



Universidade de Brasília - UnB

Instituto de Química - IQ

**Estudo da degradação dos antibióticos beta-lactâmicos
amoxicilina e ampicilina e avaliação da toxicidade e
biodegradabilidade dos seus produtos.**

Sandra Regina Longhin



COMUNICADO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Tese de Doutorado da aluna Sandra Regina Longhin, intitulada "**Estudo da degradação dos antibióticos beta-lactâmicos amoxicilina e ampicilina e avaliação da toxicidade e biodegradabilidade dos seus produtos**" apresentada no Instituto de Química da Universidade de Brasília em 04 de julho de 2008.

Prof. Dr. Jurandir Rodrigues de Souza
Presidente (IQ – UnB)

Prof. Dr. Marco Antonio Almeida de Souza
Membro Titular (FT – UnB)

Prof.ª Dr.ª Nilce Santos de Melo
Membro Titular (FS – UnB)

Prof. Dr. Wilson de Figueiredo Jardim
Membro Titular (IQ – UFG)

Prof. Dr. José Alves Dias
Membro Titular (IQ – UnB)

Brasília, 04 de julho de 2008.



Universidade de Brasília - UnB

Instituto de Química - IQ

**Estudo da degradação dos antibióticos beta-lactâmicos
amoxicilina e ampicilina e avaliação da toxicidade e
biodegradabilidade dos seus produtos.**

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de Brasília como parte dos
requisitos necessários à obtenção do grau
de Doutor em Química.

Sandra Regina Longhin

Orientador: Prof. Dr. Jurandir Rodrigues de Souza

Brasília, 2008

Aos meus amados filhos,
Tatá e Pedrão,
por amarem uma mãe “virtual”.

Aos meus pais,
Zizo e Cila,
para os quais moral e ética são os verdadeiros valores de um ser humano.

Ao meu inesquecível e amado **Mestre**,
Prof. Mario Tolentino.
(*in memoriam*)

Sonhar

Mais um sonho impossível;

Lutar

Quando é fácil ceder;

Vencer

O inimigo invencível;

Negar

Quando a regra é vender;

Sofrer

A tortura implacável;

Romper

A incabível prisão;

Voar

Num limite improvável;

Tocar

O inacessível chão;

**É minha lei, é minha questão;
Virar esse mundo;
Cravar esse chão;
Não me importa saber;
Se é terrível demais;
Quantas guerras terei que vencer;
Por um pouco de paz;
E amanhã, se esse chão que eu beijei;
For meu leito e perdão;
Vou saber que valeu delirar;
E morrer de paixão;**

E assim, seja lá como for

Vai ter fim a infinita aflição;

E o mundo vai ver uma flor

Brotar do impossível chão.

Sonho Impossível
Chico Buarque e Ruy Guerra

Foto: Sebastião Salgado

AGRADECIMENTOS

Ao SENHOR, onde nEle tudo pode.

Ao Prof. Jurandir Rodrigues de Souza pela orientação.

Aos meus filhos Nathalia e Pedro pelo apoio, carinho e as mais verdadeiras demonstrações de amor.

Às minhas “irmãs” Clélia, Lílian (*in memoriam*) e Zélia pelos 22 anos desta vida em que caminhamos de mãos dadas.

A todos os meus **Amigos**, pelo companheirismo, apoio e orientação.

Ao Centro Federal de Educação Tecnológica de Goiás e a Universidade Católica de Goiás pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Química da UnB pela atenção e disposição.

Ao prof. Guaritá e à profa. Denise, pela atenção e carinho durante a minha estada no Laboratório de Química Analítica e Ambiental.

À minha amiga Fátima, por todos os momentos de reflexão e oração.

Aos “amigos de guerra” Simone, Dudu, Amelinha, Aline, Jeane, Samantha, Susan, Waléria, Maisa, Ivoneide, Valdico, Joice, Cleiton, Carla, Edna, Leilane, Flavinha, pelo prazer da convivência.

Ao meu aluno Carlos pelo companheirismo e dedicação nas análises de toxicidade.

À Liliane e ao Sandro, técnicos de laboratório da UCG, por todo carinho e atenção que me dedicaram.

Ao Dr. Danilo, por todo cuidado e apoio nos momentos de maior fragilidade.

A todos os meus alunos pela compreensão e “muita paciência”.

A todas as pessoas, que mesmo anônimas, me permitiram “rever” o mundo e “encarar” a vida de uma outra forma.

Muito obrigado.

RESUMO

Estudo da degradação dos antibióticos beta-lactâmicos amoxicilina e ampicilina e avaliação da toxicidade e biodegradabilidade dos produtos formados.

A presença de compostos farmacêuticos e de higiene pessoal no ambiente aquático tem sido objeto de preocupação entre a comunidade científica. Uma forma de aporte dessas substâncias ocorre por meio dos efluentes das indústrias farmacêuticas que possuem baixa biodegradabilidade e alta toxicidade. A preocupação com relação aos efluentes da produção industrial dos antibióticos beta-lactâmicos se deve ao fato de que os mesmos podem promover efeitos negativos como o desenvolvimento de organismos resistentes no ambiente aquático. O presente estudo avalia a eficiência dos Processos Oxidativos Avançados (POA) homogêneo UV, $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$, $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$, $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$, $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$, $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ e $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{solar}$ na degradação de amostras sintéticas dos antibióticos AMX e AMP. Para esses POA investigou-se o efeito de parâmetros como a concentração dos íons Fe^{2+} , Fe^{3+} , a concentração de H_2O_2 , a ação da radiação UV e solar na degradação de AMX e AMP. O processo Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$) apresentou os melhores resultados mostrando-se bastante promissor. Esse processo é eficiente, simples e de baixo custo. A avaliação da eficiência dos processos se deu por meio do acompanhamento da variação da concentração de AMX e AMP por espectrofotometria no UV, pela redução da DQO durante 60 min de reação e pela avaliação da presença de compostos carbônicos nos resíduos sólidos da degradação por espectrometria no IR. A toxicidade e a biodegradabilidade dos produtos formados pelo processo Fenton também foram objeto de estudo. A toxicidade foi avaliada pela influência na determinação da dose letal para 50% dos organismos (DL_{50}) em *Artemia salina* e pela inibição do crescimento radicular e alteração no ciclo celular mitótico do organismo *Allium cepa*. Os resultados observados para a redução da concentração dos analitos AMX e AMP foram acima de 95,0% para os POA Fenton e foto-Fenton após 60 min de reação. A redução da DQO observada para o processo Fenton atingiu 75% para AMX e 81% para AMP. O resíduo sólido resultante do processo de oxidação com $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ para AMX e AMP mostrou, para ambos os antibióticos, a presença de compostos carbônicos. As respostas para toxicidade dos produtos gerados resultaram para o sistema-teste *Artemia salina* um $\text{DL}_{50}=70\%$ (v/v) após 48 h de ensaio, para AMX/Fenton e $\text{DL}_{50}=50\%$ (v/v), após 72 h, de ensaio para AMP/Fenton. No sistema-teste *Allium cepa*, a toxicidade avaliada pelo crescimento da raiz foi observada para soluções acima de 5% de diluição (v/v) tanto para AMX quanto para AMP. Quanto à genotoxicidade, os resíduos de degradação apresentaram para o sistema *Allium cepa* alterações no ciclo celular mitótico, o que indica toxicidade podendo promover mutação no conteúdo genético celular. A biodegradabilidade (DBO/DQO) dos resíduos do tratamento por $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ mostraram uma recalcitrância indicando a necessidade de tratamento combinado como químico/biológico para este efluente.

ABSTRACT

Degradation of the pharmaceuticals amoxicillin and ampicillin and evaluation of toxicity and biodegradability of derived-products.

The presence of active pharmaceutical substances and personal-care products in aquatic environment has been a great concern for the scientific community. Pharmaceutical industries are one of the main sources of these types of compounds, which are characterized by low degradability and high toxicity. The antibiotic preparation may negatively affect living organisms in water bodies. However, some organisms in the water bodies may become resistant after their contact with the bioactive chemical wastes. In the present work the efficiency of some homogeneous Advanced Oxidation Process (AOP) UV, H₂O₂/UV, Fe²⁺/H₂O₂, Fe²⁺/H₂O₂/UV, Fe³⁺/H₂O₂, Fe³⁺/H₂O₂/UV e Fe²⁺/H₂O₂/solar radiation was investigated toward the degradation of AMX and AMP. The effect of relevant experimental parameters Fe⁺², Fe⁺³, H₂O₂ concentration and the UV radiation was investigate. The Fenton process (Fe²⁺/H₂O₂) offered the most promising results, mainly accounts of high degradation capacity higher than 97% at reaction time 60 min. This process is high operational, simplicity and low coast. The efficiency of Fenton process was available using UV-Vis spectral data and chemical oxygen demand (COD). The results showed that AOP Fenton and AOP photo-Fenton are able to reduce near 100% of the concentrations of AMX and AMP after 60 min of reaction. The reduction of COD using Fenton process reached 75% and 81% for AMX and AMP, respectively. Solid residues from AMX and AMP oxidation reactions produced by Fenton reagent was evaluated by infrared spectroscopy (IR). The IR results showed the presence of carbonic compounds for both antibiotics. Toxicity tests with *Artemia salina* and *Allium cepa* were performed because of fast answers related to the toxicity of by-products from oxidation process. *Artemia salina* was efficient for the AMX/Fenton and AMP/Fenton, which showed DL₅₀= 70% (v/v), after 48 h, and DL₅₀= 50% (v/v), after 72 h, respectively. *Allium cepa* was efficient for chemical solution greater than 5% dilution (v/v) for both AMX and AMP considering the effects of toxicity on roots growth. *Allium cepa* showed changes in the mitotic cellular cycle for both AMX and AMP under Fenton reagent. It indicates an eventual mutation in the cellular genetic content. The biodegradability (BOD/COD) of Fenton process residue was investigated and shows the low biodegradation for AMX residues.

ÍNDICE

Agradecimentos	vi
Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de Abreviaturas e Acrônimos	xiv
Lista de Figuras	xvi
Lista de Tabelas	xxi
Capítulo 1. Introdução e Objetivos	1
1.1 Introdução	2
1.2 Objetivos	5
Capítulo 2. Abordagem teórica	7
2. Exposição ambiental a contaminantes orgânicos.....	8
2.1 Presença de compostos farmacêuticos e de produtos de higiene pessoal no meio ambiente.....	8
2.2 Monitoramento ambiental de CFHP	13
2.3 Antibióticos e seu aporte ambiental	19
2.4 Desenvolvimento de organismos resistentes.....	27
2.5 Degradação de contaminantes orgânicos por POA.....	30
2.6 OWCs: antibióticos penicilânicos	33
2.6.1 Degradação de antibióticos penicilânicos utilizando POA	34
2.7 Investigação de efeitos tóxicos e mutagênicos.....	36
2.8 Biodegradabilidade	40
2.9 Produção de antibióticos beta-lactâmicos e tratamento do efluente gerado	42
2.10 Legislação ambiental	44
2.10.1 Licenciamento ambiental para indústria farmacêutica.....	45

Capítulo 3. Materiais e Métodos	47
3. Materiais e métodos.....	48
3.1 Avaliação do impacto na estação de lodo ativado pelo lançamento de resíduo de hidrólise de antibióticos penicilânicos.....	49
3.2 Procedimentos analíticos.....	51
3.2.1 Determinação espectrofotométrica de AMX e AMP em solução aquosa.....	51
3.2.2 Avaliação da estabilidade das soluções estoque.....	53
3.2.3 Determinação da curva analítica.....	53
3.3 Realização das medidas de pH.....	53
3.4 Obtenção dos espectros na região do infra-vermelho.....	54
3.5 Estudos para degradação de AMX e AMP.....	54
3.5.1 Quantificação dos compostos estudados.....	56
3.5.2 Ensaio oxidativos de degradação.....	56
3.5.2.1 Reator fotoquímico.....	57
3.6 Descrição dos ensaios de degradação por POA.....	57
3.6.1 Ensaio de fotodegradação.....	57
3.6.2 Ensaio de peroxidação.....	58
3.6.3 Ensaio de fotoperoxidação.....	58
3.6.4 Ensaio com reagente de Fenton.....	58
3.6.5 Ensaio de foto-Fenton.....	58
3.6.6 Ensaio de Fenton/Fe ³⁺	58
3.6.7 Ensaio de foto-Fenton/ Fe ³⁺	58
3.6.8 Ensaio de foto-Fenton promovido por radiação solar.....	59
3.7 Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	60
3.8 Ensaio de toxicidade.....	60
3.8.1 <i>Artemia salina</i>	60

3.8.2 Organismo teste <i>Allium cepa</i>	61
3.8.2.1 Parâmetros macroscópicos: turgescência e crescimento radicular	62
3.8.2.2 Parâmetros microscópicos: índice mitótico (IM), micronúcleos (NM) e anomalias cromossômicas (AC).....	63
3.8.2.2.1 Preparação das radículas	63
3.8.2.2.2 Preparo das lâminas	64
3.8.2.2.3 Análise microscópica	64
3.8.2.2.4 Análise estatística	65
3.9 Ensaio de biodegradabilidade.....	65
Capítulo 4. Resultados e Discussão.....	67
4.1 Características das substâncias em estudo.....	68
4.2 Caracterização da AMX e AMP por espectroscopia de IR e UV.....	69
4.3 Avaliação do impacto na estação de lodo ativado pelo lançamento de resíduo de hidrólise de antibióticos penicilânicos.....	73
4.4 Amostras sintéticas em estudo	76
4.5 Ensaio de degradação por POA.....	76
4.6 Estudos da degradação de AMX e AMP utilizando reagente de Fenton.....	82
4.6.1 Influência da concentração de H ₂ O ₂	85
4.7 Avaliação da razão de remoção da DQO no resíduo filtrado e sem filtrar ..	87
4.7.1 Resíduos sólidos gerados no processo de oxidação.....	88
4.8 Avaliação da redução da DQO	92
4.9 Acompanhamento do pH	99
4.10 Cinética de reação com relação à DQO.....	100
4.11 Degradação de AMX por foto-Fenton promovido por radiação solar	101
4.12 Avaliação da toxicidade dos produtos formados pela degradação de AMX e AMP utilizando reagente de Fenton	105

4.12.1 Bioensaio utilizando o organismo teste <i>Artemia salina</i> (nauplii): avaliação da toxicidade aguda pela letalidade	105
4.12.2 Bioensaio utilizando o organismo teste <i>Allium cepa</i>	110
4.12.2.1 Avaliação da toxicidade pela inibição do crescimento das raízes	110
4.12.2.2 Análise das alterações do ciclo celular mitótico	116
4.13 Ensaio de Biodegradabilidade	126
4.14 Custos operacionais da degradação utilizando reagente de Fenton	129
4.15 Quantidade de ferro utilizada comparada com a legislação pertinente.....	130
Capítulo 5. Conclusão e Perspectivas.....	132
5.1 Conclusão	133
5.2 Perspectivas	135
Referências	137
Anexo	143
Anexo 1	144
Anexo 2	151
Referências dos Anexos	153

Lista de abreviaturas e acrônimos
(ordem alfabética)

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas
AC: anomalias cromossômicas
AMP/F: produto da oxidação de ampicilina com reagente de Fenton
AMP: ampicilina
AMX/F: produtos da oxidação de amoxicilina com reagente de Fenton
AMX: amoxicilina
BCF: Fator de bioacumulação
BTX: Benzeno, Tolueno e Xileno
CBT: Teste da garrafa fechada
CFHP: Compostos farmacêuticos e de higiene pessoal
CN: controle negativo
CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente
COT: Carbono Orgânico Total
CP: Controle positivo
CP: controle positivo
d.w.: peso seco
DBO₅: Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO: Demanda Química de Oxigênio
EC₅₀: Menor concentração que elimina 50% dos organismos
ETA: Estação de Tratamento de Água
ETE: Estação de Tratamento de Esgotos
IM: índice mitótico
IR: Espectrofotometria no infra-vermelho
KHP: biftalato de potássio
Kow: Coeficiente de partição n-octanol/água
LD₅₀: dose letal para 50% dos organismos
MDICE: Ministério do Desenvolvimento da Indústria e do Comércio Exterior
MIC₅₀: concentração semi-máxima
MN: micronúcleos
NBR: |Norma Brasileira de Referência
OCWs: Contaminantes Orgânicos de Efluentes

OECD: Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico

PA: Pureza analítica

PFHP: Produtos Farmacêuticos e de Higiene Pessoal

PhACs: Compostos Farmacêuticos Ativos

POA: Processos Oxidativos Avançados

POP: Poluentes Orgânicos Persistentes

PPCPs: Produtos farmacêuticos e de higiene pessoal

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

ROS: Espécies Orgânicas Reativas

USEPA: Agência Norte Americana de Proteção Ambiental

UV: Espectrofotometria no ultra-violeta

Lista de figuras

Figura 2.1: Rota de exposição ambiental para CFHP de uso humano e veterinário	12
Figura 2.2: Fórmula estrutural geral das: (a) penicilinas, (b) cefalosporinas, (c) tetraciclinas, (d) cloranfenicol, (e) quinolonas e (f) sulfonamidas	20
Figura 2.3: Percentual de distribuição das indústrias farmacêuticas no Brasil	22
Figura 2.4: Aporte de antibióticos nas ETE da Alemanha em 1998 de acordo com consumo e razão de excreção	25
Figura 2.5: Valores de DQO e DBO indicativos da tratabilidade de um efluente ...	42
Figura 2.6: Estrutura da ampicilina (AMP) e da amoxicilina (AMX)	43
Figura 2.7: Produtos da hidrólise ácida e básica das penicilinas	43
Figura 3.1: Fluxograma do efluente da linha de produção de penicilínicos	51
Figura 3.2: Esquema geral da montagem do foto-reator (a). Aspecto visual do foto-reator utilizado nos processos de degradação	57
Figura 3.3: Aspecto visual do microcrustáceo <i>Artemia salina</i>	60
Figura 3.4: Aspecto visual da organização das cebolas em teste	62
Figura 3.5: Condições de exposição dos bulbos na bancada; (a) disposição geral e aleatória, (b), (c), (d), (e) e (f) crescimento radicular dos bulbos em diferentes ângulos	63
Figura 4.1: Anel β -lactama presente na AMP e AMX	68
Figura 4.2: Espectro de IR característico para AMX PA (em pastilhas de KBr)	69
Figura 4.3: Espectro de IR característico para AMP PA (em pastilhas de KBr)	70
Figura 4.4: Espectro UV característico para AMX PA (em solução aquosa), $\lambda_{\text{max}} = 272 \text{ nm}$	71
Figura 4.5: Espectro UV característico para AMP PA (em solução aquosa), $\lambda_{\text{max}} = 262 \text{ nm}$	72
Figura 4.6: Razão de redução da concentração de AMX durante 60 min	80

Figura 4.7: Razão de redução da concentração de AMP durante 60 min	80
Figura 4.8: Avaliação do percentual de remoção com relação ao tempo de reação para (a) AMX e (b) AMP	81
Figura 4.9: Oxidação da AMX por reagente de Fenton: (a) $2,44 \times 10^{-3}$ mol de H_2O_2 , (b) $3,28 \times 10^{-3}$ mol de H_2O_2 , (c) $4,89 \times 10^{-3}$ mol de H_2O_2 e (d) $9,79 \times 10^{-3}$ mol de H_2O_2	83
Figura 4.10: Oxidação da AMP por reagente de Fenton: (a) $2,44 \times 10^{-3}$ mol de H_2O_2 , (b) $3,28 \times 10^{-3}$ mol de H_2O_2 , (c) $4,89 \times 10^{-3}$ mol de H_2O_2 , (d) $9,79 \times 10^{-3}$ mol de H_2O_2 , (e) $1,22 \times 10^{-2}$ mol de H_2O_2 , (f) $1,47 \times 10^{-2}$ mol de H_2O_2 e (g) $1,96 \times 10^{-2}$ mol de H_2O_2	84
Figura 4.11: Relação entre k_{obs} e a concentração de H_2O_2 na degradação de AMX por reagente de Fenton	85
Figura 4.12: Relação entre k_{obs} e a concentração de H_2O_2 na degradação de AMP por reagente de Fenton	86
Figura 4.13: DQO normalizada para as soluções filtradas e sem filtrar da degradação por reagente de Fenton para AMX.	87
Figura 4.14: Aspecto visual. (a) solução de AMX/ Fe^{2+} , t= 0 min (b) solução de AMX/ Fe^{2+} / H_2O_2 , t= 0,5 e 5 min, (c) solução AMP/ Fe^{2+} , t= 0 min, (d) solução AMP/ Fe^{2+} / H_2O_2 , t= 0,5 e 5 min	89
Figura 4.15: Espectro de IR para AMX PA.....	90
Figura 4.16 Espectro de IR do resíduo sólido gerado na degradação de AMX por reagente de Fenton.....	90
Figura 4.17: Espectro de IR de AMP PA	91
Figura 4.18: Espectro de IR do resíduo sólido gerado na degradação de AMP por reagente de Fenton.....	91
Figura 4.19: Remoção da DQO para os ensaios (I), (II), (III) e (IV) para AMX.....	94
Figura 4.20: Remoção da DQO para os ensaios (I), (II), (III) e (IV) com AMP	95
Figura 4.21: Detalhe do comportamento da degradação de AMX por reagente de Fenton para o ensaio (III) em diferentes tempos de reação. (a) AMX e Fe^{2+} , (b) após adição de H_2O_2 e de (c) a (j), a cada 5 min de reação	96

Figura 4.22: Detalhe do comportamento da degradação de AMP por reagente de Fenton para o ensaio (III) em diferentes tempos de reação. (a) solução de AMP e Fe^{2+} , (b) após adição de H_2O_2 e de (c) a (j), a cada 5 min de reação	96
Figura 4.23: Aspecto visual do resíduo da degradação AMX/reagente de Fenton após 24 h. Ensaios (I), (II), (III) e (IV)	97
Figura 4.24: Razão de remoção da DQO para os ensaios (I), (II), (III) e (IV) com AMX ($t_f = 60$ min).....	98
Figura 4.25: Razão de remoção da DQO para os ensaios (I), (II), (III) e (IV) com AMP ($t_f = 60$ min).....	98
Figura 4.26: Variação do pH durante a degradação AMX/Fenton, AMP/Fenton e do reagente de Fenton	100
Figura 4.27: Relação entre k_{obs} e a concentração de H_2O_2 na degradação de AMX e AMP por reagente de Fenton com relação à DQO	101
Figura 4.28: Percentagem de remoção de DQO para ensaios de degradação de AMX por processo Fenton, $t_f = 60$ min	103
Figura 29: Redução da DQO durante 60 min de ensaio	104
Figura 4.30: Estudo cinético da degradação de AMX por processo foto-Fenton....	104
Figura 4.31: Aspecto visual da degradação de AMX por foto-Fenton em (a) $t = 5$ min e (b) $t = 60$ min.	104
Figura 4.32: Acompanhamento da letalidade para <i>Artemia salina</i> dos produtos da degradação de AMX/F	108
Figura 4.33: Acompanhamento da letalidade para <i>Artemia salina</i> dos produtos da degradação de AMP/F	109
Figura 4.34: Crescimento radicular médio em função da diluição dos resíduos da degradação de AMX/F ($t=120$ h)	110
Figura 4.35: Crescimento radicular com relação do controle negativo ($t=120$ h) ...	111
Figura 4.36: Curva de crescimento em diferentes diluições para as 120 h de ensaio	112

Figura 4.37: Aspecto visual (efeito macroscópico) (a) CN, (b) 2,5%, (c) 1,0%, (d) 0,5% e (e) 0,25%	113
Figura 4.38: Crescimento da raiz após 120 h nas diferentes soluções	113
Figura 4.39: Percentual de crescimento radicular com relação ao CN.....	114
Figura 4.40: Diagrama de Pareto para os ensaios com diferentes diluições dos produtos de degradação de AMP/F.....	114
Figura 4.41: Curva de crescimento nas diferentes concentrações para as 120 h de ensaio	115
Figura 4.42: Aspecto visual (efeito macroscópico) (a) CN, (b) 2,5%, (c) 1,0%, (d) 0,5% e (e) 0,25%	116
Figura 4.43. Estágio de degradação do sistema radicular dos bulbos de <i>Allium cepa</i> expostos aos resíduos neutralizados de AMX tratada pelo processo Fenton	117
Figura 4.44. Fotomicrografias das células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> . (A) Núcleo interfásico; (B) e (C) Núcleos na prófase; (D) Núcleo metafásico com fragmento cromossômico; (E) Anáfase precoce normal; (F) Anáfase com pontes cromossômicas, (G) e (H) Anáfase e Metáfase normais, respectivamente; (I) Distribuição metafásica anormal; (J) Célula Binucleada e (L) Células interfásicas normais	118
Figura 4.45: Mitose normal.....	122
Figura 4.46: Prófase, metáfase e telófase normais	122
Figura 4.47: Presença de micronúcleos em AMX/F 5,0%	123
Figura 4.48: Quebras cromossômicas, AMX/F 5,0%.....	123
Figura 4.49: Quebra cromossômica AMX/F, 2,5%	124
Figura 4.50: Quebra cromossômica, AMX/F 1%	124
Figura 4.51: Ponte cromossômica, AMX/F 1%.....	124
Figura 4.52: Perda cromossômica AMP/F 2,5%.....	125

Figura 4.53: Espectro de IR do resíduo sólido formado na neutralização da solução de degradação de AMX/Fenton(verde), AMP/Fenton(vermelho) e efluente bruto da industrial/Fenton(azul).	128
Figura 4.54: Fluxo do efluente penicilânico em uma indústria de Goiás.	131

Lista de tabelas

Tabela 2.1: Detecção de CFHP em diferentes compartimentos ambientais	10
Tabela 2.2: Fármacos de uso humano e veterinário com potencial para dano em organismos aquáticos.	13
Tabela 2.3: Presença de sulfonamidas no lençol freático em função da distância com relação a um aterro sanitário.	15
Tabela 2.4: Concentrações máximas encontradas para antibióticos em efluentes de ETE, águas superficiais e no lençol freático	16
Tabela 2.5: Excreção e biodegradabilidade de alguns agentes de uso terapêutico	24
Tabela 2.6: Predominância de resistência a antibiótico de cepas de <i>Acinetobacter</i> proveniente de esgoto hospitalar e de planta farmacêutica	29
Tabela 2.7: Predominância de múltipla resistência a antibiótico de cepas de <i>Acinetobacter</i> proveniente de esgoto hospitalar e de planta farmacêutica	29
Tabela 2.8: Estudos de degradação de compostos químicos por POA	31
Tabela 2.9: Eficiência de conversão de amins cancerígenas em produtos degradados utilizando reagente de Fenton	32
Tabela 2.10: Resultados obtidos a partir da degradação por diferentes POA de efluente industrial da produção de AMX	35
Tabela 3.1: Volume de reagentes utilizados para a degradação de 200,0 mL de solução de AMX e AMP	55
Tabela 3.2: Quantidade de matéria (mol) presente nos ensaios de degradação por foto-Fenton para AMX promovido por radiação solar	59
Tabela 4.1: Tempo de detenção hidráulica em função do volumes dos tanques de tratamento	74
Tabela 4.2: Cronograma de coleta de amostras e parâmetros analisados	74
Tabela 4.3: Eficiência do sistema de tratamento, taxa de remoção e eficiência	75

Tabela 4.4: Quantidades de matéria (mol) utilizadas nos diferentes POA para 200 mL de solução $2,86 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AMX e 200 mL de solução $3,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AMP	77
Tabela 4.5: Variação de pH durante os diversos ensaios com POA utilizando soluções sintéticas de AMX e AMP	78
Tabela 4.6: Percentagem de degradação de AMX e AMP em função do POA.....	79
Tabela 4.7: Quantidade de matéria (mol) presente nos ensaios de degradação por reagente de Fenton para AMX.....	82
Tabela 4.8: Quantidade de matéria (mol) presentes nos ensaios de degradação por reagente de Fenton para AMP	84
Tabela 4.9: Quantidade de matéria (mol) presente nos ensaios de degradação por reagente de Fenton para AMX.....	93
Tabela 4.10: Quantidade de matéria (mol) presente nos ensaios de degradação por reagente de Fenton para AMP	95
Tabela 4.11: Variação do pH em função do tempo de reação	95
Tabela 4.12: Quantidade de matéria (mol) presentes nos ensaios de degradação por foto-Fenton para AMX.....	102
Tabela 4.13: Letalidade de resíduo de degradação de AMX por reagente de Fenton para <i>Artemia salina</i> (t=24 h).....	106
Tabela 4.14: Letalidade de resíduo de degradação de AMP por reagente de Fenton para <i>Artemia salina</i> (t=24h).....	106
Tabela 4.15: Percentual de mortes de <i>Artemia salina</i> de acordo com a concentração para produtos de degradação de AMX/F	107
Tabela 4.16: Percentual de mortes de <i>Artemia salina</i> de acordo com a concentração para produtos de degradação de AMP/F	108
Tabela 4.17: Valores médios de comprimentos da raiz (cm) em soluções dos produtos de degradação de AMX por reagente de Fenton.	112
Tabela 4.18: Valores médios de comprimentos da raiz (cm) em soluções dos produtos de degradação de AMP por reagente de Fenton.	115

Tabela 4.19. Resultados da análise citogenética observados em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i>	117
Tabela 4.20: Efeito citológico dos produtos de degradação de AMX por reagente e Fenton.....	120
Tabela 4.21: Efeito citológico dos produtos de degradação de AMP por reagente de Fenton.....	121
Tabela 4.22: Avaliação de DBO ₅ e DQO para efluentes industriais.....	126

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

A produção em massa de medicamentos capazes de combater doenças infecciosas constitui uma das maiores realizações da humanidade. A introdução dos antibióticos na medicina marcou o início de uma nova era ¹. A demanda por este produto cresceu vertiginosamente nos últimos anos, pois os mesmos não são utilizados única e exclusivamente como quimioterápicos na medicina humana e veterinária, mas também são aplicados de forma intensa na agricultura como protetores no crescimento de plantas e no confinamento animal como promotores de crescimento de peixes, aves e suínos².

Desde a década de setenta (1970) que estudos realizados mostram a presença de compostos farmacêuticos em efluentes de estações de tratamento de esgotos ^{3,4,5,6}, em águas superficiais ^{3,4,5,7}, profundas⁵, subterrâneas⁵, na água potável ⁴, em solo⁸, em lodos⁹ e em sedimentos^{8,10,11,12}. A presença desses compostos no meio ambiente indica que os mesmos são recalcitrantes e que possuem baixa biodegradabilidade¹³. Até o momento, pouco se conhece sobre o efeito dessas substâncias no meio ambiente, principalmente em ambientes tropicais, e a sua remoção por meio dos processos convencionais de tratamento de efluentes domésticos e industriais.

Os antibióticos compõem uma importante classe de fármacos com grande possibilidade de gerar impacto ambiental devido a sua atividade biológica específica. Alguns antibióticos, como a amoxicilina, por exemplo, possuem baixa taxa de metabolismo tanto para seres humanos quanto para animais. Os antibióticos e, em alguns casos, os seus metabólitos, possuem razões de excreção que variam de 30 a 90%. Para um consumo mundial de cerca de 200.000 t/ano, pode-se inferir que cerca de 50% estão entrando no ambiente aquático ^{5,14}.

No Brasil a indústria farmoquímica não sintetiza antibióticos beta-lactâmicos apenas formula a partir de matéria prima importada. Este processo gera quantidades moderadas ou altas de resíduos dependendo da variação sazonal da sua produção. O efluente gerado por esse processo possui baixa biodegradabilidade pois seus componentes são biologicamente ativos e

tóxicos, promovendo a inibição da atividade de sistemas de tratamento como o de lodo ativado causando problemas aos corpos receptores.

A importância do tratamento adequado para os efluentes da produção de antibióticos é destacada neste trabalho, pois a presença dessas substâncias em concentrações da ordem de ng/L ou µg/L no meio ambiente leva ao desenvolvimento de organismos resistentes, já que a seletividade natural favorece organismos com código genético resistente a antibióticos e a alteração do padrão de resistência é um processo irreversível¹⁵.

A indústria farmacêutica cresce ano a ano no Brasil. Em 2002 o país possuía cerca de 1.032 indústrias farmacêuticas de micro, pequeno, médio e grande porte. No estado de Goiás localizam-se 4,4% do total dessas indústrias, sendo que 17 indústrias no Pólo Farmoquímico de Anápolis e 5 em Goiânia¹⁶.

O Brasil é carente em pesquisas para o desenvolvimento de métodos para o tratamento de efluentes da produção dos antibióticos β-lactâmicos amoxicilina (AMX) e ampicilina (AMP). Esses antibióticos são os mais consumidos no país e dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior do Brasil mostram que, no ano de 2003, o principal produto farmoquímico importado foi a amoxicilina e seus sais, atingindo 2,1% do total¹⁶.

A necessidade do desenvolvimento de tecnologias e do estudo desses efluentes é incontestável. Os antibióticos possuem baixa biodegradabilidade, resistem ao tratamento em ETE convencionais, persistem no meio ambiente e potencializam seu efeito no ecossistema. Dessa forma, pode-se prever que futuramente serão necessárias adaptações ou mesmo implantação de novos processos de tratamento que removam os resíduos desse fármaco presente em efluentes ou os degradem física e/ou quimicamente.

Tomando-se como base esse contexto, este trabalho se ateve, no capítulo 2, a levantar as referências da literatura sobre a presença de compostos farmacêuticos nos diferentes compartimentos ambientais, levando-se a conclusão de que são baixos os rendimentos com relação à degradação desses compostos por meio dos processos de tratamento de efluentes convencionais utilizados para água e esgotos. Neste mesmo capítulo, são apresentados os processos que estão sendo considerados pela comunidade científica como uma boa proposta para a degradação de substâncias químicas refratárias entre eles os Processos Oxidativos Avançados, POA, com ênfase

aos processos homogêneos por serem considerados os de menor custo econômico. Como anexo apresenta-se uma breve discussão sobre os diferentes POA homogêneos, abordando alguns com aplicação específica na degradação de antibióticos de interesse comercial.

A metodologia experimental utilizada para o desenvolvimento encontra-se descrita no capítulo 3. No capítulo 4 os resultados obtidos para a oxidação, a otimização do melhor processo, os resíduos gerados pelo POA, a toxicidade e biodegradabilidade dos produtos formados pela oxidação por reagente de Fenton da AMX e AMP encontram-se discutidos.

Nas conclusões e perspectivas de desenvolvimentos futuros, capítulo 5, a partir do processo mais eficiente e da avaliação da sua toxicidade e biodegradabilidade, sugerem-se novas pesquisas.

Este trabalho teve como objetivo a avaliação do potencial da degradação dos efluentes da produção de AMX e AMP por diferentes POA, a otimização dos parâmetros do POA com melhor rendimento, a avaliação da toxicidade e da biodegradabilidade dos produtos formados na degradação.

1.2 OBJETIVOS

Estudos recentes sobre águas e efluentes mostram a presença de xenobióticos no meio ambiente. A concentração de substâncias como compostos farmacêuticos e de higiene pessoal tem apresentado valores crescentes em águas de lagos, lagoas, rios, oceanos e em efluentes de estações de tratamento de água e de efluentes domésticos. Essas substâncias estão sendo encontradas até mesmo em águas de abastecimento público.

Em vista da preocupação mundial quanto a manutenção da qualidade da água disponível no planeta para consumo humano, é necessários que sejam realizados estudos com o objetivo de degradar estas substâncias formando moléculas menos recalcitrantes e biodegradáveis.

Objetivo geral

- Avaliar a degradação dos antibióticos beta-lactâmicos AMX e AMP utilizando-se POA bem como a toxicidade e biodegradabilidade dos produtos formados nesse processo de degradação oxidativa.

Objetivos específicos

- Avaliar o potencial de degradação de diferentes processos oxidativos avançados;

- Avaliar o rendimento dos POA com e sem a promoção por radiação;
- Otimizar o POA que apresente a melhor perspectiva de aplicação;
- Avaliar a toxicidade dos produtos formados pela degradação;
- Avaliar a biodegradabilidade dos produtos gerados pelo POA.

Definidos os objetivos, a fim de se fundamentar e dimensionar a relevância deste trabalho, no próximo capítulo tem-se a apresentação da abordagem teórica desta tese.

CAPÍTULO 2
ABORDAGEM TEÓRICA

2. EXPOSIÇÃO AMBIENTAL A CONTAMINANTES ORGÂNICOS

2.1 Presença de compostos farmacêuticos e de produtos de higiene pessoal no meio ambiente.

A partir da década de sessenta (1960) é que o mundo começou a se preocupar com a questão da entrada de substâncias tóxicas no meio ambiente. A publicação, em 1962, do livro “Primavera Silenciosa” da pesquisadora Raquel Carlson, despertou a comunidade científica para a necessidade do desenvolvimento de modelos para as rotas de substâncias tóxicas no meio ambiente. Os compostos farmacêuticos só entraram neste contexto nos anos 90, quando estudos realizados nos Estados Unidos mostraram que algumas drogas ocorriam em concentrações baixas o suficiente para não ameaçar o ambiente, enquanto outras, apesar das baixas concentrações, poderiam causar danos ambientais. Na literatura atualmente disponível, muitas drogas estão sendo investigadas continuamente, entre elas destacam-se os antibióticos, analgésicos, desinfetantes, anestésicos, agentes antiparasitários, hormônios, meios de contrastes, agentes psicofarmacológicos, agentes citostáticos, lipídeo reguladores, solventes, etc^{17,13}.

A preocupação com a presença de substâncias químicas de uso farmacológico intenso na medicina humana e veterinária no meio ambiente deve-se ao fato de que estas foram desenvolvidas com o propósito de possuir atividade biológica. Elas frequentemente possuem comportamento físico-químico semelhante, isto é, são lipofílicas (atravessam membranas), persistentes e podem bioacumular-se nos organismos provocando efeitos desconhecidos no ecossistema aquático e terrestre. Ainda não se tem conhecimento do destino e dos efeitos dessas substâncias, apesar do aporte das mesmas no meio ambiente ser alto¹⁸.

Como o objetivo no desenvolvimento de compostos químicos para uso terapêutico é o de que suas moléculas possuam atividade biológica e propriedades físico-químicas adequadas ao fim a que se destinam, essas substâncias podem ser definidas como compostos farmacêuticos ativos

(pharmaceuticals active compounds, PhACs). Elas são utilizadas de acordo com sua atividade biológica específica e notadamente caracterizadas pelas suas propriedades iônicas naturais. Sob condições ambientais, tais moléculas podem ser neutras, catiônicas, aniônicas ou zwitteriônicas. Elas frequentemente funcionam como ácidos ou como bases. Esses compostos farmacêuticos em específico podem ainda ser classificados de acordo com seus efeitos e também devido a sua estrutura química. Normalmente a classificação conforme seu propósito terapêutico é a mais utilizada^{13,12}.

Os PhACs são moléculas desenhadas para estimular respostas fisiológicas em seres humanos, animais, bactérias e outros organismos. Durante a década passada, observou-se um grande crescimento de efeitos adversos devido ao uso e disposição inadequada desses produtos para a saúde do homem e do meio ambiente. Pesquisas mostram que esses produtos passam pelas estações de tratamento de esgotos sendo então lançados diretamente nos cursos d'água^{19,12}.

A atenção com relação a entrada de PhACs no ambiente se soma a preocupação com o consumo de produtos de higiene pessoal. O conjunto de produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (CFHP) integram um grupo conhecido como PPCPs (pharmaceutical and personal care products). Nestes últimos anos, o potencial poluente destas substâncias tem trazido preocupação, pois esses produtos possuem comportamento físico-químico semelhante a outros xenobióticos que se acumulam ou apresentam efeitos adversos em organismos aquáticos²⁰. Os CFHP normalmente encontrados nos diferentes compartimentos ambientais incluem: antibióticos, analgésicos e antiinflamatórios, agentes lipídios reguladores, β -bloqueadores, antiepiléticos, contraceptivos, esteróides e hormônios. A concentração ambiental encontrada é geralmente em nível de traços ($\mu\text{g/L}$ ou ng/L), sendo o suficiente para induzir efeitos tóxicos¹⁵.

Os CFHP de uso humano e veterinário são continuamente liberados para o meio ambiente como resultado do processo de manufatura, disposição imprópria ou excreção metabólica. Assim, sua rota passa inevitavelmente pelas estações de tratamento de esgotos (ETE) e pelo solo por meio do uso de biossólidos como adubo¹⁹. Algumas dessas substâncias não são degradadas pelas plantas de tratamento de esgotos, retornando ao meio ambiente através

de seus efluentes atingindo assim rios, córregos, lagos até chegar aos oceanos. Estudos mostram que drogas como carbamazepina, atenolol, metoprol, timetropina e diclofenaco são parcialmente removidas nas ETE (menos de 10% para a maioria delas e entre 10% e 39% para o diclofenaco) ²¹. Algumas drogas podem ser detectadas em suas formas modificadas como hidrolisados ou conjugados. O ibuprofem, por exemplo, tem uma remoção de aproximadamente 90%, transformando-se em produtos hidroxilados ou carboxilados ²¹.

As pesquisas de CFHP em ecossistemas aquáticos e terrestres detectaram-nos em diferentes compartimentos como apresentado na tabela 2.1.

Tabela 2.1: Detecção de CFHP em diferentes compartimentos ambientais.

Compartimento	Referência
Efluentes de ETE ^{3,12,4,7,9}	TERNES <i>et al.</i> , 1998; HERNANDO <i>et al.</i> , 2006; STUMPF <i>et al.</i> , 1999; KOLPIN <i>et al.</i> , 2002; CARBALLA <i>et al.</i> , 2004
Canais ⁵	HIRSCH <i>et al.</i> , 1999
Riachos ^{4,5}	STUMPF <i>et al.</i> , 1999; HIRSCH <i>et al.</i> , 1999
Grandes rios ^{4,11,3,7,5,12}	STUMPF <i>et al.</i> , 1999; BENDEZ <i>et al.</i> , 2005; TERNES, 1998; KOLPIN <i>et al.</i> , 2002; HIRSCH <i>et al.</i> , 1999; HERNANDO <i>et al.</i> , 2006
Lagos ⁷	KOLPIN <i>et al.</i> , 2002
Águas profundas ⁷	KOLPIN <i>et al.</i> , 2002
Oceanos ⁶	ZUCCATO <i>et al.</i> , 2000
Sedimentos ^{10,8,12}	LALUMERA <i>et al.</i> , 2004; DIÁZ-CRUZ <i>et al.</i> , 2003; HERNANDO <i>et al.</i> , 2006

Existe um interesse especial por exposições do ecossistema aquático, pois o esse recebe cargas contínuas proveniente das ETE.

O fato de a meia-vida ($t_{1/2}$) dos PhACs ser relativamente pequena e de que seu aporte no meio ambiente é constante, pode-se considerá-los como substâncias “pseudopersistentes”. A natureza polar e não volátil faz com que

estes compostos se mantenham na água. A presença de algumas dessas substâncias em ambientes terrestres se deve ao uso de biossólidos (lodo de ETE) ou ainda de adubos orgânicos na agricultura. As drogas que possuem propriedades ácidas ou alto valor de $\log K_{ow}$ (coeficiente de partição n-octanol/água) mostram grande afinidade por lodo e solo. Estes compostos quando hidrofóbicos e pouco voláteis se acumulam no solo ou no sedimento o que reduz significativamente a sua concentração na fase aquosa²⁰.

Cerca de 200.000 t de medicamentos são produzidas anualmente para aplicação na medicina humana, na veterinária e na agricultura. Após sua administração, uma parte significativa é excretada, cerca de 30 a 90% da dosagem de forma inalterada, podendo assim persistir no meio ambiente. Como os fármacos foram desenvolvidos para serem persistentes, mantendo suas propriedades químicas o bastante para servir a um propósito terapêutico, o uso desenfreado de antibióticos, por exemplo, acarreta dois problemas ambientais: um é a contaminação dos recursos hídricos e o outro, é o de que alguns microorganismos criam resistência a esses fármacos. As bactérias podem fazer, e frequentemente o fazem, mudanças no seu material genético, adquirindo resistência a esses fármacos²².

Pouco se conhece até o presente momento sobre as rotas ambientais dos fármacos. A figura 2.1 apresenta um esquema das prováveis rotas dessas substâncias no meio ambiente²².

Em termos de periculosidade, os CFHP possuem uma série de agravantes: 1) muitos são persistentes, assim como seus produtos de degradação; mesmos aqueles que possuem meia-vida curta são passíveis de causar exposições crônicas devido a sua introdução contínua no meio ambiente; 2) os fármacos são desenvolvidos para desencadear efeitos fisiológicos, e, conseqüentemente, a biota se torna mais suscetível a impactos desses compostos; 3) embora a concentração de alguns fármacos encontrados no ambiente seja baixa, a combinação deles pode ter efeitos pronunciados devido aos mecanismos de ação sinérgica²³.

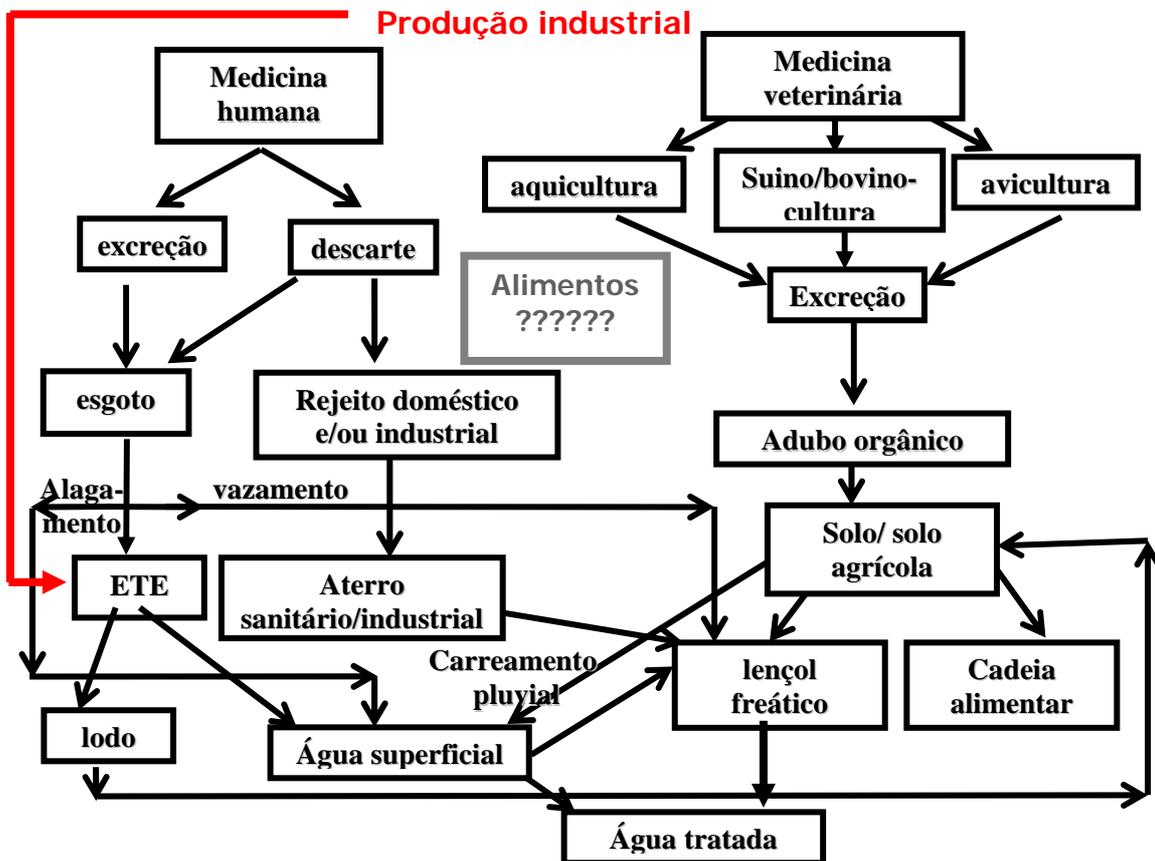


Figura 2.1: Rota de exposição ambiental para CFHP de uso humano e veterinário. Fonte: BILA *et al.*, 2003²².

Os fatores agravantes quanto a periculosidade dos CFHP preocupam por indicarem que os CFHP são potencialmente danosos aos organismos aquáticos e terrestres promovendo, por exemplo, disfunções endócrinas em peixes, répteis e invertebrados; aumento de resistência a bactericidas de bactérias presentes no solo; estímulo no crescimento de cianobactérias e inibição no crescimento de plantas aquáticas entre outros²⁴.

A tabela 2.2 apresenta os principais fármacos de uso humano com potencial para causar danos em organismos aquáticos.

Tabela 2.2: Fármacos de uso humano com potencial para dano em organismos aquáticos.

Fármaco	Uso terapêutico
Amoxicilina, tetraciclina, azitromicina, ciproflaxacina, eritromicina	Antibióticos
Diclofenaco, ibuprofeno	Antiinflamatório
1,7- α -etinilestradiol, dietilbestrol, levonorgestrel, testosterona, tiroxina	Hormônios
Reserpina	anti-hipertensivo
Omeprazol, ranitidina	Antiulceroso
Paracetamol, dipirona sódica, codeína, ácido acetilsalicílico, tramadol	Analgésico
Captopril, propranolol, diltiazem, verapamil, lisinopril	Cardiovascular
Diazepam, fluoxetina, citalopram	Antidepressivo

Fonte: REIS FILHO, 2007²³.

2.2 Monitoramento ambiental de CFHP

Pesquisadores de diversas partes do mundo reconhecem como sendo preocupante a ocorrência de compostos farmacêuticos ativos (PhCAs) no ambiente. Nos últimos anos diversas pesquisas foram realizadas com o objetivo de identificar e quantificar resíduos e metabólitos das diferentes drogas utilizadas na medicina humana e veterinária.

O descarte inadequado de resíduos da indústria farmacêutica até poucos anos atrás e a disposição de medicamentos no lixo residencial levou a aterros sanitários uma quantidade significativa de compostos orgânicos farmacêuticos. A preocupação com a contaminação do lençol freático por esses PhACs fez com que um estudo fosse realizado em um aterro que operou de 1937 a 1977. Durante seus 40 anos de funcionamento ele recebeu cargas constantes de quantidades diferenciadas destes compostos. Um ponto

importante neste estudo foi a avaliação quanto a distribuição de CFHP de acordo com a profundidade e distância com relação ao aterro. No período de operação do aterro estudado, as sulfas, amidas sulfanílicas, eram muito utilizadas no controle das infecções. A tabela 2.3 apresenta os resultados obtidos para alguns antibacterianos pesquisados nesse trabalho²⁵.

A importância desse trabalho está no fato de que o mesmo é o primeiro a ser publicado enfocando a distribuição da concentração de compostos farmacêuticos e/ou seus metabólitos no lençol freático em uma região próxima a um aterro sanitário²⁵.

O monitoramento de 18 antibióticos diferentes em efluentes de ETE, águas superficiais e lençol freático, na região de Frankfurt a Wisbaden na Alemanha, indicou que 30% dos antibióticos estavam presentes em todas as matrizes estudadas⁵. Na tabela 2.4 tem-se os resultados obtidos para os antibióticos encontrados. Dados da literatura indicam que a presença no ambiente de concentrações na ordem de ng/L ou µg/L podem levar ao desenvolvimento de organismos resistentes, logo estes dados são preocupantes.

Tabela 2.3: Presença de sulfonamidas no lençol freático em função da distância com relação a um aterro sanitário.

Distância a partir do aterro (m)					
Composto (µg/mL)	Profundidade (m)	0	15	37	50
Ácido sulfanilico	5,5	1380	na	na	na
	7	6470	6280	1000	90
	8,5	930	10440	5530	70
	10	5300	ne	3160	1610
Sulfanilamida	5,5	60	na	na	na
	7	170	210	30	<20
	8,5	40	300	140	<20
	10	120	ne	170	40
Sulfaguanidina	5,5	110	na	na	na
	7	1600	900	110	<20
	8,5	190	280	480	<20
	10	1070	ne	360	540
Sulfadiazina	5,5	100	na	na	na
	7	480	720	170	<20
	8,5	100	1160	440	<20
	10	480	ne	410	80
Sulfadimidina	5,5	100	na	na	na
	7	900	540	50	<20
	8,5	230	900	310	20
	10	640	ne	180	140
sulfametizol	5,5	70	na	na	na
	7	310	190	<20	<20
	8,5	70	330	190	<20
	10	210	ne	70	70

na: ponto não amostrado, ne: água insuficiente para amostragem

Fonte: HOLM *et al.*, 1995²⁵.

Tabela 2.4: Concentrações máximas encontradas para antibióticos em efluentes de ETE, águas superficiais e no lençol freático.

Substância (valores máximos µg/L)	Efluente de ETE	Águas superficiais	Lençol freático
Claritromicina	0,24	0,26	<LD
Eritromicina-H ₂ O	6,00	1,70	<LD
Roxitromicina	1,00	0,56	<LD
Cloranfenicol	0,56	0,06	<LD
Sulfametaxazol	2,00	0,48	0,47
trimetropina	0,66	0,20	<LD

Fonte: HIRSCH *et al.*, 1999⁵.

Uma das maiores pesquisas realizadas na área aconteceu entre 1999 e 2000 nos Estados Unidos. Foram coletadas 139 amostras em rios e riachos por praticamente todo território norte americano e 95 substâncias foram pesquisadas, dentre elas 31 (32,6%) eram antibióticos. A frequência apresentada pelos antibióticos nas amostras coletadas foi a seguinte: eritromicina-H₂O: 21,5%, limcomicina: 19,2%, sulfametaxazol: 19,0%, trimetropina: 27,4% e tilisina: 13,5%. A cafeína foi encontrada em 70% das amostras e o esteroide coprostanol foi observado em 85,7%. Como a principal fonte de contaminação destes corpos hídricos são as ETE municipais e/ou industriais, podemos considerar estas substâncias como contaminantes orgânicos de efluentes (OCWs). Observa-se no estudo que mais de um OCWs foram detectados em 80% dos pontos coletados, podendo então considerar-se que os mesmos ocorrem em uma escala nacional. Isto indica que os mesmos “sobrevivem” ao tratamento nas ETE (recalcitrantes) e que possuem baixa biodegradabilidade⁷.

Uma grande fonte de contaminação ambiental está no uso de biossólidos. Compostos farmacêuticos de uso humano e veterinário, em razão de sua taxa de excreção, acumulam-se no esterco animal e no lodo de ETE. O uso destes sub-produtos como adubo na agricultura transfere para o solo os PhACs. A atuação dos mesmos sobre a microbiota ainda não se encontra bem

esclarecida. Na Comunidade Européia tem crescido a preocupação com a presença de agentes terapêuticos nos biossólidos, eles estão sendo considerados fonte de risco para o meio ambiente. Estudos mostram que a capacidade de permanência no solo de substâncias como o antibiótico bacitracina, por exemplo, pode ser de até 30 dias em temperaturas que variam de 2 a 30 °C ¹⁴.

Compostos farmacêuticos como analgésicos, anti-inflamatórios, antibióticos, antiepiléticos, beta-bloqueadores, lipídeo reguladores, meios de contraste, drogas citostáticas e contraceptivos orais têm sido encontrados em amostras de águas de superfície, lençol freático, água potável e esgotos. Mais de 80 diferentes drogas e seus metabólitos foram identificados no ambiente aquático em concentrações que atingem µg/L. Por meio da recarga, os aquíferos podem ser contaminados com PhACs polares como o ácido clofibrico, carbamazepina, primidona ou agentes de contraste com Iodo isotópico. Estudos realizados já detectaram a presença destes compostos em águas profundas a partir da contaminação por chorume proveniente de aterro sanitário. A contaminação observada em efluentes de ETE levaram a conclusão de que é necessário o desenvolvimento de tecnologias para remoção destes contaminantes com eficiência para que os mesmos não atinjam as ETA²⁶.

A resistência a processos convencionais de tratamento em ETE foi avaliada pelo estudo da presença de um total de 106 OWC, entre eles 25 antibióticos, em estações de tratamento de água (ETA) e nos rios que as abastecem. Dentre os OWC estudados, 70 foram encontrados, 34 em mais de 10% das amostras e 17 nas amostras de água potável (após tratamento na ETA), indicando assim que esses compostos resistem aos processos de tratamento convencionais de água. Um ponto de destaque neste estudo foi a questão da regulamentação quanto à presença destas substâncias em água potável. Até o presente momento ela é incipiente por ainda não termos dados disponíveis suficientes para que se proceda à regulamentação do descarte das mesmas. Outro fator importante levantado neste trabalho é que a ausência de alguns OWCs não necessariamente implicam sua total remoção na ETE e/ou na ETA. Os processos de tratamento podem estar transformando-os em substâncias desconhecidas ou ainda, que não temos metodologia analítica que

possa avaliar essas substâncias nas concentrações em que as mesmas se encontram no ambiente²⁷.

Um estudo realizado em uma ETE na Galícia, Espanha, avaliou a presença de 13 CFHP entre eles 2 antibióticos. Os resultados apresentaram concentrações de até 0,64 µg/L para sulfametoxazol. A remoção observada na ETE estudada variou de 70 a 90% para fragrâncias, 40 a 65% para anti-inflamatórios, aproximadamente 65% para hormônios e 60% para a sulfametoxazol. A remoção observada pode ter ocorrido por degradação ou adsorção na fase sólida. Os resultados obtidos mostram que modificações precisam ser implementadas nas ETE existentes para atender as necessidades quanto a qualidade da água potável⁹.

A aquicultura se utiliza de uma grande quantidade de antibióticos para controlar doenças bem como para promover o crescimento dos animais. Produtos farmacêuticos como a amoxicilina, flumequina, oxitetraciclina, tianfenicol entre outros são de uso comum neste tipo de confinamento animal. Desta forma, grandes quantidades de PhACs são carregados para o ambiente ficando parte retida no sedimento. Amostras de sedimento de fazenda de piscicultura apresentaram valores máximo de 246,3 µg/kg p.s.(peso seco) para oxitetraciclina e 578,8 µg/kg p.s. para flumequina. Neste estudo, flumequina e oxitetraciclina se mostraram potencialmente relevantes pois foram encontrados no sedimento e em regiões próximas do ambiente estudado. Um ponto de amostragem apresentou traços de oxitetraciclina apesar deste antibiótico não estar mais sendo usado em tratamentos há mais de 2 anos. O que levou à investigação da presença de antibióticos no meio ambiente foi a preocupação com o desenvolvimento de organismos resistentes. A disseminação de população de bactérias resistentes pode estar diretamente relacionada com a aplicação destes fármacos na aquicultura¹⁰.

A presença de 31 PhACs foi avaliada no rio Höje na Suécia. Esta região recebe a carga de uma ETE dimensionada para uma população de 80.000 habitantes. Dentre as substâncias estudadas encontramos os antibióticos timetropina e sulfametoxazol. A persistência dos mesmos entre outras substâncias nos pontos de coleta a partir do ponto de descarga da ETE indica que a sua remoção não é eficiente, isto é, a tecnologia utilizada na estação é inadequada para a remoção dessas substâncias. A eficiência calculada de

remoção para trimetropina foi de 49% e no caso da sulfametoxazol, 0%. Os resultados obtidos deixam claro que há necessidade do desenvolvimento de estudos sobre a rota destas substâncias no ambiente e da sua influência nos organismos aquáticos¹¹.

Com relação a ambientes como o tropical, até o presente momento, poucos estudos foram publicados. Uma pesquisa avaliou um total de 11 drogas polares diferentes (ácido acetilsalicílico, Ibuprofen, diclofenaco etc) na região do rio Paraíba do Sul, em alguns de seus afluentes e na baía da Guanabara no estado do Rio de Janeiro. Esta é uma região com alta descarga de estações de tratamento de esgoto (ETE). A detecção das drogas estudadas e/ou seus metabólitos nas amostras mostrou que as mesmas não são degradadas nos sistemas utilizados (filtro biológico e lodo ativado). O diclofenaco, por exemplo, foi encontrado em 7 de 8 pontos amostrados no rio Paraíba do Sul e sua concentração variou de 0,02 a 0,06 µg/L. A importância deste trabalho vem do fato de que o rio Paraíba do Sul é a principal fonte de água para o abastecimento da população do estado do Rio de Janeiro⁴.

A partir das informações relatadas, observa-se a necessidade do desenvolvimento estudos para que se amplie o banco de dados atual de forma que as seguintes questões sejam respondidas:

- (1) Como varia de acordo com a estação do ano a presença de OWCs nas fontes de água?
- (2) Como os tratamentos adotados nas ETE e ETA reduzem a concentração dos OWCs? E
- (3) Que processos físicos e/ou químicos reduzem a concentração ou eliminam os OWCs?²⁷

Enfim, esclarecer como se comportam os PhACs no meio ambiente, qual seu destino e o aporte nas diferentes regiões e climas do planeta.

2.3 Antibióticos e seu aporte ambiental

Os antibióticos podem ser considerados como substâncias “pseudopersistentes” no meio ambiente pelo fato de que possuem uma meia-vida relativamente curta, são polares, não voláteis e, devido as suas estruturas

químicas, promovem reações de alta complexidade¹². A figura 2.2 apresenta as estruturas gerais de alguns grupos de antibióticos de uso comum na medicina humana e veterinária.

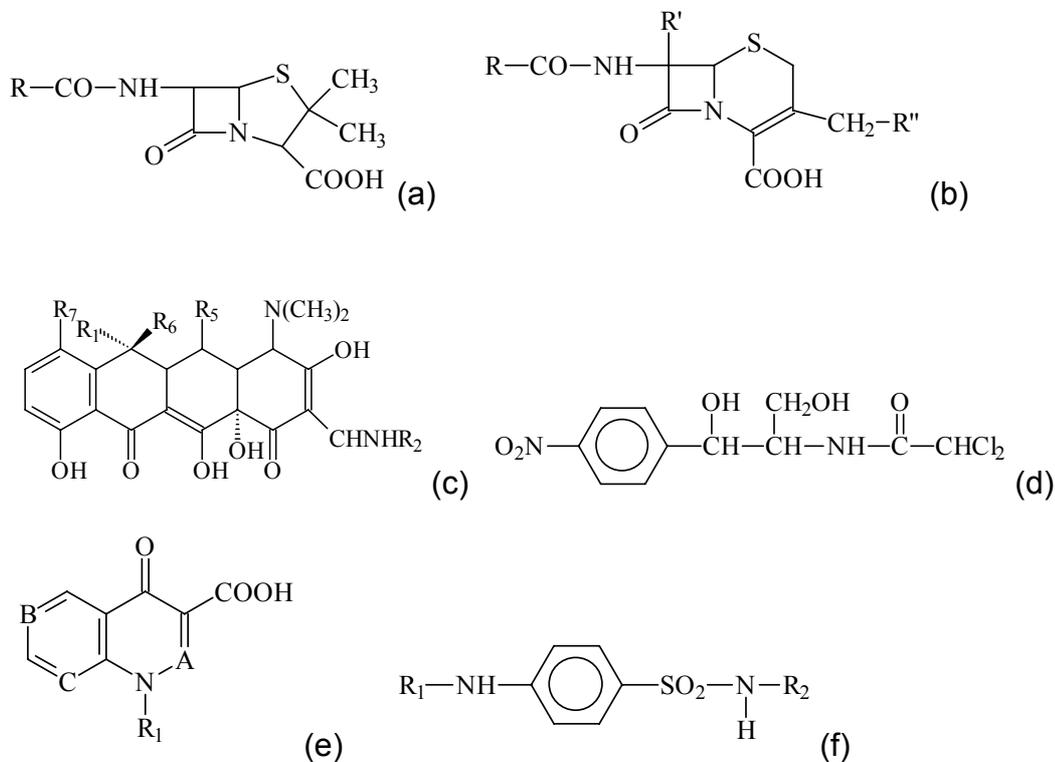


Figura 2.2: Fórmula estrutural geral das: (a) penicilinas, (b) cefalosporinas, (c) tetraciclinas, (d) cloranfenicol, (e) quinolonas e (f) sulfonamidas.

Um fato que chama a atenção observando essas estruturas é a presença de um grande número de grupos funcionais entre eles ácido carboxílico, amida, amina, álcool, cetona, enol, fenol, tiazol, nitro composto, derivados halogenados, sulfonamida entre outros, o que caracteriza a grande atividade química e biológica destas substâncias. Estes grupos funcionais fazem com que estas moléculas se liguem a partículas sólidas ou formem complexos, dependendo do pH do meio. Desta forma, podem permear o solo sendo carregadas para o lençol freático atingindo os rios e expondo os organismos aquáticos a este tipo de contaminação¹⁷.

Na medicina humana, os antibióticos beta-lactâmicos, particularmente as penicilinas e as cefalosporinas, ocupam lugar de destaque pelo fato de que juntas somam a maior quantidade de produtos biotecnologicamente produzidos

no mundo. Nas últimas cinco décadas, houve um crescimento significativo da produção, o que levou à quantidade suficiente para atender a toda população mundial. Estima-se que o mercado mundial de antibióticos beta-lactâmicos esteja em torno de US\$ 15 bilhões, dos quais aproximadamente US\$ 9,9 bilhões se referem à venda de cefalosporinas e US\$ 5 bilhões de penicilinas. Esta indústria representa a maior produção mundial de produtos biotecnologicamente fabricados e atinge aproximadamente 65% do total de antibióticos produzidos no mundo²⁸.

Em 1996 cerca de 10.200 toneladas de antibióticos foram utilizados nos Estados Unidos dos quais aproximadamente 50% na veterinária e como promotores de crescimento. Em 1999 os dados da Federação Européia de Saúde Animal mostraram que 13.288 toneladas de antibióticos foram consumidas pelos Estados Unidos e Suécia sendo que 65% para consumo humano, 29% veterinário e 6% como promotor de crescimento²⁹. No ano de 2000, os Estados Unidos produziram cerca de 16.200 t dos quais 70% foram usados em fazendas de confinamento de animais (gado, suíno, aves, peixes etc). Este total se refere a oito vezes a quantidade utilizada pela medicina humana no mesmo período²⁷.

No Brasil, no ano de 2003, a amoxicilina e seus sais ocuparam lugar de destaque na importação de farmoquímicos. Foram os produtos com maior volume de importação, atingindo um total 2,1% do total¹⁶ (Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, 2004). O Brasil conta hoje com 1032 indústrias farmacêuticas de micro, pequeno, médio e grande porte. A distribuição das mesmas pelo país encontra-se representada na figura 2.3 a seguir.

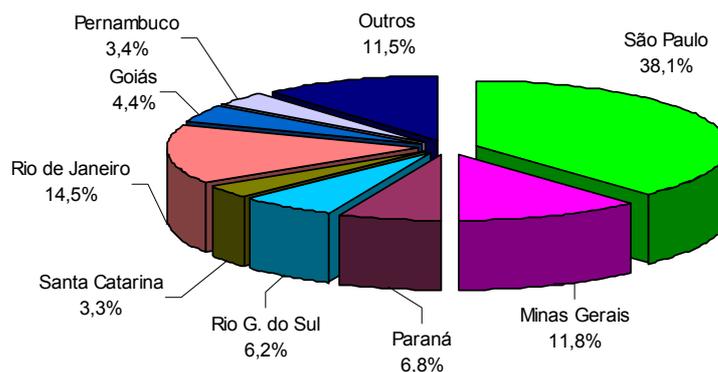


Figura 2.3: Percentual de distribuição das indústrias farmacêuticas no Brasil. Fonte: MDICE, 2004¹⁶.

Nos Estados Unidos, no ano de 2004, a amoxicilina foi o 6° produto farmacêutico mais consumido em uma lista de 300³¹, só perdendo para medicamentos para pressão e problemas cardiovasculares.

A entrada no ambiente de PPCPs ocorre a partir de uma variedade de fontes, as principais são os esgotos hospitalares, esgotos domésticos, áreas de irrigação adubadas com lodo de ETE, adubos orgânicos contendo antibióticos, infiltração a partir de tanques de piscicultura, a produção industrial, lixiviação de aterros, resíduos de processamentos de produtos alimentícios de origem animal etc³². A contaminação pela manufatura é importante pelo fato de ser localizada. A identificação da rota destas substâncias no ambiente é um ponto crucial para o entendimento dos efeitos das mesmas. A questão é bastante complexa pois, como apresentado, as fontes de contaminação são muitas⁸.

A biotransformação de compostos farmacêuticos pelos organismos nem sempre é eficiente. Essa biodegradação modifica a estrutura química bem como a atividade da molécula, que frequentemente resulta em uma mudança de comportamento físico-químico e das propriedades farmacológicas. O metabolismo destas moléculas pode frequentemente ser baixo ou incompleto, variando de 0 a 100%¹³, entrando no meio ambiente através da excreção, o que levanta uma preocupação quanto a eficiência das ETE convencionais na eliminação destes contaminantes.

Estudos realizados na Itália para substâncias excretadas não metabolizadas em quantidades significativa a partir do balanço de massa e da

razão de excreção (quantidade vendida x razão de excreção), estimam um aporte ambiental na ordem de toneladas por ano para amoxicilina, ranitidina, lincomicina e eritromicina⁶.

O conhecimento da taxa de excreção bem como da biodegradabilidade dos CFHP é importante tendo em vista o fim a que se destinam¹⁴. Agentes terapêuticos não são ambientalmente diferentes de outros compostos orgânicos tais como pesticidas e herbicidas, alguns deles mantêm sua atividade residual mesmo em bio sólidos ou no esterco animal por um longo tempo. Os bio sólidos são comumente utilizados como adubos e aplicados em terras agricultáveis, o que pode levar metais, patógenos e agentes terapêuticos para o solo, água e vegetação existente¹⁴. Alguns PhACs são utilizados em quantidades equivalentes às dos pesticidas em países como a Alemanha⁵. A tabela 2.5 apresenta dados referentes a taxas de excreção por fezes e urina de alguns agentes terapêuticos de uso humano e veterinário bem como dados referentes à sua biodegradabilidade^{5,14}.

Observando a tabela 2.5, podemos destacar os antibióticos beta-lactâmicos penicilina G com uma razão de excreção de 50 a 70% sem alteração, de 30 a 70% na forma de metabólitos e com sua biodegradabilidade considerada parcial, a amoxicilina com razão de excreção de 80 a 90% e a ampicilina de 30 a 60% sem alteração.

Estudos realizados na Alemanha mostram que só no ano de 1998, aproximadamente 412 toneladas de antibióticos foram consumidas (aproximadamente 0,5 g per capita ao ano). Tendo em vista a taxa de excreção, a quantidade prevista de entrada nas ETE foi de 305 t sendo que deste total, 73% correspondem a antibióticos beta-lactâmicos. A figura 2.4 apresenta a quantidade de antibióticos que chegam nas ETE de acordo com os grupos a que pertencem considerando a razão de excreção média de cada um¹⁵.

Tabela 2.5: Excreção e biodegradabilidade de alguns agentes de uso terapêutico.

Substância	Razão de excreção (%)		biodegradabilidade
	Sem alteração	metabólitos	
Consumo humano			
Amoxicilina	80-90	10-20	Sem dados
Ampicilina	30-60	20-30	Sem dados
Penicilina G	50-70	30-70	Parcialmente degradável
Penicilina V	~40	~60	
Eritromicina	>60		
Cloranfenicol	5-10	-	Sem dados
Clorotetraciclina	>70	-	$t_{1/2}$ = 20 dias (solo)
Oxitetraciclina	>80	-	$t_{1/2}$ = 20 dias
Sulfametaxazole	15	-	Persistente
Tetraciclina	80-90	-	Persistente
Consumo veterinário			
Ivermectin	40-75	25-60	Persistente
Tylosin	28-76	-	$t_{1/2}$ = 3-8 dias
Estreptomina	>66	-	Persistente
Virgamicina	0-31	-	Persistente
Clortetraciclina	17-75	-	$t_{1/2} \geq 64$ dias
Oxitetraciclina	20	-	$t_{1/2} > 20$ dias

Adaptada de HIRSCH *et al.*, 1999⁵ e JJEMBA, 2002¹⁴.

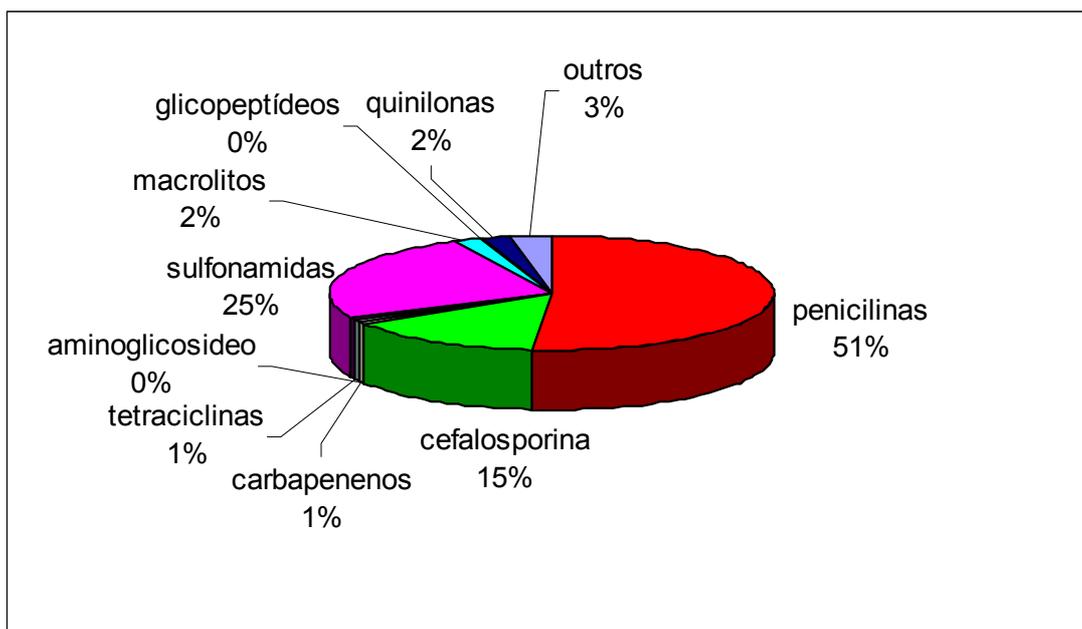


Figura 2.4: Aporte de antibióticos nas ETE da Alemanha em 1998 de acordo com consumo e razão de excreção.

Fonte: KÜMMERER E HENNINGER, 2003¹⁵.

As pesquisas de CFHP em água potável apontam para o fato de que as mesmas não são biodegradáveis e nem tão pouco eliminadas durante o processo de tratamento em ETE e/ou ETA. Os efluentes hospitalares são considerados uma fonte importante de contaminação ambiental. Drogas como analgésicos, antibióticos, lipídeo reguladores, agentes psicofarmacológicos, agentes citostáticos, meios de contraste etc já foram identificados neste tipo de efluente. Na Alemanha, em 1999, 411 t de antibióticos foram utilizadas em aplicações humanas sendo que 105 t só em hospitais. Considerando-se a razão de excreção, temos que cerca de 86 t foram descarregadas nos esgotos hospitalares. A concentração estimada de antibióticos nos efluentes hospitalares foi da ordem de 0,1 a 2,9 mg/L, encontrando-se na mesma razão da concentração semi-máxima de inibição (MIC_{50}) determinada para bactérias patogênicas sensíveis a substâncias específicas ou a grupo de substâncias. A possibilidade do desenvolvimento de organismos resistentes em filmes biológicos (isto é, em áreas com alta densidade de bactérias), como por exemplo, canos de esgoto e estações de lodo ativado precisam passar com urgência por um processo de avaliação³³.

Apesar da estrutura química bastante diferenciada para antibióticos, lipídeos reguladores, anti-inflamatórios, tranquilizantes, meios de contracepção e anti-convulsivos, eles são os PhACs mais encontrados nas ETE. A ocorrência, quantificação, potencial para biodegradabilidade etc para essas substâncias necessitam ser avaliada. Como já vimos, a responsabilidade pelo aporte dessas substâncias são os efluentes hospitalares, as descargas industriais e os esgotos domésticos. As ETE urbanas normalmente não foram projetadas para receber o volume e a diversidade de poluentes naturais e sintéticos emitidos em nível de traços. Muitos estudos mostram que a remoção de CFGP em ETE municipais varia de 60 a 90% para compostos polares³ e que esta remoção pode ser atribuída também a adsorção em superfícies sólidas. Como consequência, uma enorme quantidade de CFHP são despejados nos corpos hídricos receptores das ETE contaminando o ambiente aquático. No caso de compostos polares como, por exemplo, ácidos carboxílicos, presente nos antibióticos beta-lactâmicos; a questão é mais delicada pois o mecanismo principal de eliminação é atribuído a biodegradação e estudos mostram que nestes casos ocorre menos de 10% de degradação³⁰.

Apesar do grande consumo de antibióticos beta-lactâmicos para uso humano e veterinário, poucos estudos mostram a presença destas substâncias intactas em efluentes de esgoto domésticos, em águas superficiais ou profundas. Isto se deve a baixa estabilidade do anel β -lactama que pode ser aberto pela enzima β -lactamase produzida por bactérias e também pela hidrólise química destas substâncias. Esta possibilidade não exclui a presença destas substâncias em aquíferos nos locais onde esterco e lodo de ETE são utilizados como biossólido ou ainda em efluentes de hospitais³⁵. Há a necessidade do desenvolvimento de metodologias analíticas para antibióticos beta-lactâmicos que sejam sensíveis às concentrações encontradas em ambientes naturais e em efluentes³⁶.

Estudos com águas superficiais mostraram a presença de amoxicilina, ampicilina, mezlocilina, flucloxacilina e piperacilina em concentrações acima de 48 ng L⁻¹. Em águas de rio, amoxicilina foi detectada em concentrações próximas a 10 ng L⁻¹ neste mesmo estudo³⁷. Outros estudos realizados com águas do rio Poudre, Colorado – EUA mostraram a presença de AMP em

concentrações em torno de 11 ng L⁻¹ em áreas com grande atividade agrícola³⁶, áreas essas que utilizam biossólidos provenientes de suinocultura.

2.4 Desenvolvimento de organismos resistentes

O uso de antibióticos pelos seres humanos pode estar nos mostrando um experimento em evolução nunca antes imaginado. A partir dele estamos presenciando uma seleção natural em um tempo real. Nos últimos 50 anos temos observado o aumento do número de espécies e cepas de bactérias patogênicas e comensais resistentes a antibióticos. Inúmeros estudos nesta área estão sendo publicados. Alguns enfocam questões como o custo biológico da resistência³⁸, a evolução da resistência em organismos patogênicos³⁹, a razão da mutação bacteriana³⁸, o uso de antibióticos em hospitais e sua relação com a resistência de organismos no meio ambiente^{15,40}, o desenvolvimento de resistência de *E. coli* e Enterobacteriaceae isolada de frangos de corte⁴¹, e até o estudo de enterobactérias de roedores selvagens, animais que vivem em regiões isoladas, resistentes a amoxicilina e ampicilina⁴².

A presença de antibióticos no meio ambiente como resultado de contaminações levanta uma questão bastante preocupante, o desenvolvimento de populações de microorganismos resistentes. A atividade biológica dos antibióticos tem como objetivo inibir o crescimento de bactérias, isto ocorre quando concentrações consideradas altas dessas substâncias são ministradas e destroem totalmente as populações. Quando a concentração é relativamente baixa, na ordem de ng/L ou µg/L, há a possibilidade do desenvolvimento de linhagens resistentes. As conseqüências da presença de concentrações a este nível no ambiente ainda são pouco conhecidas, já que a pesquisa nesta área é incipiente. Alguns estudos mostram que a transferência de resistência apresentada por bactérias em laboratório pode ocorrer da mesma forma no ambiente natural⁴³. Estudos com *E. coli*³⁹, *Ps. Putida*²⁰ e *Acinetobacter spp*⁴⁵ avaliam o padrão de resistência desses organismos, isolados de efluentes de estações de tratamento de esgotos com descarga hospitalar, a antibióticos do grupo da penicilina. Estes estudos concluem que as bactérias isoladas são

resistentes e que este tipo de contaminação pode contribuir para com a disseminação das mesmas no meio ambiente.

A biodegradabilidade de antibióticos é um estudo importante para que se tenha uma idéia do comportamento dos mesmos em uma ETE de lodo ativado ou ainda em um filtro biológico. Os antibióticos ciproflaxacina, oflaxacina e metronidazole foram avaliados quanto a sua biodegradabilidade utilizando-se do método CBT (Close Bottle test, OECD 301D) e genotoxicidade (SOS chromotest) em uma ETE simulada. Os resultados obtidos mostraram que os antibióticos não se degradam biologicamente de acordo com o CBT, logo a sua genotoxicidade não foi eliminada. Os processos como adsorção, hidrólise ou degradação ocorreram em larga escala, necessitando desta forma mais investigações para que se possa entender o caso ⁴⁶.

A avaliação da presença de organismos resistentes a antibióticos em rios que recebem o aporte de ETE de tratamento de efluentes hospitalares ou ainda outras fontes de contaminação como as plantas de produção de antibióticos são fundamentais para a compreensão do comportamento destas substâncias no meio ambiente. Um estudo importante investigou a resistência a antibióticos utilizando a *Acinetobacter* spp. (organismo conhecido por disseminar infecções hospitalares) como bactéria indicadora. As mesmas foram isoladas no rio que recebe o aporte de 2 ETE, uma com carga de esgoto hospitalar e outra que recebe efluente de planta de produção de antibióticos. Os pontos de coleta selecionados encontravam-se abaixo do ponto de descarga de duas ETE. As bactérias foram coletadas, incubadas, replicadas e isoladas a partir de um procedimento de enriquecimento seletivo. A quantidade de organismos isolados neste ponto do trabalho foi de 180 cepas provenientes das amostras da ETE hospitalar e 205 provenientes da ETE da planta industrial. Seis agentes antimicrobianos foram usados como representantes das diferentes classes de antibióticos: amoxicilina, oxitetraciclina, cloranfenicol, sulfametaxozole, gentamicina e ciproflaxacina. O comportamento resultante com relação a percentagem de organismos resistentes as drogas estudadas, encontra-se na tabela 2.6 ⁴⁵.

Tabela 2.6: Predominância de resistência a antibiótico de cepas de *Acinetobacter* proveniente de esgoto hospitalar e de planta farmacêutica.

% de resistentes às drogas		
Droga	Hospital	Planta farmacêutica
Amoxicilina	3,1	31,6
Ciprofloxacina	0	0
Gentamicina	3,1	12,3
Cloranfenicol	26,6	61,4
Oxitetraciclina	12,5	61,4
Sulfametaxozol	4,7	57,9

Fonte: GUARDABASSI *et al.*, 1998⁴⁵.

A alta percentagem de resistentes entre as cepas provenientes da planta farmacêutica é preocupante, chegando a ser dez vezes maior do que os de origem hospitalar.

Uma outra observação com relação ao trabalho citado é o fato de que as cepas isoladas apresentaram múltipla resistência aos antibióticos. A tabela 2.7 a seguir apresenta estes resultados⁴⁵.

Tabela 2.7: Predominância de multipla resistência a antibiótico de cepas de *Acinetobacter* proveniente de esgoto hospitalar e de planta farmacêutica.

% de isolados com o fenótipo		
Fenótipo	Hospital	Planta farmacêutica
Sensível	64,1	8,8
Resistente a um antibiótico	29,7	28,1
Resistente a dois antibióticos	1,6	24,6
Resistente a três ou mais antibióticos	4,7	38,6

Fonte: GUARDABASSI *et al.*, 1998⁴⁵.

Conclui-se com esses resultados que o uso indiscriminado de antibióticos pode romper o balanço microbiano natural em favor das bactérias resistentes e que, no caso particular das plantas farmacêuticas, seus efluentes podem levar a seleção de bactérias resistentes no próprio esgoto. Em se

pensando no possível impacto ecológico gerado pelos resíduos da produção de agentes antimicrobianos, há a necessidade do desenvolvimento de mais pesquisas que permitam avaliar a disseminação de organismos com genes resistentes a antibióticos no meio aquático⁴⁵.

A avaliação da resistência de *E. coli* a antibióticos isolada em diferentes ETE municipais amplia o entendimento quanto ao desenvolvimento de organismos resistentes nestes ambientes. Em um estudo, 767 *E. coli* foram isoladas e sua resistência a 24 antibióticos diferentes foi testada. Dentre eles ampicilina, amoxicilina, gentamicina, tetraciclina e cefalosporina. Os organismos foram selecionados a partir da coleta em 5 pontos diferentes a saber: entrada do esgoto bruto, tanque de lodo ativado, efluente da ETE, corpo receptor antes da descarga, corpo receptor após a descarga e lodo prensado. Os resultados obtidos mostraram que *E. coli* apresentou resistência a 16 dos 24 antibióticos estudados, isto é, para 33% dos organismos os antibióticos se mostraram 100% efetivos. Em específico para as penicilinas a resistência apresentada foi de 18%, para as cefalosporinas de 11% e para as quinolonas de 2%⁴⁴.

Não se encontra até o presente momento na literatura estudos de resistência a antibióticos desenvolvidos com organismos isolados em regiões tropicais. Não há informações sobre a atividade biológica dos PPCPs nestas regiões. Ainda é incipiente a quantidade de dados sobre a ecotoxicologia de fármacos e seus metabólitos. Há a necessidade do desenvolvimento de pesquisas nesta área pois a questão do desenvolvimento de organismos resistentes é bastante preocupante. A seletividade natural favorece esses organismos, o que faz com que seu código genético seja repassado e esta alteração é irreversível.

2.5 Degradação de contaminantes orgânicos por POA

A crescente demanda por produtos industrializados levou a necessidade do desenvolvimento de tecnologias para a destruição ou desintoxicação de efluentes com OWCs. Os processos oxidativos avançados estão sendo

exaustivamente estudados para uma diversidade de substâncias visando a mineralização das mesmas.

A importância dos POA pode ser observada a partir do crescente número de pesquisas publicadas a partir da década de noventa (1990) envolvendo uma diversidade de compostos químicos. A tabela 2.8 apresenta algumas substâncias estudadas. As pesquisas centram-se em compostos utilizados em indústrias têxteis, de papel e nos poluentes orgânicos persistentes (POP). Com relação aos compostos farmacêuticos, ainda carecemos de estudos específicos.

Tabela 2.8: Estudos de degradação de compostos químicos por POA.

Substância estudada	Referência
Corantes ^{48,49}	RODRIGUEZ <i>et al.</i> , 2002, KANG <i>et al.</i> , 1999
Pigmentos ⁴⁷	KANG <i>et al.</i> , 1999
Organoclorados ^{50,51,47}	CHAMARRO <i>et al.</i> , 2001, TROVÓ <i>et al.</i> , 2005, PIGNATELLO, 1992
BTX ^{52,53}	SAFARZADEH-AMIRI <i>et al.</i> , 1997; TIBURTIUS <i>et al.</i> , 2005
aminas aromáticas ⁵⁴	CASERO <i>et al.</i> , 1997
Chorume ⁵⁵	LANGE <i>et al.</i> , 2007
compostos farmacêuticos ^{56,57,58,59,60,61,62}	ZWIENER <i>et al.</i> , 2000; DOLL <i>et al.</i> , 2003, LOPEZ <i>et al.</i> , 2003; HUBER <i>et al.</i> , 2003; ANDREOZZI <i>et al.</i> , 2005; TERNES <i>et al.</i> , 2003, TROVÓ <i>et al.</i> , 2008
derivados aromáticos ⁵⁰	CHAMARRO <i>et al.</i> , 2001
compostos biorecalcitrantes em efluentes de indústria têxtil ⁴⁸	RODRIGUEZ <i>et al.</i> , 2002
produtos de higiene pessoal ⁵⁵	TERNES <i>et al.</i> , 2003
Fenol ⁶³	WILL <i>et al.</i> , 2004
Herbicidas ⁵¹	TROVÓ <i>et al.</i> , 2005

Herbicidas organoclorados como 2,4-D e 2,4,5-T foram tratados com reagente de Fenton e Fenton/Fe³⁺ com e sem radiação UV. A degradação com irradiação a 300 nm se mostrou mais eficaz, levando ao desaparecimento dos herbicidas em menos de 2 h de reação. Este processo foi sensível a pH e altas concentrações de H₂O₂ e promoveram a mineralização total dos contaminantes estudados⁴⁷.

A degradação de BTX (benzeno, tolueno e xileno) em água foi avaliada comparando-se os POAs foto-peroxidação, foto-Fenton e foto-degradação mediada por oxalato de Ferro (III). A degradação que se mostrou mais eficiente foi a que utilizou foto-degradação mediada por oxalato de Ferro (III). A degradação destes POPs foi total em um período de 30 min de reação. Em termos de consumo de energia, kWh, este processo também mostrou-se mais eficiente que os demais⁵².

Um estudo para medir a eficiência da conversão de aminas aromáticas cancerígenas presentes em efluentes líquidos em produtos por clivagem do anel, foi realizado utilizando-se reagente de Fenton. O tratamento oxidativo realizado durante 1 h à temperatura ambiente mostrou uma taxa de remoção que variou em torno de 99,9%. A tabela 2.9 apresenta estes resultados⁵⁴.

Tabela 2.9: Eficiência de conversão de aminas cancerígenas em produtos degradados utilizando reagente de Fenton

Amina	Eficiência de remoção (%)
o-dianisidina	99,99
1-naftilamina	99,97
2-naftilamina	99,95
3,3'-diclorobenzidina	99,99
p-anisidina	99,85
4-cloroanilina	99,74
2,4-diaminotolueno	99,99
o-tolidina	99,88
anilina	99,93

Fonte: CASERO *et al.*, 1997⁵⁴.

Com o objetivo de comparar diferentes métodos de oxidação, um estudo entre a foto-peroxidação, reagente de Fenton e foto-Fenton foi aplicado para efluentes de uma planta de manufatura de corantes. A remoção de cor e da DQO deste efluente foram os parâmetros utilizados para avaliação. Em 2 horas de reação, a oxidação por foto-Fenton levou a uma remoção de 80% na DQO e 90% na cor⁴⁹.

O balanço de massa das concentrações dos produtos farmacêuticos presentes no afluente e no efluente de uma ETE mostra que os mesmos não são removidos com os tratamentos atualmente utilizados. A presença de fármacos como AAS, Ibuprofen, diclofenaco, ácido clodibrico, e ácido fenofíbrico em águas profundas e superficiais confirmam esta questão²⁶. Estudos da oxidação destes fármacos utilizando POA desenvolvidos como novas tecnologias para o tratamento de efluentes. Um estudo realizado nas águas do rio Ruhr, na Alemanha, que recebe carga de ETE, mostrou que a percentagem de redução a partir de reação com O₃ (5,0 mg/L) e H₂O₂ (1,8 mg/L) durante 10 min, em amostras de águas superficiais contaminadas, foi de 92% para o ácido clofibrico, 88% para ibuprofen e 3,2% para o diclofenaco⁵⁶.

Todos os trabalhos apresentados indicam para a possibilidade do uso de POA como tratamento mas não como único, há a necessidade da combinação com tratamentos físicos e/ou biológicos pois o rendimento para cada caso é bastante variável, como pode ser observado.

2.6 OWCs: antibióticos penicilânicos

Os efluentes de uma indústria farmacêutica são provenientes dos processos de lavagem das linhas de produção e se caracterizam por baixo fluxo e pequena carga poluidora. Ocorre que os efluentes gerados na formulação de antibióticos têm baixa biodegradabilidade e praticamente uma única substância ativa. Isto se deve ao fato de que a linha de produção de penicilânicos é isolada das demais linhas industriais e sua carga de efluentes é descarregada em um reservatório exclusivo. Como os antibióticos são compostos bioinibidores, há a necessidade de um pré-tratamento químico para estes efluentes antes de sua descarga em uma estação de lodo ativado⁶⁴.

2.6.1 Degradação de antibióticos penicilânicos utilizando POA

Diversas técnicas de oxidação estão sendo avaliadas atualmente com relação a degradação de antibióticos penicilânicos. Degradações utilizando O_3 , O_3/H_2O_2 e reagente de Fenton têm sido descritas na literatura.

A degradação de antibióticos de uso humano (penicilina VK, ceftriaxona sódico) e veterinário (enroflaxina), usando O_3 e O_3/H_2O_2 foi avaliada utilizando-se amostras sintéticas das formulações. As substâncias ativas presentes nestas amostras foram a penicilina VK (grupo das penicilinas), a enrofloxacin (grupo das quinolonas) e o ceftriaxona sódico (grupo das cefalosporinas). O efeito do pH, da DQO inicial e da concentração de H_2O_2 foram medidos e a concentração de O_3 foi mantida constante, na ordem de 2,96 g/h. A redução de DQO, em pH=7, foi de 74% para ceftriaxone sódica, 69% para penicilina VK e 88% para enroflaxina. Os resultados obtidos mostraram que a ozonização é um bom método para uso como pré-tratamento de efluentes em pH neutro⁶⁴.

Os efluentes da produção industrial de amoxicilina triidratada (AMX) foram estudados com o objetivo de avaliar a sua degradação frente aos oxidantes ozônio e ozônio/peróxido de hidrogênio em diferentes pH. Avaliou-se também a capacidade de degradação dos resíduos da oxidação por tratamento biológico. O parâmetro utilizado para este estudo foi a remoção da DQO. Para avaliação da biodegradabilidade a razão DBO_5/DQO foi utilizada como parâmetro. A DQO inicial deste efluente é de 830 mg de O_2/L e seu pH = 6,9. Os estudos de degradação ocorreram durante o período de 1 h e a concentração de O_3 utilizada foi de 2.500 mg/(L h). Os resultados obtidos mostraram que o melhor rendimento (remoção de DQO) foi para a oxidação com O_3/H_2O_2 , 82%, com o uso de 2,0 mM de H_2O_2 em pH = 10,5 (tamponado). Para este caso, a biodegradabilidade, DBO_5/DQO , variou de 0,02 (t= 0 min) a 0,45 (t= 360 min) indicando a possibilidade de tratamento biológico⁶⁵.

Um outro estudo mostra a avaliação do uso dos POA fotólise, ozonização, fotoozonização, fotoperoxidação, reagente de Fenton, foto-Fenton, Fenton/ Fe^{3+} e foto-Fenton/ Fe^{3+} na degradação de efluente da produção industrial de AMX em diferentes pH. O parâmetro usado para avaliar a degradação foi a DQO e a biodegradabilidade DBO_5/DQO . As características

iniciais do efluente são: pH= 6,95, DQO= 1.555 mg O₂/L, DBO₅= 0 mg. O₂/L. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 2.10.

Tabela 2.10: Resultados obtidos a partir da degradação por diferentes POA de efluente industrial da produção de AMX.

Processo de oxidação	DBO ₅ /DQO	Remoção de DQO (%)
Efluente <i>in natura</i>	0,000	0
O ₃ / pH=3	0,083	15
O ₃ / pH=7	0,080	28
O ₃ / pH=11	0,078	49
Fotólise/ pH=7	0,000	0
H ₂ O ₂ (40mM)/ pH=7	0,009	11
H ₂ O ₂ (30mM)/ pH=7	0,007	22
Foto-Fenton/ pH=3	0,007	56
Foto-Fenton/Fe ³⁺ / pH=3	0,045	66
Fenton/ pH=3	0,010	61
Fenton/Fe ³⁺ /pH=3	0,008	46

Fonte: ARSLAN-ALATON *et al.*, 2004⁶⁵.

Os resultados obtidos mostraram uma baixa biodegradabilidade dos resíduos gerados pela oxidação do efluente de AMX. Estudos com o substrato ativo (AMX) mostraram uma remoção de COT na ordem de 56% utilizando-se foto-Fenton em pH=3, indicando a remoção do ingrediente ativo AMX nestas condições. Maiores investigações sobre o comportamento dos resíduos da degradação por POA em uma estação de lodo ativado precisam ser realizados para obter resultados mais confiáveis⁶⁵.

A degradação por Fenton/Fe³⁺ e foto-Fenton/Fe³⁺ bem como a toxicidade dos resíduos gerados foi avaliada para a formulação do antibiótico injetável penicilina G. A melhor taxa de remoção da DQO foi obtida para o foto-Fenton/ Fe³⁺, 56%, nas seguintes condições experimentais: [Fe³⁺] = 1,5 mmol L⁻¹, [H₂O₂] = 25 mmol L⁻¹, pH=3, DQO₀ = 585 mg O₂/L, para um tempo de tratamento de 30 min. A biodegradabilidade, BDO₅/DQO, também foi avaliada e atingiu 0,45 após aplicação do foto-Fenton/ Fe³⁺, o que mostra boa degradação

biológica para os resíduos formados. Com relação a redução de COT, uma redução de 42% foi obtida após tratamento oxidativo. Como os efluentes da produção de antibióticos contêm altas concentrações de compostos refratários, eles podem inibir a atividade do processo de lodo ativado e provocar efeitos tóxicos nos organismos aquáticos dos corpos de água onde são lançados após o tratamento. Um estudo de toxicidade aguda para *Daphnia magna* nas condições experimentais propostas para o foto-Fenton/ Fe^{3+} , não indicou toxicidade aguda levando a conclusão de que este é um pré-tratamento adequado para este tipo de efluente ⁶⁶.

Um outro estudo para efluente da penicilina G injetável objetivou avaliar a degradação do mesmo utilizando ozonização e peroxiozonização. Também foi feito um estudo de biodegradabilidade e toxicidade aguda para os resíduos gerados pela degradação além de avaliar a capacidade de inativação do lodo ativado pelos mesmos. Os resultados obtidos mostraram que os efluentes da formulação de antibióticos são uma preocupação devido ao potencial tóxico e alta resistência a degradação por microorganismos. Esta alta resistência e toxicidade podem ser minimizadas por diferentes processos químicos utilizados como tratamento combinado. Os resultados mostraram que a peroxiozonização conduzida a pH=7 e com concentração inicial de H_2O_2 de 10 mmol L^{-1} , levou a melhor razão DBO_5/DQO , mas este tratamento não remove completamente a toxicidade, logo não garante um bom rendimento na estação de lodo ativado ⁶⁷.

2.7 Investigação de efeitos tóxicos e mutagênicos

Os efluentes industriais e domésticos são caracterizados como misturas complexas entre compostos orgânicos e inorgânicos. Essa complexidade não permite que se determine a nocividade dos mesmos baseando-se apenas em análises químicas. O desenvolvimento de sistemas-teste biológicos, combinados com análises químicas, permitem o levantamento de dados com base científica que levam a regulamentação da descarga de substância potencialmente perigosas no meio ambiente ⁶⁸.

A introdução do sistema-teste *Allium cepa* para a avaliação de efeitos citogenéticos ocorreu em 1938. Desde então, este sistema têm sido usado

largamente como material biológico para ensaios em laboratórios devido ao rápido crescimento de suas raízes e também da resposta do material genético na presença de substâncias com potencial citotóxico e genotóxico em soluções aquosas ^{69,70,71,72}.

O sistema teste *Allium cepa* é adequado para se avaliar a genotoxicidade em efluentes industriais. Se o sistema for aplicado a misturas complexas de substâncias com níveis tóxicos desconhecidos é recomendada a medida do crescimento radicular após a avaliação da genotoxicidade ⁶⁸. A inibição do crescimento das raízes no *Allium cepa* é um método adequado para avaliar-se a presença de substâncias tóxicas em diferentes concentrações. A simplicidade desse teste é uma das razões que fez com que as agências internacionais de proteção ao meio ambiente o recomendassem como método para estimar a poluição e toxicidade causada por efluentes industriais e domésticos. O efeito macroscópico no crescimento das raízes de *A. cepa* podem ser claramente observados em água de rio dopada com íons Cu, Zn e Pb⁷¹.

Com relação ao potencial tóxico de uma substância, alguns autores se utilizam da Diretiva Norte-Americana 93/67/EEC para interpretar a questão. Esta Diretiva adota a seguinte classificação de acordo com a EC₅₀ (menor concentração que elimina 50% dos organismos) ¹²:

EC₅₀ < 1 mg/L => muito tóxico

1 mg/L < EC₅₀ < 10 mg/L => tóxico

10 mg/L < EC₅₀ < 1 g/L => perigoso para organismos aquáticos

Estudos utilizando bactérias e algas como bioindicadores de toxicidade mostraram com base na Diretiva 93/67/EEC, que os antibióticos oflaxacina, eritromicina, clortetraciclina, oxitetraciclina e tilosina encontram-se na classe de muitos tóxicos. Esse estudo conclui que efluentes de ETE descartados sem um tratamento adequado podem causar efeitos adversos nos organismos aquáticos ¹¹.

O controle do descarte de efluentes líquidos no corpo receptor é estabelecido, no Brasil, por legislação federal, CONAMA 357/05⁷³, que especifica as substâncias e padrões numéricos de emissão. Ao se considerar a grande quantidade de substâncias passíveis de serem lançadas no ambiente aquático por atividades industriais, verifica-se que o número é muito maior do

que as que foram estabelecidas pela legislação. A identificação e detecção de todas as substâncias presentes em efluentes de natureza química complexa é inviável tanto analítica quanto economicamente. Ainda que padrões fossem estabelecidos, não seria possível estimar os efeitos que essas substâncias apresentam sobre a biota aquática⁷⁴.

O controle de efluentes complexos pode ser realizado através de testes de toxicidade. Neste teste, organismos são expostos a várias concentrações do efluente, verificando-se o efeito do mesmo sobre os organismos-teste. Este efeito traduz o resultado final das ações aditivas, antagônicas e sinérgicas das substâncias biodisponíveis que os compõem⁷⁴.

Enquanto as análises químicas identificam e quantificam as substâncias que compõem um efluente os testes de toxicidade avaliam o efeito do efluente sobre sistemas biológicos que reagem a uma situação global, isto é, ao efluente como um todo. As vantagens dos testes de toxicidade são: possibilidade de ser avaliada a toxicidade conjunta de todos os constituintes de um efluente de natureza química complexa; possibilidade de se avaliar a redução do efeito tóxico ao se limitar a um único parâmetro (toxicidade), a possibilidade de também se avaliar a biodisponibilidade e as interações dos constituintes e de se obter o fator de diluição que promoverá a redução da toxicidade, mesmo sem o conhecimento exato de quais ou quantas substâncias estão sendo geradas⁷⁵.

Apesar da dificuldade de se estabelecer uma relação entre contaminantes do meio ambiente e espécies vivas a comunidade científica admite que a saúde humana depende diretamente da saúde do ambiente e que a contínua degradação desse meio ameaça a qualidade de vida da população.

Muitos organismos são atualmente utilizados como bioindicadores da avaliação de possíveis contaminantes de origem naturais ou provocadas pelo homem. Em ambientes aquáticos são utilizados moluscos, vermes bentônicos, esponjas, anfíbios e peixes. Em ambientes terrestres, aquáticos, e na atmosfera tem se usado plantas como *Tradescantia*, *Allium cepa* e *Vicia faba*⁷⁶.

A toxicidade aguda e crônica pode ser avaliada utilizando-se crustáceos como a *Daphnia magna*, a *Artemia salina*, peixes como o *Brachydanio rerio* além de algas diversas. Estudos com esses organismos são fundamentais

para, por exemplo os antibióticos, pois os mesmos são solúveis em água, biologicamente ativos, com baixa biodegradabilidade, potencialmente bioacumulativos e persistentes no ambiente ⁷⁷. Drogas com estas características podem exercer efeitos nos organismos terrestres e aquáticos quando liberadas no meio ambiente.

A avaliação de drogas como tetraciclina, oxitetraciclina, estreptomicina, bacitracina, eritromicina, flumequina entre outras de uso veterinário foram realizadas e mostraram potencial tóxico quanto a reprodução de organismos como a *Daphnia magna* ⁷⁷.

Para *Artemia salina*, estudos de toxicidade aguda mostraram que EC₅₀ foram encontrados para concentrações de 34,06 mg/L de bacitracina e de 283,1 mg/L de limcomicina ⁷⁸.

Estudos utilizando bactérias e algas como bioindicadores de toxicidade, mostram que os antibióticos oflaxacina, eritromicina, clortetraciclina, oxitetraciclina e tilosina encontram-se na classe de muitos tóxicos. Este estudo conclui que efluentes de ETE descartados sem um tratamento adequado podem causar efeitos adversos nos organismos aquáticos ¹².

Entre os bioensaios de mutagênese, as plantas apresentam uma série de vantagens, com relação ao uso de animais entre elas: (a) as técnicas de detecção de mutagênese são de rápida execução e de baixo custo; (b) o tempo de geração de muitas plantas é curto, o que permite verificar os efeitos em gerações subseqüentes; (c) vários indicadores podem ser usados, como, por exemplo, variações cromossômicas, mutações gênicas, alterações foliares, no embrião e nos grãos de pólen; (d) os modelos utilizados para análise de alterações cromossômicas apresentam cromossomos grandes, o que tornam estes modelos convenientes para análise citogenética; (e) podem ser usadas para estudos *in situ* ou *ex situ*; (f) vários estudos mostram correlação positiva entre os efeitos observados nas plantas e aqueles observados em modelos de mamíferos, o que facilita a detecção de genotoxicidade, uma vez que a utilização de modelos animais faz-se, muitas vezes, complexa, mais dispendiosa e demorada; (g) constituem testes altamente sensíveis (poucos falso-negativos) na predição de genotoxicidade ⁷⁹.

O *Allium cepa* tem sido indicada como um eficiente organismo-teste de citotoxicidade e mutagenicidade, devido às características que possui na sua

cinética de proliferação, pelo crescimento rápido de suas raízes, pelo grande número de células em divisão, pela sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, pela sua disponibilidade durante o ano todo, pelo seu fácil manuseio e por possuir cromossomos em número reduzido ($2n=16$) e de grande tamanho⁷⁰. O uso do *Allium cepa* tem crescido, principalmente para o monitorar os impactos derivados de emissão de efluentes em rios⁸⁰. A contagem da incidência de aberrações cromossômicas e de micronúcleos em células de meristemas radiculares fornece um método fácil para se estudar os efeitos de diferentes agentes mutagênicos como compostos de mercúrio, selênio, zinco e cádmio, bem como de pesticidas^{70,76,81}.

Os resultados positivos obtidos pelo teste de *Allium cepa* devem ser considerados como uma indicação de que a substância química testada também pode causar danos biológicos em outros organismos⁷⁰.

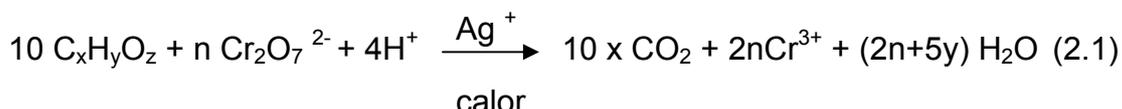
A *Artemia salina* é um pequeno crustáceo da ordem Anostraca. Esse crustáceo tem sido utilizado em testes de toxicidade devido a possibilidade de avaliar efeitos de um contaminante em um organismo sob condições controláveis, permitindo a comparação com diferentes contaminantes ou espécies testadas. A eficiência deste teste reside no fato de o mesmo ser simples, de baixo custo e de fácil implantação como ensaio de rotina. Esse teste minimiza os problemas de ordem biológica, técnica e de custo pois os cistos secos para eclosão são fáceis de serem obtidos⁸².

A resposta rápida desse organismo a substâncias químicas ou de misturas complexas permite o uso *Artemia salina* em testes de toxicidade. A avaliação da eclosão, letalidade e comportamento locomotor e morfológico desse organismo frente a quatro inseticidas ((1) O,S-dimetil acetil fosforamidotioato; (2) O,O-dietil-3,5,6-tricloro-2piridil fosforotioato; (3) dimetil(E)-1-metil -2-(metilcarbonil)vinil fosfato; (4) O-(4-bromo-2-clorofenil)O-etil-S-propil fosforotioato) provou que o ensaio pode ser considerado simples e preciso na determinação de toxicidade⁸³.

2.8. Biodegradabilidade

Os processos de tratamento biológico de um efluente ocorrem por mecanismos biológicos envolvendo consórcios de microorganismos que realizam reações de oxidação e/ou redução com alta eficiência e baixo custo. Estes processos reproduzem os processos naturais que ocorrem em um corpo receptor após o lançamento dos despejos. Em uma ETE de lodo ativado as reações de oxi-redução se desenvolvem em condições controladas e em taxas mais elevadas de eficiência⁸⁴. Embora a oxidação da matéria orgânica seja uma maneira barata de minimizar o impacto dessas substâncias no ambiente, nem sempre o uso dessa tecnologia é possível. Isso acontece porque muitas moléculas não são biodegradáveis, isto é, não são assimiladas biologicamente ou podem ser tóxicas aos microorganismos⁸⁵.

A tratabilidade biológica de um efluente é avaliada pela demanda bioquímica de oxigênio (DBO₅). A DBO₅ retrata a quantidade de oxigênio requerida para estabilizar, por meio de processos bioquímicos, a matéria orgânica. É uma indicação indireta do carbono orgânico biodegradável⁸⁶. Por outro lado, a recalcitrância dessa mesma carga orgânica pode ser avaliada pela demanda química de oxigênio (DQO), que é obtida após oxidação drástica em meio ácido (equação 2.1).



Onde $n = 4x + y - 2z$

Para um efluente, sob condições normais, a relação DQO/DBO permite tirar-se conclusões sobre sua biodegradabilidade e portanto, do processo de tratamento a ser dotado.

Para um dado efluente, se a relação $DQO/DBO_5 < 2,5$ o mesmo é facilmente biodegradável. Se a relação $5,0 < DQO/DBO_5 < 2,5$ este efluente irá exigir cuidados na escolha do processo biológico para que se tenha uma remoção desejável de carga orgânica e se $DQO/DBO_5 > 5$, então o processo biológico tem pouca chance de sucesso, e a oxidação química aparece como um processo alternativo (Figura 2.5)⁸⁵.

Alguns autores consideram a razão DBO_5/DQO como parâmetro para avaliação da biodegradabilidade. A razão $DBO_5/DQO \geq 0,5$ indica degradação

biologia rápida ⁸⁷, para valores menores do que 0,5 possivelmente substâncias químicas recalitrantes estejam presentes ^{50,87}.

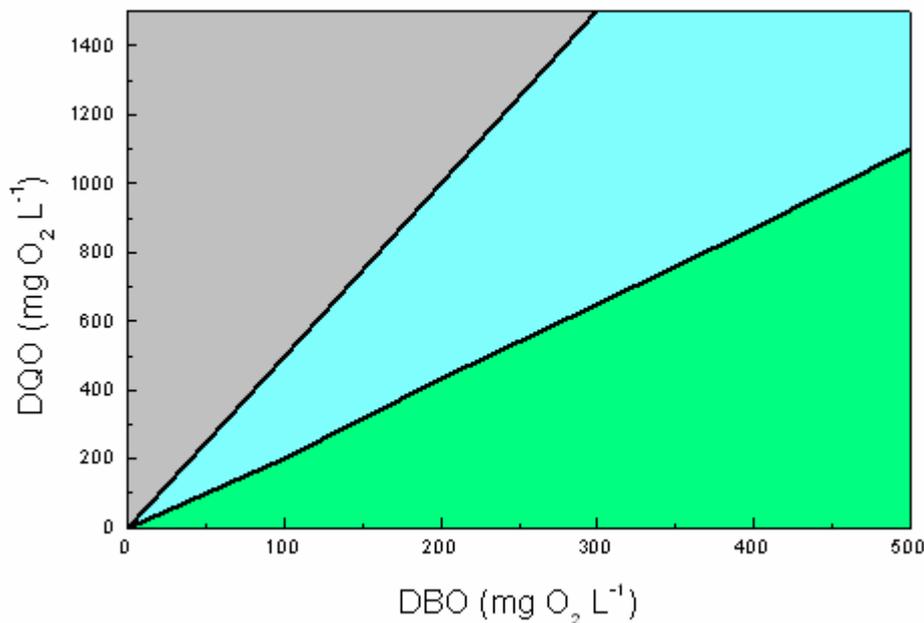


Figura 2.5: Valores de DQO e DBO indicativos da tratabilidade de um efluente: ■ biorefratário, ■ pode ser biodegradável e ■ biodegradável.

Fonte: JARDIM e CANELA, 2004⁸⁵.

2.9. Produção de antibióticos beta-lactâmicos e tratamento do efluente gerado

Em termos industriais, no Brasil, a produção de antibióticos utiliza a formulação como processo predominante. Este processo gera quantidades moderadas de efluentes dependendo da variação operacional de produção, influenciando dessa forma na qualidade e quantidade dos efluentes gerados. O processo de formulação de antibióticos como AMX e AMP (figura 2.6) leva a um aumento da concentração de PhACs nos efluentes, tornando os sistemas de tratamento com lodo ativado inadequados e aumentando a toxicidade desse efluente para os organismos aquáticos dos corpos d'água receptores ^{16,46,77,88}.

A química dos antibióticos penicilânicos é dominada pelas reações do anel carbonila altamente reativo β-lactama, normalmente pela promoção de

ataques nucleofílicos. A presença de grupos elétron-retirantes ao lado da carbonila β -lactâmica é que leva a ativação para um ataque nucleofílico⁸⁹.

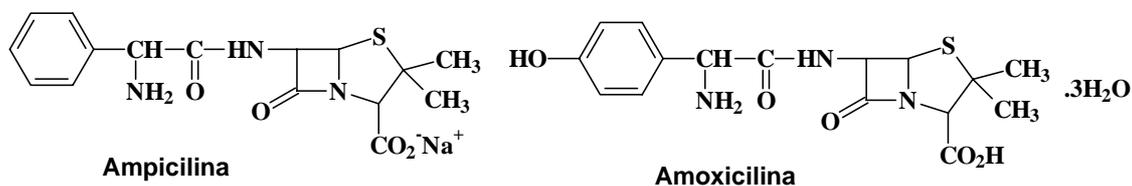


Figura 2.6: Estrutura da ampicilina (AMP) e da amoxicilina (AMX)

A hidrólise em meio ácido ou em meio básico das penicilinas promove a abertura do anel β -lactama. A figura 2.7 apresenta a hidrólise ácida e básica para a penicilina^{89,90}.

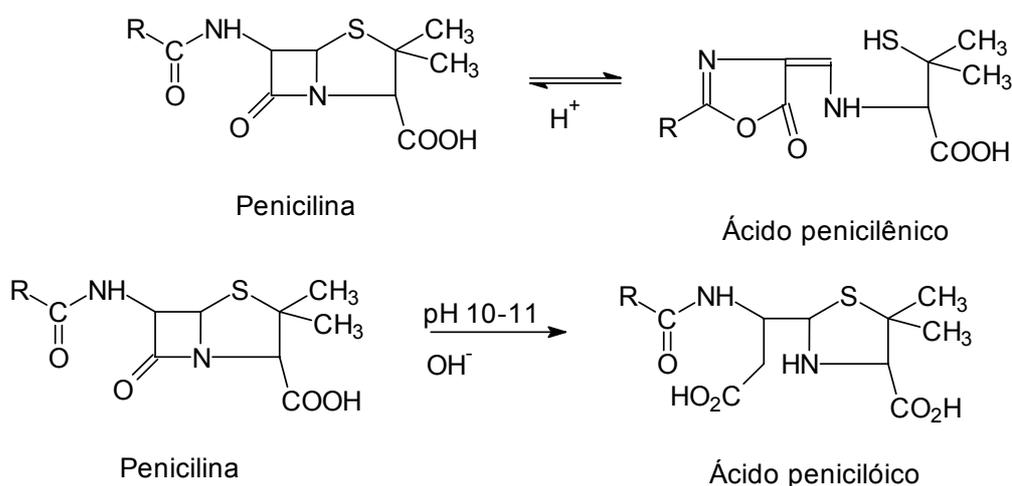


Figura 2.7: Produtos da hidrólise ácida e básica das penicilinas.

Fonte: Arnott, 1995⁸⁹ e SOLOMONS, 1996⁹⁰.

As indústrias farmacêuticas produtoras de formulações para antibióticos como AMX e AMP, utilizam o método de hidrólise básica como forma de pré-tratamento de seus efluentes da linha de produção antes de descartá-los em suas ETE. As ETE normalmente utilizam tratamento biológico (lodo ativado), pois não há legislação específica para o tratamento desse tipo de efluente, somente uma indicação de inativação da substância.

Com relação ao processo de hidrólise básica, não se têm informações quanto ao seu rendimento à temperatura ambiente nem tão pouco quanto à questão da contaminação ambiental por mercúrio (Hg) presente no hidróxido

de sódio (NaOH) comercial utilizado na reação. A reversibilidade da reação em função da atividade do lodo ativado e dos processos fotoquímicos que ali ocorrem não se encontra descrita na literatura.

2.10 LEGISLAÇÃO AMBIENTAL

O Ministério do Meio Ambiente, por meio do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), é quem tem competência para regulamentar as questões pertinentes ao meio ambiente no Brasil. Usando de suas atribuições, ele mesmo aprovou a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005⁷³. Nesta resolução o CONAMA *“Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.”*

Em seu Art. 2º, item VII, define carga poluidora como “quantidade de determinado poluente transportado ou lançado em um corpo de água receptor, expressa em unidade de massa por tempo.”

Em seu capítulo IV, dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes. No Art. 27, tem-se “É vedado, nos efluentes, o lançamento dos Poluentes Orgânicos Persistentes – POPs* mencionados na Convenção de Estocolmo. Ratificada pelo Decreto Legislativo nº 204, de 7 de maio de 2004. Já em seu Art. 34, §1º deste mesmo capítulo define que “O efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de toxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente”.

O que pode ser observado é que a legislação não prevê especificamente as condições para lançamento de efluentes da produção de produtos farmacêuticos. As únicas condições a serem seguidas são as estabelecidas pelo §4º do Art. 34 que define as condições de lançamento de efluentes com relação a pH (5 a 9), temperatura (inferior a 40 °C, sendo que a variação de temperatura do corpo receptor não deverá exceder a 3 °C na zona de mistura), entre outras.

* POPs: aldrin, chlordane, dieldrin, DDT, endrin, heptachlor, hexaclorobenzeno, mirex, toxophene, PCBs, dioxinas e furanos

Com relação à Comunidade Européia, a questão de riscos ambientais está prevista na sua legislação. Através da Diretiva 67/548/EEC, as substâncias são classificadas de acordo com dados experimentais para toxicidade aguda, degradação, coeficiente de partição (K_{ow}) n-octanol-água e fator de bioconcentração (BCF). Os compostos são designados como “perigosos para o ambiente aquático” e rotulados de acordo com o seguinte critério ⁹¹:

R50 - “muito tóxico para organismos aquáticos”:

- toxicidade aguda (LC_{50} (peixe) ou EC_{50} (*Daphnia*) ou IC_{50} (alga)) $\leq 1,0$ mg/L;

R50 e R33 – “muito tóxico para organismos aquáticos e pode causar a longo prazo efeitos adversos no ambiente aquático”:

- toxicidade aguda $\leq 1,0$ mg/L;

- compostos não são rapidamente degradados ($\log K_{ow} \geq 3$);

- experimentalmente seu fator de bioconcentração (BCF) ≤ 100 ;

R51 e R53 – “tóxico para organismos aquáticos e podem causar a longo prazo efeitos adversos no ambiente aquático”:

- 1 mg/L < toxicidade aguda ≤ 10 mg/L;

- compostos não são rapidamente degradados ($\log K_{ow} \geq 3$);

- experimentalmente seu fator de bioconcentração (BCF) ≤ 100 ;

R52 e R53 – “prejudicial aos organismos aquáticos e pode causar a longo prazo efeitos adversos no ambiente aquático”:

- 10 mg/L < toxicidade aguda ≤ 100 mg/L;

- os compostos não são rapidamente degradados ($\log K_{ow} \geq 3$);

- experimentalmente seu fator de bioconcentração (BCF) ≤ 100 .

2.10.1 Licenciamento ambiental para indústria farmacêutica

O licenciamento ambiental de uma indústria farmacêutica deve seguir as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e da Agência Ambiental de Goiás.

As instalações da ETE devem atender às recomendações da ABNT, NBR 570/90⁹² que trata da construção de estações de tratamento de esgotos e NBR 9.800/87⁹³ que trata do lançamento de efluentes industriais na rede pública de esgotos.

O licenciamento ambiental de uma indústria farmacêutica requer a análise físico-química e bacteriológica do efluente produzido, memorial de caracterização do empreendimento e, para as indústrias já instaladas e que não possuem estação de tratamento de efluentes, um termo de compromisso de ajuste de conduta deve ser firmado junto à Agência Ambiental.

Para as indústrias que produzem fármacos antimicrobianos, alguns estudos devem ser realizados periodicamente, entre eles o estudo da inativação dos antimicrobianos eliminados na ETE, que deve ser renovado a cada 120 dias.

Essas indústrias devem possuir ainda um Plano de Gerenciamentos de Resíduos do Serviço de Saúde (PGRSS) e seus resíduos sólidos devem ser tratados de acordo com a RDC 358 de 2005⁹⁴ e NBR 10.004/2004⁹⁵.

A lei estadual de Goiás nº 8.544⁹⁶ de 17 de outubro de 1978 deve ser observada pois regulamenta o controle da poluição do meio ambiente.

Considerando-se a abordagem ambiental apresentada, observa-se a necessidade do desenvolvimento de uma metodologia adequada ao tratamento de efluentes industriais que vise a inativação de resíduos dos antibióticos amoxicilina e ampicilina. O uso dos Processos Oxidativos Avançados (POA) mostra-se promissor para diversos poluentes orgânicos, incluindo antibióticos. No próximo capítulo apresentam-se as metodologias adotadas e os procedimentos experimentais para os POA testados na degradação dos antibióticos beta-lactâmicos amoxicilina e ampicilina. Apresentam-se também, diferentes técnicas para estudo da toxicidade dos produtos formados pela oxidação desses antibióticos.

CAPÍTULO 3
MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e Métodos

Este capítulo constitui-se da descrição metodológica das diversas etapas desenvolvidas durante este trabalho para avaliação da degradação de antibióticos beta-lactâmicos presentes em efluente de indústria farmacêutica. Primeiramente descreve-se a metodologia adotada para a avaliação do impacto gerado em uma ETE de indústria farmacêutica produtora dos antibióticos AMX e AMP, pelo lançamento dos efluentes de produção tratados pelo método convencional (hidrólise básica). A segunda etapa se constitui da caracterização dos poluentes e dos testes realizados para oxidação de amostras sintéticas de AMX e AMP por Processos de Oxidativos Avançados (POA)*. Na terceira etapa, definiu-se o processo com melhor rendimento a um menor custo, avaliou-se a redução da DQO promovida pelo processo e a toxicidade dos produtos formados pela oxidação. Finalizando, realizaram-se ensaios de biodegradabilidade com efluente industrial bruto submetido ao processo oxidativo pelo reagente de Fenton.

Todos os reagentes necessários para a execução desse trabalho são disponíveis comercialmente. A AMX PA e AMP PA utilizadas para a preparação das soluções padrão bem como as comerciais para preparação das soluções sintéticas foram gentilmente cedidas por uma indústria farmacêutica localizada em Goiás.

O desenvolvimento experimental dos processos de oxidação deu-se em várias etapas. Na primeira, os ensaios foram realizados a partir de soluções sintéticas de AMX e AMP, avaliando-se a redução dos analitos, o que ocorreu até a definição do POA com melhor rendimento. De posse dos resultados, definiu-se o processo com reagente de Fenton. Em uma segunda etapa, avaliou-se a redução da DQO a partir de soluções sintéticas dos antibióticos, considerando-se os resultados obtidos na etapa anterior para o processo Fenton. A partir destes resultados, realizaram-se os ensaios de toxicidade e mutagenicidade dos produtos formados na degradação, utilizando-se os organismos teste *Artemia salina* e *Allium cepa*. Em uma última etapa, o efluente bruto da produção industrial de AMX e AMP de uma indústria goiana

* Anexo 1

foi submetido ao processo de oxidação com reagente de Fenton para avaliação de sua biodegradabilidade (DQO/DBO₅).

Os materiais e a metodologia utilizada para o desenvolvimento deste trabalho encontram-se apresentados a seguir. As análises e os ensaios desenvolvidos foram realizados nas dependências do Laboratório de Química Analítica e Ambiental do Instituto de Química da UnB, nos laboratórios de Química e do centro de pesquisas REPLICON da UCG.

Toda a vidraria utilizada nos ensaios foi lavada com solução alcoólica de hidróxido de potássio (KOH/EtOH) ou solução 10% de ácido nítrico (10% HNO₃) considerando-se as substâncias químicas analisadas e as concentrações trabalhadas (orgânicos ou metais).

Os frascos de vidro utilizados na DQO em refluxo fechado foram submetidos a tratamento de limpeza após cada análise para eliminar os resíduos e armazenados para que possíveis contaminações fossem evitadas. Os resíduos dessa análise foram devidamente armazenados para posterior tratamento e descarte.

As amostras de efluentes para os ensaios de biodegradabilidade foram coletadas em uma indústria farmacêutica de Goiás, em época de seca, para que não houvesse interferência devido à diluição ocasionada pela entrada de águas pluviais no sistema de tratamento da indústria. As coletas foram realizadas no reservatório subterrâneo e no tanque de hidrólise do efluente sempre ao final do período de produção do antibiótico.

3.1. Avaliação do impacto na estação de lodo ativado pelo lançamento de resíduo de hidrólise de antibióticos penicilânicos

Uma avaliação preliminar do impacto do lançamento de efluentes hidrolisados do processamento dos penicilânicos (AMX e AMP) foi realizada junto a uma indústria farmacêutica localizada em Goiás. Para a realização de deste estudo, um volume de 3 m³ de efluente de antibióticos foi utilizado. Esse efluente foi submetido à hidrólise básica conforme metodologia adotada pela indústria: adicionaram-se 2,35 Kg de hidróxido de sódio (NaOH) comercial para a reação básica, agitou-se o sistema, manteve-se a solução em repouso por 40

min e em seguida adicionaram-se 2,6 L de ácido clorídrico (HCl) PA para a sua neutralização (pH=7).

Para avaliar os efeitos do descarte de efluentes hidrolisados na ETE, 3 amostras foram coletas em diferentes datas. Para cada amostra 2 pontos de coleta foram escolhidos: um na entrada do sistema, amostrando o efluente bruto (tanque de equalização) e outro na saída do sistema, onde tem-se o efluente tratado (tanque de decantação). As amostras foram coletadas de maneira composta com frequência de 2 horas, armazenadas em frascos plásticos e preservadas a 4 °C, sendo o volume coletado por ponto de coleta igual a 5 L. Para a primeira coleta de efluentes, considerou-se o funcionamento da ETE com a recepção de todos os efluentes, menos os da produção de penicilânicos. A segunda coleta foi realizada 48 h após o descarte dos efluentes hidrolisados dos penicilânicos e finalmente a terceira coleta ocorreu 7 dias após este descarte.

A figura 3.1 apresenta um fluxograma da indústria farmacêutica localizada em Goiás que forneceu os efluentes estudados. O efluente é composto pelos produtos básicos da produção que são: medicamento (AMX e/ou AMP), Eudragit®, talco, estearato de magnésio, corantes e dióxido de titânio. A estes se somam os produtos para limpeza da linha de produção como polietilenoglicol, álcool etílico e propanona além de detergentes especiais. O sistema de tratamento da ETE dessa indústria é o de lodo ativado. Os efluentes da linha de penicilânicos, após hidrólise básica e neutralização, são descartados em um tanque de equalização onde se misturam aos efluentes das demais linhas de produção e também ao esgoto sanitário da indústria. Após o tratamento, o efluente final é descartado na rede pública de esgoto.

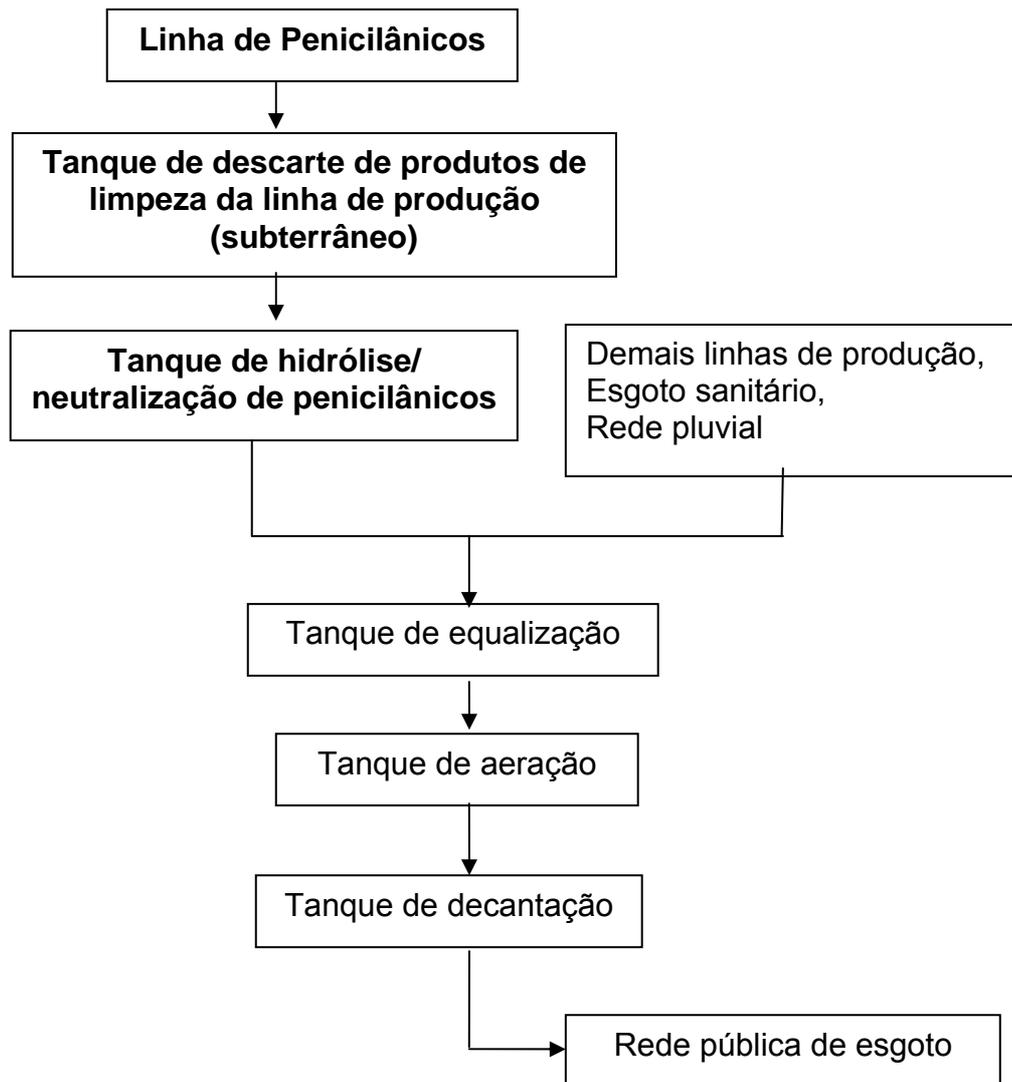


Figura 3.1: Fluxograma do efluente da linha de produção com destaque para a linha de penicilânicos.

3.2 Procedimentos analíticos

3.2.1 Determinação espectrofotométrica de AMX e AMP em solução aquosa.

Análises espectrofotométricas de varredura foram realizadas em soluções padrão de AMX e AMP. Estas varreduras foram realizadas para as amostras contendo AMX nos intervalos de 250 a 300 nm e para AMP de 240 a 280 nm com o objetivo de determinar-se o λ_{\max} para cada espécie química,

utilizando-se o espectrofotômetro GBC-911A. Quando necessário, para efeito de confirmação de resultados, leituras de 190 a 800 nm foram realizadas.

As soluções estoque e padrão foram preparadas segundo CASS (2003)⁹⁷. Estes procedimentos encontram-se descritos a seguir.

a) Preparação de soluções estoque:

Solução 0,01 mol L⁻¹ de KH₂PO₄:

1,6900 g de KH₂PO₄ foi pesado em balança analítica Mettler-Toledo (modelo AG 202), transferido para um béquer, solubilizado em água destilada, levado a um balão volumétrico de 1,0 L e seu volume completado. Após este procedimento, o pH da solução foi ajustado para 5,0 utilizando-se NaOH 2,0 mol L⁻¹.

Solução estoque 1,19 x10⁻³ mol L⁻¹ de AMX:

0,5000 g de AMX foi solubilizada em um béquer com solução 1,0 x10⁻² mol L⁻¹ de KH₂PO₄ com auxílio de banho ultrassônico Branson (modelo Branson 5210), em seguida transferida para um balão volumétrico de 1,0 L e seu volume final ajustado com solução 1,0 x10⁻² mol L⁻¹ de KH₂PO₄. A solução resultante foi transferida para um frasco de vidro âmbar, reservada em geladeira por um prazo máximo de 30 dias.

Solução estoque 2,79 x10⁻³ mol L⁻¹ de AMP:

1,0000 g de AMX foi solubilizada em um béquer com solução 1,0 x10⁻² mol L⁻¹ de KH₂PO₄ com auxílio de ultrassom, em seguida transferida para um balão volumétrico de 1,0 L e seu volume final ajustado com solução 1,0x10⁻² mol L⁻¹ de KH₂PO₄. A solução resultante foi transferida para um frasco de vidro âmbar, reservada em geladeira por um prazo máximo de 7 dias.

Solução padrão de AMX:

A partir da solução estoque de AMX, alíquotas foram retiradas e 6 padrões foram preparados com as seguintes concentrações: 1,4 x10⁻⁴ mol L⁻¹, 2,4 x10⁻⁴ mol L⁻¹, 4,8 x10⁻⁴ mol L⁻¹, 7,2 x10⁻⁴ mol L⁻¹, 9,5 x10⁻⁴ mol L⁻¹ e 1,2 x10⁻⁴ mol L⁻¹.

Solução padrão de AMP:

A partir da solução estoque de AMP, alíquotas foram retiradas e 6 padrões foram preparados com as seguintes concentrações: $3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $5,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $1,08 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $1,62 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $2,16 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,69 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

As soluções estoque foram transferidas para frascos de vidro âmbar, devidamente rotuladas, e reservadas em geladeira até o momento de sua utilização. As soluções padrão foram preparadas diariamente.

3.2.2 Avaliação da estabilidade das soluções estoque

Para o estudo da validação da metodologia, 6 padrões foram preparados a partir das soluções estoque, suas leituras repetidas a cada 7 dias, com um intermediário no 3º dia da primeira semana, durante um período de 2 meses.

Este estudo mostrou que os padrões devem ser preparados diariamente e que a solução estoque de AMX tem vida útil de 30 dias enquanto que a de AMP apenas de sete dias.

3.2.3 Determinação da curva analítica

As curvas analíticas foram obtidas a partir de soluções padrão preparadas em tampão fosfato, pH=5. Os intervalos de concentração das curvas foram de $1,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $4,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $7,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $9,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,19 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para AMX e $3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $5,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $1,08 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $1,62 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $2,16 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,69 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para AMP. As leituras de varredura do espectro de absorção com o espectrofotômetro GBC 901A permitiram a determinação do λ_{max} para cada uma das substâncias trabalhadas. Isto se fez necessário em função do máximo de absorção observado para essas substâncias de acordo com as concentrações trabalhadas nessa tese. Para AMX o $\lambda_{\text{max}} = 272 \text{ nm}$ foi estabelecido e para AMP $\lambda_{\text{max}} = 262 \text{ nm}$.

3.3 Realização das medidas de pH

As medidas de pH de todas as amostras foram realizadas antes e depois de cada degradação.

As degradações de AMX e AMP definidas como ideais tiveram seu pH acompanhado durante os 60 min de ensaio.

O pHmetro utilizado (DIGIMED modelo PH2) é constituído de eletrodo de vidro combinado, com cloreto de potássio (KCl) como eletrólito de referência. Diariamente o equipamento era calibrado, com solução tampão 4,01 e 6,98 a temperatura ambiente.

3.4 Obtenção dos espectros na região do Infravermelho (IR)

Os espectros de infravermelho (IR) para AMX e AMP foram obtidos de acordo com a metodologia sugerida pela monografia para substâncias medicinais e farmacêuticas da Farmacopéia Britânica (2000)⁹⁸.

As amostras estudadas (AMX, AMP e resíduos sólidos das degradações) foram previamente secos a vácuo, por um período de 4 h, e encaminhados a Central Analítica do IQ/UnB para confecção das pastilhas em KBr e obtenção do espectro.

3.5 Estudos para degradação de AMX e AMP

Em uma primeira etapa do trabalho, amostras sintéticas de AMX, $2,86 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, e AMP, $3,23 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, foram preparadas em água destilada. Os seguintes processos de oxidação foram testados para estas amostras: fotodegradação, peroxidação, fotoperoxidação, processo Fenton, foto-Fenton, processo Fenton/ Fe^{3+} e foto-Fenton/ Fe^{3+} . Os reagentes utilizados foram H_2O_2 PA 30% (m/v), solução de FeCl_2 $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, preparada pela dissolução de Fe em ácido clorídrico concentrado a quente e padronizada, e de FeCl_3 $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, preparada a partir do sal em meio acidificado com $\text{HCl}_{\text{conc.}}$. A variação na concentração dos analitos AMX e AMP nas amostras sintéticas foi acompanhada por espectrofotometria de absorção no ultravioleta (UV). Para a comparação entre os resultados obtidos nos diferentes ensaios para os

antibióticos, as concentrações utilizadas tanto de H₂O₂ como de Fe foram mantidas constantes. A tabela 3.1 apresenta os volumes utilizados nos diversos experimentos desta etapa do trabalho.

Tabela 3.1: Volume de reagente utilizado para a degradação de 200,0 mL de solução de AMX e AMP.

POA/ Reagente (mL)	UV	H₂O₂	H₂O₂/ UV	Fenton	foto- Fenton	Fenton /Fe³⁺	foto Fenton /Fe³⁺
H₂O₂	-	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
FeCl₂	-	-	-	10,0	10,0	-	-
FeCl₃	-	-	-	-	-	10,0	10,0

Os resultados obtidos para a redução do analito por espectrofotometria no UV levaram à definição do POA a ser utilizado nas demais etapas do trabalho em função do melhor rendimento e ao menor custo. A opção foi pelo reagente de Fenton.

A etapa seguinte do trabalho envolveu a avaliação da variação da relação AMX/H₂O₂, AMX/Fe e AMP/H₂O₂, AMP/Fe para o processo de degradação definido a partir dos resultados obtidos na primeira etapa.

O processo oxidativo escolhido foi com o uso do reagente de Fenton. A determinação da concentração residual do substrato orgânico por espectrofotometria no UV e a remoção da demanda química de oxigênio (DQO) foram os parâmetro utilizados para avaliação da degradação das soluções sintéticas.

As soluções de AMX ($2,86 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e AMP ($3,23 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foram preparadas em água destilada. Estas concentrações estão de acordo com as concentrações máximas estimadas para efluentes industriais. Para o reagente de Fenton utilizou-se sulfato de ferro (II) heptahidratado (FeSO₄.7H₂O) como fonte de Fe²⁺. No preparo dos ensaios a adição dos reagentes seguiu a seguinte ordem:

- 1º) solução aquosa AMX (ou AMP);
- 2º) adição do catalisador, sal de ferro, FeSO₄.7H₂O;

3º) adição do oxidante H₂O₂.

3.5.1 Quantificação dos compostos estudados

Na primeira etapa da pesquisa, a quantificação da AMX e AMP residual nas degradações foi feita por espectrofotometria UV. A metodologia adotada foi ajustada a partir de diversas referências disponíveis^{99,100,97,101}.

Em sua segunda etapa, após a determinação do processo oxidativo mais eficiente e de custo relativamente baixo (uso de Reagente de Fenton), as degradações de AMX e AMP foram realizadas utilizando a remoção da DQO como parâmetro e sulfato de ferro (II) como fonte de Fe²⁺, evitando assim a interferência dos íons cloretos. As quantidades de H₂O₂ e de Fe²⁺ foram avaliadas com relação à AMX e AMP.

Um estudo complementar avaliou espectros de absorção no infravermelho para os resíduos sólidos provenientes das degradações com o objetivo de verificar a presença de AMX e AMP neste material.

3.5.2 Ensaio oxidativos de degradação

Os ensaios de degradação foram realizados utilizando-se um reator fotoquímico apresentado na figura 3.1. Para os ensaios na ausência de radiação, o mesmo reator foi utilizado porém tendo a fonte luminosa desligada. Dessa forma eram mantidas as mesmas condições de turbulência e ventilação.

3.5.2.1 Reator fotoquímico

O reator fotoquímico utilizado foi desenvolvido no próprio laboratório. Como fonte de radiação utilizou-se o tubo de descarga de uma lâmpada OSRAM de vapor de mercúrio E27, HQL 125 W, que emite na faixa do UV ($\lambda \sim 254$ nm). A figura 3.1 apresenta um esquema do reator bem como seu aspecto visual.

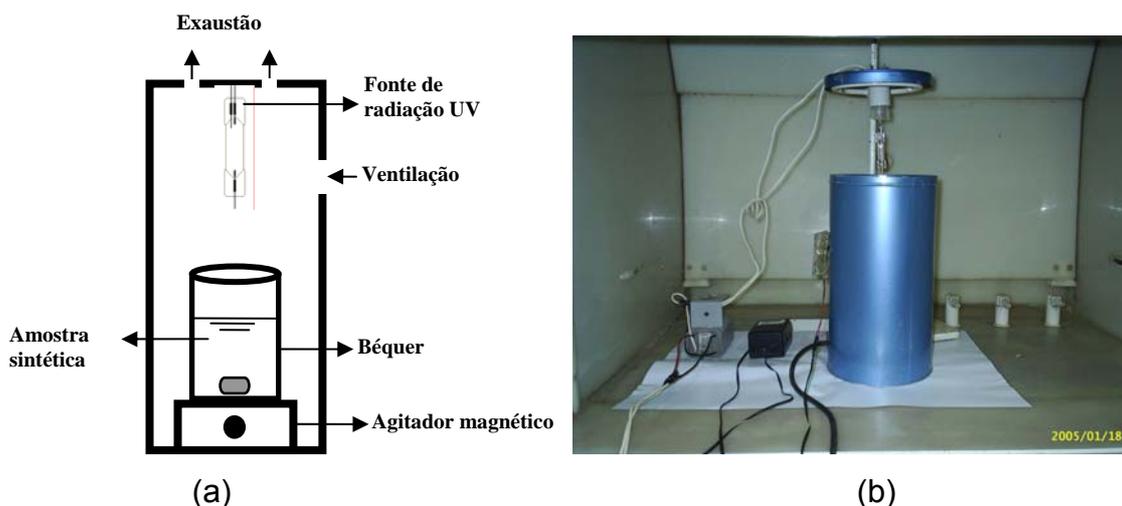


Figura 3.2. (a) esquema geral da montagem do foto-reator. (b) aspecto visual do foto-reator utilizado nos processos de degradação.

3.6 Descrição dos ensaios de degradação por POA

Para os ensaios com AMX, utilizaram-se 200 mL de solução $2,86 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e com AMP 200 mL de solução $3,20 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Todos os ensaios foram realizados sob agitação. As concentrações para as soluções sintéticas de AMX e AMP foram estabelecidas a partir da determinação da concentração média destas substâncias presentes no efluente industrial (aproximadamente $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹). A DQO também foi considerada no estabelecimento das concentrações estudadas. A DQO para o efluente bruto da produção de AMX e AMP variou no intervalo de 2300 a 4200 mg O₂/L (n=5). Para a solução de AMX $2,86 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ temos uma DQO de 2970 mg O₂/L enquanto que para solução de AMP $3,20 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, a DQO apresenta um valor de 3300 mg O₂/L.

3.6.1 Ensaios de fotodegradação

Os ensaios foram realizados utilizando o foto-reator ($\lambda \sim 254$ nm). A mistura reacional constou de 200 mL de solução de AMX ou AMP. O tempo de degradação estudado foi de 60 min e as amostras foram coletadas a cada 10 min.

3.6.2 Ensaio de peroxidação

Os ensaios foram realizados utilizando o foto-reator porém com a fonte de irradiação desligada. A mistura reacional constou de 200 mL de solução de AMX ou AMP, com adição de $9,79 \times 10^{-3}$ mol de H_2O_2 , sob agitação intensa. O tempo de degradação estudado foi de 60 min e as amostras foram coletadas a cada 10 min.

3.6.3 Ensaio de fotoperoxidação

Os ensaios foram realizados utilizando o foto-reator ($\lambda \sim 254$ nm). A mistura reacional constou de 200 mL de solução de AMX ou AMP, com adição de $9,79 \times 10^{-3}$ mol de H_2O_2 , sob agitação intensa. O tempo de degradação estudado foi de 60 min e as amostras foram coletadas a cada 10 min.

3.6.4 Ensaio com reagente de Fenton

Os ensaios foram realizados utilizando o foto-reator com a fonte de irradiação desligada. A mistura reacional constou de 200 mL de solução de AMX ou AMP, com adição de $9,79 \times 10^{-3}$ mol de H_2O_2 , e 10 mL de solução 0,01 M de $FeCl_2$, sob agitação intensa. O tempo de degradação estudado foi de 60 min e as amostras foram coletadas a cada 10 min.

3.6.5 Ensaio de foto-Fenton

Os ensaios foram realizados utilizando o foto-reator ($\lambda \sim 254$ nm). A mistura reacional constou de 200 mL de solução de AMX ou AMP, com adição de $9,79 \times 10^{-3}$ mol de H_2O_2 , e 10 mL de solução 0,01 M de $FeCl_2$, sob agitação intensa. O tempo de degradação estudado foi de 60 min e as amostras foram coletadas a cada 10 min.

3.6.6 Ensaio de Fenton/ Fe^{3+}

Os ensaios foram realizados utilizando o foto-reator com a fonte de irradiação desligada. A mistura reacional constou de 200 mL de solução de AMX ou AMP, com adição de $9,79 \times 10^{-3}$ mol de H_2O_2 , e 10 mL de solução 0,01 M de $FeCl_3$, sob agitação intensa. O tempo de degradação estudado foi de 60 min e as amostras foram coletadas a cada 10 min.

3.6.7 Ensaios de foto-Fenton/ Fe³⁺

Os ensaios foram realizados utilizando o foto-reator ($\lambda \sim 254$ nm). A mistura reacional constou de 200 mL de solução de AMX ou AMP, com adição de $9,79 \times 10^{-3}$ mol de H₂O₂, e 10 mL de solução 0,01 M de FeCl₃, sob agitação intensa. O tempo de degradação estudado foi de 60 min e as amostras foram coletadas a cada 10 min.

3.6.8 Ensaios de foto-Fenton promovido por radiação solar

Os ensaios foram realizados expondo-se a solução do antibiótico AMX com reagente de Fenton à luz solar. A mistura reacional constou de 50 mL de solução contendo $1,4 \times 10^{-3}$ mol de AMX com adição de H₂O₂ e Fe²⁺, sob agitação intensa com razões de acordo com a tabela 3.2. O tempo de degradação estudado foi de 60 min e as amostras foram coletadas a cada 10 min.

Tabela 3.2: Quantidade de matéria (mol) presente nos ensaios de degradação por foto-Fenton para AMX promovido por radiação solar.

Quantidade de matéria (mol) e razão molar					
Ensaio	(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)
AMX	$1,4 \times 10^{-3}$				
AMX/ H ₂ O ₂	0,36	1,43	0,71	0,47	0,36
AMX/ Fe ²⁺	-	14	7	4,6	3,5

3.7 Determinação da demanda química de oxigênio (DQO)

A DQO das soluções iniciais e de cada alíquota retirada durante as degradações foram realizadas de acordo com a metodologia estabelecida para refluxo fechado colorimétrico pelo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater¹⁰² (5220 Chemical oxygen demand, 1999) e NBR 10357/1988¹⁰³, utilizando-se o termoreator VELP modelo ECO-16.

3.8 Ensaios de toxicidade

Os ensaios de toxicidade foram realizados utilizando-se dois bioindicadores, o microcrustáceo *Artemia salina* e o vegetal *Allium cepa*. O método de avaliação em raízes de *Allium cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como eficiente teste para análise e monitoramento de substâncias ambientais¹⁰⁴.

3.8.1 *Artemia salina*

Os ensaios de toxicidade para a avaliação da dose letal para 50% dos organismos (DL_{50}) dos resíduos da degradação de AMX e AMP por reagente de Fenton foram realizados com culturas do crustáceo *Artemia salina* (Figura 3.2) nos Laboratórios de Química Orgânica e de Alimentos da Universidade Católica de Goiás com supervisão do prof. Dr. Armando Garcia-Rodriguez. A eclosão dos cistos foi induzida no meio ambiente adequado, contendo 3,5% de sal marinho, sob condições de aeração constante, durante 24 horas. Os exemplares adultos foram isolados e colocados em tubos de ensaios para a realização dos testes. Os resíduos foram adicionados nos tubos (triplicata) em diferentes concentrações e contados após 24, 48 e 72 horas de exposição, visualmente, os vivos e mortos¹⁰⁵.



Figura 3.3: Aspecto visual do microcrustáceo *Artemia salina*.

O procedimento adotado para o ensaio foi o seguinte:

a) Preparação do cultivo de *Artemia salina* para o bioensaio:

Pesa-se 7,0 g de sal marinho e transfere-se para um béquer de 200 mL; adiciona-se 200 mL de água destilada, dissolve o sal marinho, liga-se a lâmpada fluorescente e a bomba de aeração; adiciona-se a solução salina no reservatório e 1,0 g de ovos de *Artemia salina*. A eclosão dos ovos ocorre após 48 horas.

Após a eclosão dos ovos, as *Artemias salinas* devem ser transferidas para os tubos de ensaio. Para isto prepara-se 100 mL da solução de NaCl 3,5%, adiciona-se 0,5 mL desta solução a cada tubo de ensaio, transferem-se as *Artemias salinas* para os tubos de ensaio com as pipetas Pasteur, sendo 10 exemplares por tubo; acrescenta-se as amostras a serem estudadas para a avaliação da toxicidade (DL₅₀) em diferentes concentrações. Deixam-se os tubos de ensaio contendo as *Artemias salinas* sob iluminação fluorescente para avaliação pelo tempo de 24, 48 e 72 horas.

b) Avaliação da toxicidade:

Após 24 h (48 e 72 h), coloca-se o tubo ligeiramente inclinado sob a luz fluorescente, agita-se bem levemente, verificando-se quais *Artemia salina* estão vivas e quais estão mortas (aquelas que afundarem após a agitação estão mortas ou imobilizadas pela ação do poluente), conta-se o número de exemplares vivos, mortos ou imobilizados e calcula-se a porcentagem de sobrevivência da seguinte forma:

$$S(\%) = \frac{\text{Número de organismos vivos} \times 100}{\text{Número total de organismos no tubo (10)}}$$

Calcula-se os valores DL₁₀₀ (dose ou concentração que provoca a morte de todos os exemplares no tubo, S% = 1) e DL₅₀ (dose ou concentração que provoca a morte de 50% dos animais testados, S% = 50).

3.8.2 Organismo teste *Allium cepa*

Para a avaliação da toxicidade dos produtos gerados na degradação de AMX e AMP por reagente de Fenton foi seguida a metodologia padrão proposta por Fiskesjö (1985)⁷⁰. O material biológico utilizado como organismo teste

constitui-se de indivíduos jovens e saudáveis da espécie *Allium cepa* da Família LILIACEAE, diplóide ($2n = 16$ cromossomos). Os ensaios macroscópicos foram realizados no Laboratório de Química Analítica da Universidade Católica de Goiás e os microscópicos nos Laboratórios do Núcleo de Pesquisas REPLICON, sob orientação do prof. MSc Cláudio Carlos da Silva.

3.8.2.1 Parâmetros macroscópicos: turgescência e crescimento radicular

As cebolas adquiridas no comércio local (*Allium cepa* L.) foram selecionadas segundo seu peso e tamanho buscando a maior homogeneidade possível entre os espécimes que seriam utilizados. A túnica marrom externa foi retirada, as raízes primárias secas foram eliminadas utilizando-se bisturi de forma que o anel de brotamento se mantivesse intacto. As cebolas foram então lavadas, secas com papel macio, e em seguida colocadas nos béqueres com as soluções teste para crescer. Cada conjunto de teste era constituído de 12 cebolas⁷⁰. Como controle negativo (CN) utilizou-se água de abastecimento público. O experimento ocorreu à temperatura ambiente e protegido de luz solar direta (Figura 3.3).

Após 24 horas do início do experimento, as raízes de cada cebola foram observadas quanto a sua turgescência, contadas e seu comprimento medido com paquímetro. Este acompanhamento se estendeu por 5 dias de cultivo, 120 horas de ensaio.



Figura 3.4: Aspecto visual da organização das cebolas em teste.

3.8.2.2. Parâmetros microscópicos: índice mitótico (IM), micronúcleos (MN) e anomalias cromossômicas (AC)

3.8.2.2.1 Preparação das radículas

As cebolas foram selecionadas segundo o seu tamanho sendo que os indivíduos mais jovens e saudáveis foram escolhidos. O método de avaliação das alterações cromossômicas em raízes de *Allium* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais¹⁰⁶.

Foram formados grupos constituídos por dez cebolas para cada condição de tratamento. Os bulbos foram colocados em béqueres de 50 mL, em local seco arejado e com incidência indireta de luz solar, por 4 dias em água de abastecimento público, realizando de 12 em 12 horas o revezamento das posições dos béqueres na bancada. A figura 3.4 mostra a disposição das amostras na bancada.

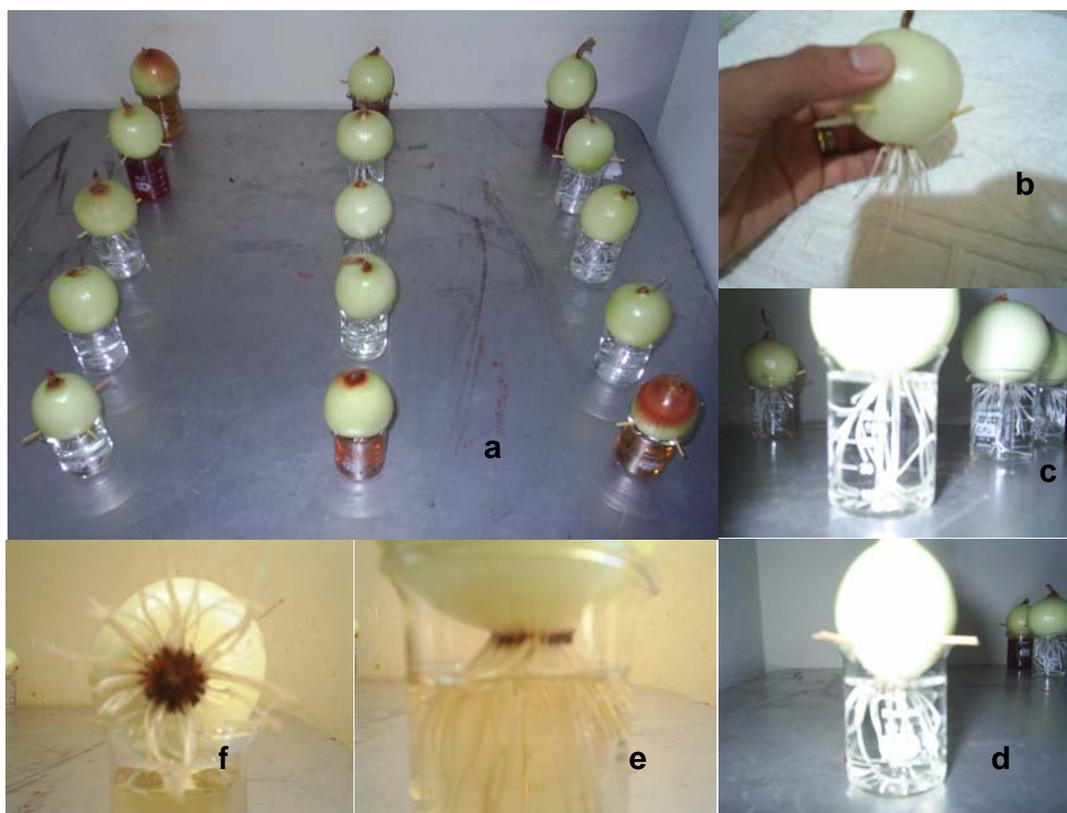


Figura 3.5: Condições de exposição dos bulbos na bancada. (a) Disposição geral e aleatória, (b), (c), (d), (e) e (f) Crescimento radicular dos bulbos em diferentes ângulos.

Após o crescimento das radículas, os indivíduos foram transferidos para as soluções AMX, AMP e AMX/F e AMP/F em diferentes diluições. Um controle negativo (CN) foi feito expondo os bulbos em água de abastecimento público. O controle positivo (CP) utilizou uma solução 10 mg L⁻¹ de Hg²⁺. Todas as raízes foram expostas por um período de 48 h. Após esse tempo, as raízes foram coletadas e armazenadas em tubos ependorff de 2 mL contendo solução fixadora álcool-ácida de Carnoi (3:1, etanol/ ácido acético) por um período mínimo 24 horas¹⁰⁷.

3.8.2.2.2. Preparo das lâminas

As lâminas foram obtidas pelo método de esmagamento onde, aproximadamente 1,0 cm da região apical radicular foi submetido à hidrólise ácida de ácido clorídrico a 1,0 mol L⁻¹ na temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida as amostras foram lavadas em água destilada por 5 min. Após, as radículas foram transferidas para a lâmina onde, em microscópio estereoscópico foi retirada a coifa para obtenção do meristema apical, adicionado reativo de Fulgen, recoberta por uma lamínula e em seguida uma leve pressão sobre o material visando espalhamento das células. Finalmente as lâminas foram seladas com esmalte. As lâminas de cebola foram observadas em microscópio óptico em aumento de 400X, contadas, em teste cego, através da técnica de varredura, 2000 células por tratamento em cada bioensaio.

3.8.2.2.3 Análise microscópica

Para a determinação do índice mitótico foi utilizado o seguinte índice:

$$IM = \frac{NCM}{NTC} \times 100$$

onde: *IM*= índice mitótico *NCM*= número de células em mitose e
NTC= número total de células observadas

Para a análise de anomalias cromossômicas (AC), vários tipos de aberrações foram consideradas. Os critérios para aceitar a presença das alterações cromossômicas observadas, estão de acordo com Nielson e Rank (1994)¹⁰⁸ e estão descritas a seguir:

- quebras cromátídicas equivalentes à perda de cromátides do cromossomo ou por fragmentação que ocorrem nas cromátides durante a divisão celular;
- não disjunção dos cromossomos no final da metáfase, formando estruturas denominadas pontes anafásicas, alterações essas observadas no início da anáfase;
- fuso acromático desestabilizado podendo provocar perda de cromossomos inteiros durante o processo de divisão celular;
- presença de micronúcleos (MN) equivalente a uma estrutura de contorno regular, redondo ou oval, e devendo estar dentro do citoplasma de uma célula; o MN deve estar no mesmo plano de foco de observação e nitidamente separado do núcleo.

Todos os registros foram reunidos em uma só categoria para possibilitar a avaliação das AC como um único *endpoint*. A incidência de MN em células meristemáticas de *Allium cepa* foi considerada como outro parâmetro de avaliação, não sendo agrupada junto com as AC.

O IM, que corresponde à relação do número de células em divisão, constitui um terceiro parâmetro de avaliação. A análise de todos estes parâmetros se deu pela contagem de cerca de 2000 células por tratamento, sendo 500 células por lâmina para um total de 4 lâminas.

3.8.2.2.4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis e teste *t-Student*, o qual possibilita a comparação dos tratamentos com controle negativo, bem como dos tratamentos entre si, em nível de significância de 0,05. Os testes foram realizados com auxílio do software Bio Estatistic versão 3.01.

3.9 Ensaio de Biodegradabilidade

Para a determinação da biodegradabilidade o efluente industrial bruto foi submetido à oxidação utilizando-se o reagente de Fenton nas razões poluente/H₂O₂ e poluente/Fe estabelecidas nas etapas anteriores deste trabalho. Após a degradação, o produto gerado foi analisado quanto a sua DBO e DQO. Esses parâmetros foram realizados, utilizando-se a metodologia de

diluições sucessivas, do Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (1999)¹⁰².

O efluente bruto hidrolisado também foi avaliado quanto à sua biodegradabilidade para que se pudesse comparar a capacidade de degradação biológica dos produtos da oxidação e do método convencional.

O próximo capítulo desta tese apresenta os resultados obtidos a partir do desenvolvimento dos experimentos descritos e apresenta as discussões referentes aos dados obtidos.

CAPÍTULO 4
RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão dos experimentos realizados serão apresentados de acordo com a sua ordem de execução. Primeiramente serão relatados os ensaios de caracterização das substâncias AMX e AMP em estudo; em seguida os resultados de oxidação dessas substâncias por POA avaliando-se a concentração residual de AMX e AMP por espectrofotometria UV. Posteriormente, a partir dos resultados obtidos na oxidação de AMX e AMP pelos POA estudados, definiu-se o processo Fenton como o de melhor rendimento. A partir desta definição, as oxidações de AMX e AMP passam a ser avaliadas em termos da variação da DQO. Estudou-se também a presença de compostos orgânicos nos resíduos insolúveis formados durante a degradação por reagente de Fenton. Em uma última etapa de trabalho, após a definição do processo oxidativo com melhor rendimento (processo Fenton) e a melhor razão $AMX/Fe^{2+}/H_2O_2$ e $AMP/Fe^{2+}/H_2O_2$ a ser utilizada, a toxicidade dos produtos formados nas oxidações foi monitorada por bioindicadores. Como procedimento-teste, avaliou-se também a biodegradabilidade de um efluente industrial oxidado pelo processo Fenton.

4.1. Característica das substâncias em estudo

A caracterização química das substâncias poluentes a serem estudadas é fundamental para o desenvolvimento deste trabalho. A figura 4.1 apresenta a estrutura das moléculas das substâncias AMX e AMP, em destaque o anel β -lactama característico dos antibióticos beta-lactâmicos.

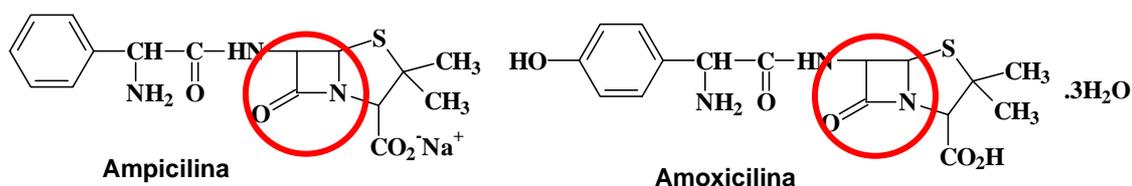


Figura 4.1: Anel β -lactama presente na AMP e AMX.

A presença do anel aromático, estrutura de grande estabilidade e difícil oxidação em condições brandas, e grupos como carboxila, amida, tiazol, fenol mostram a necessidade de uma reação de degradação promovida por um oxidante forte não seletivo como os radicais $\bullet\text{OH}$ ($E^0 = 2,720 \text{ V versus NHE}$).

Para o acompanhamento da variação das concentrações nas soluções de AMX e AMP submetidas aos processos de degradação, é necessário que se caracterize essas substâncias por espectrometria no ultravioleta (UV) e no infravermelho (IR).

4.2 Caracterização da AMX e AMP por espectroscopia de IR e UV

A caracterização das substâncias consiste na determinação de suas propriedades definidas na literatura ou, para o caso das substâncias de uso farmacêutico, da Farmacopéia Brasileira. As figuras 4.2 e 4.3 apresentam espectros de IR para padrões das substâncias AMX e AMP. Em destaque o pico em 1775 cm^{-1} que caracteriza as substâncias AMX e AMP. Este pico refere-se ao estiramento CONH, ν_{CONH} , do anel β -lactama presentes em ambas, uma característica dos antibióticos do grupo das penicilinas. A diferença entre AMX e AMP fica visível quando observa-se a banda larga acima de 3000 cm^{-1} , referente a água, presente no espectro da AMX.

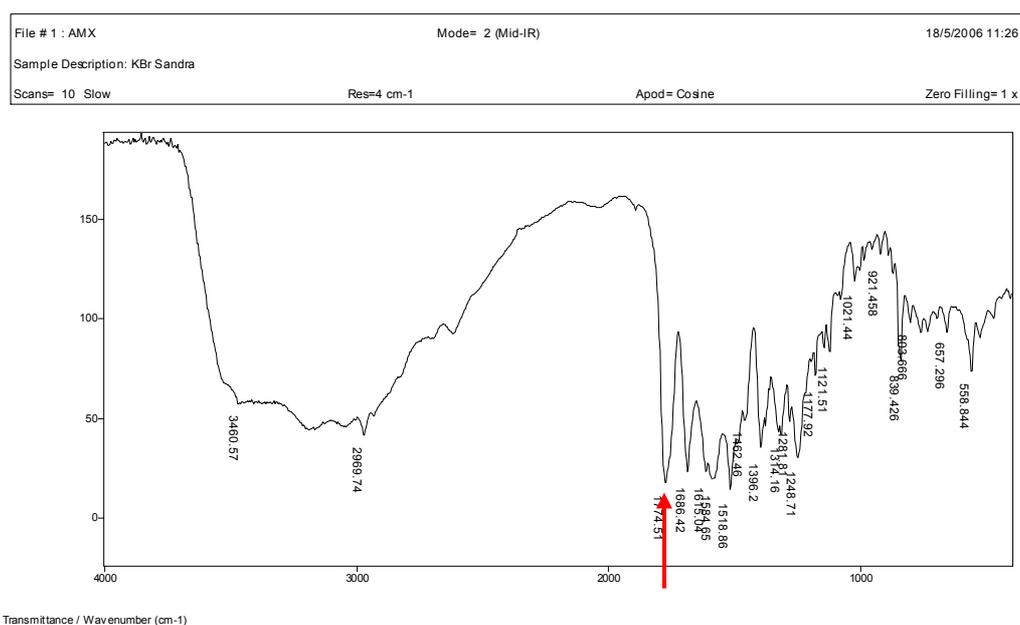


Figura 4.2: Espectro de IR característico para AMX PA (em pastilha de KBr).

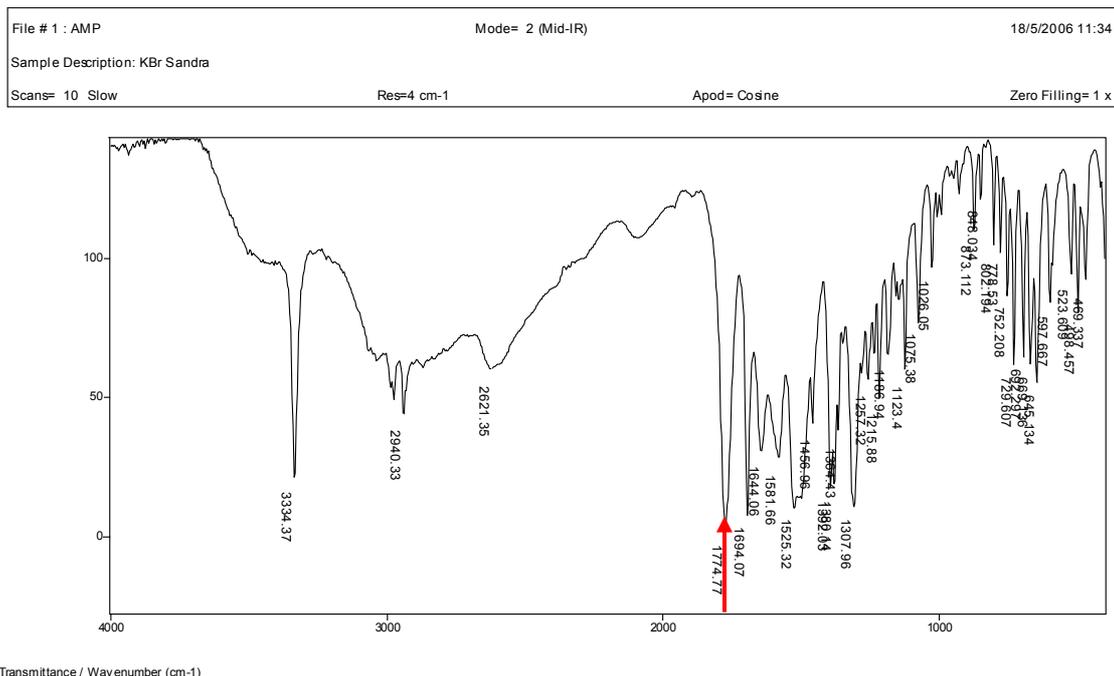


Figura 4.3: Espectro de IR característico para AMP PA (em pastilha de KBr).

Para determinação de AMX e AMP por espectrometria no UV, foram obtidos espectros de varredura de soluções padrão com a finalidade de obter-se o λ_{\max} . As figuras 4.4 e 4.5 apresentam estes resultados.

O comprimento de onda selecionado para a AMX (em solução aquosa) foi $\lambda_{\max} = 272$ nm e para a AMP (em solução aquosa) $\lambda_{\max} = 262$ nm. Esta escolha deu-se em função dos mesmos apresentarem a melhor resolução para soluções de concentrações que variaram de $1,40 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ a $1,19 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de AMX e $3,20 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ a $2,79 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de AMP, compreendendo uma larga faixa de concentração, incluindo as utilizadas nesta pesquisa, e obedecendo os limites de absorvância aceitos pela lei de Beer.

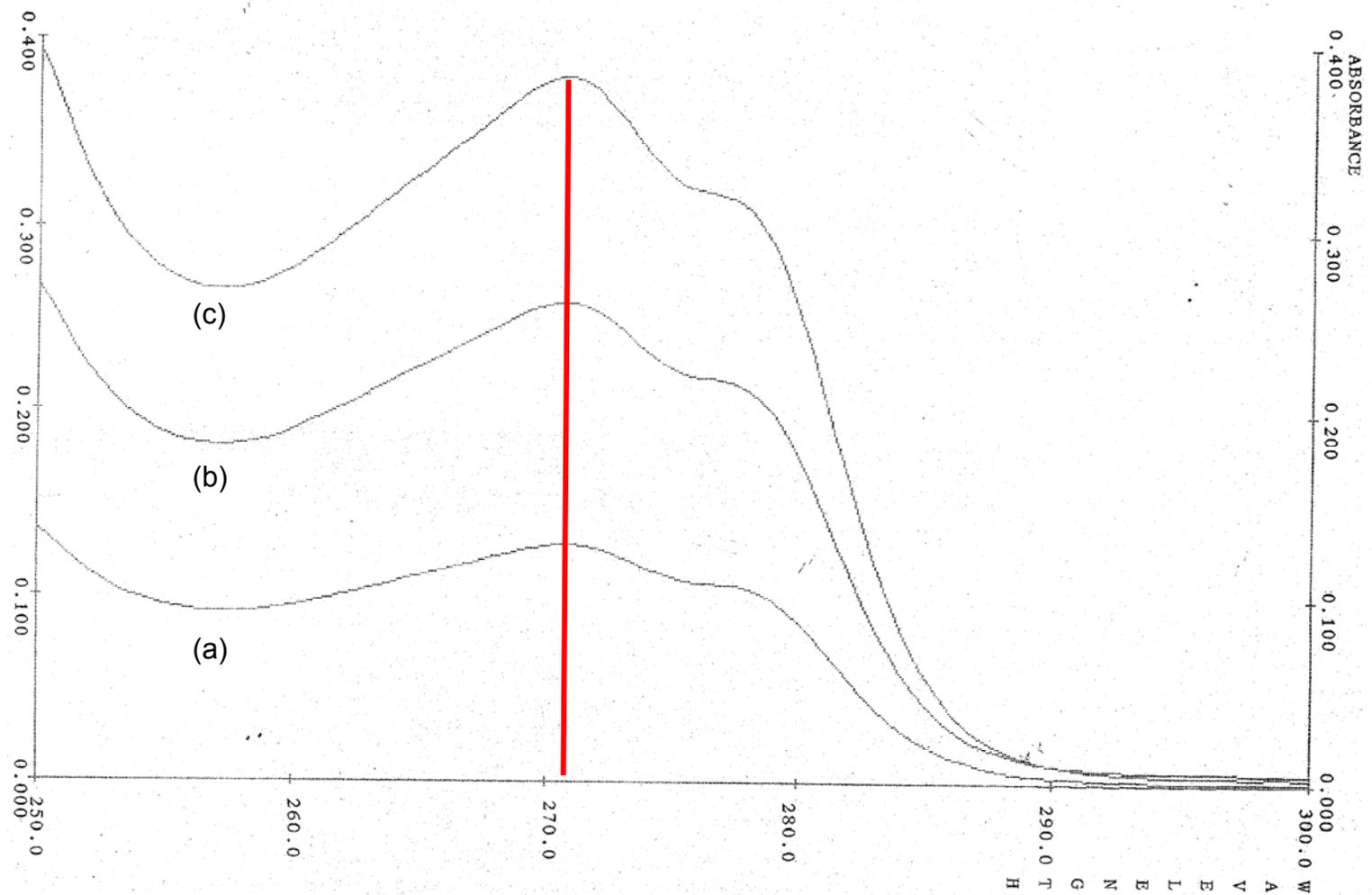


Figura 4.4: Espectro de UV característico para AMX PA (em solução aquosa), $\lambda_{\text{max}} = 272 \text{ nm}$. (a) $1,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, (b) $2,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e (c) $4,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

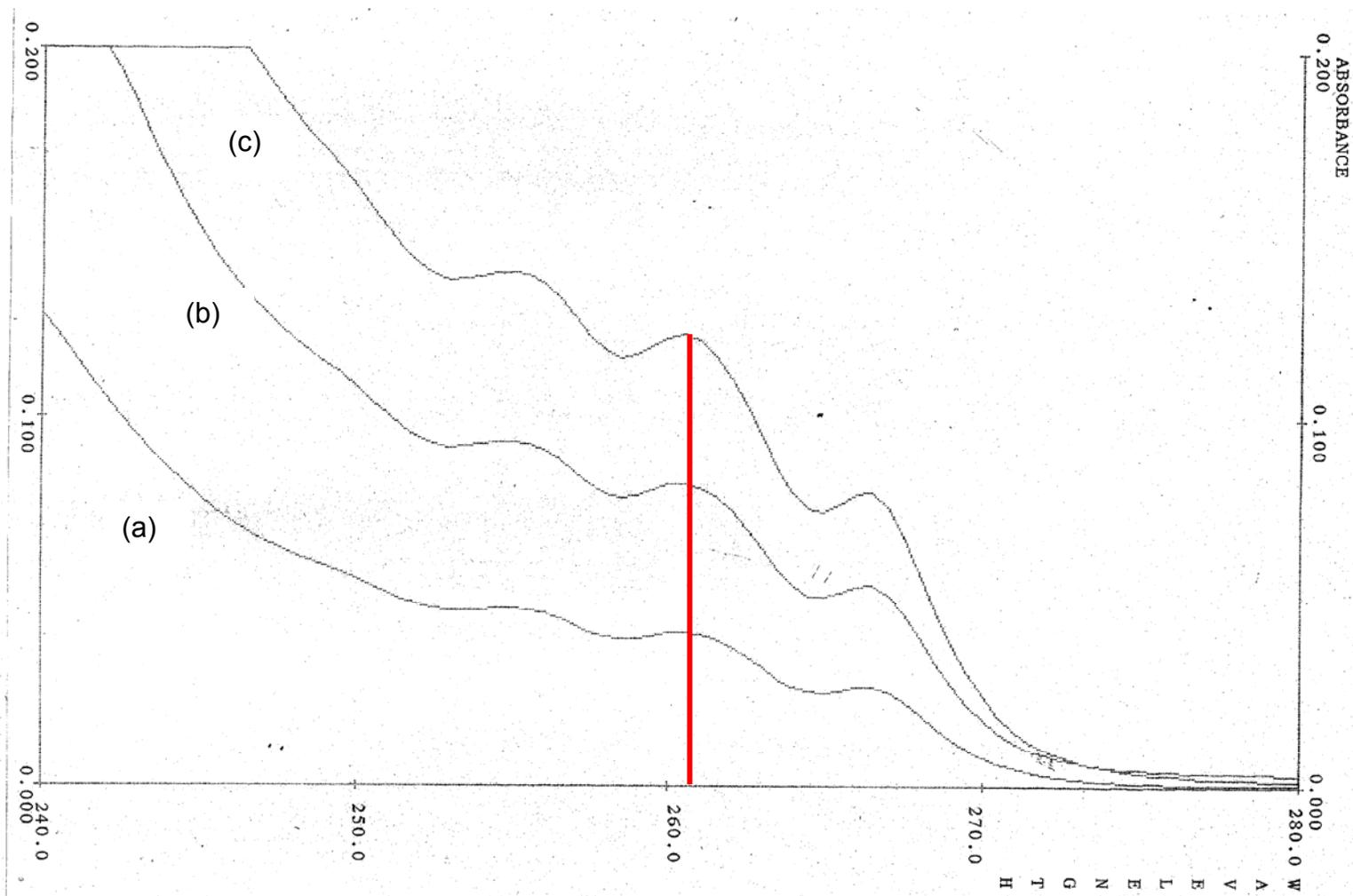


Figura 4.5: Espectro de UV característico para AMP PA (em solução aquosa), $\lambda_{\text{max}} = 262 \text{ nm}$. (a) $3,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, (b) $5,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e (c) $1,08 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

Estudos realizados por espectrofotometria de UV com o efluente industrial da produção de AMX e de AMP filtrados (0,45 μm), apresentaram concentrações que variaram de $1,0 \times 10^{-3}$ a $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ tanto para AMX quanto para AMP, valores estes compreendidos na faixa de concentração estudada para os padrões e que serviram de base para os estudos de oxidação.

4.3 Avaliação do impacto na estação de lodo ativado pelo lançamento de resíduo de hidrólise de antibióticos penicilânicos

A avaliação do impacto do descarte de resíduos do tratamento por hidrólise básica de antibióticos beta-lactâmicos em ETE com sistema de lodo ativado é necessária para que se possa entender a necessidade de um sistema de tratamento mais eficiente para resíduos da produção desses fármacos.

As indústrias farmacêuticas produtoras de formulações para antibióticos como AMX e AMP, utilizam o método de hidrólise básica como forma de pré-tratamento de seus efluentes da linha de produção antes de descartá-los em suas ETE. As ETE normalmente utilizam tratamento biológico (lodo ativado) pois não há no Brasil uma legislação específica para tratamento desse efluente, há apenas a recomendação para que a molécula seja inativada, o que pode acontecer via hidrólise básica que promove a abertura do anel beta-lactâmico por ataque nucleofílico ao grupo acila do anel.

A avaliação do impacto provocado na estação de lodo ativado de uma indústria farmacêutica localizada em Goiás pelo lançamento de efluentes da linha de produção de penicilânicos, especificamente AMX e AMP, submetidos a hidrólise básica foi realizado de acordo com as especificações do item 3.1.1. Este trabalho requereu uma avaliação do tempo de detenção hidráulica dos tanques da ETE (Tabela 4.1) a partir do qual se determinou o período entre a coleta das amostras.

Tabela 4.1: Tempo de detenção hidráulica em função do volume dos tanques de tratamento *

Etapa do tratamento	Volume total (m ³)	Tempo de detenção hidráulica (h)
Tanque de séptico	37,8	7,56
Tanque de equalização	18,75	3,75
Tanque de aeração	154	30,8
Tanque de decantação	48	4,8
Total		47

*Vazão média de entrada de efluentes no sistema = 5,0 m³/h

Obs.: dados fornecidos pela equipe da ETE da indústria.

Os parâmetros de rotina pH, temperatura, DBO₅, DQO e lodo decantável foram avaliados e os resultados obtidos encontram-se na tabela 4.2.

Tabela 4.2: Cronograma de coleta de amostras e parâmetros analisados

Coleta de efluentes							
Parâmetros Verificados	28/07/05		04/08/05		11/08/05		CONAMA 357/05
	entrada	saída	entrada	saída	entrada	saída	
pH	4,82	7,3	4,75	6,83	5,11	7,1	5,0-9,0
Temperatura (°C)	25,8	28,1	26,4	28,2	25,9	28,7	NR
DBO ₅ (mg O ₂ /L)	1800	135	960	133	1400	120	60,0
DQO (mg O ₂ /L)	2384	222	2220	326	1706	144	NR
razão DBO ₅ /DQO (biodegradabilidade, na saída do sistema)	0,75		0,43		0,82		NR
Lodo decantável (mL)	560		480		520		NR

NR: não há recomendação na legislação. As análises foram realizadas de acordo com a metodologia do Standard Methods for Examination of Water and Wastewater¹⁰².

Os resultados mostram uma alteração no sistema da ETE com o lançamento dos efluentes penicilânicos. A queda na remoção da DBO e da DQO pode estar relacionada com a inativação do sistema de lodo ativado pela atividade biológica própria das penicilinas. A biodegradabilidade também sofreu alteração indicando uma diminuição na capacidade de biodegradabilidade do efluente dos antibióticos penicilânicos após hidrólise ($DQO/QBO_5 > 2$). Em casos como esses, tratamentos combinados físicos e/ou químicos e biológicos são recomendados pela literatura^{86,85}.

A eficiência da ETE foi observada em termos da taxa de remoção da DBO e DQO e da relação DQO/DBO na saída do sistema. A tabela 4.3 a seguir apresenta esses resultados.

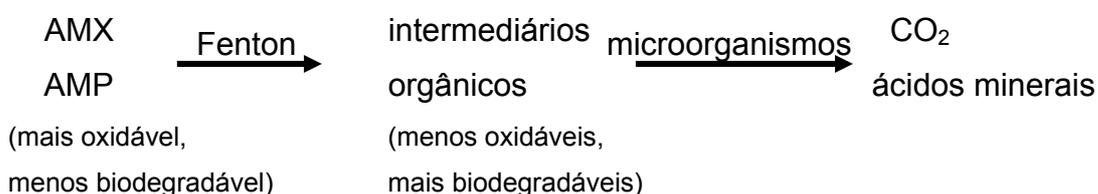
Tabela 4.3: Eficiência do sistema de tratamento, taxa de remoção e eficiência.

Parâmetro	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
DBO	92,5%	86,1%	91,4%
DQO	90,7%	85,3%	91,6%
DQO/DBO	1,32	2,31	1,21

Os resultados mostram uma menor eficiência do sistema, apresentando uma redução da DBO_5 (86,1%) e DQO (85,3%) para a 2ª coleta, exatamente no período em que o resíduo da hidrólise básica dos antibióticos permaneceu em tratamento na estação, inferior ao encontrado para as demais coletas indicando a necessidade do desenvolvimento de novas metodologias para degradação desses poluentes devido a sua recalcitrância.

Segundo Kümmerer (2004)¹³, devido as Boas Práticas de Fabricação (BPF) adotadas pelas indústrias e ao alto custo das matérias primas, a contribuição das mesmas com o aporte de PhAC no meio ambiente na Europa e nos Estados Unidos sejam baixos e que só trariam problemas em caso de acidentes mas, mesmo assim, o problema seria localizado. Esse ponto é

bastante questionável quando se tem a informação de que pequenas concentrações é que levam ao desenvolvimento de organismos resistentes. A questão do efluente industrial é importante exatamente por ser localizada e, portanto, permitir o uso de tecnologias combinadas como reator de degradação por reagente Fenton seguido de descarte em estação de lodo ativado, minimizando assim a contaminação ambiental. O propósito de teses como esta é de que se alcance o máximo de mineralização com o menor custo. Assim, a partir do uso do processo oxidativo reagente de Fenton para a degradação de efluentes da produção dos antibióticos AMX e AMP, pode-se ter:



que é o espera-se alcançar em um tratamento de efluente.

4.4 Amostra sintética

Para o desenvolvimento do trabalho, na busca de tratamentos preliminares que permitissem um melhor rendimento para a oxidação de antibióticos penicilânicos, foram testadas amostras sintéticas de AMX e AMP em solução aquosa para realização de ensaios de degradação por POA.

A utilização de efluentes industriais *in natura* fez parte da etapa final do trabalho, após a definição do POA com o melhor rendimento. Nos experimentos realizados todos os reagentes foram adicionados no início do processo (sistema de batelada).

4.5 Ensaios de degradação por POA

Para avaliação do potencial de degradação da AMX e AMP, realizaram-se ensaios de diferentes POA. A avaliação dos resultados baseou-se na

redução da concentração dos substratos orgânicos, concentração residual, determinados por espectrofotometria no UV. As leituras foram realizadas tomando-se como base os comprimentos de onda (λ) do pico máximo para AMX, $\lambda_{\text{max}}=272$ nm, e para AMP, $\lambda_{\text{max}}=262$ nm experimentalmente estabelecidos.

O estudo compreendeu a avaliação por diferentes POA da degradação durante um período de 60 min, com amostras coletadas em intervalos de 10 min para cada ensaio conforme descrito no item 3.5.

Os processos oxidativos avaliados foram fotodegradação, peroxidação, fotoperoxidação, reagente de Fenton, foto-Fenton, reagente de Fenton/ Fe^{3+} , foto-Fenton/ Fe^{3+} .

A tabela 4.4 apresenta as quantidades de matéria (mol) utilizadas dos reagentes H_2O_2 , FeCl_2 e FeCl_3 , nas oxidações testadas para AMX e para AMP. As concentrações de AMX e AMP foram estabelecidas tomando-se como base estudos preliminares com efluente industrial (item 4.2).

Tabela 4.4 – Quantidade de matéria (mol) utilizados nos diferentes POA para 200 mL de solução $2,86 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AMX e 200 mL de solução $3,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AMP

POA/ Reagente (mol)	UV	H_2O_2	UV/ H_2O_2	Fenton	Fenton/ UV	Fenton/ Fe^{3+}	Fenton/ Fe^{3+}/UV
H_2O_2	-	$9,79 \times 10^{-3}$	$9,79 \times 10^{-3}$	$9,79 \times 10^{-3}$	$9,79 \times 10^{-3}$	$9,79 \times 10^{-3}$	$9,79 \times 10^{-3}$
FeCl_2	-	-	-	1×10^{-5}	1×10^{-5}	-	-
FeCl_3	-	-	-	-	-	1×10^{-5}	1×10^{-5}

Nesta etapa do trabalho, quantidades idênticas de reagentes foram utilizadas nos testes tanto para AMX quanto para AMP com objetivo de avaliar-se o rendimento para ambos. A necessidade deste procedimento decorre do fato de que durante o período de mudança na produção de AMX para AMP ou vice-versa, pode ocorrer mistura dos antibióticos no tanque reservatório de penicilânicos.

Os valores de pH (inicial e final) para cada ensaio encontram-se discriminados na tabela 4.5. Este acompanhamento do pH é necessário devido ao rendimento das reações estarem diretamente relacionados com este parâmetro. A formação dos radicais $\bullet\text{OH}$ é maior quando o pH se encontra próximo de 3. Esta condição foi observadas nas soluções que usam o Fe^{2+} como catalisador.

Tabela 4.5: Variação de pH durante os diversos ensaios com POA utilizando soluções sintéticas de AMX e AMP.

Ensaio	UV	H_2O_2	$\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$	Fenton	Fenton/UV	Fenton/ Fe^{3+}	Fenton/ Fe^{3+}/UV
AMX							
pHi	4,70	4,70	4,70	4,70	4,70	4,70	4,70
pHf	4,58	4,50	4,27	2,67	2,42	2,72	2,82
AMP							
pHi	5,08	5,08	5,08	5,08	5,08	5,08	5,08
pHf	4,87	4,80	4,49	2,85	2,68	2,78	2,78

Os resultados obtidos para os ensaios de oxidação nos tempos 30 e 60 min de degradação se encontram na tabela 4.6. Esses mostram que os melhores rendimentos na degradação foram obtidos nos processos oxidativos Fenton/UV e Fenton/ Fe^{3+}/UV . Para AMX obteve-se um valor máximo de remoção do analito de 99,62% (Fenton/UV) e para AMP de 97,52% (Fenton/ Fe^{3+}/UV).

A importância na avaliação da oxidação em função do tempo se deve ao custo do processo que envolve consumo de energia elétrica para agitação do sistema e, nos processos foto-químicos, o uso de radiação UV artificial.

Tabela 4.6: Percentagem de degradação de AMX e AMP em função do POA.

Ensaio/ tempo (min)	AMX (%)		AMP (%)	
	30	60	30	60
Fenton/ Fe ³⁺	99,61	99,61	53,18	79,79
Fenton/ Fe ³⁺ /UV	99,61	99,61	88,67	97,52
Fenton	85,84	97,13	60,73	95,42
Fenton/ UV	99,62	99,62	60,73	95,42
H ₂ O ₂	7,29	7,29	8,66	8,66
H ₂ O ₂ /UV	12,07	12,07	8,66	8,66
UV	0	0	0	0

A variação da razão de remoção de AMX e AMP durante os ensaios para os diferentes POA em função do tempo encontra-se representada nas figuras 4.6 e 4.7. Observa-se uma redução significativa da concentração de AMX e AMP para os processos que utilizam Fe como catalisador. Os processos que fazem uso do catalisador e de radiação UV se mostraram mais eficientes.

Os resultados são evidentes quanto à eficiência do uso do Fe como catalisador. Os processos catalisados levaram a uma redução da concentração de AMX que variou de 85 a 99% (foto-assistido) enquanto para AMP a variação foi de 79 a 97% (foto-assistido). A combinação Fe catalisador/radiação UV mostrou-se eficiente tanto para a oxidação de AMX quanto para AMP.

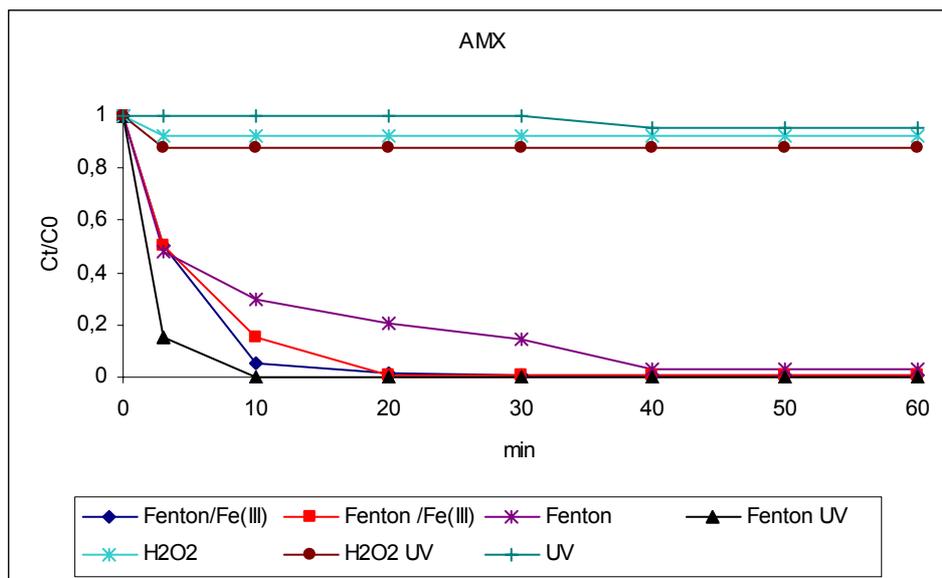


Figura 4.6: Razão de redução da concentração de AMX durante 60 min.

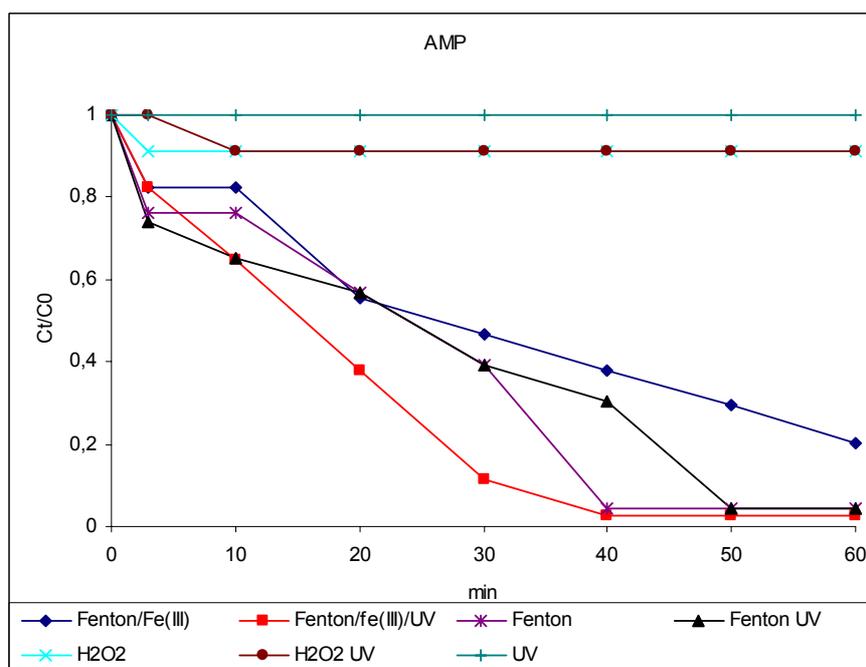
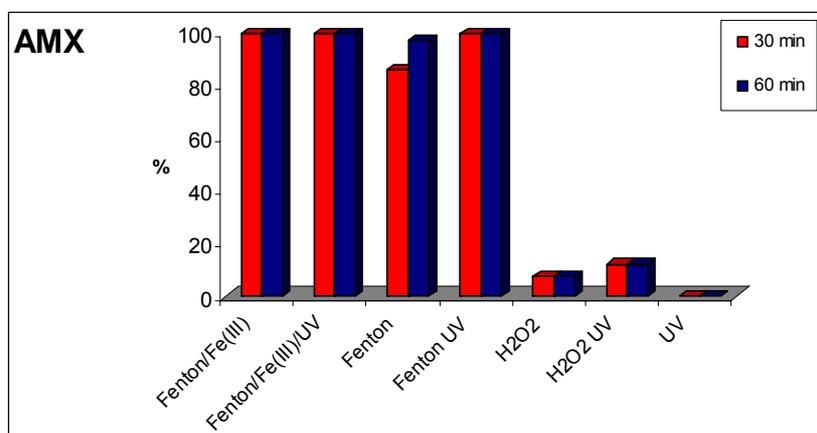


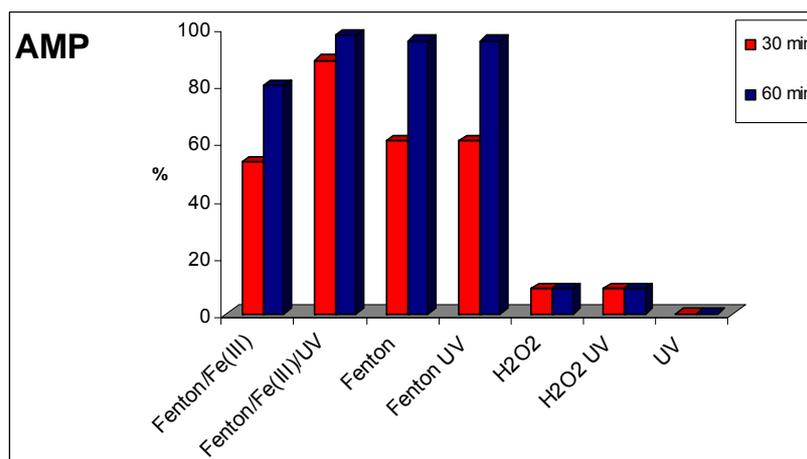
Figura 4.7: Razão de redução da concentração de AMP durante 60 min.

Na figura 4.8 apresenta-se uma comparação em termos de percentuais de redução da concentração do analito (AMX e AMP) para diferentes tempos de reação (30 e 60 min). Para as oxidações catalisadas e foto-assistidas observa-se um rendimento para os tempos 30 e 60 min, praticamente idênticos no caso da AMX. Para AMP, isso não se repetiu, mostrando que a questão tempo de reação interfere no rendimento da mesma.

Os ensaios realizados com os diferentes POA mostram que os melhores rendimentos foram obtidos após 60 min de oxidação. Para AMX, os percentuais obtidos foram os seguintes: 99,62% para Fenton/UV e 99,61% para Fenton/ Fe³⁺ /UV, já para AMP o percentual de degradação chegou a 97,42% para Fenton/UV e 97,52% para Fenton/ Fe³⁺/UV. Pode-se observar também que os ensaios Fenton e Fenton/ Fe³⁺ apresentaram rendimentos acima de 99% para AMX e de 97% para AMP. Partindo-se do fato de que os ensaios com o uso de radiação UV custam 2 a 3 vezes mais caros que os sem UV¹⁰⁹, o uso do reagente de Fenton para a degradação desse compostos orgânicos se mostra bastante promissor.



(a)



(b)

Figura 4.8: Avaliação do percentual de remoção com relação ao tempo de reação para (a) AMX e (b) AMP.

Considerando-se os resultados obtidos e o consumo de energia no processo foto-assistido, pode-se estabelecer o reagente de Fenton como POA a ser otimizado para oxidação de soluções sintéticas de AMX e AMP.

4.6 Estudos da degradação de AMX e AMP utilizando reagente de Fenton

Após a definição do POA reagente de Fenton como o processo a ser adotado, realizaram-se os ensaios para a determinação (ajuste) das concentrações de H_2O_2 e Fe^{2+} que levariam ao um melhor rendimento. A tabela 4.7 apresenta as concentrações utilizadas nos ensaios para AMX.

Tabela 4.7: Quantidade de matéria (mol) utilizada na oxidação de AMX por reagente de Fenton.

Quantidade de matéria (mol) e razão molar				
Ensaio	(a)	(b)	(c)	(d)
AMX	$1,43 \times 10^{-4}$	$1,43 \times 10^{-4}$	$1,43 \times 10^{-4}$	$1,43 \times 10^{-4}$
H_2O_2	$2,44 \times 10^{-3}$	$3,28 \times 10^{-3}$	$4,89 \times 10^{-3}$	$9,79 \times 10^{-3}$
Fe^{2+}	$5,0 \times 10^{-5}$	$6,7 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-4}$
$\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$	49	49	49	49
AMX/ H_2O_2	0,058	0,043	0,029	0,014
AMX/ Fe^{2+}	2,86	2,13	1,43	0,71

A figura 4.9 apresenta um acompanhamento da variação da concentração residual de AMX por espectrofotometria no UV para os diversos ensaios de degradação por reagente de Fenton durante um período de 60 min.

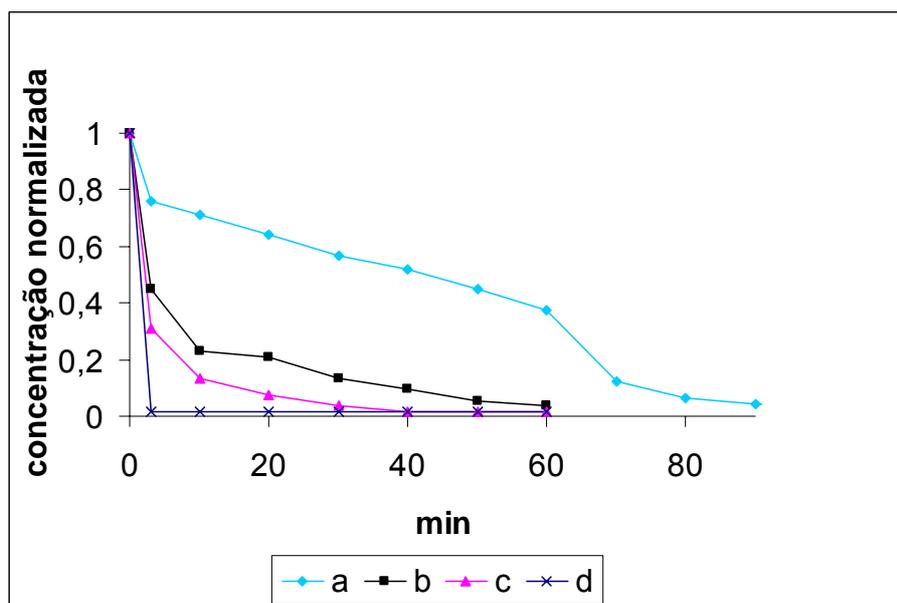


Figura 4.9: Oxidação da AMX por reagente de Fenton: (a) $2,44 \times 10^{-3}$ mol de H_2O_2 , (b) $3,28 \times 10^{-3}$ mol de H_2O_2 , (c) $4,89 \times 10^{-3}$ mol de H_2O_2 e (d) $9,79 \times 10^{-3}$ mol de H_2O_2

Os ensaios (c) e (d) se mostraram os mais eficientes, com uma redução de cerca de 100% dos analitos após um período de 60 min de oxidação. Esse resultado era esperado devido ao aumento na concentração de radicais livres hidroxila promovidos na mistura reacional de acordo com a concentração de H_2O_2 utilizada.

As quantidades de matéria (mol) utilizadas nos diversos ensaios realizados para avaliação da degradação por reagente de Fenton de AMP encontram-se discriminados na tabela 4.8.

O baixo rendimento obtido para os ensaios (a) a (d) levou a necessidade de um estudo mais amplo do que o realizado com AMX. Observou-se a necessidade de concentrações maiores de H_2O_2 para uma degradação mais eficiente.

A figura 4.10 apresenta os resultados obtidos a partir da determinação da concentração residual de AMP por espectrofotometria no UV para cada ensaio de degradação com reagente de Fenton durante um período de 60 min.

Tabela 4.8: Quantidade de matéria (mol) utilizada na oxidação de AMP por reagente de Fenton.

Quantidade de matéria (mol) e razão molar							
ensaio	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)
AMP	$1,62 \times 10^{-4}$						
H ₂ O ₂	$2,44 \times 10^{-3}$	$3,28 \times 10^{-3}$	$4,89 \times 10^{-3}$	$9,79 \times 10^{-3}$	$1,22 \times 10^{-2}$	$1,47 \times 10^{-2}$	$1,96 \times 10^{-2}$
Fe ²⁺	$5,0 \times 10^{-5}$	$6,7 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-4}$	$3,1 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-4}$
H ₂ O ₂ / Fe ²⁺	48,8	48,9	48,9	48,9	48,8	48,8	48,7
AMP/ H ₂ O ₂	0,066	0,049	0,033	0,016	0,013	0,11	0,008
AMP/ Fe ²⁺	3,24	2,42	1,62	0,81	0,65	0,52	0,40

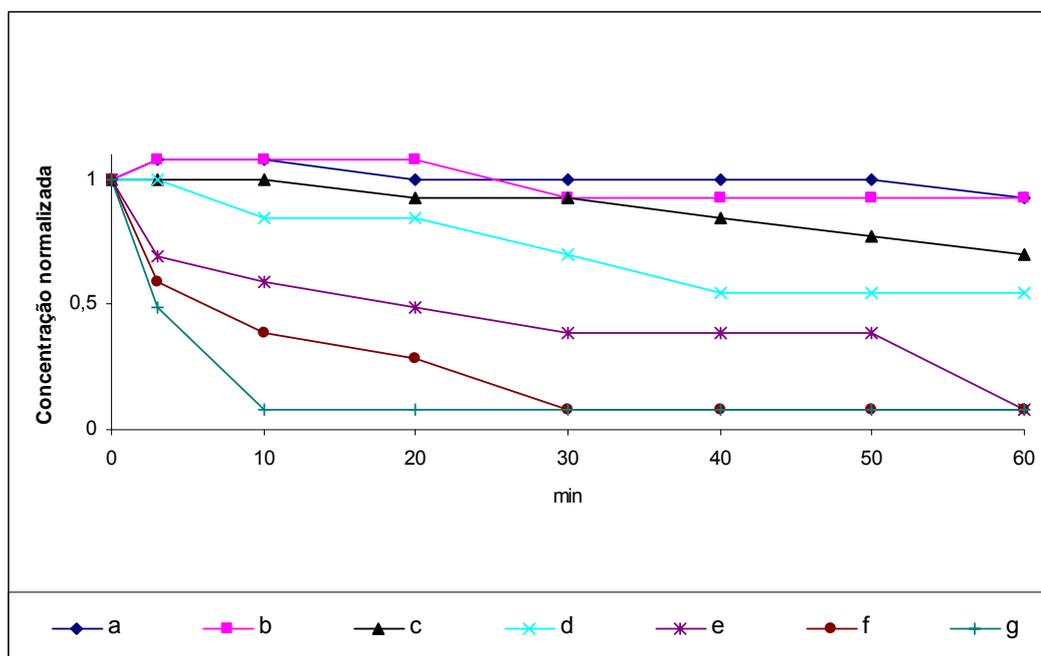


Figura 4.10: Oxidação da AMP por reagente de Fenton: (a) $2,44 \times 10^{-3}$ mol de H₂O₂, (b) $3,28 \times 10^{-3}$ mol de H₂O₂, (c) $4,89 \times 10^{-3}$ mol de H₂O₂, (d) $9,79 \times 10^{-3}$ mol de H₂O₂, (e) $1,22 \times 10^{-2}$ mol de H₂O₂, (f) $1,47 \times 10^{-2}$ mol de H₂O₂ e (g) $1,96 \times 10^{-2}$ mol de H₂O₂.

Os resultados mostram que os ensaios (e), (f) e (g) atingiram uma redução da concentração de AMP de próxima de 97% após 60 min de oxidação.

A partir dos resultados obtidos, considerando-se a maior razão de remoção com menor consumo de reagentes para $t = 60$ min, pode-se observar que o melhor rendimento para AMX foi obtido com $3,28 \times 10^{-3}$ mol de H_2O_2 e $6,7 \times 10^{-5}$ mol de Fe^{2+} . Para a AMP, o melhor rendimento foi obtido com $1,22 \times 10^{-2}$ mol de H_2O_2 e $2,5 \times 10^{-4}$ mol de Fe^{2+} .

4.6.1 Influência da concentração de H_2O_2

A determinação do k_{obs} ($\Delta[AMX]/\Delta t$) (Figura 4.11), assumindo a reação como de pseudo 1ª ordem, mostra-se constante a partir da presença de $3,28 \times 10^{-3}$ mol de H_2O_2 . Este valor coincide com o considerado ótimo no estudo da determinação de AMX residual.

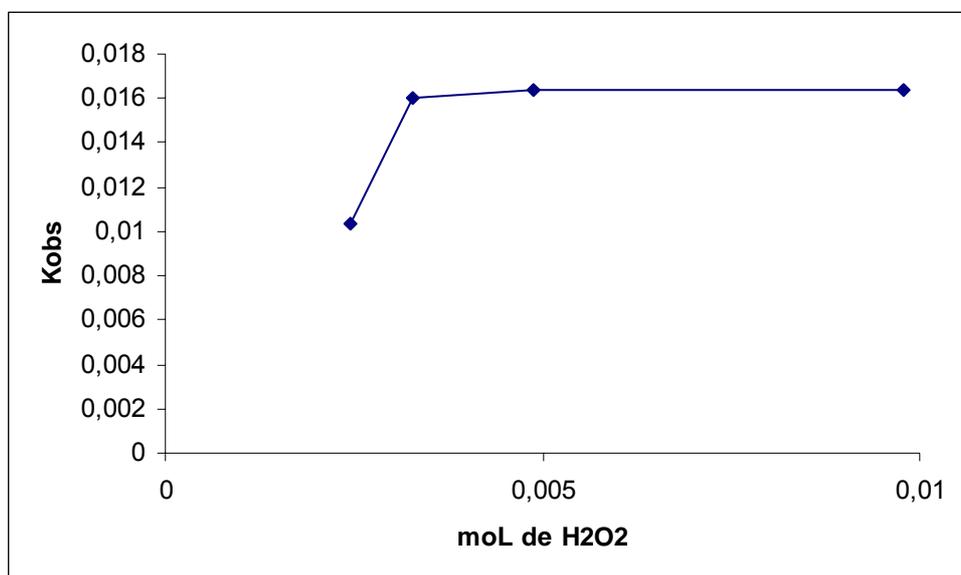


Figura 4.11: Relação entre k_{obs} e a concentração de H_2O_2 na degradação de AMX por reagente de Fenton.

A determinação do k_{obs} ($\Delta[AMP]/\Delta t$) (Figura 4.12), assumindo a reação como de pseudo 1ª ordem, se mostra constante a partir da presença de 1,22

$\times 10^{-2}$ mol de H_2O_2 . Este valor coincide com o considerado ótimo no estudo da determinação de AMP residual.

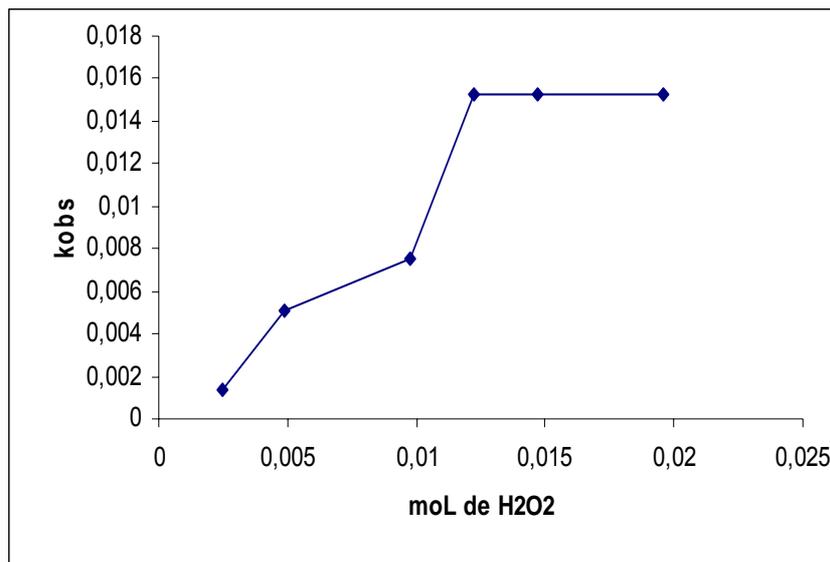


Figura 4.12: Relação entre k_{obs} e a concentração de H_2O_2 na degradação de AMP por reagente de Fenton.

Com o aumento da concentração de H_2O_2 , espera-se uma maior destruição dos contaminantes. A constatação de que o K_{obs} a partir de uma determinada concentração se torne constante pode ser justificada pela formação de radicais hidroxiperoxila ¹⁰⁹, que são oxidantes menos enérgicos que os radicais $\bullet\text{OH}$ e que consomem esses radicais para sua formação. Conclui-se assim que a razão ideal de $\text{AMX}/\text{H}_2\text{O}_2$ para a degradação por reagente de Fenton é 0,043 e para $\text{AMP}/\text{H}_2\text{O}_2$ é 0,013. Esta avaliação é fundamental em termos de custo do tratamento da matriz (efluente industrial).

Apesar da comprovada eficiência na redução da concentração dos analitos estudados, há a necessidade de se avaliar a redução do parâmetro DQO das oxidações por reagente de Fenton. As quantidades de H_2O_2 determinadas pelos estudos cinéticos para AMX e AMP servirão como base para esses estudos.

Observou-se durante a realização dos ensaios de oxidação tanto para AMX como para AMP, a formação de um resíduo sólido que permaneceu após 24 h do final do ensaio. Estudos mostram que a destruição dos compostos de interesse assim como de seus intermediários pode ser prejudicada pela

formação de um precipitado durante a reação ¹¹⁰. Esse fato é relevante pois, em processos promovidos por radiação UV, esses compostos provocam uma diminuição no aproveitamento dos fótons emitidos pela fonte luminosa (natural ou artificial), devido ao espalhamento, atrapalhando a degradação do contaminante de interesse¹¹¹. A formação desse precipitado pode também favorecer a adsorção dos contaminantes, prejudicando o tratamento¹¹⁰.

4.7 Avaliação da razão de remoção da DQO no resíduo filtrado e sem filtração

Apesar do pH ácido (<3) ao final dos ensaios, a observação da formação de um precipitado durante o processo de degradação, que persistia por mais de 24 h após o término do ensaio, indicou a necessidade de um estudo que avaliasse a remoção da DQO durante a degradação por reagente de Fenton para AMX. A mistura reacional se constituiu de $1,43 \times 10^{-4}$ mol de AMX: $9,79 \times 10^{-3}$ mol de H_2O_2 : $2,0 \times 10^{-4}$ mol de Fe^{2+} , condição avaliada no ensaios como de alto rendimento na degradação. Essa mistura foi colocada para reagir sob agitação intensa e amostras coletada a cada 10 min para determinação da DQO. A DQO foi obtida tanto do resíduo de degradação filtrado (em éster de celulose, $0,45 \mu m$) como sem filtrar. Os resultados obtidos para a DQO normalizada encontram-se na figura 4.13 a seguir.

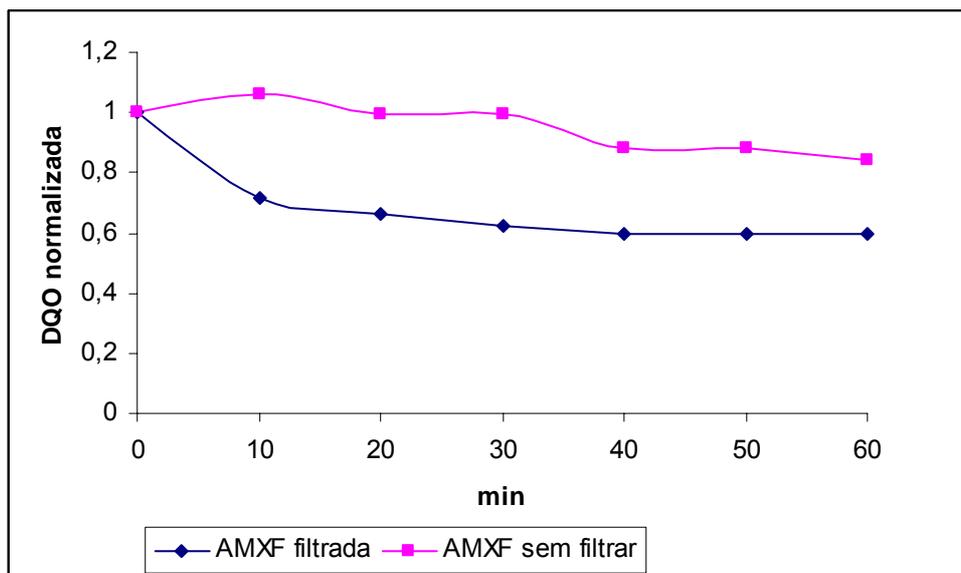


Figura 4.13: DQO normalizada para as soluções filtradas e sem filtrar da degradação por reagente de Fenton para AMX.

Pode-se observar uma variação na razão de remoção da DQO entre filtrado e não filtrado. A ausência do resíduo sólido levou a uma redução da DQO de até 48% enquanto que na presença do mesmo, a redução não ultrapassou 17%.

Pode-se concluir que no resíduo sólido estão presentes compostos carbônicos que tanto podem ser o substrato orgânico que se pretende degradar ou ainda fragmentos desse composto adsorvidos. Há a possibilidade de que complexos de Fe^{3+} gerado pelo reagente de Fenton estejam se formando. Para uma confirmação desses resultados, os resíduos sólidos foram devidamente tratados e preparados para que se realizassem espectros de IR dos mesmos, buscando a confirmação da presença de compostos carbônicos neste material.

4.7.1 Estudos dos resíduos sólidos gerados no processo de oxidação

A presença de íons Fe^{2+} nas soluções de AMX e AMP levaram à formação de produtos solúveis, como pode ser observado nas figuras 4.14 (a) e (c). A adição do H_2O_2 , que promove a formação do reagente de Fenton, faz com que se forme imediatamente uma substância insolúvel em água (figura 4.14 (b) e (d)) turvando a solução.

A formação de Fe^{3+} no meio reacional pode ser o responsável pela formação do resíduo sólido observado. A constatação de que o uso prolongado de antibióticos penicilânicos levava ao efeito clínico anemia, levantou a questão sobre a possibilidade de formação de complexos entre o Fe^{3+} e os antibióticos β -lactâmicos, o que foi confirmado por diversos estudos sobre a formação desses complexos** 112,113,114,115 .

** Anexo 2

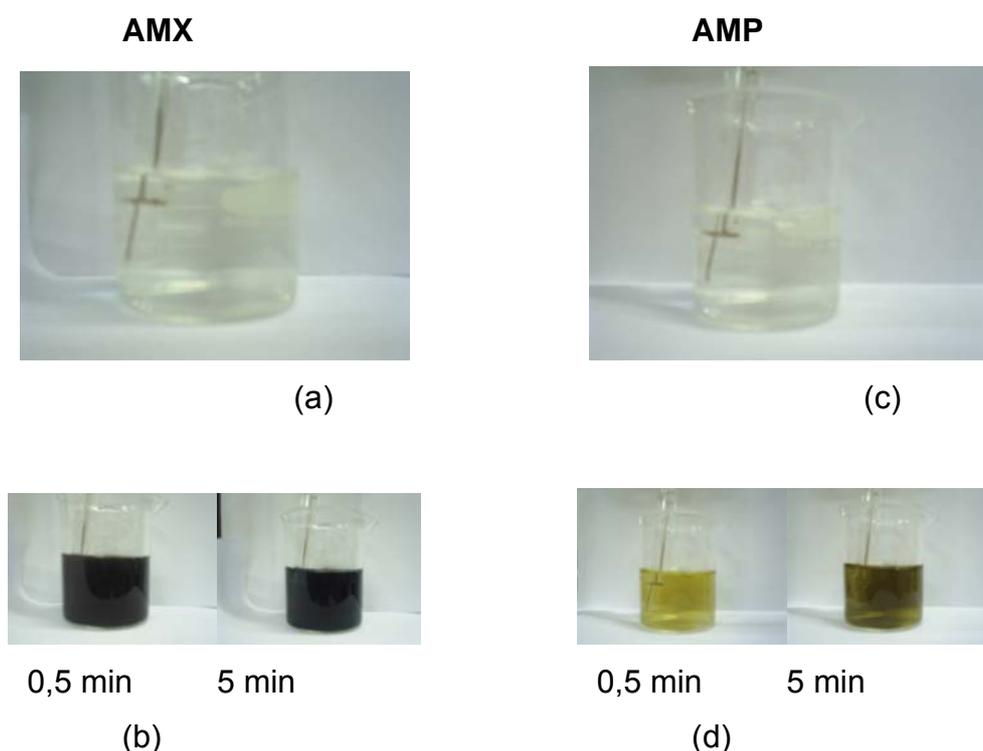


Figura 4.14: Detalhamento do comportamento da amostra em diferentes tempo de reação (a) solução de AMX/ Fe^{2+} , $t=0$ min (b) solução de AMX/ Fe^{2+} / H_2O_2 , $t=0,5$ e 5 min, (c) solução AMP/ Fe^{2+} , $t=0$ min, (d) solução AMP/ Fe^{2+} / H_2O_2 , $t=0,5$ e 5 min

Para os estudos dos resíduos sólidos formados nos processos de oxidação por reagente de Fenton, as suspensões resultantes dos processos de oxidação de AMX e AMP foram então filtradas ($0,45 \mu\text{m}$) e o resíduo sólido obtido foi seco a vácuo. A temperatura de fusão dos mesmos foi determinada sendo que ambos apresentaram $T_{\text{fusão}} > 300 \text{ }^\circ\text{C}$, o que indica a formação de sais inorgânicos. Para a confirmação da presença de compostos orgânicos, obtiveram-se espectros de IR dos mesmos. As figuras 4.15 a 4.18 apresentam os espectros de IR obtidos para matéria prima utilizada bem como para os resíduos obtidos da degradação, possibilitando assim uma comparação entre ambos.

Em destaque o pico referente ao estiramento CONH, ν_{CONH} , aproximadamente 1775 cm^{-1} , do anel β -lactama, característico das penicilinas.

File # 1 : AMX Mode= 2 (Mid-IR) 18/5/2006 11:26
 Sample Description: KBr Sandra
 Scans= 10 Slow Res=4 cm-1 Apod= Cosine Zero Filling= 1 x

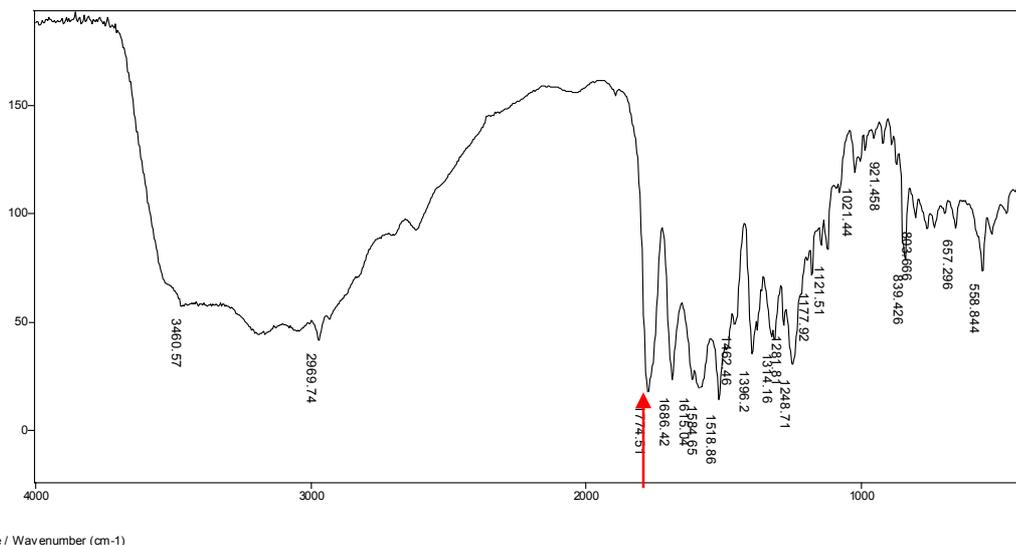


Figura 4.15: Espectro de IR de AMX PA.

File # 1 : AMX502 Mode= 2 (Mid-IR) 18/5/2006 11:06
 Sample Description: KBr Sandra
 Scans= 10 Slow Res=4 cm-1 Apod= Cosine Zero Filling= 1 x

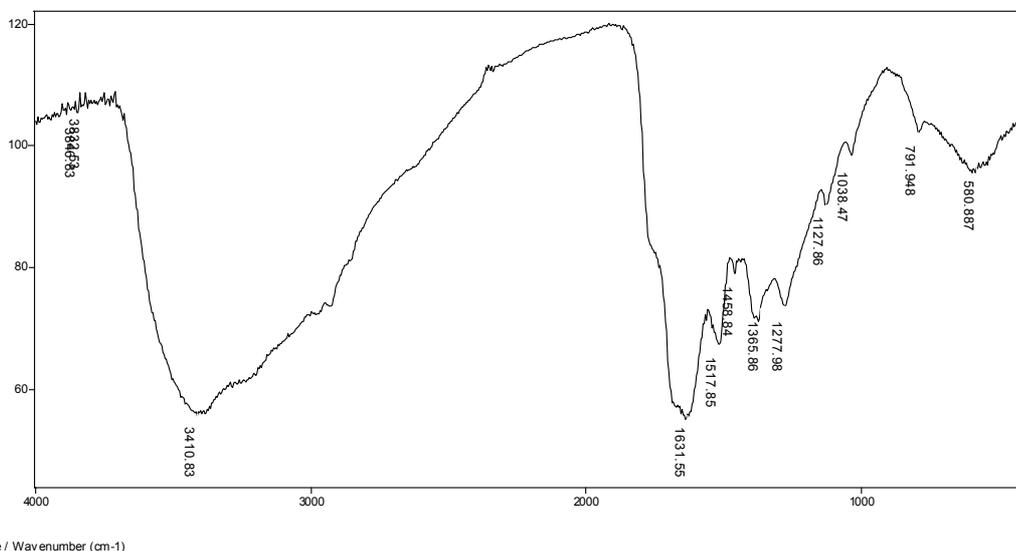


Figura 4.16: Espectro de IR do resíduo sólido gerado na degradação de AMX por reagente de Fenton.

File # 1 : AMP Mode= 2 (Mid-IR) 18/5/2006 11:34
 Sample Description: KBr Sandra
 Scans= 10 Slow Res=4 cm-1 Apod= Cosine Zero Filling= 1 x

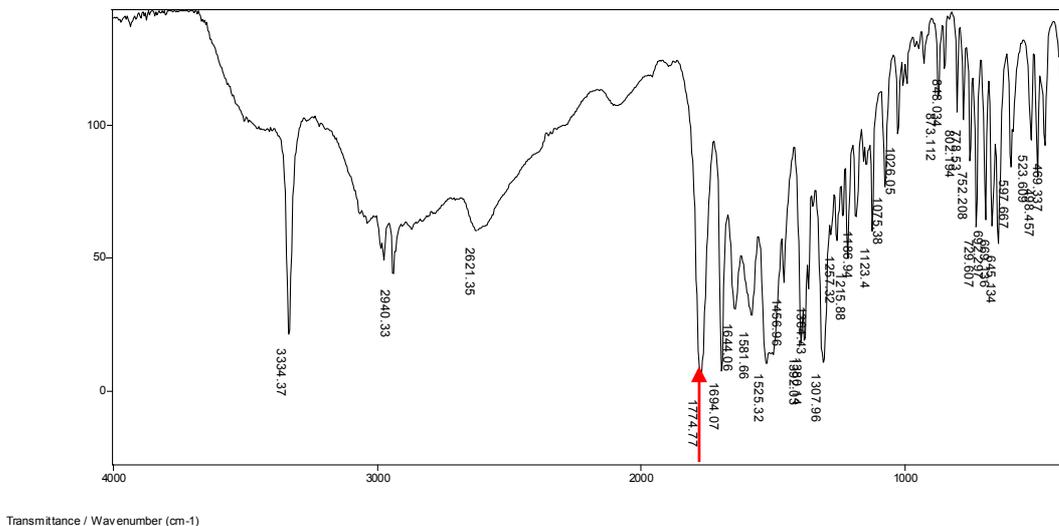


Figura 4.17: Espectro de IR de AMP PA.

File # 1 : AMPF10 Mode= 2 (Mid-IR) 19/5/2006 09:15
 Sample Description: KBr Sandra
 Scans= 10 Slow Res=4 cm-1 Apod= Cosine Zero Filling= 1 x

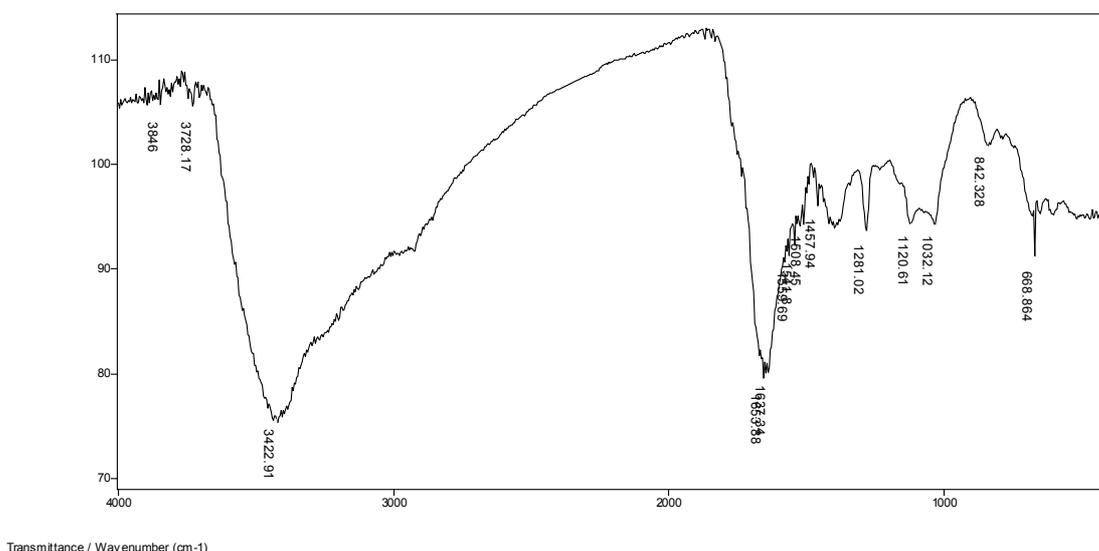


Figura 4.18: Espectro de IR do resíduo sólido gerado na degradação de AMP por reagente de Fenton

Os espectros IR apresentados indicam a presença de compostos orgânicos no resíduo sólido. Pode-se observar que o pico característico das penicilinas, 1775 cm^{-1} , não aparece em destaque como para as matérias primas, mas também não tem-se como afirmar que o anel beta-lactama não se

encontra presente. A banda larga entre 2.600 e 3.500 cm^{-1} indica a presença de anel aromático, grupos carboxila, estiramento N-H e C=O da amida na região de 2.600 cm^{-1} a 3.500 cm^{-1} . A banda larga em torno de 1650 cm^{-1} pode indicar o estiramento ν_{CO} de amida secundária que ocorre em torno 1.680 cm^{-1} e também de C=C aromático em aparece em 1.630 cm^{-1} . As características apresentadas nos espectros indicam à presença de grupos carbônicos tanto no resíduo de AMX degradada por reagente de Fenton (AMX/F) quanto de AMP degradada pelo mesmo processo (AMP/F)

A avaliação da redução de DQO é necessária na solução resultante do processo de oxidação e não somente no filtrado. A possibilidade de formação de complexos de Fe^{3+} com AMX e AMP não pode ser descartada, dessa forma parte do substrato estaria sendo transferido para a fase sólida e não degradado. Um ponto a ser avaliado a partir dos dados de IR é a possibilidade de formação de subprodutos tóxicos devido a presença de moléculas orgânicas resultantes da fragmentação das moléculas de AMX e AMP durante o processo de oxidação.

4.8 Avaliação da redução da DQO

Considerando-se que a DQO é um dos parâmetros utilizados na avaliação da qualidade de um efluente, por permitir que se determine a presença de substâncias recalcitrantes, a avaliação da redução desse parâmetro levará a determinação do grau de oxidação atingido na degradação.

Levando-se em conta os resultados obtidos para os tratamentos oxidativos realizados para AMX e AMP e considerando-se a redução de concentração do contaminante, optou-se pelo processo Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$) para os ensaios de degradação avaliando-se a redução da DQO no processo.

A razão $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ foi mantida constante e a razão AMX/ H_2O_2 foi utilizada como parâmetro na determinação do grau de oxidação. O mesmo trabalho foi desenvolvido para AMP. Nesta fase do trabalho, determinou-se a melhor relação substrato orgânico/ $[\text{H}_2\text{O}_2]$ que promovesse a oxidação sem a

formação do resíduo sólido. Esses estudos tiveram como base as informações obtidas na literatura para penicilina G^{65,66}.

A remoção da DQO foi avaliada a partir do processo com melhor rendimento na relação substrato orgânico/ reagente de Fenton. O sulfato de ferro II heptahidratado foi o sal utilizado como fonte de Fe²⁺ em função do seu baixo custo e por não causar interferência na determinação da DQO.

A tabela 4.9 apresenta as quantidades molares trabalhadas. As mesmas condições para AMX e AMP foram executadas em função da possibilidade de que misturas em concentrações variadas dessas duas substâncias possam estar presentes em efluentes industriais.

Tabela 4.9: Quantidade de matéria (mol) presente nos ensaios de degradação por reagente de Fenton para AMX.

Quantidade de matéria (mol) e razão molar				
Ensaio	(I)	(II)	(III)	(IV)
AMX	$1,4 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-3}$
H ₂ O ₂	$9,79 \times 10^{-4}$	$1,96 \times 10^{-3}$	$2,94 \times 10^{-3}$	$3,91 \times 10^{-3}$
Fe ²⁺	$1,0 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-4}$	$3,0 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-4}$
AMX/ H ₂ O ₂	1,43	0,71	0,47	0,36
AMX/ Fe ²⁺	14	7	4,6	3,5
H ₂ O ₂ / Fe ²⁺	9,8	9,8	9,8	9,8
AMX/ (H ₂ O ₂ / Fe ²⁺)	$1,4 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-3}$

Os resultados obtidos na remoção de DQO para a degradação de AMX com reagente de Fenton durante os 60 min de ensaio encontram-se na figura 4.19.

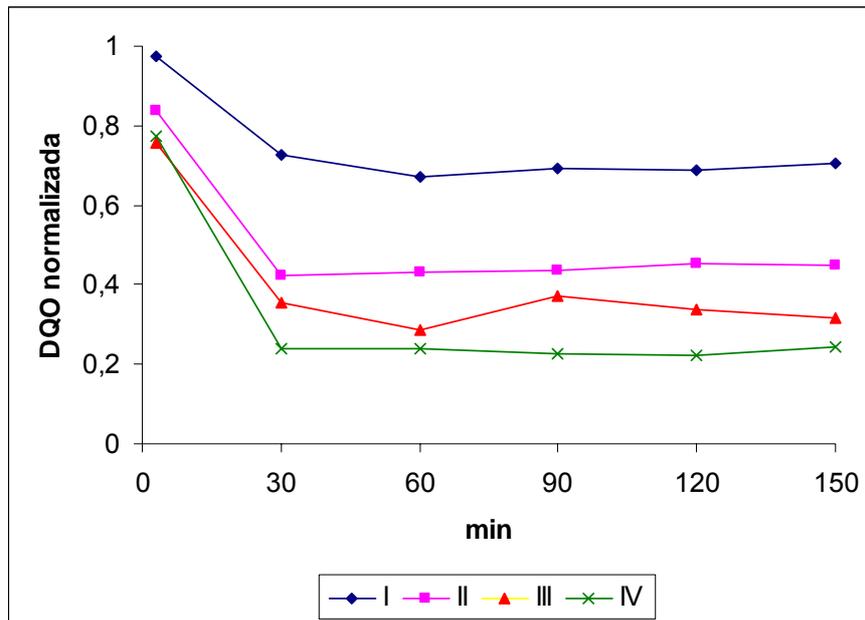


Figura 4.19: Remoção da DQO para os ensaios (I), (II), (III) e (IV) com AMX.

Pode-se concluir que a reação de oxidação ocorre nos primeiros 30 min de reação, a partir dos quais, a reação mantém-se praticamente constante sem variações significativas com relação a redução da DQO. Uma explicação para esse fato é que compostos refratários podem estar sendo formados ou ainda que complexos de Fe imobilizam o catalisador diminuindo a concentração de radicais $\bullet\text{OH}$ formados.

A tabela 4.10 apresenta as quantidades de matéria (mol) trabalhadas para AMP nos ensaios para avaliação da redução da DQO.

Tabela 4.10: Quantidade de matéria (mol) presente nos ensaios de degradação por reagente de Fenton para AMP.

Número de mol em cada ensaio e razão molar				
ensaio	(I)	(II)	(III)	(IV)
AMP	$4,89 \times 10^{-3}$	$4,89 \times 10^{-3}$	$4,89 \times 10^{-3}$	$4,89 \times 10^{-3}$
H ₂ O ₂	$9,79 \times 10^{-4}$	$1,96 \times 10^{-3}$	$2,94 \times 10^{-3}$	$3,91 \times 10^{-3}$
Fe ²⁺	$1,0 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-4}$	$3,0 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-4}$
AMP/ H ₂ O ₂	4,99	2,49	1,66	1,25
AMP/ Fe ²⁺	48,9	24,45	16,3	12,25
H ₂ O ₂ / Fe ²⁺	9,8	9,8	9,8	9,8
AMP/ (H ₂ O ₂ / Fe ²⁺)	$4,99 \times 10^{-4}$	$4,99 \times 10^{-4}$	$4,99 \times 10^{-4}$	$4,99 \times 10^{-4}$

Os resultados obtidos na remoção de DQO para a degradação de AMP com reagente de Fenton durante os 60 min de ensaio encontram-se na figura 4.20.

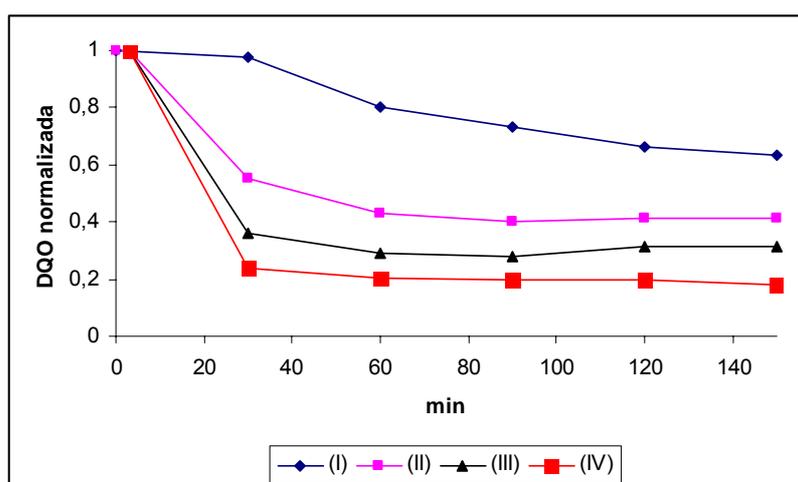


Figura 4.20: Remoção da DQO para os ensaios (I), (II), (III) e (IV) com AMP.

Da mesma forma como observado para a degradação da AMX, pode-se concluir que a reação de oxidação ocorre nos primeiros 30 min de reação, a partir dos quais mantêm-se praticamente constante sem variações significativas com relação a redução da DQO. A formação de compostos refratários ou a complexação dos íons ferro, diminuem a concentração do catalisador e podem estar promovendo este comportamento.

As figuras 4.21 e 4.22 apresentam o detalhamento (aspecto visual) do comportamento da degradação de AMX e AMP em diferentes tempos de reação.

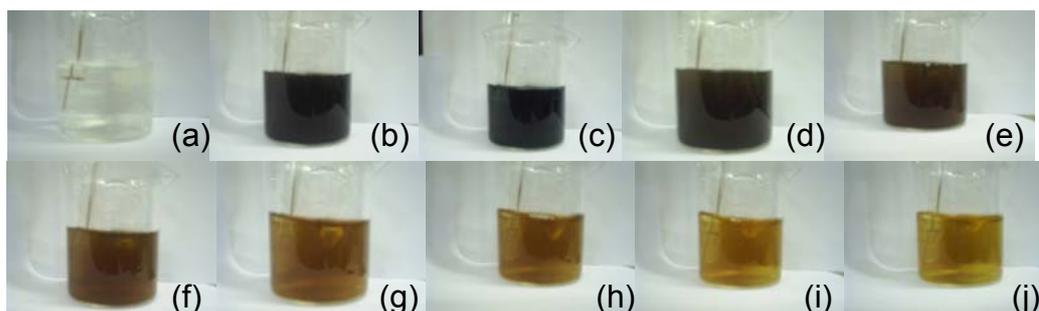


Figura 4.21: Detalhe do comportamento da degradação de AMX por reagente de Fenton para o ensaio (III) em diferentes tempos de reação. (a) AMX e Fe^{2+} , (b) após adição de H_2O_2 e de (c) a (j), a cada 5 min de reação.

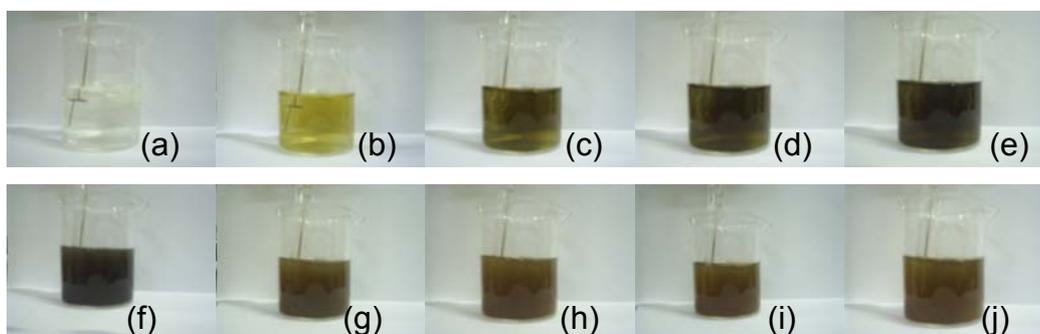


Figura 4.22: Detalhe do comportamento da degradação de AMP por reagente de Fenton para o ensaio (III) em diferentes tempos de reação. (a) solução de AMP e Fe^{2+} , (b) após adição de H_2O_2 e de (c) a (j), a cada 5 min de reação.

Apesar do pH próximo de 2, observa-se a formação de uma suspensão que turva a solução. A formação de um complexo entre AMX e Fe^{3+} nessas condições encontra-se relatado na literatura¹¹². A razão AMX/ H_2O_2 e AMP/ H_2O_2

são fundamentais para que esse resíduo sólido não se forme durante a degradação.

A figura 4.23 apresenta os aspectos visuais dos resíduos das degradações com reagente de Fenton com AMX para os ensaios (I), (II), (III) e (IV) após 60 min de reação. Pode-se observar a presença de sólidos, provavelmente complexos de AMX com Fe^{3+} , em (I) e (II). Já nos ensaios (III) e (IV) não encontra-se resíduos sólidos, um indicativo de que a razão entre AMX e H_2O_2/Fe^{2+} promove a degradação da matriz (solução do antibiótico) a compostos refratários que não formam complexos insolúveis nas condições da reação ($pH < 3$).

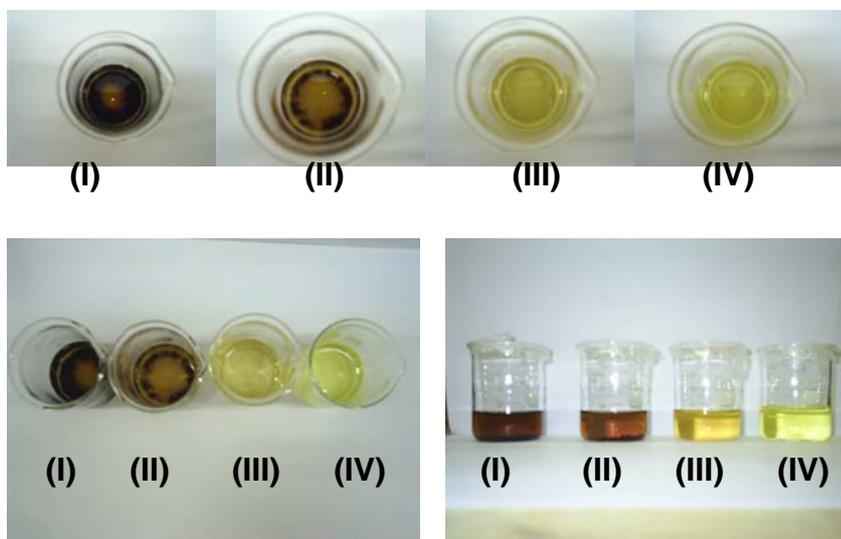


Figura 4.23: Aspecto visual do resíduo da degradação AMX/reagente de Fenton após 24 h. Ensaios (I), (II), (III) e (IV)

Os ensaios III e IV, onde não houve formação de resíduo sólido insolúvel, apresentaram também os melhores rendimentos quanto à redução da DQO na oxidação da AMX e AMP. Tem-se então as concentrações utilizadas no ensaio IV como as mais promissoras.

Os resultados obtidos para a remoção da DQO, percentual de remoção, para AMX e AMP no processo de degradação por reagente de Fenton, encontram-se representados nas figuras 4.24 e 4.25.

Os resultados obtidos mostram que a razão $AMX/H_2O_2 = 0,36$ levou a um rendimento na remoção de DQO de 75,62% enquanto que para AMP o melhor rendimento foi obtido para a razão $AMP/H_2O_2 = 1,25$ que resultou em

uma remoção de 81,92% da DQO confirmando que o melhor rendimento foi obtido a partir das soluções que não formaram resíduo sólido, estando assim o catalisador livre para promover a formação dos radicais $\bullet\text{OH}$, e a formação de compostos refratários a partir da degradação da AMX e da AMP foi menor.

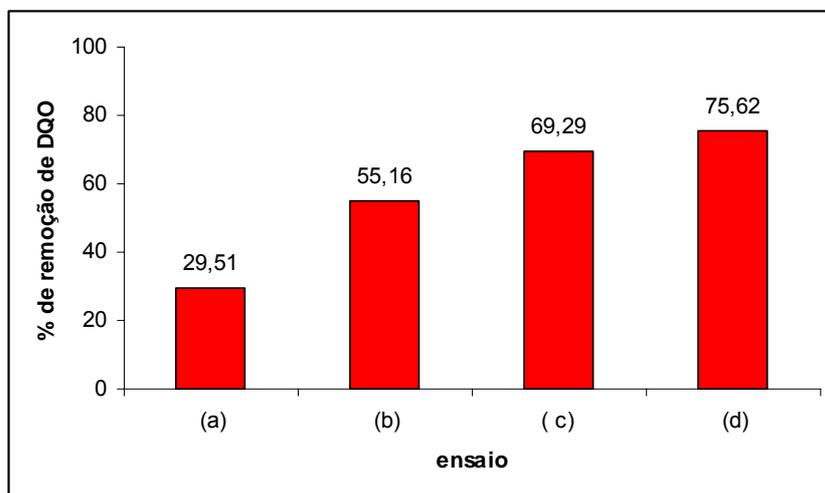


Figura 4.24: Razão de remoção da DQO para os ensaios (I), (II), (III) e (IV) com AMX ($t_f = 60$ min).

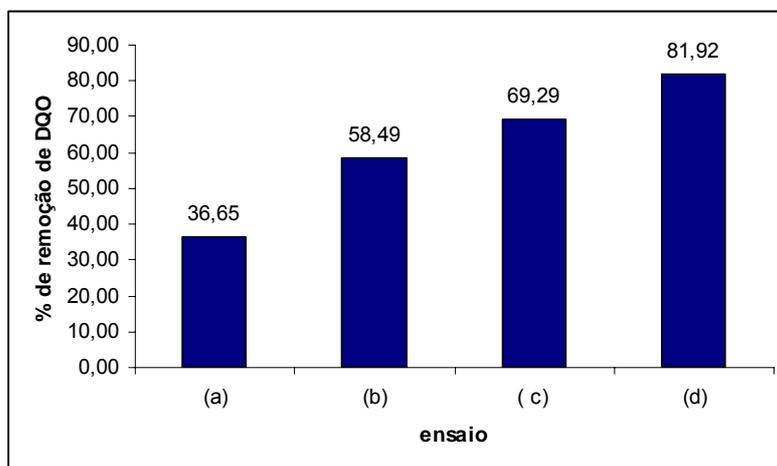


Figura 4.25: Razão de remoção da DQO para os ensaios (I), (II), (III) e (IV) com AMP ($t_f = 60$ min).

4.9 Acompanhamento do pH

Devido à dependência da eficiência do reagente de Fenton com relação ao pH, há necessidade de um acompanhamento da sua variação durante a degradação. A reação de formação do radical $\cdot\text{OH}$ por reagente de Fenton é fortemente dependente do pH, somente em condições ácidas este radical é o oxidante reativo predominante¹¹⁶.

Este estudo foi realizado para os ensaios que apresentaram melhor rendimento, o ensaio (IV) tanto para AMX quanto para AMP.

Para AMX e AMP tem-se que o pH inicial da solução de trabalho se encontra na faixa de 4,0. Estudos mostram que o pH próximo de 3 é uma condição ótima para o uso do reagente de Fenton como oxidante¹¹⁷. A adição do Fe^{2+} seguida pela de H_2O_2 leva o pH para aproximadamente 2,1.

A Tabela 4.11 apresenta as variações de pH para as degradações de AMX e AMP bem como para o reagente de Fenton. A figura 4.26 apresenta a variação do pH em função do tempo para o ensaio com melhor rendimento tanto para AMX como para AMP. O reagente de Fenton também foi acompanhado quanto a variação de pH para uma comparação com as soluções AMX e AMP em reação do reagente de Fenton.

Tabela 4.11: Variação de pH em função do tempo de reação.

Tempo (min)/ pH	0	30	60	90
Reagente de Fenton	5,88	2,89	2,88	2,87
AMX/Fenton	4,69	2,09	2,06	2,05
AMP/Fenton	4,15	2,18	2,15	2,14

Os resultados mostram uma acidez maior para as soluções do reagente de Fenton na presença de AMX e AMP com relação à solução do reagente puro. A figura 4.26 apresenta o comportamento do pH para o reagente de Fenton e para as soluções de AMX e AMP com o mesmo reagente durante um período de 90 min.

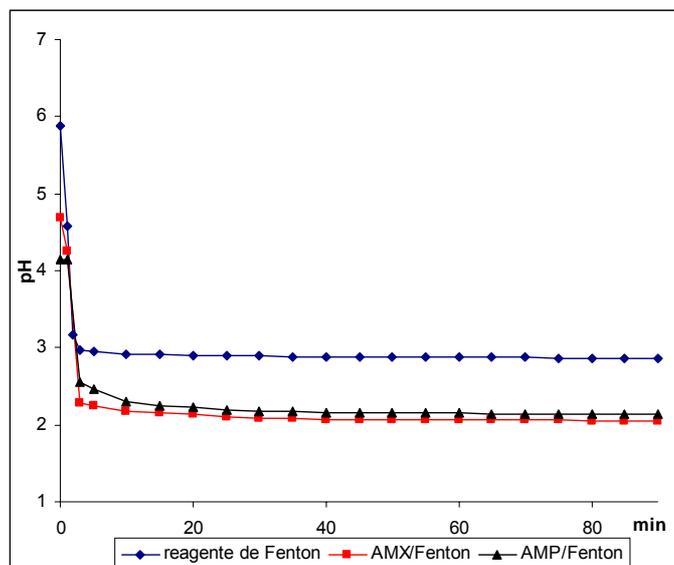
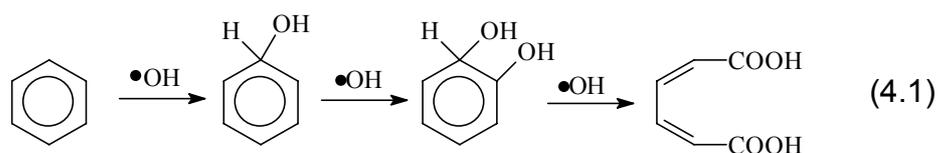


Figura 4.26: Variação do pH durante degradação AMX/Fenton, AMP/Fenton e do reagente de Fenton.

Os resultados obtidos mostram que as degradações ocorrem em pH ácido (abaixo de 3) definido como ótimo na literatura para o uso do reagente de Fenton como oxidante.

Na presença de íons ferro, em pH baixo, pode-se ter reações de adição de radicais $\bullet\text{OH}$ em anéis aromáticos ou em anéis heterocíclicos (também em compostos com ligações insaturadas como alquenos e alquinos) promovendo a liberação do próton H^+ para o meio de acordo com a equação 4.1¹¹⁸.



4.10 Cinética de reação com relação à DQO

A determinação do Kobs ($\Delta\text{DQO}/\Delta t$), assumindo a reação como de pseudo 1ª ordem encontra-se representado na figura 4.27.

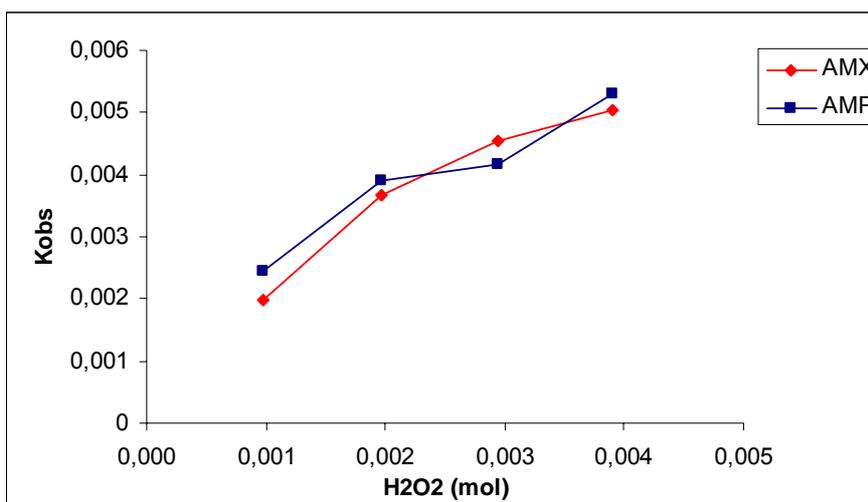


Figura 4.27: Relação entre k_{obs} e a concentração de H_2O_2 na degradação de AMX e AMP por reagente de Fenton com relação à DQO.

Apesar da redução de DQO obtida para AMX/F e AMP/F, os ensaios não mostram uma estabilidade quanto a velocidade da reação. Não foi observado um limite máximo para H_2O_2 a partir do qual a velocidade de reação se torna constante, logo quanto maior a concentração de peróxido melhor o rendimento da reação, como mostram os resultados de redução da DQO. A limitação quanto ao consumo de H_2O_2 para a degradação se deve ao custo do reagente.

4.11 Degradação de AMX por foto-Fenton promovido por radiação solar

O fato de Goiás possuir um pólo farmacêutico instalado com 23 indústrias e a facilidade da realização de reações foto-químicas promovidas por radiação solar na região centro-oeste devido à disponibilidade da mesma durante o período de maio a setembro, quando se tem céu claro e praticamente sem nuvens, levou a que testes fossem realizados com o objetivo de avaliar-se a redução da DQO de soluções de AMX utilizando o processo foto-Fenton promovido por radiação solar. O local escolhido para os ensaios possui as seguintes coordenadas: 16°40' S e 49° 14' O.

Um ensaio preliminar foi realizado com o objetivo de avaliar-se a oxidação da matriz por foto-peroxidação. Após esses estudos, avaliou-se a degradação da AMX por processo foto-Fenton nas mesmas concentrações

utilizadas para os ensaios sem a presença da radiação solar, avaliando-se a redução da DQO para um período de 60 min de exposição com coleta de amostras em intervalos de 10 min. A tabela 4.12 apresenta os valores de H₂O₂ e Fe²⁺ utilizados para os diferentes ensaios.

Tabela 4.12: Quantidade de matéria (mol) presente nos ensaios de degradação por foto-Fenton para AMX.

Quantidade de matéria (mol) e razão molar					
Ensaio	(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)
AMX	1,4x10 ⁻³				
H ₂ O ₂	3,91x10 ⁻³	9,79x10 ⁻⁴	1,96x10 ⁻³	2,94x10 ⁻³	3,91x10 ⁻³
Fe ²⁺	0	1,0x10 ⁻⁴	2,0x10 ⁻⁴	3,0x10 ⁻⁴	4,0x10 ⁻⁴
AMX/ H ₂ O ₂	0,36	1,43	0,71	0,47	0,36
AMX/ Fe ²⁺	-	14	7	4,6	3,5
H ₂ O ₂ / Fe ²⁺	-	9,8	9,8	9,8	9,8
AMX/ (H ₂ O ₂ / Fe ²⁺)	-	1,4x10 ⁻³	1,4x10 ⁻³	1,4x10 ⁻³	1,4x10 ⁻³

A figura 4.28 apresenta os resultados obtidos na redução da DQO utilizando reagente de Fenton promovido por radiação solar.

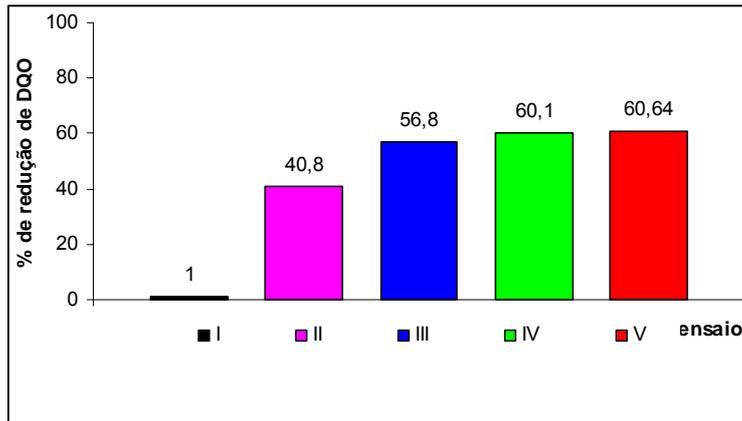


Figura 4.28: Percentagem de remoção de DQO para ensaios de degradação de AMX por processo foto-Fenton, $t_f = 60$ min.

Os resultados obtidos mostram que a redução de DQO não ultrapassou os 60%, resultado este menor do que o obtido para a mesma relação de AMX/H₂O₂ porem sem a presença da radiação solar (75%).

A turbulência no reator por agitação visando o melhor aproveitamento dos fótons aliado ao aumento de temperatura do sistema pode ser pelo menor rendimento da oxidação promovida por radiação solar frente a sem radiação. A decomposição do H₂O₂ em O₂ e H₂O ocorre nestas condições. Neste caso, são necessários estudos para que se encontre a condição ótima de oxidação do poluente a um menor custo.

A figura 4.29 apresenta um acompanhamento na redução de DQO durante os 60 min de ensaio em intervalos de 10 min.

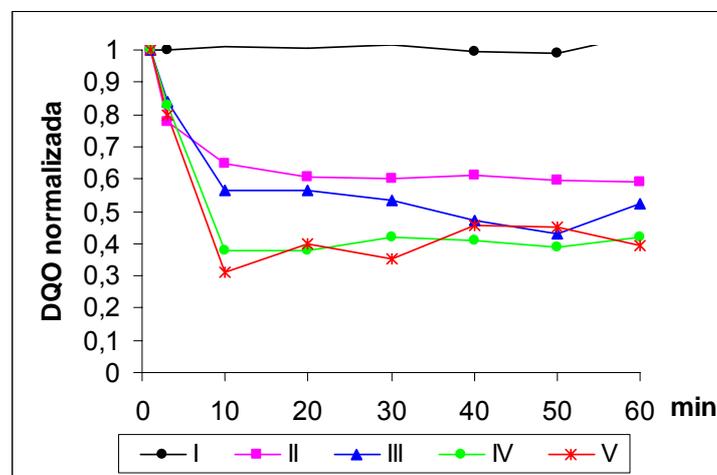


Figura 4.29: Redução da DQO durante 60 min de ensaio.

As condições de reação para o ensaio (I) foram semelhantes as do ensaio (V), com exceção da presença do Fe. O baixo rendimento para o ensaio (I) confirma novamente a necessidade do catalisador para que se obtenha um melhor resultado no processo de oxidação da matriz orgânica.

A figura 4.30 mostra um estudo cinético para o processo de degradação utilizando foto-Fenton.

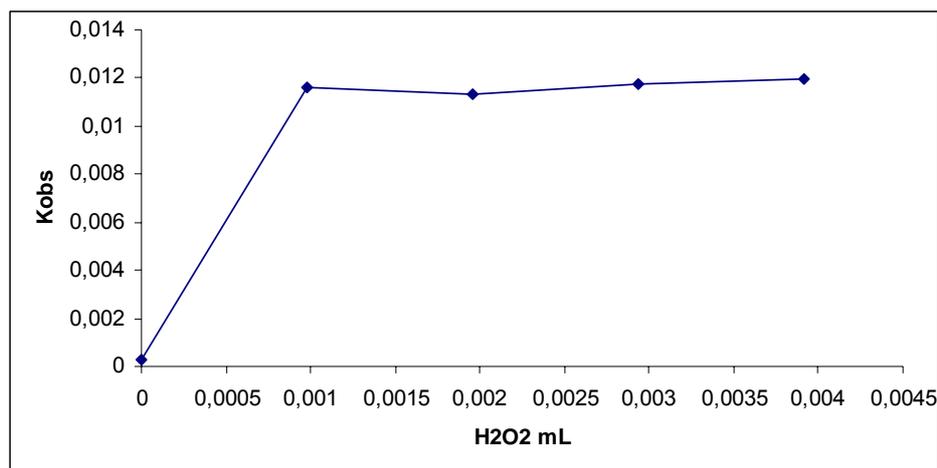


Figura 4.30: Estudo cinético da degradação de AMX por processo foto-Fenton.

O aumento da concentração de H_2O_2 não levou a um aumento na velocidade da degradação. A decomposição térmica do peróxido de hidrogênio pode ser a causa desta estabilidade.

A figura 4.31 apresenta o aspecto visual da degradação de AMX utilizando o processo foto-Fenton promovido por radiação solar para o ensaio com a maior redução de DQO.

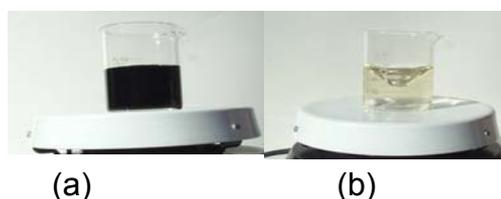


Figura 4.31: Aspecto visual da degradação de AMX por foto-Fenton em (a) $t = 5$ min e (b) $t = 60$ min.

A turvação da solução (Figura 4.32a) foi observada durante os primeiros 20 min de reação. Este fator pode estar ligado a uma redução da concentração

do radical $\cdot\text{OH}$, pois limita a interação dos fótons com os reagentes responsáveis pela formação destes radicais.

4.12 Avaliação da toxicidade dos produtos formados pela degradação de AMX e AMP utilizando reagente de Fenton.

A avaliação da toxicidade dos resíduos de degradação de AMX e AMP por reagente de Fenton é necessária, considerando-se que, pelos resultados obtidos com relação a redução da DQO, somente este processo de oxidação não leva a uma mineralização total dos antibióticos estudados. O uso de tratamentos combinados como químico/biológico podem ser adotados nestes casos. Assim sendo, para que se possam utilizar sistemas de tratamento de efluentes por lodo ativado ou reatores biológicos, há a necessidade de avaliar-se o impacto dos produtos formados na oxidação dos poluentes em sistemas biológicos. A avaliação da toxicidade utilizando biomonitores tem sido adotada como um parâmetro para avaliação da qualidade de águas e efluentes. Essa ferramenta avalia a resposta de organismos vivos às mudanças ocorridas geralmente causadas por ações antropogênicas^{68,70,119,120}. Testes como os utilizados neste trabalho são rápidos, simples e de baixo custo e ainda permitem a avaliação de potenciais riscos a biota aquática.

4.12.1 Bioensaio utilizando o organismo teste *Artemia salina* (nauplii): avaliação da toxicidade aguda pela letalidade

A avaliação da toxicidade aguda dos produtos formados a partir da degradação de AMX e AMP por reagente de Fenton se deu pela sensibilidade do nauplii (recém eclodido) de *Artemia salina*, crustáceo marinho, durante um período que variou de 24 h a 72 h. O bioensaio com o crustáceo, que permite determinar a DL_{50} (dose letal para 50% dos organismos), foi realizado em solução com diferentes concentrações dos produtos de degradação dos antibióticos AMX por processo Fenton (AMX/F) e AMP por processo Fenton (AMP/F) como descrito no item 3.6.1 desta tese. A percentagem de indivíduos

mortos para ambos os antibióticos em diferentes condições de pH encontra-se na tabela 4.13.

Tabela 4.13: Letalidade de resíduo de degradação de AMX por reagente de Fenton para *Artemia salina* (t=24 h).

Ensaio	% de morte
a) solução salina (CN)	0
b) AMX 0,0028 mol/L (pH= 4,6)	0
c) AMX/ Fenton – resíduo, (pH=2,3)	100
d) AMX/Fenton – resíduo filtrado em 0,45 µm (pH=2,3)	100
e) AMX/Fenton – resíduo (pH=7)	100
f) AMX/Fenton – resíduo filtrado em 0,45 µm (pH=7,0)	100

CN: controle negativo

Os dados apresentados na tabela 4.13 mostram a letalidade dos produtos de degradação da AMX. Pode-se observar que tanto em pH fortemente ácido (2,3) como em pH neutro, este fato se repete, o que leva a necessidade de ensaios que permitam avaliar a concentração na qual a letalidade seja para 50% dos indivíduos (DL₅₀).

O mesmo estudo foi realizado para os produtos de degradação de AMP/F. Os dados encontram-se na tabela 4.14.

Tabela 4.14: Letalidade de resíduo de degradação de AMP por reagente de Fenton para *Artemia salina* (t=24h).

Ensaio	% de morte
a) solução salina (CN)	0
b) AMP 0,0032 mol/L (pH= 4,8)	0
c) AMP/Fenton – resíduo, (pH =2,8)	100
d) AMP/Fenton – resíduo filtrado em 0,45 µm (pH=2,8)	100
e) AMP/Fenton – resíduo (pH=7)	50
f) AMP/Fenton – resíduo filtrado em 0,45 µm (pH=7,0)	30,5

CN: controle negativo

Neste caso, observa-se uma menor letalidade aguda para os resíduos em pH neutro frente ao apresentado pela AMX.

A tabela 4.15 apresenta os resultados obtidos (percentual de indivíduos mortos) para os ensaios realizados com soluções de produtos de degradação de AMX/F após neutralização e diluídos com solução salina 3,5%, por um período de 72 h.

Tabela 4.15: Percentual de mortes de *Artemia salina* de acordo com a concentração para produtos de degradação de AMX/F.

Concentração %(v/v)	% mortes		
	24 h	48 h	72 h
90	100	100	100
80	30	60	100
70	10	50	90
60	0	40	90
50	0	50	90
25	0	50	90
CN	0	0	0

Os resultados obtidos mostram que a solução com fator de diluição de 90%(v/v) provocou a morte de 100% dos indivíduos após 24 h. As soluções com diluições inferiores a 70% apresentaram um índice de letalidade de 50% (DL₅₀) após 48 h de ensaio.

O acompanhamento quanto à letalidade para as diferentes concentrações dos produtos formados pela degradação de AMX/F encontra-se na figura 4.32.

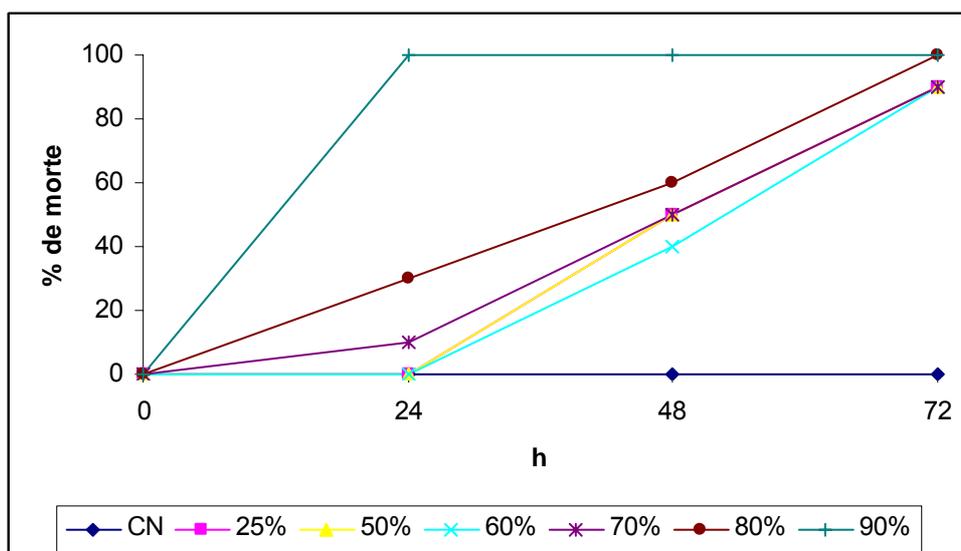


Figura 4.32: Acompanhamento da letalidade para *Artemia salina* dos produtos da degradação de AMX/F.

Um estudo semelhante com *Artemia salina* foi realizado para resíduos de degradação de AMP/F. A tabela 4.16 apresenta os resultados de percentual de mortes de *Artemia salina* a cada 24 h, de acordo com o fator de diluição testado para os resíduos de degradação de AMP/F após neutralização.

Tabela 4.16: Percentual de mortes de *Artemia salina* de acordo com a concentração para produtos de degradação de AMP/F.

% mortes			
Concentração % (v/v)	24h	48h	72h
90	20	40	100
80	10	30	60
70	0	20	80
60	0	20	70
50	0	20	50
25	0	30	50
CN	0	10	30

Os resultados mostram que as soluções com fatores de diluição menores que 50% apresentaram um índice de morte dos indivíduos menor ou igual a 50% (DL₅₀) após 72 h de ensaio.

A figura 4.33 apresenta um acompanhamento dos resultados obtidos para avaliação da dose letal de acordo com a concentração de produtos formados pela degradação de AMP/F em um período de 72 h.

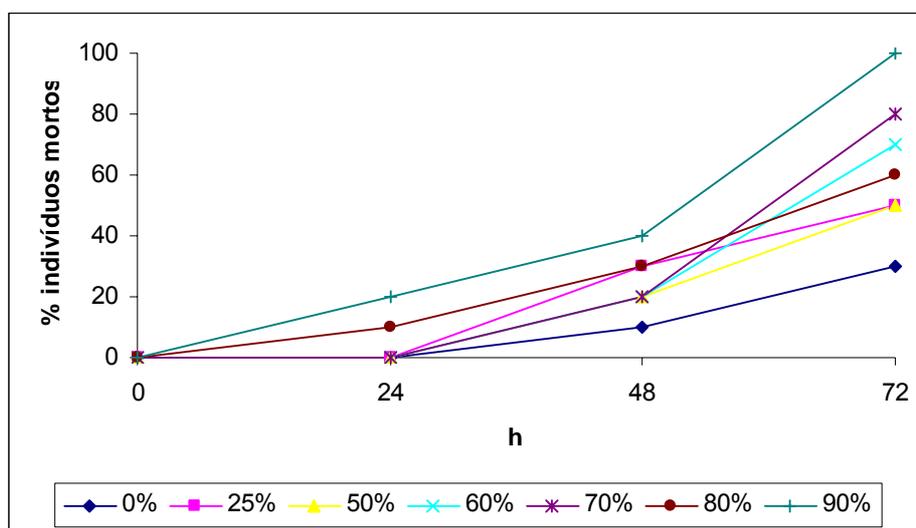


Figura 4.33: Acompanhamento da letalidade para *Artemia salina* dos produtos da degradação de AMP/F

Os produtos de oxidação apresentam um comportamento diferenciado quanto a toxicidade frente a *Artemia salina*. Os produtos gerados na degradação de AMX/F apresentaram uma DL₅₀ após 48 h de ensaio para soluções com diluição menores do que 70% (v/v). Para os resíduos de degradação de AMP/F a DL₅₀ foi obtida para as soluções com diluição menor do que 50% (v/v), porém após 72 h de ensaio. Conclui-se assim que os produtos de degradação da AMP apresentam menor toxicidade aguda para o organismo estudado do que os da AMX.

Considerando-se que o fator de diluição entre o tanque de desativação e o de equalização na indústria farmacêutica estudada atinge 83,4% (v/v), pode-se concluir que é maior do que o fator de diluição obtido para a definição do DL₅₀ dos produtos de degradação dos antibióticos.

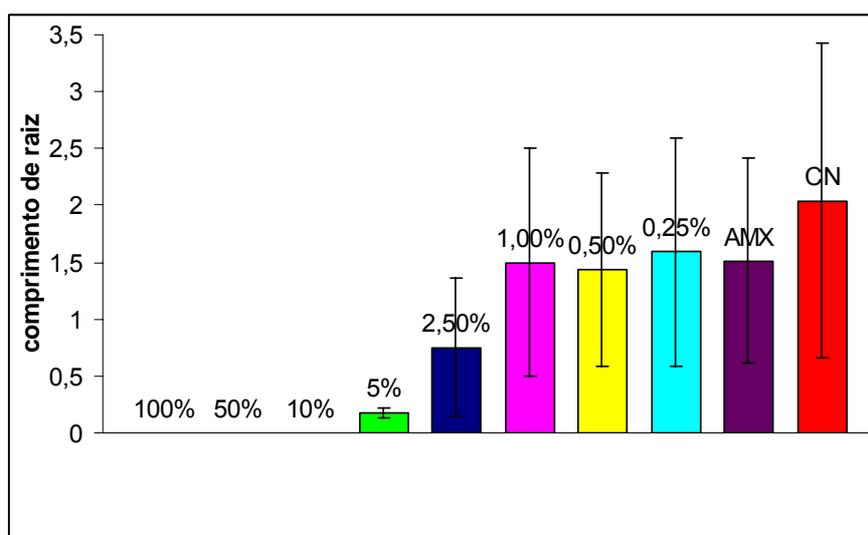
4.12.2 Bioensaio utilizando o organismo teste *Allium cepa*

Uma outra avaliação da toxicidade dos produtos gerados pela oxidação de AMX e AMP utilizando reagente de Fenton foi realizada utilizando-se o sistema teste *Allium cepa*. Esse teste tem sido aplicado para avaliação de águas superficiais e efluentes pela avaliação de aspectos macroscópicos como a inibição do crescimento da raiz e turgescência e citológicos como aberrações na metáfase e anáfase ou ainda inibição da divisão celular.

4.12.2.1 Avaliação da toxicidade pela inibição do crescimento das raízes

Para a realização dos ensaios, foram preparadas soluções dos produtos de degradação de AMX/F e AMP/F, com pH ajustado para 7,0 e filtradas, variando as diluições de 100% a 0,25% (v/v) em água destilada. A avaliação do crescimento radicular foi realizada em um período de 120 h e as medidas do comprimento das raízes tomadas a cada 24 h.

A figura 4.34 apresenta a variação do comprimento médio das raízes em função da diluição dos resíduos de degradação de AMX para 120 h de ensaio. Observa-se que soluções com diluições acima de 10% não permitiram o crescimento das raízes, nestas concentrações ocorreu necrose dos bulbos, o que impediu o crescimento das mesmas.



CN: controle negativo

Figura 4.34: Crescimento radicular médio em função da diluição dos resíduos da degradação de AMX/F (t=120h).

A média de crescimento das raízes para a solução com fator de diluição de 5% foi 89,5% menor do que o CN enquanto que para as soluções 1,0%, 0,50% e 0,25% foram de 27%, 31% e 22 % respectivamente. As soluções com diluição acima de 10% inibiram totalmente o crescimento das raízes, a turgescência (mudança de cor e deformação nas raízes) foi observada para soluções acima de 5%.

A figura 4.35 apresenta uma relação entre o crescimento das raízes e o CN para as soluções que apresentaram maior crescimento.

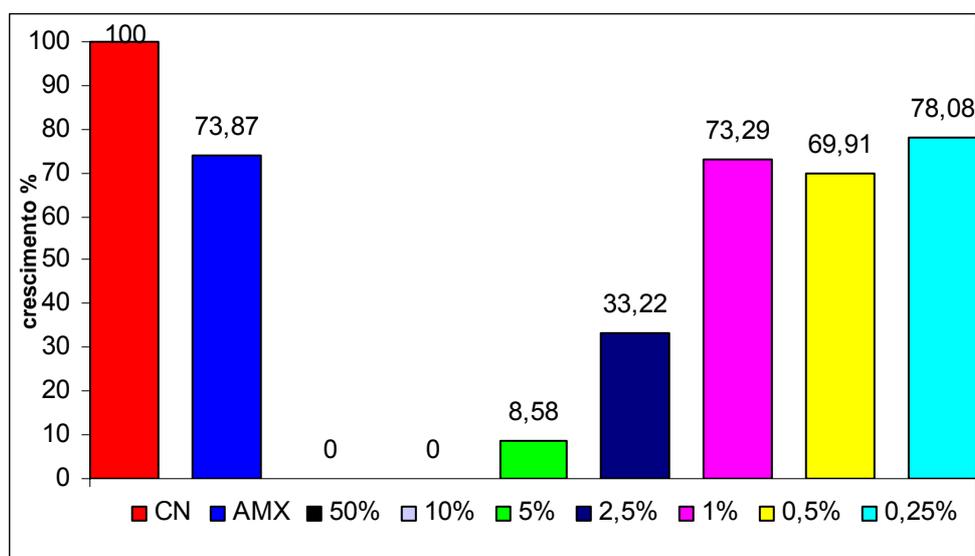


Figura 4.35: Crescimento radicular com relação do controle negativo (t=120 h).

Os resultados mostram claramente uma relação entre a concentração dos produtos de degradação e o crescimento da raiz. A solução diluída a 2,5% teve seu crescimento 66,78% menor do que o CN. O maior crescimento com relação ao CN foi obtido para a solução diluída a 0,25%, sendo este 21,92% menor que CN.

As diluições acima de 0,5% apresentaram redução de crescimento de raiz maior do que para a solução de AMX.

Os resultados obtidos para o tamanho médio das raízes e tamanho da maior raiz nas soluções dos produtos da degradação de AMX após 120 h de ensaio, encontram-se na tabela 4.17.

Tabela 4.17: Valores médios de comprimentos da raiz (cm) em soluções dos produtos de degradação de AMX por reagente de Fenton.

Diluição %	maior raiz	média	desvpad	intervalo	n
2,5	2,5	0,788	0,61	0,1-2,5	45
1,0	3,6	1,498	1,00	0,3-3,6	50
0,5	3,2	1,429	0,85	0,4-3,2	46
0,25	3,7	1,596	1,00	0,4-3,7	61
AMX	3,3	1,511	0,94	0,3-3,3	76
CN	5	2,044	1,38	0,3-5,0	67

Com relação a maior raiz, observa-se que para a solução diluída a 2,5%, a mesma atingiu 50% do CN. Para a solução diluída a 0,25%, o comprimento da maior raiz atingiu 74% do CN.

A figura 4.36 apresenta o acompanhamento do crescimento das raízes durante as 120 h de ensaio em intervalos de 24 h.

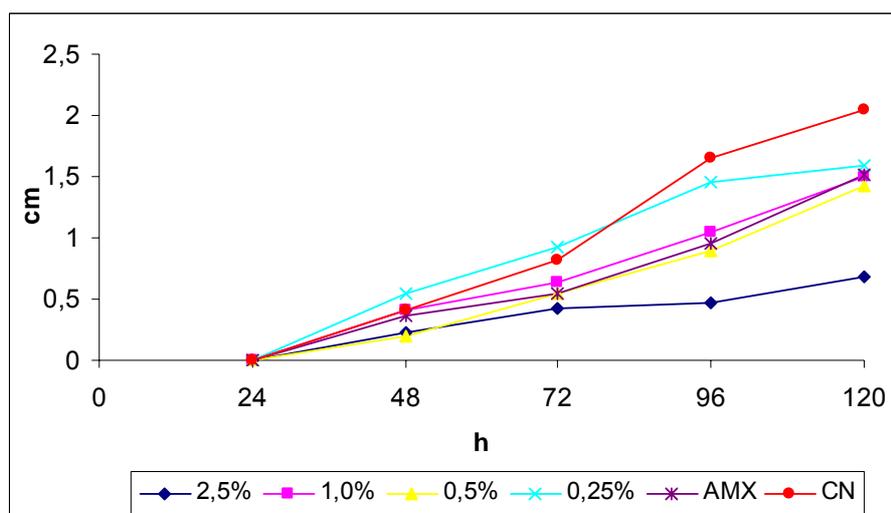


Figura 4.36: Curva de crescimento em diferentes diluições para as 120 h de ensaio.

A curva para o CN apresentou uma boa linearidade ($y = 0,0222x - 0,6158$) com $r = 0,9821$.

A figura 4.37 apresenta o efeito macroscópico dos produtos de degradação da AMX/F no crescimento da raiz nas soluções com diluição abaixo de 2,5%.

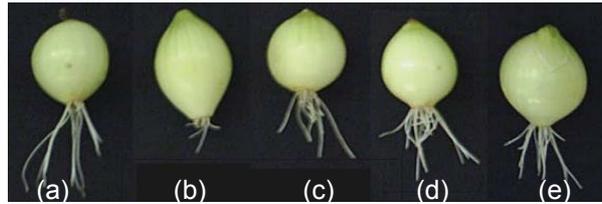


Figura 4.37: Aspecto visual (efeito macroscópico) (a) CN, (b) 2,5%, (c) 1,0%, (d) 0,5% e (e) 0,25%

Os resultados para o bioensaio com resíduos de degradação de AMP/F encontram-se apresentados a seguir.

A figura 4.38 apresenta a variação do tamanho das raízes em função da diluição dos resíduos de degradação após 120 h de ensaio para as soluções que permitiram o desenvolvimento de raízes. As soluções acima de 50% de resíduo de degradação promoveram a necrose dos bulbos de *Allium cepa*, e deformação nas raízes. A turgescência foi observada para soluções acima de 10%.

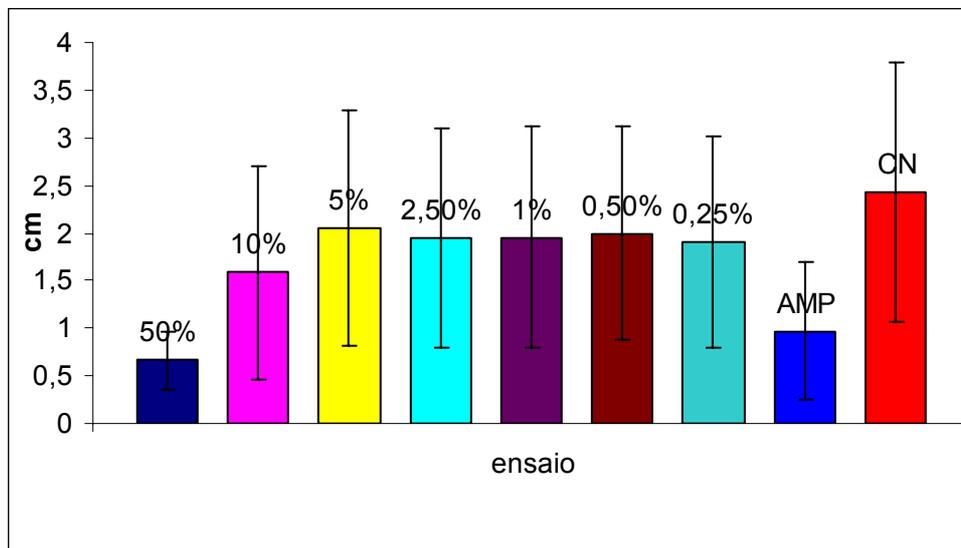


Figura 4.38: Crescimento da raiz após 120 h nas diferentes soluções.

As soluções com diluições menores do que 10% apresentaram crescimento maior que para a solução de AMP.

A figura 4.39 apresenta o percentual de crescimento das raízes com relação ao CN.

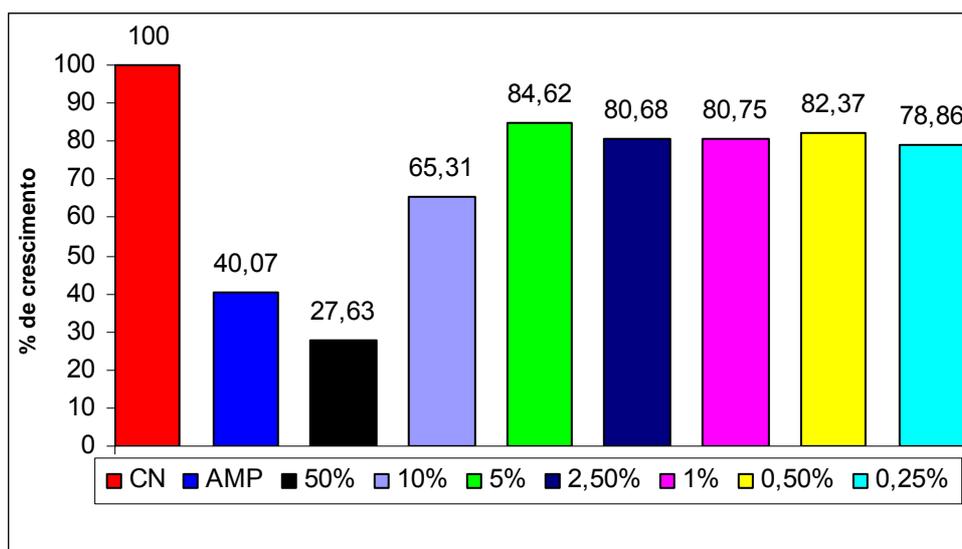


Figura 4.39: Percentual de crescimento radicular com relação ao CN.

A figura 4.40, Diagrama de Pareto, apresenta os resultados do crescimento radicular para soluções AMP/F de acordo com a frequência destacando que diluições acima de 10% e AMP possuem diferença significativa de acordo com o teste t-student ($p > 0,01$)

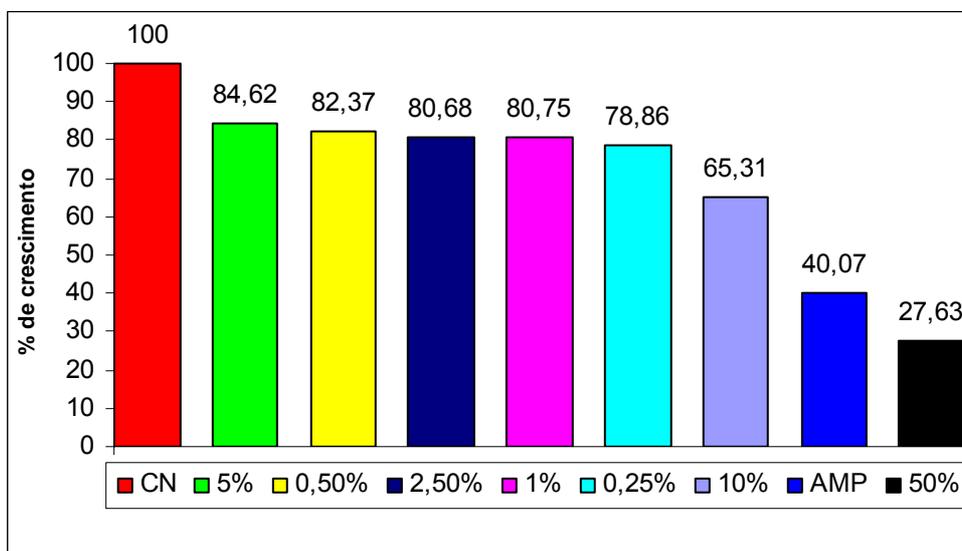


Figura 4.40: Diagrama de Pareto para os ensaios com diferentes diluições dos produtos de degradação de AMP/F.

Todas as soluções com diluições menores do que 10% apresentaram crescimento acima de 50% do CN. Para AMP, as raízes atingiram 37,63% do CN.

A inibição do crescimento das raízes em soluções acima de 50% apresentou-se maior do que para a solução de AMP.

A figura 4.41 apresenta o acompanhamento do desenvolvimento das raízes no período de 120 h para as soluções com diluição menores do que 50%.

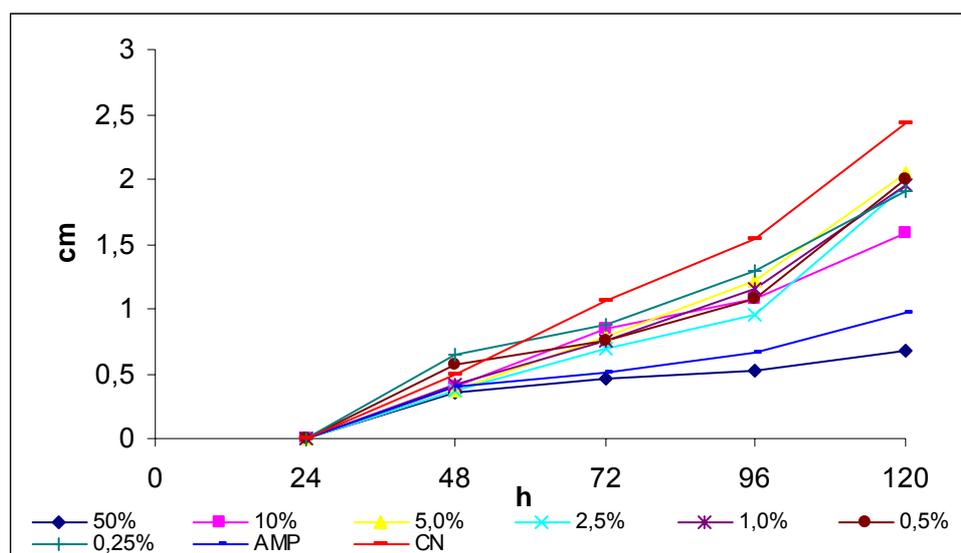


Figura 4.41: Curva de crescimento nas diferentes concentrações para as 120 h de ensaio.

A curva para o CN apresentou uma boa linearidade ($y = 0,0246x - 0,6657$) com $r = 0,9855$.

Os resultados obtidos para toxicidade dos produtos da degradação de AMP após 120 h de ensaio com relação ao crescimento das raízes encontram-se na tabela 4.18.

Tabela 4.18: Valores médios de comprimentos da raiz (cm) em soluções dos produtos de degradação de AMP por reagente de Fenton.

Diluição %	maior raiz	média	desvpad	intervalo	n
2,5	3,7	1,955	1,15	0,4-3,7	88
1	3,1	1,957	1,16	0,2-3,1	89
0,5	4,1	1,996	1,11	0,3-4,1	82
0,25	4,5	1,911	1,11	0,3-4,5	87
AMP	3	0,978	0,73	0,3-3,0	61
CN	4,9	2,420	1,36	1,2-4,9	99

Quanto ao comprimento da maior raiz, as soluções abaixo de 2,5% mostraram um crescimento maior que para AMP. O mesmo comportamento foi observado com relação ao número total de raízes

A figura 4.42 apresenta o efeito macroscópico dos produtos de degradação da AMP no crescimento da raiz nas soluções diluídas.

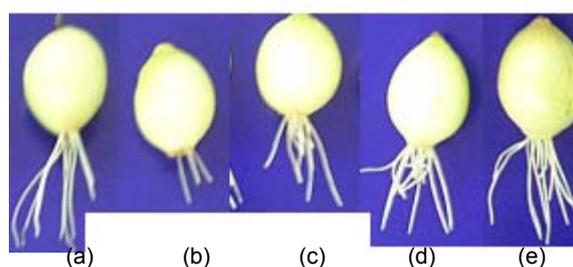


Figura 4.42: Aspecto visual (efeito macroscópico) (a) CN, (b) 2,5%, (c) 1,0%, (d) 0,5% e (e) 0,25%

4.12.2.2 Análise das alterações do ciclo celular mitótico

A análise de possíveis alterações do ciclo celular mitótico permite a observação de efeitos das substâncias sobre os organismos teste. Testes como estes são indicadores de eventuais mutações no conteúdo genético celular.

A Tabela 4.19 apresenta os resultados da análise citogenética observados após a exposição das células meristemáticas à solução de AMX e o respectivo controle negativo. Para as soluções de AMX/F neutralizadas não foi possível a realização da análise microscópica das células devido ao estado de intensa degradação dos bulbos.

Tabela 4.19. Resultados da análise citogenética observados em células meristemáticas de *Allium cepa*.

	Células Analisadas	A+M	f(A+M) an	fBN
CN	1194	209	0	0,002
AMX/Fenton 100%	NA	NA	NA	NA
AMX/Fenton 50%	NA	NA	NA	NA
AMX	1203	210	0,15	0,004

Legenda: A+M = Número de anáfase e metáfases analisadas; $f(A+M) \text{ an}$ = Frequência de anáfases e metáfases anormais; fBN = Frequência de células binucleadas. NA = Não avaliado.

A necrose das raízes de *A. cepa* para as soluções com concentrações de 100% e 50% dos produtos de degradação de AMX/F pode ser observada na figura 4.43.



Figura 4.43. Estágio de degradação do sistema radicular dos bulbos de *Allium cepa* expostos aos resíduos neutralizados de AMX tratada pelo processo Fenton.

A Figura 4.44 apresenta fotomicrografias de células normais e de alterações possíveis de serem observadas durante as diferentes fases do ciclo celular como resultantes das ações clastogênica e/ou aneugênica dos produtos de degradação por processo Fenton.

No CN não foi observado a presença de micronúcleos e de nenhuma metáfase e anáfase com alterações na migração cromossômica, entretanto a frequência de binucleações celulares foi de 0,002. As células meristemáticas

expostas à solução AMX apresentaram uma frequência metáfases/anáfases anormais igual a 0,15 e de células binucleadas igual a 0,004. Não foram observados micronúcleos em nenhuma das células expostas à solução AMX.

Há uma evidente ação microtúbulo despolimerizante da solução AMX 100%, pois foi encontrado aumento significativo ($p = 0,03$) na frequência de metáfases e/ou anáfases anormais quando comparada com o CN. A ação microtúbulo despolimerizante da solução avaliada permite caracterizá-la como substância aneugênica e/ou clastogênica. Estas ações promovem um efeito severo na célula impedindo a segregação simétrica do material genético durante a divisão celular.

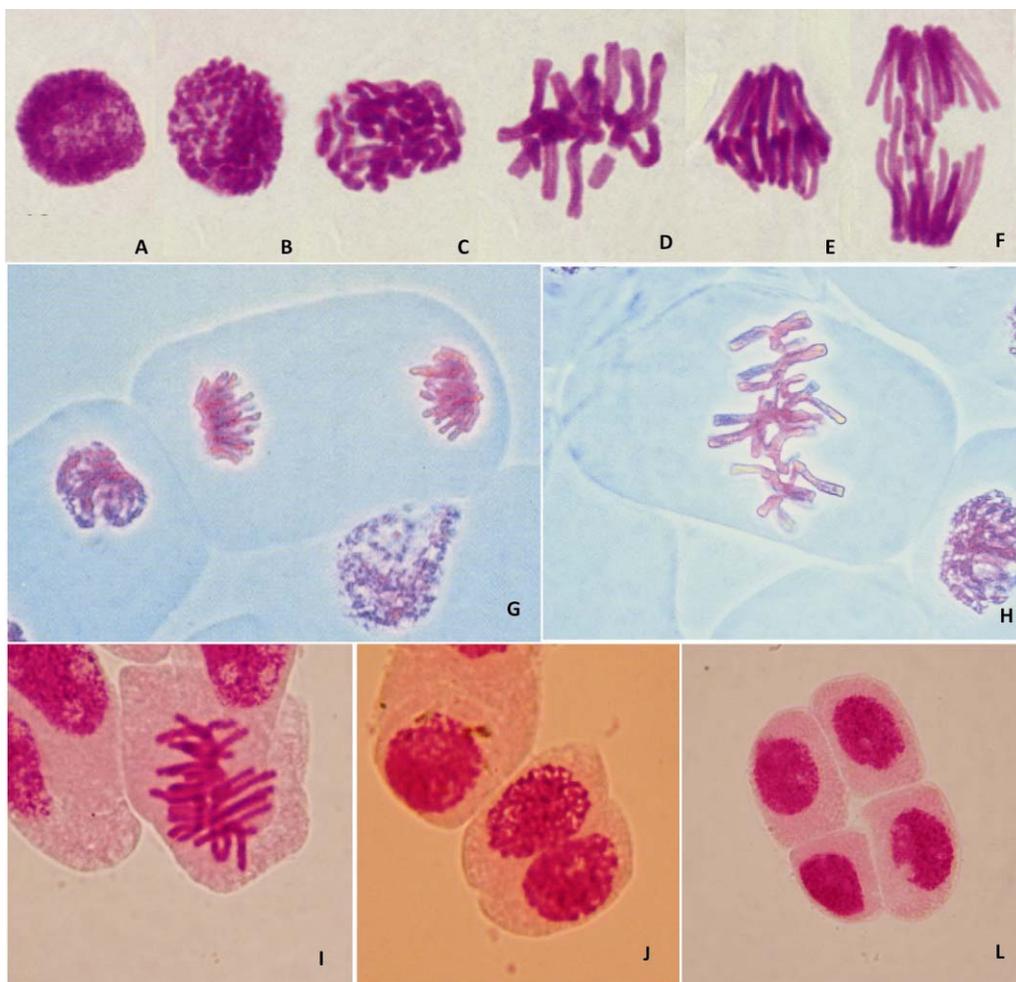


Figura 4.44. Fotomicrografias das células meristemáticas de *Allium cepa*. (A) Núcleo interfásico; (B) e (C) Núcleos na prófase; (D) Núcleo metafásico com fragmento cromossômico; (E) Anáfase precoce normal; (F) Anáfase com pontes cromossômicas, (G) e (H) Anáfase e Metáfase normais, respectivamente; (I) Distribuição metafásica anormal; (J) Célula Binucleada e (L) Células interfásicas normais.

Os produtos, em altas concentrações (AMX/FNT 100% e AMX/FNT 50%), resultantes da degradação da AMX pelo processo Fenton, apresentam uma toxicidade capaz de desencadear processos de morte celular em bulbos de *Allium cepa*. Mas é importante lembrar que não podemos admitir tais eventos, avaliando somente um único teste. Por outro lado, a liberação de antibióticos no meio ambiente, não somente poderá induzir a seleção de linhagens de microorganismos resistentes, como poderá aumentar o nível de genotoxicidade nos animais que habitam ecossistemas aquáticos, visto que a frequência de micronúcleos observada nas células meristemáticas expostas à solução AMX foi diferente da frequência de micronúcleos nas células do CN.

Uma vez que o organismo teste utilizado nesse estudo parece ter boa correlação com testes realizados em mamíferos, é preocupante a eventual possibilidade destes produtos de degradação, presentes nos ambientes aquáticos apresentarem potencialidade para causar problemas à saúde humana, uma vez que as alterações registradas neste estudo são também apontadas como alterações relacionadas à carcinogênese.

Uma complementação deste estudo se faz necessária para a identificação da atividade genotóxica de soluções diluídas. O efeito das diluições a 5%, 2,5% e 1% dos produtos de degradação de AMX na divisão celular e comportamento cromossômico de *Allium cepa* encontram-se na tabela 4.20.

Todas as concentrações estudadas apresentaram distúrbios na mitose. A solução diluída a 5% apresentou um IM equivalente ao do CP, sendo que para as demais os resultados foram menores mas ainda superiores ao CN. Quanto a presença de AC, pode-se observar que nas soluções a 1,0% apresenta-se igual ao CP sendo maior para as soluções a 2,5% e 5,0%. Este quadro indica possível efeito citotóxico e genotóxico para as soluções estudadas.

Tabela 4.20: Efeito citológico dos produtos de degradação de AMX por reagente de Fenton

diluição	IM	MN		AC		Total AC		Células analisadas
		N (%)	p	n (%)	p	n (%)	p	
5.0%	8.2±0.94	4 (0.20)	0.1832	6 (0.30)	0.1465	10 (0.50)	0.1465	2000
2.5%	6.2±1.21	3 (0.15)	0.4678	5 (0.25)	0.1832	8 (0.40)	0.0650	2000
1.0%	6.2±0,72	3 (0.15)	0.4678	4 (0.20)	0.1832	7 (0.35)	0.0336	2000
CN	5.4±0,78	1 (0.05)	-	1 (0.05)	-	2 (0.10)	-	2000
CP	8.3±1.65	5 (0.25)	0.1832	4 (0.20)	0.1832	9 (0.45)	0.1465	2000

Testes *t* de Student e Kruskal –Wallis, IM: índice mitótico, MN: micronúcleos, AC: anomalias cromossômicas, $p < 0,05$. CN: controle negativo, CP: controle positivo.

A avaliação do efeito de soluções diluídas a 5%, 2,5% e 1% dos produtos de degradação de AMP na divisão celular e comportamento cromossômico de *Allium cepa* encontram-se na tabela 4.21.

Os resultados mostram um IM para todas as soluções de resíduos de degradação de AMP/F estudadas comparáveis ao encontrado para o CP. Com relação as AC, estas apresentam-se superiores ao CN com exceção para a solução a 5%. Observa-se também anomalias em todas as soluções estudadas indicando potencial para efeitos citotóxicos e mutagênicos.

Tabela 4.21: Efeito citológico dos produtos de degradação de AMP por reagente de Fenton

Diluição	IM	MN		AC		Total AC		Células analisadas
		N (%)	p	n (%)	p	n (%)	p	
5.0%	7.4±1.02	2 (0.10)	1.0000	0 (0.00)	0.3910	2 (0.10)	0.6376	2000
2.5%	6.1±1.16	2 (0.10)	1.0000	4 (0.20)	0.0576	6 (0.30)	0.2151	2000
1.0%	7.6±0.84	2 (0.10)	1.0000	4 (0.20)	0.2151	6 (0.30)	0.3910	2000
CN	5.4±1.19	2 (0.10)	-	1 (0.05)	-	3 (0.15)	-	2000
CP	8.9±2.42	5 (0.25)	0.3910	5 (0.20)	0.3910	10 (0.50)	0.0060	2000

Testes *t* de Student e Kruskal –Wallis, IM: índice mitótico, MN: micronúcleos, AC: anomalias cromossômicas, $p < 0,05$. CN: controle negativo, CP: controle positivo.

As figuras 4.45 a 4.53 apresentam imagens microscópicas das células de *Allium cepa* para as soluções diluídas dos resíduos de degradação de AMX e AMP por reagente de Fenton e as anomalias encontradas.

As diversas fases da divisão celular para células normais podem ser observadas nas figuras 4.45 e 4.46, obtidas de lâminas preparadas a partir do CN (água de abastecimento).

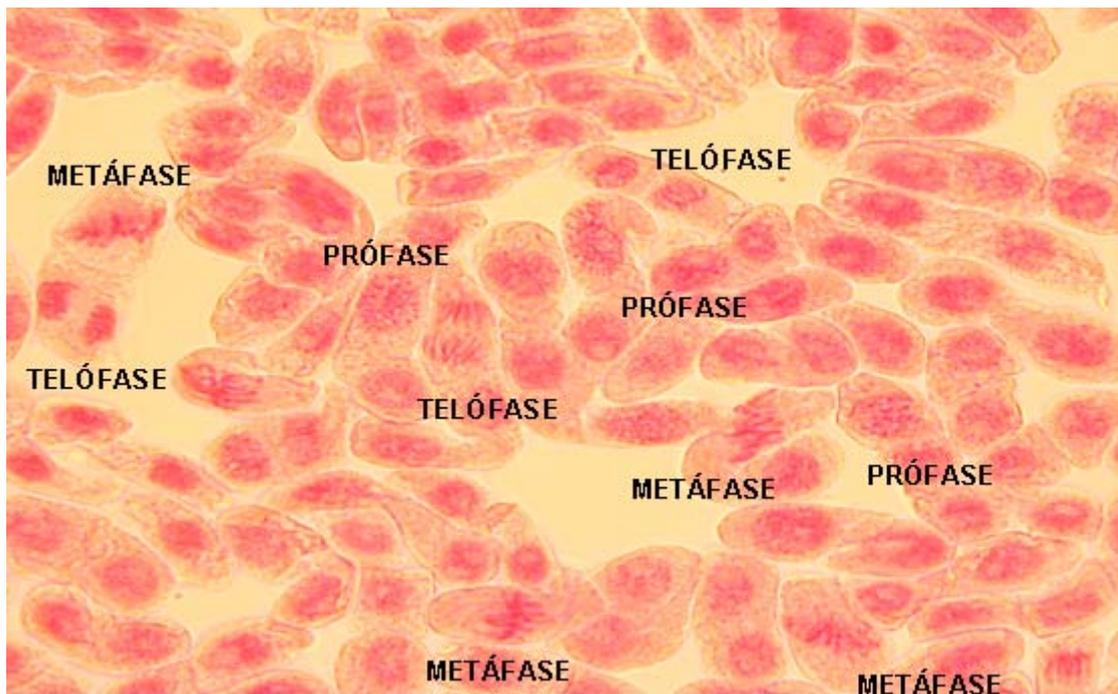


Figura 4.45: Mitose normal



Figura 4.46: Prófase, metáfase e telófase normais

A figura 4.47 mostra, em destaque, a presença de micronúcleos nas raízes tratadas com produtos de degradação de AMX por reagente de Fenton (AMX/F) a 5% de diluição.

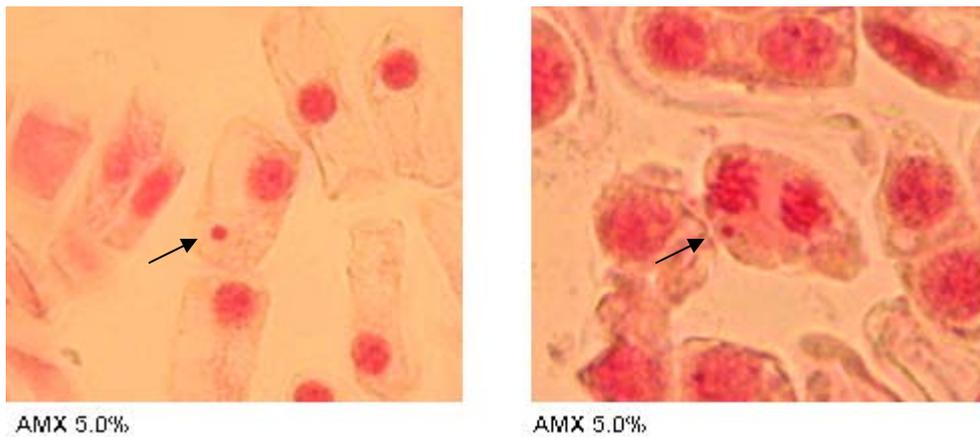


Figura 4.47: Presença de micronúcleos em AMX/F 5,0%

A formação de micronúcleos é uma das aberrações cromossômicas que podem ser observadas quando da presença de substâncias citotóxicas e genotóxicas em solução.

Na figura 4.48, 4.49 e 4.50 observa-se quebras cromossômicas e na figura 4.51 ponte cromossômica.

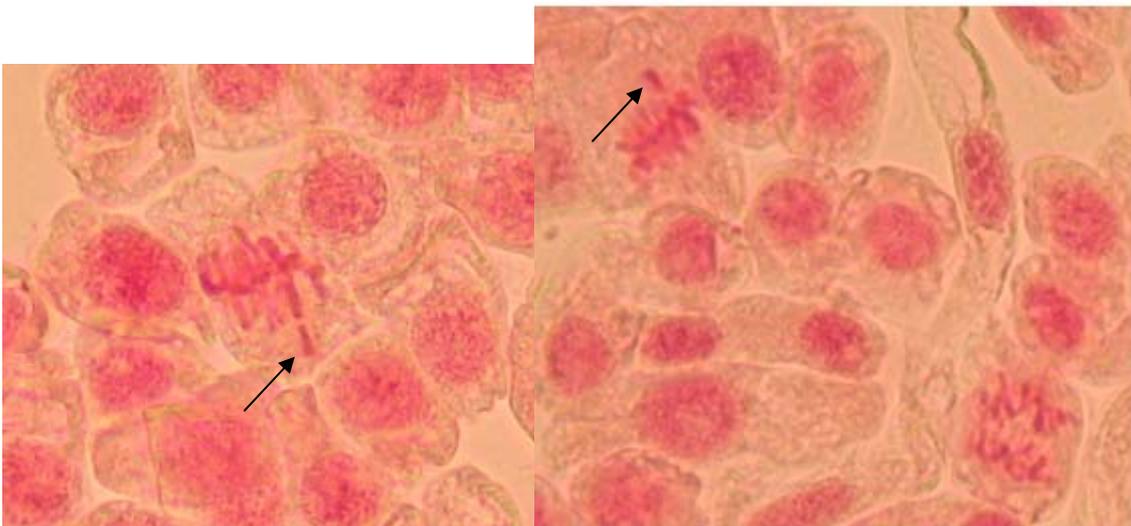


Figura 4.48: Quebras cromossômicas, AMX/F 5,0%



Figura 4.49: Quebra cromossômica AMX/F, 2,5%

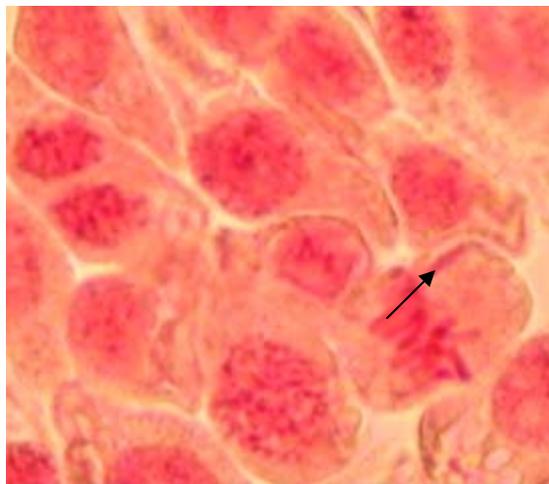


Figura 4.50: Quebra cromossômica, AMX/F 1%



Figura 4.51: Ponte cromossômica, AMX/F 1%

A figura 4.52 apresenta a ocorrência de aberrações cromossômicas em raízes tratadas com produtos de degradação de AMP por reagente de Fenton (AMP/F)

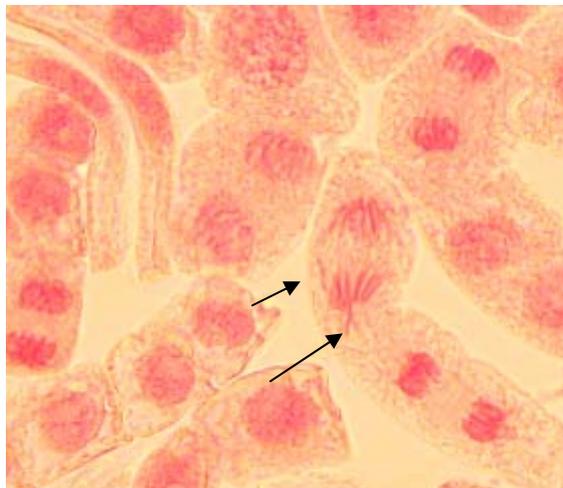


Figura 4.52: Perda cromossômica AMP/F 2,5%.

As ações observadas promovem um efeito severo na célula impedindo a segregação simétrica do material genético durante a divisão celular. Os produtos, em altas concentrações (AMX/F 100% e AMX/F 50%), resultantes da degradação da AMX pelo processo Fenton, apresentam uma toxicidade capaz de desencadear processos de morte celular em bulbos de *Allium cepa*. Mas é importante lembrar que não podemos admitir tais eventos, avaliando somente um único teste. Por outro lado, a liberação de antibióticos no meio ambiente, não somente poderá induzir a seleção de linhagens de microorganismos resistentes, como poderá aumentar o nível de genotoxicidade nos animais que habitam ecossistemas aquáticos, visto que a frequência de micronúcleos observada nas células meristemáticas expostas à solução AMX 100% foi diferente da frequência de micronúcleos nas células do Grupo Controle ($p = 0,04$).

Uma vez que o organismo teste utilizado nesse estudo parece ter boa correlação com testes realizados em mamíferos, é preocupante a eventual possibilidade desses produtos de degradação, presentes nos ambientes aquáticos, apresentarem potencialidade para causar problemas à saúde

humana, uma vez que as alterações registradas neste estudo são também apontadas como alterações relacionadas à carcinogênese.

4.13 Ensaio de Biodegradabilidade

A avaliação da biodegradabilidade de um afluente para uma estação de tratamento de efluentes que usa um sistema biológico (por exemplo lodo ativado) é fundamental para que se mantenha a eficiência desse sistema. A biodegradabilidade de substâncias orgânicas pode ser medida pela razão DBO_5/DQO que permite avaliar o potencial de mineralização pelos microorganismos. A tabela 4.22 apresenta um estudo da DBO_5 , da DQO e biodegradabilidade para os efluentes gerados tanto pelo processo convencional (hidrólise básica) como pela degradação por processo Fenton de efluentes gerados pela produção industrial de AMX e AMP (efluente bruto) após neutralização.

Tabela 4.22: Avaliação de DBO_5 , DQO e parâmetros de biodegradabilidade para efluente industrial, efluente hidrolisado e efluente degradado por reagente de Fenton.

Parâmetro	Efluente bruto	Efluente hidrolisado	Efluente degradado por reagente de Fenton (n=2)
DQO (mg/L O_2)	4.180	3.340	1.579,5
redução da DQO		20,1%	62,21%
DBO_5 (mg/L O_2)	2.120	1.240	450
redução da DBO_5		41,50%	78,77%
DBO_5/DQO	0,507	1,972	0,410
DQO/DBO_5	1,972	2,696	2,437

Os valores obtidos mostram uma redução na DBO₅ de 41,5% para o efluente hidrolisado e de 67,6% para o efluente tratado com reagente de Fenton. Quanto à DQO, obteve-se uma redução de 20,1% para o efluente hidrolisado e de 57,1% para o tratado com reagente de Fenton.

A razão DBO₅/DQO \geq 0,5 indica degradação biológica rápida ⁸⁷, para valores menores que 0,5, é possível que substâncias químicas recalcitrantes estejam presentes. Desta forma, os resultados apresentados na tabela 4.22 mostram que tanto o efluente hidrolisado como o degradado a razão é menor do que 0,5, não indicando eficiência no uso de tratamento biológico para os mesmos.

Após a degradação por processo Fenton do efluente bruto, o mesmo foi neutralizado, o que levou a formação de um produto insolúvel. Este foi então separado por filtração, seco a vácuo e analisado quanto a presença de compostos orgânicos por IR. A figura 4.53 apresenta os espectros de IR obtidos tanto para o resíduo gerado a partir do tratamento de efluente bruto industrial como também por soluções sintéticas de AMX e AMP que passaram pelo mesmo tratamento.

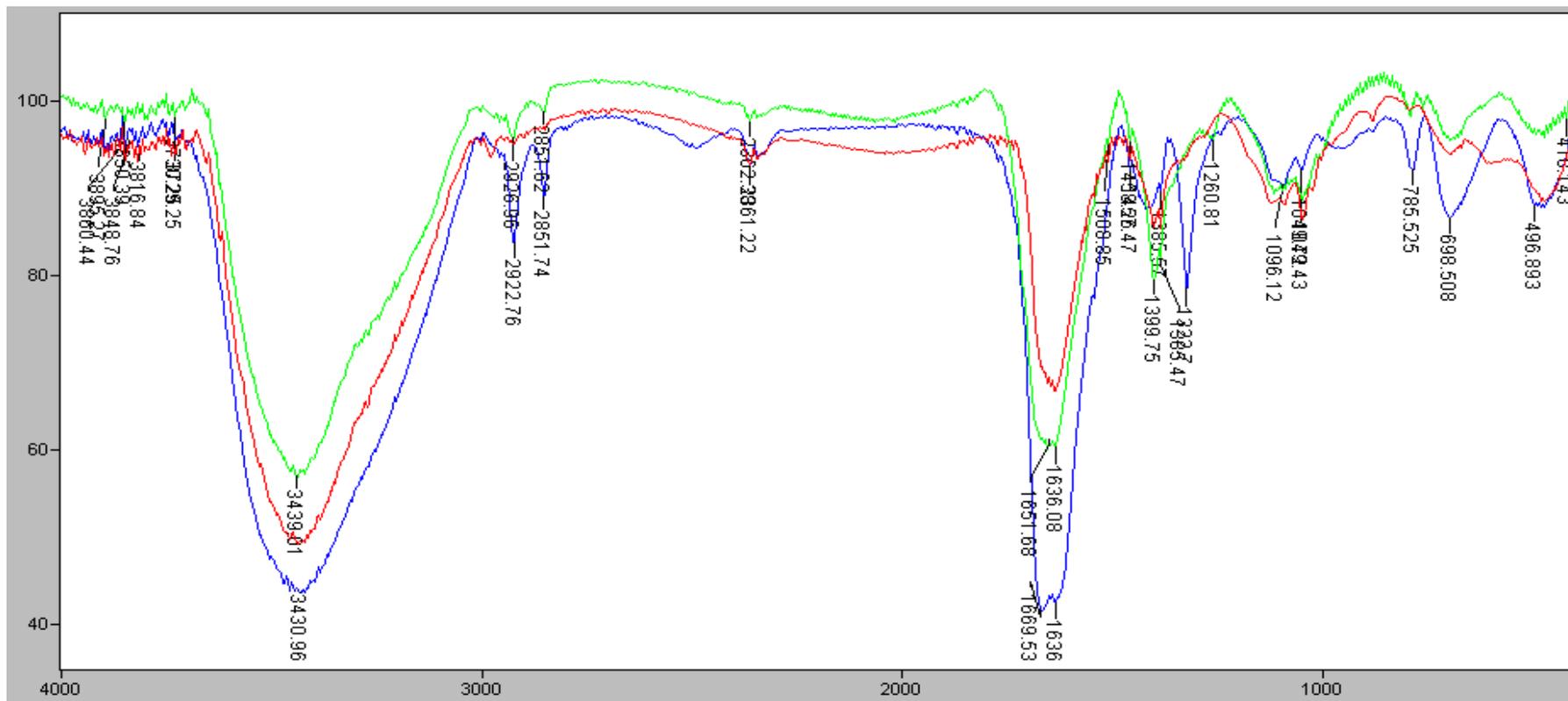


Figura 4.53: Espectro de IR do resíduo sólido formado na neutralização da solução de degradação de AMX/Fenton(verde), AMP/Fenton(vermelho) e efluente bruto da industrial/Fenton(azul).

Os espectros de IR não apresentam o pico característico das penicilinas, ν_{CON} em 1775 cm^{-1} , porém há a indicação da presença de anel aromático, grupos carboxila, estiramento N-H e C=O da amida na região de 2.600 cm^{-1} a 3.500 cm^{-1} . Outro destaque é para a banda larga em torno de 1650 cm^{-1} , que pode ser devido ao estiramento ν_{CO} de amida secundária, que se apresenta em torno 1.680 cm^{-1} e também de C=C aromático em 1.630 cm^{-1} .

Os resultados apresentados para os espectros no IR demonstram a presença de compostos carbônicos nos resíduos sólidos provenientes da neutralização dos produtos de degradação por reagente de Fenton. Dessa forma confirma-se que a mineralização dos poluentes não ocorre totalmente.

4.14 Custos operacionais da degradação utilizando reagente de Fenton

O custo operacional é um importante ponto a ser discutido quando se avalia a implantação de uma nova metodologia para a degradação de poluentes.

O custo de implantação de um tratamento deve considerar os procedimentos de Engenharia Econômica (depreciação, custos envolvidos, equipamentos, obras, consumo de energia elétrica, reagentes e mão de obra). Um exemplo é a utilização do reagente de Fenton no tratamento de lixiviado de aterro sanitário. Nesse caso, foi estimado que para um sistema com capacidade de tratamento de 10.000 L/dia , em sistema de batelada, o investimento deve ser de aproximadamente R\$ 60.000,00. Para a operação, o investimento necessário é de R\$ 3.300,00 como custo fixo e R\$ 0,023/litro de lixiviado ¹²¹.

O custo estimado baseando-se em reagentes PA, consumidos na hidrólise básica, tratamento adotado atualmente pelas indústrias produtoras de antibióticos penicilânicos, é o seguinte:

3 m^3 de efluente consomem 2.350 g de NaOH e 2,6 L de HCl PA.

1 L de efluente consome 0,783 g de NaOH e 0,86 mL de HCl PA.

NaOH = R\$ 18,00 /kg R\$ 0,014/L de efluente

HCl = R\$ 20,00 /L R\$ 0,017/L de efluente

levando a um total de R\$ 0,031/L de efluente sem considerar o custo fixo.

Para o tratamento do mesmo efluente utilizando-se as concentrações de Fe/H₂O₂ estabelecidas para o reagente Fenton neste trabalho, tem-se o custo para os reagentes (PA) na oxidação de:

1 L de efluente consome:

336 mg de Fe (1,668 g de FeSO₄.7H₂O)

15 mL de H₂O₂ 30%

FeSO₄.7H₂O = R\$ 11,00/kg R\$0,018 / L de efluente

H₂O₂ 30% = R\$ 180,00/L R\$ 2,70 /L de efluente

o que leva a um total de R\$ 2,72/L de efluente isto é, um custo 272 vezes maior que o processo atualmente adotado em termos de reagentes.

Pignatello *et al.* (2006)¹⁰⁹ levantam alguns fatores importantes que devem ser observados quando se seleciona uma tecnologia para aplicação ao tratamento de efluentes: amortização do investimento, custo de instalação, custo operacional, qualidade do efluente, manutenção, segurança, robustez entre outras. Com relação aos POA, aborda que os custos não são frequentemente levantados, que muitas vezes não se utiliza nos ensaios efluentes *in natura*, que quando consideram o custo da energia elétrica desconsideram o custo dos reagentes, alguns estudos ignoram operações tais como filtração e/ou neutralização, que o uso de energia solar minimizaria o custo com energia elétrica e que a projeção é para um único tipo de poluente.

Avaliando-se o custo operacional envolvendo apenas os reagentes químicos, a nível de PA, consumidos observa-se que o mesmo é 272 vezes maior do que o tratamento por hidrólise básica.

Apesar do custo mais elevado para o tratamento proposto, um ponto importante que não é abordado por Pignatello *et al.* (2006)¹⁰⁹ é o custo ambiental com a redução da presença de compostos farmacêuticos ativos como antibióticos no ambiente aquático.

4.15 Quantidade de ferro utilizada comparada com a legislação em vigor

A utilização de sais de ferro para a decomposição catalítica do peróxido de hidrogênio apresenta-se como uma solução de custo menos elevado em

relação aos outros POA pois utiliza um catalisador de baixo custo, o sulfato de ferro II, que é resíduo de indústria de produção de aço¹²¹.

O custo ambiental deve ser levado em consideração quando se trata efluentes, logo, a concentração de Fe^{2+} presente no efluente pós-tratamento deve respeitar a legislação vigente, CONAMA 357/05⁷³.

A legislação estabelece que o padrão de lançamento direta ou indiretamente nos corpos de água (CONAMA 357/2005, cap. IV, art. 34, §5º) deve ser de 15 mg/L de Fe. O processo proposto para o tratamento do efluente utilizando reagente de Fenton nesta tese consome 336 mg/L de Fe. Considerando-se que na ETE da indústria que forneceu as amostras de efluente bruto após a degradação, os produtos formados são descartados no tanque de equalização para em seguida passarem pelo tratamento biológico (tratamento combinado POA/biológico), tem-se, portanto, uma concentração final de Fe atingindo 7,0 mg/L, menor do que o limite estabelecido pela legislação vigente.

A figura 4.54 apresenta o fluxo dos efluentes da linha de produção dos antibióticos penicilânicos na indústria amostrada bem como o volume dos tanques. Pode-se observar a diluição que ocorrerá nos tanques de tratamento antes de ser descartado na rede pública de esgoto.

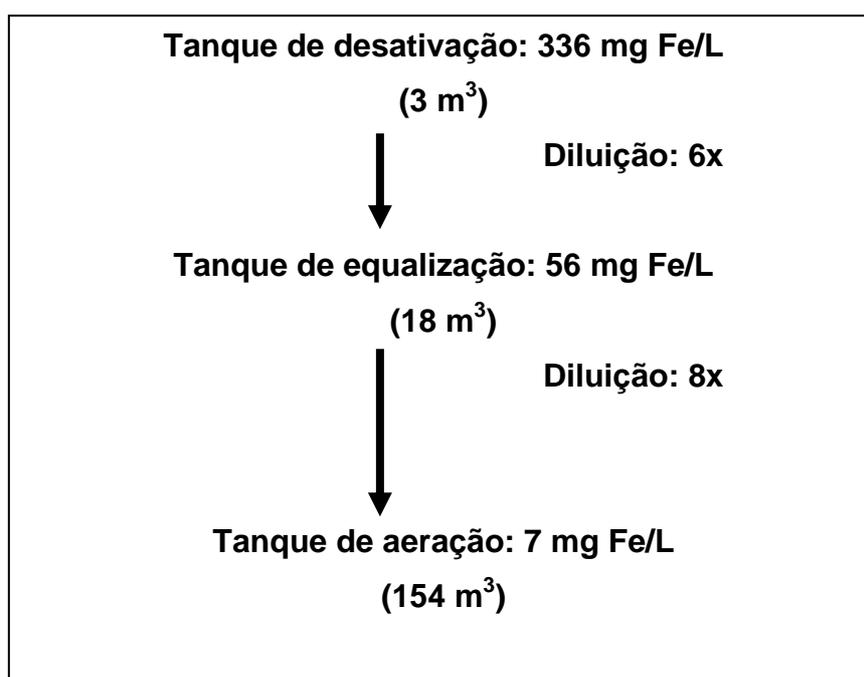


Figura 4.54: Fluxo do efluente penicilânico em uma indústria de Goiás

Neste capítulo foram apresentados os resultados obtidos a partir das metodologias adotadas para avaliação da oxidação dos antibióticos beta-lactâmicos amoxicilina e ampicilina, a toxicidade dos produtos gerados pelo processo de oxidação definido como ideal (reagente de Fenton), o custo em termos de consumo de reagentes comparado ao sistema de tratamento de efluentes adotado pelas indústrias produtoras desses antibióticos e finalmente a avaliação da presença de Fe no produto final frente aos parâmetros legais.

No próximo capítulo encontram-se as conclusões deste trabalho e perspectivas de trabalhos futuros.

CAPÍTULO 5
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5.1 Conclusão

Os compostos farmacêuticos ativos possuem moléculas complexas e com atividade biológica específica. A presença de AMX e AMP no meio ambiente pode gerar impactos de grandes proporções. O estudo da oxidação buscando formas de mineralizá-las coloca-se como uma necessidade frente às pesquisas ambientais.

Dada a importância para a saúde pública do uso dos antibióticos amoxicilina e ampicilina, sua taxa de excreção e também de seu aporte ambiental, torna-se indiscutível a necessidade de estudos que permitam a avaliação da degradação dos mesmos.

Os resultados obtidos para os diferentes POA testados nesta tese mostraram que o processo Fenton/UV levou aos melhores rendimentos com uma redução de 99,62% do analito AMX e 97,42 % de AMP após 60 min de reação. Para o POA reagente de Fenton no mesmo tempo, obteve-se 97,13% de redução de AMX e 95,42% para AMP, em se considerando que:

- a redução dos analitos foi 2% menor do que para o POA Fenton/UV;
- que com reagente de Fenton não há a necessidade do uso de radiação UV;
- que este processo é simples e de baixo custo e
- que essas características são importantes para viabilizar a sua aplicação no tratamento de efluentes industriais da produção de AMX e AMP, esse foi o processo escolhido para os estudos de redução de DQO.

A utilização do parâmetro DQO na avaliação da mineralização dos antibióticos AMX e AMP por processo Fenton mostrou uma redução de 75,62 % para ensaios com AMX e 81,92 % com AMP.

A diferença de rendimento da oxidação entre os resultados obtidos a partir da redução da concentração dos analitos e da DQO pode ser justificada pela presença de compostos carbônicos, demonstrado por meio de análises de IR, nos sólidos formados a partir da neutralização dos resíduos de degradação por reagente de Fenton tanto de AMX quanto de AMP. Esse fato demonstra que a mineralização não ocorreu completamente (100%), e que compostos carbônicos foram gerados no processo de degradação.

A mineralização parcial dos poluentes estudados por meio do processo Fenton indica a necessidade de tratamento combinado processo Fenton/biológico (químico/biológico) para que se obtenha um melhor rendimento. Sendo assim, análises de toxicidade realizadas com organismos testes como *Artemia salina* e *Allium cepa* mostraram que:

- para os ensaios com o microcrustáceo *Artemia salina*, que a letalidade para 50% dos organismos (DL_{50}) para resíduos de degradação de AMX por reagente de Fenton ocorreu com solução diluída a 70% em um tempo de 48 h e que para AMP por reagente de Fenton o DL_{50} foi obtido para 50% de diluição porém após 72 h de ensaio mostrando assim uma menor toxicidade para os produtos de degradação de AMP frente aos da AMX.

- para os ensaios com *Allium cepa*, as avaliações realizadas dos parâmetros macroscópicos turgescência e crescimento radicular indicaram que os produtos de degradação de:

- AMX/reagente de Fenton apresentaram efeitos significativos para soluções com fatores de diluição maiores do que 10%, onde as mesmas provocaram a necrose dos bulbos não permitindo o crescimento radicular. Os melhores resultados se mostraram para soluções com fatores de diluição menores do que 1% onde não se obteve variação significativa com relação ao controle negativo. A turgescência foi observada nas soluções com fatores de diluição maiores do que 10%,

- AMP/reagente de Fenton apresentaram necrose dos bulbos em soluções com fator de diluição acima de 50%, a turgescência foi observada nas soluções para acima de 10%. Os melhores resultados foram observados para soluções com fator de diluição menores do que 5% pois os mesmos não mostraram diferença significativa com relação ao controle negativo.

- para os parâmetros microscópicos anomalias cromossômicas (índice mitótico, quebra cromossômicas, perda cromossômica, pontes cromossômicas e formação de micronúcleos) nas diferentes diluições dos produtos de degradação para:

- AMX/reagente de Fenton os resultados obtidos mostraram que não variam significativamente com relação ao CP para os parâmetros IM, MN e AC nas soluções diluídas abaixo de 5%, o que é preocupante em termos de mutagenicidade,
- AMP/reagente de Fenton os resultados mostraram que o IM, MN e AC não variaram significativamente com relação ao CN, indicando assim uma menor mutagenicidade do que para a AMX.

A aplicação do tratamento proposto, reagente de Fenton, para efluente bruto industrial mostrou uma razão DBO_5/DQO média de 0,4392, o que não indica degradação biológica rápida, logo, os produtos formados pela degradação são recalcitrantes e indica-se em casos como este tratamentos combinados como químico/biológico ou físico/químico/biológico.

5.2 Perspectivas

Mediantes as conclusões apresentadas, vê-se que os estudos realizados contribuem para o conhecimento do comportamento de compostos farmacêuticos como os antibióticos beta-lactâmicos frente a oxidação por POA e também, a toxicidade dos produtos formados e a capacidade de degradação em sistemas biológicos de tratamento de efluentes.

Há a necessidade de aprimorar-se o conhecimento quanto às espécies geradas durante a degradação e ampliar a avaliação da toxicidade dessas substâncias.

Nesse intuito, sugerem-se as seguintes propostas:

- avaliar as espécies químicas formadas durante o processo de oxidação;
- avaliar a toxicidade das espécies formadas utilizando organismos testes como algas, fungos e peixes, ampliando a compreensão do comportamento destas substâncias no meio ambiente;
- desenvolvimento de um reator de batelada;
- desenvolvimento de um reator foto-químico;
- avaliar o desempenho de um reator foto-químico utilizando radiação solar;

- avaliar os custos da implantação de um sistema de tratamento utilizando reagente de Fenton;
- avaliar a toxicidade do efluente bruto da indústria e dos produtos gerados na oxidação com diferentes organismos-teste.

REFERÊNCIAS

1. Menezes, J. C., Alves, T. P. e Cardoso, J. P.; *Biotecnologia Microbiana: Fundamentos e Aplicações*, N. Lima e M. Mota Ed., Lisboa, 1999.
2. Demain, A.L. e Elander, R.P.; *Antonie van Leeuwenhoek*, **2000**, 75, 5.
3. Ternes, T.; *Water Research*, **1998**, 32, 3245 apud Carballa, M.; Omil, F.; Lema, J. M.; Llompert, M.; García-Jares, C.; Rodríguez, I.; Gómez, M. e Ternes, T.; *Water Res.*, **2004**, 38, 2918.
4. Stumpf., M.; Ternes, T.; Wilken, R. D.; Rodrigues, S., V. e Baumann, W.; *Sci. Total Environ.*, **1999**, 225, 135.
5. Hirsch, R.; Ternes, T.; Haberer, K. e Kratz, K. L.; *Sci. Total Environ.*, **1999**, 225, 109.
6. Zuccato, E.; Calamari, D.; Natangelo, M. e Fanelli, R.; *The Lancet*, **2000**, 355, 1789.
7. Kolpin, D. W.; Furlong, E. T.; Meyer, M. T.; Thurman, E. M.; Zaugg, S. D.; Barber, L. B. e Buxton, H. T.; *Environ. Sci. Technol.*, **2002**, 36, 1202.
8. Díaz-Cruz, M. S.; Alda, M. J. L. e Barceló, D.; *Trends in Analit. Chem.*, **2003**, 22, 340.
9. Carballa, M.; Omil, F.; Lema, J. M.; Lompart, M.; García-Jares, C.; Rodríguez, I.; Gómez, M. e Ternes, T.; *Water Res.*, **2004**, 38, 2918.
10. Lalumera, G. M.; Calamari, D.; Galli, P.; Castiglioni, S.; Crosa, G. e Fanelli, R.; *Chemosphere*, **2004**, 54, 661.
11. Bendz, D.; Paxéus, N. A.; Ginn, T. R. e Loge, F.J.; *J. Hazard. Mater.*, **2005**, 122, 195.
12. Hernando, M. D.; Mezcuca, M.; Fernández-Alba, A. R. e Barceló, D.; *Talanta*, **2006**, 69, 334.
13. Kümmerer, K. In *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effectd and Risks*, 2nd ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Berlin, 2004.
14. Jjemba, P. K.; *Agric., Ecosyst. Environ.*, **2002**, 93, 267.
15. Kümmerer, K. e Henninger, A.; *Clin.Microbiol.Infect.*, **2003**, 9, 1203.
16. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, Secretaria do Desenvolvimento da Produção. Cadeia Produtiva da Indústria Farmacêutica, Relatório do Fórum de Competitividade: Diálogo Para o Desenvolvimento, abril de 2004.
17. Jøergensen, S.E. e Halling-Sørensen, B.; *Chemosphere*, **2000**, 40, 691.
18. Halling-Sørensen, B.; Nielsen, S. N.; Lanzky, P. F.; Ingerslev, F.; Holten Lutzheft, H. C. e Jørgensen, S. E.; *Chemosphere*, **1998**, 36, 357.
19. Kümmerer, K., Al-Ahamad, A. e Mersch-Sundermann, V.; *Chemosphere*, **2000**, 40, 701.
20. Kümmerer, K.; *J. Antimicrob. Chemother.*, **2003**, 52, 5.
21. REMPHARMAWATER, Contract number EVK1-CT2000-00048. Ecotoxicological assessments and removal technologies for pharmaceuticals in wastewater, projects funded under 5th Framework Programme for Research Technological Development 1998-2000 apud Hernando, M. D.; Mezcuca, M.; Fernandéz-Alba, A. R. e Barceló, D.; *Talanta*, **2006**, 69, 334.
22. Bila, D. M. e Dezotti, M.; *Quím. Nova*, **2003**, 26, 523.
23. Reis Filho, R.W., Barreiro, J. C., Vieira, E.M.e Cass, Q.B.; *Revista Ambiente e Água*, **2007**, 2, 54.
24. Boxall, A.B.A.; *EMBO Reports*, **2004**, 5, 1110.
25. Holm, J. V.; Rügge, K.; Bjerg, P. L. e Christensen, T. H.; *Environ. Sci. Technol.*, **1995**, 29, 1415.

26. Heberer, T.; *Toxicol. Lett.*, **2002**, 131, 5.
27. Stackelberg, P. E.; Furlong, E.T.; Meyer, M. T.; Zaugg, S. T.; Henderson, A. K. e Reissman, D. B.; *Sci. Total Environ.*, **2004**, 329, 99.
28. Elander, R. P.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2003**, 6, 385.
29. European Federation of Animal Health (FEDESA)(2001). Antibiotics use in farm animals does not threaten human health. FEDESA/FEFANA, Brussels, Belgium apud Kümmerer, K.; *J. Antimicrob. Chemother.*, **2003**, 52, 5.
30. Union of Concerned Scientists. (2001) *70 percent of all antibiotics given to healthy livestock*. Press release. Cambridge, MA, USA apud Kümmerer, K.; *J. Antimicrob. Chemother.*, **2003**, 52, 5.
31. <http://www.rxlist.com/top200.html>, acessado em janeiro de 2007.
32. <http://www.water.usgs.gov/2002tx60b/> acessado em fevereiro de 2006.
33. Kümmerer, K.; *Chemosphere*, **2002**, 45, 957.
34. Schäfer, A. I. e Waite, T. D.; *Abstract of the IWA World Water Congress*, Melbourne, Australia, 2000 apud Carballa, M.; Omil, F.; Lema, J. M.; Lompart, M.; García-Jares, C.; Rodríguez, I.; Gómez, M. e Ternes, T.; *Water Res.*, **2004**, 38, 2918.
35. Balón-Pérez, M.I., Garcia-Campaña, A.M., Cruces-Blanco, C. e Iruela, M.O.; *J. Chromatogr., A*, **2008**, 1185, 273.
36. Cha, J.M., Yang, S. e Carlson, K.H.; *J. Chromatogr., A*, **2006**, 1115, 46.
37. Christian, T., Scheneider, R.J., Fäber, H.A., Skutlare, D., Meyer, M.T. e Goldbach, H.E.; *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, **2003**, 31, 36 apud Cha, J.M., Yang, S. e Carlson, K.H.; *J. Chromatogr., A*, **2006**, 1115, 46.
38. Andersson, D. I. e Levin, B. R.; *Curr. Opin. Microb.*, **1999**, 2, 489.
39. Guillemont, D.; *Curr. Opin. Microbiol.*, **1999**, 2, 494.
40. Dancer, S. J.; Coyne, M.; Robertson, C.; Thomson, A; Guleri, A e Alcock, S.; *J. Hospital Infection*, **2006**, 62, 200.
41. Pessanha, R. P. e Gontijo Filho, P. P.; *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, **2001**, 53,
42. Gilliver, M.A., Bennett, M., Begon, M., Hazel, S.M. e Hart, C.C., *Nature*, **1999**, 401, 233.
43. Kanai, H.; *Japanese Journal of Veterinary Science*, **1983**, 45, 171 apud Morse, A. e Jackson, A.; Report for 2002TX60B, 2003, www.water.usgs.gov, acessado em 03/02/2006.
44. Reinthaler, F. F.; Posch, J.; Feierl, G.; Wüst, G.; Haas, D.; Ruckebauer, G.; Mascher, F. e Marth, E.; *Water Res.*, **2003**, 37, 1685.
45. Guardabassi, L.; Peterson, A; Olsen, J. E. e Dalsgard, A.; *Appl. Environ. Microbiol.*, **1998**, 64, 3499.
46. Kümmerer, K.; Al-Ahamad, A e Mersch-Sundermann, V.; *Chemosphere*, **2000**, 40, 701.
47. Pignatello, J. J.; *Environ. Sci. Technol.*, **1992**, 26, 944.
48. Rodriguez, M.; Sarria, V.; Esplugas, S. e Pulgarin, C.; *J. Photobiol., A*, **2002**, 151, 129.
49. Kang, S. F.; Liao, C. H. e Huang H. P.; *J. Hazard. Mater., B.*, **1999**, 65, 317.
50. Chamarro, E.; Marco, A. e Esplugas, S.; *Water Res.*, **2001**, 35, 1047.
51. Trovó, A. G.; Villa, R. D. e Nogueira, R. F. P.; *Quím. Nova*, **2005**, 28, 847.
52. Safarzadeh-Amiri, A.; Bolton, J. R. e Cater, S. R.; *Water Res.*, **1997**, 31, 787.

53. Tiburtius, E. R. L.; Peralta-Zamorra, P.; Emmel, A. e Leal, E. S.; *Quím. Nova*, **2005**, 28, 61.
54. Casero, I.; Sicilian, D.; Rubio, S. e Pérez-Bendito, D.; *Water Res.*, **1997**, 31, 1985.
55. Lange, L.C., Alves, J.F., Amaral, M.C.S. e Melo Júnios, W.R., *Eng. Sanit.Ambient.*, **2007**, 2, 175.
56. Zwiener, C. e Frimmel, F. H.; *Water Res.*, **2000**, 34, 1881.
57. Doll, T. E. e Frimmel, F. H.; *Chemosphere*, **2003**, 52, 1757.
58. Lopez, A., Bozzi, A., Mascolo, G. e Kiwi, J., *J. Photochem. Photobiol., A*, **2003**, 156, 121.
59. Huber, M.M., Canonica, S., Park, G.-Y. e von Guten, U.; *Environm.Sci.Technol.*, **2003**, 37, 1016.
60. Andreatti, R.; Canterini, M.; Marotta, M. e Paxeus, N.; *J. Hazard. Mater.*, **2005**, 122, 243.
61. Ternes, T. A.; Stüber, J.; Herrmann, N.; McDowell, D.; Ried, A.; Kampmann, M. e Teiser, B.; *Water Res.*, **2003**, 37, 1976.
62. Trovó, A.G, Melo, S.A.S. e Nogueira, R.F.P.; *J. Photochem. Photobiol., A*, doi:10.1016/j.jphotochem.2008.03.011.
63. Will, I. B. S.; Moraes, J. E. F.; Teixeira, A. C. S. C.; Guardani, R. e Nascimento, C. A.O.; *Sep. Purif. Technol.*, **2004**, 34, 51.
64. Balcioglu, I. A. e Ötker, M.; *Chemosphere*, **2003**, 50, 85.
65. Arslan-Alaton, I.; Dogruel, S.; Baykal, E. e Gerone, G.; *J. Environ. Managem.*, **2004**, 73, 155.
66. Arslan-Alaton, I. e Dogruel, S.; *J. Hazard. Mater., B*, **2004**, 112, 105.
67. Arslan-Alaton, I. e Caglayan, A. F.; *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **2006**, 63, 131.
68. Nielsen, M.H. e Hank, J.; *Hereditas*, **1994**, 121, 249.
69. Vesna, S., Stegnar, P., Lovka, M., e Toman, M.J., *Mutat. Res.*, **1996**, 368, 171.
70. Fiskesjo, G.; *Hereditas*, **1985**, 102, 99.
71. Palacio, S.M., Espinoza-Quifones, F.R., Galante, R.M., Zenatti, D.C., Seolatto, A.A., Lorenz, E.K., Zacarkim, C.E., Rossi, N., Rizzutto, M.A. e Tabacniks, M.H.; *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **2005**, 48, 191.
72. Akinboro, A. E Bakare, A.A.; *Journal of Ethno-Pharmacology*, **2007**, 112, 470.
73. Brasil, **Resolução CONAMA 357 de 17 de março de 2005**, Dispões sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões para o lançamento de efluentes, e dá outras providências. Publicação no **Diário Oficial da União** de 18 de março de 2005. (Revoga a Resolução CONAMA nº 20, de 18 de junho de 1986).
74. Gherardi-Goldstein, E., Bertoletti, E., Zagatto, P.E., Araújo, R. P. E. e Ramos, M.L.L.C.; Série Manuais nº 6, CETESB, São Paulo, 1994.
75. *Water Quality Standard Handbook*, Washington D.C. EPA, 1983.
76. Fernandes, T.C.C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Brasil, Rio Claro, 2005.
77. Wolleberger, L.; Halling-Sørensen, B. e Kusk, K. O.; *Chemosphere*, **2000**, 40, 723.
78. Migliore, L.; Civitareale, C.; Brambilla, G. e Delupis, G. D.; *Water Res.*, **1997**, 31, 1801.

79. Grant, W.F., Lee, H.G., Logan, D.M. e Salamone, M.F.; *Mutat. Res.*, **1994**, 270, 53.
80. Fiskesjö, G., *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 1993, 8, 291.
81. Fiskesjö, Hereditas, 1979, 91, 169.
82. Vanhaeck, P., Persoone, G. e Sergeloos, P.; *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **1981**, 5, 382.
83. Rao, J.V., Kavitha, P., Jakka, N.M., Sridhar, V. e Usman, P.K.; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **2007**, 6, 226.
84. von Sperling, M.; *Princípios básicos do tratamento de esgotos*, 1ª ed., DESA/UFMG: Belo Horizonte, 2003.
85. Jardim, W.F. e Canela, M.C.; Caderno Temático, v.1, Universidade de Campinas, Brasil, 2004.
86. von Sperling, M.; *Introdução a Qualidade da Águas e ao Tratamento de Esgotos*, 2ª ed., DESA/UFMG: Belo Horizonte, 2004.
87. Fresenius, W., Schneider, W., Böhnke, B. e Pöppinghus, K.; *Technologie des eaux résiduaires – Production, collecte traitement et analyse des eaux résiduaires*. Springer-Verlag, 1990 apud Emmanuel, E., Perrodin, Y., Keck, J., Blanchard, M. E Vermande, P.; *J. Hazard. Mater.*, A, **2005**, 117, 1.
88. Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., Llompert, C. G.-J., Rodríguez, I., Gómez, M. e Ternes, T.; *Water Res.*, 2004, 38, 2918.
89. Arnott, I. A. e Weatherley, L.R.; *Process Biochem.*, **1995**, 30, 447.
90. Solomons, T.W.G.; *Organic Chemistry*, 6th ed., John Wiley & Sons: New York, 1996.
91. Carlsson, C.; Johansson, A.-K.; Alvan, G.; Bergman, K. e Kühler, T.; *Sci. Total Environ.*, **2006**, 364, 67.
92. ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Projeto de estações de tratamento de esgotos. NBR-570. 1990.
93. ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Critérios para lançamento de efluentes líquidos industriais no sistema coletor público de esgotos sanitários. NBR-9.800. 1987.
94. Resolução CONAMA nº358 de 29 de abril de 2005, *Dispõe sobre o tratamento e a disposição dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providência*, Diário Oficial da União, Brasília (DF), abril de 2005.
95. ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Resíduos sólidos - Classificação. NBR-1.004. 2004.
96. Assembléia Legislativa do Estado de Goiás, Lei 8.544 de 17 de outubro de 1978. Dispõe sobre o controle da poluição do meio ambiente. www3.agenciaambiental.gov.br/site/legislacao/01_legis_estad_8544.php p, acesso em 15/01/2008.
97. Cass, Q. B.; Gomes, R. F.; Calafatti, S. A. e Pedrazolli JR., J.; *J. Chromatogr.*, A, **2003**, 987, 235.
98. British Pharmacopoeia, **2000**, v.I, monographs: Medicinal and Pharmaceuticals Substances: amoxicillin and ampicillin, CD-Rom.
99. Mahgoub, H. e Aly, F. A.; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1998**, 17, 1273.
100. Abdel-Moety, E. M.; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1991**, 9, 187.
101. Farmacopéia Brasileira IV, **2000**, Monografia para produtos farmacêuticos, 0060.01-1 e 0061.04-2.
102. APHA, *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*, 19th ed., 1999. CD-ROM.

103. ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Águas: Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO) – Método de Refluxo Aberto, Refluxo Fechado – Titulométrico e Refluxo Fechado – Colorimétrico. Método de Ensaio. NBR 10.357. 1988.
104. Bagatini, A.D., da Silva, A.C.F. e Tedesco, S.B.; *Rev. Bras. Farmacog.*, **2007**, *17*, 444.
105. Garcia-Rodríguez, A., Caetano, G.G.I., Borges, M.B.B., Santos, C.A. e Cardoso, G.S.; *Estudos*, **2004**, *31*, 1595.
106. Cabrera, G.L. e Rodrigues, D.M.G.; *Mutat. Res.*, **1999**, *426*, 211.
107. Fernandes, T. C. C., *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, Brasil, 2005.
108. Nielson, M. H. e Rank, J.; *Hereditas*, **1994**, *121*, 249.
109. Pignatello, J. J.; Oliveros, E. e Mackay, A.; *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, **2006**, *36*, 1.
110. Arruda, T. *Dissertação de Mestrado*, Universidade de Campinas, Campinas, Brasil, 2005.
111. Bachman, J. e Patterson, H.H.; *Environ. Sci. Technol.*, **1999**, *33*, 874.
112. Carp, N., Tufoj, V. Carp, M., Aldea, V. e Badescu, V.; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1996**, *14*, 1055.
113. Zayed, M. A. e Abdallah, S. M.; *Spectrochim. Acta, Part A*, **2005**, *61*, 2231.
114. Masarwa, A.; Rachmilovich-Calis, S.; Meyerstein, N. e Meyerstein, D.; *Coord. Chem. Rev.*, **2005**, *249*, 1937.
115. Goldstein, S.; Meyerstein, D. e Czapski, G.; *Free Radical Biol. Med.*, **1993**, *15*, 435.
116. Teixeira, C.P.A.B. e Jardim, W.F.; *Processos Oxidativos Avançados*, Caderno Temático, vol.3, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2004.
117. Watts, R.j., Botenberg, B.C., Hess, T. F., Jensen, M.D. e Teel, A.L.; *Environ.Sci.Technol.*, **1999**, *33*, 3432.
118. Neyens, E. e Baeyens, J.; *J. Hazard. Mater., B*, **2003**, *98*, 33.
119. Buss, D.F., Baptista, D.F. e Nessimian, J.L.; *Caderno de Saúde Pública*, **2003**, *19*, 465.
120. Gherardi-Goldstein, E., Bertoletti, E., Zagatto, P.A., Araújo, A.P.A. e Ramos, M.L.L.C.; *Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos*, Série Manuais, CETESB, São Paulo, 1990.
121. Lange, L.C., Alves, J.F., Amaral. M.C.S. e Melo Júnior, W.R.; *Engenharia Sanitária e Ambiental*, **2006**, *11*, 175.

ANEXOS

ANEXO 1

PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS (POA)

A mineralização de um poluente pode ocorrer por métodos físicos, químicos ou biológicos. Podemos citar que os mais utilizados atualmente são a incineração e o tratamento biológico. O tratamento biológico é provavelmente a técnica mais utilizada devido ao seu baixo custo e à versatilidade na oxidação de um grande número de poluentes orgânicos. Neste tipo de tratamento, microorganismos como bactérias e fungos promovem a conversão da matéria orgânica em constituintes inorgânicos como o CO_2 e H_2O . Alguns inconvenientes deste processo são: o processo operacional, sensibilidade a variações de pH e temperatura, característica do efluente (presença de substâncias tóxicas e/ou não biodegradáveis) etc¹.

A utilização de oxidantes fortes para tratamento e desinfecção de água é antigo, Meritens em 1886, utilizou ozônio (O_3) como desinfetante de água de acordo com Teixeira e Jardim (2004)², porém a utilização da terminologia “Tecnologia de Oxidação Avançada” só aconteceu a partir de 1973, durante o Simpósio Internacional em Ozônio para Tratamento de Água e Efluentes. A publicação em 1998 pela United State Environment Protection Agency (USEPA) do Handbook of Advanced Oxidation Process³ veio consolidar a importância desses processos².

Os processos oxidativos avançados têm sido uma alternativa de grande interesse para o tratamento de matrizes contaminadas com compostos orgânicos. Estes processos são mais intensivamente utilizados para o tratamento de efluentes em fase aquosa e gasosa e, mais recentemente, têm sido aplicados para matrizes sólidas, como solos e sedimentos. Os processos oxidativos geralmente envolvem geração de espécies altamente oxidantes e não seletivas, como o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), oxidante mais forte do que O_3 . Este radical ($\cdot\text{OH}$) pode ser gerado por processos fotoquímicos ou não-fotoquímicos para oxidar contaminantes no ambiente, convertendo-os em espécies inócuas. Os radicais hidroxila podem ser gerados por meio de reações que envolvem oxidantes fortes. A tabela 1 apresenta valores de potencial padrão de redução para diversos oxidantes.

Tabela 1: Potenciais padrão de redução (E^0_{red} NHE).

Espécie	Potencial Redox (V)
Fúor	3,03
Radical hidroxila	2,80
Oxigênio atômico	2,42
Ozônio	2,07
Peróxido de hidrogênio	1,78
Permanganato	1,68
Dióxido de cloro	1,57
Cloro	1,36
Iodo	0,54

Fonte: TEIXEIRA e JARDIM, 2004².

A grande vantagem na utilização dos POA está no fato que a mineralização dos poluentes pode ocorrer, transformando os compostos refratários em biodegradáveis. Estes processos podem ser usados como pré e/ou pós- tratamento biológico e/ou físico pois possuem uma cinética relativamente elevada e com custo, em alguns casos, reduzido.

Os POA dividem-se em dois grupos: os processos homogêneos e os heterogêneos. Ambos geram radical hidroxila, $\bullet\text{OH}$, com o sem irradiação ultravioleta. A tabela .2 apresenta estes processos ⁴:

Tabela 2.: Processos oxidativos avançados

Homogêneos		Heterogêneos	
Com irradiação	Sem irradiação	Com irradiação	Sem irradiação
UV	O_3	TiO_2/UV	Eletro-Fenton
O_3/UV	$\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$	
$\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$	H_2O_2	ZnO/UV	
$\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$	$\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{Zn}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$	
$\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$	$\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{Nb}_2\text{O}_5/\text{UV}$	
$\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$		$\text{Nb}_2\text{O}_5/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$	

2. Processos Oxidativos Avançados Homogêneos

Quanto a questão da degradação de um poluente orgânico, diversos POA tem sido relatados na literatura. A seguir uma breve discussão teórica para os mesmos.

2.1 Radiação UV: fotólise direta, onde a radiação UV é a única fonte capaz de destruir o poluente.



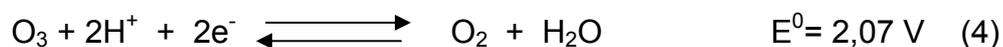
2.2 Peroxidação: onde o agente oxidante utilizado é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).



2.3 Foto-peroxidação: presença do oxidante forte o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na presença de irradiação, promovendo a formação do radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$)^{119,124}.



2.4 Ozonização: presença do oxidante forte ozônio (O_3)².



2.5 Foto-ozonização: presença do oxidante forte ozônio (O_3) e de irradiação, promovendo a formação do radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$).



2..6 Peroxi-ozonização: presença do oxidante forte ozônio (O₃) e do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), promovendo a formação do radical hidroxila (•OH) ⁵.



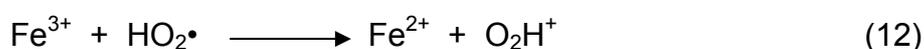
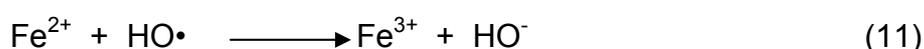
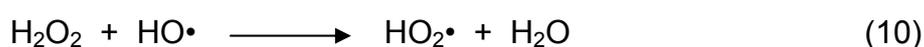
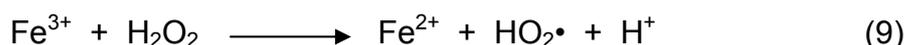
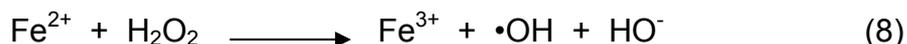
2.7 Foto-peroxi-ozonização: presença do oxidante forte ozônio (O₃) e do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na presença de irradiação, promovendo a formação do radical hidroxila (•OH).

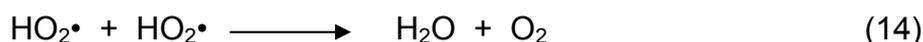
2.8 Reagente de Fenton: decomposição de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) catalisada por Fe²⁺.

O reagente de Fenton, como é tradicionalmente chamado, é composto de Fe²⁺/H₂O₂/H⁺. A reação envolve a decomposição catalítica do peróxido de hidrogênio a formas intermediárias de radicais livres, que possuem um potencial de oxidação maior do que o próprio peróxido ^{6,7}. A equação para a reação do reagente de Fenton pode ser representada por

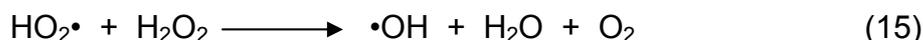


O mecanismo atualmente proposto para a decomposição de H₂O₂ em soluções ácidas na ausência de luz e de compostos orgânicos consiste no conjunto de reações de (8) a (15) ⁸. Esta seqüência se refere a reação térmica de Fenton.





Alguns autores incluem a reação (8)

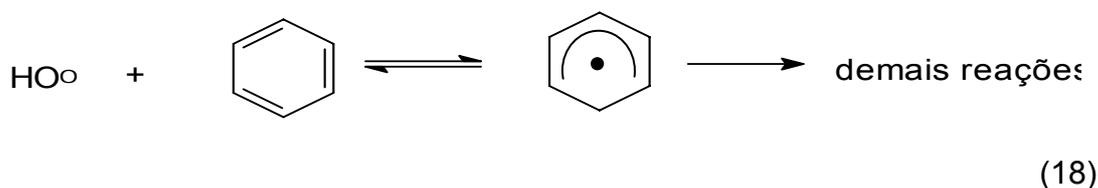


Como podemos observar na reação (8), o H_2O_2 age como oxidante e na (9) como redutor, este comportamento é uma característica própria do peróxido de hidrogênio extremamente útil nas reações que envolvem os POA.

O radical hidroxila pode ser gerado (reação (8)) pela simples combinação de sais de Fe(II) com H_2O_2 . Entretanto, precipitados de oxihidróxidos de Fe (III) amorfos podem ser produzidos quando o pH passa de fortemente ácido para neutro, gerando uma quantidade de lodo indesejável ⁸.

Processos para tratamento de efluentes com reagente de Fenton são conhecidos pela efetiva remoção de diversos poluentes orgânicos perigosos. A maior vantagem deste processo está na destruição do contaminante levando-o a compostos menos danosos como o CO_2 , água e sais inorgânicos ⁵.

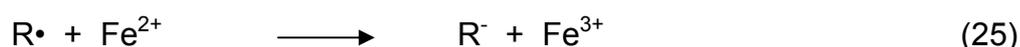
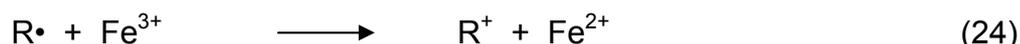
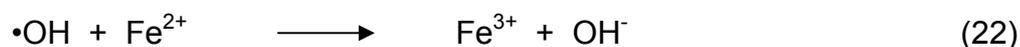
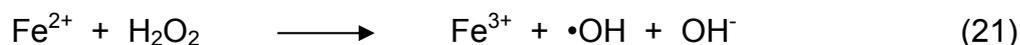
A reação do radical $\cdot\text{OH}$ com compostos orgânicos leva a formação de radicais centrados no carbono, reações bem conhecidas, principalmente pela abstração do próton H^+ a partir de C-H, N-H ou O-H, adições a C=C, ou adição ao anel aromático produzindo radicais orgânicos $\text{R}\cdot$ ^{5,8,9,10}.



Quando o ar está presente na solução, os radicais produzidos nas reações acima, podem reagir com o O_2 produzindo $\text{HO}_2\cdot$ (O_2^-), radicais peroxila $\text{R-OO}\cdot$ ou radicais oxila $\text{R-O}\cdot$:



As reações a apresentadas a seguir sugerem um mecanismo de reação em cadeia para a degradação de compostos orgânicos ^{5,11}.



2.9 Reagente de Fenton/UV

O processo que combina a aplicação de radiação ultra-violeta ao processo Fenton é denominado de foto-Fenton. Uma maior eficiência na degradação pode ser obtida a partir do uso deste processo frente ao reagente de Fenton devido a formação de uma maior quantidade de HO• em função da fotólise do H₂O₂

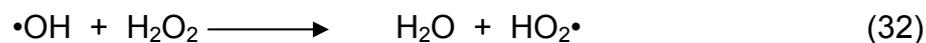
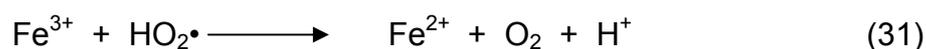
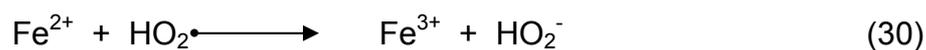


2.10 Reagente Fenton/Fe³⁺

Reações Fenton/Fe³⁺ são análogas às reações de Fenton, com o uso de complexos metálicos do tipo Mⁿ⁺L_m, com metais tais como Fe(III), Cu(I), Cr(II) Co(II). Reações do tipo Fenton/Fe³⁺ são importantes em uma variedade de processos catalíticos e biológicos ¹².

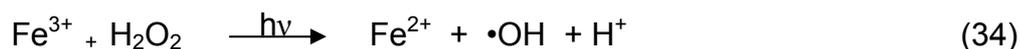
O íon Fe (III) catalisa a decomposição do H₂O₂ para O₂ e H₂O. O mecanismo clássico proposto para esta reação em cadeia segue os seguintes passos ^{8,11,13}.





2.11 Reagente de Fenton/ Fe^{3+} /UV

O processo que combina a aplicação de radiação ultra-violeta ao processo Fenton/ Fe^{3+} é denominado de foto-Fenton/ Fe^{3+} . Uma maior eficiência na degradação pode ser obtida a partir do uso deste processo devido a formação de uma maior quantidade de $\text{HO}\cdot$ em função da fotólise do H_2O_2 .



3 Processos Oxidativos Avançados Heterogêneos

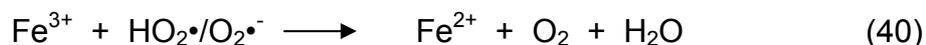
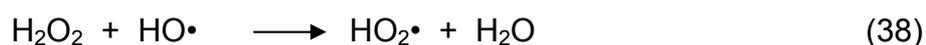
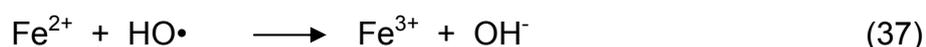
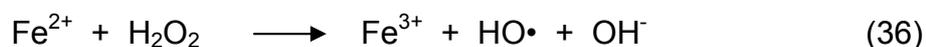
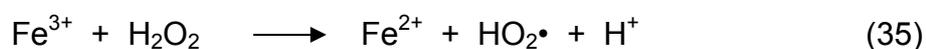
Os sistemas heterogêneos se diferenciam dos homogêneos devido a presença de catalisadores sólidos. Os catalisadores sólidos utilizados nestes sistemas são semicondutores que atuam como fotocatalisadores.

A literatura apresenta uma série de semicondutores entre eles o TiO_2 , ZnO , Fe_2O_3 , SiO_2 , Al_2O_3 , V_2O_5 , entre outros.

ANEXO 2

Formação de complexos de ferro

As reações com peróxido de hidrogênio e sais de Fe^{2+} e Fe^{3+} em solução aquosa ácidas são fontes em potencial de radicais hidroxila normalmente utilizados na oxidação de compostos orgânicos presentes em águas residuárias. Na ausência de luz e de ligantes complexantes que não a água, o mecanismo da decomposição de H_2O_2 , em solução aquosa ácida, envolve a formação de radicais hidroperoxila ($\text{HO}_2\cdot/\text{O}_2\cdot^-$) e hidroxila ($\text{HO}\cdot$) de acordo com as seguintes etapas^{14,15,16}.



Em biologia estas reações são muito importantes, acredita-se que as mesmas sejam responsáveis por reações que produzem espécies oxigênio-reativas (ROS) nas células, causando uma diversidade de doenças como câncer, arteriosclerose, hipertensão, mal de Alzheimer, amiloidose, osteoartrite entre outras. Apesar de passados mais de 110 anos da publicação por Fenton^{12,17} dos estudos da oxidação de substrato orgânico na presença de H_2O_2 e $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$, conhecido como “Reagente de Fenton”, os intermediários ativos e detalhes do mecanismo deste tipo de reação ainda continuam ambíguos e repetidamente discutidos em muitas publicações e artigos de revisão. A ocorrência das reações Fenton-like dependem da natureza do metal M, do ligante L, do substrato orgânico ROOR’ e do meio reacional. Informações quanto a oxidação de substratos orgânicos por reagentes de Fenton em sistemas aquosos oxigenados é bastante comum, já estudos em condições não aquosa e anaeróbias é bastante limitado¹².

O efeito da presença de Fe^{3+} em soluções aquosas de antibióticos β -lactâmicos despertou interesse, tendo em vista o quadro clínico de anemia

observado em pacientes submetidos a longos tratamentos com estes antibióticos. Os resultados obtidos por estudos de infra-vermelho (IR) e espectrometria de massa (MS) levaram à proposta de um modelo de estrutura monomolecular para o complexo formado ¹⁸. A figura 4.1 a seguir mostra uma representação deste monocomplexo.

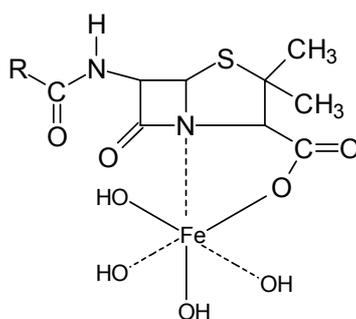


Figura 1: Proposta de modelo de complexo mononuclear.

Fonte: CARP, 1996¹⁸.

Outros estudos sobre a formação de complexos entre metais e substratos orgânicos, em especial os antibióticos β -lactâmicos, sugerem além de estruturas prováveis ¹¹⁴, o mecanismo da reação do complexo com o oxidante ^{19,20}. As reações propostas estão apresentadas a seguir:



REFERÊNCIAS DOS ANEXOS

1. von Sperling, M.; *Introdução a Qualidade da Águas e ao Tratamento de Esgotos*, 2^a ed., DESA/UFMG: Belo Horizonte, 2004.
2. Teixeira, C.P.A.B. e Jardim, W.F.; *Processos Oxidativos Avançados*, Caderno Temático, vol.3, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2004.
3. U.S. Environment Protection Agency,. Handbook on Advanced Photochemical Oxidation Processes, EPA/625/R-98/0004. 1998 apud Teixeira, C.P.A.B. e Jardim, W.F.; *Processos Oxidativos Avançados*, Caderno Temático, vol.3, Instituto de Química, Unicamp, 2004.
4. Huang, C. P., Dong, C. e Tang, Z.; *Waste Managem.*, **1993**, 13, 361 apud Higarashi, M.M.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 1999.
5. Neyens, E. e Baeyens, J.; *J. Hazard. Mater., B.*, **2003**, 98, 33.
6. Safarzadeh-Amiri, A.; Bolton, J. R. e Cater, S. R.; *Water Res.*, **1997**, 31, 787.
7. Rigg, T.; Taylor, W. e Weiss, J.; *J. Chem. Phys.*, **1954**, 22, 575.
8. Pignatello, J. J.; Oliveros, E. e Mackay, A.; *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, **2006**, 36, 1.
9. von Sonntag, C e Schumann, H. P. In *Peroxyl Radicals*, Alfassi, Z.B., John Wiley and Sons: New York, 1997 apud Pignatello, J. J.; Oliveros, E. e Mackay, A.; *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, **2006**, 36, 1.
10. Buxton, G.V., Grenstock, C.L., Helman, W.P. e Ross, A.B.; *J. Phys. Chem.*, **1988**, 17, 513 apud Pignatello, J. J.; Oliveros, E. e Mackay, A.; *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, **2006**, 36, 1.
11. Walling, C. e Goosen, A.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, 95, 2987.
12. Masarwa, A.; Rachmilovich-Calis, S.; Meyerstein, N. e Meyerstein, D.; *Coord. Chem. Rev.*, **2005**, 249, 1937.
13. Haber, F. e Weiss, J.J.; *Proc. Roy. Soc. London*, **1934**, A.147, 332.
14. Pignatello, J. J.; *Environ. Sci. Technol.*, **1992**, 26, 944.
15. Barb, W.G. Baxendale, J.H., George, P. e Hargrave, K.R.; *Nature*, **1949**, 163, 692 apud Gallard, H.; A. A.T, J. e Legube, B.; *Water Res.*, **1999**, 33, 2929.
16. Barb, W.G. Baxendale, J.H., George, P. e Hargrave, K.R.; *Trans. Faraday Soc.*, **1951**, 47, 591 apud Gallard, H.; AA.T, J. e Legube, B.; *Water Res.*, **1999**, 33, 2929.
17. Fenton, H.J.H.; *J.Chem.Soc.*, **1894**, 65, 899.
18. Carp, N., Tufoi, V. Carp, M., Aldea, V. e Badescu, V.; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1996**, 14, 1055.
19. 115. Goldstein, S.; Meyerstein, D. e Czapski, G.; *Free Radical Biol. Med.*, **1993**, 15, 435.
20. Masarwa, M.; Cohen, H.; Meyerstein, D.; Hickman, D. L.; Bakac, A. e Espenson, J. H.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 4294.