfametazol         | Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                                                                     | Li <i>et al</i> , 2012             |
| Tetraciclina         | TiO <sub>2</sub> /UV                                                                                                                                | Mboula <i>et al</i> , 2012         |

Estes compostos são difíceis de serem degradados passando pelos processos convencionais de tratamento biológico sem serem modificados ou eficientemente removidos. O destino e a toxicidade dos metabólitos formados e a absorção do fármaco realizada pela biomassa que deveria oxidá-lo tem sido muito pouco estudada ou negligenciada. Desta forma, novas tecnologias devem ser inseridas objetivando remover especificamente estes compostos.

### 3.2.1 Utilização de peróxido de hidrogênio como oxidante

O peróxido de hidrogênio pode ser utilizado no tratamento de efluentes que requerem condições de oxidação menos severas. O maior potencial de oxidação é observado em condições ácidas, variando de 1,80 para 0,87 V quando o pH muda de 0 para 14 (NEYENS e BAEYENS, 2003). Contudo, observa-se que em faixas de pH muito ácidas ( $\text{pH} < 2$ ), o peróxido de hidrogênio também apresenta instabilidade (CRUZ *et al.*, 2000).

A utilização somente de peróxido de hidrogênio para degradar fármacos não é muito reportada na literatura devido à estabilidade destes compostos o que faz com que sua remoção não seja efetiva. Nesse sentido, a literatura reporta uma série de trabalhos onde o peróxido de hidrogênio é utilizado de forma combinada a outros processos.

### 3.2.2 Fotólise e fotólise do peróxido de hidrogênio

O espectro de radiação ultravioleta pode ser dividido em três faixas distintas: UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm) e UV-C (100-280 nm). Tanto radiações UV-A quanto UV-C são amplamente utilizadas em aplicações ambientais. A maioria das lâmpadas UV-A têm seu pico de emissão em 365 nm e, algumas, em 350 nm. A radiação UV-C, que também é chamada de radiação de ondas curtas, é usada para desinfecção de águas e efluentes. O espectro da radiação emitido por lâmpadas de mercúrio de baixa pressão, usadas para fins de desinfecção, tem pico de emissão em torno de 254 nm (CASTRO, 2004).

A radiação UV, quando utilizada de forma isolada, leva a uma decomposição lenta do composto orgânico, exceto nos casos em que a molécula seja fotossensível, por isso na maioria dos casos utilizam-se processos combinados.

A combinação da radiação UV com peróxido de hidrogênio tem demonstrado ser eficiente na remoção de compostos em baixas concentrações. Segundo DOMÉNECH *et al.*, (2001) a utilização da irradiação UV promove a quebra homolítica da molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , produzindo radicais hidroxilas, Equação 4.1.



A formação destes radicais é fortemente dependente do pH, apresentando um maior rendimento em pH ácido.

De acordo com MELO *et al.*, (2009) a aplicação da fotólise de  $H_2O_2$  para degradação de baixas concentrações de fármacos encontrados em águas e efluentes de ETEs pode ser efetiva sem a necessidade de utilização de altas concentrações do oxidante.

A degradação de fármacos como carbamazepina (VOGNA *et al.*, 2004a), diclofenaco (VOGNA *et al.*, 2004b) e paracetamol (ANDREOZZI *et al.*, 2003) foi estudada em concentrações que variaram de 1,51 a 296 mg L<sup>-1</sup> com a utilização da combinação  $H_2O_2$ /UV. Observou-se uma degradação total dos fármacos e remoção de 40% de carbono orgânico total (COT) entre 5 e 90 min de reação.

JUNG *et al.*, (2012) avaliaram a remoção de amoxicilina e consequentemente eliminação da atividade antimicrobiana pelos processos de radiação UV e UV/ $H_2O_2$ . Observou-se que a mineralização da amoxicilina com utilização de radiação UV foi pouco significativa em comparação com a degradação do composto de origem que foi de 99%. A degradação do composto de origem foi acelerada com a adição de pequenas doses de  $H_2O_2$ . A total mineralização do composto não foi observada para nenhum dos dois processos. A atividade antimicrobiana permaneceu após tratamento, o que foi confirmado pela presença de metabólitos que possuíam anel  $\beta$ -lactâmico.

CRUZ *et al.*, (2012) estudaram a remoção de 32 (trinta e dois) compostos classificados como poluentes emergentes presentes em efluentes municipais após tratamento por lodos ativados. Foram monitorados 37 (trinta e sete) compostos dos quais trinta e dois foram detectados após tratamento biológico secundário. Estudou-se a remoção destes compostos por UV (254nm), Fenton e foto-Fenton. Os resultados encontrados são apresentados na Tabela 4.2.

**Tabela 4.2** - Compostos encontrados após tratamento biológico; limite de quantificação e % de remoção por UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

| Família/Função            |                          | Substância        | LDQ ng/L | Concentração após<br>tratamento secundário<br>(ng/L) | UV <sub>254</sub><br>10min | UV+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>(50 mg/L)<br>10 min | UV+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>(50 mg/L)<br>30 min |
|---------------------------|--------------------------|-------------------|----------|------------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Fármacos                  | Reguladores<br>lipídicos | Bezafibrato       | 8        | 426                                                  | 24                         | 75                                                      | 100                                                     |
|                           |                          | Gemfibrozil       | 2        | 25                                                   | 18                         | 75                                                      | 100                                                     |
|                           |                          | Sinvastatina      | 15       | nd                                                   | nd                         | nd                                                      | nd                                                      |
|                           | Antidiabético            | Metformina        | 15       | 1027                                                 | 6                          | 34                                                      | 11                                                      |
|                           | Antiepiléptico           | Carbamazepina     | 9        | 263                                                  | 23                         | 75                                                      | 100                                                     |
|                           |                          | Gabapentina       | 7        | 1737                                                 | 10                         | 53                                                      | 99                                                      |
|                           |                          | Diclofenaco       | 15       | 518                                                  | 100                        | 100                                                     | 100                                                     |
|                           | Analgésicos              | Ibuprofeno        | 15       | 112                                                  | 34                         | 100                                                     | 100                                                     |
|                           |                          | Cetoprofeno       | 10       | 123                                                  | 100                        | 100                                                     | 100                                                     |
|                           |                          | Ácido Mefenâmico  | 15       | 291                                                  | 100                        | 100                                                     | 100                                                     |
|                           |                          | Naproxeno         | 30       | 178                                                  | 62                         | 100                                                     | 100                                                     |
|                           |                          | Paracetamol       | 50       | nd                                                   | nd                         | nd                                                      | nd                                                      |
|                           | β-Bloquadores            | Primidona         | 5        | 49                                                   | 5                          | 65                                                      | 100                                                     |
|                           |                          | Atenolol          | 7        | 669                                                  | 20                         | 58                                                      | 100                                                     |
|                           |                          | Metoprolol        | 5        | 179                                                  | 14                         | 73                                                      | 100                                                     |
|                           |                          | Sotalol           | 5        | 260                                                  | 86                         | 100                                                     | 100                                                     |
|                           |                          | Azitromicina      | 40       | 295                                                  | 0                          | 50                                                      | 100                                                     |
|                           | Antibióticos             | Ciprofloxacino    | 15       | 129                                                  | 48                         | 69                                                      | 100                                                     |
|                           |                          | Claritromicina    | 3        | 518                                                  | 0                          | 56                                                      | 100                                                     |
|                           |                          | Metronidazol      | 50       | 456                                                  | 24                         | 52                                                      | 100                                                     |
|                           |                          | Norfloxacino      | 15       | 27                                                   | 36                         | 100                                                     | 100                                                     |
|                           |                          | Ofloxacino        | 15       | 41                                                   | 65                         | 100                                                     | 100                                                     |
|                           |                          | Sulfametoxazol    | 5        | 578                                                  | 51                         | 98                                                      | 100                                                     |
|                           |                          | Trimetoprim       | 5        | 131                                                  | 7                          | 66                                                      | 100                                                     |
|                           | Contraste Raio-X         | Iopamidol         | 240      | 1726                                                 | 100                        | 100                                                     | 100                                                     |
|                           |                          | Iopromida         | 600      | nd                                                   | nd                         | nd                                                      | nd                                                      |
| Inibidores de<br>corrosão |                          | Benzotriazol      | 19       | 2781                                                 | 40                         | 71                                                      | 100                                                     |
|                           |                          | Metilbenzotriazol | 10       | 1535                                                 | 37                         | 72                                                      | 100                                                     |
| Biocidas/<br>Pesticidas   | Biocida                  | Triclosan         | 50       | 135                                                  | 29                         | 100                                                     | 100                                                     |
|                           |                          | Atrazina          | 4        | 9                                                    | 100                        | 100                                                     | 100                                                     |
|                           | Herbicida                | Diuron            | 40       | 57                                                   | 100                        | 100                                                     | 100                                                     |
|                           |                          | Isoproturon       | 10       | nd                                                   | nd                         | nd                                                      | nd                                                      |
|                           |                          | Mecoprop          | 5        | 34                                                   | 82                         | 100                                                     | 100                                                     |
|                           | Algicida                 | Irgarol           | 3        | nd                                                   | nd                         | nd                                                      | nd                                                      |
|                           |                          | terbutrina        | 3        | 19                                                   | 74                         | 83                                                      | 100                                                     |

Fonte: Cruz *et al.*, 2012.

Os estudos de CRUZ *et al.*, (2012) demonstraram que a utilização do processo combinado UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ser efetivo na remoção de uma série de compostos, podendo ser utilizado como pós tratamento para tratamentos biológicos.

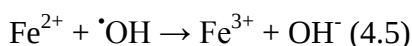
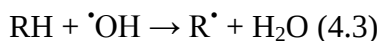
### 3.2.3 Utilização de oxidação de Fenton

O poder oxidante da mistura entre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e sais ferrosos foi descoberto há aproximadamente 100 anos atrás por H. J. H. Fenton, mas sua aplicação como um processo oxidante para destruir compostos orgânicos somente foi iniciada em meados de 1960 (NEYENS & BAEYENS, 2003).

A reação de Fenton está baseada na geração de radicais hidroxilas através da decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalisada por Fe<sup>2+</sup> em meio ácido, Equação (4.2).



O mecanismo de reação envolvendo o peróxido de hidrogênio é complexo, podendo mudar de acordo com as condições do meio de reação e do tipo de catalisador utilizado (KANG e HWANG, 2000). As equações 4.2, 4.3, 4.4 e 4.5 mostram de forma simplificada o mecanismo de reação de decomposição catalítica do  $\text{H}_2\text{O}_2$  por sais de ferro, em meio ácido.



O Reagente de Fenton tem sido amplamente utilizado para tratar efluentes que possuam compostos recalcitrantes. Dentre as vantagens deste tratamento cita-se o baixo custo operacional atrelado a uma alta eficiência na remoção de compostos orgânicos.

LIU *et al.*, (2012) e AHMAD *et al.*, (2005) demonstram que reações realizadas em pH próximos de 3 apresentam maiores eficiências na degradação da matéria orgânica através do sistema Fenton homogêneo. Ao final do processo, na etapa de neutralização, ocorre a formação de quantidade significativa de lama. Essa é uma das principais desvantagens deste processo, pois dependendo da concentração de ferro e do volume de efluente tratado, torna-se obrigatória uma etapa de separação de sólidos ao final do tratamento (CRUZ, 2000).

BAE *et al.*, (2013) relataram que o anti-inflamatório diclofenaco de potássio pode ser rapidamente degradado quando se utiliza a oxidação proposta por Fenton. Durante os ensaios foram realizados testes utilizando a oxidação tradicional e o mineral pirita como fonte de ferro. Com a utilização da pirita observou-se completa degradação do diclofenaco, em 120 segundos de reação. A oxidação tradicional resultou em 65% de degradação em 180 segundos de reação o que sugere que, a reação de Fenton pode ser melhorada através da liberação contínua de  $\text{Fe}^{2+}$  para o meio reacional que foi proporcionada pelas reações que aconteceram na superfície do mineral.

### 3.2.4 Utilização de foto-Fenton –H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>/UV

Este processo, que combina a aplicação de radiação ultravioleta a uma reação de Fenton, pode produzir uma maior eficiência de degradação, pois a fotólise do peróxido de hidrogênio acelera a formação dos radicais <sup>•</sup>OH.

Em comparação com Fenton, o processo foto-Fenton tende a ser mais efetivo na degradação de poluentes devido à aceleração na produção de radicais hidroxilas e em função de uma menor produção de lama, o que torna o processo mais atrativo e viável economicamente.

O efluente de uma indústria farmacêutica de formulação de penicilina foi estudado por processo Fenton modificado (Fe<sup>3+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e foto-Fenton modificado (Fe<sup>3+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV). Os resultados encontrados, utilizando-se condições ótimas de trabalho ([Fe<sup>3+</sup>] = 1,5 mM e [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 25 mM, pH = 3,0), demonstraram uma remoção de 56% de DQO e 42% de TOC para um tempo reacional de 30 minutos no processo foto-Fenton modificado. Em contrapartida, a eficiência de remoção do processo Fenton modificado foi limitada a 44% de DQO e 35% de TOC para o mesmo período de tratamento. Com relação à biodegradabilidade do efluente, observou-se um aumento de 10 para 24% após o tratamento por Fenton modificado (ARSLAN-ALATON *et al.*, 2004).

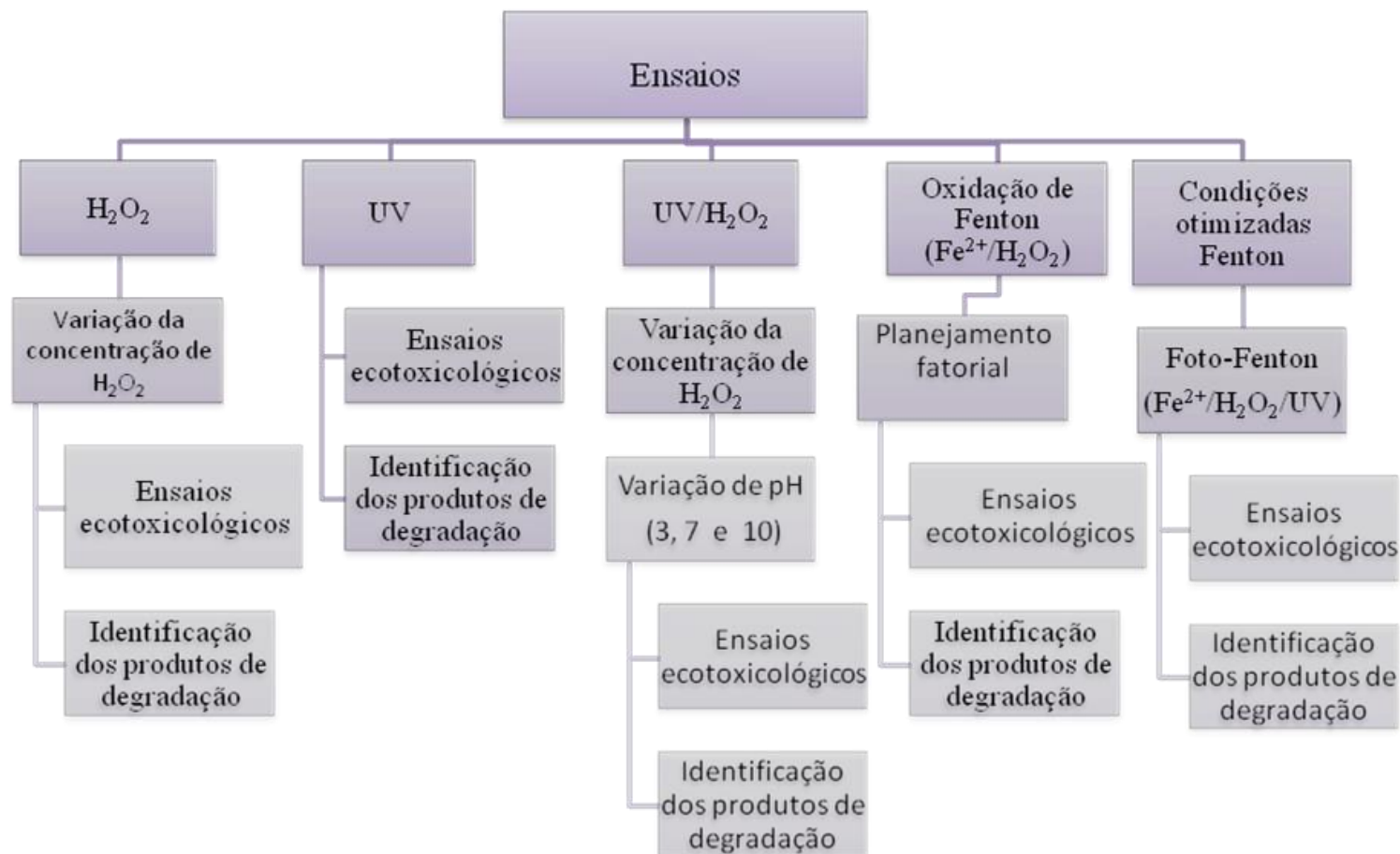
RIVAS *et al.*, (2010) estudaram a degradação do fármaco metoprolol por diversos processos oxidativos avançados. Os autores observaram que a taxa de degradação e mineralização foi melhorada através da adição de promotores de radicais hidroxilas, quando se utilizava sistema de radiação UV. O processo foto-Fenton, quando otimizado, apresentou mineralização de 70%, tendo sido o processo mais eficiente.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Etapas metodológicas

A Figura 4.1 apresenta o fluxograma de desenvolvimento desta etapa metodológica.

**FIGURA 4.1-** Fluxograma demonstrando as etapas do desenvolvimento metodológico.



## 4.2 Reação com peróxido de hidrogênio

Os ensaios que avaliaram a degradação dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina através da oxidação por peróxido de hidrogênio foram realizados em béqueres de 2 litros e submetidos à agitação em *Jar-Test*, a uma velocidade de 120 rpm em pH 3.

Foram preparadas soluções de 15 e 100 mg/L de norfloxacino e sulfato de gentamicina, respectivamente. Foram utilizadas as proporções estequiométricas  $[C]:[HO^-]$  de  $[1]:[0.5]$ ,  $[1]:[1]$ ,  $[1]:[1.5]$  e  $[1]:[2]$  para os dois antibióticos.

Para o cálculo estequiométrico da quantidade de peróxido de hidrogênio a ser utilizado no tratamento do antibiótico sulfato de gentamicina foi levado em consideração uma fórmula molecular média, Tabela 4.3. Os padrões utilizados continham uma mistura dos compostos de gentamicina que foram apresentados na Figura 2.4, do Capítulo 2.

**Tabela 4.3** - Relação das fórmulas moleculares possíveis para gentamicina e fórmula média utilizada.

| Gentamicinas       | Fórmula Molecular                           | Massa Molar (g/mol) |
|--------------------|---------------------------------------------|---------------------|
| Fórmulas possíveis | $C_{19-21}H_{39-41}N_5O_7 \cdot 2,5H_2SO_4$ | 694-720             |
| Média utilizada    | $C_{20}H_{40}N_5O_7 \cdot 2,5H_2SO_4$       | 707                 |

A eficiência do processo foi avaliada através da determinação da absorvidade molar em 273 nm, para o antibiótico norfloxacino, e COT para o caso do sulfato de gentamicina.

## 4.3 Determinação do peróxido residual

O peróxido residual foi avaliado através da metodologia espectrofotométrica proposta por NOGUERIA *et al.*, 2005. As soluções utilizadas foram preparadas no dia dos ensaios para evitar interferências. As leituras foram realizadas utilizando Espectrofotômetro Lambda XL, Perkin Elmer.

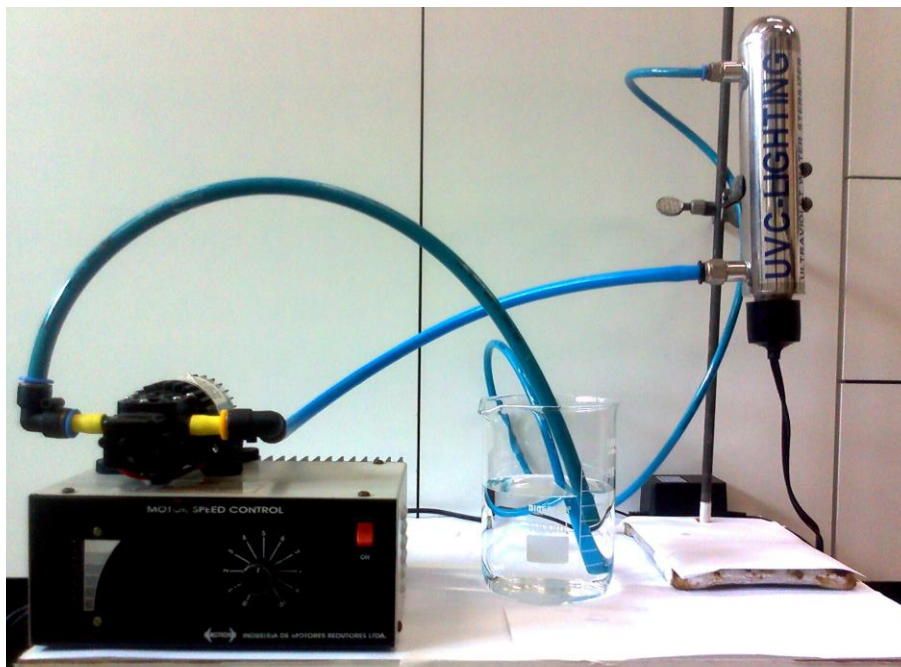
## 4.4 Ensaios utilizando radiação ultravioleta – UV

### 4.4.1 Descrição do aparato utilizado

As reações de fotodegradação foram realizadas em um reator cilíndrico de 50,5 x 320 mm e 280 mL de capacidade *PurePro Ultraviolet Water Sterilizer*, Figura 4.2, contendo um tubo de quartzo em seu interior. Ao tubo de quartzo foi conectada uma lâmpada de vapor de mercúrio

de baixa pressão de 6W de potência, emitindo radiação máxima em 254 nm. A intensidade da lâmpada foi determinada por experimentos de actinometria utilizando o método com ferrioxalato de potássio de acordo com metodologia proposta por MUROV (1973).

**FIGURA 4.2** - Reator utilizado nos ensaios de fotodegradação



Todos os experimentos foram conduzidos à temperatura ambiente (28°C) tendo sido realizado seu monitoramento mas não sendo necessário resfriar. O monitoramento dos ensaios foi realizado por COT, UV/Vis e os produtos de degradação foram monitorados por HPLC/MS.

#### **4.4.2 Determinação do fluxo de radiação da lâmpada - Actinometria**

A determinação da intensidade luminosa da lâmpada de vapor de mercúrio foi realizada pelo método actinométrico de ferrioxalato de potássio, que na presença de radiação de comprimento de onda inferior a 490 nm se decompõe dando origem a íons ferrosos  $\text{Fe}^{2+}$ , Equação 4.6. Os íons  $\text{Fe}^{2+}$  formados são complexados com 1,10-fenantrolina e analisados por espectrometria de absorção na região do UV-visível, de acordo com metodologia proposta por MUROV (1973).



O ferrioxalato de potássio utilizado foi obtido através da mistura de 25 mL de solução 1,2 mol/L de oxalato de potássio ( $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ) e 9 mL de solução 0,61 mol/L de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). As soluções foram preparadas e mantidas sob refrigeração à 4 °C em frascos âmbar. Para evitar a decomposição do complexo pela luz, no dia do ensaio, a mistura foi

transferida para balão volumétrico de 1L que teve seu volume completado com água ultrapura.

Em intervalos regulares de tempo, 5,0 mL da solução actinométrica foram transferidos para um balão de 50,0 mL contendo 10,0 mL de solução 0,2% m/m de 1,10-fenantrolina e 2,5 mL de solução tampão de acetato de sódio, que teve seu volume completado com água deionizada. A solução foi analisada por espectroscopia de absorção molecular em 510 nm, utilizando uma cubeta de quartzo de 4,5 mL de capacidade. O experimento foi encerrado quando a absorbância medida não apresentou mudanças significativas.

A intensidade de luz obtida foi calculada através da Equação 4.7.

$$I = \frac{A.V_2.V_3}{\varepsilon.\Phi.d.t.V_1} \quad (4.7)$$

Onde:

$I$  = intensidade da luz (Einstein/min)

$A$  = absorbância ( $\lambda=510\text{nm}$ ) da solução actinométrica;

$d$  = largura da cubeta utilizada para a medida de absorbância (A);

$\varepsilon$  = coeficiente de extinção do complexo de ferro 1-10-fenantrolina para 510 nm ( $\sim 1,11 \times 10^4 \text{L/mol.cm}$ );

$\Phi$  = rendimento quântico da produção de ferro para o comprimento de onda da luz utilizada;

$V_1$  = volume para análise (mL) da solução actinométrica irradiada;

$V_2$  = volume total (mL) da solução actinométrica irradiada;

$V_3$  = volume (mL) do balão volumétrico utilizado para a diluição da alíquota irradiada;

$t$  = tempo de radiação (min).

#### **4.5 Ensaios utilizando radiação ultravioleta e peróxido de hidrogênio**

Para realização dos ensaios com fotólise direta, 1L de solução contendo 15 mg/L de norfloxacino, em pH 7 foi irradiada até estabilização da concentração do fármaco através de leitura de sua absorvidade em 273 nm. Para isto, um béquer de 2L contendo a solução em estudo foi conectado ao reator UV por meio de mangueiras e bomba peristáltica. A solução no béquer teve sua temperatura monitorada durante todo o experimento e permaneceu, aproximadamente, em 28°C. A agitação foi mantida através da corrente formada pela utilização da bomba peristáltica.

Para a realização dos ensaios contendo o antibiótico sulfato de gentamicina adotou-se o mesmo procedimento, sendo utilizada uma concentração inicial de 100 mg/L em função da necessidade de se adaptar a concentração de carbono presente nas amostras ao limite de detecção do analisador de carbono orgânico utilizado.

Para realização dos ensaios utilizando UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do antibiótico norfloxacino foram avaliadas as relações estequiométricas [C]:[HO<sup>-</sup>] de 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 e 1:6 em pH 7 e para a condição reacional de melhor remoção foram avaliados os pHs 2, 3, 5, 7 e 10. Para o sulfato de gentamicina foram avaliadas as relações estequiométricas [C]:[HO<sup>-</sup>] de 1:1, 1:2,5 e 1:3 sendo que para melhor condição foram avaliados os pHs 3, 7 e 10.

Após terem o pH acertado, as soluções eram transferidas para béqueres de 2L e conectadas ao reator de UV, onde eram irradiadas até a estabilização da concentração do fármaco.

Após a otimização dos ensaios, foram realizados ensaios ecotoxicológicos e identificação dos produtos de degradação.

#### **4.6 Ensaios utilizando Fenton homogêneo**

Para os ensaios envolvendo reações de Fenton foram investigadas as melhores condições operacionais em termos de concentração peróxido de hidrogênio e concentração de ferro ferroso. Os ensaios foram conduzidos em escala de laboratório e em batelada. As demais variáveis foram mantidas constantes e constam na Tabela 4.4.

Os experimentos foram realizados em triplicata segundo o planejamento fatorial, que utilizou dois níveis de concentrações (alto e baixo) para cada um dos dois fatores investigados, sendo eles: concentração peróxido de hidrogênio e concentração de ferro ferroso. Para tal, utilizou-se o software estatístico Minitab versão 15.

**Tabela 4.4** - Valores utilizados no monitoramento da degradação dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina para reação de Fenton.

| Fenton homogêneo             |                 |         |
|------------------------------|-----------------|---------|
| Constante                    | Valor Utilizado | Unidade |
| pH                           | 3               |         |
| Velocidade de Rotação        | 120             | rpm     |
| Concentração de Norfloxacino | 15              | mg/L    |
| Concentração de Gentamicina  | 100             | mg/L    |
| Temperatura                  | Ambiente        |         |

Além dos experimentos utilizando níveis alto e baixo de concentrações, foram adotados dois pontos centrais, totalizando 14 (quatorze) experimentos por antibiótico estudado. O ponto central foi adicionado ao planejamento fatorial para aumentar os graus de liberdade e para verificar estatisticamente a curvatura da resposta. Nas Tabelas 4.5 e 4.6 são apresentadas as matrizes do planejamento fatorial utilizadas para os antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina, respectivamente.

**Tabela 4.5** - Matriz do planejamento fatorial utilizada para os experimentos de Fenton homogêneo para o antibiótico norfloxacino.

| Experimentos | Ponto Central | [OH <sup>-</sup> ][Fe <sup>2+</sup> ] |
|--------------|---------------|---------------------------------------|
| 1            | 0             | [4][2]                                |
| 2            | 1             | [2][1]                                |
| 3            | 1             | [2][1]                                |
| 4            | 1             | [8][4]                                |
| 5            | 1             | [8][4]                                |
| 6            | 1             | [8][4]                                |
| 7            | 1             | [8][1]                                |
| 8            | 1             | [2][4]                                |
| 9            | 1             | [2][1]                                |
| 10           | 1             | [2][4]                                |
| 11           | 1             | [8][1]                                |
| 12           | 0             | [4][2]                                |
| 13           | 1             | [2][4]                                |
| 14           | 1             | [8][1]                                |

Para a realização dos ensaios foram preparadas soluções dos antibióticos utilizando água ultra-pura. 1L de cada solução foi transferido para béquer, onde o pH foi acertado para 3. As soluções foram colocadas para agitar em *Jar Test* a uma velocidade de 120 rpm e foram acrescentadas as respectivas quantidades de Fe<sup>2+</sup> e peróxido hidrogênio, de acordo com o planejamento fatorial.

Inicialmente, foi realizada uma oxidação de Fenton exploratória, em que foram utilizadas quantidades estequiométricas de [C]:[Fe]:[OH] na proporção de [1]:[1]:[1]. Observou-se que a porcentagem de degradação para o antibiótico norfloxacino foi de 30% e, por isso, para o planejamento fatorial deste fármaco, adotou-se o dobro desta relação como nível mínimo e o quádruplo do nível mínimo como nível máximo, isso para a concentração de peróxido de hidrogênio.

**Tabela 4.6** - Matriz do planejamento fatorial utilizada para os experimentos de Fenton homogêneo para o antibiótico sulfato de gentamicina.

| Experimentos | Ponto Central | [OH <sup>-</sup> ][Fe <sup>2+</sup> ] |
|--------------|---------------|---------------------------------------|
| 1            | 0             | [2,5][2,5]                            |
| 2            | 1             | [1][1]                                |
| 3            | 1             | [1][1]                                |
| 4            | 1             | [4][4]                                |
| 5            | 1             | [4][4]                                |
| 6            | 1             | [4][4]                                |
| 7            | 1             | [4][1]                                |
| 8            | 1             | [1][4]                                |
| 9            | 1             | [1][1]                                |
| 10           | 1             | [1][4]                                |
| 11           | 1             | [4][1]                                |
| 12           | 0             | [2,5][2,5]                            |
| 13           | 1             | [1][4]                                |
| 14           | 1             | [4][1]                                |

Para monitoramento da degradação dos compostos foram recolhidas alíquotas para determinação da absorvidade em 273 nm e COT por um período de 360 minutos. As alíquotas tiveram sua absorvidade determinada imediatamente após a coleta e para as determinações por COT foi necessário o acréscimo da enzima catalase, objetivando inibir a reação do peróxido residual. Para isto, as amostras tiveram seu pH acertado para 6,8 e foram acrescidas de 1 mL de solução contendo a enzima catalase e (460 mg/L, em tampão fosfato – 0,04 mol/L, pH 7; Sigma- Aldrich Lote 010M7010V), de acordo com a metodologia descrita por POOLE (2004).

Após a otimização dos ensaios através do planejamento fatorial a melhor condição foi repetida e monitorou-se: absorvidade, COT, peróxido residual, toxicidade e produtos de degradação.

#### ***4.7 Ensaios utilizando foto-Fenton homogêneo***

Para realização dos ensaios utilizando foto-Fenton homogêneo foram utilizadas as condições otimizadas nos ensaios de Fenton para os dois antibióticos.

Foram recolhidas alíquotas para monitoramento por UV/Vis, COT, peróxido residual, toxicidade e produtos de degradação.

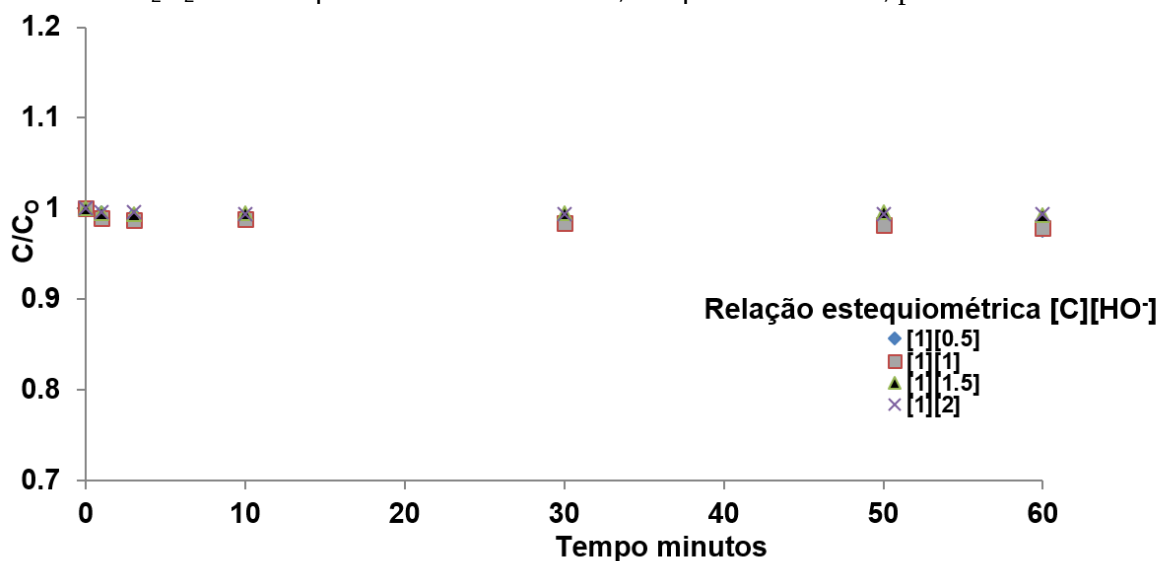
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Experimentos com $H_2O_2$

#### 5.1.1 Avaliação da degradabilidade dos antibióticos variando a concentração de peróxido de hidrogênio.

Nas Figuras 4.3 e 4.4 são apresentadas as degradações dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina utilizando diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio, em pH 3.

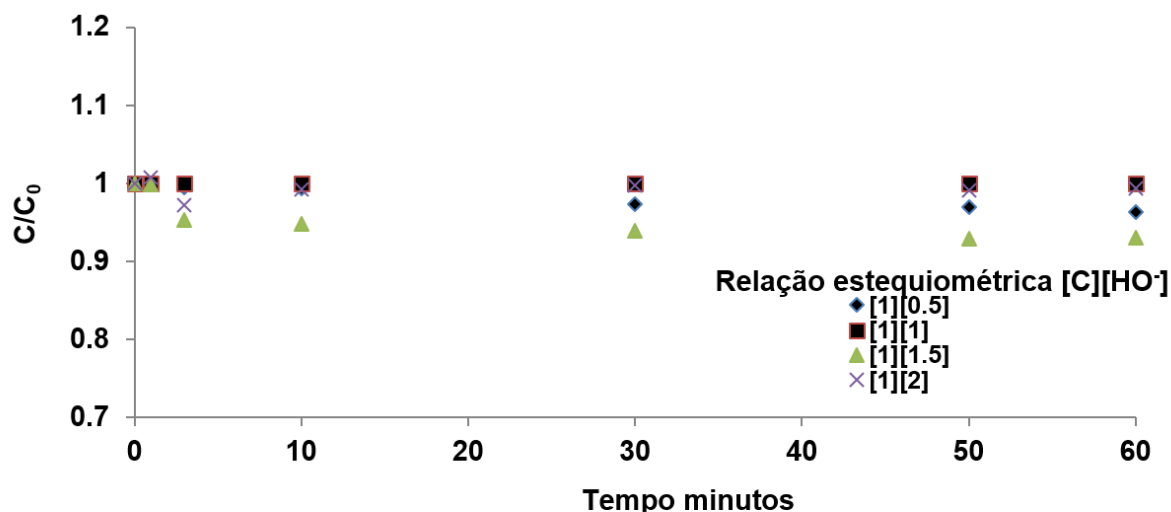
**FIGURA 4.3** - Monitoramento da degradabilidade do antibiótico norfloxacino (15 mg/L) utilizando  $H_2O_2$  e leitura por UV/VIS em 273 nm, temperatura =28°C, pH 3.



Observa-se uma degradação de apenas 2% do antibiótico norfloxacino quando se utiliza as relações estequiométricas de [C]:[OH·] [1]:[1]. O acréscimo de peróxido de hidrogênio não melhorou a eficiência de remoção deste fármaco sugerindo que o aumento na concentração peróxido de hidrogênio não interfere na eficiência de remoção deste antibiótico. Neste caso, não foram realizadas determinações de COT devido aos baixos valores de degradação encontrados. Ao se utilizar espectrometria de massas os resultados obtidos foram confirmados, pois obteve-se 2,07 % de degradação.

Para o sulfato de gentamicina o monitoramento foi realizado pela determinação de carbono orgânico total e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

**FIGURA 4.4** - Monitoramento da degradabilidade do antibiótico sulfato de gentamicina ( $C_0$  100 mg/L) utilizando  $H_2O_2$  e leitura por COT em pH 3.



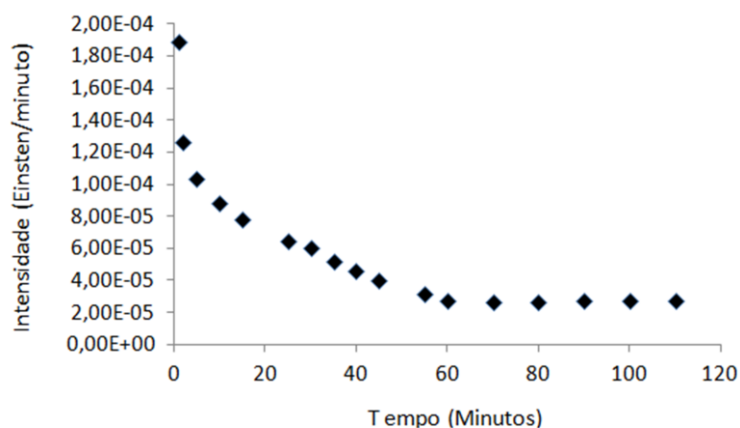
Observou-se que a melhor degradação ocorreu quando foi utilizada as relações estequiométricas de  $[C]:[OH^\bullet]$   $[1]:[1,5]$  alcançando uma taxa de degradação de 63,2% e 2% de mineralização. A discrepância entre a taxa de mineração e degradação comprova a formação de produtos de degradação, que podem ser verificados no item 5.6 deste capítulo.

## 5.2 Experimentos utilizando radiação ultravioleta

### 5.2.1 Actinometria

A intensidade luminosa ao longo do tempo foi calculada a partir da equação 4.7, sendo que a intensidade de radiação da lâmpada foi calculada através das médias dos valores obtidos após estabilização da concentração do composto formado, Figura 4.5.

**FIGURA 4.5** - Intensidade luminosa da lâmpada de vapor de mercúrio de baixa pressão de 6W de potência em função do tempo.

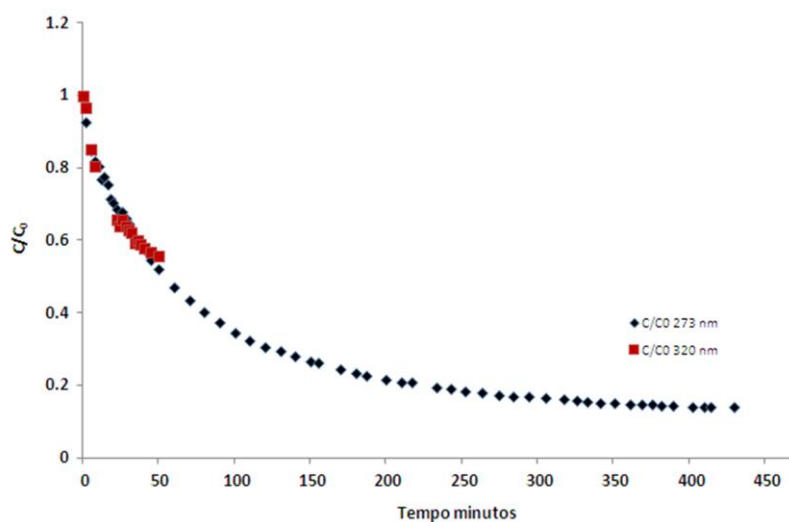


Dessa forma, o valor obtido para a intensidade luminosa da lâmpada foi de  $4,94 \times 10^{-05}$  Einstein/min.

### 5.2.2 Fotólise do antibiótico norfloxacino

A degradação do antibiótico norfloxacino via fotólise direta foi investigada em pH 7 utilizando concentração inicial de 15 mg/L. Os resultados da irradiação UV ao longo do tempo são apresentados na Figura 4.6.

**FIGURA 4.6** - Decomposição do antibiótico norfloxacino através da radiação ultravioleta. Condições experimentais: Concentração do antibiótico: 15 mg/L; Intensidade da luz:  $4,94 \times 10^{-05}$  Einstein/min; temperatura: 27°C; pH=7;  $\lambda=273$  nm e 320 nm.

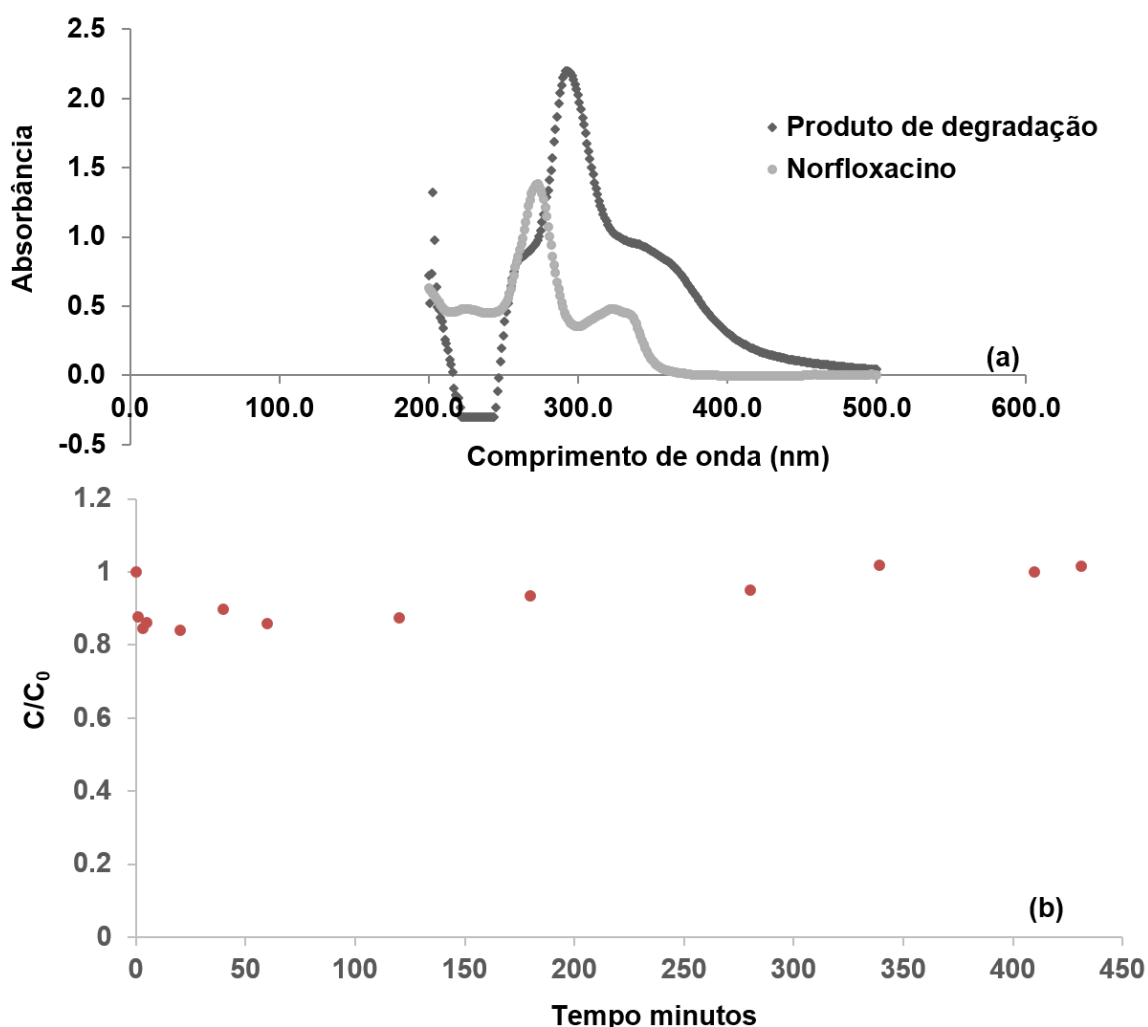


É possível verificar o desaparecimento da banda de absorção em 320 nm, durante a fotólise do norfloxacino. Trata-se de uma banda de absorção pouco sensível que, desapareceu nos primeiros 50 minutos de reação.

Observa-se uma remoção de, aproximadamente, 85 % do antibiótico em 7 horas de reação e, portanto, pode-se concluir que trata-se de um composto fotossensível. No entanto, a utilização de radiação UV como forma de remoção deste composto não é recomendada devido ao elevado tempo necessário para se atingir valores de degradação acima de 80 %.

Observa-se que com 60 minutos de reação apenas 50 % do norfloxacinó havia sido degradado. Também durante o processo de fotólise foi observada o aparecimento de coloração amarelada que indica a presença de produtos de degradação. Esta observação pode ser comprovada pela Figura 4.7A, onde é apresentado o espectro de absorção do norfloxacinó e do produto de degradação após extração e concentração em cartucho C<sub>18</sub>.

**FIGURA 4.7** - Comportamento do antibiótico norfloxacinó através da utilização de radiação UV. (a) Espectro absorção do norfloxacinó com máximo em 273 nm e do produto de degradação com máximo em 293 nm e (b) Concentração de norfloxacinó ao longo do processo de radiação UV.

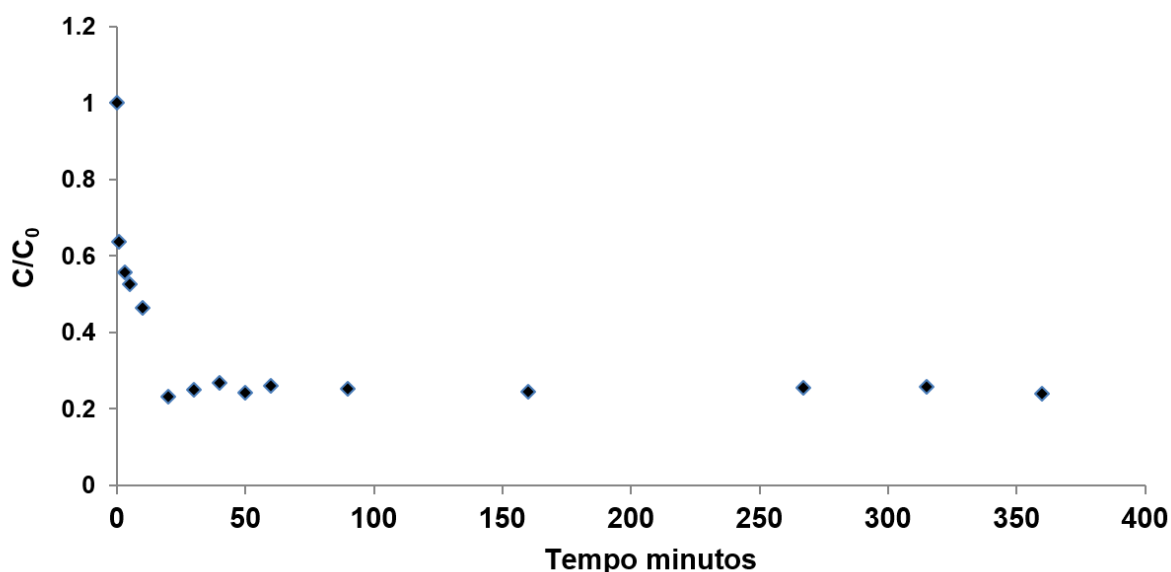


Observa-se uma mineralização discreta, em torno de 2 %, evidenciando a necessidade de novas etapas de tratamento, Figura 4.7B. Os resultados encontrados corroboram com os estudos realizados por CHEN e CHU (2012) em que não foi observado remoção do antibiótico norfloxacino através da utilização de fotólise. A incompleta mineralização do norfloxacino pode levar a formação de compostos recalcitrantes, cujos efeitos tóxicos ao meio ambiente podem ser mais impactantes que o fármaco de origem.

### 5.2.3 Fotólise do antibiótico sulfato de gentamicina

A degradação do antibiótico sulfato de gentamicina via fotólise direta foi investigada em pH 7 utilizando concentração inicial de 100 mg/L. Os resultados da irradiação UV ao longo do tempo são apresentados na Figura 4.8.

**FIGURA 4.8** - Decomposição do antibiótico sulfato de gentamicina através da radiação ultravioleta. Condições experimentais: Concentração do antibiótico: 100 mg/L; Intensidade da luz:  $4,94 \times 10^{-05}$  Einstein/min; temperatura: 27°C; pH=7; Determinação por COT.



Para o sulfato de gentamicina observa-se uma degradação de 92,3 % e uma taxa de mineralização de, aproximadamente, 80% em 25 minutos de reação. Estes resultados indicam que este fármaco é mais fotossensível se comparado ao norfloxacino podendo ser parcialmente removido em estações de tratamento de água que utilizam radiações UV como forma de tratamento ou pós tratamento. Comportamento semelhante a este também foi observado por JUNG *et al.*, (2012) quando avaliou a degradação e mineralização de amoxicilina por radiação UV.

### 5.3 Experimentos utilizando UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

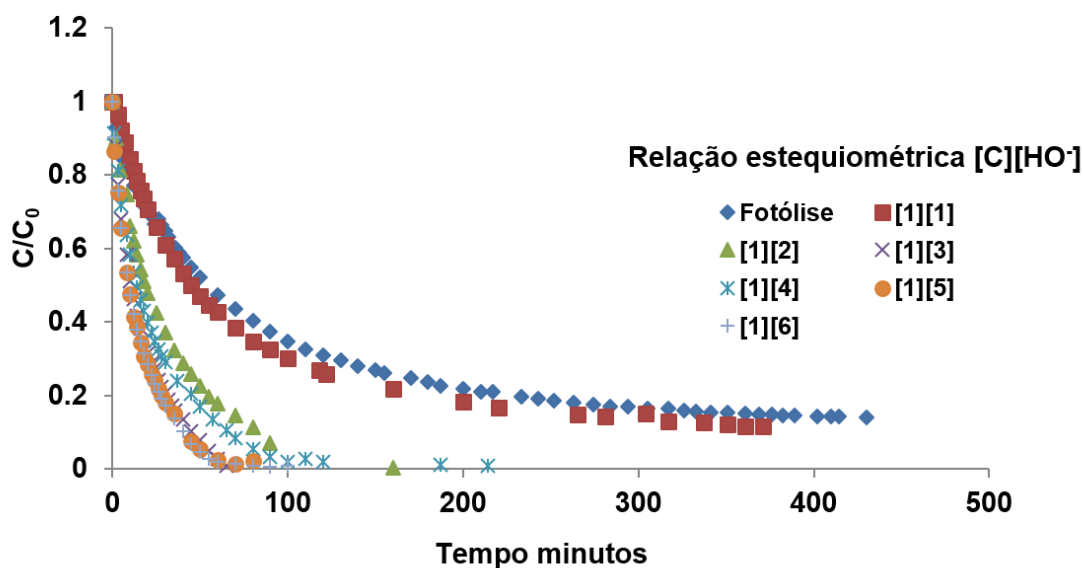
Com o objetivo de acelerar a degradação dos antibióticos foram realizados testes utilizando radiação UV e diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio.

#### 5.3.1 Avaliação da degradabilidade dos antibióticos

Para o antibiótico norfloxacino foram realizados testes em que foram utilizadas as relações estequiométricas [C]:[OH<sup>-</sup>] de [1]:[1], [1]:[2], [1]:[3], [1]:[4], [1]:[5] e [1]:[6] em pH 7, Figura 4.9.

Considerando-se as faixas de concentrações dos fármacos encontrados em águas e efluentes a ETEs, a utilização da fotólise do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mostra-se uma alternativa viável, pois utiliza-se baixas concentrações de oxidante.

**FIGURA 4.9** - Decomposição do antibiótico norfloxacino através da radiação ultravioleta com peróxido de hidrogênio. Condições experimentais: Concentração do antibiótico: 15 mg/L; Intensidade da luz:  $4,94 \cdot 10^{-05}$  Einstein/min; temperatura: 28°C; pH=7;  $\lambda=273$  nm.



Conforme mostrado na Figura 4.9, à medida que a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi aumentada observou-se uma notória melhoria na taxa de degradação do antibiótico. O aumento na velocidade de degradação do composto pode ser atribuído à baixa foto-atividade do norfloxacino, que passa a ter sua remoção aumentada devido à presença de radicais hidroxilas gerados através da fotólise do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

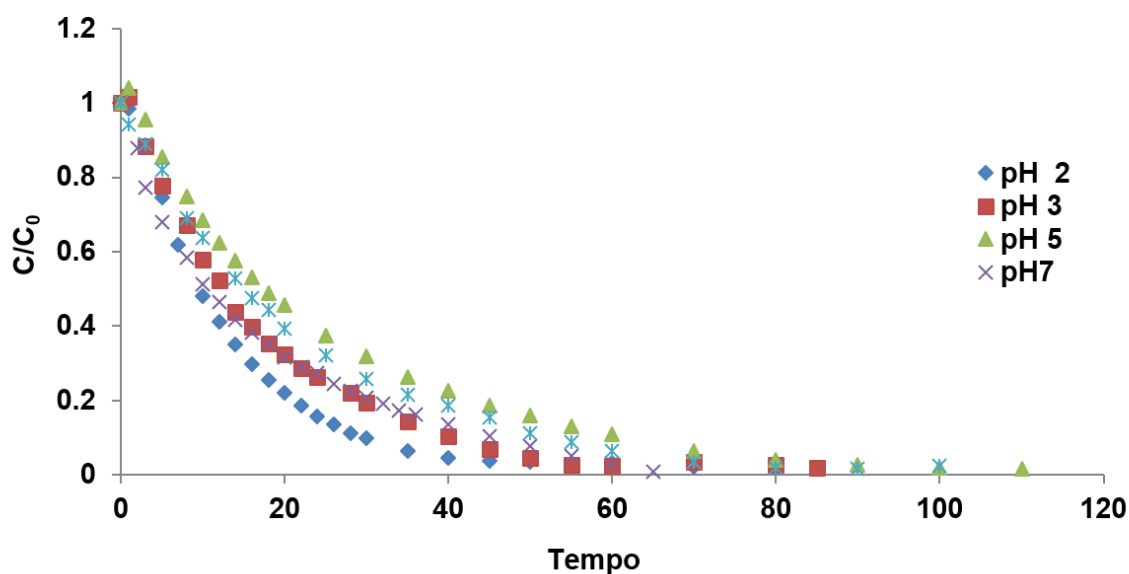
Com a utilização de UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observou-se remoções de até 100% do norfloxacino para a maioria das concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizadas. O aumento da concentração de peróxido de hidrogênio aumentou de forma expressiva a velocidade da reação até a proporção de [C]:[OH<sup>-</sup>]

] de [1]:[3], apresentando uma cinética de *pseudo* primeira ordem. A partir desta proporção não foram observados aumentos significativos na degradação do fármaco, de forma que a otimização do pH foi realizada utilizando esta proporção de [C]:[OH<sup>-</sup>].

A estabilidade na velocidade da reação está associada ao excesso de peróxido em meio reacional, de forma que um aumento em sua concentração não mais aumentaria a velocidade. A utilização de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em excesso pode ocasionar reações competitivas entre o radical hidroxila (HO•) e o peróxido presente no meio produzindo um efeito inibitório na degradação dos compostos, uma vez que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode agir capturando radicais hidroxilas.

Após a otimização da concentração de peróxido repetiu-se o experimento utilizando pH 2, 3, 5 e 10, Figura 4.10.

**FIGURA 4.10** - Degradação do antibiótico norfloxacinol através da radiação ultravioleta com variação de pH. Condições experimentais: C<sub>0</sub>: 15 mg/L; Intensidade da luz: 4,94\*10<sup>-05</sup>Einstein/min; temperatura: 28°C; λ=273 nm.



Vários estudos têm demonstrado que o pH reacional influencia na reatividade dos compostos podendo aumentar ou diminuir a velocidade da reação (BOJANOWSKA-CZAJKA *et al.*, 2006; HOMLOK *et al.*, 2010). Neste estudo, verificou-se que em pH 2 e 3 a degradabilidade ocorreu mais rapidamente.

Como ocorrido durante a fotólise direta, também foi observado o aparecimento de coloração amarelada, que indica a presença de produtos de degradação. Esperava-se que tais compostos pudessem absorver na região do visível, no entanto, de acordo com as Figuras 4.11 e 4.12 isto não foi observado.

**FIGURA 4.11** - Espectro de absorção do antibiótico norfloxacin durante o monitoramento da fotólise com peróxido de hidrogênio nas proporções de [C]:[HO<sup>•</sup>] (a) [1]:[1], (b) [1]:[2] e (c) [1]:[3].

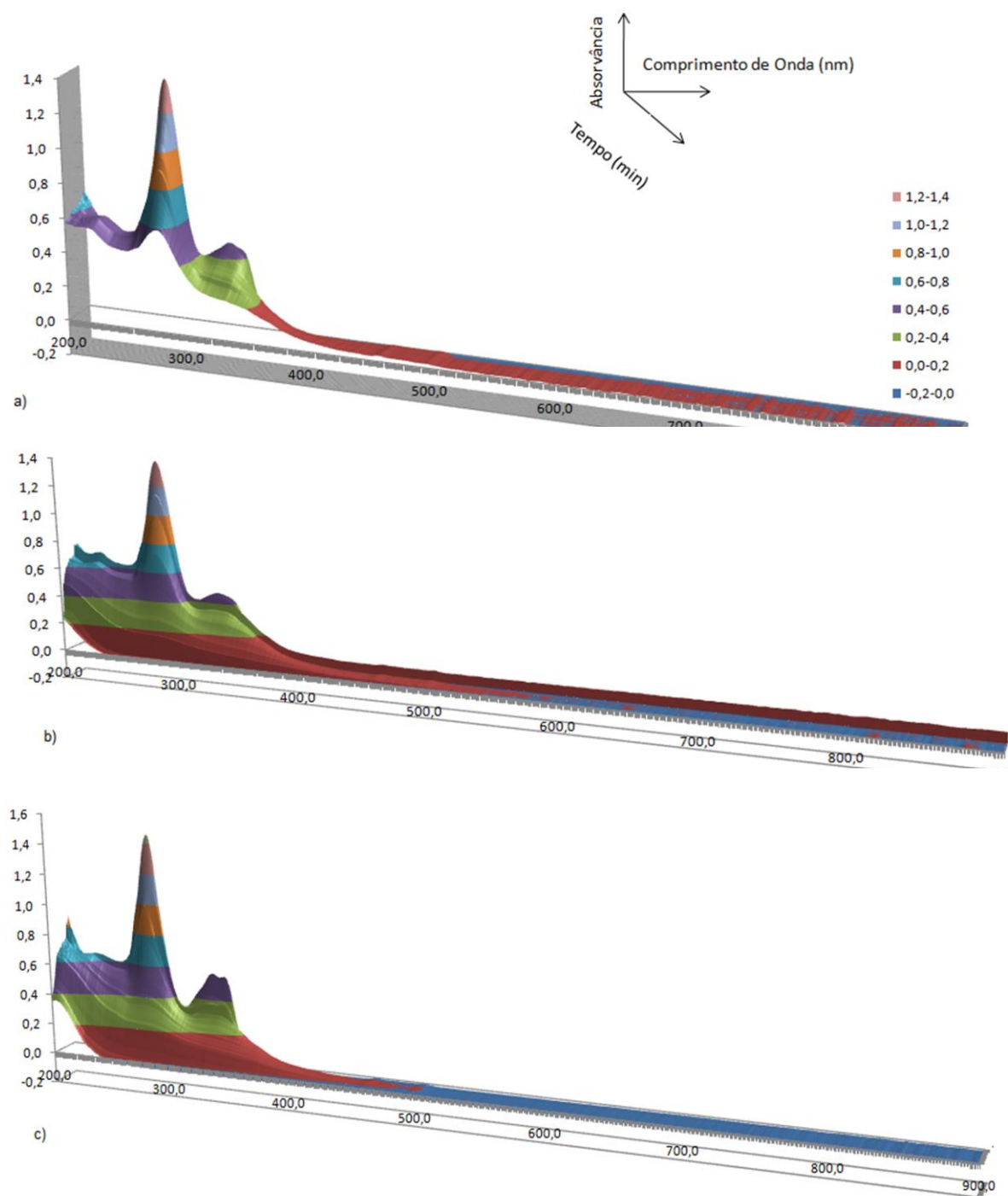
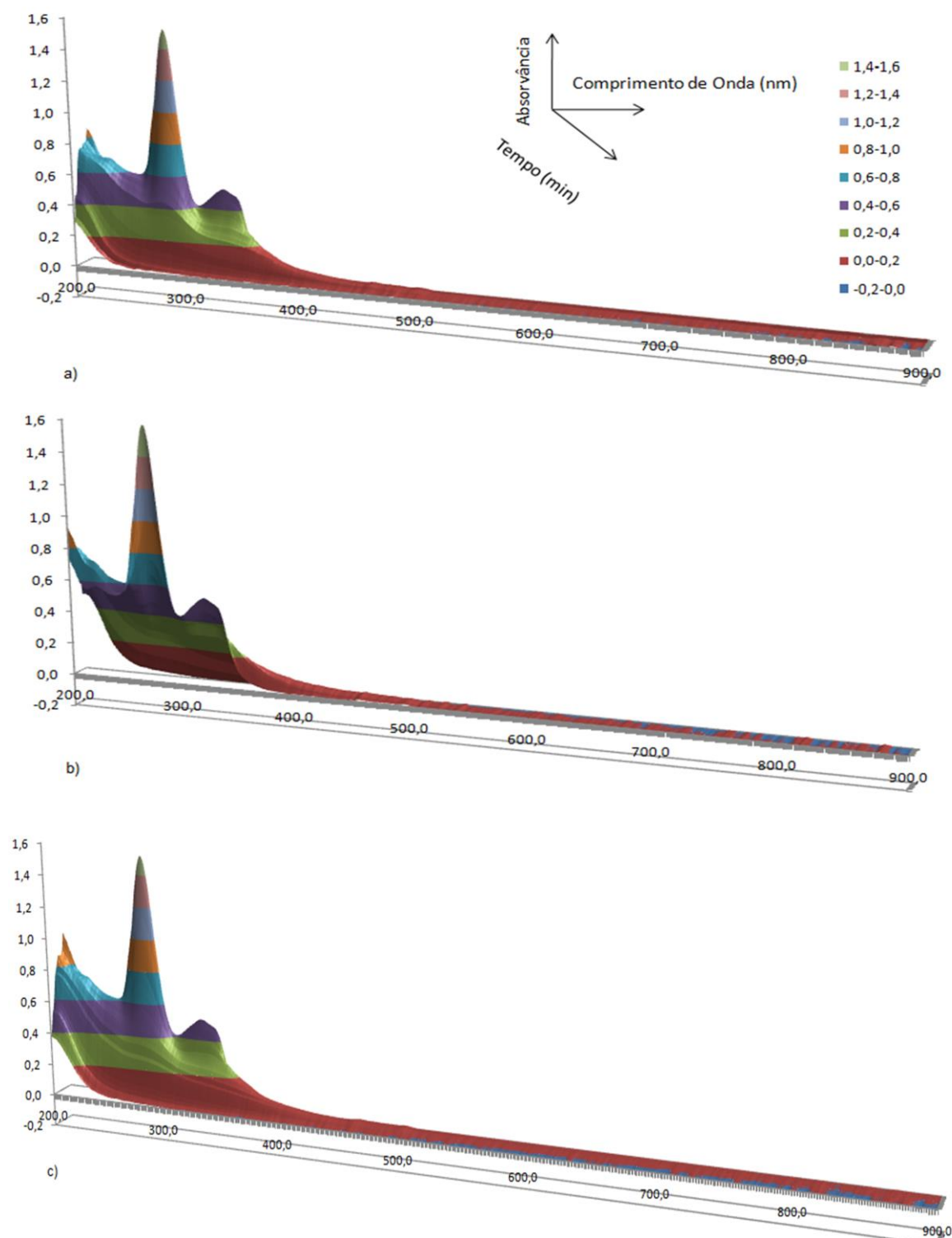


**FIGURA 4.12** - Espectro de absorção do antibiótico norfloxacinol durante o monitoramento da fotólise com peróxido de hidrogênio nas proporções de [C]:[HO] (a) [1]:[4], (b) [1]:[5] e (c) [1]:[6].

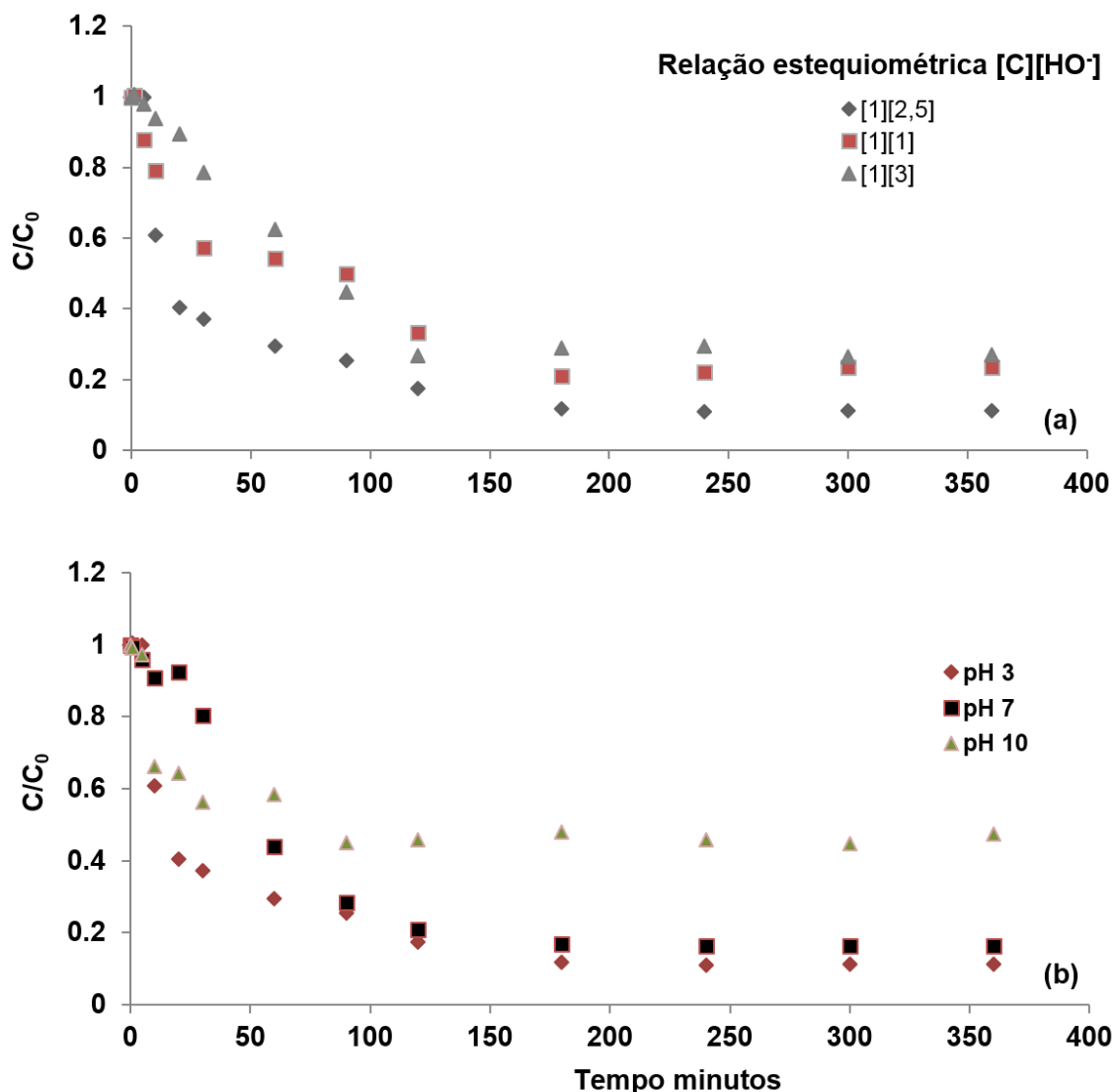


Em função do aparecimento da coloração amarelada durante todos os experimentos, foram realizadas varreduras de 200 a 900 nm, no entanto, devido à baixa concentração do produto de degradação formado não foi possível observar sua absorção. Para identificação dos produtos de degradação foi utilizado extração com Cartuchos C<sub>18</sub> e leitura no por HPLC/MS.

A formação de produtos de degradação ou metabólitos do antibiótico norfloxacino tem sido amplamente relatada na literatura (PRIETO *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2012; WAMMER *et al.*, 2013). Estes compostos intermediários são formados durante os processos de tratamento devido a característica refratária das fluoroquinolonas. Sugere-se que a identificação dos produtos seja realizada caso a caso devido às inúmeras possibilidades de formação e rearranjos que podem acontecer durante o tratamento empregado.

Para o antibiótico sulfato de gentamicina foram realizados testes em que foram utilizadas as relações estequiométricas [C]:[OH<sup>-</sup>] de [1]:[1], [1]:[2,5] e [1]:[3] em pH 7. Observou-se remoções do fármaco que variaram de 73 % até 88 % para as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizadas. Conforme visualizado na Figura 4.13A, a partir de 60 minutos de reação a proporção [C]:[OH<sup>-</sup>] de [1]:[2,5] é aquela que proporciona as melhores taxas de remoções, chegando a 88% em 180 minutos. Portanto, essa proporção foi a selecionada para otimização do pH reacional (Figura 4.13B).

**FIGURA 4.13** - Decomposição do antibiótico sulfato de gentamicina através da radiação ultravioleta com peróxido de hidrogênio. (a) Variação da concentração de  $H_2O_2$  e (b) Variação de pH. Condições experimentais: Concentração do antibiótico: 100mg/L; Intensidade da luz:  $4,94 \times 10^{-05}$  Einstein/min; temperatura: 28°C; pH=7.



É possível observar que, para o sulfato de gentamicina, o pH não apenas influenciou a velocidade da reação, como também a eficiência de remoção do fármaco. Nos pHs 3 e 7 a eficiência da reação é superior a verificada em pH 10 (52%). Vale ressaltar que em pH 10 ocorre a decomposição do peróxido de hidrogênio o que leva a uma perda de eficiência. Ressalta-se, ainda, que em pH 3 a eliminação do fármaco é discretamente superior (89%) que em pH 7 (83%), sendo essa, portanto, a melhor condição reacional.

## 5.4 Experimentos utilizando oxidação de Fenton-( $H_2O_2/Fe^{2+}$ )

### 5.4.1 Avaliação da degradabilidade dos antibióticos.

Os resultados obtidos pelos ensaios de Fenton homogêneo para o antibiótico norfloxacino, através do planejamento fatorial, são apresentados na Tabela 4.6. As variáveis monitoradas foram porcentagem de degradação por COT e absortividade em 273 nm.

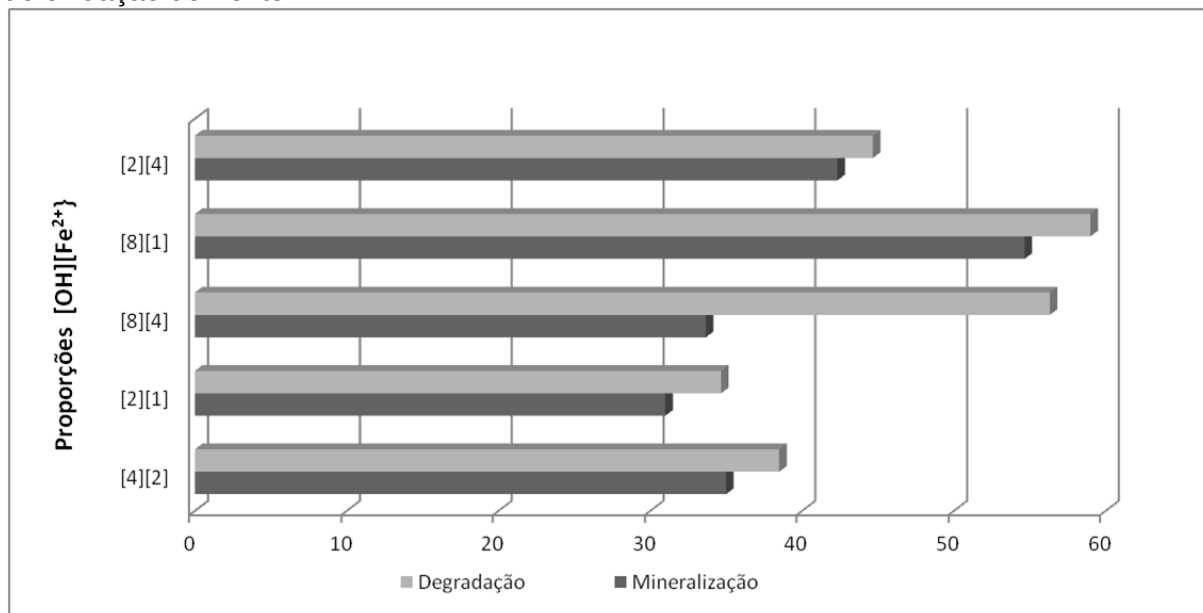
**Tabela 4.7** - Relação entre as eficiências de mineralização e degradação do antibiótico norfloxacino nos ensaios de Fenton por COT e UV/Vis, respectivamente.

| Experimentos | Ponto Central | $[OH][Fe^{2+}]$ | % Degradação COT | % Degradação UV |
|--------------|---------------|-----------------|------------------|-----------------|
| 1            | 0             | [4][2]          | 35               | 38              |
| 2            | 1             | [2][1]          | 32               | 36              |
| 3            | 1             | [2][1]          | 31               | 33              |
| 4            | 1             | [8][4]          | 36               | 58              |
| 5            | 1             | [8][4]          | 33               | 55              |
| 6            | 1             | [8][4]          | 32               | 56              |
| 7            | 1             | [8][1]          | 53               | 60              |
| 8            | 1             | [2][4]          | 44               | 46              |
| 9            | 1             | [2][1]          | 30               | 35              |
| 10           | 1             | [2][4]          | 41               | 44              |
| 11           | 1             | [8][1]          | 55               | 60              |
| 12           | 0             | [4][2]          | 35               | 39              |
| 13           | 1             | [2][4]          | 42               | 44              |
| 14           | 1             | [8][1]          | 56               | 57              |

Observa-se que a porcentagem de mineralização do norfloxacino nos experimentos é menor que a degradação do fármaco de forma específica, o que sugere a formação de produtos intermediários.

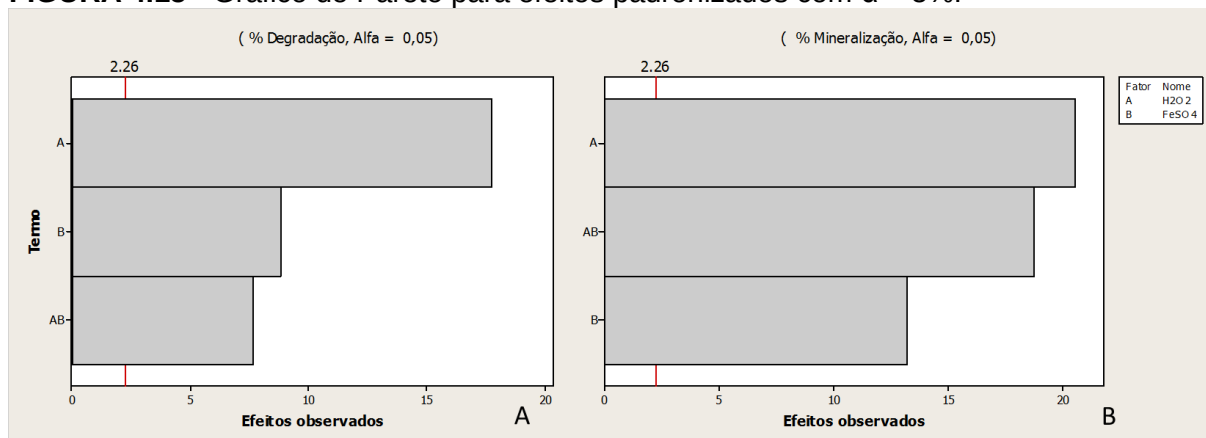
Na Figura 4.14 é possível observar que a maior eficiência de degradação e de remoção de matéria orgânica é verificada quando se utiliza a relação de  $[OH][Fe^{2+}]$  de [8]:[1] sugerindo que, o fator mais relevante para esta remoção é a concentração de  $H_2O_2$ . De acordo com FRONTISTIS *et al.*, (2011) e CHAN e CHU (2003), a oxidação de Fenton, para alguns fármacos ou compostos mais recalcitrantes, pode ser explicada pela presença de dois regimes cinéticos distintos onde maiores concentrações de peróxido aumentam de forma significativa a velocidade inicial da reação sendo seguida por uma etapa com velocidade mais lenta.

**FIGURA 4.14** - Degradação e mineralização do antibiótico norfloxacino através da utilização de oxidação de Fenton.



A Figura 4.15A demonstra através do gráfico de Pareto, a um nível de significância de 5%, que a concentração de peróxido de hidrogênio é, de fato, a variável que exerce maior influência na degradação de antibiótico norfloxacino. Com relação à mineralização, Figura 4.15B, percebe-se um certo equilíbrio entre as variáveis que influenciam este parâmetro, com uma discreta vantagem para a concentração de peróxido.

**FIGURA 4.15** - Gráfico de Pareto para efeitos padronizados com  $\alpha = 5\%$ .



Embora o fator mais relevante para maximização da remoção do fármaco seja a concentração de peróxido de hidrogênio, a exagerada adição deste composto deve ser evitada, pois o peróxido de hidrogênio residual confere toxicidade ao efluente tratado. Os radicais hidroxilas são oxidantes não seletivos e, quando presentes nos efluentes lançados em corpos d'água, poderão oxidar espécies indesejadas, causando um desequilíbrio no ecossistema aquático.

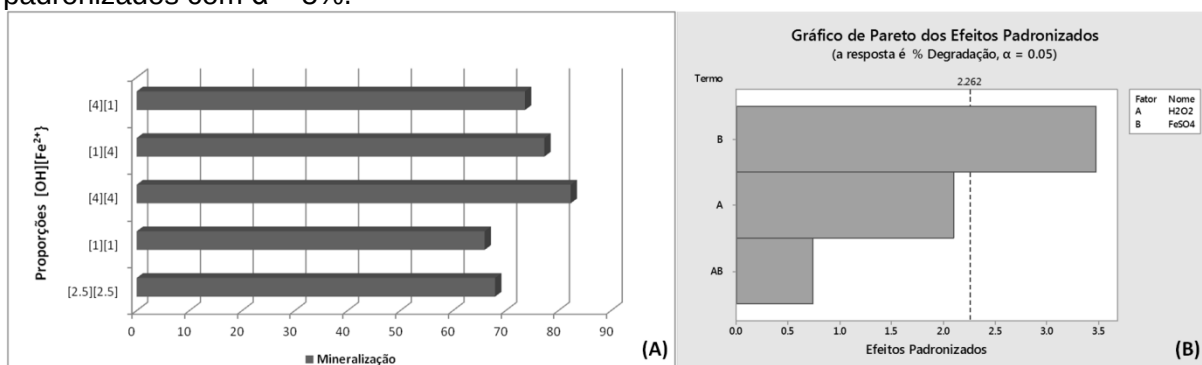
Na Tabela 4.8 são apresentados os resultados obtidos pelos ensaios de Fenton homogêneo, através do planejamento fatorial, para o antibiótico sulfato de gentamicina.

**Tabela 4.8** - Eficiência de mineralização do antibiótico sulfato de gentamicina durante os ensaios oxidação de Fenton.

| Experimentos | Ponto Central | [OH <sup>-</sup> ][Fe <sup>2+</sup> ] | % Degradação<br>COT |
|--------------|---------------|---------------------------------------|---------------------|
| 1            | 0             | [2,5][2,5]                            | 67                  |
| 2            | 1             | [1][1]                                | 66                  |
| 3            | 1             | [1][1]                                | 65                  |
| 4            | 1             | [4][4]                                | 83                  |
| 5            | 1             | [4][4]                                | 83                  |
| 6            | 1             | [4][4]                                | 81                  |
| 7            | 1             | [4][1]                                | 72                  |
| 8            | 1             | [1][4]                                | 75                  |
| 9            | 1             | [1][1]                                | 67                  |
| 10           | 1             | [1][4]                                | 78                  |
| 11           | 1             | [4][1]                                | 75                  |
| 12           | 0             | [2,5][2,5]                            | 69                  |
| 13           | 1             | [1][4]                                | 79                  |
| 14           | 1             | [4][1]                                | 74                  |

Observa-se que para todos os experimentos realizados obteve-se taxas de mineralização superiores a 60%, o que nos permite concluir que trata-se de um composto mais facilmente oxidável se comparado ao norfloxacino. Na Figura 4.16A é possível observar que a maior eficiência de mineralização é obtida quando se utiliza a relação [OH<sup>-</sup>][Fe<sup>2+</sup>][4][4] obtendo-se em torno de 80% de remoção.

**FIGURA 4.16** - Porcentagem de mineralização do antibiótico sulfato de gentamicina nos ensaios de Fenton. (a) Taxa de mineralização e (b) Gráfico de Pareto para efeitos padronizados com  $\alpha = 5\%$ .

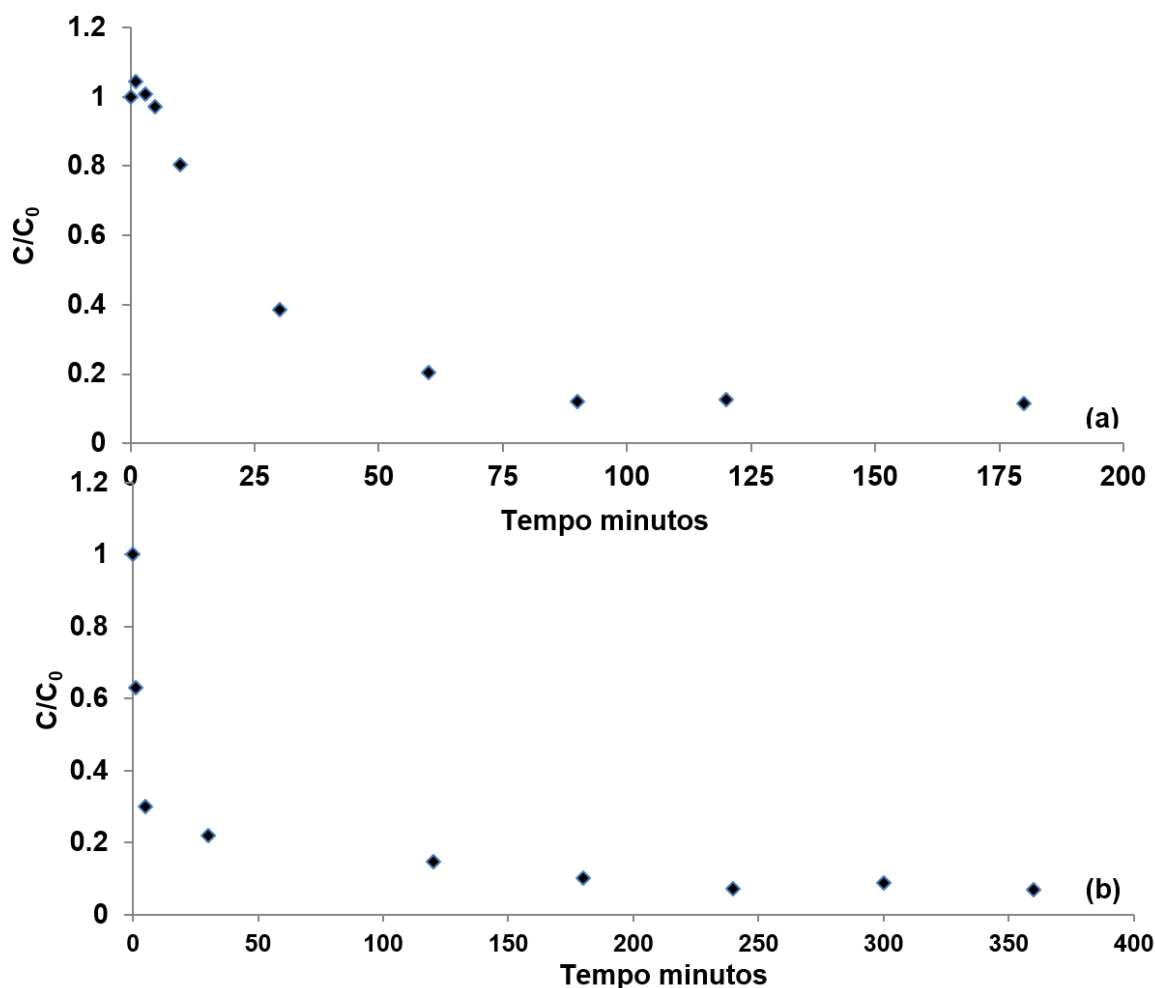


Ao contrário do que foi verificado para o antibiótico norfloxacino, no caso do antibiótico sulfato de gentamicina, observa-se um sinergismo entre as concentrações de peróxido de hidrogênio e íons  $\text{Fe}^{2+}$ , Figura 4.16 B, na eficiência de remoção. Ao avaliar a remoção do composto de forma específica através de determinações feitas por HPLC/MS observou-se uma remoção de 99,5 % deste antibiótico. Estes resultados confirmam que, para cada tipo de fármaco com o qual se deseja trabalhar, é necessário um estudo detalhado de seu comportamento devido à inexistência de um protocolo ideal. Observa-se, portanto, a eficiência da utilização dos processos oxidativos avançados para a remediação de águas residuais contaminadas contendo poluentes orgânicos não-biodegradáveis como fármacos (OLLER *et al.*, 2011;. RIZZO, 2011).

### **5.5 Avaliação da degradação dos antibióticos por foto-Fenton - ( $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}/\text{UV}$ )**

Para os ensaios utilizando foto-Fenton foram utilizadas as melhores condições analíticas encontrada nos ensaios de Fenton para cada antibiótico. Os resultados obtidos nestes ensaios são apresentados na Figura 4.17.

**FIGURA 4.17** - Degradação dos antibióticos utilizando tratamento por foto-Fenton. (a) Antibiótico norfloxacino e (b) Sulfato de gentamicina. Condições experimentais: Concentrações iniciais: 15mg/L e 100 mg/L, respectivamente; Intensidade da luz:  $4,94 \cdot 10^{-05}$  Einstein/min; temperatura: 28°C, pH 3.



Para o antibiótico norfloxacino (Figura 4.17a), onde utilizou-se a proporção  $[OH^-][Fe^{2+}]$  de [8]:[1], conseguiu-se uma taxa de mineralização em torno de 88 % e degradação (UV/Vis) de 65 %. O tratamento por foto-Fenton é, portanto, mais eficiente se comparado à oxidação de Fenton, além de gerar uma menor quantidade de lama durante a etapa de neutralização. Ao avaliarmos os resultados obtidos através da técnica de HPLC/MS para este composto observa-se que a taxa de remoção do norfloxacino foi ainda maior (87,4%). Esta diferença se deve as interferências de matriz que acontecem durante a utilização da técnica por UV/Vis onde outros compostos absorvem em comprimentos de onda muito próximo ao do norfloxacino.

Já para o sulfato de gentamicina (Figura 4.17b), para o qual a proporção  $[OH^-][Fe^{2+}]$  foi de [4]:[4], foi observada uma taxa de mineração de 93 % e de decomposição por HPLC/MS de 99,7 %. Também nesse caso o tratamento por foto-Fenton é mais eficiente quando comparado à oxidação por Fenton.

## **5.6 Comparação entre os processos utilizados**

Na Tabela 4.9 é apresentado um compilado das condições analíticas e eficiências de remoções encontradas durante os ensaios envolvendo processos oxidativos avançados para os antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina.

É possível verificar que ambos os antibióticos podem ser removidos de forma satisfatória utilizando processos oxidativos avançados como Fenton e foto-Fenton. Observou-se degradações médias de 88 % e 99 % e mineralizações médias de 55 % e 59 % para os dois antibióticos.

**Tabela 4.9** - Resumo das principais condições analíticas utilizadas e remoções observadas durante os estudos envolvendo processos oxidativos avançados (a) norfloxacino e (b) sulfato de gentamicina.

| Processos utilizados            | Processos oxidativos avançados            |         |                                  |                                    |                                    |
|---------------------------------|-------------------------------------------|---------|----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
|                                 | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>             | UV      | UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Fenton                             | Foto-Fenton                        |
| Concentração Inicial mg/L       | 15.0                                      | 15.0    | 15.0                             | 15.0                               | 15.0                               |
| Concentração Final mg/L UV      | 14.7                                      | 2.3     | <0.1                             | 6.2                                | 1.8                                |
| Concentração Final mg/L HPLC/MS | 14.7                                      | 3.5     | 0.1                              | 1.9                                | 0.0                                |
| Temperatura                     | 28±2                                      | 28±2    | 28±2                             | 28±2                               | 28±2                               |
| Tempo                           | 60 min                                    | 7 horas | 100 min                          | 200 min                            | 200 min                            |
| pH                              | 3.0                                       | 7.0     | 3.0                              | 3.0                                | 3.0                                |
| Relação Otimizada               | [C][OH <sup>-</sup> ][1][2]               | *NA     | [C][OH <sup>-</sup> ][1][3]      | [C][OH <sup>-</sup> ][Fe][1][8][1] | [C][OH <sup>-</sup> ][Fe][1][8][1] |
| % Degradação UV/VIS, 273 nm     | 2.0                                       | 85.0    | 100.0                            | 59.0                               | 88.0                               |
| % Degradação HPLC/MS            | 2.1                                       | 76.7    | 99.3                             | 87.4                               | 99.7                               |
| % Mineralização (COT)**         | ***NR                                     | 2.0     | 32.0                             | 55.0                               | 65.0                               |
| <b>(a)</b>                      |                                           |         |                                  |                                    |                                    |
| Processos utilizados            | Processos oxidativos avançados            |         |                                  |                                    |                                    |
|                                 | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>             | UV      | UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Fenton                             | Foto-Fenton                        |
| Concentração Inicial mg/L       | 100                                       | 100     | 100                              | 100                                | 100                                |
| Concentração Final mg/L HPLC/MS | 36.8                                      | 7.7     | 2.0                              | 0.5                                | 0.3                                |
| Temperatura                     | 28±2                                      | 28±2    | 28±2                             | 28±2                               | 28±2                               |
| Tempo                           | 60 min                                    | 7 horas | 360 min                          | 360 min                            | 360 min                            |
| pH                              | 3.0                                       | 7.0     | 3.0                              | 3.0                                | 3.0                                |
| Relação Otimizada               | [C][OH <sup>-</sup> ][1][1.5]             | *NA     | [C][OH <sup>-</sup> ][1][2.5]    | [C][OH <sup>-</sup> ][Fe][1][4][4] | [C][OH <sup>-</sup> ][Fe][1][4][4] |
| % Degradação HPLC/MS            | 63.2                                      | 92.3    | 98.0                             | 99.5                               | 99.7                               |
| % Mineralização (COT)**         | 7.0                                       | 76.3    | 88.9                             | 59.0                               | 93.1                               |
| <b>(b)</b>                      |                                           |         |                                  |                                    |                                    |
| *NA Não se aplica               | ** Determinação de carbono orgânico total |         | ***NR Não realizado              |                                    |                                    |

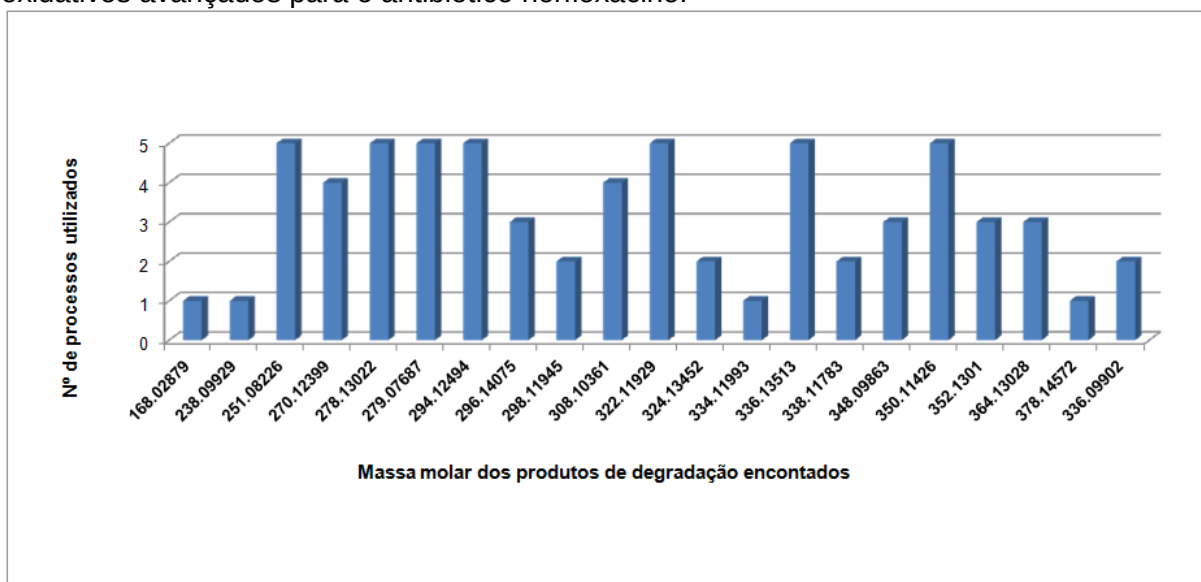
## 5.7 Identificação dos produtos de degradação formados durante o tratamento com processos oxidativos avançados.

Ao utilizar processos oxidativos avançados como forma de tratamento para fármacos deve-se levar em consideração a formação de uma série de produtos de degradação gerados devida a mineralização incompleta destes compostos. Alguns produtos de degradação podem ser observados em diversos processos empregados, mas alguns são específicos e serão gerados no sistema em função das condições reacionais empregadas, sobretudo, devido ao alto poder oxidante e não seletivo dos radicais hidroxilas. A identificação destes produtos de degradação é uma etapa importante, pois a escolha de um ou outro tratamento deve estar baseada não somente na eficiência de remoção, mas também na geração de um efluente com pouca ou nenhuma toxicidade.

### 5.7.1 Antibiótico norfloxacinol

Para os processos oxidativos avançados envolvendo o antibiótico norfloxacinol observou-se a formação de uma série de produtos de degradação. Alguns foram encontrados em vários processos sendo alguns mais específicos. Na Figura 4.18 são apresentadas as massas molares dos produtos de degradação bem como o número de processos em que foram encontrados.

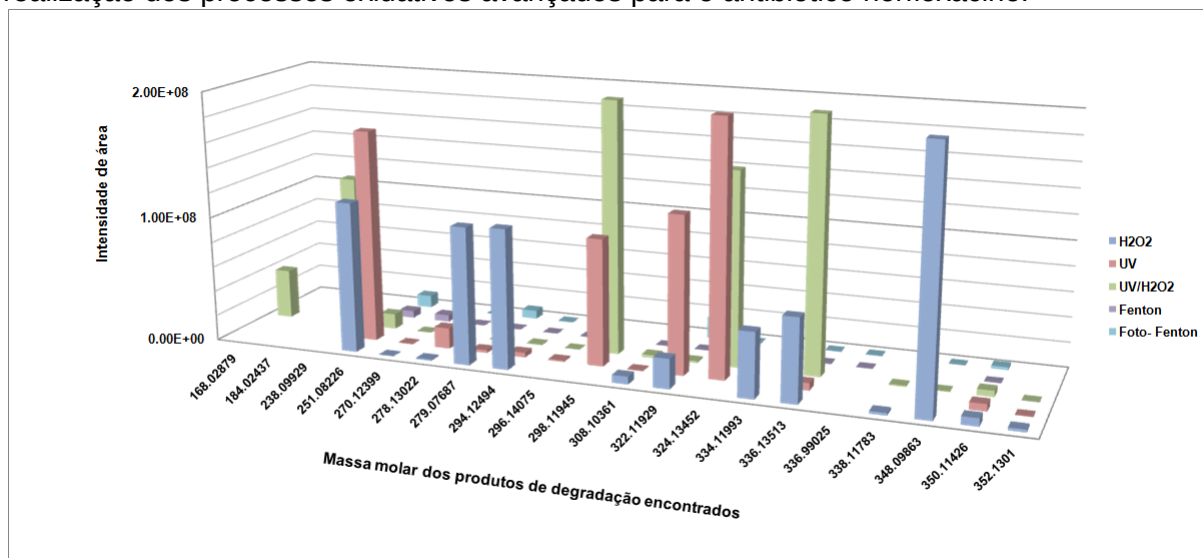
**FIGURA 4.18** - Produtos de degradação encontrados após a utilização dos processos oxidativos avançados para o antibiótico norfloxacinol.



Estes produtos de degradação foram gerados em quantidades variadas dependendo do processo empregado, Figura 4.19, o que demonstra, sobretudo, a não seletividade do peróxido de hidrogênio e, ainda, as diferentes rotas que um composto pode passar durante um processo oxidativo avançado. Vários estudos têm relatado a identificação de produtos de degradação

após a utilização de processos oxidativos avançados para diferentes fármacos (SONG, *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2012; HOFMANN, *et al.*, 2007), demonstrando a importância desta etapa do trabalho.

**FIGURA 4.19** - Intensidade de área dos produtos de degradação encontrados após a realização dos processos oxidativos avançados para o antibiótico norfloxacino.



Na Figura 4.19 é possível observar que processos menos energéticos como UV e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tendem a gerar produtos de degradação em uma concentração mais elevada, o que demonstra a ineficiência destes processos se comparados com os processos de Fenton e foto-Fenton para a degradação do norfloxacino. Ao avaliarmos as taxas de mineralização alcançada pelos dois processos supracitados, verifica-se uma remoção em torno de 2 % para UV e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enquanto os processos de Fenton e foto-Fenton possuem taxas de mineralização de 55 e 65 %, respectivamente.

Nas Tabelas 4.10, 4.11 e 4.12 são apresentadas as possíveis estruturas moleculares dos produtos de degradação identificados durante a utilização dos diversos processos de oxidação estudados. Muitos destes produtos de degradação já foram relatados na literatura e estão devidamente referenciados por pelo menos uma citação. Os que não possuem citação são considerados inéditos.

**Tabela 4.10** - Estrutura molecular dos compostos encontrados após a realização dos ensaios envolvendo processos oxidativos avançados para o antibiótico norfloxacin. Processos utilizados: (1) UV, (2) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (3) UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (4) Fenton e (5) Foto-Fenton.

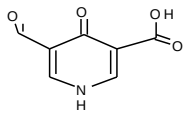
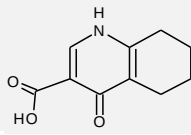
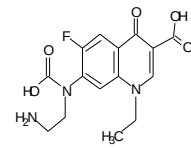
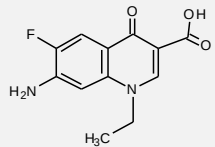
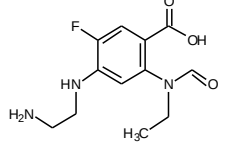
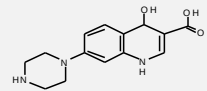
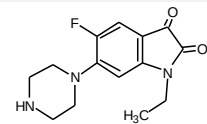
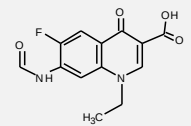
| Relação carga/massa (m/z) | Fórmula proposta                                                | Erro ppm | DBE | Nome IUPAC                                                                                     | Estrutura proposta                                                                    | Tratamento utilizado | Refs              |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------|----------|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|-------------------|
| 168.02879                 | C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>     | -2.0     | 5.5 | 5-formyl-4-oxo-1,4-dihydropyridine-3-carboxylic acid                                           |    | 3                    | Babic et al. 2013 |
| 194.08119                 | C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>                 | +0.98    | 5.5 | 4-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid                                         |    | 1                    |                   |
| 238.09929                 | C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> N <sub>3</sub> F | +0.67    | 5.5 | 7-[(2-aminoethyl)(carboxy)amino]-1-ethyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid |    | 3                    | Liu et al. 2012   |
| 251.08226                 | C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>  | -1.04    | 7.5 | 7-amino-1-ethyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid                          |    | Todos                | Liu et al. 2012   |
| 270.12399                 | C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>  | +2.0     | 5.5 | 4-[(2-aminoethyl)amino]-2-[ethyl(formyl)amino]-5-fluorobenzoic acid                            |    | 1, 2, 3, 4           | Liu et al. 2012   |
| 276.1344                  | C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>   | -0.36    | 7.5 | 4-hydroxy-7-(piperazin-1-yl)-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid                            |  | 1                    |                   |
| 278.13022                 | C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>2</sub>  | +0.50    | 7.5 | 1-ethyl-5-fluoro-6-(piperazin-1-yl)-1H-indole-2,3-dione                                        |  | 1, 2, 3, 4 e 5       | Liu et al. 2012   |
| 279.07687                 | C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>4</sub>  | -1.05    | 8.5 | 1-ethyl-6-fluoro-7-(formylamino)-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid                  |  | 1, 2, 3, 4 e 5       | Liu et al. 2012   |

**Tabela 4.11** - Estrutura molecular dos compostos encontrados após a realização dos ensaios envolvendo processos oxidativos avançados para o antibiótico norfloxacino. Processos utilizados: (1) UV, (2) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (3) UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (4) Fenton e (5) Foto-Fenton.

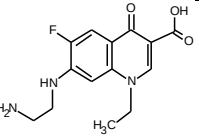
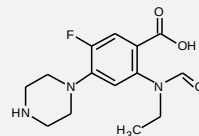
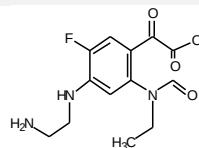
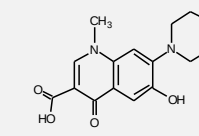
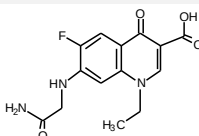
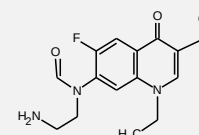
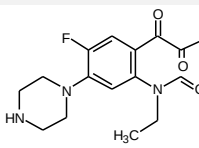
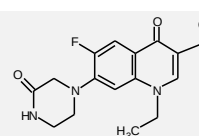
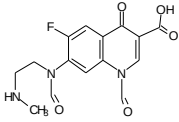
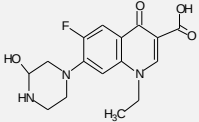
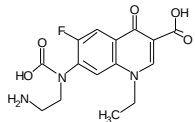
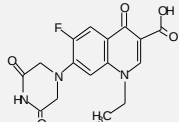
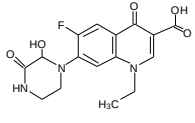
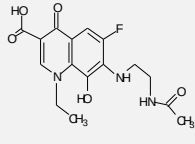
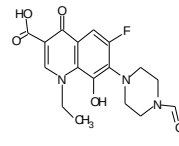
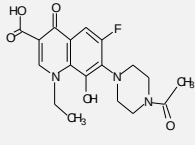
| Relação carga/massa (m/z) | Fórmula proposta                                               | Erro ppm | DBE | Nome IUPAC                                                                                    | Estrutura proposta                                                                   | Tratamento utilizado | Refs                                               |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------|----------|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------------------------------------|
| 294.12494                 | C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> | -0.63    | 7.5 | 7-[(2-aminoethyl)amino]-1-ethyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid         |    | Todos                | Liu <i>et al.</i> 2012 e Prieto <i>et al.</i> 2011 |
| 296.14075                 | C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> | -0.08    | 6.5 | 2-[ethyl(formyl)amino]-5-fluoro-4-(piperazin-1-yl)benzoic acid                                |    | 1, 3 e 4             | Liu <i>et al.</i> 2012                             |
| 298.11945                 | C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> | -2.0     | 6.5 | {4-[(2-aminoethyl)amino]-2-[ethyl(formyl)amino]-5-fluorophenyl}(oxo)acetic acid               |    | 1 e 3                | Liu <i>et al.</i> 2012                             |
| 304.12918                 | C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>  | +1.70    | 8.5 | 6-hydroxy-1-methyl-4-oxo-7-(piperazin-1-yl)-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid            |   | 1, 2                 |                                                    |
| 308.10361                 | C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> | +1.24    | 8.5 | 7-[(2-amino-2-oxoethyl)amino]-1-ethyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid   |  | 1, 2, 3 e 4          | Liu <i>et al.</i> 2012                             |
| 322.11929                 | C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> | -0.59    | 8.5 | 7-[(2-aminoethyl)(formyl)amino]-1-ethyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid |  | Todos                | Liu <i>et al.</i> 2012                             |
| 324.13452                 | C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>5</sub> | -0.45    | 7.5 | {2-[ethyl(formyl)amino]-5-fluoro-4-(piperazin-1-yl)phenyl}(oxo)acetic acid                    |  | 1 e 3                | Liu <i>et al.</i> 2012                             |
| 334.11993                 | C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> | -0.12    | 8.5 | 1-ethyl-6-fluoro-4-oxo-7-(3-oxopiperazin-1-yl)-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid         |  | 2                    | Liu <i>et al.</i> 2012                             |

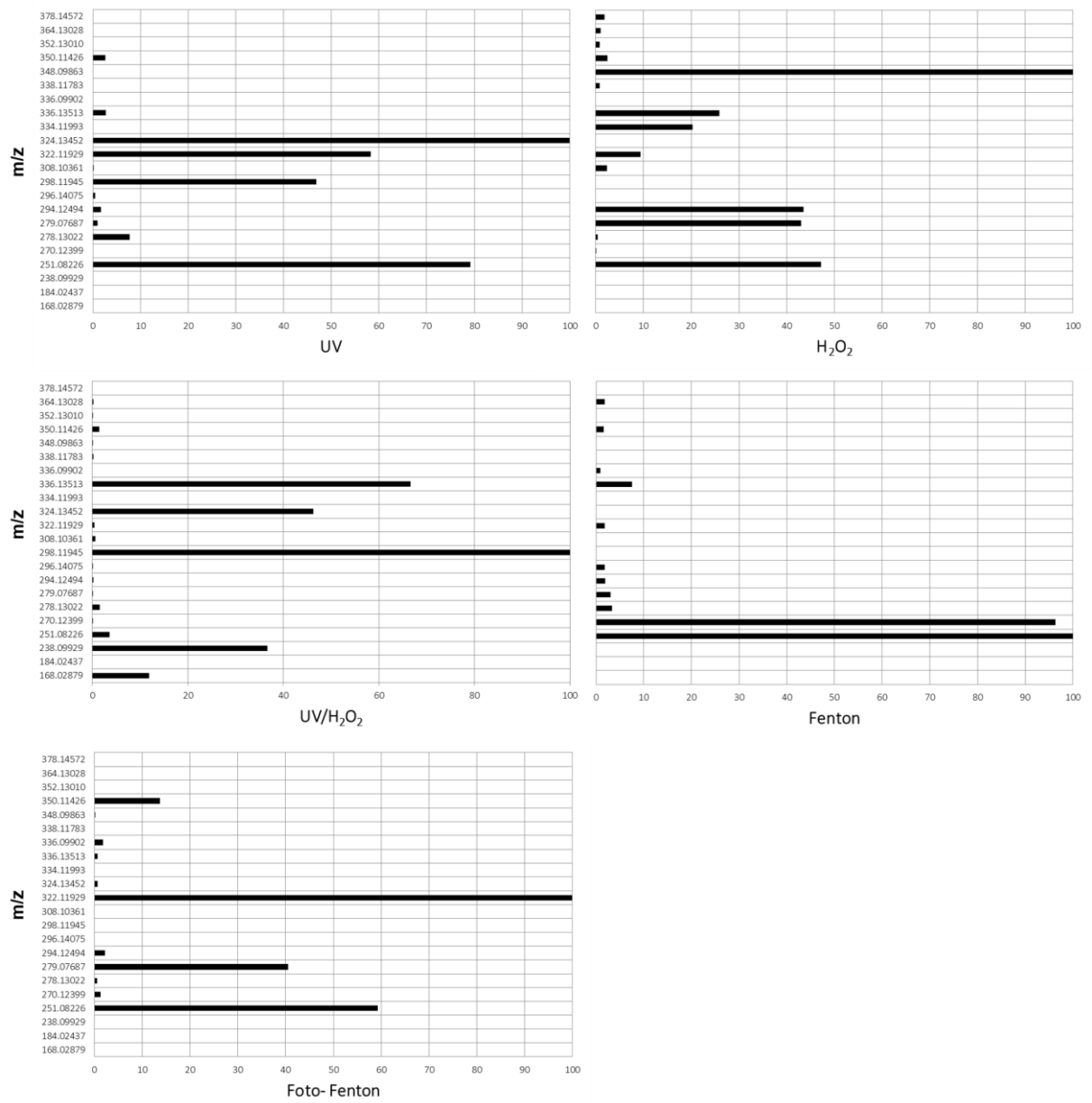
**Tabela 4.12** – Estrutura molecular dos compostos encontrados após a realização dos ensaios envolvendo processos oxidativos avançados para o antibiótico norfloxacino. Processos utilizados: (1) UV, (2) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (3) UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (4) Fenton e (5) Foto-Fenton.

| Relação carga/massa (m/z) | Fórmula proposta                                               | Erro ppm | DBE  | Nome IUPAC                                                                                              | Estrutura proposta                                                                    | Tratamento utilizado | Refs                                                    |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------|----------|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------------------------------------------|
| 336.09902                 | C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>5</sub> | -0.14    | 7.5  | 6-fluoro-1-formyl-7-{formyl[2-(methylamino)ethyl]amino}-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid    |    | 4 e 5                | Babic <i>et al.</i> 2013                                |
| 336.13513                 | C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> | -1.55    | 8.5  | 1-ethyl-6-fluoro-7-(3-hydroxypiperazin-1-yl)-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid               |    | Todos                | Liu <i>et al.</i> 2012                                  |
| 338.11783                 | C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>5</sub> | +1.28    | 7.5  | 7-[(2-aminoethyl)(carboxy)amino]-1-ethyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid          |    | 2 e 3                | Liu <i>et al.</i> 2012                                  |
| 348.09863                 | C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>5</sub> | -0.23    | 10.5 | 7-(3,5-dioxopiperazin-1-yl)-1-ethyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid               |   | 2, 3 e 5             | Liu <i>et al.</i> 2012                                  |
| 350.11426                 | C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>5</sub> | -0.42    | 9.5  | 1-ethyl-6-fluoro-7-(2-hydroxy-3-oxopiperazin-1-yl)-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid         |  | Todos                | Liu <i>et al.</i> 2012                                  |
| 352.13010                 | C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>5</sub> | -0.64    | 8.5  | 7-[(2-(acetylamino)ethyl)amino]-1-ethyl-6-fluoro-8-hydroxy-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid |  | 1, 2 e 3             | Liu <i>et al.</i> 2012<br>Parshiko <i>v et al.</i> 2001 |
| 364.13028                 | C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>5</sub> | -0.13    | 9.5  | 1-ethyl-6-fluoro-7-(4-formylpiperazin-1-yl)-8-hydroxy-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid      |  | 2, 3 e 4             | Parshiko <i>v et al.</i> 2001                           |
| 378.14572                 | C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>5</sub> | +0.96    | 9.5  | 7-(4-acetylpiperazin-1-yl)-1-ethyl-6-fluoro-8-hydroxy-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-                     |  | 2 e 6                | Parshiko <i>v et al.</i> 2001                           |

A concentração de cada produto de degradação formado em cada processo de tratamento empregado não foi possível ser definida devido à ausência de padrões analíticos para quantificação. Sabe-se que a toxicidade de um composto é devida, entre outros fatores, a sua concentração no meio. Desta forma, para facilitar a visualização e permitir uma melhor

interpretação dos dados, foi realizada uma normalização nas áreas dos produtos de degradação afim facilitar a comparação entre os dados ecotoxicológicos e a de presença deste metabólito no meio, Figura 4.20.

**FIGURA 4.20** - Produtos de degradação identificados após a realização dos ensaios envolvendo processos oxidativos avançados para o antibiótico norfloxacin.



### 5.7.2 Antibiótico sulfato de gentamicina

Ao contrário do antibiótico norfloxacino o sulfato de gentamicina é pouco relatado na literatura, sobretudo no que tange seu tratamento enquanto contaminante ambiental. A identificação deste composto em meios aquosos somente é possível através de técnicas de espectrometria de massa ou através da utilização de alguns detectores específicos.

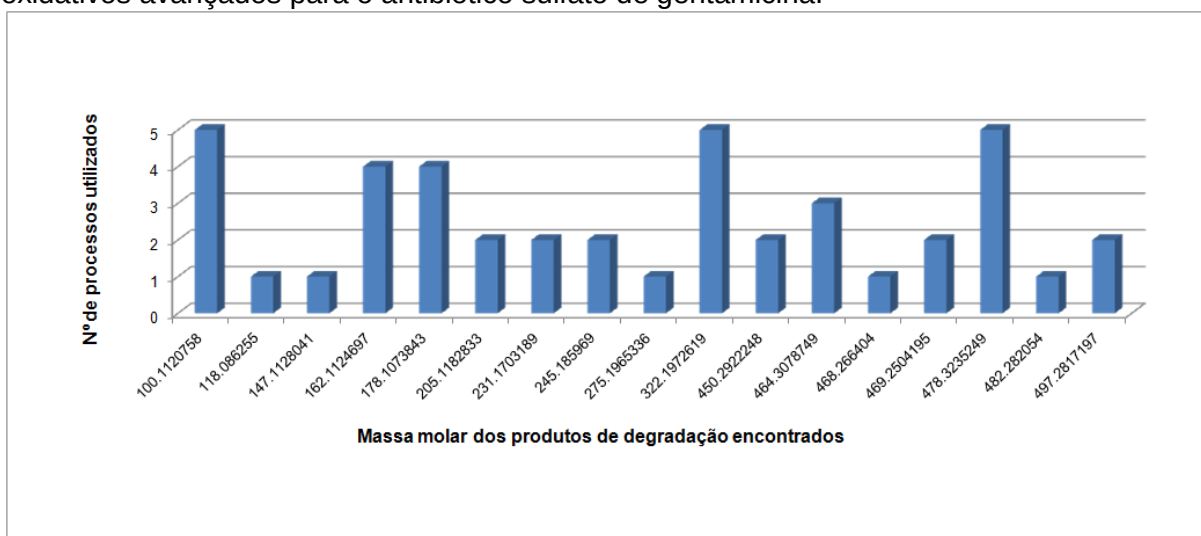
O sulfato de gentamicina é facilmente solúvel em água não possuindo cor nem sabor. Além disso, é muito utilizado no Brasil, sobretudo em regimes hospitalares durante tratamento de infecções e em pós operatório. A dificuldade em se manter uma robusta base de dados acerca da presença deste fármaco no meio ambiente está no fato de não possuir grupos cromóforos e por isso não serem detectados através de técnicas analíticas que utilizam o espectro eletromagnético como forma de detecção.

Outro aspecto importante está no fato de ser um composto hidrofílico e por isso não ficar retido em colunas cromatográficas rotineiramente utilizadas em laboratórios de espectrometria de massa como as colunas  $C_{18}$ .

Para esta determinação analítica foi utilizada uma coluna  $C_{18}$  modificada conhecida como T3, cujas referencias foram citadas no item *Material e Métodos*.

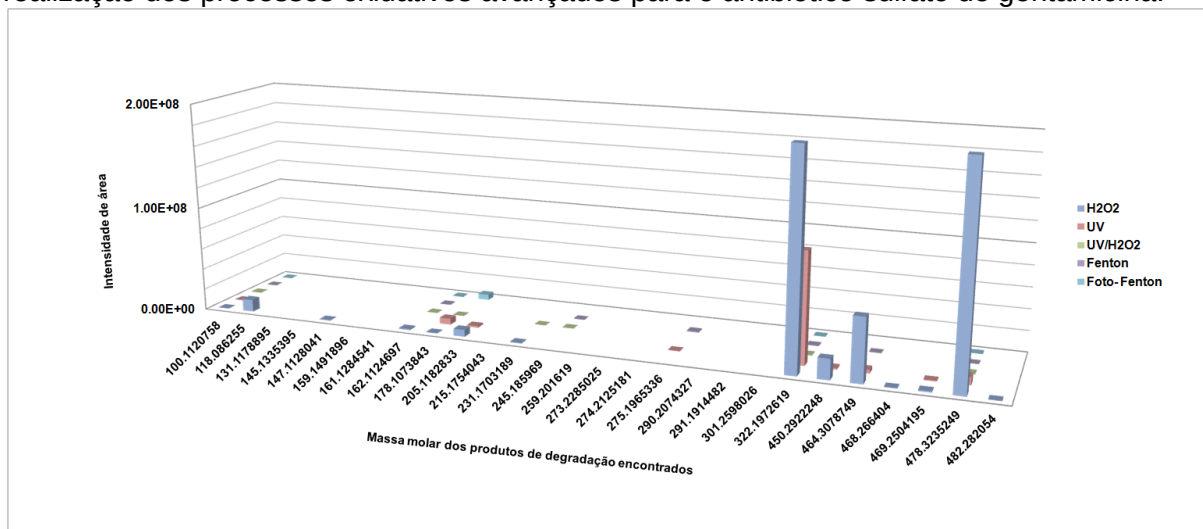
Na Figura 4.21 são apresentados os produtos de degradação identificados após os ensaios envolvendo processos oxidativos avançados para o antibiótico sulfato de gentamicina.

**FIGURA 4.21** - Produtos de degradação encontrados após a utilização dos processos oxidativos avançados para o antibiótico sulfato de gentamicina.



Assim como nos estudo envolvendo o antibiótico norfloxacinó vários produtos de degradação foram identificados em diversos processos enquanto que outros são mais específicos, Figura 4.22.

**FIGURA 4.22** - Intensidade de área dos produtos de degradação encontrados após a realização dos processos oxidativos avançados para o antibiótico sulfato de gentamicina.



Para o antibiótico sulfato de gentamicina, de igual maneira a observada para os ensaios de biodegradabilidade, observa-se a presença do TP 322,1972 em todos os processos estudados. Este composto já foi relatado pela literatura (LOFFTER, *et al.*, 2003; LI, *et al.*, 2012) e é formado mesmo quando não se aplica nenhuma forma de tratamento. Pode-se dizer que trata-se de uma decomposição natural deste antibiótico e que os tratamentos utilizados simplesmente aumentam sua concentração no meio reacional.

Os TPs de massas molares 450,2922, 464,30787 e 478,3235 são íons moleculares do antibiótico sulfato de gentamicina, uma vez que este fármaco se apresenta na forma de uma mistura contendo três compostos distintos.

Nas Tabelas 4.13 e 4.14 são apresentadas as possíveis estruturas moleculares dos produtos de degradação encontrados durante os ensaios envolvendo os processos oxidativos avançados. Alguns destes compostos já foram relatados na literatura e outros foram identificados durante este estudo. Nesta tabela cita-se pelo menos um trabalho que relate o TPs e os que não tiverem citações são considerados compostos inéditos.

**Tabela 4.13** - Estrutura molecular dos compostos encontrados após a realização dos ensaios envolvendo processos oxidativos avançados para o antibiótico sulfato de gentamicina. Processos utilizados: (1) UV, (2) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (3) UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (4) Fenton e (5) Foto-Fenton.

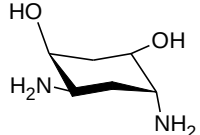
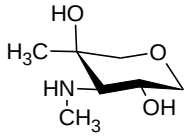
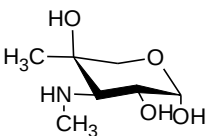
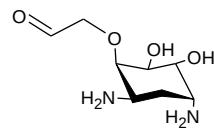
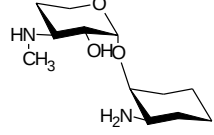
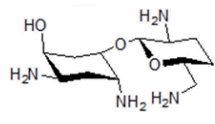
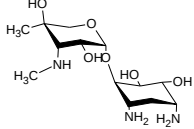
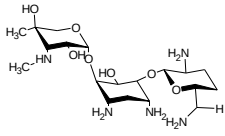
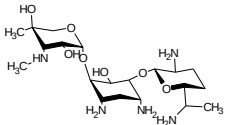
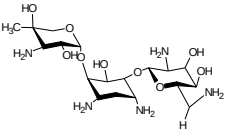
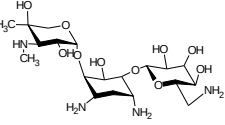
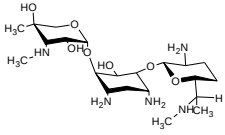
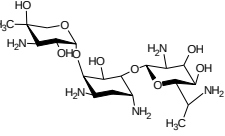
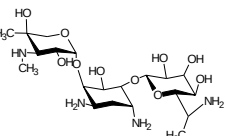
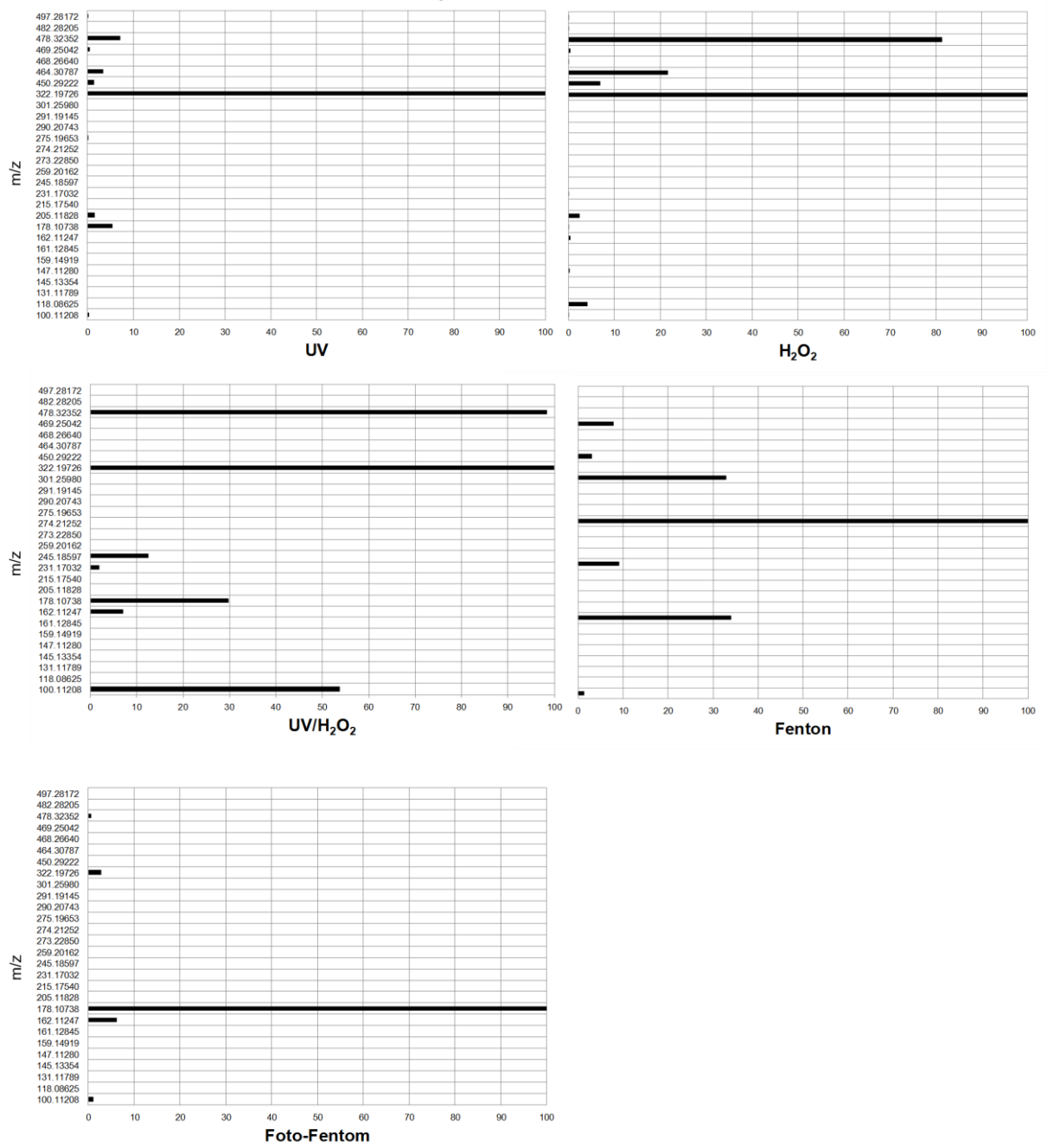
| Experimental (m/z) | Fórmula molecular proposta                                    | Erro ppm | DBE (double bond equivalents) | IUPAC name                                                                                       | Estrutura proposta                                                                    | Tratamento utilizado | Refs |
|--------------------|---------------------------------------------------------------|----------|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|------|
| 100,1120758        | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N                              | 1,23     | 0,5                           | Ciclohexanamina                                                                                  |    | Todos                |      |
| 147,1128041        | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  | 0,26     | 0,5                           | (1S,4R)-4,6-diaminociclohexano-1,3-diol                                                          |     | 2                    |      |
| 162,1124697        | C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>                | -1,14    | 0,5                           | (3R,5S)-3-metil-4-(metilamino)tetrahidro-2H-piran-3,5-diol                                       |     | 2, 3, 4 e 5          |      |
| 178,1073843        | C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub>                | -0,33    | 0,5                           | 5-metil-4-(metilamino)tetrahidro-2H-piran-2,3,5-triol                                            |     | 1, 2, 3 e 5          |      |
| 205,1182833        | C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>  | 0,70     | 1,5                           | {[(1R,4R)-4,6-diamino-2,3-dihidroxiciclohexil]oxi} acetaldehyde                                  |    | 1 e 2                |      |
| 245,185969         | C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | -1,48    | 2,0                           | 2-[(2-aminociclohexil)oxi]-4-(metilamino)tetrahidro-2H-piran-3-ol                                |   | 3 e 4                |      |
| 275,1965336        | C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | -1,31    | 2,0                           | (1S,5R)-2,4-diamino-5-[[[(2R,6S)-3-amino-6-(aminometil)tetrahidro-2H-piran-2-il]oxi]ciclohexanol |  | 1 e 4                |      |

**Tabela 4.14** - Estrutura molecular dos compostos encontrados após a realização dos ensaios envolvendo processos oxidativos avançados para o antibiótico sulfato de gentamicina. Processos utilizados: (1) UV, (2) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (3) UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (4) Fenton e (5) Foto-Fenton.

| Experimental (m/z) | Fórmula molecular proposta                                     | Erro ppm    | DBE (double bond equivalents) | IUPAC name                                                                                      | Estrutura proposta                                                                   | Tratamento utilizado | Refs                       |
|--------------------|----------------------------------------------------------------|-------------|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------------|
| 322,1972619        | C <sub>13</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>  | -1,12491936 | 2,0                           | 2-[(4,6-diamino-2,3-dihidroxiciclohexil)oxi]-5-metil-4-(metilamino)tetrahidro-2H-piran-3,5-diol |   | Todos                | Loffter <i>et al.</i> 2003 |
| 450,2922248        | C <sub>19</sub> H <sub>39</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>  | -0,72       | 3,0                           | Gentamicina C1a                                                                                 |    | Todos                |                            |
| 464,3078749        | C <sub>20</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>  | -0,95       | 3,0                           | Gentamicina C2 e C2a                                                                            |    | Todos                |                            |
| 468,266404         | C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub>  | -1,60       | 3,0                           |                                                                                                 |   | 3 e 4                | Li <i>et al.</i> , 2011    |
| 469,2504195        | C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub> | -0,69       | 3,0                           |                                                                                                 |  | 1, 3, 4 e 5          | Li <i>et al.</i> , 2011    |
| 478,3235249        | C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>  | -1,16       | 3,0                           | Gentamicina C1                                                                                  |  | 1, 2, 5 e 6          |                            |
| 482,282054         | C <sub>19</sub> H <sub>39</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub>  | -1,54       | 3,0                           |                                                                                                 |  | 3 e 4                | Li <i>et al.</i> , 2011    |
| 497,2817197        | C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub> | -1,86       | 3,0                           |                                                                                                 |  | 3, 4, 5 e 6          | Li <i>et al.</i> , 2011    |

Para facilitar a comparação entre a presença dos produtos de degradação e os resultados dos ensaios ecotoxicológicos foi realizada uma normalização nas áreas dos compostos encontrados, Figura 4.23.

**FIGURA 4.23** - Produtos de degradação identificados após a realização dos ensaios envolvendo processos oxidativos avançados para o antibiótico sulfato de gentamicina.



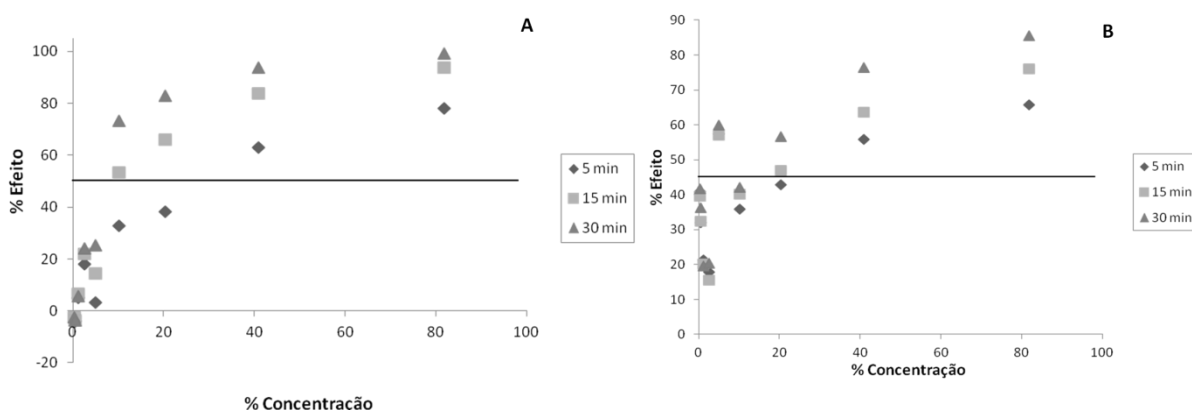
## 5.8 Ensaios ecotoxicológicos para os antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina após utilização de processos oxidativos avançados.

### 5.8.1 Análise ecotoxicológica das amostras provenientes do tratamento por UV

Tanto a amostra com norfloxacino quanto com sulfato de gentamicina apresentaram-se tóxicas após realização do tratamento por radiação UV.

No caso do antibiótico norfloxacino, o valor de toxicidade da amostra final foi  $CE_{50}$  (30 min) 7,02 % (Figura 4.24a). Este resultado sugere que os metabólitos gerados, Figura 4.20, durante o processo de degradação do fármaco por UV são mais tóxicos que ele próprio em 273 %. Esse resultado aponta para a necessidade de acompanhamento da toxicidade de efluentes durante processos de tratamento por UV, uma vez que a degradação deste antibiótico não significou a extinção de sua toxicidade e, ao contrário, pode proporcionar um efluente ainda mais tóxico.

**FIGURA 4.24** - Porcentagem de efeito (redução de luminosidade) em função da porcentagem de concentração de efluente em 5, 15, 30 minutos em amostras submetidas a tratamento por radiação UV. (a) Antibiótico norfloxacino e (b) Antibiótico sulfato de gentamicina.



No caso do sulfato de gentamicina, o valor de toxicidade da amostra final é ainda mais elevado que o encontrado para o norfloxacino,  $CE_{50}$  (30 min) 5,4% (Figura 4.24b). É importante ressaltar que o sulfato de gentamicina a 100 mg/L não é tóxico, isso significa que o tratamento com radiação UV, por si só, é capaz de atribuir elevada toxicidade ao efluente ao gerar subprodutos tóxicos de degradação, Figura 4.23.

Os dados provenientes dos testes de toxicidade esclarecem que, embora o tratamento por UV seja eficiente na degradação do sulfato de gentamicina e norfloxacino após longo tempo de reação, não se trata de uma opção de tratamento viável, visto que, os metabólitos gerados durante o processo apresentam toxicidade muito elevada. Resultados similares foram encontrado por BONNEMOY e colaboradores (2004) ao testarem a toxicidade de herbicidas

halogenados da classe fenilureia para *Aliivibrio fischeri*. Os autores esclarecem que, embora esses herbicidas não sejam tóxicos em sua forma original, tornam-se significativamente nocivos após tratamento por UV, devido a formação de produtos de degradação.

### **5.8.2 Análise ecotoxicológica das amostras provenientes do tratamento por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

As análises ecotoxicológicas realizadas com as amostras após término do experimento esclarecem que não há toxicidade remanescente. No caso do norfloxacino a amostra foi considerada não tóxica, apresentando maior inibição de luz observada de 27,82 % no teste em 30 minutos. Já no caso do sulfato de gentamicina, encontrou-se hormesis, portanto o mesmo resultado da amostra bruta a 100 mg/L. Isso significa que o tratamento por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é eficiente na eliminação da toxicidade da amostra, no caso do norfloxacino, e que cumpre o objetivo de não geração de subprodutos tóxicos de degradação, muito comumente descritos na literatura durante processos oxidativos de tratamento (LI *et al.*, 2008). Vale mencionar que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, é tóxico por si só (REICHWALDT *et al.*, 2012), porém, ao reagir com a solução, não só deixa de ser tóxico como é capaz de degradar parte dos fármacos e gerar uma amostra final não tóxica.

A utilização de peróxido de hidrogênio individualmente para degradar fármacos não é muito apresentada na literatura, isso devido à elevada estabilidade destes compostos, o que dificulta sua efetiva remoção. Esse resultado foi comprovado pelas já apresentadas análises de degradação dos fármacos. Apesar disso, conforme demonstrado pelas análises de toxicidade acima descritas, trata-se de tratamento capaz de extinguir a toxicidade ou manter a toxicidade das amostras analisadas.

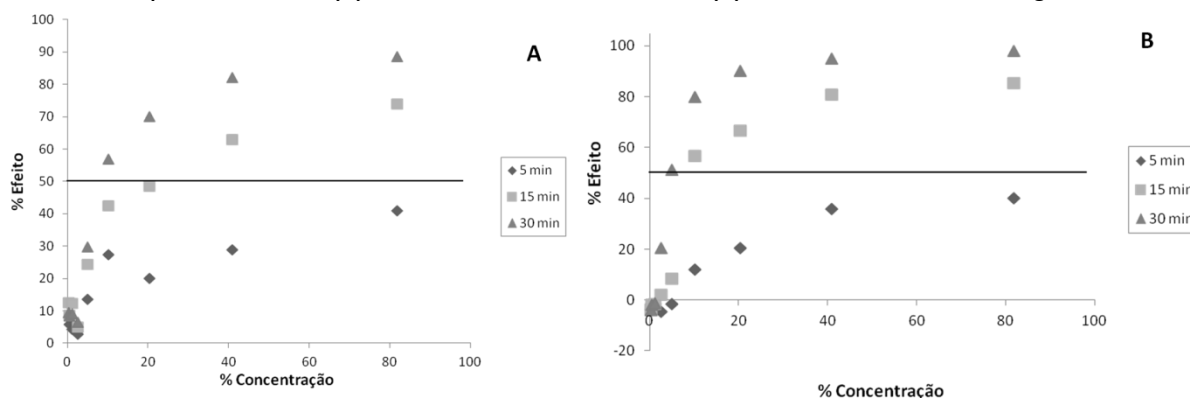
### **5.8.3 Análise ecotoxicológica das amostras provenientes do tratamento por UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Tanto a amostra que continha norfloxacino quanto a que continha sulfato de gentamicina apresentaram-se tóxicas após realização de tratamento por UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizando as condições otimizadas. Estes resultados sugerem que alguns dos produtos de degradação formados e identificados são tóxicos de acordo com as análises com o organismo *Aliivibrio fischeri*.

No caso do antibiótico norfloxacino, o valor de toxicidade da amostra final foi CE<sub>50</sub> (30 min) 9,41% (Figura 4.25a). Isso significa que os produtos de degradação gerados durante o processo de degradação do fármaco são mais tóxicos que ele próprio em 179%. A formação de produtos de degradação ou metabólitos do antibiótico norfloxacino tem sido amplamente

relatada na literatura (PRIETO *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2012; WAMMER *et al.*, 2013). Estes compostos intermediários são formados durante os processos de tratamento devido a característica refratária das fluoroquinolonas.

**FIGURA 4.25** - Porcentagem de efeito (redução de luminosidade) em função da porcentagem de concentração de efluente em 5, 15, 30 minutos em amostras submetidas a tratamento por UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (a) Antibiótico norfloxacino e (b) Antibiótico sulfato de gentamicina.



Já no caso do sulfato de gentamicina, o valor de toxicidade da amostra final é ainda mais elevado que o encontrado para o norfloxacino, CE<sub>50</sub> (30 min) 5,22% (Figura 4.25b). Novamente, chama-se atenção para o fato de que o sulfato de gentamicina a 100 mg/L não é tóxico. Esse resultado, juntamente com os demais, aponta para o elevado potencial dos POAs gerarem metabólitos tóxicos durante o andamento do tratamento.

Os resultados acima discutidos esclarecem que, embora o tratamento por UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seja extremamente eficiente na degradação do sulfato de gentamicina e do norfloxacino, não deve ser considerado uma alternativa viável, uma vez que gera efluentes muito tóxicos. No entanto, esse comportamento não se repete com todos os fármacos, mesmo no caso de outros antibióticos da família das quinolonas. Yuan e colaboradores (2011) testaram a toxicidade de três antibióticos – oxitetraciclina, doxiciclina e ciprofloxacino – após passarem por tratamento com UV e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os autores esclarecem que, embora a toxicidade tenha elevado significativamente no tratamento por UV, o mesmo não ocorreu com o UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nesse caso, a toxicidade das amostras aumentou inicialmente, mas ao final da análise gerou-se uma solução atóxica.

#### 5.8.4 Análise ecotoxicológica das amostras provenientes do tratamento por oxidação de Fenton

Apesar das eficiências de remoção acima descritas, apenas a solução tratada de norfloxacino apresentou-se atóxica. Com relação à toxicidade da solução tratada de sulfato de gentamicina, dentre todos os tratamentos por POAs, esse é o que gera o efluente mais tóxico.

No caso do antibiótico norfloxacino, a amostra final não é tóxica ( $CE_{50} > 81,9\%$ ), embora tenha havido efeito de inibição de luz sob as bactérias. Nesse caso, os resultados são expressos em “maior porcentagem de efeito”. O maior efeito de inibição de luz observado foi 4,97% em 30 minutos. Isto é, embora a porcentagem de mineralização do norfloxacino nos experimentos seja menor que a degradação do fármaco de forma específica, com a formação de produtos intermediários que podem ser comprovados na Figura 4.21, esses produtos de degradação formados não são nocivos à bactéria *Aliivibrio fischeri* no teste em 30 minutos.

Levando-se em consideração a eficiência de remoção de 55 % e 59 % em termos de UV/VIS e COT, respectivamente, além da eficiência na eliminação da toxicidade do norfloxacino, o tratamento por reagente Fenton é uma alternativa viável. É importante, no entanto, destinar e/ou tratar adequadamente o lodo formado durante o processo, uma vez que ele adsorve uma série de contaminantes presentes nos efluentes.

Já no caso do sulfato de gentamicina, o valor de toxicidade da amostra final é elevado,  $CE_{50}$  (30 min) 3,50%. Isso significa que, mesmo com altas taxas de remoção do fármaco por COT – cerca de 60% –, os metabólitos formados durante o processo são tóxicos. É necessário ressaltar, ademais, o fato de que o sulfato de gentamicina a 100 mg/L não é tóxico, ou seja, o tratamento torna a amostra nociva. Uma comparação entre as taxas de degradação do norfloxacino (55%) e do sulfato de gentamicina (60%), em termos de COT, reforça a importância de testes de toxicidade durante os métodos de tratamento dos mais diversos efluentes, bem como a insuficiência dos métodos físico-químicos de análise para a tomada de decisões.

Finalmente, mesmo havendo significativa porcentagem de remoção para o antibiótico avaliado, o fato desse tratamento gerar o efluente mais tóxico, aliado aos problemas relacionados à geração de lama peculiares ao processo, repercutem na inviabilidade do tratamento para a degradação do sulfato de gentamicina.

Os distintos resultados, em termos de toxicidade, para norfloxacino e sulfato de gentamicina esclarecem que cada resíduo precisa ser testado e monitorado especificamente. Um método que se apresente adequado para determinado tipo de contaminante pode se mostrar impróprio para tantos outros. A exemplificar, a eficiência do tratamento por Fenton na remoção da toxicidade de efluente da indústria têxtil (MERIÇ *et al.*, 2005) e a ineficiência desse mesmo processo para lixiviados (GOI *et al.*, 2010; GOTVAJN *et al.*, 2011), em que ocorre aumento na toxicidade das amostras.

#### **5.8.5 Análise ecotoxicológica das amostras provenientes do tratamento por foto-Fenton**

Ambas as amostras apresentam-se tóxicas após realização de tratamento otimizado por foto-Fenton. Ressalta-se que, em todos os processos oxidativos em que participa a radiação UV, os efluentes gerados são tóxicos, tanto para o sulfato de gentamicina quanto para o norfloxacino. Esse fato, aliado a outros apresentados pela literatura e citados nesse trabalho, sugere que a presença da citada radiação favorece a formação de subprodutos de degradação tóxicos.

No caso do antibiótico norfloxacino, o valor de toxicidade da amostra final foi CE<sub>50</sub> (30 min) 17,98% isto é, os metabólitos gerados durante o processo de degradação do fármaco são mais tóxicos que ele próprio em 46%.

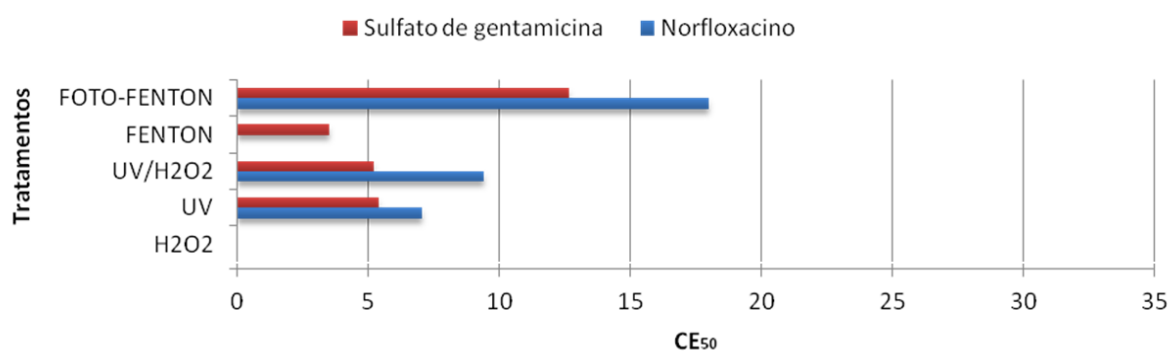
No caso do sulfato de gentamicina, o valor de toxicidade da amostra final é ainda mais elevado que o encontrado para o norfloxacino, CE<sub>50</sub> (30 min) 12,67% (Figura 5.34). Não sendo o sulfato de gentamicina a 100 mg/L tóxico, isto significa que o tratamento por foto-Fenton transforma parte dos antibióticos em metabólitos nocivos. Vale mencionar que em todos os processos oxidativos avançados, com exceção daquele com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a amostra final de sulfato de gentamicina apresenta-se mais tóxica que a de norfloxacino. Sugere-se que a oxidação pelo radical hidroxila (HO<sup>•</sup>) favoreça fortemente a degradação desse aminoglicosídeo em moléculas mais tóxicas.

Importante chamar a atenção para o fato de que embora o processo por foto-Fenton seja mais eficiente que o por Fenton, no caso do norfloxacino, gera-se um efluente mais tóxico. Ressalta-se, portanto, que a amostra contaminada por esse antibiótico deixa de ser tóxica ao ser submetida à oxidação por Fenton e se torna bastante tóxica no tratamento por foto-Fenton. O mesmo não ocorre com o sulfato de gentamicina, em que a amostra final de foto-Fenton é menos tóxica em 262% que a proveniente do tratamento por Fenton. Importante trazer a lume que generalizações não são possíveis nesta seara, uma vez que cada fármaco se comporta de

forma diferente frente a um mesmo tratamento. Sabe-se, por exemplo, que o processo por foto-Fenton reduz a toxicidade do antibiótico sulfametoxazol (GONZÁLEZ *et al.*, 2007), aumenta a toxicidade da sulfametazina (PÉREZ-MOYA *et al.*, 2010) e, no caso da amoxicilina, gera uma amostra tóxica, porém menos nociva que a inicial (TROVÓ *et al.*, 2012).

Na Figura 4.26 são apresentados os dados de  $CE_{50}$  compilados, facilitando a visualização dos efeitos dos tratamentos sob a toxicidade das amostras finais. É importante relembrar que quanto menor o valor de  $CE_{50}$ , mais tóxica é a amostra.

**FIGURA 4.26** – Dados compilados dos ensaios de ecotoxicidade para os tratamentos estudados.



## 6. CONCLUSÕES

A utilização de processos oxidativos avançados na remoção compostos recalcitrantes, como os antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina, demonstrou-se adequada, sobretudo através da utilização sistemas combinados. A otimização da concentração de  $H_2O_2$  e a acidificação do meio para pH entre 2 e 3 aumentaram, de forma expressiva, a eficiência de remoção, alcançando valores de até 100%. No entanto, deve-se atentar para a toxicidade do efluente tratado, pois muitos processos podem levar a formação de subprodutos tóxicos.

A remoção dos antibióticos utilizando radiação UV demonstrou ser uma técnica inviável devido ao elevado tempo de reação necessária e a baixa mineralização verificada. Para o antibiótico norfloxacino verificou-se 85 % de degradação e 2 % de mineralização após 7 horas de reação. Já para o sulfato de gentamicina verificou-se valores de remoção na ordem de 90 % de degradação e 80 % de mineralização 25 minutos de reação. Acrescenta-se que, em função da formação de subprodutos de degradação nocivos, ambas as amostras apresentam-se tóxicas após realização do tratamento, não sendo esse, portanto, um tratamento indicado.

Os experimentos utilizando  $H_2O_2$  apresentaram baixos valores de mineralização, no entanto, as análises ecotoxicológicas esclarecem que não há toxicidade remanescente, embora a eficiência de remoção dos fármacos seja muito reduzida. No caso do norfloxacino, observou-se 2 % de degradação. Para o antibiótico sulfato de gentamicina foi observada degradação de 64 % e 7 % de mineralização.

A utilização do processo combinado UV/ $H_2O_2$  demonstrou-se adequada para remoção dos dois fármacos estudados. Para o antibiótico norfloxacino foi observada degradação de 99% e 32 % de mineralização. Para o antibiótico sulfato de gentamicina verificou-se 98 % de degradação e 90 % de mineralização. Embora este processo tenha sido efetivo na remoção dos dois fármacos a mineralização incompleta leva a formação de subprodutos nocivos, pois, ambas as amostras apresentaram-se tóxicas após realização do tratamento

Embora a utilização de sistema UV/ $H_2O_2$  inclua uma etapa de neutralização para pH 7, não há a formação de lama, como no caso da oxidação por Fenton. Esse fato torna o primeiro processo mais atraente.

Os experimentos envolvendo oxidação de Fenton proporcionaram degradações médias de 88 % e 99 % e mineralizações médias de 55 % e 59 % para os antibióticos norfloxacino e sulfato

de gentamicina, respectivamente. O tratamento foi eficiente na eliminação da toxicidade do norfloxacino, porém gerou um efluente de elevada toxicidade para o antibiótico sulfato de gentamicina. Vale lembrar que a solução inicial para o antibiótico sulfato de gentamicina não apresentou toxicidade.

Para esta técnica, deve-se observar que as fluoroquinolonas possuem elevadas taxas de sorção podendo, portanto, ficar adsorvidas na lama de  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  formada durante a etapa de neutralização. Neste caso, parte do antibiótico é removida e a outra parte fica aderida ao sólido formado, podendo retornar ao meio ambiente se não houver uma disposição adequada deste sólido. A oxidação por Fenton é um processo eficiente de remoção de compostos orgânicos presentes em águas para abastecimento urbano e residuais devido a seu elevado poder oxidante. Contudo, não existe um protocolo a ser seguido havendo a necessidade de estudo caso a caso.

Para os experimentos envolvendo foto-Fenton foram observadas degradações médias de 99 % e 99 % e mineralizações médias de 65 % e 93 % para os antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina, respectivamente. Embora o tratamento otimizado por foto-Fenton seja mais eficiente que o que utiliza oxidação de Fenton, ambas as amostras finais apresentam-se tóxicas após realização dos ensaios, sobretudo a amostra contaminada com sulfato de gentamicina.

De modo geral, verifica-se que cada composto comporta-se de maneira distinta frente a cada processo de tratamento empregado e que a otimização das condições reacionais é, sem dúvida, a etapa mais importante do tratamento. Os resultados dos estudos ecotoxicológicos podem ser empregados como instrumentos de escolha frente às remoções observadas em cada processo.

# Capítulo 5

---

Modelagem biomimética do metabolismo oxidativo dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina.

## 1. INTRODUÇÃO

Os fármacos, após serem absorvidos pelo organismo, passam por uma série de biotransformações que têm como objetivo torná-los solúveis para que possam ser excretados. A maioria das reações de metabolização, envolvendo fármacos, é mediada pelo citocromo P450, cujo sitio ativo é uma metaloporfirina de ferro.

Nos capítulos anteriores foram realizados testes que objetivaram mostrar o comportamento dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina frente a tratamentos biológicos e oxidativos avançados. Muito foi falado sobre a importância da realização de ensaios ecotoxicológicos para definição da melhor técnica de tratamento, visto que, tais processos poderiam levar à formação de metabólitos tóxicos. De fato, os estudos realizados evidenciaram a importância destes ensaios, pois vários testes ecotoxicológicos apresentaram resultados mais tóxicos que os fármacos de partida.

Neste contexto, não se pode negligenciar a formação de compostos tóxicos pelos organismos vivos e sua posterior excreção. Desta forma, o Capítulo 5, buscou mimetizar a ação dos organismos vivos sobre os antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina utilizando porfirinas de segunda e terceira gerações com o intuito de identificar os metabólitos gerados e verificar a toxicidade gerada pelo sinergismo destes compostos. É importante ressaltar que este estudo se limita a tentar identificar os metabólitos formados na etapa de biotransformação que envolve o citocromo P450, por meio de catalisadores biomiméticos desta enzima, não tendo sido realizado estudos sobre metabólitos formados a partir de reações de conjugação posteriores em que estes compostos podem estar envolvidos.

Ao final deste capítulo foi possível observar que tanto o norfloxacino quanto o sulfato de gentamicina geram metabólitos tóxicos. Esses metabólitos podem estar presentes em maior concentração em efluentes hospitalares e podem, portanto, conferir toxicidade, inviabilizando o tratamento biológico. Além disso, podem ser metabólitos bioativos, não biodegradáveis, sendo, portanto, uma fonte de contaminação ambiental.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 *Objetivo geral***

Avaliar a degradação dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina por meio de modelos biomiméticos do citocromo P450 empregando porfirinas sintéticas como catalisadores.

### **2.2 *Objetivos específicos***

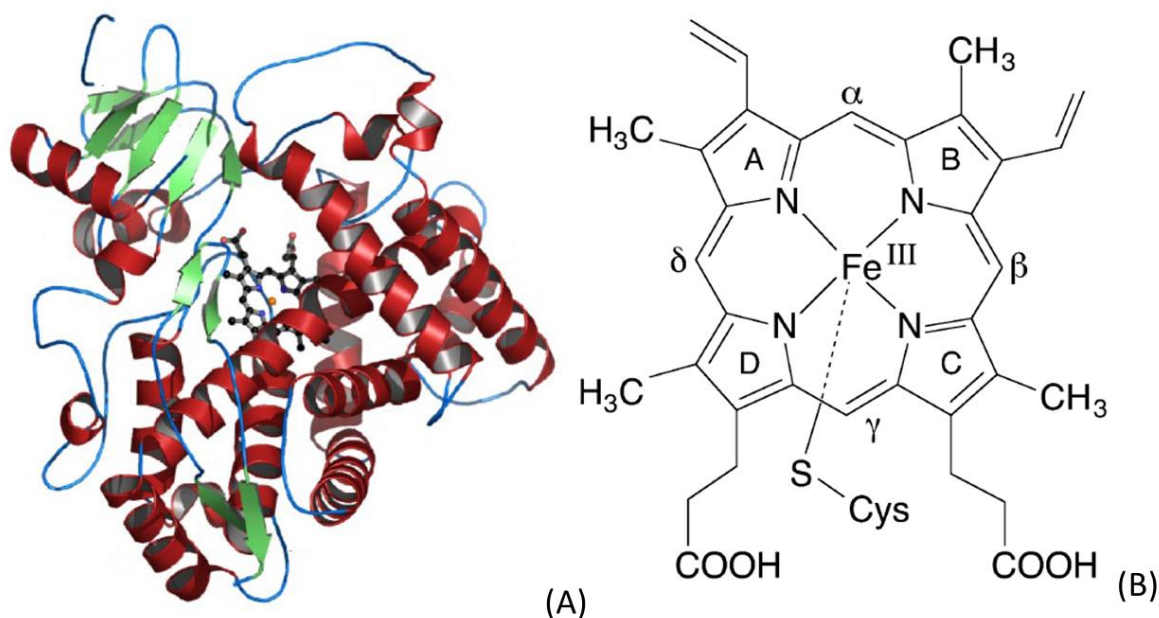
- ✓ Avaliar a eficiência de degradação dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina por meio da utilização de diferentes oxidantes e catalisadores;
- ✓ Identificar os produtos de degradação obtidos pela oxidação biomimética dos antibióticos supracitados, utilizando metaloporfirinas de segunda e terceira gerações;
- ✓ Avaliar a toxicidade das soluções obtidas, por meio das degradações mediadas pelas metaloporfirinas utilizando o organismo *Allivibrio fischeri*.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 O citocromo P450

O metabolismo humano é passível de sofrer interferências direta ou indireta pela administração passiva ou ativa de compostos químicos capazes de causar alterações fisiológicas benéficas ou maléficas ao organismo (efeito farmacológico). Neste grupo de compostos químicos estão incluídas substâncias das mais variadas naturezas, como agentes terapêuticos, produtos químicos utilizados no trabalho, aditivos alimentares ou subprodutos industriais que podem ser ingeridos, inalados ou absorvidos pela pele (THOMAS 2000, DEVLIN 2002, LENINGER *et al.*, 2002). Como a maioria desses compostos são insolúveis em água, tem-se a necessidade de convertê-los em espécies químicas hidrossolúveis para que, assim, possam ser excretados por meio das fezes, urina e suor. Esta conversão de solubilidade, em geral, é mediada por uma ampla família de proteínas chamadas Citocromos P450, Figura 5.1A, que recebem este nome pela absorção de luz, por seu sítio ativo, na região próxima a 450 nm.

**FIGURA 5.1** – (a) Estrutura do citocromo P450 e (b) Sítio ativo da proteína ou grupo Heme B (protoporfirina IX).



Fonte: (Rowland *et al.*, (2006) e Meunier *et al.*, (2004)).

Os citocromos P450 constituem uma grande família de enzimas e estão presentes em todas as formas de vida (plantas, bactérias e mamíferos) desempenhando um importante papel na

transformação oxidativa endógena e exógena de moléculas orgânicas (MEUNIER *et al.*, 2004) atuando na oxidação de cerca de 75% de produtos farmacêuticos até então conhecidos (RITTLE & GREEN, 2010). Essas enzimas são formadas por uma parte proteica ligada a uma metaloporfirina de ferro que constitui seu sítio ativo, Figura 5.1B.

Os estudos acerca do papel desenvolvido pelos citocromos P450 foram iniciados por volta de 1960 por bioquímicos e farmacologistas que necessitavam entender o metabolismo oxidativo dos fármacos (MEUNIER *et al.*, 2004).

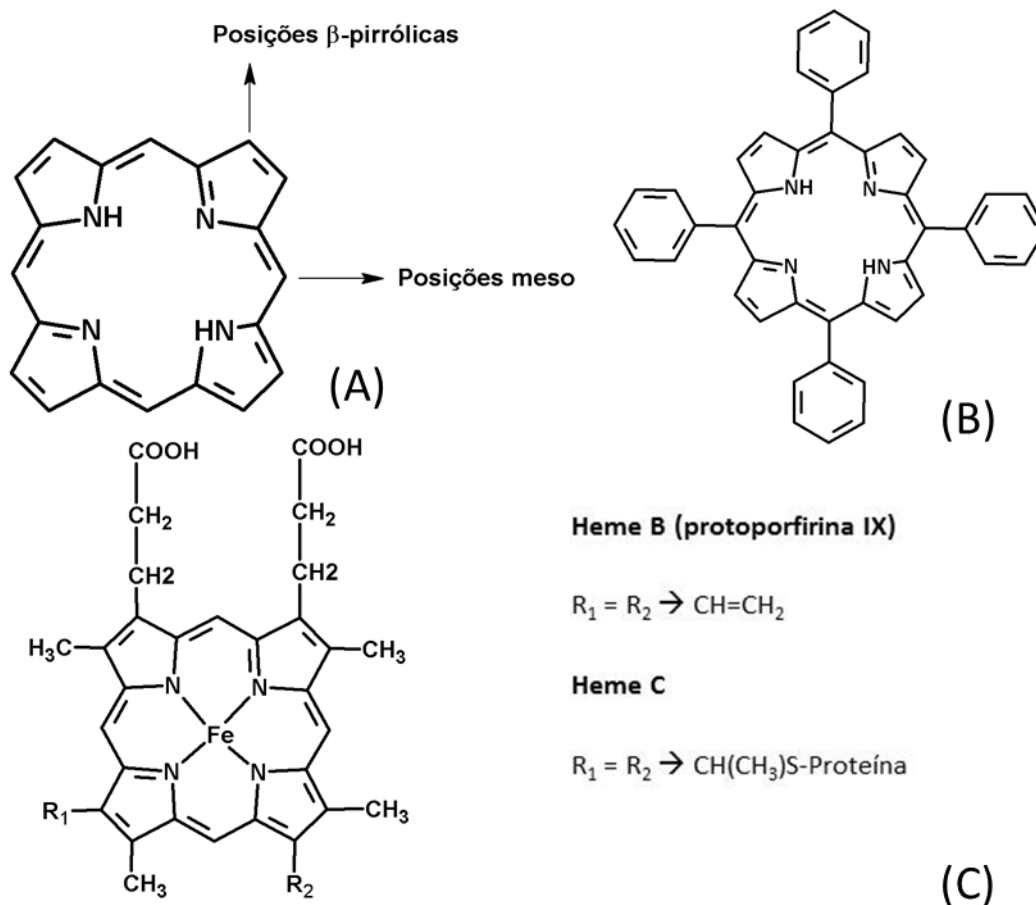
A partir do entendimento de que a oxidação catalítica era de responsabilidade do grupo prostético dos citocromos P450, vários estudos desenvolveram-se no intuito de sintetizar porfirinas capazes de mimetizar as reações que acontecem nos organismos vivos.

### **3.2 Porfirinas e suas gerações**

Porfirinas são moléculas orgânicas constituídas por quatro unidades do tipo pirrol ligadas por quatro pontes metilidências (carbonos  $sp^2$ ), Figura 5.2. São compostos abundantes na natureza que desempenham importantes funções em diversos processos biológicos e catalíticos. A maioria das porfirinas naturais existe sob a forma de grupos heme, presentes em moléculas como a hemoglobina, a mioglobina e os citocromos.

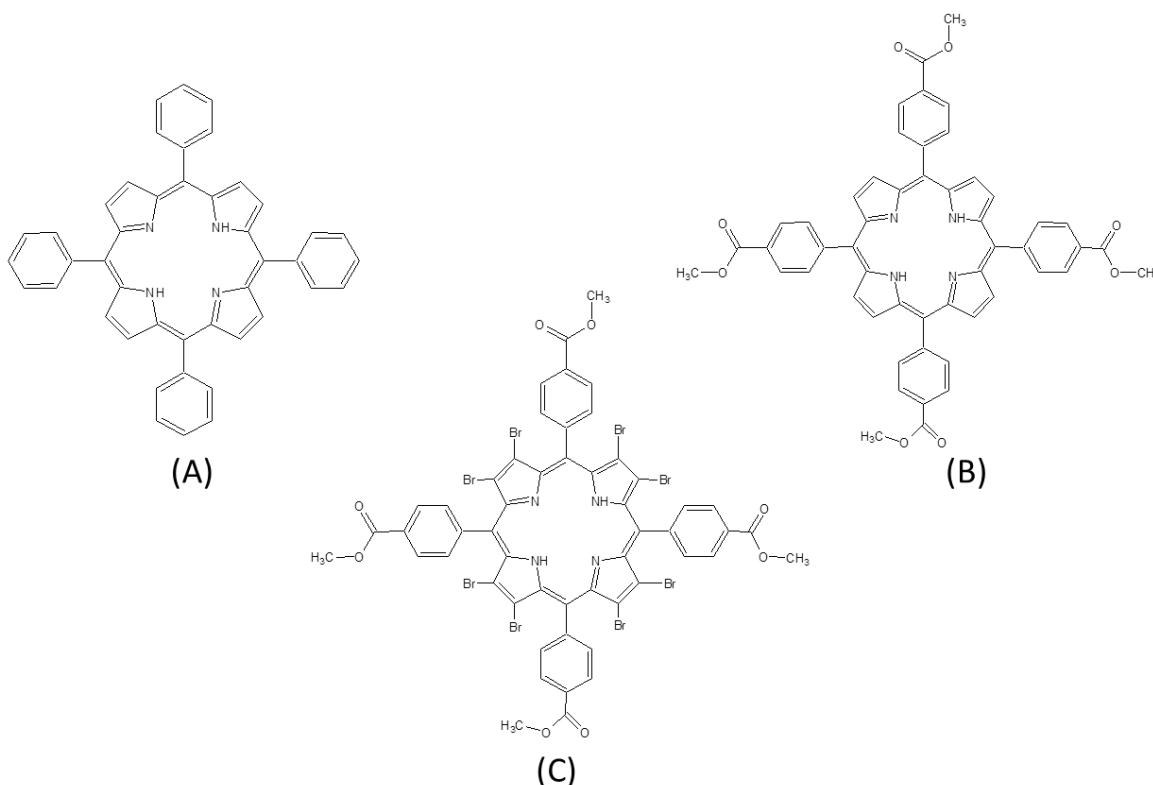
As porfirinas são compostos que possuem um espaço apropriado para acomodar um íon metálico que se liga aos quatro átomos de nitrogênio presentes no seu centro, passando a ser designada como metaloporfirina (CASTRO, 2009). Esses compostos têm sido muito estudados, pois constituem o sítio ativo dos citocromos P450 e, por isso, podem ser utilizados para mimetizar as reações enzimáticas que acontecem nos seres humanos. Buscando o entendimento destas reações vários modelos sintéticos têm sido desenvolvidos e aprimorados desde o final da década de 1960 (LOHMANN *et al.*, 2008; MANSUY, 2008; MEUNIER, 2002).

**FIGURA 5.2** - Exemplos de porfirinas. (a) Denominação das posições do macrociclo porfirínico, (b) Estrutura molecular da porfirina 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (H<sub>2</sub>TPP) e (c) Grupo heme: tipo B, heme da hemoglobina, mioglobina Grupo heme: tipo B, heme da hemoglobina, mioglobina, peroxidase, citocromo P450 e citocromo b; e tipo C, heme do citocromo c.



Devido à grande possibilidade de alterações estruturais no macrociclo, as porfirinas podem ser classificadas em primeira, segunda, terceira ou quarta geração de acordo com o grupo substituinte, Figura 5.3. Os derivados metálicos da 5,10,15,20-tetrafenilporfirina, H<sub>2</sub>TPP, Figura 5.3a, constituem o grupo de catalisadores de primeira geração e reproduzem muitas das reações do citocromo P450. Contudo, a sua atividade decresce rapidamente devido à destruição da metaloporfirina (DOLPHIN, 1997). Os catalisadores de segunda geração são representados pelos compostos que contenham substituintes como grupos alquila ou halogênios nas posições *orto*, *meta* e *para* dos grupos meso-arila (TRAYLOR *et al.*, 1984). A terceira geração é constituída por uma extensão das anteriores por meio da introdução de átomos volumosos e/ou eletronegativos nas posições  $\beta$ -pirrólicas dos macrociclos, como átomos de halogênios ou grupo nitro (MEUNIER, 1992). As porfirinas de quarta geração são compostos altamente ramificados, com estruturas dendrimétricas, não tendo sido relatado até o momento qualquer estudo catalítico envolvendo tais compostos.

**FIGURA 5.3** - Exemplos de porfirinas. (a) Primeira geração, (b) segunda geração e (c) terceira geração.



O uso de metaloporfirinas como catalisadores em modelos biomiméticos do citocromo P450 para oxidação de fármacos e pró-fármacos tem permitido a síntese e determinação estrutural de possíveis metabólitos de interesse para desvendar a natureza destes produtos, seu envolvimento no mecanismo de ação, suas propriedades toxicológicas e farmacológicas (SILVA *et al*, 2011).

### **3.3 Utilização de porfirinas como catalisadores da oxidação de fármacos**

A via fundamental para a eliminação de compostos estranhos ao nosso organismo é uma biotransformação enzimática que, em muitos casos, é iniciada por meio de reações de oxidação catalisadas por enzimas do citocromo P450 (RITTLE & GREEN, 2010). Desta forma, vários estudos têm utilizado sistemas químicos que envolvem metaloporfirinas sintéticas (como miméticos dos citocromos P450) para degradar substratos orgânicos, sobretudo, fármacos.

Os primeiros trabalhos empregando metaloporfirinas como catalisadores para a oxidação de fármacos data do final dos anos de 1980, com a transformação sofridas pelo anti-histamínico fenbenzamina (PAUTET *et al.*, 1998), pelo anestésico fenilciclidina (MASUMOTO *et al.*, 1989), pelo diurético ácido tienílico (MANSUY *et al.*, 1989) e pelo anti-inflamatório suprofen (MANSUY *et al.*, 1989). Estes estudos possuem grande relevância acadêmica, visto que, ao serem realizados em escala laboratorial não exigem o sacrifício animal para isolamento dos compostos alvos, as preparações de enzimas extraídas de fígados (microsossomos, hepatócitos cultivados) nem sempre terão as mesmas composições, o isolamento de intermediários reativos pode ser difícil devido à possibilidade de ligação dos mesmos a polímeros biológicos e devido às suas hidrofílicidades (SILVA, 2012) além de que a realização em escala laboratorial permite chegar em amostras menos complexas sendo a identificação dos metabólitos facilitada.

SILVA *et al.*, (2011) avaliaram a oxidação do fármaco carbamazepina utilizando metaloporfirina de manganês. Sabe-se que a carbamazepina (CBZ) é um dos fármacos antiepilépticos mais comumente prescrito e utilizado no tratamento da neuralgia trigeminal e distúrbios psiquiátricos sendo metabolizado principalmente pelos citocromos P450. Os estudos realizados demonstraram que houve uma elevada seletividade na formação do principal metabólito da carbamazepina já identificado *in vivo*, confirmando a ação biomimética das metaloporfirinas para a oxidação deste fármaco.

Neves *et al.*, (2012) avaliaram a oxidação do anti-inflamatório diclofenaco de potássio através da utilização de metaloporfirinas de manganês, ou seja [Mn (TDCPP) Cl] e [Mn (TPFPP) Cl], a temperatura ambiente e utilizando peróxido de hidrogênio como oxidante. Os estudos revelaram a formação de vários metabólitos do diclofenaco de potássio que já haviam sido identificados *in vivo*.

### **3.4 Ecotoxicidade dos derivados de degradação de fármacos mediados por porfirinas.**

Sabe-se que as biotransformações mediadas pelos Citocromos P450 podem interferir diretamente sobre o efeito farmacológico, bem como levar à formação de metabólitos potencialmente tóxicos (SISAMÓN, 2003). Esses metabólitos, após serem gerados, são excretados e passam a fazer parte do esgoto doméstico.

Vários estudos tem relado a formação de metabólitos tóxicos que, comprovadamente, geram efeitos colaterais em humanos. A geração desses metabólitos pode ser potencializada, por exemplo, por meio do consumo de álcool concomitantemente ao uso de algum fármaco. DEVLIN (2002) relatou a indução em maior quantidade do CYP 2E1 (citocromo da família do P450) após a ingestão de álcool. Este excesso de atividade acelerou a metabolização do paracetamol aumentando, também, a formação do metabólito N-acetil-p-benzoquinoneimina (NAPQ1), composto extremamente reativo que pode se conjugar com estruturas proteicas causando estresse oxidativo e toxicidade.

Além disso, embora o processo de biotransformação tenha por função facilitar a excreção de compostos lipofílicos, muitas vezes esse processamento modificada a estrutura química do composto levando à formação de um metabólito tóxico. (DEVLIN, 2002; GALLI & FEIJOO, 2002). DEVLIN (2002) estudou a biotransformação do fármaco terfenadina que somente torna-se farmacologicamente ativo após a hidroxilação sequencial por CYP 3A4 e observou a formação de metabólitos tóxicos e reativos.

Neste contexto verifica-se a importância da identificação dos metabólitos formados após a ingestão de fármacos, bem como, o estudo de sua ecotoxicidade. A utilização de porfirinas como modelos biomiméticos da ação dos citocromos P450 é de fundamental importância, pois permite chegar aos metabólitos gerados durante a ingestão de fármacos sem a necessidade da utilização de amostras complexas, como as excretadas pelo corpo humano. Outra vantagem é permitir a geração de metabólitos em quantidades suficiente para que seja realizado o processo de purificação, caracterização farmacológica, elucidação estrutural e possíveis ensaios ecotoxicológicos (SILVA *et al.*, 2011).

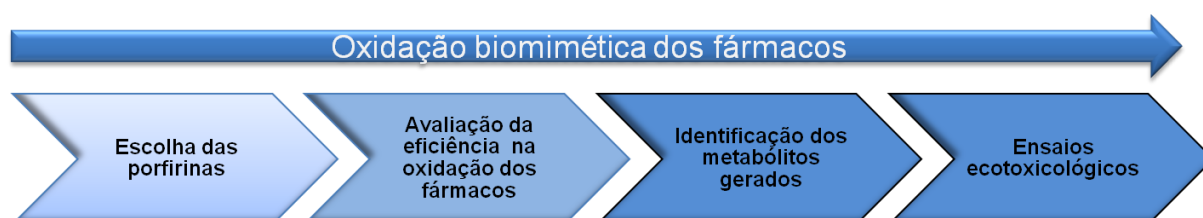
## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Etapas do desenvolvimento metodológico

Nesta etapa foram utilizados os antibióticos sulfato de gentamicina e norfloxacino e as porfirinas de manganês  $\text{Mn(III)(Br}_8\text{TCMPP)Cl}$ ,  $\text{Mn(III)(Br}_8\text{TCPP)Cl}$ ,  $\text{Mn(III)(TCMPP)Cl}$  e  $\text{Mn(III)(TCPP)Cl}$  preparadas pelo grupo de porfirinas do Departamento de Química da UFMG. Os antibióticos foram utilizados como substratos e as porfirinas como catalisadores oxidativos biomiméticos dos citocromos P450.

Na Figura 5.4 é apresentado o fluxograma das etapas do desenvolvimento metodológico.

**FIGURA 5.4** - Fluxograma demonstrando as etapas do desenvolvimento metodológico



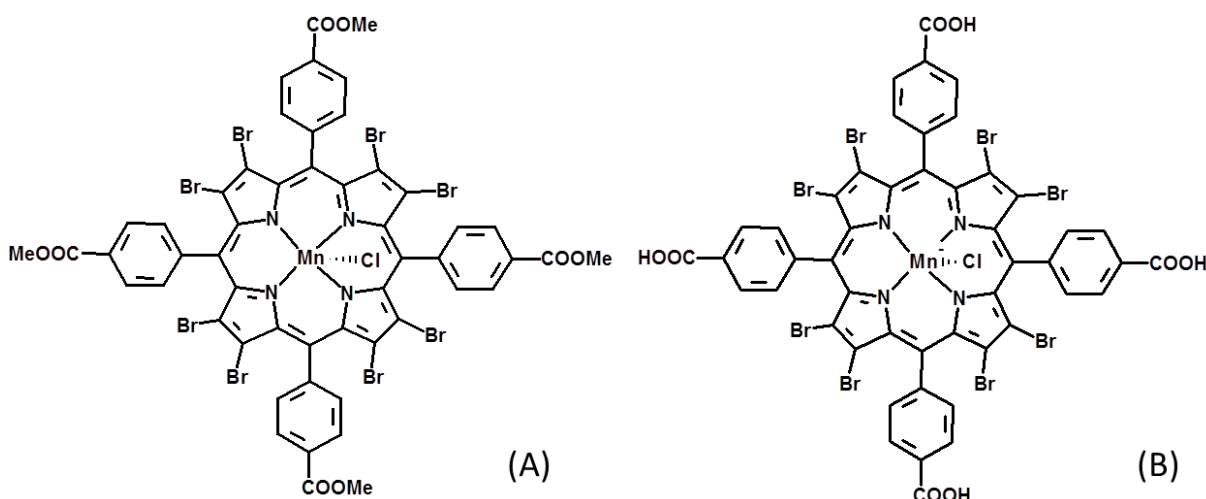
### 4.2 Elaboração da curva de calibração para quantificação dos fármacos.

Nesta etapa uma nova curva de calibração foi elaborada para os dois fármacos, visto que a identificação dos metabólitos foi realizada no laboratório de Espectrometria de Massas do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental utilizando o equipamento MicroTOF II da Bruker. Para esta etapa utilizou-se padrões analíticos com grau de pureza superior a 99% da Sigma-Aldrich. Todos os solventes utilizados possuíam grau de pureza HPLC/MS.

### 4.3 Escolha das porfirinas a serem estudadas

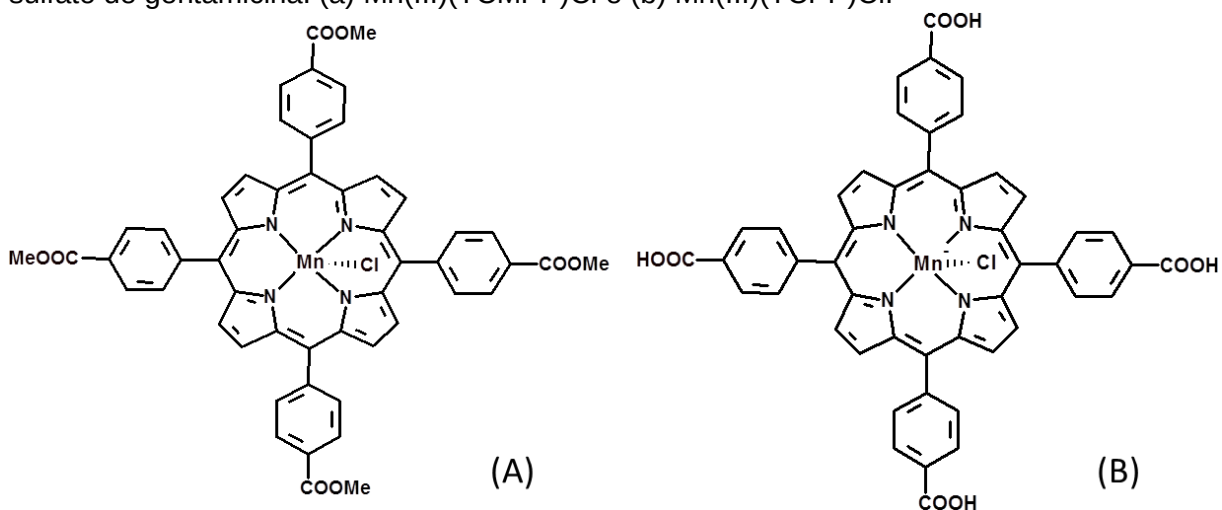
Para oxidação dos fármacos foram utilizadas quatro porfirinas sintetizadas pelo grupo de pesquisa em Porphirinas do Departamento de Química da UFMG. A escolha foi realizada de acordo com a disponibilidade das porfirinas e rendimento analítico durante a etapa de síntese. As porfirinas utilizadas são apresentadas na Figura 5.5 e 5.6.

**FIGURA 5.5** - Porfirinas utilizadas para catalisar a oxidação dos antibióticos norfloxacin e sulfato de gentamicina. (a)  $\text{Mn(III)(Br}_8\text{TCMPP)Cl}$  e (b)  $\text{Mn(III)(Br}_8\text{TCPP)Cl}$ .



As obtenções das porfirinas de manganês  $\text{Mn(III)(Br}_8\text{TCMPP)Cl}$  (cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(4-carbometoxifenil)- $\beta$ -octabromoporfirinamanganês(III)) e  $\text{Mn(III)(Br}_8\text{TCPP)Cl}$  (cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(4-carboxifenil)- $\beta$ -octabromoporfirinatomanganês(III)) foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos por NASCIMENTO *et al.*, (2005) e REBOUÇAS *et al.*, (2008), respectivamente. Trata-se de porfirinas de 3ª geração sendo a primeira hidrofóbica e a segunda hidrofílica.

**FIGURA 5.6** - Porfirinas utilizadas para catalisar a oxidação dos antibióticos norfloxacin e sulfato de gentamicina. (a)  $\text{Mn(III)(TCMPP)Cl}$  e (b)  $\text{Mn(III)(TCPP)Cl}$ .

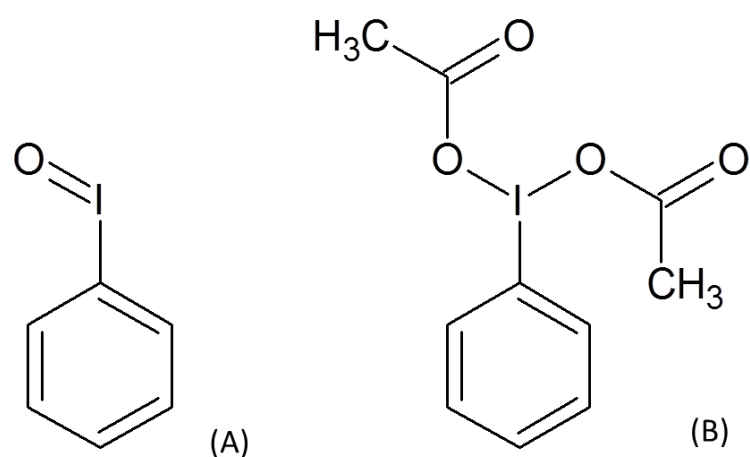


As porfirinas de manganês  $\text{Mn(III)(TCMPP)Cl}$  (cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(4-carbometoxifenil)porfirinamanganês(III)) e  $\text{Mn(III)(TCPP)Cl}$  (cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(4-carboxifenil)porfirinatomanganês(III)) foram sintetizadas de acordo com os

procedimentos descritos por NASCIMENTO *et al.*, (2005) e REBOUÇAS *et al.*, (2008), respectivamente. Trata-se de porfirinas de 2ª geração sendo a primeira hidrofóbica e a segunda hidrofílica. Todas as porfirinas utilizadas foram sintetizadas e caracterizadas no Laboratório de Porphirinas do DQ da UFMG, de acordo com a literatura indicada e, cedidas para o uso neste trabalho.

A ação catalítica das porfirinas foi avaliada utilizando os oxidantes iodossilbenzeno (PhIO) e iodobenzeno diacetato (PhI(OAc)<sub>2</sub>), Figura 5.7.

**FIGURA 5.7** - Estrutura molecular dos oxidantes utilizados nas reações de oxidação dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina catalisadas pelas diferentes porfirinas. (a) iodossilbenzeno (PhIO) e (b) iodobenzeno diacetato PhI(OAc)<sub>2</sub>.



Para realização dos ensaios fez-se a medida das massas das porfirinas e oxidantes de acordo com as Tabelas 5.1 e 5.2. Após a medida das massas cada frasco, Figura 5.8, recebia 20 mL de solução de 10 mg/L de norfloxacino ou 10 mL de solução 50 mg/L de sulfato de gentamicina. A relação molar utilizada para o antibiótico norfloxacino foi de [MnP]:[NOR]:[OX]=[1]:[6]:[9] enquanto que para o sulfato de gentamicina foi de [MnP]:[GEN]:[OX]=[1]:[10]:[9].

**Tabela 5.1** - Relação das massas utilizadas para oxidação catalítica do antibiótico norfloxacino.

| Amostras             | PhIO<br>(mg) | PhI(OAc) <sub>2</sub><br>(mg) | Norfloxacino<br>10 mg/L | Mn(III)(Br <sub>8</sub> TCMPP)Cl<br>(mg) | Mn(III)(Br <sub>8</sub> TCPP)Cl<br>(mg) | Mn(III)(TCPP)Cl<br>(mg) | Mn(III)(TCMPP)Cl<br>(mg) |
|----------------------|--------------|-------------------------------|-------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Norfloxacino inicial |              |                               | 20                      |                                          |                                         |                         |                          |
| 1A                   | 0.20         |                               | 20                      |                                          |                                         |                         |                          |
| 1B                   | 0.19         |                               | 20                      |                                          |                                         |                         |                          |
| 1C                   | 0.19         |                               | 20                      |                                          |                                         |                         |                          |
| 2A                   |              | 0.32                          | 20                      |                                          |                                         |                         |                          |
| 2B                   |              | 0.31                          | 20                      |                                          |                                         |                         |                          |
| 2C                   |              | 0.32                          | 20                      |                                          |                                         |                         |                          |
| 3A                   | 0.19         |                               | 20                      | 0.15                                     |                                         |                         |                          |
| 3B                   | 0.18         |                               | 20                      | 0.15                                     |                                         |                         |                          |
| 3C                   | 0.17         |                               | 20                      | 0.18                                     |                                         |                         |                          |
| 4A                   |              | 0.29                          | 20                      | 0.16                                     |                                         |                         |                          |
| 4B                   |              | 0.28                          | 20                      | 0.16                                     |                                         |                         |                          |
| 4C                   |              | 0.28                          | 20                      | 0.14                                     |                                         |                         |                          |
| 5A                   | 0.21         |                               | 20                      |                                          | 0.13                                    |                         |                          |
| 5B                   | 0.22         |                               | 20                      |                                          | 0.13                                    |                         |                          |
| 5C                   | 0.22         |                               | 20                      |                                          | 0.13                                    |                         |                          |
| 6A                   |              | 0.34                          | 20                      |                                          | 0.17                                    |                         |                          |
| 6B                   |              | 0.35                          | 20                      |                                          | 0.14                                    |                         |                          |
| 6C                   |              | 0.35                          | 20                      |                                          | 0.16                                    |                         |                          |
| 7A                   | 0.21         |                               | 20                      |                                          |                                         | 0.10                    |                          |
| 7B                   | 0.20         |                               | 20                      |                                          |                                         | 0.10                    |                          |
| 7C                   | 0.21         |                               | 20                      |                                          |                                         | 0.10                    |                          |
| 8A                   |              | 0.33                          | 20                      |                                          |                                         | 0.11                    |                          |
| 8B                   |              | 0.34                          | 20                      |                                          |                                         | 0.12                    |                          |
| 8C                   |              | 0.32                          | 20                      |                                          |                                         | 0.11                    |                          |
| 9A                   | 0.19         |                               | 20                      |                                          |                                         |                         | 0.10                     |
| 9B                   | 0.17         |                               | 20                      |                                          |                                         |                         | 0.11                     |
| 9C                   | 0.19         |                               | 20                      |                                          |                                         |                         | 0.12                     |
| 10A                  |              | 0.30                          | 20                      |                                          |                                         |                         | 0.12                     |
| 10B                  |              | 0.28                          | 20                      |                                          |                                         |                         | 0.10                     |
| 10C                  |              | 0.27                          | 20                      |                                          |                                         |                         | 0.11                     |

Os ensaios foram realizados em triplicata, na ausência de luz, sob agitação magnética e por 24 horas. Após este tempo as soluções foram filtradas utilizando membrana de 0,45 µm em PVDF hidrofílico e analisadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa. Para determinação da conversão do fármaco e identificação dos metabólitos foi utilizado o equipamento HPLC Shimadzu LC 20A acoplado ao espectrômetro de massa Bruker MicroTOF QII com ionização por Eletrospray (ESI-MS) a uma resolução de 12000. Os metabólitos foram identificados utilizando os softwares do equipamento.

**FIGURA 5.8** - Frascos utilizados para as reações de oxidação dos fármacos utilizando as metaloporfirinas de manganês.



Para o antibiótico norfloxacino utilizou-se coluna C18 Shim-pack XR-ODS dimensões 2.0x 50 mm e para o sulfato de gentamicina foi utilizada a coluna Kinetex 2,6  $\mu$ m Hilic 100A dimensões 2.1x100 mm.

**Tabela 5.2** - Relação das massas utilizadas para oxidação catalítica do antibiótico sulfato de gentamicina.

| Amostras            | PhIO<br>(mg) | PhI(OAc) <sub>2</sub><br>(mg) | Gentamicina<br>50 mg/L | Mn(III)(Br <sub>8</sub> TCMPP)Cl<br>(mg) | Mn(III)(Br <sub>8</sub> TCPP)Cl<br>(mg) | Mn(III)(TCPP)Cl<br>(mg) | Mn(III)(TCMPP)Cl<br>(mg) |
|---------------------|--------------|-------------------------------|------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Gentamicina inicial |              |                               | 10                     |                                          |                                         |                         |                          |
| 1A                  | 0.19         |                               | 10                     |                                          |                                         |                         |                          |
| 1B                  | 0.20         |                               | 10                     |                                          |                                         |                         |                          |
| 1C                  | 0.21         |                               | 10                     |                                          |                                         |                         |                          |
| 2A                  |              | 0.33                          | 10                     |                                          |                                         |                         |                          |
| 2B                  |              | 0.33                          | 10                     |                                          |                                         |                         |                          |
| 2C                  |              | 0.33                          | 10                     |                                          |                                         |                         |                          |
| 3A                  | 0.17         |                               | 10                     | 0.16                                     |                                         |                         |                          |
| 3B                  | 0.17         |                               | 10                     | 0.16                                     |                                         |                         |                          |
| 3C                  | 0.19         |                               | 10                     | 0.15                                     |                                         |                         |                          |
| 4A                  |              | 0.30                          | 10                     | 0.17                                     |                                         |                         |                          |
| 4B                  |              | 0.30                          | 10                     | 0.17                                     |                                         |                         |                          |
| 4C                  |              | 0.30                          | 10                     | 0.17                                     |                                         |                         |                          |
| 5A                  | 0.21         |                               | 10                     |                                          | 0.17                                    |                         |                          |
| 5B                  | 0.20         |                               | 10                     |                                          | 0.15                                    |                         |                          |
| 5C                  | 0.22         |                               | 10                     |                                          | 0.16                                    |                         |                          |
| 6A                  |              | 0.35                          | 10                     |                                          | 0.17                                    |                         |                          |
| 6B                  |              | 0.31                          | 10                     |                                          | 0.18                                    |                         |                          |
| 6C                  |              | 0.34                          | 10                     |                                          | 0.17                                    |                         |                          |
| 7A                  | 0.20         |                               | 10                     |                                          |                                         |                         | 0.08                     |
| 7B                  | 0.22         |                               | 10                     |                                          |                                         |                         | 0.11                     |
| 7C                  | 0.20         |                               | 10                     |                                          |                                         |                         | 0.10                     |
| 8A                  |              | 0.32                          | 10                     |                                          |                                         |                         | 0.09                     |
| 8B                  |              | 0.30                          | 10                     |                                          |                                         |                         | 0.09                     |
| 8C                  |              | 0.34                          | 10                     |                                          |                                         |                         | 0.11                     |
| 9A                  | 0.20         |                               | 10                     |                                          |                                         | 0.12                    |                          |
| 9B                  | 0.21         |                               | 10                     |                                          |                                         | 0.11                    |                          |
| 9C                  | 0.23         |                               | 10                     |                                          |                                         | 0.10                    |                          |
| 10A                 |              | 0.31                          | 10                     |                                          |                                         | 0.11                    |                          |
| 10B                 |              | 0.35                          | 10                     |                                          |                                         | 0.12                    |                          |
| 10C                 |              | 0.35                          | 10                     |                                          |                                         | 0.12                    |                          |

Os parâmetros metodológicos utilizados durante as injeções realizadas no HPLC/MS encontram-se descrito na Tabela 5.3.

**Tabela 5.3** - Parâmetros utilizados durante as corridas cromatográficas dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina.

|                      | Norfloxacino                     |        |           | Sulfato de gentamicina           |        |           |
|----------------------|----------------------------------|--------|-----------|----------------------------------|--------|-----------|
| Modo de ionização    | Positivo                         |        |           | Positivo                         |        |           |
| Solventes utilizados | [Água]:[Metanol 0.1% Ac Fórmico] |        |           | [Água]:[Metanol 0.1% Ac Fórmico] |        |           |
| Programação da bomba | Tempo min                        | Água % | Metanol % | Tempo min                        | Água % | Metanol % |
|                      | 6                                | 95     | 5         | 3                                | 90     | 10        |
|                      | 7.5                              | 5      | 95        | 6                                | 30     | 70        |
|                      | 9                                | 5      | 95        | 7                                | 5      | 95        |
|                      | 15                               | 95     | 5         | 10                               | 5      | 95        |
|                      |                                  |        |           | 14                               | 90     | 10        |

#### 4.4 Avaliação da ecotoxicidade dos sistemas avaliados por meio da utilização de *Allivibrio fischeri*.

As amostras resultantes dos processos oxidativos envolvendo porfirinas tiveram sua ecotoxicidade determinada por meio da realização de ensaios ecotoxicológicos com a bactéria marinha luminescente *Allivibrio fischeri*, utilizando o equipamento MICROTOX® Model 500 Analyzer (SDI).

Os testes foram realizados de acordo com as determinações da norma ABNT NBR 15411-3 (setembro, 2009) e seguindo o protocolo estabelecido pelo software (MICROTOX® Omni Software, versão 4.1 do próprio equipamento MICROTOX® Model 500 Analyzer).

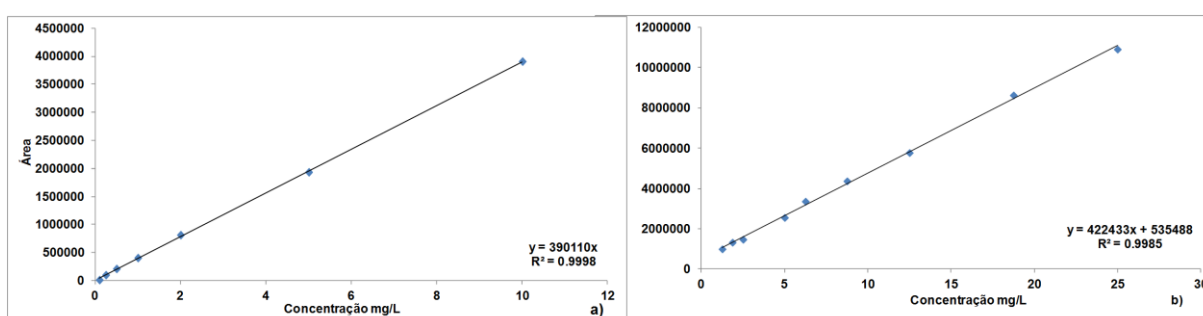
As bactérias liofilizadas utilizadas foram obtidas da SDI, e foram armazenadas à temperatura de – 20°C. A toxicidade aguda (CE<sub>50</sub>) foi determinada a partir de medições da luminescência da bactéria nos tempos 5, 15 e 30 minutos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da eficiência de oxidação dos antibióticos

Para avaliação da eficiência de oxidação dos fármacos, catalisadas pelas porfirinas, foi necessária a elaboração de novas curvas de calibração, visto que, utilizou-se equipamento para identificação dos metabólitos e quantificação dos fármacos diferente daquele utilizado nos demais ensaios. Na Figura 5.9 são apresentadas as curvas de calibração obtidas para cada fármaco.

**FIGURA 5.9** - Curvas de calibração utilizadas para análise das reações de oxidação dos fármacos catalisadas pelas metaloporfirinas. (a) norfloxacino e (b) sulfato de gentamicina.



Para o antibiótico norfloxacino a curva foi baseada no cromatograma de íon extraído e para o sulfato de gentamicina utilizou-se o cromatograma total, visto que, a gentamicina apresenta-se na forma de uma mistura contendo três compostos diferentes. Para elaboração da curva utilizou-se metanol e água na relação 1:1 e de ácido fórmico 1%.

Nas Tabelas 5.4 e 5.5 são apresentadas as médias dos resultados das reações de oxidação de cada sistema estudado. As amostras 1 e 2 das duas tabelas apresentam as porcentagens de oxidação dos fármacos sem a utilização de catalisadores, apenas na presença dos oxidantes.

**Tabela 5.4** – Resultados das reações de oxidação do antibiótico norfloxacino catalisadas por porfirinas de segunda e terceira gerações.

| Amostras             | PhIO<br>(mg) | PhI(Oac) <sub>2</sub><br>(mg) | Norfloxacino<br>10 mg/L | Mn(III)(Br <sub>8</sub> TCMPP)Cl<br>(mg) | Mn(III)(Br <sub>8</sub> TCPP)Cl<br>(mg) | Mn(III)(TCPP)Cl<br>(mg) | Mn(III)(TCMPP)Cl<br>(mg) | % de<br>Oxidação |
|----------------------|--------------|-------------------------------|-------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------|
| Norfloxacino inicial |              |                               | 20                      |                                          |                                         |                         |                          |                  |
| 1                    | 0.19         |                               | 20                      |                                          |                                         |                         |                          | 7                |
| 2                    |              | 0.32                          | 20                      |                                          |                                         |                         |                          | 15               |
| 3                    | 0.18         |                               | 20                      | 0.16                                     |                                         |                         |                          | 83               |
| 4                    |              | 0.28                          | 20                      | 0.15                                     |                                         |                         |                          | 87               |
| 5                    | 0.22         |                               | 20                      |                                          | 0.13                                    |                         |                          | 95               |
| 6                    |              | 0.35                          | 20                      |                                          | 0.16                                    |                         |                          | 88               |
| 7                    | 0.21         |                               | 20                      |                                          |                                         | 0.10                    |                          | 77               |
| 8                    |              | 0.33                          | 20                      |                                          |                                         | 0.11                    |                          | 50               |
| 9                    | 0.18         |                               | 20                      |                                          |                                         |                         | 0.11                     | 95               |
| 10                   |              | 0.28                          | 20                      |                                          |                                         |                         | 0.11                     | 82               |

Para o antibiótico norfloxacinol observa-se uma taxa de oxidação de 7,0 % ao se utilizar o oxidante PhIO e 15% ao se utilizar o oxidante PhI(OAc)<sub>2</sub>. Estes baixos valores obtidos, em relação àqueles obtidos nos demais sistemas, demonstram a importância da presença do catalisador no meio reacional. Para todos os sistemas avaliados, em presença de catalisadores, obtiveram-se taxas de oxidação superiores a 70%.

**Tabela 5.5** – Resultados das reações de oxidação do antibiótico sulfato de gentamicina catalisada por porfirinas de segunda e terceira gerações.

| Amostras            | PhIO<br>(mg) | PhI(OAc) <sub>2</sub><br>(mg) | Gentamicina<br>50 mg/L | Mn(III)(Br <sub>8</sub> TCMPP)Cl<br>(mg) | Mn(III)(Br <sub>8</sub> TCPP)Cl<br>(mg) | Mn(III)(TCPP)Cl<br>(mg) | Mn(III)(TCMPP)Cl<br>(mg) | % de<br>Oxidação |
|---------------------|--------------|-------------------------------|------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------|
| Gentamicina inicial |              |                               | 10                     |                                          |                                         |                         |                          |                  |
| 1                   | 0.20         |                               | 10                     |                                          |                                         |                         |                          | 21               |
| 2                   |              | 0.33                          | 10                     |                                          |                                         |                         |                          | 21               |
| 3                   | 0.18         |                               | 10                     | 0.16                                     |                                         |                         |                          | 22               |
| 4                   |              | 0.30                          | 10                     | 0.17                                     |                                         |                         |                          | 20               |
| 5                   | 0.21         |                               | 10                     |                                          | 0.16                                    |                         |                          | 30               |
| 6                   |              | 0.33                          | 10                     |                                          | 0.17                                    |                         |                          | 26               |
| 7                   | 0.21         |                               | 10                     |                                          |                                         |                         | 0.10                     | 37               |
| 8                   |              | 0.32                          | 10                     |                                          |                                         |                         | 0.10                     | 30               |
| 9                   | 0.21         |                               | 10                     |                                          |                                         | 0.12                    |                          | 40               |
| 10                  |              | 0.34                          | 10                     |                                          |                                         | 0.12                    |                          | 36               |

A oxidação do sulfato de gentamicina, mediada por catalisadores metaloporfirínicos, comporta-se de maneira diferente à oxidação do norfloxacinol. Observam-se taxas de oxidação em torno de 21% ao se utilizar somente os oxidantes. A presença dos catalisadores melhora o rendimento reacional, mas não tão eficientemente se comparado com as taxas de oxidações alcançadas pelo antibiótico norfloxacinol. A Tabela 5.6 traz uma compilação das taxas de oxidação alcançadas nos diferentes sistemas avaliados.

**Tabela 5.6** - Eficiência de oxidação dos fármacos utilizando diferentes metaloporfirinas, como catalisadores, e oxidantes.

| % de Oxidação |                       |                                  |                                 |                 |                  |
|---------------|-----------------------|----------------------------------|---------------------------------|-----------------|------------------|
| Fármaco       | Oxidante              | Mn(III)(Br <sub>8</sub> TCMPP)Cl | Mn(III)(Br <sub>8</sub> TCPP)Cl | Mn(III)(TCPP)Cl | Mn(III)(TCMPP)Cl |
| Norfloxacinol | PhIO                  | 83                               | 95                              | 77              | 95               |
| Gentamicina   | PhIO                  | 22                               | 30                              | 38              | 41               |
| Norfloxacinol | PhI(OAc) <sub>2</sub> | 87                               | 88                              | 50              | 82               |
| Gentamicina   | PhI(OAc) <sub>2</sub> | 20                               | 27                              | 30              | 36               |

Verifica-se que, para o antibiótico norfloxacinol, os sistemas empregando o iodosilbenzeno como oxidante levaram às melhores taxas de conversão do substrato, sendo os sistemas com melhor taxa de oxidação (95%) aqueles em presença das porfirinas Mn(III)(Br<sub>8</sub>TCPP)Cl e Mn(III)(TCMPP)Cl. As menores taxas de conversão quando se utiliza o iodobenzeno diacetato pode estar associado a sua menor solubilidade no meio de reação, quando

comparado ao outro oxidante. A obtenção de porfirinas de terceira geração (de maior investimento sintético) não levou à obtenção de melhores catalisadores para as porfirinas de hidrofóbicas (classe TCMPP), enquanto nos sistemas com porfirinas hidrofílicas (classe TCPP) o aumento da conversão foi de pelo menos 18 % (valores absolutos).

Para o sulfato de gentamicina também se observou que os sistemas empregando o iodobenzeno diacetato como oxidante levaram às menores taxas de conversão do substrato, sendo a melhor taxa de remoção (41 %) observada quando se utilizou o oxidante PhIO na presença da metaloporfirina de 2<sup>a</sup> geração [Mn(III)(TCMPP)Cl]. Em todos os sistemas estudados, a porfirina de terceira geração levou a menores taxas de conversão, provavelmente devido ao impedimento estéreo gerado pela estrutura distorcida do macrociclo porfirínico, o que dificultaria a aproximação do substrato.

A eficiência de oxidação dos fármacos por algumas metaloporfirinas não implica na mineralização destes compostos. Desta forma, a identificação dos metabólitos gerados e o estudo de sua toxicidade é uma etapa importante e que deve ser realizada para todos os sistemas avaliados. Mesmo diante de metabólitos que podem ser gerados pelo corpo humano é amplamente relatado na literatura que muitos são metabólitos tóxicos e se gerados em maior quantidade podem causar efeitos colaterais (SISAMÓN, 2003; DEVLIN, 2002; GALLI E FEIJOO 2002). Por se tratarem de metabólitos hidrossolúveis o destino final destes compostos será os efluentes domésticos. Desta maneira, assim como não se pode negligenciar a presença de metabólitos/produtos de degradação tóxicos advindos dos tratamentos que envolvam processos oxidativos avançados ou processos biológicos, os metabólitos originados pelo metabolismo humano (mimetizado pelas metaloporfirinas) também devem ser estudados.

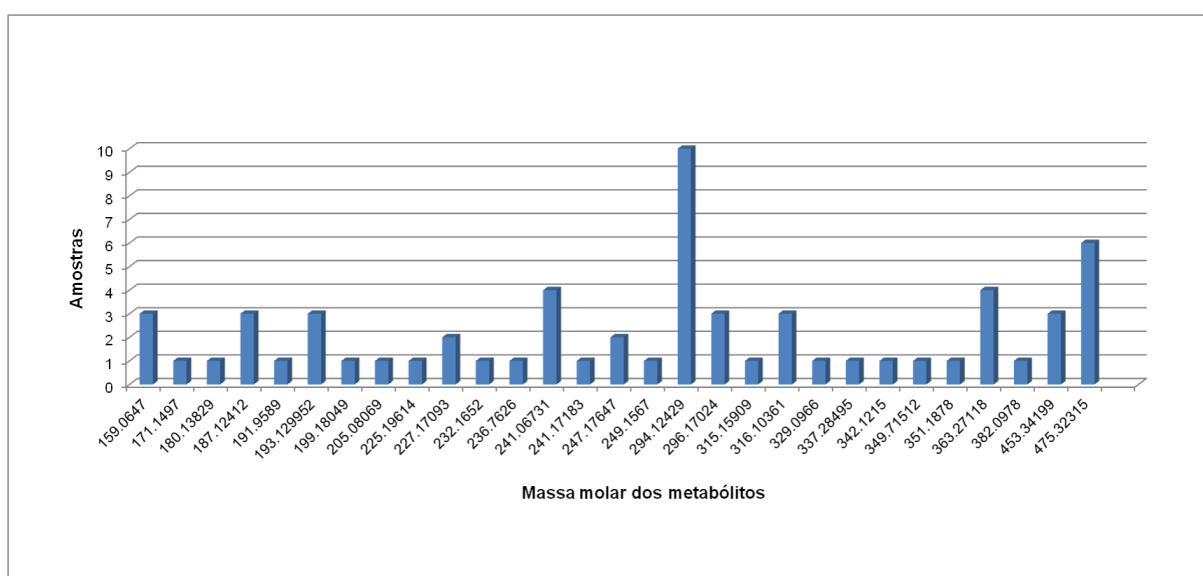
## **5.2 Identificação dos metabólitos e ensaios ecotoxicológicos**

Os ensaios ecotoxicológicos com as amostras submetidas às transformações mediadas por porfirinas e oxidantes esclarecem que os metabolitos gerados no processo são, na maioria das vezes, mais tóxicos que os fármacos em sua forma original. Esse fato chama atenção para um assunto negligenciado na literatura: quando os fármacos são excretados através das fezes e urinas, após metabolização no organismo humano, podem apresentar-se mais tóxicos que se excretados em sua forma original.

### 5.2.1 Antibiótico norfloxacin

Na Figura 5.10 são apresentadas as massas dos metabólitos obtidos por meio da utilização da técnica de espectrometria de massas para o antibiótico norfloxacin após a oxidação catalítica por metaloporfirinas. A utilização de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas tem se mostrado uma técnica viável para identificação de metabólitos e já tem sido utilizada na identificação de metabólitos desta fluoroquinolona presentes em plasma (BAILAC *et al.*, 2006).

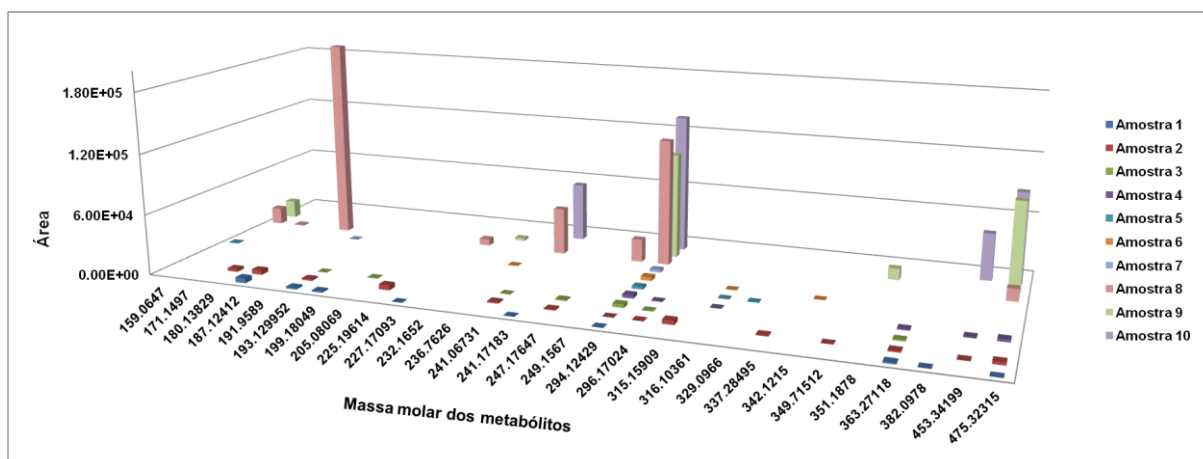
**FIGURA 5.10** - Número de sistemas em que os metabólitos foram verificados durante os ensaios de oxidação do antibiótico norfloxacin catalisados pelas metaloporfirinas.



Observa-se que o metabólito de massa molar 294,1242 foi encontrado em todos os sistemas analisados, inclusive os que não empregavam metaloporfirinas. Apesar disso, somente nas amostras 8, 9 e 10 (Figura 5.11) sua concentração é mais elevada. Este resultado sugere que as porfirinas de 2ª geração potencializam a formação deste metabólito.

Alguns metabólitos são extremamente específicos como o de massa molar 205,0806 g que somente é obtido na Amostra 3 e, em baixas concentrações, se comparado as demais. Outros como o de massa 475,3231 são obtidos em várias amostras em concentrações diferentes. É importante verificar que se trata de um metabólito de massa molar superior a massa molar do norfloxacin podendo ser uma substância resultante da reação entre dois metabólitos ou entre metabólitos e oxidante.

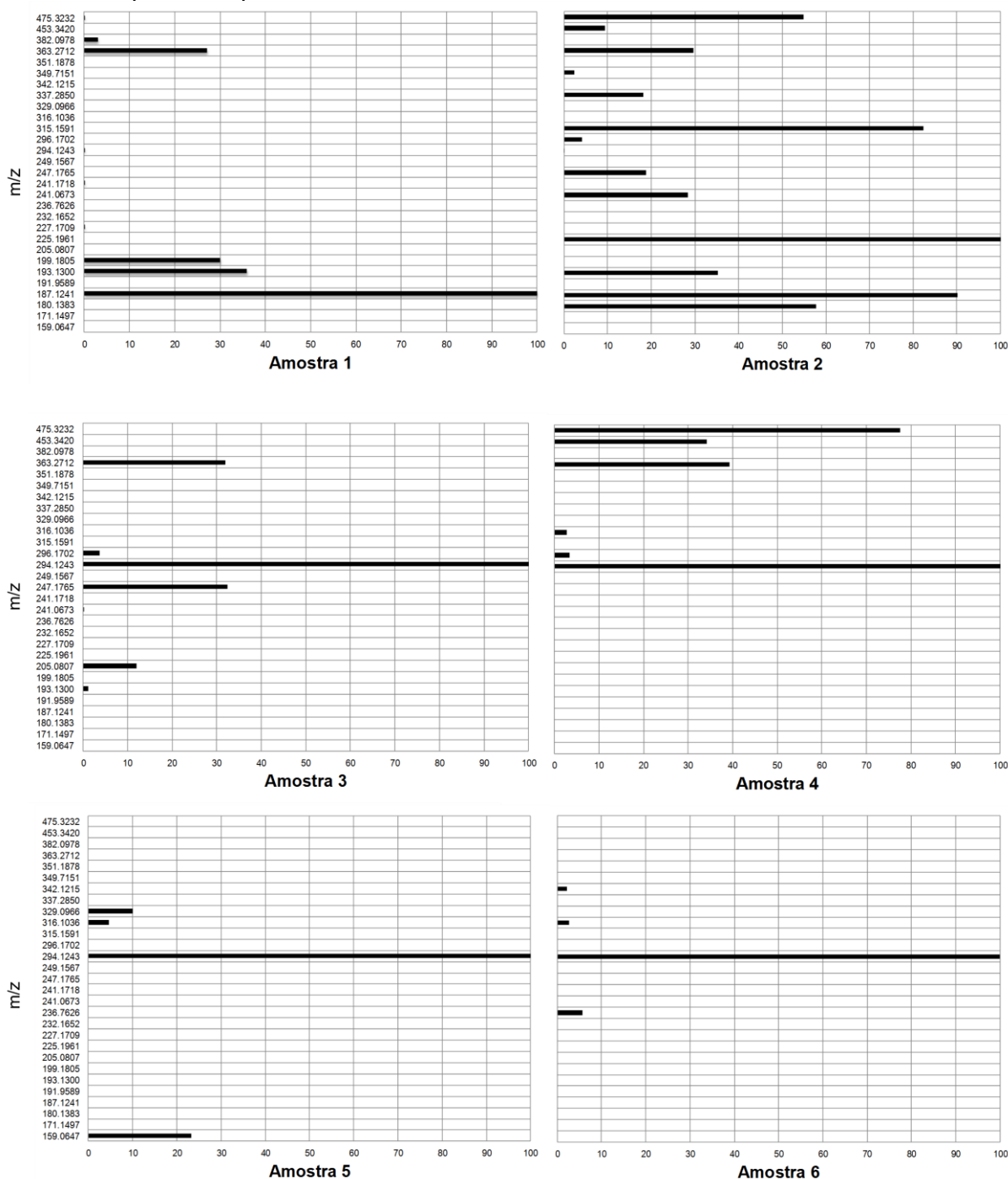
**FIGURA 5.11** - Intensidade de área dos metabólitos obtidos durante os processos empregando metaloporfirinas na oxidação do antibiótico norfloxacino.



Nas Figuras 5.12 e 5.13 foi realizada a normalização das áreas dos metabólitos obtidos objetivando facilitar a interpretação dos dados quando confrontados com os dados dos ensaios ecotoxicológicos.

É possível verificar que embora o oxidante  $\text{PhI}(\text{OAc})_2$  consiga um maior desempenho na oxidação do norfloxacino (15%) na ausência de porfirinas, ele gera uma oxidação incompleta levando a formação de um maior número de metabólitos, Figura 5.21 Amostra 2. Mesmo diante da formação de metabólitos os ensaios ecotoxicológicos realizados para esta amostra não verificou toxicidade. Conclui-se, portanto, que os metabolitos gerados nesta amostra ou não são tóxicos ou o sinergismo entre os compostos geram uma amostra sem toxicidade.

**FIGURA 5.12** - Metabólitos identificados após a realização dos ensaios catalíticos envolvendo porfirinas para o antibiótico norfloxacino.



O metabólito de massa molar 294.1242, Figura 5.14, além de ter sido detectado em todos os sistemas estudados, é o que foi gerado em maior quantidade, exceto para a Amostra 8 em que o composto de massa molar 187.1241 se destaca. Nas Tabelas 5.7 e 5.8 são apresentados os demais metabólitos obtidos durante os ensaios envolvendo a reação de oxidação, mediadas pelas metaloporfirinas.

**FIGURA 5.13** - Metabólitos identificados após a realização dos ensaios catalíticos envolvendo porfirinas para o antibiótico norfloxacino.

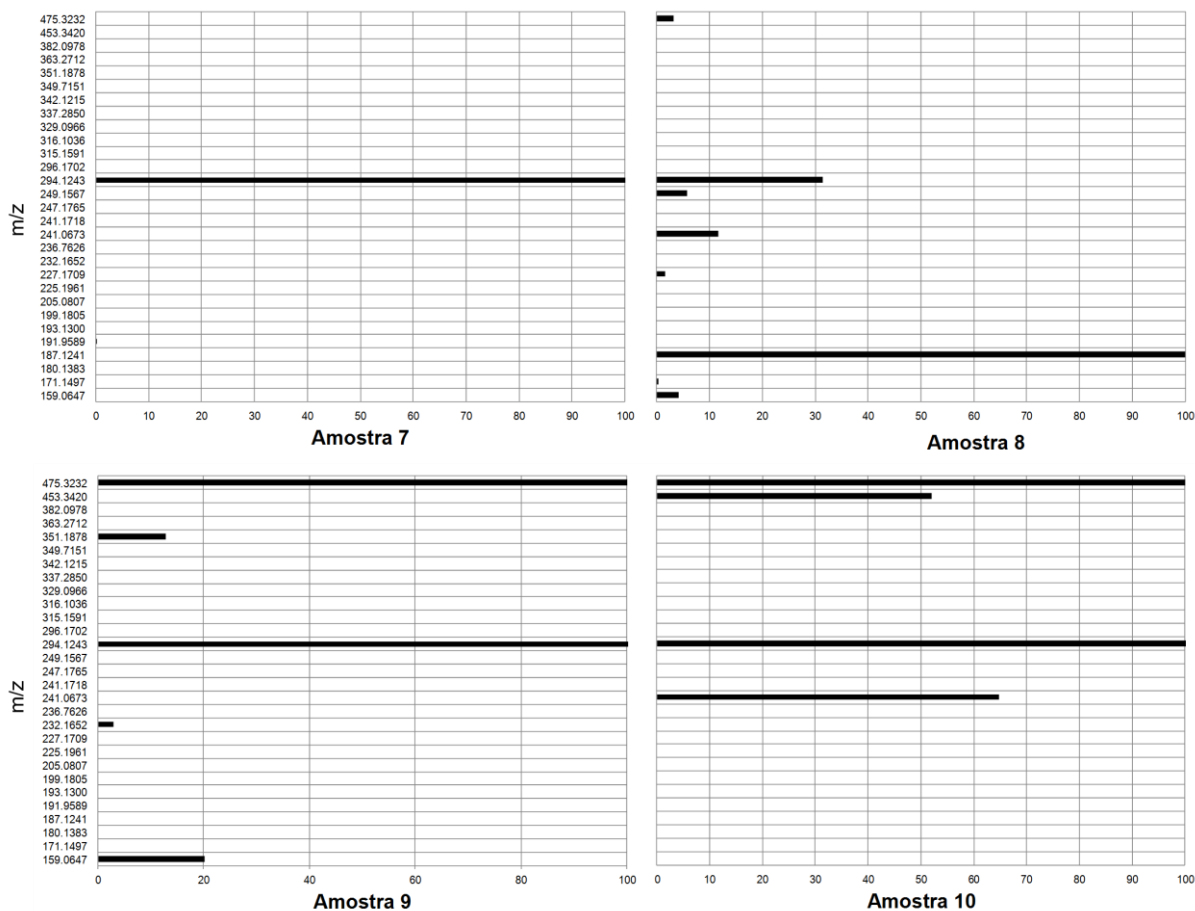


**FIGURA 5.14** - Metabólitos identificados após a realização dos ensaios catalíticos envolvendo porfirinas para o antibiótico norfloxacino.

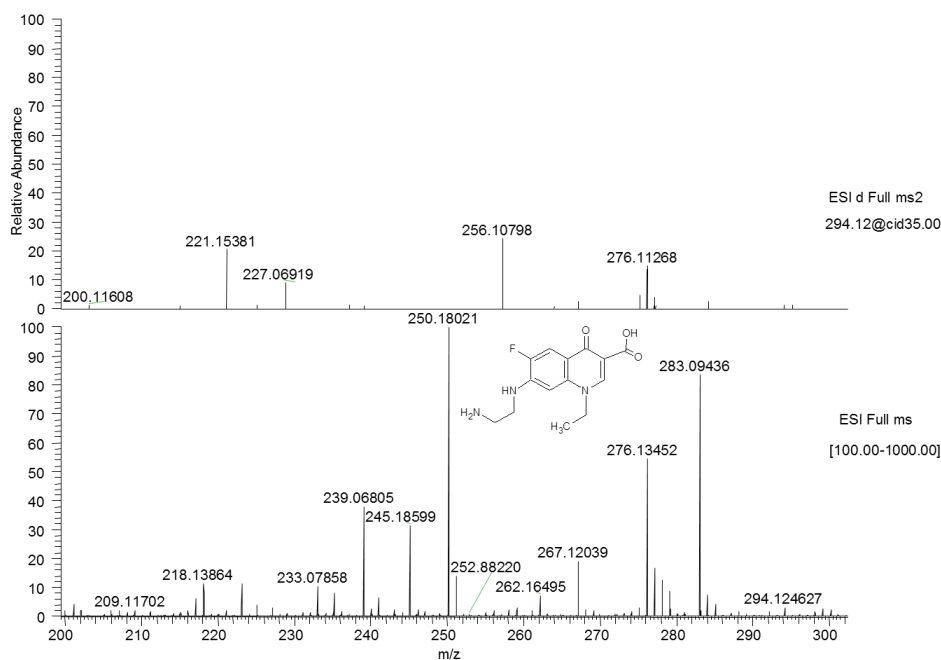


**Tabela 5.7** - Relação dos metabólitos obtidos durante os ensaios envolvendo metaloporfirinas de manganês.

| Composto | Relação carga/massa | Fórmula molecular                                              | Tempo de retenção | Erro ppm | RDB | m Sigma | MS <sup>2</sup>                                                      | Amostra      |
|----------|---------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------|----------|-----|---------|----------------------------------------------------------------------|--------------|
| T1       | 159.0647            | C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub>                  | 7.2               | 2.8      | 2.5 | 9.3     | 84.9577<br>115.0570<br>143.0716<br>132.0189                          | 5, 8 e 9     |
| T2       | 171.1497            | C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O                | 8                 | -2.8     | 1.5 | 3.1     | 89.0695<br>105.0684<br>133.0088<br>147.0404<br>161.9943              | 8            |
| T3       | 180.1383            | C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> NO                             | 9                 | 4.7      | 3.5 | 14.9    | 84.9603<br>118.9389                                                  | 2            |
| T4       | 187.1267            | C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> FN <sub>2</sub> O               | 8.4               | -3.9     | 2.5 | 18.5    | 88.0208<br>90.0183                                                   | 1, 2 e 3     |
| T5       | 191.9589            | C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> FN <sub>3</sub> O                | 1                 | -2.9     | 7.5 | 3.4     | 125.0358<br>134.0446<br>148.0594<br>156.0544<br>170.0510<br>177.5789 | 7            |
| T6       | 193.1243            | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>   | 8                 | -4.9     | 0.5 | 7.0     | 84.9595<br>128.9414<br>172.9761<br>193.0132                          | 1, 2 e 3     |
| T7       | 199.1805            | C <sub>11</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O               | 8.8               | 0.7      | 1.5 | 11.3    | 100.0755<br>130.2591<br>159.1194<br>186.8906                         | 1            |
| T8       | 205.0807            | C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>   | 8                 | 4.9      | 2.5 | 15      | 93.0036<br>156.0816<br>178.0820                                      | 3            |
| T9       | 225.1961            | C <sub>13</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> O               | 9.1               | 2.8      | 2.5 | 4.8     | 100.1116<br>143.1172                                                 | 2            |
| T10      | 227.1709            | C <sub>8</sub> H <sub>19</sub> N <sub>8</sub>                  | 5.7               | 1.4      | 3.5 | 14.8    | 100.1121<br>131.0675<br>162.9431<br>198.9045                         | 1 e 8        |
| T11      | 232.1652            | C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>  | 6.5               | -3       | 1.5 | 7.5     | 100.1097<br>118.0669<br>132.0819<br>159.1029<br>174.1271<br>215.1037 | 9            |
| T12      | 236.7626            | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub>  | 7.3               | 2.1      | 6.5 | 8.4     | 127.0358<br>141.0428<br>176.9366<br>196.9710                         | 6            |
| T13      | 241.06731           | C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>    | 7.2               | 2.8      | 6.5 | 6.1     | 84.9592<br>127.0390<br>212.9282                                      | 2, 3, 8 e 10 |
| T14      | 241.17183           | C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>    | 7.3               | 0.3      | 6.5 | 11.6    | 84.9595<br>117.5354<br>169.0493<br>200.9582<br>232.6414              | 1            |
| T15      | 247.17647           | C <sub>10</sub> H <sub>23</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>  | 9.1               | -0.2     | 1.5 | 7.5     | 194.9512<br>176.9355                                                 | 2 e 3        |
| T16      | 249.1567            | C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>8</sub>                 | 5.9               | 1.4      | 6.5 | 7.3     | 100.1132<br>210.0172                                                 | 8            |
| T17      | 294.12429           | C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> | 6.1               | 1.9      | 7.5 | 8.0     | 200.1161<br>227.0692<br>256.1080<br>276.1127                         | Todos        |
| T18      | 296.17024           | C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> FN                             | 9.8               | -1.1     | 9.5 | 14.3    | 266.9974<br>248.9936<br>225.0410                                     | 2, 3 e 4     |

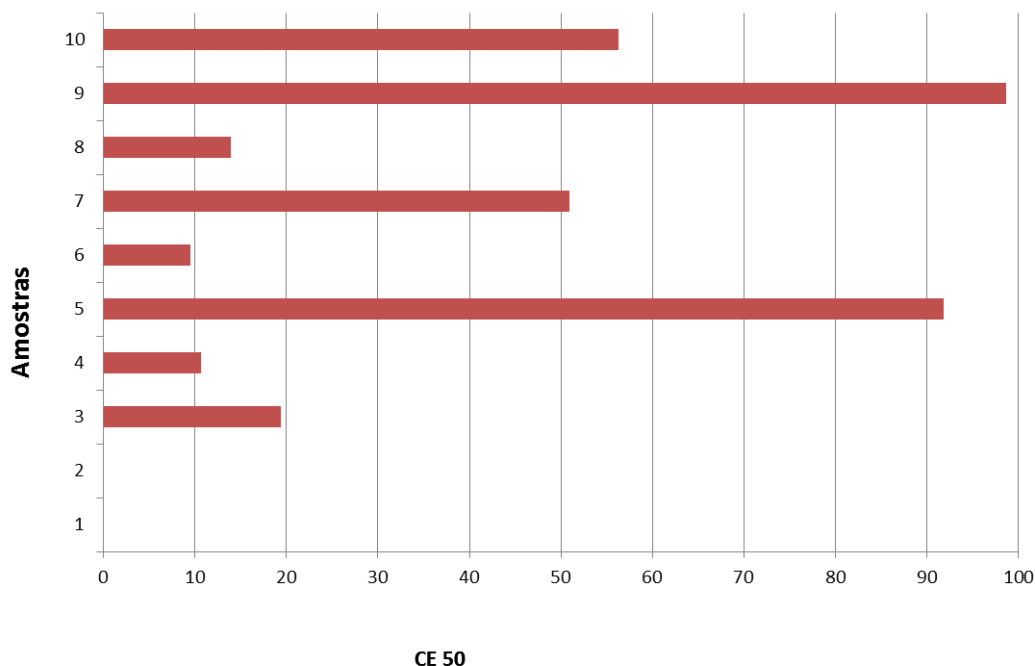
**Tabela 5.8** - Relação dos metabólitos obtidos durante os ensaios envolvendo metaloporfirinas de manganês.

| Composto | Relação carga/massa | Fórmula molecular                                              | Tempo de retenção | Erro ppm | RDB  | m Sigma | MS <sup>2</sup>                                                      | Amostra            |
|----------|---------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------|----------|------|---------|----------------------------------------------------------------------|--------------------|
| T19      | 315.1591            | C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> O <sub>4</sub>                 | 10                | 1.5      | 8.5  | 8.3     | 312.3527<br>280.0534<br>158.1508<br>158.1508<br>107.0559             | 2                  |
| T20      | 316.1036            | C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>  | 6.1               | 1.3      | 10.5 | 18.4    | 210.9471<br>237.6494<br>261.1235<br>289.8635                         | 4, 5 e 6           |
| T21      | 329.0966            | C <sub>22</sub> H <sub>14</sub> FO <sub>2</sub>                | 7.4               | 1.8      | 15.5 | 18.9    | 103.0404<br>146.0424<br>224.0639                                     | 5                  |
| T22      | 337.2850            | C <sub>20</sub> H <sub>37</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  | 9                 | 2.7      | 3.5  | 16.3    | 311.1994<br>180.1345<br>158.1539                                     | 2                  |
| T23      | 342.1215            | C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> N <sub>9</sub>                 | 6.3               | -1.5     | 16.5 | 15.8    | 131.0001<br>158.9238<br>175.9988<br>214.8581<br>250.9171<br>274.8738 | 6                  |
| T24      | 349.7151            | C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> FN <sub>6</sub> O              | 7.5               | 1.3      | 7.5  | 1.8     | 103.0391<br>133.0871<br>203.5792<br>247.0981<br>336.1642             | 2                  |
| T25      | 351.1878            | C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> FN <sub>2</sub> O              | 7.5               | -3.1     | 11.5 | 8.9     | 103.0398<br>168.0565<br>251.0705                                     | 9                  |
| T26      | 363.2719            | C <sub>23</sub> H <sub>36</sub> FO <sub>2</sub>                | 8                 | -5.1     | 5.5  | 3.6     | 193.1302<br>211.1407                                                 | 1, 2, 3 e 4        |
| T27      | 382.0978            | C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> FN <sub>11</sub> O <sub>7</sub> | 1.0               | -0.1     | 6.5  | 17.2    | 84.9346<br>194.0382<br>246.9541<br>312.1347<br>338.1072              | 1                  |
| T28      | 453.34235           | C <sub>24</sub> H <sub>45</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>  | 7.5               | 1.9      | 4.5  | 34.5    | 100.1110<br>139.0861<br>210.1492<br>336.2256                         | 2, 4 e 10          |
| T29      | 475.3235            | C <sub>30</sub> H <sub>40</sub> FN <sub>4</sub>                | 5.9               | -0.7     | 12.5 | 16.7    | 249.1557                                                             | 1, 2, 4, 8, 9 e 10 |

Com relação aos ensaios ecotoxicológicos as amostras que continha norfloxacino apresentaram, em geral, toxicidades menos elevadas que as apresentadas pelo sulfato de gentamicina após reação com as porfirinas e oxidantes, resultado similar ao observados nas amostras tratadas por POA.

Na Figura 5.15 são apresentados os dados de CE<sub>50</sub> compilados, facilitando a visualização dos efeitos dos tratamentos sob a toxicidade das amostras finais. É importante relembrar que quanto menor o valor de CE<sub>50</sub>, mais tóxica é a amostra.

**FIGURA 5.15** – Dados compilados dos ensaios ecotoxicológicos para o antibiótico norfloxacino utilizando porfirinas.



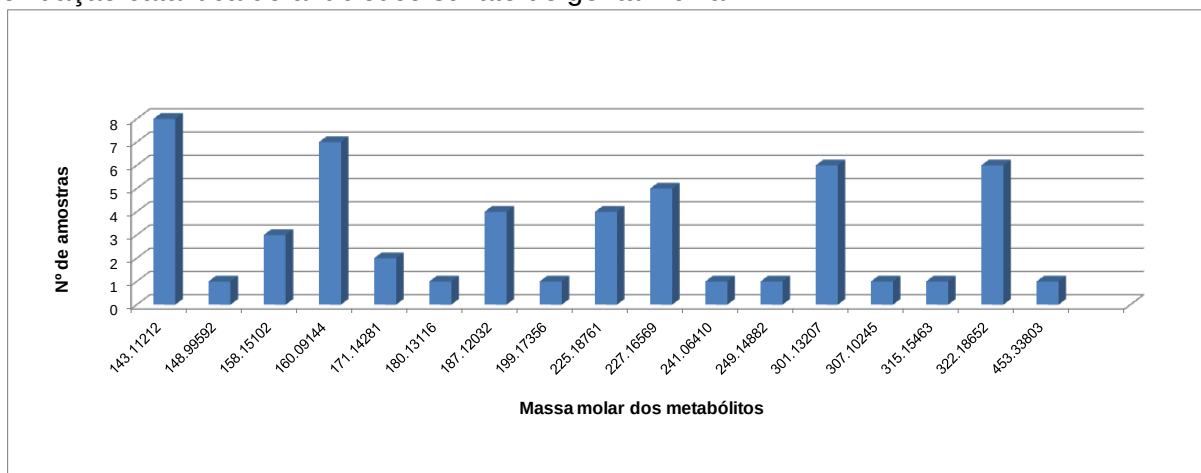
As amostras 1 e 2 sequer são tóxicas e, esse resultado esclarece que somente a presença do oxidante não confere toxicidade ao meio reacional.

As amostras 5, 7, 9 e 10 apresentaram toxicidade, mas em menor intensidade se comparado com o fármaco original. A amostra 9, por exemplo, é entre todas a menos tóxica. Já as amostras 3, 4, 6 e 8, o valor de toxicidade é superior ao encontrado no fármaco de partida, esclarecendo que os metabólitos gerados são mais tóxicos que o próprio norfloxacino. O valor mais baixo obtido foi na amostra 6, com valor 9,49%.

### 5.2.2 Antibiótico sulfato de gentamicina

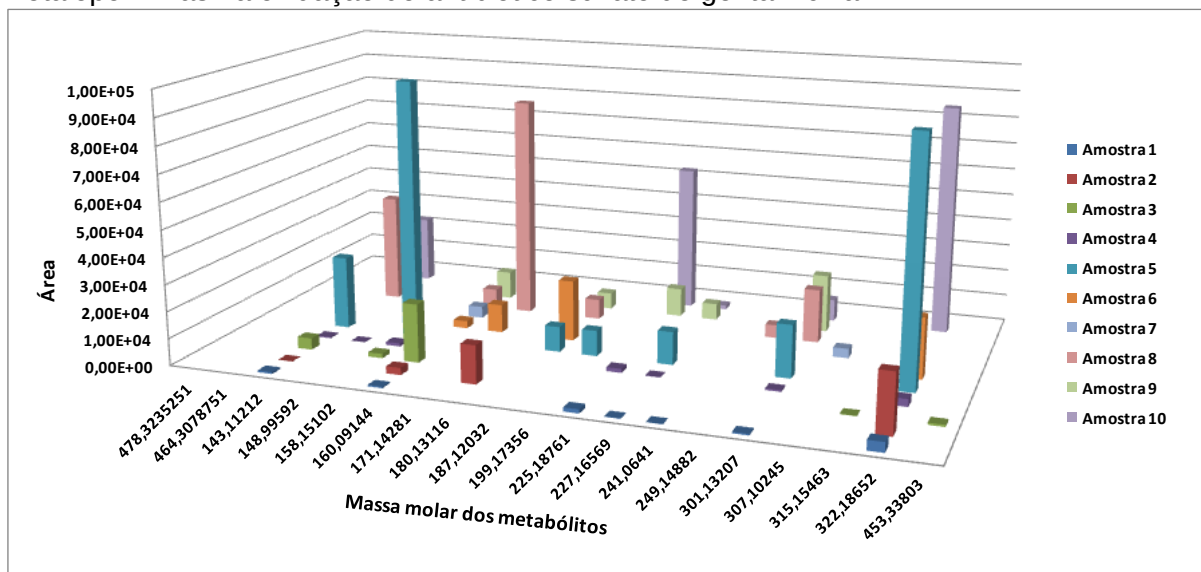
Na Figura 5.16 são apresentadas as massas dos metabólitos obtidos, por meio da utilização da técnica de espectrometria de massas, após os ensaios envolvendo metaloporfirinas de manganês como catalisadores para a oxidação do antibiótico sulfato de gentamicina.

**FIGURA 5.16** - Número de sistemas em que os metabólitos foram verificados durante a oxidação catalítica do antibiótico sulfato de gentamicina.



Ao contrário do que foi observado para o antibiótico norfloxacin, para o sulfato de gentamicina não se observou um metabólito comum a todos os processos. Além disso, todos os metabólitos estavam presentes em baixas concentrações se comparado com os presentes nos processos envolvendo o antibiótico norfloxacin, Figura 5.17.

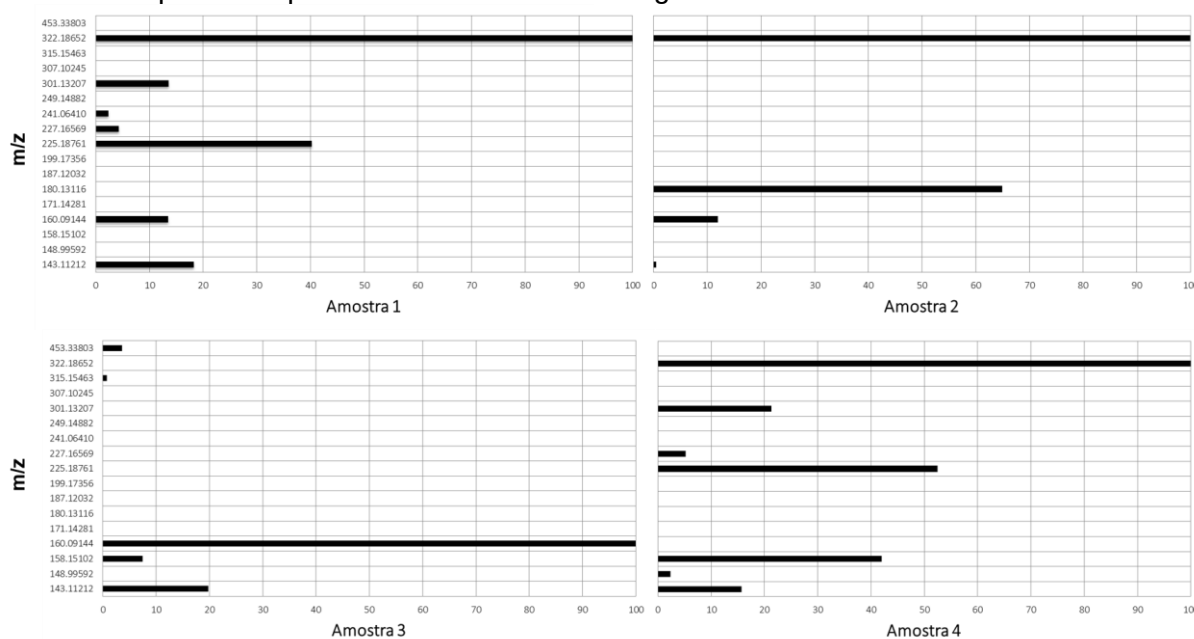
**FIGURA 5.17** - Intensidade de área dos metabólitos obtidos nos processos empregando metaloporfirinas na oxidação do antibiótico sulfato de gentamicina.



As baixas concentrações observadas podem ser justificadas pelos baixos valores de eficiência na degradação do sulfato de gentamicina com remoção máxima de 41% para a amostra 9. Este baixo valor de remoção pode ser atribuído ao fato de que o oxidante, para reação do sulfato de gentamicina, foi o reagente limitante.

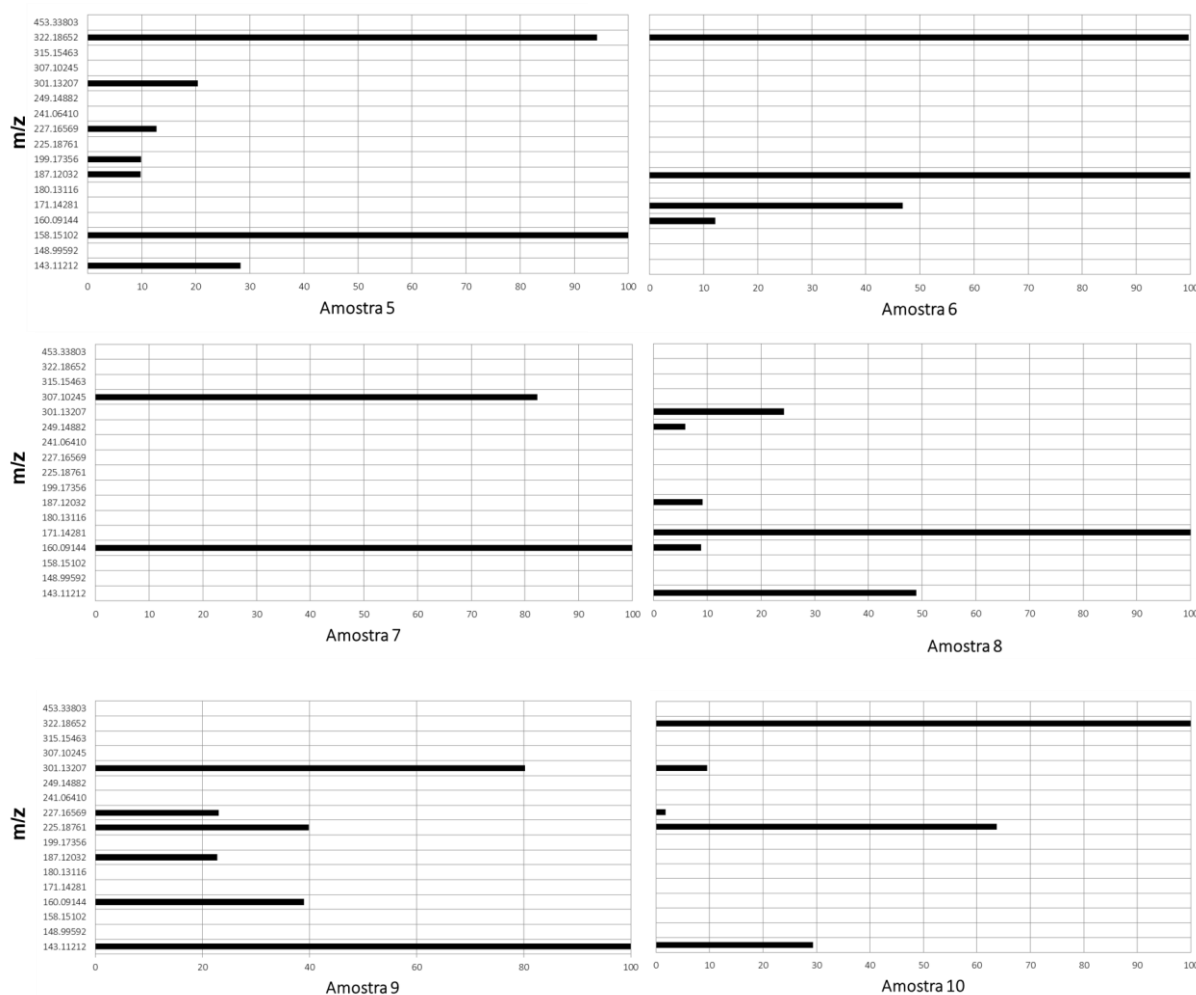
Nas Figuras 5.18 e 5.19 são apresentados os metabólitos com suas áreas normalizadas. A presença destes metabólitos pode conferir toxicidade ao meio reacional. É importante salientar que um metabólito pode apresentar efeitos tóxicos em um determinado meio e não apresentar em outro, em função de fenômenos de antagonismo e sinergismo inerentes a mistura. Desta forma, no contexto ambiental, é impossível discutir o efeito individual de cada metabólito gerado durante o processo, sendo o estudo da ecotoxicidade do sistema o parâmetro mais relevante.

**FIGURA 5.18** - Metabólitos identificados após a realização dos ensaios catalíticos envolvendo porfirinas para o antibiótico sulfato de gentamicina.



Para os ensaios com o antibiótico sulfato de gentamicina todas as amostras geradas foram tóxicas. É importante ressaltar que o antibiótico, embora não seja tóxico, ao reagir com as porfirinas e oxidantes alcança valores bastante elevados de toxicidade. No caso das amostras 4, 6, 9 e 10 as toxicidades são as mais altas, respectivamente, 5,16 %, 4,3 %, 2,27 % e 1,9 %. As amostras de toxicidade menos elevadas são as 3 e 8, respectivamente, 19,9 % e 27,27 %.

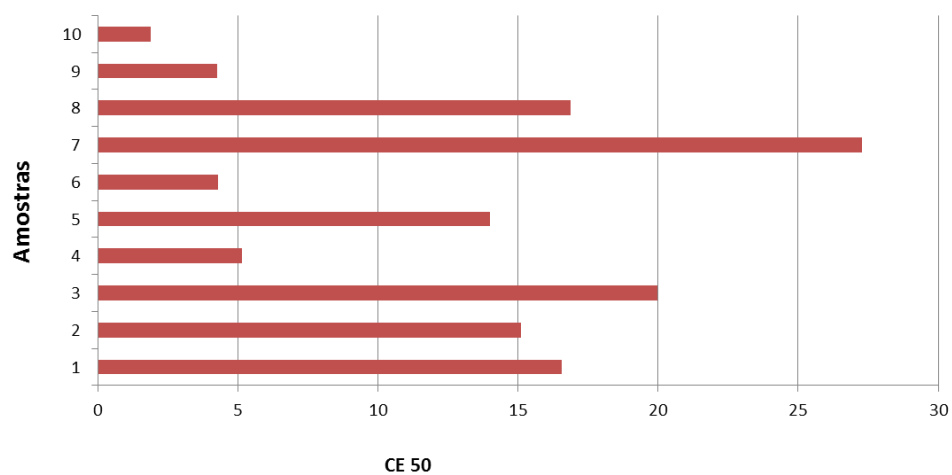
**FIGURA 5.19** - Metabólitos identificados após a realização dos ensaios catalíticos envolvendo porfirinas para o antibiótico sulfato de gentamicina.



Para o composto sulfato de gentamicina não foi observado um metabólito comum a todos os sistemas utilizados. Observa-se que o metabólito de massa molar 322.1865g está presente na maioria dos sistemas. Este metabólito também foi identificado como produto de degradação dos processos oxidativos avançados e processos biológicos de tratamento.

Na Figura 5.20 são apresentados os dados de  $CE_{50}$  compilados, facilitando a visualização dos efeitos dos tratamentos sob a toxicidade das amostras finais. É importante relembrar que quanto menor o valor de  $CE_{50}$ , mais tóxica é a amostra.

**FIGURA 5.20** – Dados compilados dos ensaios ecotoxicológicos para o antibiótico sulfato de gentamicina utilizando porfirinas.



Nas Tabelas 5.9 e 5.10 são apresentados os demais metabólitos obtidos durante os ensaios envolvendo a oxidação catalítica mediada pelas metaloporfirinas.

**Tabela 5.9** - Relação dos metabólitos obtidos durante os ensaios envolvendo metaloporfirinas de manganês.

| Composto | Relação carga/massa | Fórmula molecular                                            | Tempo de retenção | Erro ppm | RDB | mSigma | MS <sup>2</sup>                                                                  | Amostra                         |
|----------|---------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------|----------|-----|--------|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| T1       | 143.11597           | C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O              | 2                 | 5.4      | 1.5 | 1.7    | 93.06143<br>104.04804<br>131.05639                                               | 1, 2, 3, 4,<br>5, 8, 9, e<br>10 |
| T2       | 148.99592           | CHN <sub>4</sub> O <sub>5</sub>                              | 3.5               | -5.9     | 3.5 | 16     | 84.95563<br>134.9803                                                             | 4                               |
| T3       | 158.15090           | C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> NO                            | 7.2               | 3.2      | 0.5 | 6.2    | 90.897444<br>102.094491<br>115.054801<br>137.410198                              | 3, 4, 5                         |
| T4       | 160.09662           | C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>               | 2                 | 1.3      | 1.5 | 15.1   | 91.05336<br>112.07235<br>135.05271                                               | 1, 2, 3, 6,<br>7, 8 e 9         |
| T5       | 171.14398           | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>               | 3.9               | -5.2     | 1.5 | 14.6   | 84.9610<br>115.0504<br>130.0720<br>144.9547<br>169.0343                          | 6 e 8                           |
| T6       | 180.13116           | C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> N                             | 7.4               | -5.7     | 4.5 | 19.7   | 69.72198<br>98.98414<br>135.08508<br>161.56874                                   | 2                               |
| T7       | 187.1205            | C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub>               | 7.2               | 3.2      | 6.5 | 9      | 109.0572<br>140.9196<br>157.7434                                                 | 5, 6, 8 e 9                     |
| T8       | 225.19179           | C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O             | 7.6               | 1.3      | 2.5 | 16.7   | 100.11159<br>121.03129<br>143.11929<br>173.04218<br>209.01057                    | 1, 4, 9 e<br>10                 |
| T9       | 227.16980           | C <sub>8</sub> H <sub>19</sub> N <sub>8</sub>                | 6.2               | 2.8      | 3.5 | 6.4    | 100.11034<br>140.98008<br>165.90254<br>196.94333                                 | 1, 4, 5, 9<br>e 10              |
| T10      | 241.06410           | C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> N <sub>12</sub> O <sub>2</sub> | 5.1               | 5.6      | 7.5 | 16.9   | 99.04138<br>148.94363<br>183.91746<br>196.93449<br>237.09373                     | 1                               |
| T11      | 249.14882           | C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> O <sub>3</sub>               | 5                 | -1.2     | 5.5 | 17.8   | 84.96455<br>108.0458<br>131.0819<br>154.5634<br>183.0598<br>207.9659<br>233.0739 | 8                               |

**Tabela 5.10 - Relação dos metabólitos obtidos durante os ensaios envolvendo metaloporfirinas de manganês.**

| Composto | Relação carga/massa | Fórmula molecular                                             | Tempo de retenção | Erro ppm | RDB | mSigma | MS <sup>2</sup>                                                                   | Amostra            |
|----------|---------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------|----------|-----|--------|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| T12      | 199.17356           | C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>                | 7.1               | -1.6     | 1.5 | 10.6   | 121.0348<br>146.9647<br>189.0774                                                  | 5                  |
| T13      | 301.13329           | C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> | 7.3               | -2.5     | 9.5 | 14.9   | 130.15765<br>166.12405<br>217.08303                                               | 1, 4, 5, 8, 9 e 10 |
| T14      | 307.10245           | C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>                | 7.2               | -0.3     | 3.5 | 16.3   | 121.0399<br>139.02278<br>169.0424<br>183.0439<br>206.1201<br>220.0607<br>238.0756 | 7                  |
| T15      | 315.15463           | C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O              | 7.0               | -7.2     | 5.5 | 12.4   | 84.960772<br>115.962100<br>173.093556<br>201.947060<br>240.917827                 | 3                  |
| T16      | 322.19357           | C <sub>13</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> | 2                 | 1.4      | 1.5 | 9      | 112.07374<br>142.08294<br>187.11132<br>250.00881                                  | 1, 2, 4, 5, 6 e 10 |
| T17      | 453.33803           | C <sub>16</sub> H <sub>36</sub> N <sub>16</sub>               | 7.5               | 0.3      | 6.5 | 18.6   | 100.109822<br>155.169748<br>210.146603<br>298.480619<br>336.222485                | 3                  |

## 6. CONCLUSÕES

A utilização de metaloporfirinas de manganês como mímicos das oxidações biológicas se mostrou adequada para os dois antibióticos. Foram obtidas eficiências de remoções de 41 e 95% para os antibióticos sulfato de gentamicina e norfloxacino, respectivamente.

Observou-se que para o sulfato de gentamicina novos estudos utilizando outras proporções estequiométricas são necessários, sobretudo, proporções em que o oxidante não seja o reagente limitante da reação. O norfloxacino alcançou valores de oxidação de 95% quando utilizado porfirina de 2ª geração que são compostos de menor investimento financeiro.

Os experimentos realizados para os dois antibióticos demonstraram que são gerados metabólitos tóxico, sobretudo, os que envolveram o antibiótico sulfato de gentamicina. Este fato alerta para a importância da identificação e quantificação destes metabólitos.

De forma geral, os estudos demonstram a importância da identificação de compostos potencialmente tóxicos para que novas tecnologias de tratamento de águas de abastecimento e residuárias sejam incorporadas aos sistemas já utilizados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. NBR 15411-3: Ecotoxicologia Aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *Vibrio Fischeri* (ensaio de bactéria luminescente). Rio de Janeiro, 2006.

AGUINACO, A.; BELTRÁN, F. J.; GARCÍA-ARAYA, J. F.; OROPESA, A.; Photocatalytic ozonation to remove the pharmaceutical diclofenac from water: Influence of variables. *Chemical Engineering Journal* 189– 190, 275– 282, 2012.

ALEXY, R.; KÜMPEL, T.; KÜMMERER, K.; Assessment of degradation of 18 antibiotics in the closed bottle test. *Chemosphere* 57, 505–512, 2004.

ALVARES, A. B. C.; DIAPER, C.; PARSON, S. A.; Partial oxidation by ozone to remove recalcitrance from wastewaters - a review. *Environmental Technology*, v.2, n.4, p.409-427, 2001.

AMINOV, R. I.; MACKIE, R. I.; Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiology Letters* 271, 147–161, 2007.

ANDREOZZI, R.; CAPRIO, V.; MAROTTA, R.; VOGNA, D.; *Water Research*, 37, 993, 2003.

APHA - Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21th Edition. *American Public Health Association*, Washington, DC, 2012.

ARSLAN-ALATON I.; DOGRUEL, S.; Pre-treatment of penicillin formulation effluent by advanced oxidation processes. *Journal of Hazardous Materials*, v.112, p.105-113, 2004.

BAE, S.; KIM, D.; LEE, W.; Degradation of diclofenac by pyrite catalyzed Fenton oxidation. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org.ez27.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.apcatb.2012.12.031> Acesso em: 17 de Janeiro de 2013.

BAGAL, M. V.; GOGATE, P. R.; Degradation of diclofenac sodium using combined processes based on hydrodynamic cavitation and heterogeneous photocatalysis. *Ultrasonics Sonochemistry*, p 1035-1043, 2014.

BAILAC, S.; BARRON, D.; SANZ-NEBOT, V.; BARBOSA, J.; Determination of fluoroquinolones in chicken tissues by LC-coupled electrospray ionisation and atmospheric pressure chemical ionization. *Journal of Separation Science*, 29: p131 a136, 2006.

BAILLY, E.; LEVI, Y.; KAROLAK, S.; Calibration and field evaluation of polar organic chemical integrative sampler (POCIS) for monitoring pharmaceuticals in hospital wastewater. *Environmental Pollution*, 174, pp. 100–105, 2013.

BELDEN, J. B.; MAUL, J. D.; LYDY, M. J.; Partitioning and photodegradation of ciprofloxacin in aqueous systems in the presence of organic matter. *Chemosphere* 66 (8), p 1390-1395, 2007.

BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A.; Aplicação dos ensaios ecotoxicológicos e legislação pertinente. In: ZAGATTO, P. A; BERTOLETTI E. (eds.), *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. Rima. São Paulo. São Carlos. 478, P. 347-379, 2006.

BIAŁK-BIELIŃSKA, A.; STOLTE, S.; ARNING, J.; UEBERS, U. BOSCHEN, A.; STEPNOWSKI, P.; MATZKE, M. Ecotoxicity evaluation of selected sulfonamides. *Chemosphere*, v.85, p.928-933, 2011.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. *Química Nova*, v.26, n4, p.523-530, 2003.

BOJANOWSKA-CZAJKA, A.; DRZEWICZ, P.; KOZYRA, C.; NALECZ-JAWECKI, G; SAWICKI, J.; SZOSTEK, B.; TROJANOWICZ, M.; Radiolytic degradation of herbicide 4-chloro-2methyl phenoxyacetic acid (MCPA) by irradiation for environmental protection. *Ecotoxicology Environmental Safety* 65, 2065-277, 2006.

BONNEMOY, F.; LAV\_EDRINE, B.; BOULKAMH, A. Influence of UV irradiation on the toxicity of phenylurea herbicides using Microtox test. *Chemosphere*, v.54, p.1183–1187, 2004.

BOUKI, C.; VENIERI, D.; DIAMADOPOULOS, E. Detection and fate antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.91, p1-9, 2013.

BROWN K.D.; KULIS J.; THOMSON B.; CHAPMAN T.H.; MAWHINNEY D. B. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Science of the Total Environment*, v.366, p.772-783, 2006.

BRURRIDGE, L.; WEIS, JS.; CABELLO, F.; PIZARRO, J.; BOSTICK, K. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture. Elsevier B.V.*; Aug; 306 (1-4):7-23, 2010.

BUSER, H. R.; POISER, T.; MÜLLER, M. D.; “Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a Lake”. *Environmental Science and Technology*, Vol. 32, pp. 3449-3456, 1998.

CAHILL, J. D.; FURLONG, E. T.; BURKHARDT, M.R.; KOLPIN, D.; ANDERSON, L. G. Determination of pharmaceutical, compounds in surface-and ground-water samples by solid phase, extraction and high-performance liquid, chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1041 (1-2), 171-180, 2004.

CARDOZA, L. A.; KNAPP, C. W.; LARIVE, C. K.; BELDEN, J. B.; LYDY, M. J.; GRAHAM, D. W.; Factors affecting the fate of ciprofloxacin in aquatic field systems. *Water, Air and Soil Pollution* 161 (1-4), p 383-398, 2005.

CASADEVALL, A.; Antibody-based therapies for emerging infectious diseases. *Emerg Infect Dis.*; 2(3):200-8, 1996.

CASTIGLIONI, S.; POMATI, F.; MILLER, K.; BURNS, B.P.; ZUCCATO, E.; CALAMARI, D.; NEILAN, B.A.; Novel homologs of the multiple resistance regulator marA in antibiotic-contaminated environments, *Water Research* 42, pp. 4271-4280, 2008.

CASTRO, A. V. S.; *Processos Oxidativos Avançados para Tratamento de Águas Ácidas de Refinaria de Petróleo*, Tese de M. Sc., PEQ/COPPE, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2004.

CASTRO, M. C. R.; Oxidação de compostos orgânicos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalisada por metaloporfirinas. 100f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica e Produtos Naturais) – Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2009.

CHA, J.M.; YANG, S.; CARLSON, K.H. Trace determination of beta-lactam antibiotics in surface water and urban wastewater using liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1115 (1-2), 46-57, 2006.

CHAN, K. H.; CHU, W.; Modeling the reaction kinetics of Fenton's process on the removal of atrazine, *Chemosphere* 51, 305–31, 2003.

CHANG, E-E.; LIU, T.; HUANG, C.; LIANG, C.; CHIANG, P.; Degradation of mefenamic acid from aqueous solutions by the ozonation and O<sub>3</sub>/UV processes. *Separation and Purification Technology* 98, p 123–129, 2012.

CHEN, M.; CHU, W.; Degradation of antibiotic norfloxacin in aqueous solution by visible-light-mediated C-TiO<sub>2</sub> photocatalysis. *Journal of Hazardous Material* 219– 220, 183– 189, 2012.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p.1820-1830, 2008.

COSTANZO, S. D.; MURBY, J.; BATES, J.; Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Marine Pollution Bulletin*, 51, (1-4), 218-223, 2005.

CRUZ, N. L.; GIMÉNEZ, J.; ESPLUGAS, S.; GRANDJEAN, D.; ALENCASTRO, L.F.; PULGARÍN, C.; Degradation of 32 emergent contaminants by UV and neutral photo-Fenton in domestic wastewater effluent previously treated by activated sludge, *Water Research* 46, 1947 -1957, 2012.

CRUZ, R. M.; *Reativo de Fenton e Foto-Fenton em Efluente de Alta Salinidade*, Tese de M. Sc., PEQ/COPPE, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2000.

DA-SILVA, D. C.; LEOD, T. C. O. M.; FARIAS, A. L.; SANTOS, J. S.; CARVALHO, M. E. M.; REBOUÇAS, J. S.; IDEMORI, Y. M.; ASSIS, M. D.; Carbamazepine oxidation catalyzed by manganese porphyrins: Effects of the -bromination of the macrocycle and the choice of oxidant. *Applied Catalysis A: General* 408, p 25– 30, 2011.

DENG, A. J.; SHAO, B. Y.; GAO, N.; XIA, S.; TANA, C.; ZHOU, S.; HUA, X.; Degradation of the antiepileptic drug carbamazepine upon different UV-based advanced oxidation processes in water. *Chemical Engineering Journal*, Volume 222, p 150-158, 2013.

DE SILVA, D.; BURNS.; TJANDRAATMADJA, G.; MOGLIA,M.; DAVIS, P.; WOLF, L.; Sustainable management of leakage from wastewater pipelines. *Water Science Technology*, 52, pp. 189–198, 2005.

DEVLIN, T. Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas, Tradução da sexta edição americana, Editora Blucher, 2002.

DEZOTTI, M. Apostila do Curso da Escola Piloto: Técnicas de Controle Ambiental em Efluentes Líquidos – Processos Oxidativos Avançados. Escola Piloto Virtual, PEQ, COPPE, UFRJ, 2003.

DEZOTTI, M. Processos e técnicas para o controle ambiental de efluentes líquidos. Escola Piloto em Engenharia Química, COPPE/UFRJ, 2008.

DOLPHIN, D.; TRAYLOR, T. G.; XIE, L. Y.; *Accounts of Chemical Research.*, 1997, 30, 251.

DOMÈNECH, X.; JARDIM, W. F.; LITTER, M. I.; Eliminación de contaminantes por fotocátalisis heterogénea; Blesa, M. A., ed.; *Digital Grafic*: La Plata, 2001.

ELLIS, J. B.; Sewer exfiltration and the colmation layer. *Water Science Technology*, 59, p. 2273, 2009.

ELMOLLA, E.; CHAUDHURI, M.; Combined photo-Fenton–SBR process for antibiotic wastewater treatment. *Journal of Hazardous Materials* 192, p 1418-1426, 2011

ELMOLLA, E.; CHAUDHURI, M.; Photocatalytic degradation of amoxicillin, ampicillin and cloxacillin antibiotics in aqueous solution using UV/TiO<sub>2</sub> and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> photocatalysis. *Desalination* 252, p46-52, 2010.

EMA. Sales of veterinary antimicrobial agents in 25 EU/EEA countries in 2011. EMA/236501/2013; 2013

FENG, L.; HULLEBUSCH, E. D.; RODRIGO, M. A.; ESPOSITO, G.; OTURAN, M.A; Removal of residual anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals from aqueous systems by electrochemical advanced oxidation processes. A review. *Chemical Engineering Journal* 228, 944-964, 2013.

FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, v. 76, p. 122–159, 2006.

FERNICOLA, N. A. G. G. e OLIVEIRA, S. Poluentes Orgânicos Persistentes: POPS. Série Cadernos de Referência Ambiental. Salvador, 13, 2002.

FIELD, J.; SIERRA, R.; LETTING, G. Ensayos anaerobios.4º Seminario de depuración de aguas residuales Spain: Valladolid, 1988.

FIOCRUZ. A Indústria Química e de Fármacos. *Conferência Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação*. Brasília, set. 2001.

FRONTISTIS, Z.; XEKOUKOULOTAKIS, N. P.; HAPESHI, E.; VENIERI, D.; FATTAKASSINOS, D.; MANTZAVINOS, D.; Fast degradation of estrogen hormones in environmental matrices by photo-Fenton oxidation under simulated solar radiation. *Chemical Engineering Journal* 178, p 175-182, 2011.

GALLI, E.; FEIJOO, L.C.; Citocromo p-450 y su importancia clínica revisión actualizada, *Revista de Neuro-Psiquiatría*, 2002;

GARTISER, S.; URICH, E.; ALEXY, R.; KÜMMERER, K.; Ultimate biodegradation and elimination of antibiotics in inherent tests. *Chemosphere* 67, 604–613, 2007.

GEBHARDT, W.; SCHRÖDER, H.Fr., Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry for the follow-up of the elimination of persistent pharmaceuticals during wastewater treatment applying biological wastewater treatment and advanced oxidation. *Journal of Chromatography A*, v.1160, p.34-43, 2007.

GOBEL, A.; ATHOMSEN, A.; MCARDELL, C.S.; JOSS, A.; GIGER, W.; Occurrence and sorption behavior of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in activated sludge treatment. *Environmental Science and Technology* 39 (11), 3981-3989, 2005.

GOI, A.; VERESSININA, Y.; TRAPIDO, M. Fenton Process for Landfill Leachate Treatment: Evaluation of Biodegradability and Toxicity. *Journal of Environmental Engineering*, v.136, p.46-53, 2010.

GONZÁLEZ, O.; SANS, C; ESPLUGAS, S. Sulfamethoxazole abatement by photo-Fenton Toxicity, inhibition and biodegradability assessment of intermediates. *Journal of Hazardous Materials*, v.146, p.459–464, 2007.

GOTVAJN, A.; ZAGORC-KONČAN, J.; COTMAN, M. Fenton's oxidative treatment of municipal landfill leachate as an alternative to biological process. *Desalination*, v.275, p. 269–275, 2011.

GROS, M.; CRUZ-MORATO, C.; MARCO-URREA, E.; LONGRE', P.; SINGER H.; SARRA, M.; HOLLENDER J.; VICENT, T.; RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELO', D. Biodegradation of the X-ray contrast agent iopromide and the fluoroquinolone antibiotic ofloxacin by the white rot fungus *Trametes versicolor* in hospital wastewaters and identification of degradation products, *Water Research* 60, p 2 2 8 e2 4 1, 2014.

GUARDABASSI, L, KRUSE, H.; Princípios da utilização prudente e racional de antimicrobianos em animais. *Guia de Antimicrobianos em Veterinária*. 17–30, 2010.

GUIMARÃES, O. D.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, v 33, Nº 3, 667-679, 2010.

GUNNARSSON, L; KRISTIANSSON, E.; RUTGERSSON, C.; STURVE, J.; FICK, J.; FORLIN, L.; LARSSON, D. G. J.; Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Pharmaceutical Industry Effluent Diluted 1:500 Affects Global Gene Expression, Cytochrome P450 1A Activity, and Plasma Phosphate in Fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 28, n. 12, p.2639–2647, 2009.

HALLING-SØRENSEN, B.; NIELSEN, S. N.; LANZKY, P. F.; INGERSLEV, F.; LUTZHEFT, H. C. H.; JØRGENSEN S.E.; Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. *Chemosphere*, v. 36, n.2, p. 357-393, 1998.

HAWKSHEAD III, J.J., Hospital wastewater containing pharmaceutically active compounds and drug-resistant organisms: a source of environmental toxicity and increased antibiotic resistance. *Journal of Residuals Science & Technology*. 5 (2), 51e60, 2008.

HEINLAAN M.; IVASK A., BLINOVA I., DUBOURGUIER H.C., KAHRU A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*; v. 71, p.1308–1316, 2008.

HIRSCH, R.; TERNES, T.; HABERER, K.; KRATZ, K. L.; Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *The Science of the Total Environment* 225 (1-2), 109-118, 1999.

HOFMANN, J.; FREIER, U.; WECKES, M.; HOHMANN, S.; Degradation of diclofenac in water by heterogeneous catalytic oxidation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Applied Catalysis B* 70, 447, 2007.

HOMLOK, R.; TAKACS, E. WOJNAROVITS, L.; Radiolytic degradation of 2,4-ichlorophenoxyacetic acid in dilute aqueous solution: pH dependence. *Journal of Radio analytical and Nuclear Chemistry* 284:415–9, 2010.

HÖRSING, M.; KOSJEK, T.; ANDERSEN, H.; HEATH, E.; LEDIN, A.; Fate of citalopram during water treatment with O<sub>3</sub>, ClO<sub>2</sub>, UV and Fenton oxidation. *Chemosphere* 89, p 129-135, 2012.

INGERSLEV, F.; HALLING-SØRENSEN, B.; Biodegradability of metronidazole, olaquinox, and tylosin, and formation of tylosin degradation products in aerobic soil/manure slurries. *Ecotoxicology Environmental Safety* 48, 311–320, 2001.

INGERSLEV, F.; TORÄNG, L.; LOKE, M.L.; HALLING-SØRENSEN, B.; NYHOLM, N.; Primary biodegradation of veterinary antibiotics in aerobic and anaerobic surface water simulation systems. *Chemosphere* 44, 865–872, 2001.

JEAN, J.; PERRODIN, Y.; PIVOT, C.; TREPO, D.; PERRAUD, M.; DROGUET, J.; TISSOT-GUERRAZ, F.; LOCHER, F.; Identification and prioritization of bioaccumulable pharmaceutical substances discharged in hospital effluents. *Journal of Environmental Management*, Volume 103, 30 July, Pages 113–121, 2012.

JELIC, A.; GROS, M.; GINEBRED, A.; CESPEDES-SÁNCHEZ, R.; VENTURA, F.; PETROVIC, M.; BARCELO, D. Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment, *Water Research* 45 , pp. 1165–1176, 2011.

JIA, A.; WAN, Y.; XIAO, Y.; HU, J.; Occurrence and fate of quinolone and fluoroquinolone antibiotics in a municipal sewage treatment plant. *Water Research* 46, pp. 387–394, 2012.

JOSS, A.; KELLER, E.; ALDER, A.C.; GOBEL, A.; MCARDELL, C. S.; TERNES, T.; SIEGRIST, H.; Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water Research* 39 (14), 3139 e 3152, 2005.

JUNG, Y. J.; KIM, W. G.; YOON, Y.; KANG, J.; HONG, Y. M.; KIM, H. W.; Removal of amoxicillin by UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> processes. *Science of the Total Environment* 420, p160–167, 2012.

KAISER, K.; Correlations of *Vibrio fischeri* bacteria test data with bioassay data of other organisms. *Environmental Health Perspectives Supplements*. v. 106, n. 2, p.583-591, 1998.

KAISER, K; MCKINNON, M.; FORT, F.; Interspecies toxicity correlations of rat, mouse and *Photobacterium phosphoreum*. *Environmental toxicity and chemistry*, v.13, p. 1599-1606, 1994.

KAISER, K; PALAPRICA, V.; *Photobacterium phosphoreum* toxicity data index. *Water Pollution Research Journal of Canada*, v.26, n. 3, p.363-431, 1991.

KANG, Y. W.; HWANG, K.; Effects of reaction conditions on the oxidation efficiency in the Fenton process. *Water Research*, v.34, n.10, p.2786-2790, 2000.

KIM, N. R.; LIM, J. S.; HONG, S.; KIM, S. W.; Optimization of feed conditions in a 2.5-l fed batch culture using rice oil to improve cephalosporin C production by *C. acremonium* M25. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v 21, no. 5, p. 787-789, 2005.

KIM, Y.; CHOI, K.; JUNG, J.; PARK, S.; KIM, P.; PARK, J. Aquatic toxicity of cetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. *Environment International*, v.33, p.370–375, 2007.

KÜMMERER, K. Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 52, p.5-7, 2003.

KÜMMERER, K.; AL-AHMAD, A.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere* 40 (7), p 701-710, 2000.

KÜMMERER, K.; Pharmaceuticals in the Environment, Ed.2nd ed.; *Springer-Verlag*, New York, 2004.

KUMPEL, T.; ALEXY, R.; KÜMMERER, K.; What do we know about antibiotics in the environment? Pharmaceuticals in the Environment - Sources, Fate, Effects and Risks. *Springer Verlag*, Heidelberg, Germany, p. 67–76, 2001.

KUNGOLOS, A. et al. Toxic properties of metals and organotin compounds and their interactions on *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 4, p.101–110, 2004.

KÜSTER, E.; DORUSCH, F.; ALTENBURGER, R. Effects of hydrogen sulfide to *Vibrio fischeri*, *Scenedesmus Vacuolatus* and *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 24, n.10, p. 2621–2629, 2005.

LAJEUNESSE, A.; SMYTH, S. A.; BARCLAY, K.; SAUVE', S.; GAGNON, C.; Distribution of antidepressant residues in wastewater and biosolids following different

- treatment processes by municipal wastewater treatment plants in Canada. *Water Research* 46, p 5600-5612, 2012.
- LARCHER, S.; DELBÈS, G.; ROBAIRE, B.; YARGEAU, V.; Degradation of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol by ozonation — Identification of the by-products and assessment of their estrogenicity and toxicity. *Environment International* 39, p 66-72, 2012.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D.L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica. *Worth Publishers*, terceira edição, 2002.
- LE-MINH, N.; KHAN, S. J.; DREWES, J. E.; STUETZ, R. M.; Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes—Review. *Water Research* 44, p 4295 -4323, 2010.
- LI, B.; ZHANG, T.; Mass flows and removal of antibiotics in two municipal wastewater treatment plants, *Chemosphere*, p1284-1289, 2011
- LI, D.; YANG, M.; HU, J.; ZHANG, Y.; CHANG, H.; JIN, F.; Determination of penicillin G and its degradation products in a penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. *Water Research* 42 (1-2), 307-317, 2008.
- LI, K.; YEDILER, A.; YANG, M.; SCHULTE-HOSTEDE, S.; WONG, M.H.; Ozonation of oxytetracycline and toxicological assessment of its oxidation by-products. *Chemosphere* 72, 473–478, 2008.
- LI, W.; NANABOINA, V.; ZHOU, Q.; KORSHIN, G. V.; Effects of Fenton treatment on the properties of effluent organic matter and their relationships with the degradation of pharmaceuticals and personal care products. *Water Research* 46, p 403-412, 2012.
- LINDBERG, R.; OLOFSSON, U.; RENDAHL, O.; TYSKLIND, M.; ANDERSSON, B. A. V.; Behavior of fluoroquinolones and trimethoprim during mechanical, chemical, and active sludge treatment of sewage water and digestion of sludge. *Environmental Science Technology* 40 (3), p1042-1048, 2006.
- LINDBERG, R.H.; WENNBERG, P.; JOHANSSON, M.I.; TYSKLIND, M.; ANDERSSON, B.A.V.; Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in five sewage treatment plants in Sweden. *Environmental Science & Technology* 39 (10), 3421-3429, 2005.
- LIU, C.; NANABOINA, V.; KORSHIN, G. V.; JIANG, W. Spectroscopic study of degradation products of ciprofloxacin, norfloxacin and lomefloxacin formed in ozonated wastewater. *Water Research*, v.46, p. 5235-5246, 2012.
- LIU, C.; NANABOINA, V.; KORSHIN, G.; Spectroscopic study of the degradation of antibiotics and the generation of representative Ef OM oxidation products in ozonized wastewater. *Chemosphere* 86, p. 774-782, 2012.
- LÖFFLER, D.; OMBKE, J. R.; MELLER, M.; TERNES, T. A.; Environmental fate of pharmaceuticals in water/sediment systems, *Environmental Science Technology*. 39, (14) 5209–5218, 2005.

LOHMANN, W.; KARST, U.; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 391, 79, 2008.

MACKEN, A. A test battery approach to the ecotoxicological valuation of cadmium and copper employing a battery of marine bioassays. *Ecotoxicology*, v.18, p.470–480, 2009.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S.; A ecotoxicologia como ferramenta para o biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia brasiliensis*.v.13, n.3, p.355-381, 2008.

MANFRA, L. et al. Metal Content and Toxicity of Produced Formation Water (PFW): Study of the Possible Effects of the Discharge on Marine Environment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, v.53, p.183–190, 2007.

MANSUY, D.; BATTIONI, P.; BATTIONI, J. P.; “Chemical model systems for drug-metabolizing cytochrome-P450-dependent monooxygenases”. *European Journal of Biochemistry* 184 (2), p. 267-285, 1989.

MANSUY, D.; BATTIONI, P.; BATTIONI, J. P.; “Chemical model systems for drug-metabolizing cytochrome-P-450-dependent monooxygenases *European Journal of Biochemistry* 184 (2), p. 267-285, 1989.

MANSUY, D.; Biocatalysis and substrate chemodiversity: Adaptation of aerobic living organisms to their chemical environment. *Catalysis Today*, V. 138, Issues 1-2, 15 October, p 2-8, 2008.

MARKMAN, B. E. O.; KOSCHTSCHAK, M. R. W.; YANO, H. M.; Determinação de quinolonas por cromatografia líquida de alta eficiência empregando coluna monolítica de fase reversa. *Instituto Adolfo Lutz*. 64(1):35-9, 2005.

MARQUES, C. R. et al. Ecotoxicological effects of MIKADO and VIPER on *Algae* and *Daphnids*. *Environmental Toxicology*, Março 2011.

MARTÍN, J.; CAMACHO-MUÑOZ, M. A.; SANTOS, J. L.; APARICIO, I.; ALONSO, E.; Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants: removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal. *Journal of Hazardous Materials*, 239–340, pp. 40–47, 2012a.

MARTÍN, J.; CAMACHO-MUÑOZ, M. A.; SANTOS, J. L.; APARICIO, I.; ALONSO, E.; Distribution and temporal evolution of pharmaceutically active compounds alongside sewage sludge treatment. Risk assessment of sludge application onto soils. *Journal of Environmental Management*, 102, pp. 18–25, 2012b.

MARTINEZ, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*, v. 157, p.2893–2902, 2009.

MASCOLO, G.; BALEST, L.; CASSANO, D.; LAERA, G.; LOPEZ, A.; POLLICE, A.; SALERNO, C.; Biodegradability of pharmaceutical industrial wastewater and formation of recalcitrant organic compounds during aerobic biological treatment. *Bioresource Technology* 101, p2585–2591, 2010.

MASUMOTO, H.; TAKEUCHI, K.; OHTA, S.; HIROBE, M.; “Application of chemical P450 model systems to studies on drug metabolism. Phencyclidine: a multi-functional model substrate”, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37 (7), p.1788-1794, 1989.

MBOULA, V. M.; HEQUET, V.; GRU, Y.; COLIN, R.; ANDRÈS, Y.; Assessment of the efficiency of photocatalysis on tetracycline biodegradation. *Journal of Hazardous Materials*, 209–210, p 355–364, 2012.

MELO, S. A. S.; TROVÓ, A. G.; BAUTITZ, I. R.; NOGUEIRA, R. F. P.; Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados, *Química Nova*, Vol. 32, No. 1, 188-197, 2009.

MERİÇ, S.; SELÇUK, H.; BELGIORNO, V.; Acute toxicity removal in textile finishing wastewater by Fenton's oxidation, ozone and coagulation–flocculation processes. *Water Research*, v.39, p.1147–1153, 2005.

MEUNIER, B.; BERNADOU, J.; *Topics in Catalysis*, 21, 47, 2002.

MEUNIER, B.; Metalloporphyrins as versatile catalysts for oxidation reactions and oxidative DNA cleavage, *Chemical Reviews*, 92 (6), p 1411-1456, 1992.

MEUNIER, B.; VISSER, S. L. P.; SHAIK, S.; Mechanism of Oxidation Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 Enzymes. *Chemical Reviews*, 104, 3947-3980, 2004.

MOHAPATRA, D.P.; BRARA, S.K.; TYAGIA, R.D.; PICARDB, P.; RAMPALLIC, R.Y.; A comparative study of ultrasonication, Fenton's oxidation and ferro-sonication treatment for degradation of carbamazepine from wastewater and toxicity test by Yeast Estrogen Screen (YES) assay. *Science of The Total Environment*, Volume 447, p 280-285, 2013.

Monografia “Sulfato de Gentamicina”, *Farmacopeia Portuguesa VIII*, vol. 2, Lisboa, 2005, pp. 2964-2966.

Monograph “Gentamicin Sulphate” 01/2005:0331 corrected, *European Pharmacopeia*, 5th Ed., European Department for the Quality of Medicines, Strasbourg, France, pp. 1653-1654, 2005.

MONTEIRO, J. G.; BRANDÃO, F.; OSSWALD, W.; GUIMARÃES, S.; Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas, 4ª Edição, Porto Editora, Porto, p 863-871, 2001.

MUNKITTRICK, K.; POWER, E.; SERGY, G. The relative sensitive oh Microtox, daphnid, rainbow trout and fathead minnow acute lethality test. *Toxicity Assays*, v.6, p. 35-62, 1991

MUROV, S. L.; *Handbook of Photochemistry*, New York: Marcel Dekker, p 119, 1973.

NAGARNAIK, P. M., BATT, A. L., BOULANGER, B.; Healthcare facility effluents as point sources of select pharmaceuticals to municipal wastewater. *Water Environmental Research* 84 (4), 339 e 345, 2012.

NASCIMENTO, E.; SILVA, G. F.; CAETANO, F. A.; FERNANDES, M. A. M.; SILVA, D. C.; CARVALHO, M. E. M. D.; PERNAUL, J. M.; REBOUÇAS, J. S.; IDEMORI, Y. M.

Partially and fully beta-brominated Mn-porphyrins in P450 biomimetic systems: Effects of the degree of bromination on electrochemical and catalytic properties. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 99, n. 5, p. 1193-1204, 2005.

NEVES, C. M. B.; SIMÕES, M. M. Q.; DOMINGUES, M. R. M.; SANTOS, I. C. M. S.; NEVES, M. G. P. M. S.; Paz, F. A. A.; SILVA, A. M. S.; CAVALEIRO, J. A. S.; Oxidation of diclofenac catalyzed by manganese porphyrins: synthesis of novel diclofenac derivatives. *Royal Society of Chemistry Advances*, 2, p7427–7438, 2012.

NEYENS, E.; BAEYENS, J.; “A review of classic Fenton’s peroxidations as an advanced oxidation technique”, *Journal of Hazardous Materials*, v. 98, pp. 33-50, 2003.

NOGUEIRA, R. F. P.; OLIVEIRA, M. C.; PATERLINI, W. C.; Simple and fast spectrophotometric determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in photo-Fenton reactions using metavanadate. *Talanta* 66, 86-91, 2005.

Nota Técnica N° 1/2010: Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes. Outubro, 2010.

NUÑEZ, H. C.; El citocromo p450 y su rol en la hepatotoxicidad inducida por las drogas. *Clínica Vitarte*, Volumen 2 - Número 2, 1999.

OECD. Detailed review paper on biodegradability testing environment monograph N° 98, 1995.

Official Monograph “Gentamicin Sulfate”, United States Pharmacopeia 28/National Formulary 23, *United States Pharmacopeial Convention*, Inc., Rockville, MD, pp. 895-896, 2005.

OLIPHANT, C. M.; PHARM, D.; GARY, M.; GREEN, M.D.; Quinolones: A Comprehensive Review. *American Family Physician*, vol. 65, Number 3, p. 455 -465, 2002.

OLLER, I.; MALATO, S.; SÁNCHEZ-PÉREZ, J. A. Combination of Advanced Oxidation

Processes and biological treatments for wastewater de contamination - A review. *Science of the Total Environment*, v. 409, p. 4141–66, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. *Overcoming Antibiotic Resistance*, *World Health Organization Report in Infectious Diseases*. OMS, Geneva. 2000.

OROZCO, A.M. F.; LOBO, C. C.; CONTRERAS, E. M.; ZARITZKY, N. E.; Biodegradation of bisphenol-A (BPA) in activated sludge batch reactors: Analysis of the acclimation process. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v85, november, p392–399, 2013.

ORT, C.; LAWRENCE, M. G.; RIECKERMANN, J.; JOSS, A.; Sampling for pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and illicit drugs in wastewater systems: are your conclusions valid? A critical review. *Environmental Science Technology*, 44, pp. 6024–6035, 2010.

PARSHIKOV, I. A.; HEINZE, T. M.; MOODY, J. D.; FREEMAN, J. P.; WILLIAMS, A. J.; SUTHERLAND, J. B.; The fungus *Pestalotiopsis quepini* as a model for the biotransformation of ciprofloxacin and norfloxacin. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56, p 474-477, 2001.

PADILHA, T.; Resistência antimicrobiana x produção animal: uma discussão internacional. Embrapa, "LABEX", Estados Unidos, Jul. 2000. Disponível em < [www.dipemar.com.br/carne/309/materia\\_arttec\\_carne.htm](http://www.dipemar.com.br/carne/309/materia_arttec_carne.htm) > acesso em 12/04/2011;

PALMA, P. et al. Acute Toxicity of Atrazine, Endosulfan Sulphate and Chlorpyrifos to *Vibrio fischeri*, *Thamnocephalus platyurus* and *Daphnia magna*, Relative to Their Concentrations in Surface Waters from the Alentejo Region of Portugal. *Bull Environ Contam Toxicol*, v.81, p.485–489, 2008.

PARK, G. S. et al. Ecotoxicological Evaluation of Sewage Sludge Using Bioluminescent Marine Bacteria and Rotifer. *Ocean Science Journal*, v. 40, N. 2, p.91-100, 2005.

PAUTET, F.; BARRET, R.; DAUDON, M.; "Optimization of biomimetic oxidation reactions achieved with the aid of an iodosylbenzene and meso-tetraphenylporphyrinatoiron (III): application to antergan", *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 64, p.140-144, 1988.

PÉREZ-MOYA, M.; GRAELLS, M.; CASTELLS, G.; AMIGO, J.; ORTEGA, E.; BUHIGAS, G.; PÉREZ, L.; MANSILLA, H. Characterization of the degradation performance of the sulfamethazine antibiotic by photo-Fenton process. *Water Research*, v.44, p 2533–2540, 2010.

POOLE, A. J.; "Treatment of biorefractory organic compounds in wool scour effluent by hydroxyl radical oxidation." *Water Research* 38 (14-15),p 3458-3464, 2004.

PRIETO, A.; MÖDER, M.; RODIL, R.; ADRIAN, L.; MARCO-URREA, E.; Degradation of the antibiotics norfloxacin and ciprofloxacin by a white-rot fungus and identification of degradation products, *Bioresource Technology* 102, p.10987-10995, 211.

PYÖRÄLÄ, S.; BAPTISTE, K. E.; CATRY, B.; VAN DUIJKEREN, E.; GREKO, C.; MORENO, M. A.; POMBA M. C. M. F.; RANTALA, M.; RUŽAUSKAS, M.; SANDERS, P.; THRELFALL, E. J.; TORREN-EDO, J.; TÖRNEK, K.; Macrolides and lincosamides in cattle and pigs: Use and development of antimicrobial resistance. *The Veterinary Journal* 200, p230-239, 2014.

QUERO-PASTOR, M.; VALENZUELA, A.; QUIROGA, J. M.; ACEVEDO, A.; Degradation of drugs in water with advanced oxidation processes and ozone. *Journal of Environmental Management* 137,p 197 e 203, 2014.

QUINN, B.; GAGNÉ, F.; BLAISE, C.; The effects of pharmaceuticals on the regeneration of the cnidarian, *Hydra attenuate*. *Science of The Total Environment*, v. 402, p. 62-69, 2008.

RAND, G. M. & S.R. PETROCELLI. *Fundamental of aquatic toxicology*. Hemisphere Publishing Corporation, Washington. p 666, 1985.

RASGALLA JR. C.; NOLDIN, J. A.; SANTOS, A. L.; SATO, G.; EBERHARDT, D. S.; Toxicidade aguda de herbicidas e inseticidas utilizados na cultura de arroz irrigado sobre juvenis de carpas (*Cyprinus carpio*). *Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 12, p. 59-68, 2002.

REBOUÇAS, J. S.; SPASOJEVIC, I.; BATINIC-HABERLE, I.; Pure manganese (III) 5,10,15,20-tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin (MnTBAP) is not a superoxide dismutase mimic in aqueous systems: a case of structure-activity relationship as a watchdog mechanism in experimental therapeutics and biology. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, v. 13, n. 2, p. 289-302, fev. 2008.

REUBEN, B. G.; The consumption and production of pharmaceuticals. *CHAPTER 45*, p 894-921, 2008.

RITTLE, J.; M. T. GREEN. Cytochrome P450 compound I: capture, characterization, and C-H bond activation kinetics, *Science* 330, 933, 2010.

RIVAS, F. J.; GIMENO, O. T.; CARBAJO, B. M.; UV-C radiation based methods for aqueous metoprolol elimination. *Journal of Hazardous Materials* 179, 357–362, 2010.

ROWLAND, P.; BLANEY, F. E.; SMYTH, M. G.; JONES, J. J.; LEYDON, V. R.; OXBROW, A. K.; LEWIS, C. J.; TENNANT, M. G.; MODI, S.; EGGLESTON, D. S.; CHENERY, R. J.; BRIDGES, A. M. Crystal Structure of Human Cytochrome P450 2D6, *The Journal of Biological Chemistry*, V. 281(11), pp. 7614–7622, March 17, 2006

RUTSCH, M.; Towards a better understanding of sewer exfiltration. *Water Research* 42, p. 2385, 2008.

SANTOS, L. V. S.; TEIXEIRA, D. C.; JACOB, R. S.; AMARAL, M. C. S., LANGE, L. C.; Evaluation of the aerobic and anaerobic biodegradability of the antibiotic norfloxacin. *Water Science & Technology*. V.70-2, p.265-271, 2014.

SANTOS, N. Q.; A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. *Texto e contexto - enfermagem*, vol.13, n.esp, p. 64-70, 2004.

SAPKOTA, A., SAPKOTA, A.R., KUCHARSKI, M., BURKE, J., MCKENZIE, S., WALKER, P., LAWRENCE, R., Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities. *Environment International* 34, 1215–1226, 2008.

SILVA, D. C. Metaloporfirinas deficientes em elétrons: síntese e catálise biomimética, 192 f. Tese (Doutorado em Ciências - Química) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

SILVA, F. C.; Estudo fitoquímico de galhos e raízes de maytenus gonoclada (celastraceae), obtenção de derivados do lupeol e avaliação de atividades biológicas. Tese (Doutorado em Ciências Química) - Departamento de química da Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

SILVA, J. M. B.; HOLLENBACH, C. B.; Fluoroquinolonas X Resistência Bacteriana na Medicina Veterinária - Artigo de Revisão. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.77, n.2, p.363-369, abr./jun., 2010.

SILVA, M. A. R. ; Environmental impact of industrial sludge stabilization/solidification products: Chemical or ecotoxicological hazard evaluation? *Journal Hazardous Materials*, v.192, n.3, p.1108-1113, 2011.

SILVA, V. S.; TEIXEIRA, L. I.; NASCIMENTO, E.; IDEMORI, Y. M.; DE FREITAS SILVA, G. New manganese porphyrin as biomimetic catalyst of cyclohexane oxidation: Effect of water or imidazole as additives. *Applied Catalysis A: General*, v. 469, p. 124-131, 2014.

SISAMÓN, I.; Acerca de la hepatotoxicidad del paracetamol Revista del Hospital Privado de Comunidad , vol 6, nº 2, 2003.

SONG,W.; COOPER,W.J.; MEZYK,S.P.; GREAVES,J.; PEAKE,B.; *Environmental Science & Technology* 42, p1256, 2008.

STACKELBERG,P.E.; FURLONG, E.T.; MEYER, M.T. ZAUGG; S.D.; HENDERSON; A.K., REISSMAN, D.B.; Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. *Science Total Environment*, 329, 2004.

STEAD, D. A.; Current methodologies for the analysis of aminoglycosides, *Journal of Chromatography B*, 747, p 69-93, 2000.

TAMBOSI, J. L. Remoção de fármacos e avaliação de seus produtos de degradação através de tecnologias avançadas de tratamento. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

TERNES, T. A.; “Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers”, *Water Research*, Vol. 32, No. 11, pp. 3245-3260, 1998.

TERNES, T. A.; JOSS, A.; SIEGRIST, H.; “Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment”, *Environmental Science and Technology*, Vol. 38, pp. 392A-399A, 2004.

TERNES, T.; KORMOS, J.; SCHULZ M. Occurrence and fate of pharmaceuticals in the environment. Abstracts / Toxicology Letters, Symposium 11: *Environmental Risk Assessment for Human Pharmaceuticals*, Germany, 2009.

TERNES, T.; MEISENHEIMER, M.; MCDOWELL, D.; SACHER, F.; BRAUCH. HJ.; HAIST-GULDE, B.; PREUSS, G.; WILME, U.; ZULEI-SEIBERT, N.; Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. *Environment Science Technology* 36, p 3855-63, 2002.

THIELE-BRUHN, S.; Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*.166, 145–167, 2003.

THOMAS, G.; Química Medicinal - Uma introdução. Editora Guanabara Koogan, 2002.

TRAYLOR, P. S.; DOLPHIN, D.; TRAYLOR, T. G.; *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 279, 1984.

TROVÓ, A. G. ;NOGUEIRA, R. F. P.; FERNANDEZ-ALBA, A. R.; MALATO,S.; Paracetamol degradation intermediates and toxicity during photo-Fenton treatment using different iron species, *Water Research* 46, p 5374-5380, 2012.

VALCÁRCEL, Y.; MARTÍNEZ,F.; GONZÁLEZ-ALONSO,S.; SEGURA, Y.; CATALÁ,M.; MOLINA, R.; MONTERO-RUBIO, J.C.; MASTROIANNI, N.; LÓPEZ DE ALDA, M.; POSTIGO, C.; BARCELÓ, D.; Drugs of abuse in surface and tap waters of the Tagus River basin: Heterogeneous photo-Fenton process is effective in their degradation. *Environment International* 41, p 35-43, 2012.

VALDEZA,H.C. A.; JIMÉNEZA,G. G.; GRANADOSA, G.; LEÓN,C. P.;. Degradation of paracetamol by advance oxidation processes using modified reticulated vitreous carbon electrodes with TiO<sub>2</sub> and CuO/TiO<sub>2</sub>/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *Chemosphere*,v117, December, p 447–454, 2014.

VASQUEZ, M.I.; LAMBRIANIDES, A.; SCHNEIDER, M.; KÜMMERER,K.;FATTA-KASSINOS, D.; Environmental side effects of pharmaceutical cocktails: What we know and what we should know. *Journal of Hazardous Materials* 279,169–189, 2014.

VOGNA, D.; MAROTTA, R.; ANDREOZZI, R.; NAPOLITANO, A.; D'ISCHIA, M.; Kinetic and chemical assessment of the UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment of antiepileptic drug carbamazepine. *Chemosphere*, 54, 497, 2004a.

VOGNA, D.; MAROTTA, R.; NAPOLITANO, A.; ANDREOZZI, R.; D'ISCHIA, M.; Advanced oxidation of the pharmaceutical drug diclofenac with UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ozone. *Water Research* 38, 414-422, 2004b.

VON NUSSBAUM, F.; BRANDS, M.; HINZEN, B.; WEIGAND, S.; HÄBICH, D.; ANGEW. *Chemosphere, Int. Ed*, 45, 5072, 2006.

WAMMER, K. H.; KORTE, A. R.; LUNDEEN, R. A.; SUNDBERG, J. E.; MCNEILL, K.; ARNOLD, W. A.; Direct photochemistry of three fluoroquinolone antibacterials: Norfloxacin, ofloxacin, and enrofloxacin, *Water Research* 47, 439-448, 2013.

WATKINSON, A. J.; MURBYC, E. J.; COSTANZO, S. D.; Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: implications for environmental discharge and wastewater recycling. *Water Research* 41 (18), 4164-4176, 2007.

WATKINSON, A.J.; MURBYD,E.J.; KOLPINE,D.W.; COSTANZO, S.D.; The occurrence of antibiotics in an urban watershed: from wastewater to drinking water, *Science of the Total Environment* 407, pp. 2711-2723, 2009.

XU, J.; XU, Y.; WANG, H.; GUO, C.; QIU, H.; HE, Y.; ZHANG, Y.; LI, X.; MENG, W.; Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river. *Chemosphere*, 2014.

ZEMBOWER, T. R.; NOSKIN, G. A.; POSTELNICK, M. J.; NGUYEN, C.; PETERSON, L.R.; *International Journal of Antimicrobials Agents* 10,p 95-105, 1998.

ZHAO, I.; WHANG, L.; ZHANG, Z. Quantitative structure-activity relationships. Relationship between toxicity of organic chemicals to fish and to *Photobacterium phosphoreum*. *Chemosphere*, v.26, p.1971-1979, 1993.

ZUCCATO, E.; CASTIGLIONI, S.; FANELLI, R.; Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials* 122 (3), 205-209, 2005.

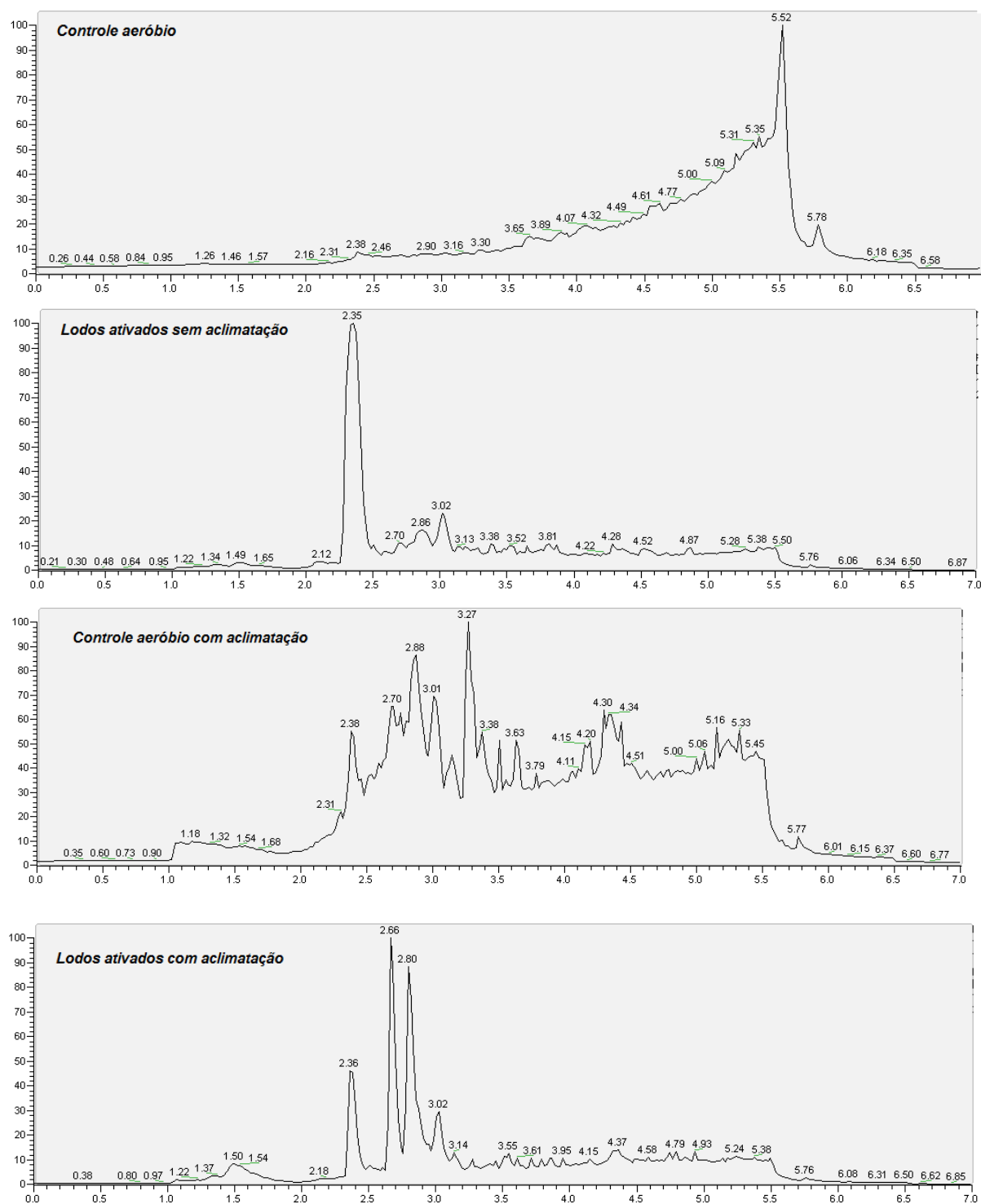
ZWIENER, C. e FRIMMEL, F.H.; Short-term tests with a pilot sewage plant and biofilm reactors for the biological degradation of the pharmaceutical compounds clofibric acid, ibuprofen and diclofenac. *Science Total Environmental* 309, 201-211, 2003.

# Apêndice A

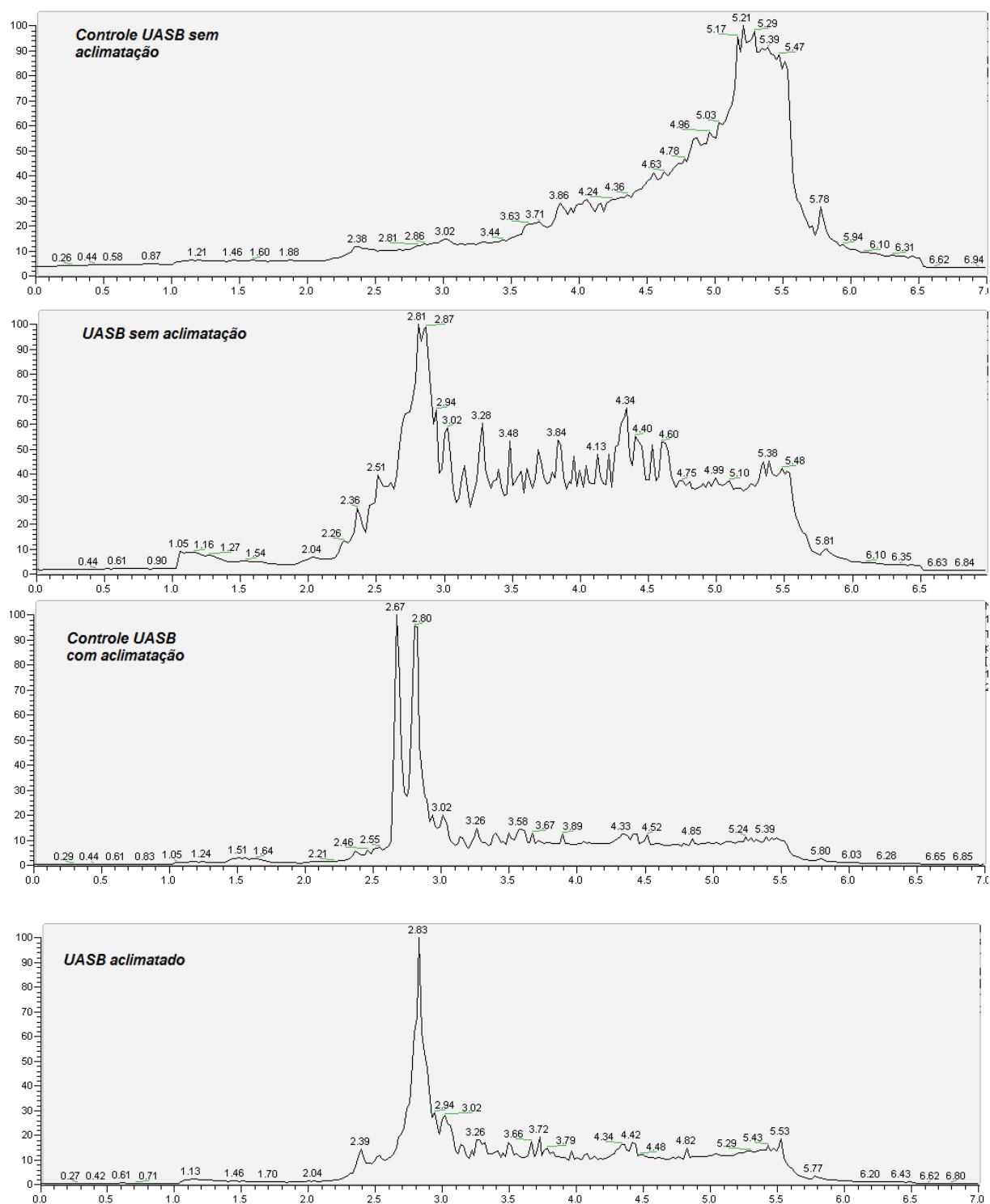
---

Corridas cromatográficas realizadas para o  
antibiótico norfloxacino

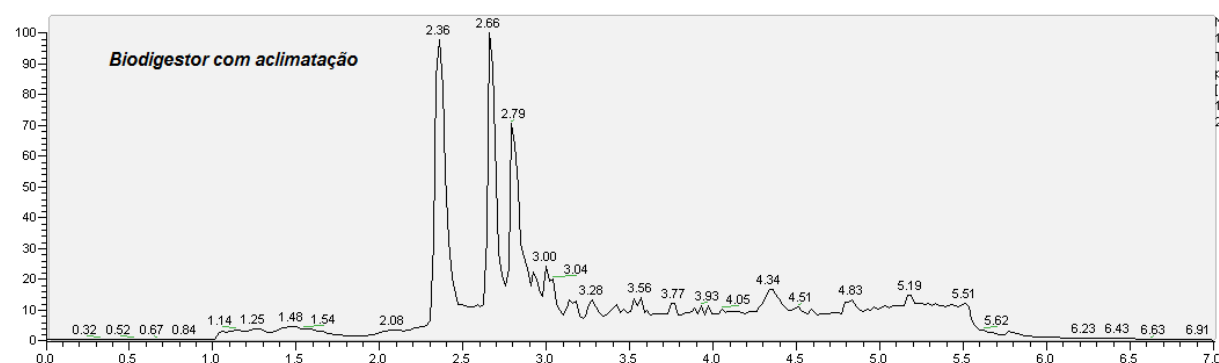
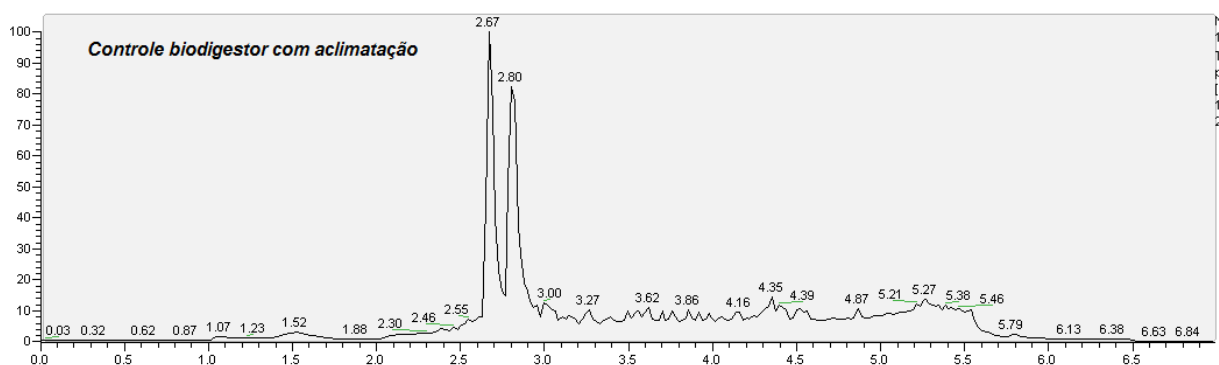
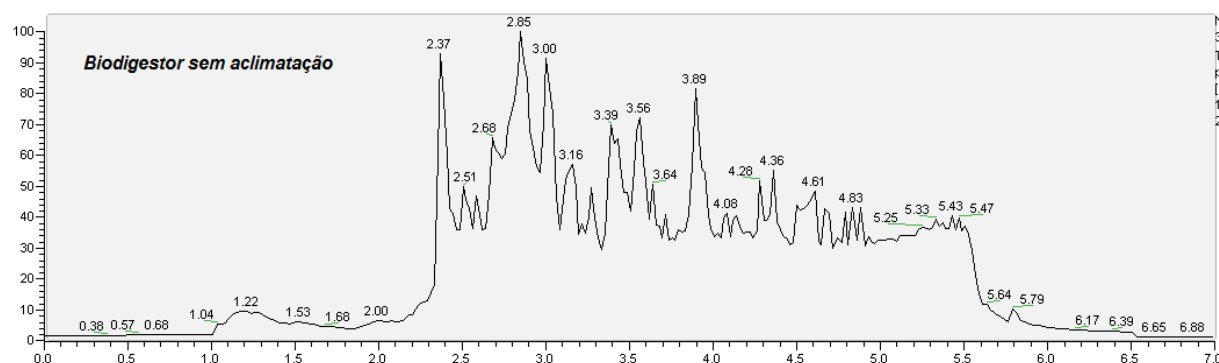
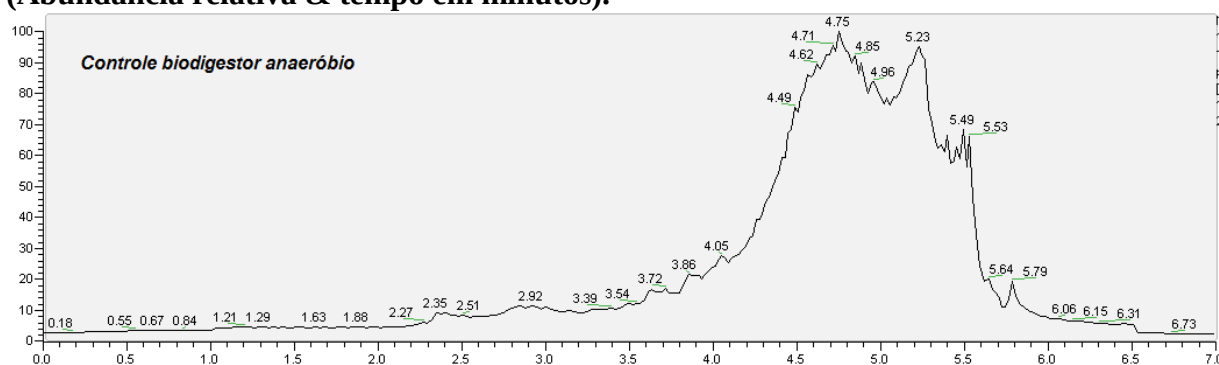
**A.1 Cromatogramas gerados durante a avaliação da biodegradabilidade aeróbia utilizando biomassa advinda de reatores com lodos ativados para o antibiótico norfloxacino. (Abundância relativa & tempo em minutos).**



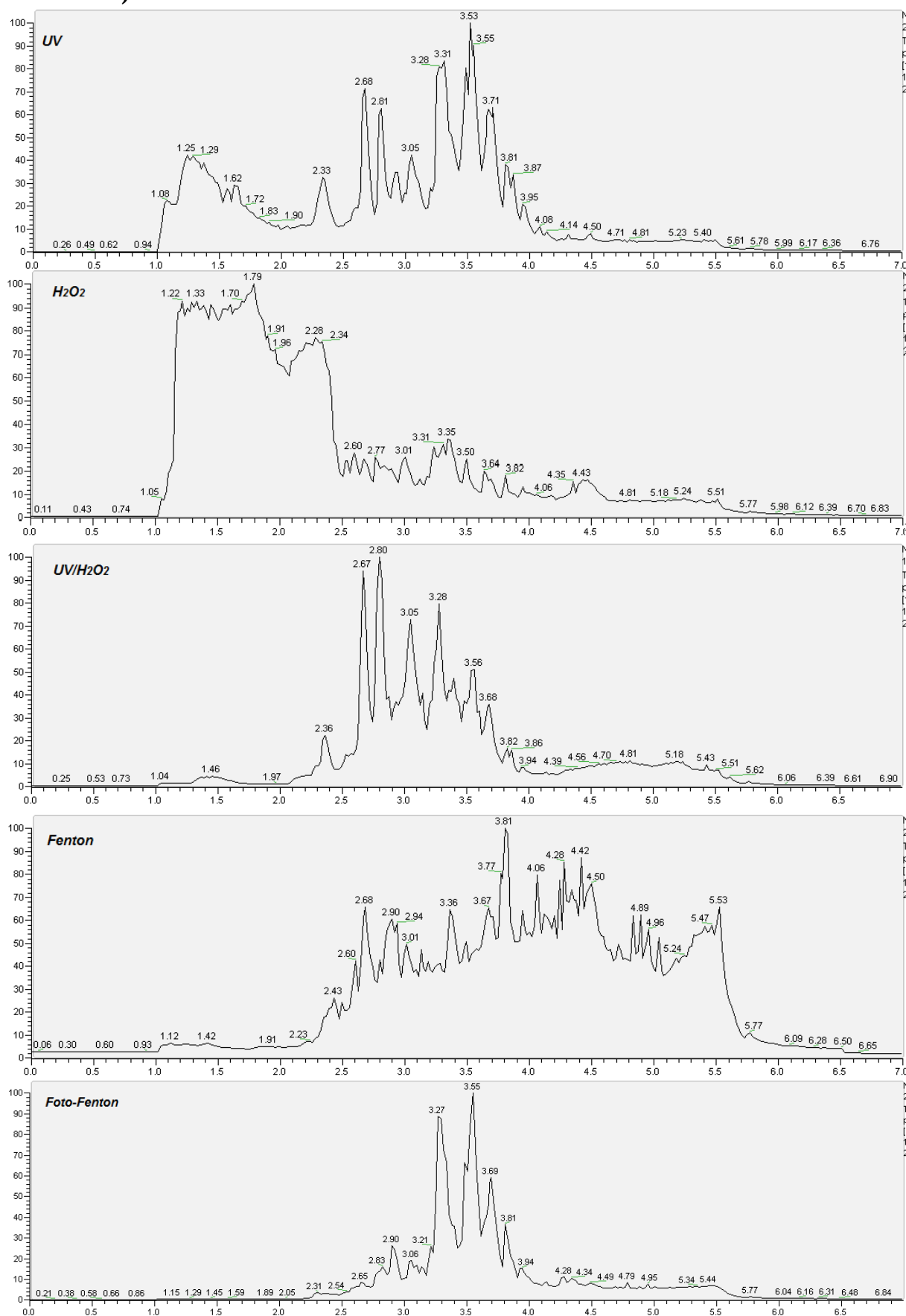
## A.2 Cromatogramas gerados durante a avaliação da biodegradabilidade anaeróbia do antibiótico norfloxacinol utilizando biomassa advinda de reatores UASB. (Abundância relativa & tempo em minutos).



### A.3 Cromatogramas gerados durante a avaliação da biodegradabilidade anaeróbia do antibiótico norfloxacinol utilizando biomassa advinda de biodigestores anaeróbio. (Abundância relativa & tempo em minutos).



#### A.4 Cromatogramas gerados durante a avaliação da degradabilidade do antibiótico norfloxacino utilizando processos oxidativos avançados. (Abundância relativa & tempo em minutos).

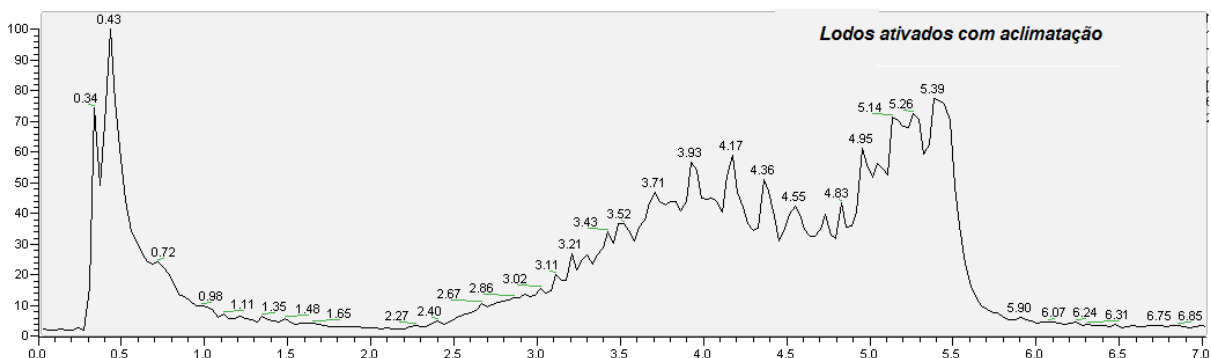
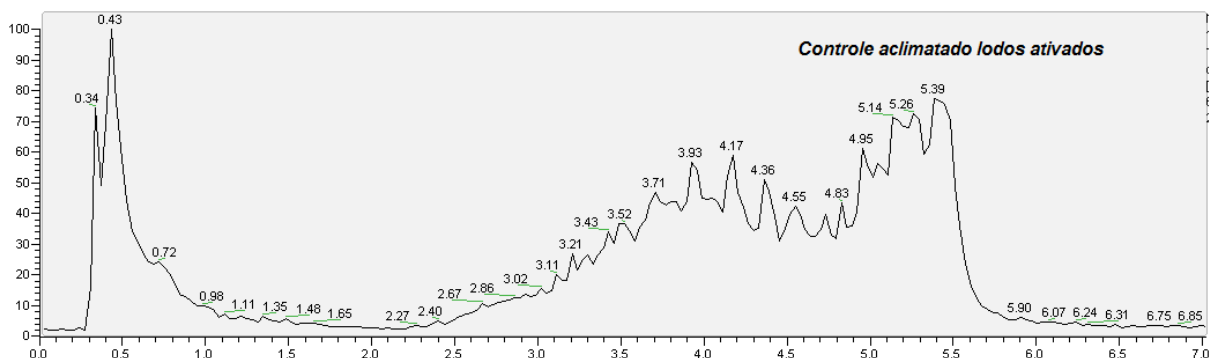
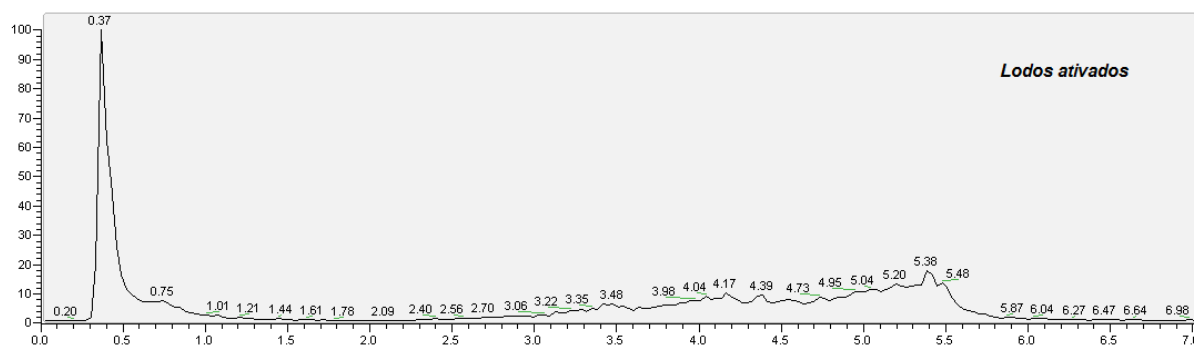
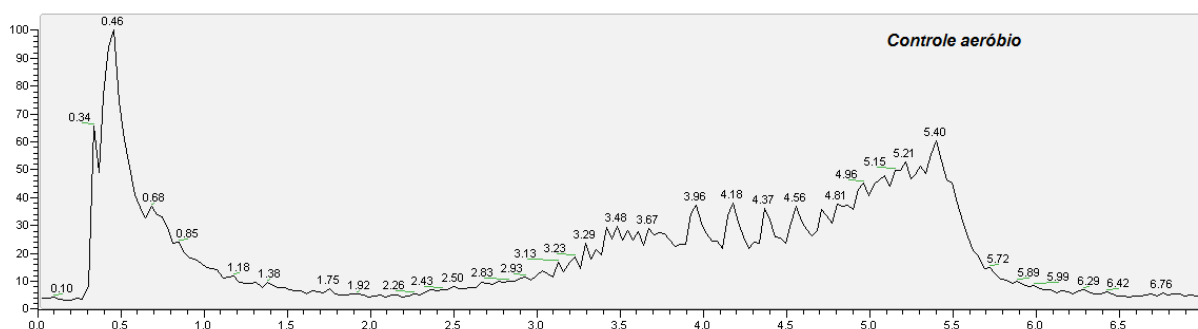


# Apêndice B

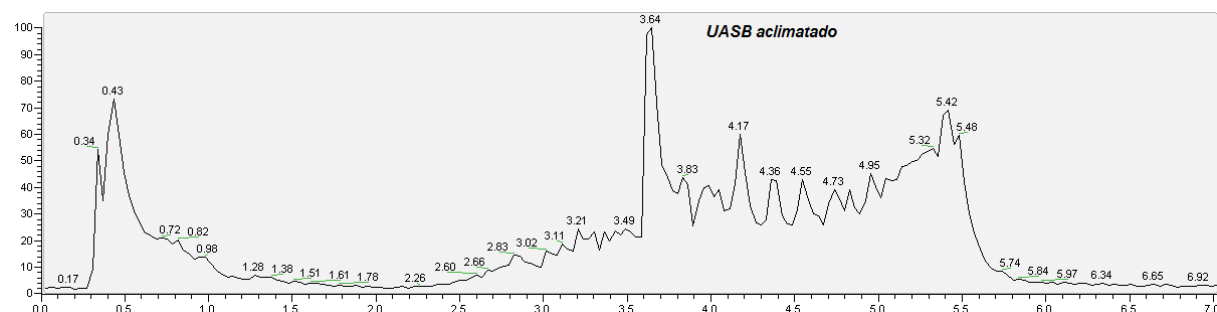
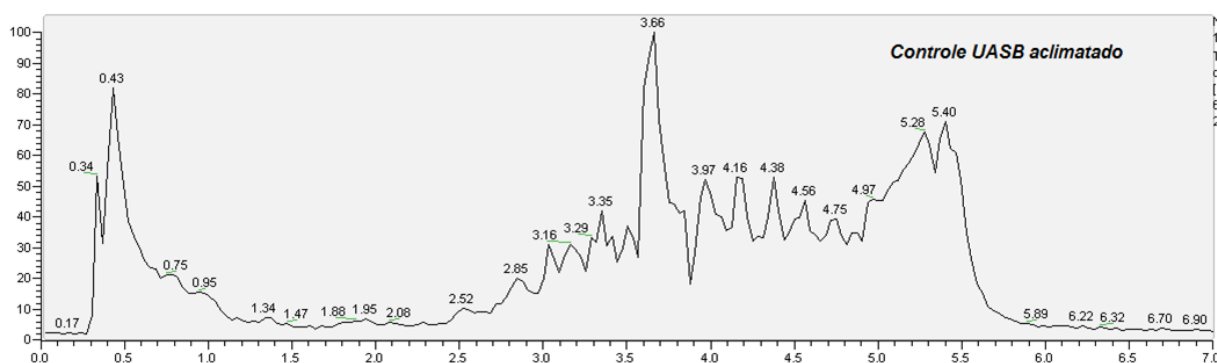
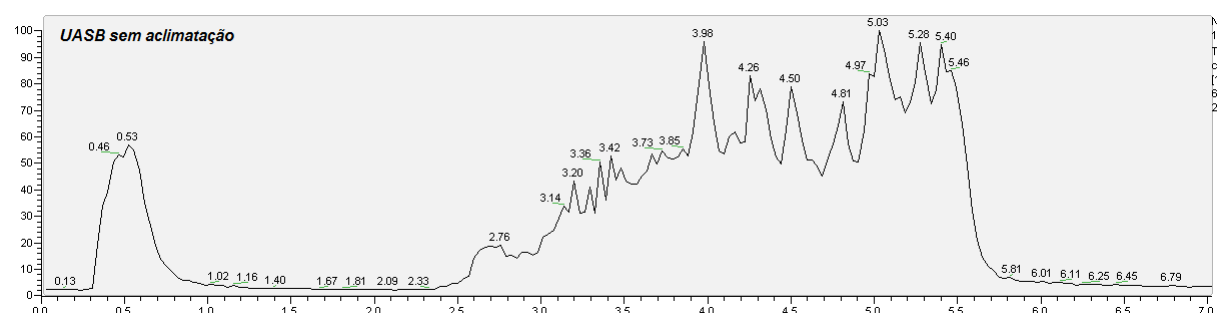
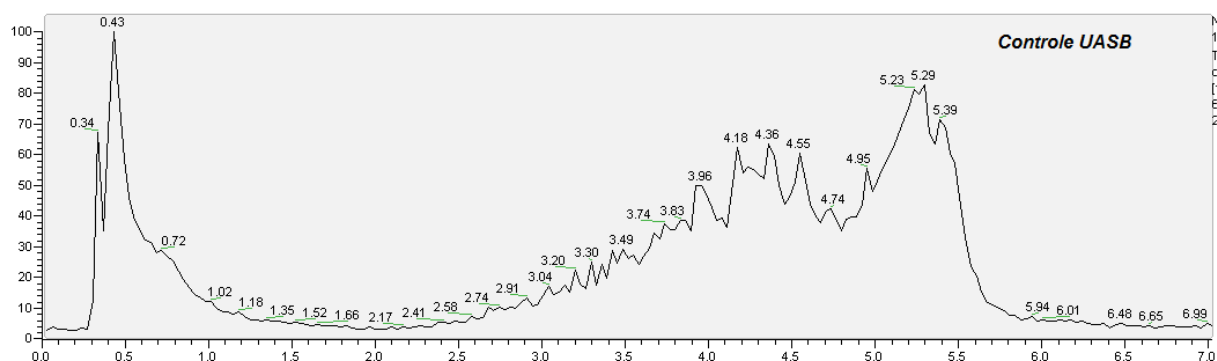
---

Corridas cromatográficas realizadas para o  
antibiótico sulfato de gentamicina

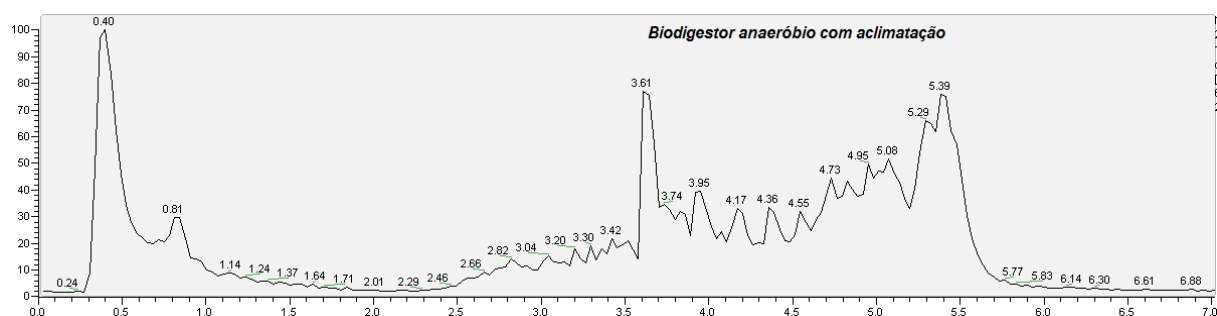
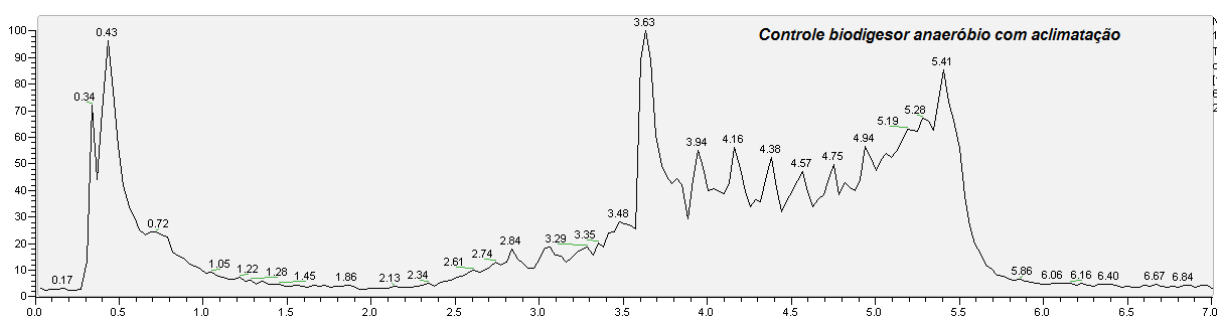
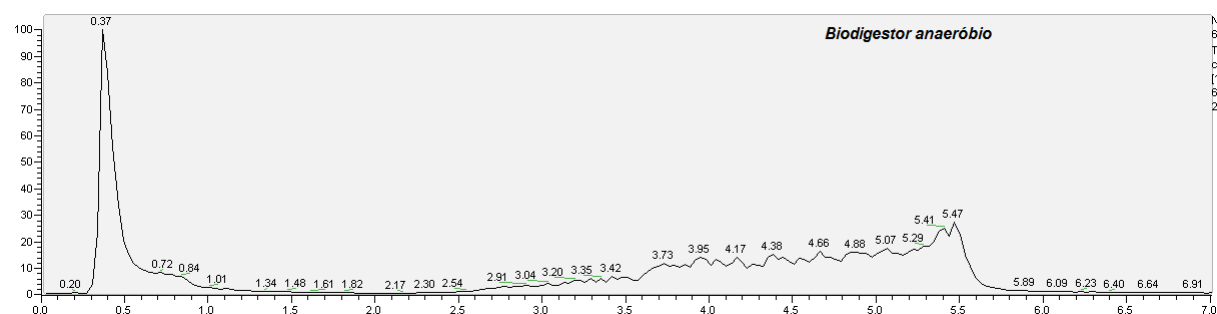
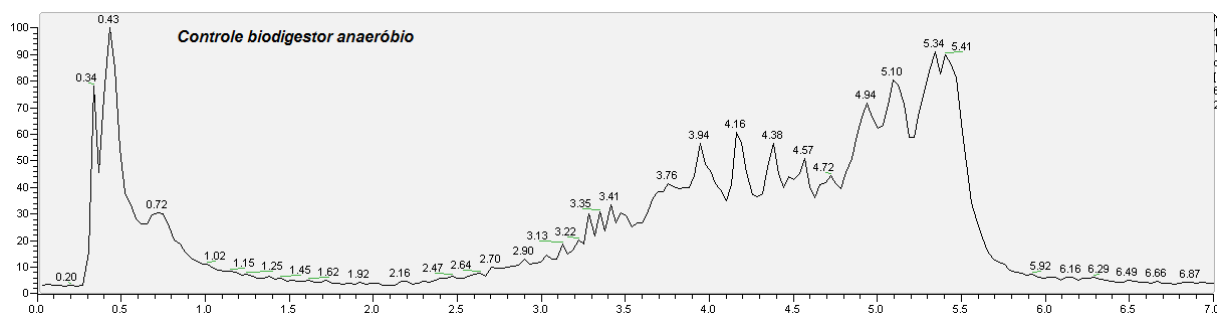
**A.1 Cromatogramas gerados durante a avaliação da biodegradabilidade aeróbia utilizando biomassa advinda de reatores com lodos ativados para o antibiótico sulfato de gentamicina. (Abundância relativa & tempo em minutos).**



## A.2 Cromatogramas gerados durante a avaliação da biodegradabilidade anaeróbia do antibiótico sulfato de gentamicina utilizando biomassa advinda de reatores UASB. (Abundância relativa & tempo em minutos).



#### A.4 Cromatogramas gerados durante a avaliação da biodegradabilidade anaeróbia do antibiótico norfloxacino utilizando biomassa advinda de biodigestores anaeróbio. (Abundância relativa & tempo em minutos).



### A.3 Cromatogramas gerados durante a avaliação da degradabilidade do antibiótico sulfato de gentamicina utilizando processos oxidativos avançados. (Abundância relativa & tempo em minutos).

