

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental
Mestrado em Engenharia Ambiental

RHUANA VALDETÁRIO MÉDICE

Identificação de subprodutos de cloração do norfloxacino por espectrometria de massas de alta resolução e avaliação de sua atividade antimicrobiana e toxicidade aguda

Ouro Preto, Minas Gerais

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental
Mestrado em Engenharia Ambiental

RHUANA VALDETÁRIO MÉDICE

Identificação de subprodutos de cloração do norfloxacino por espectrometria de massas de alta resolução e avaliação de sua atividade antimicrobiana e toxicidade aguda

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

Área de Concentração: Tecnologias Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Libânio

Coorientador: Prof. Dr. Robson José de Cássia Franco Afonso

Ouro Preto, Minas Gerais

2017

M478i

Médice, Rhuana Valdetário.

Identificação de subprodutos de cloração do norfloxacino por espectrometria de massas de alta resolução e avaliação de sua atividade antimicrobiana e toxicidade aguda [manuscrito] / Rhuana Valdetário Médice. - 2017.

92f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Libânia.

Coorientador: Prof. Dr. Robson José de Cássia Franco Afonso.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação. PROAMB. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental.

Área de Concentração: Tecnologias Ambientais.

1. Antibióticos. 2. Fluoroquinolonas. 3. Subprodutos de cloração. 4. Espectrometria de massas. 5. Toxicidade Ambiental. I. Libânia, Marcelo. II. Afonso, Robson José de Cássia Franco. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 502:004



UFOP
Universidade Federal
de Ouro Preto

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – PROAMB



IDENTIFICAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE CLORAÇÃO DO NORFLOXACINO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO E AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E TOXICIDADE AGUDA

Autora: Rhuana Valdetário Médice

Dissertação defendida e aprovada, em 13 de novembro de 2017, pela banca examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Marcelo Libânio - Orientador
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Robson José de Cássia Afonso - Coorientador
Universidade Federal de Ouro Preto

Prof.ª Dr.ª Lisete Lange
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Sérgio Francisco de Aquino
Universidade Federal de Ouro Preto

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à pessoa sem a qual nada disso seria possível, minha mãe, Tânia. Muito obrigada por todo o apoio, todo o carinho, toda força e toda doçura. Você é e sempre será minha referência. Muito obrigada também ao meu irmão, Guilherme, que mesmo de longe fez fazer sentir sua torcida e apoio. Amo vocês!

Obrigada à Vó Mirza e aos Tios Paulinho e Maurinho que me acompanham há muito nessa jornada e nunca deixaram de me apoiar. Obrigada à toda minha grande família: Rose, Edinho, Joaquina e Camilla, o carinho de vocês foi essencial em cada etapa. Obrigada a todos os meus amigos, sem exceção, por terem pegado a estrada tantas vezes, só pra me ver, por entenderem as inúmeras ausências, por me incentivarem ao ouvir um “tá acabando” quando me perguntavam do andar da pesquisa, e olha que não foram poucas as vezes! A torcida de vocês me ajudou a seguir em frente.

O meu muito obrigada ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Libânio, por topar essa aventura comigo e por ser de uma gentileza sem precedentes. Muitíssimo obrigada também ao meu coorientador Prof. Dr. Robson Afonso, por abrir as portas de seu laboratório, por todo o conhecimento transmitido, por toda a dedicação e carinho que vi durante esses anos, não só comigo, mas com toda a equipe de trabalho. Você é um exemplo.

Por falar em equipe de trabalho, quero agradecer ao pessoal do Laboratório de Caracterização Molecular e Espectrometria de Massas: Amanda, Ananda, André, Bianca, Célia, Camila, Daniel, Joanne, Marina, Mariana, Paulo Bernardo, Rafaela Paiva, Rafaela Queiroz e Raquel. Obrigada por me acolherem nessa família linda que vocês formam e tornarem essa jornada muito mais leve e divertida.

Obrigada ao Prof. Dr. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira, da escola de Farmácia, que tão gentilmente me ajudou com os ensaios biológicos. Obrigada à Prof. Dr. Alceni Augusta Werle pelos ensinamentos, pela paciência e toda a ajuda durante o trabalho.

Quero agradecer também à UFOP, ao PROAMB e à instituição de fomento FAPEMIG pela oportunidade.

E por último, mas não menos importante, agradeço a Deus, por ter aberto as portas do mestrado pra mim, por tudo o que aprendi, por tudo o que tenho e por ter a sorte de ter tanto a que agradecer.

“Os voos mais altos são reservados às águias, não aos pássaros domésticos”.

Nicolas Flamel

RESUMO

Fármacos e produtos para cuidado pessoal são compostos que se encaixam na categoria de contaminantes de preocupação emergentes. Dentre essas substâncias, os antibióticos despertam especial interesse por serem amplamente utilizados na medicina humana e veterinária e por poderem levar ao desenvolvimento de resistência bacteriana no meio em que se encontram. Os sistemas convencionais de tratamento de esgotos não demonstram ser efetivos na remoção da maioria desses compostos, assim esses fármacos podem chegar a estações de tratamento de água e então serem submetidos a processos convencionais de tratamento, onde é comum a desinfecção com compostos de cloro. A cloração pode levar à formação de subprodutos que podem ser ainda mais tóxicos do que os compostos de origem. Este trabalho teve como objetivo avaliar a degradação e a possível formação de subprodutos pela cloração do norfloxacino (NOR), um antibiótico da classe das fluoroquinolonas, indicado para o tratamento de infecções do trato urinário. O composto de cloro escolhido foi o hipoclorito de sódio (NaClO), comumente utilizado em estações de pequeno porte no Brasil. Para tal, o medicamento foi submetido a ensaios de cloração, em escala de bancada, com diferentes tempos de reação (t0', t5', t15', t30', t45', t60', t2h, t4h, t8h, t12h e t24h); na sequência foram feitas análises de carbono orgânico total (COT) e utilizada Espectrometria de Massas (MS) de Alta Resolução para a caracterização dos subprodutos formados. Também foram avaliadas, a atividade antimicrobiana e a toxicidade aguda da mistura dos produtos de degradação formados. Os resultados de COT indicaram taxa de mineralização de no máximo 40% da concentração inicial de NOR para os tempos de contato e dose de NaClO utilizados. Os resultados de MS mostraram 5 picos, referentes às moléculas protonadas $[M+H]^+$ 322.1197, $[M+H]^+$ 294.1307, $[M+Na]^+$ 273.0641, $[M+H]^+$ 251.0837 e $[M+H]^+$ 147.5661; atribuídos à formação de subprodutos. Destes 5 subprodutos, 4 tiveram suas fórmulas moleculares identificadas (SP-1, SP-2, SP-3 e SP-4). O antibiograma indicou que o processo de cloração levou à formação de subprodutos que perderam a atividade antibacteriana frente à cepa de *E. coli* estudada e os ensaios de toxicidade aguda, para o microcrustáceo *Artemia salina*, mostraram que os subprodutos apresentaram maior toxicidade do que NOR puro.

Palavras-chave: antibióticos, fluoroquinolonas, cloração, espectrometria de massas, caracterização de subprodutos de cloração, antibiograma, teste de toxicidade.

ABSTRACT

Pharmaceuticals and personal care products are considered contaminants of emerging concern. Among in the large group of pharmaceuticals, antibiotics draw especial attention because they are widely used in human and veterinary medicine, because they can be excreted unchanged and because they can lead to the development of resistant bacteria in the environment. Conventional wastewater treatment plants do not prove to be effective in removing of such compounds. So, they are worldwide detected in water compartments. Once their presence was confirmed in water compartments, these drugs can reach water treatment plants and then, be undergoing to disinfection processes with chlorine compounds. Chlorination can lead to the formation of even more toxic by-products than the parent compound. This work aimed to evaluate the degradation and possible formation of chlorination byproducts of norfloxacin (NOR); a fluoroquinolone antibiotic widely used in Brazil indicated for the treatment of urinary infections. The chlorine compound chosen was the sodium hypochlorite (NaClO), commonly used in small water treatment plants in the country. For this purpose, the drug was subjected to chlorination tests with different reaction times (t0', t5', t15', t30', t45', t60', t2h, t4h, t8h, t12h and t24h); sequentially, analyzes of total organic carbon (TOC) and high resolution mass spectrometry (MS) was performed for the characterization of the by-products formed. The antimicrobial activity and an acute toxicity of the degradation products also were evaluated. The results of TOC indicated that the NOR was not completely mineralized to CO₂ and H₂O for the chlorination process. The results of MS identified 4 disinfection byproducts, a chemical route of degradation was proposed. The antibiogram assay indicated that the by-products formed lost the antibacterial activity against the *E. coli* strain studied and the acute toxicity tests revealed that the same byproducts are more toxic to the micro crustacean *Artemia salina* than the parent compound.

Key words: antibiotics, chlorination, mass spectrometry, chlorination byproducts, antibiogram, toxicity test

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura básica das fluoroquinolonas, com os carbonos do anel quinolônico numerados.....	16
Figura 2: Estrutura química do Norfloxacino.....	17
Figura 3: Esquema de protonação/desprotonação para o norfloxacino.....	18
Figura 4: Gráfico: Volume de vendas dos dez antimicrobianos mais vendidos no País no período de Junho de 2012 a Maio de 2017.....	22
Figura 5: Esquema de possíveis rotas de entrada e destino de antibióticos no meio ambiente.....	24
Figura 6: Componentes de um Espectrômetro de Massas.....	44
Figura 7: Modelo de ionização por <i>electrospray</i> : (A) modelo do resíduo carregado, e (B) modelo de dessorção de íons.....	47
Figura 8: Esquema de configuração de um espectrômetro de massas híbrido IT-TOF.....	49
Figura 9: Esquema do procedimento de cloração.....	56
Figura 10: Esquema da disposição dos poços escavados em placa de Petri.....	59
Figura 11: Esquema para eclosão dos ovos de <i>Artemia</i> e sua incubação durante o ensaio de toxicidade.....	60
Figura 12: Concentração residual de COT obtidas com a cloração do norfloxacino nos diferentes tempos de reação.....	61
Figura 13: Espectros de massa das soluções obtidas da degradação do norfloxacino em diferentes tempos de cloração.....	63
Figura 14: Rota de degradação proposta para o norfloxacino durante os ensaios de cloração.....	70
Figura 15: Resultado do antibiograma pela técnica de difusão em ágar por meio de orifícios cavados.....	72
Figura 16: Detalhe da medição dos halos de inibição.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Algumas propriedades físico-químicas do Norfloxacino.....	20
Tabela 2: Registro de fluoroquinolonas encontradas, em diferentes países, no ambiente hídrico.....	26
Tabela 1: Processos oxidativos avançados mais aplicados para degradação de moléculas orgânicas.....	32
Tabela 4: Subprodutos de oxidação de fluoroquinolonas para diferentes tratamentos oxidativos empregados.....	40
Tabela 5: Fórmula molecular do norfloxacino e dos possíveis subprodutos identificados a partir dos dados obtidos por injeção direta em espectrômetro de massas.....	67
Tabela 6: Estrutura química dos subprodutos identificados após a cloração do norfloxacino.....	69
Tabela 7: Número de organismos vivos e mortos após 24h de incubação em soluções cloradas e não cloradas de norfloxacino.....	75

LISTA DE EQUAÇÕES

(Equação 1).....	35
(Equação 2).....	35
(Equação 3).....	35
(Equação 4).....	35
(Equação 5).....	36
(Equação 6).....	37
(Equação 7).....	37
(Equação 8).....	37
(Equação 9).....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

➤	ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária	➤	LEV	Levofloxacino
					<i>Mass Spectrometry</i>
➤	DNA	Ácido desoxirribonucleico	➤	MS	(Espectrometria de massas)
➤	DMSO	Dimetilsulfóxido	➤	NaClO	Hipoclorito de sódio
➤	DQO	Demanda química de oxigênio	➤	NOR	Norfloxacino
➤	CIP	Ciprofloxacino	➤	OFL	Ofloxacino
➤	ESF	Esparfloxacino	➤	pH	Potencial hidrogeniônico
➤	ETA	Estação de tratamento de água	➤	pKa	-log Ka (constante de acidez)
➤	ETE	Estação de tratamento de esgotos	➤	POA	Processos oxidativos avançados
➤	FLU	Flumequina	➤	SPD	Subprodutos de desinfecção
➤	GAT	Gatifloxacino	➤	TVF	Trovafloxacino
➤	GMF	Gemifloxacino	➤	UV	Ultravioleta
➤	FQ	Fluoroquinolonas	➤	THM	Trihalometanos
		<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia líquida de alta eficiência)			
➤	HPLC		➤	•OH	Radical hidroxila
➤	Kow	Coefficiente de partição octanol/água	➤	•Cl	Radical cloro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS	
2.1 Objetivos Gerais.....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3. REVISÃO DA LITERATURA	
3.1 Antibióticos.....	15
3.2 Fluoroquinolonas.....	15
3.3 Norfloxacino.....	16
3.3.1 <i>Propriedades físico-químicas da molécula de Norfloxacino.....</i>	<i>17</i>
3.4 Consumo de Fluoroquinolonas no Brasil e no mundo.....	21
3.5 Rotas de entrada de fluoroquinolonas no meio ambiente.....	22
3.6 Presença de fluoroquinolonas em ambiente hídrico.....	25
3.7 Remoção de antibióticos por estações de tratamento de efluente	
3.7.1 <i>Capacidade de remoção de antibióticos do meio aquoso por processos convencionais de tratamento.....</i>	<i>30</i>
3.7.2 <i>Capacidade de remoção de antibióticos do meio aquoso por processos oxidativos avançados.....</i>	<i>31</i>
3.8 Desinfecção.....	34
3.8.1 <i>Compostos de cloro livre.....</i>	<i>35</i>
3.8.2 <i>Compostos de cloro combinado.....</i>	<i>36</i>
3.9 Estudos de oxidação do norfloxacino e outras fluoroquinolonas.....	38
3.10 Fundamentos dos métodos analíticos envolvidos.....	43

3.10.1	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>	43
3.10.2	<i>Espectrometria de massas</i>	44
3.10.2.1	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (HPLC-IT-TOF)</i>	45
3.10.3	<i>Carbono Orgânico Total (COT)</i>	49
3.11 Ensaios biológicos		
3.11.1	<i>Antibiograma</i>	50
3.11.2	<i>Teste de toxicidade aguda com Artemia salina</i>	51
4. MATERIAIS E MÉTODOS		
4.1 Ensaios Químicos		
4.1.1	<i>Reagentes, solventes, equipamentos, vidrarias e consumíveis</i>	53
4.1.2	<i>Preparo das soluções padrão</i>	54
4.1.3	<i>Ensaio de cloração</i>	55
4.1.4	<i>Análise de Carbono Orgânico Total</i>	56
4.1.5	<i>Deteção no espectrômetro de massas</i>	57
4.2 Ensaios microbiológicos		
4.2.1	<i>Antibiograma</i>	57
4.2.1.1	<i>Reagentes, solventes, equipamentos, vidrarias e consumíveis</i>	57
4.2.1.2	<i>Preparo do ágar</i>	58
4.2.1.3	<i>Técnica de difusão em ágar por meio de orifícios cavados</i>	58
4.2.1.4	<i>Artemia salina</i>	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO		
5.1	Avaliação da mineralização do norfloxacino alcançada com a cloração	61

5.2	Identificação dos subprodutos de degradação.....	62
5.2.1	<i>Elucidação estrutural e rotas de degradação.....</i>	68
5.3	Antibiograma.....	71
5.4	Testes de toxicidade aguda com Artemia salina.....	75
6.	CONCLUSÃO.....	78
7.	PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO.....	79
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

1. INTRODUÇÃO

Um contaminante de preocupação emergente pode ser definido, como uma substância química, de ocorrência natural ou antrópica, ou qualquer microrganismo que não é normalmente encontrado no ambiente, mas que tem potencial para entrar no mesmo e causar efeitos adversos ecológicos ou sobre a saúde humana, sendo estes efeitos conhecidos ou suspeitos. São substâncias que ainda não estão incluídas nos programas de monitoramento, mas que através dos resultados de pesquisas sobre sua toxicidade, efeitos sobre a saúde e percepção do público podem se tornar candidatas à legislações futuras (UNITED STATES GEOLOGICAL SURVEY – USGS). Muitos desses contaminantes foram ou ainda são lançados no ambiente há anos ou até mesmo décadas, mas sua determinação só foi possível recentemente, a partir do aperfeiçoamento dos métodos de detecção, por isso são considerados de preocupação emergente.

Fármacos e produtos para higiene pessoal são compostos que se encaixam nessa categoria de contaminantes. Dentro do grande grupo dos medicamentos, os antibióticos são compostos que vem se destacando como contaminantes emergentes devido a diversos fatores: (i) são largamente utilizados na medicina humana e veterinária, (ii) uma porcentagem significativa desses compostos é excretada de forma inalterada e persiste no ambiente e, (iii) podem levar ao desenvolvimento de cepas de bactérias resistentes no meio em que se encontram.

Diversos estudos demonstram a presença dessa classe de fármacos nos mais diferentes ambientes aquáticos em faixas de concentrações de $\mu\text{g/L}$ e ng/L (HIRSCH et al., 1999; JOHNSON; BELFROID; DI CORCIA, 2000; KOLPIN et al., 2002; LOCATELLI, 2011), que embora sejam consideradas baixas para representar algum perigo à saúde humana geram preocupação quanto ao aumento de resistência bacteriana e à formação de subprodutos com características e toxicidade ainda desconhecidas já que, uma vez liberadas no ambiente, as substâncias estão sujeitas a processos bióticos e abióticos que são responsáveis pela sua transformação e/ou eliminação.

Estudos demonstram que várias dessas substâncias parecem ser persistentes no meio ambiente e não são completamente removidas nas estações de tratamento de esgoto (ETE) (TERNES *et al.*, 1999). Em razão da massificação de seu uso e da baixa eficiência de remoção dos sistemas convencionais de tratamento de água residuária, contaminam águas

superficiais e subterrâneas, podendo gerar efeitos deletérios no meio hídrico, problemas ambientais e de saúde pública (DA CRUZ *et al.*, 2010).

A ocorrência de antibióticos em corpos hídricos, inclusive, em mananciais que servem como fonte de abastecimento de água para consumo humano traz a preocupação de que tais fármacos possam sofrer transformações ao reagirem com as substâncias químicas que participam do processo de tratamento, principalmente com os oxidantes utilizados durante o processo de desinfecção. Os produtos formados durante essa etapa são chamados de produtos de degradação ou subprodutos de desinfecção (SPD). Não é surpreendente que SPD possam formar-se a partir desses fármacos, pois muitas dessas substâncias possuem anéis aromáticos que podem reagir rapidamente com compostos de cloro livre, cloraminas, ozônio ou dióxido de cloro (POSTIGO & RICHARDSON, 2014).

No Brasil, os compostos de cloro são, certamente, os agentes desinfetantes mais utilizados. Apresentam-se como cloro livre ou associado, e podem reagir com os fármacos através de reações de substituição ou adição de cloro, alterando grupos funcionais ativos, ou por meio da quebra da molécula pela oxidação com radicais hidroxila ou de cloro ativo (LEMINH *et al.*, 2010).

O avanço das técnicas de detecção tem permitido um aprofundamento na averiguação dos SPD, contudo, ainda são escassos os dados sobre os SPD dos antibióticos na literatura. Além do mais, uma vez que vários intermediários podem ser formados durante o tratamento, é importante identificar uma rota de degradação bem como avaliar a toxicidade e o destino destes no ambiente (POSTIGO & RICHARDSON, 2014).

O norfloxacino (NOR) é um antibiótico de amplo espectro de ação, utilizado em todo o mundo, principalmente, para o tratamento de infecções do trato urinário. É a terceira fluoroquinolona mais comercializada no Brasil, figurando entre os dez antimicrobianos mais consumidos em nosso País. O hipoclorito de sódio (NaClO) é o agente desinfetante mais utilizado em estações de tratamento de água de pequeno e médio porte no Brasil. Haja vista o exposto, este estudo propôs-se a investigar quais são os subprodutos de desinfecção do NOR quando submetido ao tratamento com NaClO. Propôs-se ainda a avaliar a atividade antimicrobiana dos subprodutos formados e a toxicidade aguda frente ao microcrustáceo *Artemia salina*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Identificar os subprodutos de desinfecção do norfloxacino, formados após a cloração com hipoclorito de sódio, usando a técnica de espectrometria de massas de alta resolução; avaliar sua atividade antimicrobiana e comparar a toxicidade dos subprodutos formados com o composto que lhes deu origem.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos são:

- Avaliar a mineralização do norfloxacino após o processo cloração;
- Propor rotas químicas para a degradação do norfloxacino e formação dos subprodutos;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos subprodutos formados, por meio de teste antibiograma com cepas do microrganismo *Escherichia coli*;
- Comparar a toxicidade dos subprodutos formados e a toxicidade do fármaco frente ao microcrustáceo *Artemia salina*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ANTIBIÓTICOS

Antibiótico, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é qualquer molécula sintetizada por um microrganismo que antagonize o crescimento de outros microrganismos. Já os antimicrobianos são um conjunto mais abrangente de compostos; um antimicrobiano é qualquer substância, seja ela produzida por microrganismos ou sintetizada em laboratório, que apresenta a propriedade de inibir a reprodução ou matar um agente patogênico (ANVISA, 2011).

Contudo, muitos antimicrobianos sintetizados pelo homem são rotineiramente chamados de antibióticos. O uso indevido da terminologia acabou por cunhar o termo antibiótico como o mais comum para se referir a medicamentos, de uso humano ou veterinário, utilizados no combate às infecções bacterianas. Considerando esse fato, o termo antibiótico será empregado neste texto com o sentido mais amplo, por ser a forma mais usual de se referir a esta classe de fármacos.

Existe uma ampla gama de compostos, com características e propriedades químicas diversas, utilizados como antibióticos hoje em dia. E há, pelo menos, duas maneiras de se classificar esses compostos. Uma delas leva em consideração o modo de ação do fármaco, de acordo com essa classificação os antibióticos podem ser divididos em: (i) bactericidas, provocam a morte do microrganismo, ou (ii) bacteriostáticos, impedem a replicação celular do microrganismo. A segunda forma leva em consideração as funções orgânicas presentes nas moléculas, de acordo com essa classificação, os antibióticos são agrupados por semelhanças químicas e, por conseguinte, semelhanças no mecanismo de ação (HANG et al., 2007). Dentre as classes mais comuns destacam-se os β -lactâmicos, sulfonamidas, tetraciclinas, quinolonas, macrolídeos, nitroimidazólicos, estreptograminas, dentre outros.

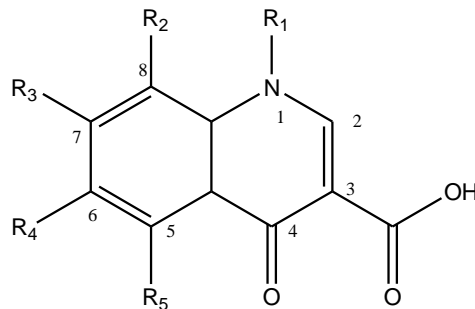
3.2 FLUOROQUINOLONAS

As quinolonas são uma classe de antibióticos derivados do quinino que surgiram no início da década de 1960, com a introdução do ácido nalidíxico na terapêutica (ANVISA, 2016). A adição de um átomo de flúor à estrutura básica desses compostos deu origem às

fluoroquinolonas, consideradas quinolonas de segunda geração (PICÓ; ANDREU, 2007). Tal descoberta incentivou a pesquisa de novos derivados e hoje em dia fazem-se presentes quinolonas de primeira, segunda, terceira e quarta gerações. O modo de ação de todas elas envolve a inibição da síntese do DNA bacteriano, pelo bloqueio da enzima DNA girase.

A introdução de um átomo de flúor à molécula aumentou o espectro de ação e diminuiu os efeitos adversos dos compostos quando comparados àqueles da primeira geração, o que fez crescer o seu uso na terapêutica clínica. A cada nova geração de fluoroquinolonas há uma busca por maior ação antimicrobiana e maior número de propriedades farmacológicas. Entre os compostos dessa classe destacam-se os ácidos nalidíxico e pipemídico como exemplos de quinolonas de primeira geração; norfloxacin (NOR) e ciprofloxacino (CIP) são os principais representantes da segunda geração; levofloxacin (LEV), gatifloxacino (GAT), moxifloxacino (MOX) são considerados de terceira geração e; trovafloxacino (TVF), gemifloxacino (GMF) e esparfloxacino (ESF) são alguns dos representantes das quinolonas de quarta geração. A estrutura básica de uma fluoroquinolona (FQ) pode ser observada na Figura 1.

Figura 1: Estrutura básica das fluoroquinolonas, com os elementos do anel quinolônico numerados.



Fonte: DEMEESTERE et al. (2014).

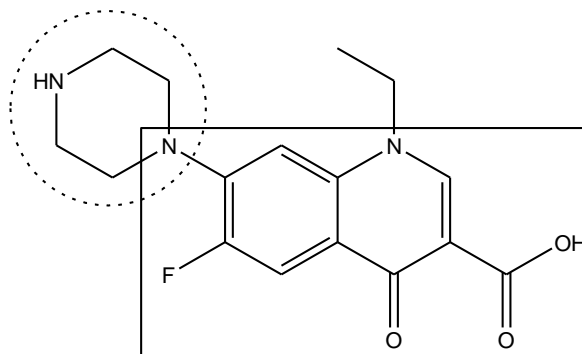
3.3 NORFLOXACINO

O norfloxacin ($C_{16}H_{18}FN_3O_3$) é uma quinolona de segunda geração e, como tal, é um agente bactericida que age por inibição da DNA-girase bacteriana, enzima envolvida no processo de replicação do DNA (CAMOZZATO & CAMPOS, 1999). É indicado para o tratamento de infecções do trato urinário, gastroenterites, gonorreia e febre tifoide. É

administrado por via oral e, após metabolização, tem entre 33 e 48% do fármaco excretados inalterados na urina. (FLOXACIN, Bula).

A molécula do norfloxacin (NOR) tem um átomo de flúor ligado à posição 6 do anel quinolônico e um anel piperazina ligado à posição 7 deste mesmo anel. Sua estrutura química pode ser vista na Figura 2.

Figura 2: Estrutura química do Norfloxacin. O círculo tracejado e o retângulo destacam o anel piperazina e o núcleo quinolônico, respectivamente.

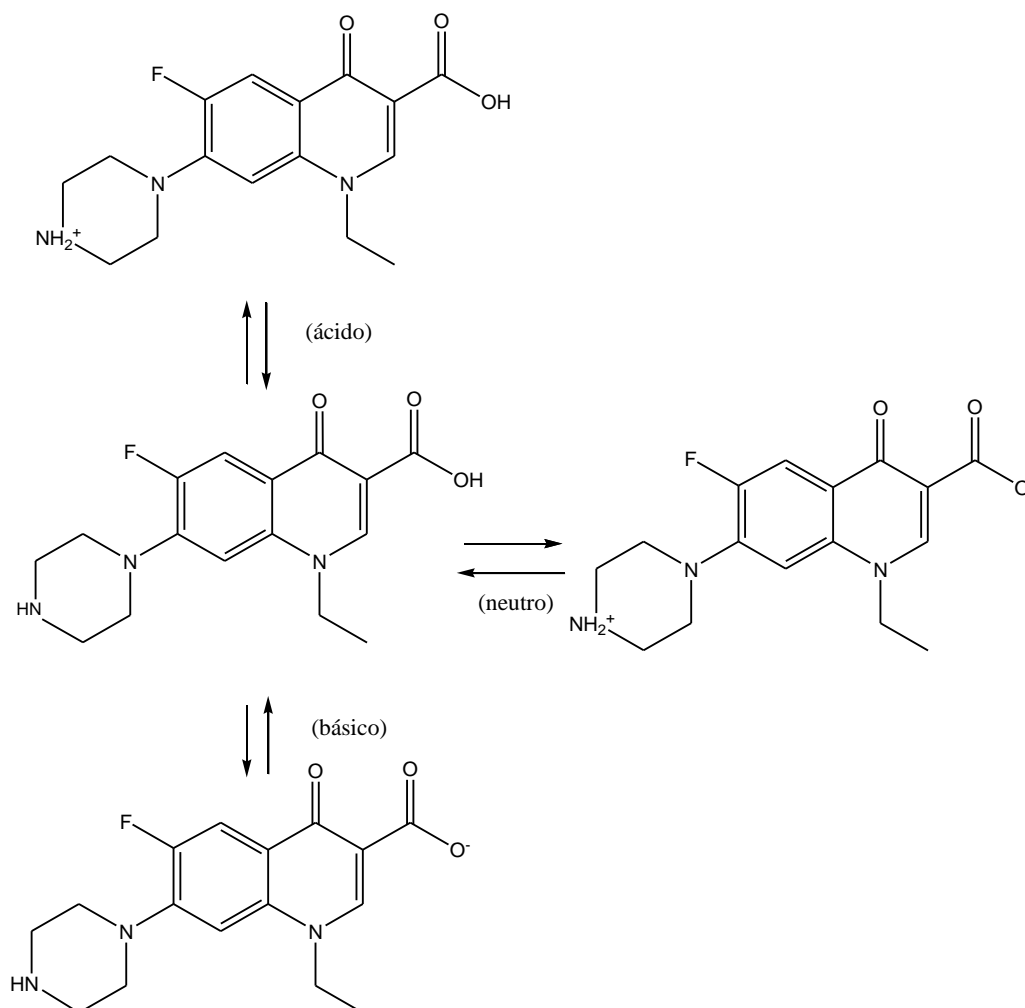


Fonte: DRUGBANK (2017)

3.3.1 Propriedades físico-químicas da molécula de Norfloxacin

O NOR é uma fluoroquinolona zwitteriônica (composto químico eletricamente neutro, mas que possui cargas opostas em diferentes átomos não adjacentes) em pH fisiológico mas, pode ser encontrado nas formas: (i) protonada (em meio ácido); (ii) zwitteriônica (em meio neutro ou fracamente ácido); e (iii) desprotonada (em meio alcalino) (BARBOSA; BARRON; JIMÉNEZ-LOZANO, 1999). O esquema de protonação/desprotonação do NOR nos meios ácido, neutro e básico está representado na Figura 3.

Figura 3: Esquema de protonação/desprotonação para o norfloxacino.



Fonte: MITSCHER (2005) - adaptado.

O grupo carboxílico, que se encontra na posição 3 do anel quinolônico, protona-se em meio levemente ácido ($pK_a \sim 6$). Já o grupo associado ao N na posição 4 do anel piperazina protona-se em meio alcalino ($pK_a \sim 8.5$). Há ainda autores que mencionam a possibilidade de processos de protonação/desprotonação nos demais átomos de N da molécula, dependendo do pH em que se encontra, porém os dados são escassos e contraditórios (MITSCHER, 2005).

Outra propriedade importante para a compreensão do comportamento de determinada substância é o seu coeficiente de partição octanol-água. Esse coeficiente, geralmente representado por K_{ow} ou P , informa a razão entre a solubilidade de um composto em octanol (solvente não polar) e a sua solubilidade em água (solvente polar). Os valores são usualmente tabelados como $\log K_{ow}$ (ou $\log P$), quanto maior o $\log K_{ow}$, mais apolar será o composto, e

maior a sua tendência em estar aderido aos sedimentos em um corpo d'água; enquanto valores menores de K_{ow} indicam uma maior tendência à dissolução do composto na fase aquosa. Peruzzo e Canto, (2012) afirmam que, se $\log K_{ow} > 0$, então, $K_{ow} > 1$ e a afinidade do analito é maior pela fase orgânica, já se $\log K_{ow} < 0$, então $K_{ow} < 1$, o analito tende a se dissolver preferencialmente na fase aquosa.

Os valores do coeficiente de partição octanol-água do NOR, descritos na literatura, não são concordantes e alguns autores expressam opiniões controversas quanto sua maior afinidade pelos sedimentos ou pela fase aquosa. Golet et al. (2003); Picó e Andreu, (2007) e Ying et al. (2010) apontam afinidade das FQ por lodo, sedimentos e solos, enquanto, Hari et al. (2005) reportam baixa afinidade do NOR pelos sedimentos em água natural. Demeestere et al. (2014) corroboram essa ideia em um estudo no qual compilaram dados que mostram que as FQ em geral possuem log de K_{ow} pequenos, o que indica baixo potencial de adsorção no meio. Amparo (2013) afirma que, devido aos grupos polares ligados ao núcleo lipofílico, as FQ tem alta solubilidade em água, mas que sua estrutura química determina ainda uma possível interação com a matéria orgânica natural, bem como certa adsorção no solo por causa de interações hidrofóbicas, eletrostáticas ou ambas.

Também Demeestere et al. (2014), afirmam que alguns pesquisadores relatam suas dúvidas sobre a utilidade do $\log K_{ow}$ para prever a partição ambiental de compostos ionizáveis devido ao fato de que, ao lado do particionamento hidrofóbico, as interações eletrostáticas desempenham um papel significativo no processo de sorção.

Independente dos valores de $\log K_{ow}$ e pK_a relatados, fato é que a presença do NOR, entre outras FQ, tem sido confirmada em diversos corpos d'água e assim gera preocupação quanto ao seu destino e potencial de degradação (LOCATELLI, 2011; XU et al., 2015b). A Tabela 1 traz alguns valores de propriedades físico-químicas importantes do NOR descritas na literatura.

Tabela 1: Algumas propriedades físico-químicas do Norfloxacino.

Parâmetros	Valores	Referência
Peso Molecular(g/mol)	319,33	U.S.PHARMACOPEIA,2017
pKa₁/pKa₂^a	6,30/8,38	ROSS; RILEY, 1990
	6,26/8,85	SCHMITT-KOPPLIN et al., 1999
	6,22/8,51	WANG; HE; HUANG, 2010a
	6,27/8,71	DEMEESTERE et al., 2014
	5,77/8,68	CHEMAXON, 2017
Solubilidade em água a 20°C(mg/L)	320	PENG et al., 2014
	1000	DRUGBANK, 2017
Solubilidade em metanol (mg/L)	620	PENG et al., 2014
Coefficiente de partição octanol-água(log Kow)	-2,0	ROSS; RILEY, 1990
	1,25	SCHMITT-KOPPLIN et al., 1999
	-1,17	DEMEESTERE et al., 2014
	-1,03	PUBCHEM, 2017
	0,46	VALDEQUÍMICA, 2015

a) pKa₁ se refere à constante de dissociação ácida do próton associado ao grupo carboxílico; pKa₂ refere-se a constante de dissociação ácida do próton da amina secundária do anel piperazina.

3.4 CONSUMO DE FLUOROQUINOLONAS NO BRASIL E NO MUNDO

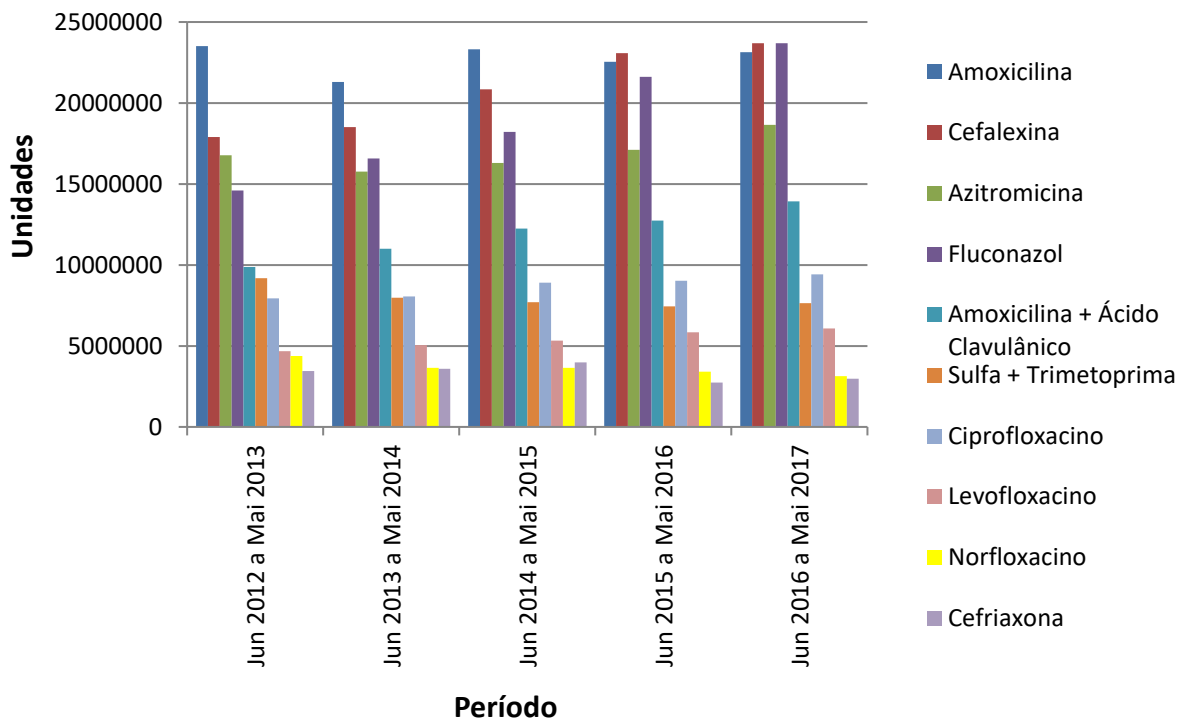
As fluoroquinolonas são consideradas umas das drogas mais bem sucedidas desenvolvidas pela indústria farmacêutica (ALBINI; MONTI, 2003) e figuram entre às classes de antibióticos mais utilizadas no mundo (FRADE et al., 2014).

Um estudo publicado por Laxminarayan et al. (2014), sobre o consumo global de antibióticos entre os anos 2000 e 2010 aponta que as FQ subiram duas posições no *ranking* de vendas dessa classe de fármacos, passando do 6º para o 4º lugar em volumes de venda, nesses dez anos. O relatório *The State of de World's Antibiotics 2015* apontou ainda que, neste mesmo período, o maior aumento no uso desses medicamentos aconteceu nos países emergentes, conhecidos como BRICS (68% no Brasil, 19% na Rússia, 66% na Índia, 37% na China e 219% na África do Sul). O relatório afirma que aproximadamente três quartos do aumento total do consumo global ocorreram nessas nações, apesar delas representarem apenas um terço do aumento mundial da população entre 2000 e 2010 (CENTER FOR DISEASE DYNAMICS, ECONOMICS & POLICY, 2015).

No Brasil, em 2008, 40% dos remédios consumidos eram antibióticos (IMS HEALTH, 2010). A partir de 2010, essa classe de fármacos passou a ter sua venda controlada, só podendo ser dispensados com receita médica. Este fato, no entanto, não diminuiu o consumo no país. De acordo com a ANVISA, após a exigência para retenção de receita, o consumo de antibióticos cresceu 4,8% em um ano, saindo de 90,3 milhões para 94,7 milhões de unidades.

Dados do instituto IMS Health afirmam que as fluoroquinolonas são a terceira classe de antibióticos mais vendida no Brasil desde 2012, figurando o NOR entre os dez antibióticos mais consumidos no país, o terceiro mais vendido entre as fluoroquinolonas, ficando atrás apenas do CIP e do LEV (IMS HEALTH, 2017). Esses dados são ilustrados na Figura 4.

Figura 4: Gráfico do volume de vendas dos dez antimicrobianos mais comercializados no País no período de Junho de 2012 a Maio de 2017.



Fonte: IMS HEALTH (2017).

3.5 ROTAS DE ENTRADA DE FLUOROQUINOLONAS NO MEIO AMBIENTE

A entrada de fluoroquinolonas e outros antibióticos no meio ambiente se dá devido a aplicações humanas ou veterinárias. A contaminação resultante de aplicações humanas pode ocorrer pela disposição incorreta de medicamentos não utilizados ou vencidos e, em maior soma, pela descarga de efluentes contendo fluoroquinolonas. Com relação a este último, três diferentes fontes merecem ser destacadas: (i) efluentes de indústrias farmacêuticas, (ii) efluentes urbanos e (iii) efluentes hospitalares.

A indústria farmacêutica, assim como qualquer outra, elimina, continuamente, uma série de resíduos no meio ambiente. A diversidade e a particularidade dos efluentes dessas indústrias requer uma série de tratamentos diferenciados e mais específicos, contudo, o grande aporte de substâncias faz com que seja praticamente impossível não haver traços de fármaco no efluente final. Na maioria das vezes, os fármacos permanecem em pequenas quantidades,

mas ainda assim, mantém sua atividade biológica mesmo após o tratamento das águas residuárias (PIERONE, 2011).

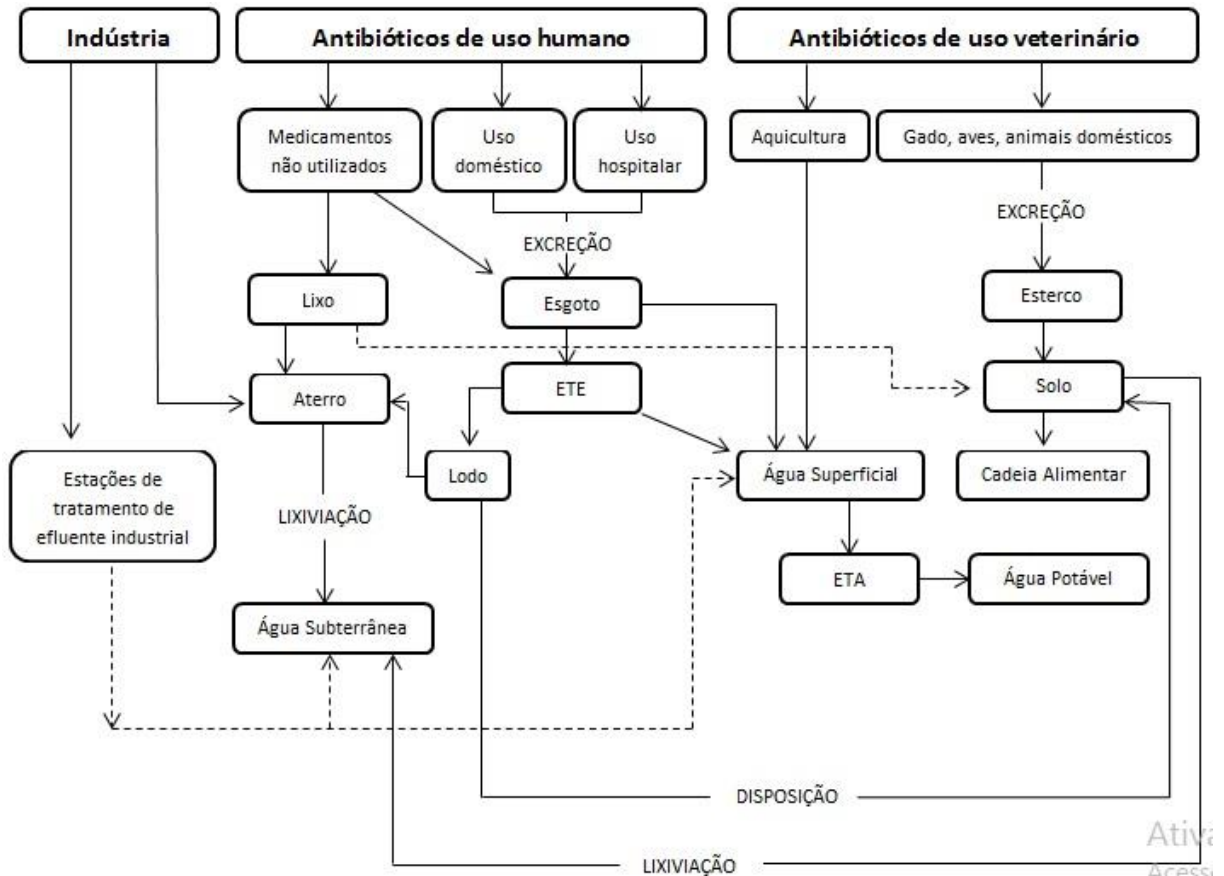
Quanto à presença de fluoroquinolonas em efluentes urbanos, uma vez administrados, os antibióticos são absorvidos, distribuídos e posteriormente metabolizados no organismo. Apesar de haver absorção e metabolização, uma quantidade significativa dessas substâncias é eliminada de forma inalterada na urina e nas fezes. Esses fármacos são então diluídos no esgoto doméstico sendo conduzidos ao longo do sistema de esgotos até corpos d'água ou estações de tratamento. Nesta mesma rota inclui-se o descarte de forma inadequada (por exemplo, no vaso sanitário) de produtos não utilizados ou fora do prazo de validade. Há de se considerar também a disposição em aterros sanitários clandestinos que pode causar contaminação por infiltração no solo e escoamento superficial (IKEHATA; JODEIRI NAGHASHKAR; GAMAL EL-DIN, 2006; KOSJEK; HEATH, 2008; RATOLA et al., 2012).

Os efluentes hospitalares são mais uma fonte significativa de contaminação do meio ambiente por antibióticos devido à alta carga e à grande diversidade de medicamentos de que é composto. Van Doorslaer et al. (2014), em um estudo de revisão sobre a presença de FQ no meio ambiente, analisaram mais de 200 artigos, publicados entre 1998 e 2013, e apontaram que as concentrações de FQ em efluentes hospitalares variam entre 3 ng/L e 240 µg/L. Sendo CIP, NOR e LEV/OFL os mais comumente encontrados, em concentrações médias de 21 µg/L, 5 µg/L e 11 µg/L, respectivamente.

No que diz respeito ao uso veterinário, as FQ são utilizadas desde a década de 1990, tanto para o tratamento e prevenção de doenças, quanto como agentes promotores de crescimento (GOLET; ALDER; GIGER, 2002). Esses fármacos podem ser lançados diretamente na água, quando seu uso na aquicultura, ou chegarem ao meio ambiente pela excreção dos animais. Van Doorslaer et al. (2014) relatam a utilização de NOR em tanques de criação de camarão no Vietnã e Pallo-Zimmerman; Byron; Graves (2010) afirmam que o CIP é frequentemente utilizado no tratamento de animais domésticos.

Possíveis rotas de entrada e destino de antibióticos no meio ambiente são esquematizadas na Figura 5.

Figura 5: Esquema de possíveis rotas de entrada e destino de antibióticos no meio ambiente.



Fonte: FRADE et al. (2014) - adaptado.

Uma vez no ambiente, o destino dos fármacos vai depender de suas características estruturais e propriedades físico-químicas, como estrutura molecular, solubilidade, coeficiente de partição, fotossensibilidade e biodegradabilidade (MELO; DUARTE; SOARES, 2012). O pH do meio, a capacidade de adsorção do contaminante aos sedimentos e o regime de chuvas também são determinantes na concentração e na forma como essas espécies irão se apresentar (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006).

3.6 PRESENÇA DE FLUOROQUINOLONAS EM AMBIENTE HÍDRICO

A primeira observação da presença de antibióticos em águas naturais foi realizada em 1999, por Hirsch e colaboradores, que determinaram 18 antibióticos de diferentes classes em amostras de efluente de estações de tratamento de esgotos, água superficial e água subterrânea, na Alemanha. Porém, somente nos últimos anos uma investigação mais complexa sobre essas substâncias vem sendo realizada a fim de permitir um melhor entendimento sobre os riscos ambientais que podem representar (KÜMMERER, 2009a).

Santos et al. (2010) compilaram informações de 134 artigos publicados entre os anos de 1997 e 2009, identificando as principais classes terapêuticas presentes no meio ambiente. Dentre todos os fármacos citados 15% são antibióticos, a segunda maior porcentagem, ficando atrás apenas dos anti-inflamatórios não esteroides (16% das citações). Os antibióticos da classe das FQ foram identificados em diversos compartimentos hídricos: efluentes hospitalares; afluentes, efluentes e lodo de ETE; águas superficiais e até efluentes de ETA.

Golet et al. (2001) confirmaram a presença de nove fluoroquinolonas em estações de tratamento de esgoto na Suíça, entre elas, o CIP e o NOR foram as mais abundantes, encontradas na faixa de 249 ng/L a 405 ng/L e 45 ng/L a 120 ng/L, respectivamente. Kolpin et al. (2002) em um amplo estudo sobre a presença de fármacos e outros contaminantes de preocupação emergente em águas superficiais, nos Estados Unidos, relataram a presença de CIP e NOR, nos rios do país. Lindberg et al. (2005) mostraram o resultado de uma triagem de doze antibióticos em cinco ETE na Suécia, realizado nos anos de 2002 e 2003, os analitos foram extraídos do afluente, do efluente final e do lodo da estação de tratamento; dos cinco antibióticos mais frequentemente detectados nessas matrizes, três eram fluoroquinolonas: NOR, CIP e OFL. No continente asiático, Nie et al. (2012) encontraram NOR em amostras de água salgada em regiões próximas a criadores de peixes. No Brasil, Locatelli (2011) relatou a presença de dois representantes dessa classe (CIP e NOR) em águas superficiais no estado de São Paulo.

A Tabela 2 traz o registro de estudos, em vários países, que confirmaram a presença de FQ nos mais diferentes compartimentos hídricos.

Tabela 2: Registro de fluoroquinolonas encontradas, em diferentes países, no ambiente hídrico.

Fármaco	Concentração (ng/L)	Amostra	País	Referência
	20 – 30	Água Superficial	Estados Unidos	KOLPIN et al., 2002
	62 -568	Efluente Sanitário bruto e tratado	Suíça	GOLET; ALDER; GIGER, 2002
	7 - 300	Efluente Sanitário bruto e tratado	Suécia	LINDBERG et al., 2005
	20 – 310	Efluente Sanitário bruto e tratado	Estados Unidos	KARTHIKEYAN; MEYER, 2006
	600 – 15000	Efluente Hospitalar, Sanitário bruto e tratado e Água Superficial	Austrália	WATKINSON et al., 2009
Ciprofloxacino	13625 - 160	Efluente sanitário bruto e tratado	Espanha	ROSAL et al., 2010
	<5,2 – 164	Água Superficial	Espanha	RODRÍGUEZ-GIL et al., 2010
	<6 – 224	Água Superficial	Espanha	VALCÁRCEL et al., 2011
	<0,6 – 2	Água Superficial	Brasil	LOCATELLI, 2011
	18	Água Superficial	Argentina	WUNDERLIN et al., 2014
	<5 - 207	Água Superficial e Efluente de Estação de Tratamento de Água	China	XU et al., 2015

Fármaco	Concentração (ng/L)	Amostra	País	Referência
	120	Água Superficial	Estados Unidos	KOLPIN et al., 2002
	36 – 553	Efluente Sanitário bruto e tratado	Suíça	GOLET; ALDER; GIGER, 2002
	7 - 174	Efluente Sanitário bruto e tratado	Suécia	LINDBERG et al., 2005
	250 – 330	Efluente Sanitário bruto e tratado	Estados Unidos	KARTHIKEYAN; MEYER, 2006
	<10 - 60	Água Superficial	França	TAMTAM et al., 2008
Norfloxacino	25 – 1150	Efluente Hospitalar, Sanitário bruto e tratado e Água Superficial	Austrália	WATKINSON et al., 2009
	<7,6 – 37	Água Superficial	Espanha	RODRÍGUEZ-GIL et al., 2010
	<0,6 – 4	Água Superficial	Brasil	LOCATELLI, 2011
	4,14 – 6,62	Água do mar	China	NIE et al., 2012
	<5 - 65	Água Superficial e Efluente de Estação de Tratamento de Água	China	XU et al., 2015
Enrofloxacino	250 – 270	Efluente Sanitário bruto e tratado	Estados Unidos	KARTHIKEYAN; MEYER, 2006

Fármaco	Concentração (ng/L)	Amostra	País	Referência
Enrofloxacino	2 – 300	Efluente Hospitalar, Sanitário bruto e tratado e Água Superficial	Austrália	WATKINSON et al., 2009
	<5 - 248	Água Superficial e Efluente de Estação de Tratamento de Água	China	XU et al., 2015
Ofloxacino	7 – 287	Efluente Sanitário bruto e tratado	Suécia	LINDBERG et al., 2005
	49 – 388	Água Superficial	Espanha	RODRÍGUEZ-GIL et al., 2010
	<3 – 552	Água Superficial	Espanha	VALCÁRCEL et al., 2011
	<5 – 204	Água Superficial e Efluente de Estação de Tratamento de Água	China	XU et al., 2015

3.7 REMOÇÃO DE ANTIBIÓTICOS POR ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE EFLUENTE

3.7.1 Capacidade de remoção de antibióticos do meio aquoso por processos convencionais de tratamento de efluentes

Devido aos custos envolvidos e à eficiência na remoção da matéria orgânica, os processos mais comuns de tratamento de efluentes sanitários e industriais são os processos biológicos (TEIXEIRA, 2014). Contudo, na grande maioria dos casos, esses processos não se mostram eficientes na degradação de microcontaminantes (MELO et al., 2009).

No que diz respeito aos antibióticos, sua presença nos afluentes pode representar toxicidade para os microrganismos envolvidos, que não conseguem, nas condições apresentadas na maioria das ETE, degradar moléculas dessa classe de fármacos. De fato, a presença de antibióticos em afluentes de ETE pode prejudicar os processos de tratamento que utilizam bactérias, diminuindo a eficiência do sistema e até aumentando a toxicidade do efluente (HALLING-SORENSEN et al., 1998).

Golet; Alder; Giger (2002) afirmam que as ETE são importantes fontes pontuais de contaminação de águas superficiais por antibióticos e diversos trabalhos que apresentam o balanço das concentrações de fármacos na entrada e na saída de plantas de tratamento de água e efluentes sanitários e industriais corroboram essa afirmação. Em uma revisão, Deblonde; Cossu-Leguille; Hartemann (2011) identificaram e compilaram dados sobre as concentrações de contaminantes de preocupação emergente em afluentes e efluentes de ETE descritos na literatura entre os anos de 1997 e 2010. Com os dados compilados, puderam inferir a capacidade média de remoção de cada um dos compostos investigados nas ETE. Para os antibióticos (13 no total), a média da capacidade de remoção descrita na literatura é de apenas 50%. Para o NOR a média de remoção apresentada foi de 54%.

Li et al. (2013) avaliaram 45 ETE em 23 cidades da China. Os resultados apresentaram contaminação por antibióticos nos efluentes de todas as estações avaliadas e apontaram que o tratamento biológico não se mostrava efetivo na degradação desses fármacos. Entre todos os antibióticos estudados, a classe das FQ foi a mais detectada (encontrada em todas as amostras), sendo as maiores concentrações exibidas na fração sólida (lodos) das ETE.

Jin; Peldszus (2012) apresentaram um trabalho sobre a capacidade de remoção de vários fármacos por tratamento convencional, processos oxidativos avançados e separação por membranas. Os resultados apontaram que os processos convencionais de tratamento de esgoto são menos eficientes na degradação de fármacos do que os processos avançados.

3.7.2 Capacidade de remoção de antibióticos do meio aquoso por processos oxidativos

Novas tecnologias para tratamentos de água e efluentes vem sendo empregadas na tentativa de degradar poluentes orgânicos recalcitrantes aos tratamentos biológicos convencionais. Estas tecnologias consistem principalmente na transferência de fase e na oxidação química (ZIOILLI; JARDIM, 1998; JARDIM; CANELA, 2004).

Nos processos de transferência de fase o poluente é transferido de um meio para outro, como por exemplo, na adsorção em carvão ativo e na filtração por membrana, o aprofundamento de tais processos, no entanto, não faz parte do escopo dessa revisão. Já a oxidação química do poluente tem como objetivo a mineralização do mesmo em dióxido de carbono, água e material inorgânico. Contudo, a mineralização dos poluentes nem sempre é factível, na maioria das vezes a oxidação se dá de modo incompleto, não havendo controle sobre os subprodutos formados (JARDIM; CANELA, 2004).

Diversos oxidantes químicos podem ser utilizados no tratamento de águas e efluentes, os mais comuns são: cloro (Cl_2), hipoclorito (OCl^-), dióxido de cloro (ClO_2), ozônio (O_3), permanganato (MnO_4^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ferratos (FeO_4^{2-}) (GUIMARÃES; NOUR, 2001).

Quando um composto é colocado em contato com um oxidante, uma ampla gama de subprodutos ou intermediários podem ser produzidos, dependendo do tipo de oxidante escolhido. Outra variável a ser considerada é a complexidade do efluente, é muito raro que o contaminante de interesse seja o único composto orgânico presente na matriz ambiental. Assim, a interação do oxidante com os demais compostos orgânicos e a relação estequiométrica entre oxidante e matéria orgânica tem de ser levadas em conta. O sucesso da oxidação química depende do objetivo final do tratamento - eliminação de uma espécie química em particular, redução da carga orgânica total, remoção de cor, redução de toxicidade, entre outros. É uma operação que precisa ser cautelosamente estudada,

principalmente se utilizada antes ou no lugar do tratamento biológico, pois um residual de oxidante poderá levar à formação de subproduto após o tratamento, além de ser economicamente muito desaconselhável. Por esse motivo, a maioria das ETE opta por não utilizar a oxidação química branda em seus processos, sendo utilizada apenas nos processos de polimento ou quando há necessidade de desinfecção do efluente (JARDIM; CANELA, 2004).

Uma categoria mais recente de processos oxidativos são os processos oxidativos avançados (POA), que consistem em métodos de oxidação nos quais há a geração de espécies altamente oxidantes, como o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), capazes de promover a degradação parcial ou total da matéria orgânica. Esses radicais podem ser formados a partir de técnicas diversas. Os POA são classificados em sistemas homogêneos ou heterogêneos, conforme a ausência ou a presença de catalisadores na forma sólida, além de poderem estar ou não sob irradiação (TEIXEIRA; JARDIM, 2004; TEIXEIRA, 2014). Na literatura podemos encontrar diversas configurações de POA, a Tabela 3 apresenta os mais comumente utilizados.

Tabela 3: Processos oxidativos avançados mais aplicados para degradação de moléculas orgânicas.

Nome do Processo	Condições do processo
Ozonização	O_3
	O_3/UV
	$\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$
	$\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$
Fotólise de H_2O_2	$\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$
Reagente de Fenton	$\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$
Foto-Fenton	Fe^{2+} ou $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$
Fotocatálise	TiO_2/UV
	$\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$

Fonte: GAMA, (2012) - adaptado.

Os POA possuem a capacidade de eliminar ou reduzir substâncias de elevada estabilidade (refratárias) e baixo grau de mineralização presentes na água (FREITAS, 2014). Por isso se mostram importantes para o tratamento de efluentes contaminados por

antibióticos, pois podem alcançar expressivas porcentagens de remoção desses contaminantes (TEIXEIRA, 2014).

Diante do potencial apresentado, a capacidade de degradação e de mineralização de fármacos por POA tem sido amplamente estudada nos últimos anos. Klammerth et al. (2010) estudaram a capacidade de degradação de 15 fármacos, em amostras sintéticas e efluentes sanitários fortificados, por processos de Fenton e foto-Fenton. Dentre os medicamentos estudados, as duas quinolonas abordadas no estudo, ofloxacino (OFL) e flumequina (FLU), foram as que apresentaram melhor remoção por processo Fenton. Aproximadamente 70% para o OFL e 50% para a FLU. Na etapa envolvendo radiação solar (Foto-Fenton), em aproximadamente uma hora de exposição, a FLU e o OFL alcançaram concentrações abaixo do limite de quantificação.

Pulgarín et al. (2012) avaliaram a remoção de 32 contaminantes (entre eles CIP, NOR e OFL) de efluente sanitário, por radiação UV e foto-Fenton. Quando submetidos à radiação UV foram observados percentuais de remoção de 36%, 48%, e 65% para NOR, CIP, e OFL, respectivamente. Quando o mesmo efluente foi submetido ao tratamento por radiação UV acrescida de peróxido de hidrogênio, a remoção das quinolonas foi de 100%, levando em consideração o limite de quantificação de 15 ng/L.

Contudo, devido à complexidade dos efluentes sanitários e industriais, às baixas concentrações dessas substâncias no ambiente hídrico e aos limites de detecção das técnicas envolvidas, a maioria dos trabalhos que testaram a remoção de fármacos de amostras aquosas por processos oxidativos, sejam eles avançados ou não, focaram no potencial de remoção desses contaminantes, mas negligenciaram quais seriam os subprodutos formados durante os processos de degradação (TEIXEIRA, 2014). Devido à baixa concentração, os métodos espectrométricos foram desenvolvidos, na maioria dos casos, para medir e identificar apenas o composto alvo, o que melhora o limite de detecção. No entanto, essa melhora tem um preço: apenas as eficiências de remoção podem ser reportadas, não sendo realizada a determinação do produto final dessas reações e, conseqüentemente, do potencial de toxicidade dos compostos formados, uma vez que somente os íons precursores são monitorados (GLASSMEYER & SHOEMAKER, 2005). Na tentativa de suprir essa lacuna, alguns trabalhos mais recentes vem desenvolvendo estudos mais específicos sobre a formação de subprodutos da oxidação de determinados antibióticos que serão discutidos em tópico mais adiante neste texto.

3.8 DESINFECÇÃO

A desinfecção é geralmente a última etapa do tratamento tanto de águas residuárias quanto de água para consumo humano. Em síntese, é um processo que se dá por agentes químicos ou físicos e objetiva a inativação de microrganismos patogênicos (LIBÂNIO, 2010).

No que tange ao tratamento de águas residuárias, a decisão sobre a implantação da desinfecção não é simples e tem de levar em conta os custos envolvidos, a eficácia do tratamento, a possível geração de produtos tóxicos, o uso do corpo receptor, entre outros fatores, e nem sempre se faz necessária ou viável. A desinfecção de esgotos sanitários visa inativar seletivamente espécies de organismos que ameaçam a saúde humana, em consonância com os padrões de qualidade estabelecidos para as diferentes situações. (VON SPERLING, 2014). A utilização de agentes químicos para a desinfecção desses efluentes ainda que possível, não é comum, devido à alta dosagem de oxidante necessária, o que além de encarecer o processo aumenta as chances da geração de subprodutos tóxicos ao meio ambiente. Assim, quando necessário, outros processos são mais comumente utilizados, como lagoas de maturação, infiltração no solo, radiação UV e membranas.

Já no tratamento de água para consumo humano a desinfecção apresenta-se como etapa obrigatória a fim de garantir o controle da qualidade microbiológica e, conseqüentemente, combater doenças de veiculação hídrica. Os agentes químicos utilizados são os mais diversos, figuram entre eles: cloro gasoso (Cl_2), compostos de cloro (NaClO , $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, ClO_2 , etc.), ozônio (O_3), permanganato de potássio (KMnO_4), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido peracético ($\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$), íons ferrato (FeO_4^{2-}) e outros agentes como sais de prata e cobre, detergentes e álcoois (SINCERO & SINCERO, 2003).

Historicamente, o cloro e seus compostos são os agentes químicos mais difundidos no tratamento de águas de abastecimento em todo o Planeta. Isto ocorre devido ao amplo espectro de ação germicida; da capacidade de formação de compostos que permanecem na água, proporcionando residual desinfetante; da capacidade de prevenção do crescimento de algas; remoção de ferro e manganês; remoção de cor e controle do desenvolvimento de biofilmes nas tubulações (LIBÂNIO, 2010). A cloração pode oxidar compostos químicos através de dois mecanismos gerais: (i) reações de substituição ou adição de cloro, alterando

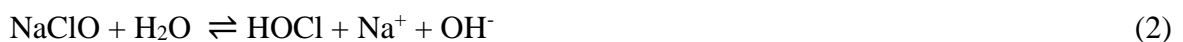
grupos funcionais ativos ou (ii) quebra da molécula pela oxidação com radicais hidroxila ou de cloro ativo (LE-MINH et al., 2010).

No Brasil, a Portaria 2914 de 2011, que versa sobre o padrão de potabilidade de água para consumo humano, em seus artigos 34 e 35 preconiza como obrigatória a manutenção de no mínimo, 0,2 mg/L de cloro residual livre ou 2,0 mg/L de cloro residual combinado ou 0,2 mg/L de dióxido de cloro em toda a extensão do sistema de distribuição. No caso do uso de ozônio ou radiação UV como desinfetante, o cloro ou o dióxido de cloro deverá ser adicionado a fim de se manter o residual mínimo no sistema de distribuição.

3.8.1 Compostos de cloro livre

O gás cloro (Cl_2) é o agente empregado na quase totalidade dos sistemas de grande e médio porte do país. Os hipocloritos de cálcio ($\text{Ca}(\text{ClO}_2)$), e de sódio (NaClO), são mais utilizados em sistemas de pequeno porte, piscinas, embarcações e hotéis. O hipoclorito de cálcio é disponibilizado na forma sólida, geralmente com teor de cloro ativo da ordem de 65%. O hipoclorito de sódio é disponibilizado na forma líquida, com teor de cloro ativo próximo a 12% e, apesar de ser comercializado na forma líquida, o que encarece os custos de transporte e armazenamento, o hipoclorito de sódio ainda é mais utilizado do que o hipoclorito de cálcio (LIBÂNIO, 2010).

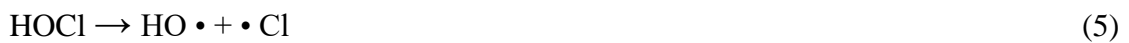
A dissociação dos compostos de cloro em água leva a formação do ácido hipocloroso (HOCl), como mostrado nas equações 1, 2 e 3. Na sequência, o ácido hipocloroso dissocia-se em íons hipoclorito (OCl^-) e hidrogênio, como evidenciado na Equação 4.



A dissociação apresentada na equação 4 é fortemente dependente do pH do meio. Em pH entre 6,5 e 8,5 ela se dá de forma incompleta e as duas espécies HOCl e OCl^- estão presentes em pequena concentração (WHITE, 1992 *apud* DANIEL, 2001). Em pH abaixo de

6,5 não ocorre a dissociação de HOCl e em pH acima de 8,5 todo o ácido se dissocia no íon OCl⁻. O efeito germicida do ácido hipocloroso é maior do que o do íon hipoclorito e, por causa disso, a etapa de desinfecção geralmente é realizada em pH mais baixo. O cloro existente na água sob as formas de ácido hipocloroso (HOCl) e de íon hipoclorito (OCl⁻) é definido como cloro residual livre (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2011).

Na presença radiação UV, o ácido hipocloroso, pode absorver um fóton o que leva à formação de espécies radicais (HO• e Cl•) altamente reativos (LINDEN; WATTS, 2007). A clivagem homolítica da ligação O-Cl é mostrada na Equação 5.



A formação de espécies radicalares pela exposição de soluções aquosas contendo compostos de cloro à radiação UV pode aumentar a velocidade de reações de oxidação e até permitir a oxidação de compostos recalcitrantes, contudo, por se tratar de espécies altamente reativas, não pode-se prever ao certo quais serão os produtos formados (STEVANI, 2004).

O uso indiscriminado de compostos de cloro como desinfetante traz preocupações quanto à geração de subprodutos, principalmente trihalometanos (THM), e ao desenvolvimento de resistência de alguns patógenos à ação desse desinfetante. Como alternativa, diversos sistemas, especialmente na América do Norte e Europa, utilizam o cloro associado a outro desinfetante, reduzindo a dosagem do gás que passa a assumir apenas a função de conferir o residual, minimizando a formação de subprodutos e assegurando a qualidade microbiológica da água tratada. No Brasil, os desinfetantes alternativos têm aplicação praticamente incipiente no que tange às águas de consumo, tendo sua aplicação restrita às águas destinadas à distintas atividades industriais (LIBÂNIO, 2010).

3.8.2 *Compostos de cloro combinado*

O dióxido de cloro e as cloraminas apresentam-se como compostos de cloro alternativos, utilizados junto a outros desinfetantes, com o intuito de conferir cloro residual e minimizar a formação de subprodutos.

O dióxido de cloro (ClO₂) é um composto neutro, em que o cloro está no estado de oxidação +4. Sua ação desinfetante é, em termos químicos, uma oxidação, não sendo

formadas espécies de cloro livre. É um oxidante seletivo que, através de um mecanismo de transferência de elétrons, reduz-se a clorito (ClO_2^-), como mostrado na Equação 6.



O ClO_2 não atua como agente de cloração. Assim, ao contrário do cloro gasoso, o ClO_2 não reage com a matéria orgânica presente na água, nem com outros diversos compostos orgânicos, diminuindo a formação de subprodutos clorados como os trihalometanos (ALMEIDA, 2008; DANIEL et al., 2001).

As dificuldades no emprego do dióxido de cloro se dão principalmente devido ao custo, que é maior quando comparado ao cloro gasoso ou os hipocloritos; e devido ao maior cuidado necessário no processo de geração do gás, fatores que limitam sua utilização a estações de grande porte.

As cloraminas são substâncias resultantes da reação do cloro com compostos nitrogenados (DANIEL et al., 2001). Seu poder desinfetante (frente a vírus e *Giardia*) é menor quando comparado ao cloro gasoso, mas equivalente ao poder desinfetante dos hipocloritos. As cloraminas são comumente utilizadas em situações nas quais, através da associação com outro desinfetante ou devido ao desempenho das etapas posteriores de tratamento, a qualidade microbiológica da água já está assegurada. Assim, sua adição tem como objetivo conferir o residual na rede de distribuição, minimizando o crescimento biológico e a formação de trihalometanos (LIBÂNIO, 2010).

Nas estações de tratamento de água, geralmente são formadas pela combinação de amônia e ácido hipocloroso e podem dar origem a monocloraminas (NH_2Cl), dicloraminas (NHCl_2) e/ou tricloreto de nitrogênio (NCl_3). As reações são mostradas nas equações 7, 8 e 9.



O cloro presente sob a forma de cloraminas é denominado cloro residual combinado (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2011).

A desinfecção química, desde quando começou a ser aplicada, possibilitou uma diminuição vertiginosa na transmissão de doenças de veiculação hídrica levando a uma melhora na qualidade de vida das populações abastecidas por água desinfetada. Contudo, seja qual for o agente químico empregado, podem ser gerados alguns subprodutos de desinfecção que, apesar de se apresentarem em pequenas concentrações, podem ser danosos aos seres humanos e ao meio ambiente (DANIEL et al., 2001).

A presença de fluoroquinolonas em afluentes de estações de tratamento de esgoto e água é fato incontestável. Sendo assim, essas substâncias serão submetidas a processos de oxidação, seja durante os processos de remoção de carga orgânica, seja na etapa de desinfecção.

Apesar de não ser comumente aplicada quando o objetivo é a oxidação de micropoluentes orgânicos, justamente pela possibilidade de formação de subprodutos tóxicos, a cloração é o processo químico mais utilizado para a desinfecção de águas, não só no País como em diversas partes do mundo, como discutido anteriormente. Assim, as reações entre espécies aquosas de cloro e fluoroquinolonas merecem destaque, pois desempenham papel importante no destino ambiental desses fármacos e, por isso, são alvo deste estudo.

3.9 ESTUDOS DE OXIDAÇÃO DO NORFLOXACINO E OUTRAS FLUOROQUINOLONAS

Do ponto de vista aplicado ao tratamento de efluentes, as reações de oxidação/redução são uma tentativa de transformar moléculas ambientalmente indesejáveis e potencialmente tóxicas em outras moléculas menos nocivas e capazes de serem assimiladas nos ciclos da natureza (DANIEL et al., 2001). A oxidação pode se dar de forma completa ou parcial. A oxidação completa de um composto leva a sua mineralização, gerando como produtos dióxido de carbono, água e demais compostos inorgânicos. Contudo, em se tratando da remoção de antibióticos de efluentes, na grande maioria das vezes, o que ocorre é a oxidação parcial ou incompleta, que leva à quebra da molécula precursora em moléculas menores. O problema reside no fato de que tais moléculas menores não são, necessariamente, menos tóxicas do que o composto original. Dodd et al. (2005) afirmam que ao submeter efluentes contendo FQ a processos de desinfecção como cloração, ozonização e radiação UV são gerados diversos subprodutos não mineralizados, que serão então lançados nos corpos receptores, podendo chegar às residências para consumo.

Mesmo a aplicação de POA não consegue atingir altas taxas de mineralização desses fármacos. Para que houvesse a total mineralização dos microcontaminantes seriam necessárias condições drásticas como pH extremos, tempos de retenção hidráulica muito longos, vazões muito baixas, etc., o que inviabilizaria o tratamento, logística e economicamente. Em condições usuais em que são aplicados em estações de tratamento de água e esgotos os processos oxidativos demonstram alcançar taxas significativas de remoção de fármacos, mas as taxas de mineralização não são satisfatórias.

Dados sobre a formação de subprodutos da oxidação de fluoroquinolonas por compostos de cloro, livre ou associado, ainda são escassos na literatura, mas existem diversos estudos que realizam a investigação dos subprodutos formados por processo oxidativos diversos como fotólise, fotocátalise e ozonização. Como de forma geral, o que ocorre são reações de oxidação, os subprodutos formados pelos diferentes processos apresentam muita semelhança. A Tabela 4 traz alguns estudos que realizaram esta investigação.

Tabela 4: Estudos envolvendo a investigação dos subprodutos de oxidação de fluoroquinolonas para diferentes tratamentos oxidativos empregados.

Antibióticos (concentração)	Método oxidativo empregado	Eficiência de mineralização (%)	Análise de subprodutos	Teste de toxicidade	Referência
Ciprofloxacino (100 mg/L)	Cloração com espécies de cloro livre (NaClO)	Não	5 subprodutos	Não	DODD et al., 2005
Enrofloxacino (100 mg/L)	Cloração com espécies de cloro livre (NaClO)	Não	3 subprodutos		
Ciprofloxacino (67 mg/L)	Oxidação com MnO ₂	Não	6 subprodutos	Não	ZHANG; HUANG, 2005
Norfloxacino (64 mg/L)	Oxidação com MnO ₂	Não	6 subprodutos		
Norfloxacino (80 mg/L)	Cloração com ClO ₂	Não	6 subprodutos	Não	WANG; HE; HUANG, 2010
Ciprofloxacino (80mg/L)	Cloração com ClO ₂	Não	6 subprodutos		
Ciprofloxacino (33mg/L)	UVA, Vis-TiO ₂ e UVA-TiO ₂	Não	7 subprodutos	Sim: inibe o crescimento de <i>Escherichia coli</i>	PAUL; DODD; STRATHMANN, 2010
Levofloxacino (1000 mg/L)	Cloração com compostos de cloro livre (NaClO)	Não	4 subprodutos (2 não identificados)	Sim: Ensaio de bioluminescência - <i>Vibrio fischeri</i> : subprodutos mais tóxicos	DEBORDE et al., 2013

Antibióticos (concentração)	Método oxidativo empregado	Eficiência de mineralização (%)	Análise de subprodutos	Teste de toxicidade	Referência
Ciprofloxacino (10 mg/L)	Ozonização	Não	19 subprodutos		
Norfloxacino (10 mg/L)	Ozonização	Não	19 subprodutos	Não	JIANG et al., 2012
Lomefloxacino (10 mg/L)	Ozonização	Não	27 subprodutos		
Ciprofloxacino (10 mg/L)	Simulador de luz solar	Não	5 subprodutos		
Norfloxacino (10 mg/L)	Simulador de luz solar	Não	8 subprodutos	Não	BABIĆ; PERIŠA; ŠKORIĆ, 2013
Enrofloxacin (10 mg/L)	Simulador de luz solar	Não	7 subprodutos		
Ciprofloxacino (33 g/L)	Simulador de luz solar	Não	4 subprodutos	Sim: residual de atividade antibacteriana contra diferentes cepas de <i>E. coli</i> .	STURINI et al., 2015
Enrofloxacin (36 g/L)	Simulador de luz solar	Não	2 subprodutos		
Enrofloxacin 90 mg/L)	Oxidação com permanganato de potássio (Mn (VII))	Não	9 subprodutos	Sim: diminuição da atividade antibacteriana contra cepas de <i>E. coli</i>	XU et al., 2016

Estudos experimentais da oxidação de FQ demonstraram que, na maioria dos processos ocorre uma modificação na porção piperazina da molécula. Von Gunten; Dodd; Buffle (2006), em um estudo sobre a ozonização de fármacos, entre eles duas FQ de segunda geração (CIP e ENF) afirmaram que o nitrogênio (N4) da porção piperazina das moléculas é o principal alvo de oxidação pelo O₃, contudo, os autores não demonstraram quais seriam os subprodutos formados. Wang; He; Huang (2010) investigaram os mecanismos e os subprodutos de reação entre algumas FQ e o dióxido de cloro e afirmaram que o mesmo N4, do anel piperazina, é o principal alvo para o ClO₂, podendo ocorrer a desalquilação, hidroxilação ou fechamento intramolecular na porção piperazina. Seus dados apontam ainda que as FQ com nitrogênio terciário reagem mais prontamente com ClO₂ do que as FQ com nitrogênio secundário. Sturini et al. (2015) ao estudarem a fotodegradação de algumas FQ por luz-solar em ETE também mostraram que, para o ENF e o CIP, os subprodutos de degradação mais abundantes eram aqueles em que havia ocorrido oxidação e/ou abertura do anel piperazina. Xu *et al.* (2016) mostraram que a oxidação do ENF com Mn(VII) leva formação de subprodutos atacados no mesmo anel.

Alguns trabalhos envolvendo FQ e espécies de cloro livre (HOCl/OCl⁻) também apontam um envolvimento do anel quinolônico. Alguns autores preveem que, na presença de excesso de espécies de cloro livre, pode ocorrer halogenação do anel quinolônico. Dodd et al. (2005) investigaram o comportamento das fluoroquinolonas CIP e ENF frente às espécies de cloro livre HOCl/OCl⁻ e propuseram alguns produtos da cloração aquosa dos mesmos. Para o ENF, uma FQ com nitrogênio terciário no anel piperazina, o principal produto de reação proposto pressupõe que o grupo carboxílico do anel quinolônico é substituído por um átomo de cloro, esta reação seria catalisada pela formação de um intermediário cloramônio altamente reativo. Já para o CIP, que contém uma amina secundária no anel piperazina assim como o NOR, o principal subproduto proposto infere uma fragmentação concertada do anel piperazina. No entanto, reações com excesso de cloro livre resultaram na formação de diversos outros subprodutos, sendo os mais estáveis representados pela halogenação orto, em relação à porção piperazina, do anel quinolônico.

Os dados de Deborde et al. (2013) corroboram os achados de Dodd et al. (2005) para a cloração de uma FQ com amina terciária. Na investigação da cinética de degradação e dos subprodutos da cloração do levofloxacino (LVF), os autores também sugeriram a formação de um intermediário cloramônio, que resulta na halodescarboxilação do anel quinolônico e, na sequência, na abertura do anel piperazina.

3.10 FUNDAMENTOS DOS MÉTODOS ANALÍTICOS ENVOLVIDOS

A análise de fármacos em amostras ambientais exige a utilização de técnicas analíticas sofisticadas já que, na maioria das vezes, esses compostos apresentam-se em baixas concentrações e/ou em misturas complexas. Sendo assim, os métodos para realização de tais análises precisam ser capazes de separar, identificar e quantificar os compostos químicos com alta sensibilidade e especificidade (FATTA-KASSINOS; MERIC; NIKOLAOU, 2011). Para tal, o uso de técnicas hífenadas tem sido amplamente difundido.

O termo técnicas hífenadas refere-se ao acoplamento entre duas ou mais técnicas analíticas com o objetivo de realizar análises mais eficientes e rápidas do que os sistemas convencionais. As técnicas a serem acopladas deverão gerar informações complementares. Exemplo típico é o acoplamento de métodos de separação, como a cromatografia, com técnicas de identificação, como a espectroscopia de massas (RODRIGUES et al., 2006).

3.10.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

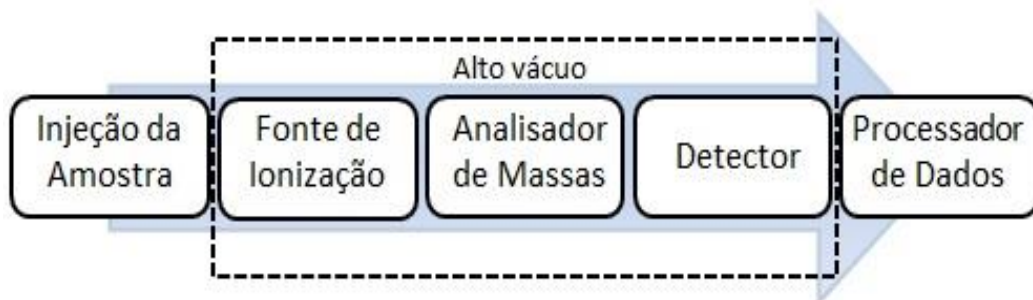
A cromatografia é uma técnica físico-química de separação baseada no equilíbrio dos componentes de interesse entre duas fases imiscíveis: fase estacionária e fase móvel (MATUMOTO & ALCÂNTARA, 2014). A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) é o tipo mais versátil de cromatografia por eluição. Nessa técnica a fase móvel é um solvente líquido e a fase estacionária é composta por partículas finamente divididas. A identificação de um determinado analito, ou separação de uma mistura deles, baseia-se no tempo de retenção, que nada mais é do que à medida, em função do tempo, entre o ponto de injeção da amostra e o pico de um componente que emerge da coluna. O tempo de retenção pode variar com o fluxo da fase móvel, com o comprimento e o diâmetro da coluna. Esta técnica é caracterizada pelo uso de colunas em aço inoxidável com diâmetro interno entre 2 - 5 mm empacotadas com partículas porosas esféricas de tamanhos entre 3 - 10 μm , que formam a fase estacionária. A fase móvel elui continuamente pela coluna, sob pressão elevada e com um fluxo controlado. A utilização de pressões elevadas permite maior eficiência das análises e o uso de colunas com micropartículas permite maior eficiência na separação dos compostos. Um sistema de HPLC geralmente é acoplado a um computador que traduz, sob a forma de um gráfico (cromatograma), a leitura dos analitos que foram identificados (SKOOG, 2006).

A cromatografia líquida é uma excelente técnica de separação, no entanto, se a análise qualitativa (confirmação da identidade química) também se fizer necessária, é interessante que esta técnica seja acoplada a um método de identificação. Entre as várias opções existentes, uma das que melhor fornece informações estruturais é a espectrometria de massas (LANÇAS, 2009). O acoplamento dessas técnicas combina as vantagens da cromatografia (alta eficiência de separação) com as da espectrometria de massas (seletividade e obtenção de informação estrutural e massa molar) para tornar o método um dos mais eficientes e extensivamente utilizados em pesquisas recentes com aplicação ambiental (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

3.10.2 Espectrometria de Massas

Em sua forma mais simples, um espectrômetro de massas tem cinco componentes (Figura 6). O primeiro deles é a unidade de introdução da amostra que faz a interseção atmosfera-vácuo (as pressões dentro de um espectrômetro são mais baixas do que a pressão atmosférica, chegando a micrometros de mercúrio em algumas regiões). A unidade de introdução da amostra leva até ao segundo componente, a fonte de ionização, onde as moléculas da amostra são transformadas em íons em fase gasosa. Estes íons são acelerados por um campo magnético e, na sequência, o terceiro componente, um analisador de massas, os separa em razão de sua relação massa/carga (m/z). A seguir, o quarto componente, um detector, quantifica os íons gerados e, por último, o sistema de dados registra e processa os sinais (PAVIA *et al.*, 2015). As massas atômicas são expressas em termos de unidades de massa atômica, ou daltons (Da). O espectro de massas é um gráfico do número de íons produzidos *versus* a razão massa/carga (SKOOG, 2006).

Figura 6: Componentes de um Espectrômetro de Massas.



Através da determinação precisa da razão massa/carga dos analitos, a espectrometria de massas (MS - do inglês *Mass Spectrometry*) é capaz de fornecer informação sobre: (i) a composição elementar de amostras; (ii) a estrutura molecular; (iii) a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas; (iv) a estrutura e a composição de superfícies sólidas e as proporções isotópicas de átomos em amostras (ARDREY, 2003).

Diferentes tipos de cada um dos componentes citados tem sido desenvolvidos e utilizados em análises diversas. Dentre as fontes de ionização mais usadas em sistemas hifenados, destacam-se: ionização por eletronebulização (ESI - *electrospray ionization*), ionização química à pressão atmosférica (APCI - *atmospheric pressure chemical ionization*) e, mais recentemente, a fotoionização à pressão atmosférica (APPI - *atmospheric pressure photoionization*) (ARDREY, 2003; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). Cada uma delas possui um mecanismo específico de ionização que influencia de maneira distinta a produção dos íons. Assim, cada técnica possui suas especialidades e suas limitações (REMANE et al., 2010).

Quanto aos analisadores, os mais utilizados são: quadrupolos (Q), armadilha de íons (*ion trap*- IT), tempo de voo (*time of flight* - TOF), setor elétrico (E) e setor magnético (B), ressonância ciclôtrica de íons com transformada de Fourier (*Fourier-transformation cyclotron resonance* – FT ICR) e configurações híbridas, por exemplo, IT-TOF (HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

3.10.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HPLC-IT- TOF)

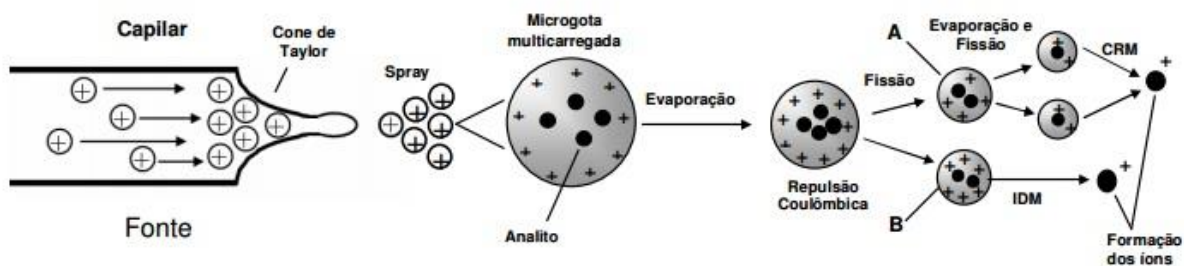
No presente estudo, a determinação dos subprodutos de cloração do norfloxacino foi realizada através de injeção direta em um espectrômetro de massas híbrido contendo analisadores do tipo *ion trap* (IT) e *time off flight* (TOF), em sequência, com fonte de ionização do tipo *electrospray* (ESI).

A ESI é uma das principais técnicas de ionização em pressão atmosférica (API – *atmospheric pressure ionization*) e faz parte das técnicas no conceito de ionização suave, que permite a formação de íons a partir de macromoléculas, superando sua propensão em fragmentar-se quando ionizadas (SOUZA, 2008).

O processo de ionização por ESI ocorre mediante o bombeamento dos analitos, dissolvidos em um solvente volátil, através de um fino capilar de aço inoxidável. Na ponta deste capilar é aplicada uma alta tensão e como consequência deste forte campo elétrico, a amostra que sai pelo capilar forma um aerossol composto por gotículas de solvente e analito altamente carregadas. As gotículas carregadas enfrentam um contrafluxo de um gás de secagem (geralmente nitrogênio), em temperaturas elevadas (150 - 200°C), que auxilia na evaporação do solvente e na formação do aerossol (PAVIA, 2015). A evaporação do solvente diminui o tamanho destas gotas e, conseqüentemente, aumenta a repulsão eletrostática entre as cargas formais de sua superfície. Com isso, a tensão superficial do líquido vai tornando-se cada vez menor até que ocorre o fenômeno de “explosão Coulômbica”, que resulta na formação de gotas menores, com posterior liberação dos íons (ARDREY, 2003; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; LANÇAS, 2009; SOUZA, 2008).

Os detalhes de como efetivamente os íons são transferidos para a fase gasosa ainda são motivos de muita controvérsia. Dois mecanismos são propostos: o modelo de carga residual e o modelo de dessorção de íons. De acordo com o modelo de carga residual (CRM), as gotículas continuam a sofrer evaporação e fissão num processo contínuo até que ocorra a total dessolvatação das moléculas e, assim, a transferência das cargas que estavam contidas no solvente para o analito, levando a formação de um íon isolado. Já o modelo de dessorção de íons (IDM) considera que com a evaporação, as gotículas de solvente alcançam um determinado raio no qual a densidade elétrica na sua superfície é grande o suficiente para expulsar os íons dos analitos diretamente para fora da gotícula, neste momento ocorreria a transferência de carga entre o solvente e o analito (YAMASHITA; FENN, 1984; HOFFMANN; STROOBANT, 2007; SOUZA, 2008) A Figura 7, ilustra os mecanismos propostos.

Figura 7: Modelo de ionização por *electrospray*: (A) modelo do resíduo carregado, e (B) modelo de dessorção de íons.



Fonte: SOUZA (2008)

A maioria dos íons gerados na ESI são moléculas protonadas ($[M+Hn]^{n+}$) ou desprotonadas ($[M-Hn]^{n-}$), mas também é possível a formação de moléculas cationizadas ($[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$) ou anionizadas ($[M+Cl]^-$). Também é comum a formação de íons multicarregados ($z > 1$) em moléculas com alto peso. Nestes casos, como o espectrômetro reconhece a relação massa/carga (m/z), o resultado aparecerá com a massa do analito dividida pelo número de cargas presentes na molécula. Entretanto é possível estimar a presença de múltiplas cargas através da relação isotópica da amostra, ou seja, pela presença natural de isótopos de ^{13}C ou 2H , entre outros. Deve-se destacar ainda que substâncias que apresentam grupamentos básicos, principalmente aminas, amidas e ésteres, normalmente são analisadas no modo positivo, dada a relativa facilidade com que as mesmas são protonadas. Por outro lado, substâncias contendo funções ácidas, tais como ácidos carboxílicos e fenóis, são analisadas no modo negativo por serem facilmente desprotonadas (CROTTI et al., 2006).

As vantagens da utilização da ESI são: (i) a ionização ocorre em fase líquida, permitindo que compostos iônicos e termicamente instáveis possam ser analisados e (ii) a capacidade de produzir íons de múltiplas cargas, viabilizando portanto, o estudo de moléculas com elevada massa molar (PAIVA, 2016).

Já as desvantagens da técnica são: (i) sua suscetibilidade a efeitos causados por interferentes na matriz de análise; (ii) não aplicabilidade para compostos apolares ou de baixa polaridade e (iii) sua ionização branda que produz espécies moleculares intactas dificultando a sua informação estrutural (ARDREY, 2003).

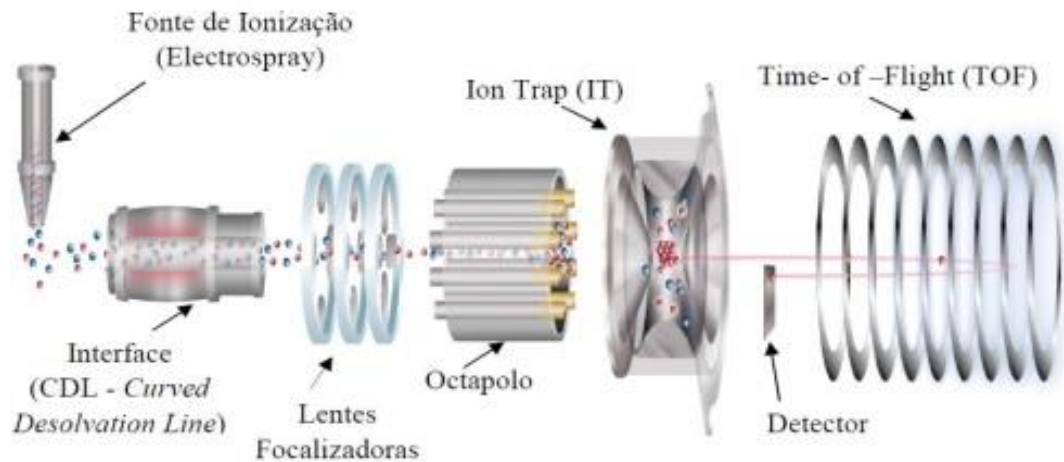
A configuração híbrida dos analisadores IT-TOF possibilita obter alta exatidão de massa e alta resolução, nela o analisador do tipo IT é usado para acumular íons e selecioná-los, além de realizar fragmentações antes de passar para o TOF. O analisador do tipo TOF é utilizado para a análise de massas (FREITAS, 2014).

O IT é composto por dois eletrodos hiperbólicos terminais conectados e um eletrodo em forma de anel. Ao aplicar uma corrente alternada e um potencial de radiofrequência (RF) nesses eletrodos é possível criar um campo elétrico quadrupolar em 3-D, esse campo mantém os íons aprisionados em uma órbita estável no interior do analisador (PAVIA, 2015). Para ejetá-los em direção ao próximo analisador ou ao detector aplica-se uma rampa crescente de RF, que os desestabiliza de acordo com seus valores de m/z (DASS, 2007).

Os analisadores TOF baseiam-se no princípio de que íons com mesma carga têm energias cinéticas iguais, e sua velocidade será inversamente proporcional à raiz quadrada da sua massa. Logo, se dois íons com mesma carga, mas com massas diferentes, são acelerados através de um campo elétrico com potencial constante, suas velocidades serão dependentes de suas massas, e eles atingirão o detector com “tempos de voo” diferentes (PAVIA, 2015). Assim, o íon com menor m/z (menor massa neste caso) atingirá o detector primeiro, enquanto que o de maior massa levará mais tempo para chegar ao detector (DASS, 2007; HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

Para o funcionamento do TOF é absolutamente necessário que todos os íons formados na fonte, entrem no analisador ao mesmo tempo, para isso, eles devem ser criados em pulsos breves, bem definidos, pois só assim será possível determinar o tempo que cada íon levou para percorrer toda a extensão do analisador. Para aumentar a distância percorrida pelos íons, refletores são posicionados nos analisadores, o que permite aumentar a precisão do equipamento (Figura 8).

Figura 8: Esquema de configuração de um espectrômetro de massas híbrido IT-TOF.



Fonte: Shimadzu, (2015) - adaptado

3.10.3 Carbono Orgânico Total (COT)

O carbono pode se apresentar de três formas na natureza : carbono elementar (C), carbono inorgânico (CI) e carbono orgânico (CO). Em amostras aquosas a quantidade de carbono elementar é insignificante e assim somente o CI e o CO são considerados. O carbono orgânico total (COT) é uma expressão que denomina toda a matéria orgânica presente em uma amostra aquosa. O COT fornece quantitativamente a soma de todos os carbonos ligados organicamente em espécies orgânicas dissolvidas e não dissolvidas (BENEDETTI, 2012).

Em análises ambientais, a diminuição do COT presente na água é um parâmetro que avalia a eficiência de um sistema de tratamento. Seu monitoramento pode revelar se a matéria orgânica foi efetivamente removida, ou seja, mineralizada em CO_2 e H_2O ; ou se a mesma foi apenas fragmentada, transformada em moléculas menores. (BELTRÁN; AGUINACO; GARCÍA-ARAYA, 2010).

Os métodos para determinação do carbono orgânico total são classificados em direto e indireto. No método direto, todo o carbono inorgânico deve ser removido da amostra anteriormente à determinação da fração orgânica por meio de acidificação ou calcinação. No método indireto, o valor de COT é obtido pela diferença entre CT e CI. O CT é medido através da oxidação do carbono presente e o CI é medido na purga do gás do tratamento ácido ou por decomposição após a eliminação do CO_2 (BENEDETTI, 2012).

3.11 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.11.1 Antibiograma

Um antibiograma é um ensaio que mede a susceptibilidade ou resistência de uma bactéria a um ou mais agentes antimicrobianos. A técnica é utilizada tanto para a análise do espectro de sensibilidade de um microrganismo a determinada droga quanto para a determinação de sua concentração mínima inibitória (CMI). A organização mundial da saúde (OMS) e a *United States Food and Drug Administration* (FDA) recomendam a utilização do ágar Müeller Hinton para o teste de susceptibilidade/resistência a antibióticos de bactérias Gram positivas e Gram negativas, aeróbias ou anaeróbias facultativas (MORETTI, 2007).

O antibiograma pode ser realizado por diversas técnicas. Neste estudo, utilizou-se a metodologia de Magaldi que, em 1997, desenvolveu uma modificação da técnica de difusão em ágar por meio de discos, substituindo-os por poços escavados no próprio ágar. Neste novo método as bactérias são inoculadas, por espalhamento, em um meio de cultura sólido colocado em placas de Petri. A seguir, com auxílio de cilindros de 6 a 8 mm de diâmetro, faz-se a escavação de pequenos poços nesse meio de cultura sólido. Então, uma pequena alíquota da solução diluída do agente antimicrobiano a ser testado é colocada dentro desses poços e a partir daí se difunde no meio de cultura.

Assim como na técnica de difusão em ágar por meio de discos, a formação de um halo transparente sobre a superfície do meio, ao redor de um poço escavado contendo solução de antibiótico, é indicativo de uma região com ausência de crescimento bacteriano, revelando a ação inibitória do agente antimicrobiano sobre a bactéria ensaiada. Esta região é chamada de zona de inibição e é medida em milímetros.

Karaman et al. (2003) estipularam um parâmetro avaliativo para a determinação de resistência ou não a um determinado antimicrobiano. Nela a avaliação da suscetibilidade da bactéria à solução inoculada é feita comparando-se o resultado a um padrão biológico de referência (controle positivo). A zona de inibição, também denominada halo de crescimento, é medida partindo-se da circunferência do poço, até a margem onde começa o crescimento bacteriano. De acordo com a dimensão desse halo os microrganismos podem ser classificados como: (i) sensíveis, quando o diâmetro da zona de inibição é maior, ou não mais do que 3 mm menor, que o controle positivo; (ii) moderadamente sensíveis, halo maior que 2 mm, porém

menor que o controle positivo mais de 3 mm; e (iii) resistentes, diâmetro igual ou menor que 2 mm. Como controle positivo, utiliza-se o quimioterápico padrão, e como controle negativo o solvente utilizado para a preparação das soluções.

3.11.2 Teste de Toxicidade aguda com *Artemia salina*

Artemia salina é um microcrustáceo da ordem anostraca (sem carapaça) que vive em lagos de águas salgada de todo o mundo, e tem caráter extremamente eurialino, os organismos desse gênero atuam como elo trófico entre as comunidades planctônicas e as cadeias superiores (PIMENTEL et al., 2011).

É utilizada como alimento vivo para peixes ornamentais e, por causa disso, seus ovos são encontrados com facilidade em lojas de aquaristas. Os ovos não eclodidos são metabolicamente inativos e podem ser conservados por longos períodos de tempo se mantidos desidratados e a baixas temperaturas, acondicionados, preferencialmente, sob vácuo (MILANI; ZIOLLI, 2007). Quando reidratados e em condições ambientais adequadas, os ovos de *Artemia sp* eclodem em cerca de 24 horas.

O baixo custo, a ampla distribuição e a fácil manutenção em condições laboratoriais faz com que *Artemia sp* seja largamente utilizada em testes de toxicidade preliminares. A simplicidade desse teste, que é rápido, requer pequena quantidade de amostra (2 - 20 mg), não requer métodos assépticos, nem equipamentos especiais, favorece sua utilização rotineira em laboratórios.

Os testes de toxicidade aguda tem como objetivo avaliar a sobrevivência dos náuplios do micro crustáceo expostos a um agente ou amostra a ser analisada, durante um determinado período de tempo, geralmente 24 a 48h. A letalidade desses organismos é utilizada para identificação de respostas biológicas, onde as variáveis morte e vida são as únicas envolvidas. A determinação da toxicidade é realizada através do percentual de mortalidade dos crustáceos (FREITAS, 2014; PIMENTEL et al., 2011). Nesse trabalho utilizamos *Artemia salina* para compararmos a toxicidade entre o norfloxacino e seus subprodutos de cloração frente a estes organismos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Para cumprir os objetivos propostos, a metodologia seguiu os seguintes passos: (i) realização dos ensaios de cloração, (ii) determinação da porcentagem de mineralização alcançada durante os ensaios de cloração, (iii) determinação dos subprodutos de desinfecção e (iv) determinação da atividade antimicrobiana e da toxicidade dos subprodutos formados.

Todas as vidrarias foram previamente lavadas com detergente não iônico Extran® na concentração de 12,5% (v/v), sistematicamente enxaguadas com água corrente e a seguir enxaguadas com quantidade suficiente de água ultrapura. Logo após, foram colocadas de molho, por 24h, em solução de ácido nítrico 20% (v/v) e, em seguida, enxaguadas novamente com quantidade suficiente de água ultrapura. As vidrarias não volumétricas foram secas em estufa e as volumétricas secaram-se naturalmente em bancada limpa.

Os fracos nos quais foram realizados os ensaios de cloração, além das etapas de lavagem acima, passaram por lavagem a quente, em solução de ácido nítrico 20% (v/v), durante 2h. Na sequência foram enxaguados com quantidade suficiente de água ultrapura e secos em estufa a 120°C.

As vidrarias utilizadas nos ensaios microbiológicos foram esterilizadas, por vapor úmido, em autoclave, a 120°C por 20min. Todos os materiais foram manuseados utilizando luvas vinílicas.

4.1 ENSAIOS QUÍMICOS

4.1.1 Reagentes, solventes, equipamentos, vidrarias e consumíveis

- Padrões analíticos: Norfloxacino (Grau PA Sigma-Aldrich®, $\geq 98\%$ de pureza), Tiosulfato de Sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) (Grau PA, Alphatec® $\geq 99\%$ de pureza), Solução de hipoclorito de sódio (NaClO) na concentração de 100 g/L cedida pelo SEMAE de Ouro Preto;
- Reagentes (grau HPLC): Acetonitrila (J. T. Backer®), ácido fórmico (J. T. Backer®), água ultrapura (MiliQ®);
- Balança analítica Shimadzu®, modelo AUY220;
- Banho de ultrassom digital (MaxiClean 1600);

- Agitador magnético SPLabor®;
- Micropipetas de volumes variados (5000 µL, 1000 µL, 200 µL e 20 µL);
- Béqueres, balões volumétricos, erlenmeyers;
- Frascos de vidro âmbar de 20 mL com tampa e batoque em teflon;
- Vials, tampas e septos de politetrafluoretileno (PTFE) e silicone para auto injetor.
- Analisador de carbono orgânico total (*Total Organic Carbon Analyzer* - TOC-L) (Shimadzu®);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução (*High-Performance Liquid Chromatograph Mass Spectrometer* – LCMS-IT-TOF -Shimadzu®);
- Software ‘LCMSsolution’.

4.1.2 Preparo das soluções padrão

Para o preparo da solução padrão de norfloxacino na concentração de 100 mg/L pesou-se 0,05 g do fármaco em balança analítica. A seguir, essa quantidade foi transferida para um balão volumétrico de 500 mL e adicionou-se água ultrapura até este volume. O balão foi coberto com papel alumínio, para evitar uma possível oxidação do fármaco pela luz, e levado ao ultrassom por 1h, até que todo o medicamento fosse solubilizado.

A solução padrão de hipoclorito de sódio, na concentração de 100 mg/L foi preparada pipetando 500 µL da solução estoque de NaClO (100 g/L) para um balão volumétrico de 500 mL, o qual foi então completado com água ultrapura.

O preparo da solução padrão de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), também na concentração de 100 mg/L, foi feito pesando-se 0,05 g de tiosulfato em balança analítica, essa quantidade foi transferida para um balão volumétrico de 500 mL que foi então completado com água ultrapura e agitado, manualmente, até que a análise visual indicasse completa dissolução do sólido.

Todas as soluções foram preparadas no mesmo dia dos ensaios de cloração e mantidas em temperatura ambiente, durante os mesmos.

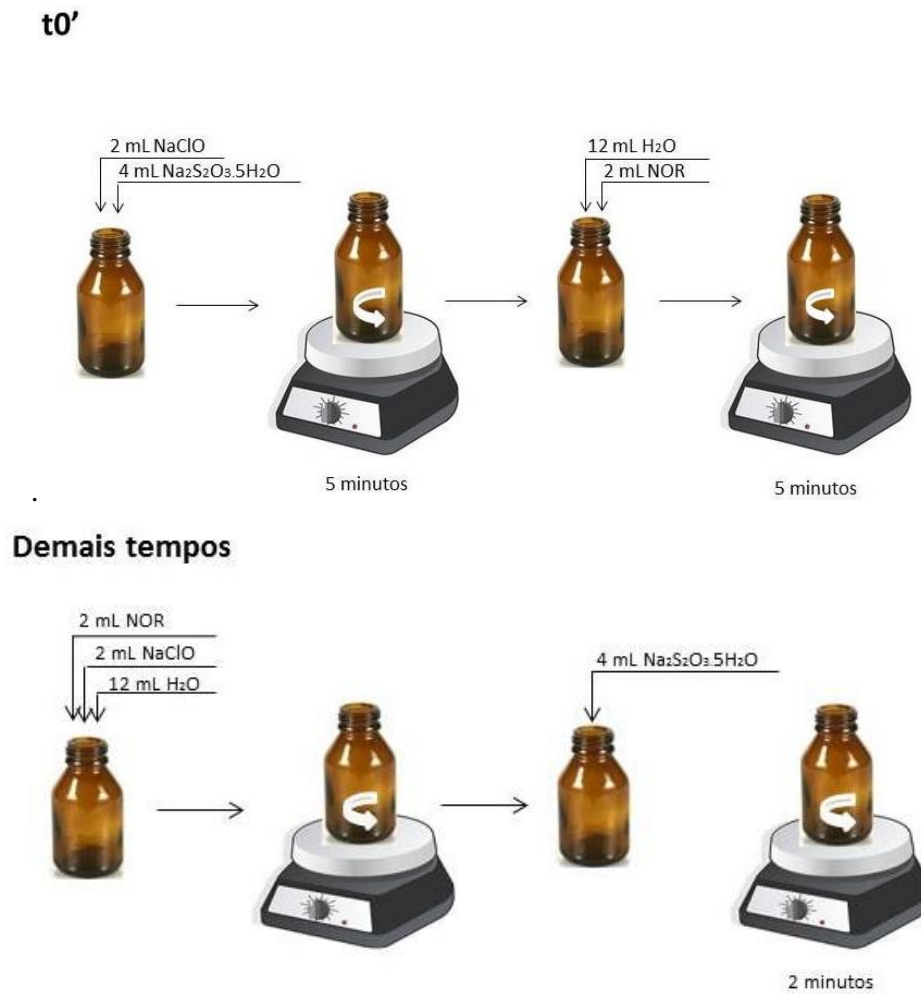
4.1.3 Ensaio de Cloração

Os ensaios de cloração foram realizados, em triplicata, para os tempos: zero minutos (t_0'), cinco minutos (t_5'), quinze minutos (t_{15}'), trinta minutos (t_{30}'), sessenta minutos (t_{60}'), duas horas (t_{2h}), quatro horas (t_{4h}), oito horas (t_{8h}), doze horas (t_{12h}) e vinte e quatro horas (t_{24h}).

A concentração inicial, tanto do fármaco quanto do composto de cloro, foi de 10 mg/L que, embora sejam superiores às aquelas normalmente encontradas no ambiente e às aquelas aplicadas nas estações de tratamento de água para o cloro, foram escolhidas a fim de facilitar a identificação de possíveis subprodutos formados. O $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ foi adicionado em excesso, 20 mg/L, para garantir que não houvesse cloro residual livre em solução após os tempos de reação pré-determinados.

Para tal, pipetou-se para frasco de vidro âmbar, 2 mL da solução padrão de NOR + 2 mL da solução padrão de NaClO + 12 mL de água ultrapura. Os frascos foram mantidos sob agitação durante o período de tempo correspondente a cada análise e, após esse tempo, adicionou-se 4 mL da solução padrão de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ para neutralização do cloro residual. Para o tempo inicial t_0' , 2 mL da solução padrão de NaClO e 4 mL da solução padrão de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ foram adicionados previamente em frasco âmbar, mantidos em reação durante 5 min e só após, adicionou-se 12 mL de água destilada e 2 mL da solução padrão de NOR. Um esquema é mostrado na Figura 9. Após a cloração, todas as amostras foram mantidas em geladeira (aproximadamente 8 °C) e protegidas da luz até o momento das análises. O pH das soluções foi monitorado antes e após os ensaios.

Figura 9: Esquema do procedimento para os ensaios de cloração



Fonte: A autora.

4.1.4 Análise de Carbono Orgânico Total

Para a análise de COT, as concentrações iniciais de NOR foram de 10 mg/L e de NaClO foram de 50 mg/L a fim de garantir que a concentração do agente oxidante não fosse fator limitante para a completa mineralização do fármaco. Os ensaios prosseguiram da mesma forma relatada acima.

As análises de carbono orgânico total foram realizadas pela injeção direta das amostras, sem nenhuma diluição, no instrumento *Total Organic Carbon Analyzer* (TOC-L) da Shimadzu®, pertencente ao Laboratório de Química Tecnológica e Ambiental do Departamento de Química da Universidade Federal de Ouro Preto. O princípio de

funcionamento baseia-se na oxidação do carbono a alta temperatura (1000 °C). O programa utilizado fornece os valores de carbono total e carbono inorgânico. O valor de carbono orgânico total é obtido pela diferença entre carbono total e carbono inorgânico.

4.1.5 Detecção no espectrômetro de massas

Todas as análises foram feitas através de injeção direta no espectrômetro de massas de alta resolução. As amostras foram introduzidas diretamente na fonte ESI através do amostrador automático (SIL-30AC) do aparelho, utilizando-se fluxo de gás de nebulização (N₂) constante a 1,5 L/min e temperatura do CDL (*curved desolvation line*) igual a 150 °C.

Foram injetados um volume total de 5 µL de amostra, em um fluxo binário de fase móvel (50% H₂O + 0,1% de ácido fórmico e 50% acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico) de 0,2 mL/min. O tempo de acumulação de íons no octapolo foi definido como 50 ms. A faixa de razão massa/carga (*m/z*) analisada foi de 50 a 450 *m/z*. Os dados obtidos foram avaliados no software 'LCMSsolution'.

4.2 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

4.2.1 Antibiograma

4.2.1.1 Reagentes, solventes, equipamentos, vidrarias e consumíveis

- Reagentes: Ágar Müeller Hinton (Prodimol Biotecnologia®); água destilada estéril; solução alcóolica a 70% (v/v);
- *Escherichia coli* – cepa: ATCC25922 – coleção particular;
- Béqueres, erlenmeyers, tubos de ensaio, alça de Drigalski, swabs, bico de Bunsen;
- Placas de Petri (120 x 20 mm),
- Cilindro de vidro acoplado à bomba de sucção;
- Autoclave;
- Estufa.

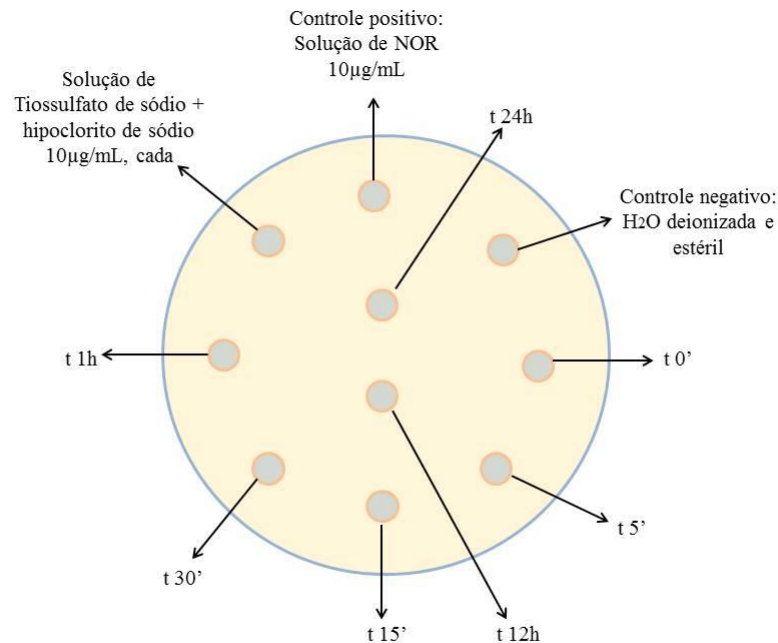
4.2.1.2 Preparo do ágar

Adicionou-se 38 g de ágar Müeller Hinton a 1000 mL de água destilada em um erlenmeyer, após dissolução completa, o meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 120°C durante 15 min. O erlenmeyer foi mantido em bancada para resfriamento até aproximadamente 55°C. A seguir, foram distribuídos 40 mL do meio em placas de Petri, previamente esterilizadas. Após sua solidificação, as placas foram incubadas a 37 °C por 24h com o objetivo de se fazer o controle de esterilidade (visual) e serem liberadas para o experimento.

4.2.1.3 Técnica de difusão em ágar por meio de orifícios cavados

As placas de Petri contendo o meio já solidificado foram dispostas em bancada limpa, próximas a um bico de Bunsen, a fim de se manter a maior esterilidade possível e então, com a ajuda de um *swab*, foram inoculadas com uma fração da suspensão de *E. coli* solução salina (solução aquosa de NaCl 0,9%) com turvação equivalente a 0,5 da Escala de Mac Farland, de modo a obter o crescimento em toda a superfície do meio. A seguir, com a ajuda de uma pipeta de vidro, do tipo Pasteur, esterilizada e acoplada a uma bomba de sucção, foram confeccionados 10 poços com aproximadamente 5 mm de diâmetro em pontos equidistantes da placa. Os poços foram preenchidos com 20 µL das soluções de antibiótico cloradas, nos tempos: t0', t5', t15', t30', t60', t12h e t24h. Para o ensaio de antibiograma, a concentração final dos reagentes em solução era de 10 µg/mL. Uma solução de NOR, pura, também na concentração de 10 µg/mL foi utilizada como controle positivo. Para controle negativo, utilizou-se água ultrapura esterilizada (Mille Q®). Também foi realizado controle com uma solução de tiosulfato de sódio mais hipoclorito de sódio, ambos na concentração de 10 µg/mL, para garantir que estas substâncias não interfeririam no resultado do antibiograma. Um esquema com a disposição dos poços pode ser visto na Figura 10.

Figura 10: Esquema da disposição dos poços escavados em placa de Petri.



Fonte: A autora.

Depois de preenchidos todos os poços, as placas foram incubadas a 37°C por 24h. Os halos formados após esse período foram medidos com o auxílio de uma régua.

4.2.2 *Artemia salina*

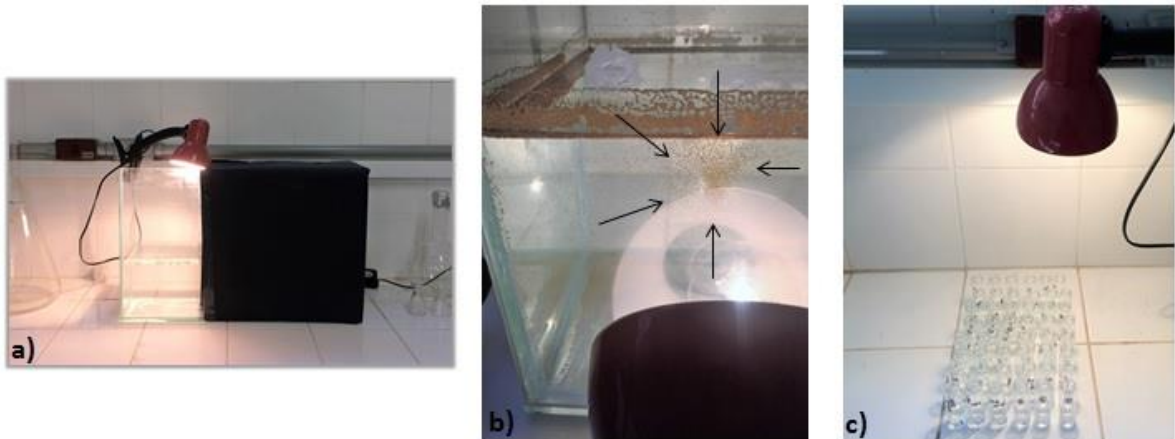
O teste utilizado para a avaliação da ecotoxicidades aguda dos subprodutos de cloração do NOR frente ao micro crustáceo *Artemia salina* consiste em adaptação da metodologia de Meyer et al. (1982).

A eclosão dos ovos de *Artemia* foi realizada em um aquário de vidro retangular. A este aquário foi adicionada água salina 3,5% (38 gramas de sal marinho para cada litro de água) até que a lâmina d'água atingisse, aproximadamente, 10 cm. Metade do aquário foi coberta com cartolina preta, a fim de que se distinguíssem duas regiões (iluminada e não iluminada) dentro dele. Os ovos de *Artemia* foram então adicionados a este recipiente. O período para a eclosão foi de aproximadamente 24h. Durante esse tempo o sistema foi mantido sob aeração artificial constante e iluminado com lâmpada incandescente com filamento de tungstênio de 100 W de potência (Figura 11a). A temperatura da sala manteve-se na média de 20 °C.

Após a eclosão dos náuplios, os que haviam migrado para a região iluminada do aquário e demonstravam maior mobilidade foram transferidos para tubos de ensaio (10 em cada tubo), com a ajuda de uma pipeta. A esses tubos de ensaio adicionou-se 1 mL da solução salina e 4 mL de cada uma das soluções de amostras cloradas. O teste foi realizado em triplicata para cada um dos tempos de cloração (t_0' , t_5' , t_{15}' , t_{30}' , t_{45}' , t_{60}' , t_{2h} , t_{4h} , t_{8h} , t_{12h} e t_{24h}). Como controle negativo utilizou-se água salina e como controle positivo DMSO na concentração de 2 mg/L, também foi testada uma solução “branca” que consistia na mistura de hipoclorito de sódio mais tiosulfato de sódio, ambos na concentração de 10 mg/L.

Os tubos contendo os náuplios em solução foram incubados na presença de luz, por 24h (Figura 11c). Após esse tempo, realizou-se a contagem visual do número de crustáceos mortos (sem mobilidade) e sobreviventes (com mobilidade). O resultado foi apresentado em porcentagem de sobreviventes.

Figura 11: Esquema para eclosão dos ovos de *Artemia* e sua incubação durante o ensaio de toxicidade.



a) aquário com divisão claro/escuro para eclosão dos ovos de *Artemia* b) detalhe da maior concentração dos náuplios de *Artemia* próximo à fonte luminosa c) tubos de ensaio contendo as soluções a serem testadas e 10 náuplios de *Artemia*, cada.

Fonte: A autora

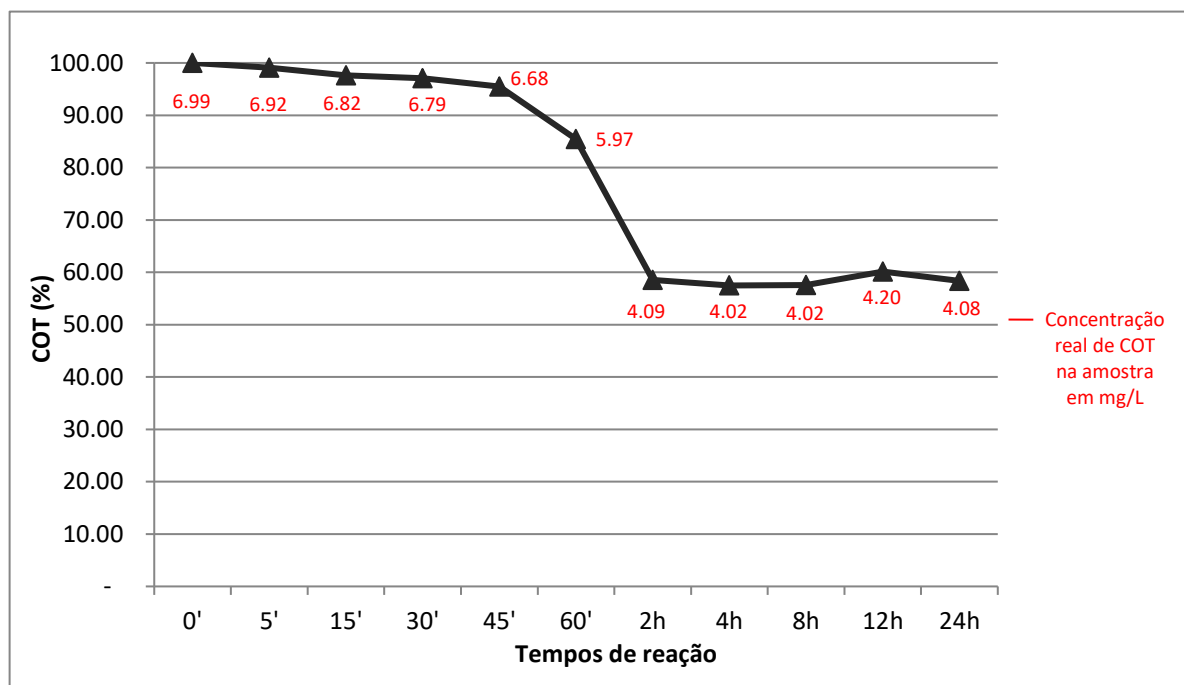
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DA MINERALIZAÇÃO DO NORFLOXACINO PELA CLORAÇÃO.

A avaliação da mineralização do norfloxacinó durante o processo de cloração foi feita através da análise de COT. Para tal, considerou-se como concentração inicial de COT o valor obtido no tempo inicial (t_0), quando não se verificou mineralização. As taxas de mineralização dos demais tempos foram obtidas através da normalização de suas concentrações com a concentração de t_0 .

Os resultados obtidos indicam que o norfloxacinó não é completamente mineralizado a CO_2 e H_2O durante o processo de cloração com NaClO , nas dosagens utilizadas. Até o tempo de reação de 60 min as porcentagens de mineralização não chegaram a 20%. Uma maior taxa de mineralização (40%) foi observada no tempo de 2h e mantém-se praticamente estável até o fim do experimento, conforme ilustrado na Figura 12.

Figura 12: Porcentagens de remoção e concentração real de COT obtidas com a cloração do norfloxacinó nos diferentes tempos de reação.



Na literatura, a mineralização incompleta do norfloxacinó é relatada até mesmo quando são aplicados processos oxidativos avançados. Santos; Meireles; Lange (2015)

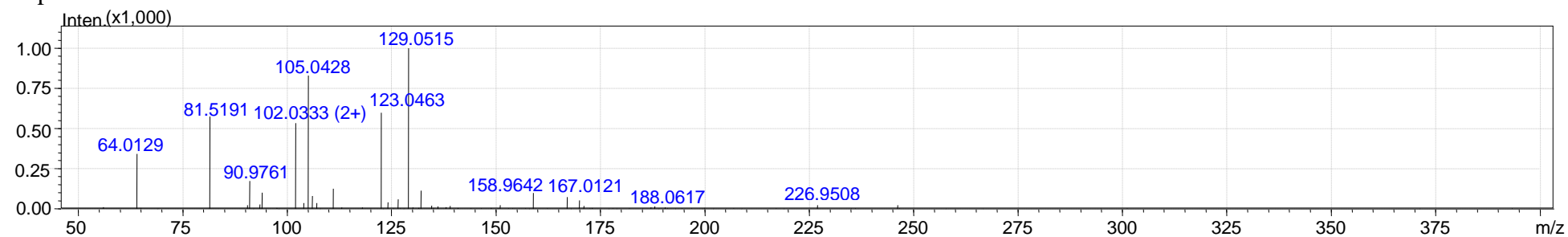
avaliaram a degradação do NOR por fotólise direta (UV), fotólise com peróxido de hidrogênio (UV/H₂O₂) e processos de oxidação de foto-Fenton. Os resultados mostraram que a fotólise direta alcançou taxa de degradação de 85% porém, a taxa de mineralização foi de apenas 2%. O tratamento combinado UV/H₂O₂ testou várias concentrações de peróxido de hidrogênio em diferentes pH, as melhores condições atingiram taxa de degradação de 100% mas a taxa de mineralização foi de apenas 32%. A aplicação de foto-Fenton alcançou 60% de degradação do composto e 55% de mineralização. A mineralização incompleta do norfloxacino pode levar a formação de produtos de degradação cujos efeitos ao meio ambiente podem ser mais tóxicos que o próprio fármaco.

5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS SUBPRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

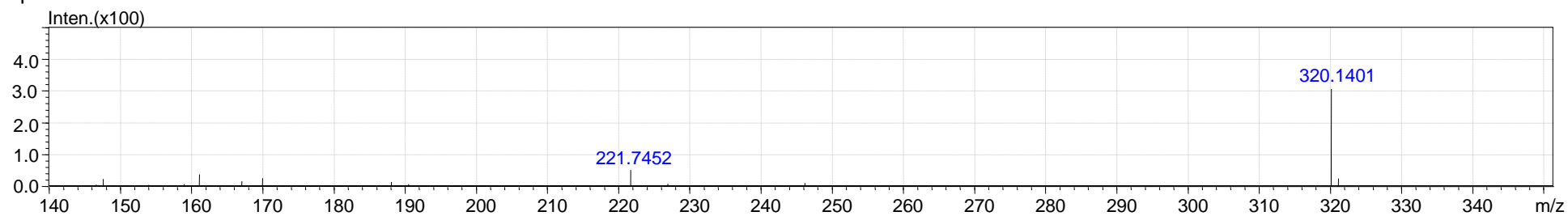
A detecção e identificação dos subprodutos de degradação formados durante a cloração do norfloxacino foram realizadas utilizando a ESI-MS como ferramenta. A Figura 13 apresenta os espectros de massas, gerados no modo positivo, por injeção direta das amostras nos diferentes tempos de contato.

Figura 13: Espectros de massa das soluções obtidas da degradação do norfloxacino em diferentes tempos de cloração.

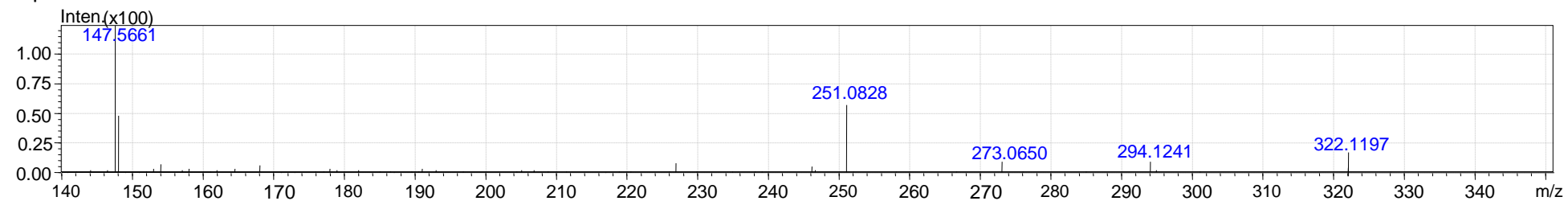
Espectro do branco



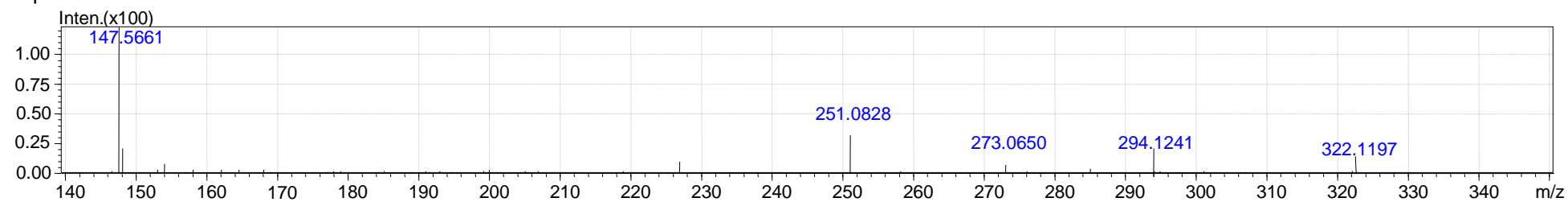
Espectro do t0'



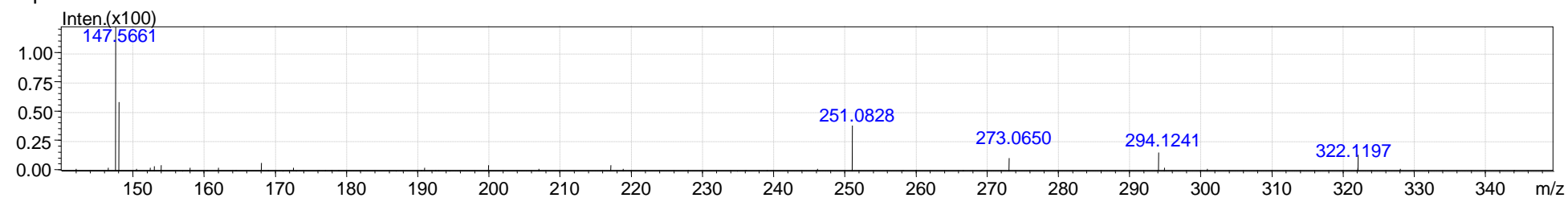
Espectro do t5'



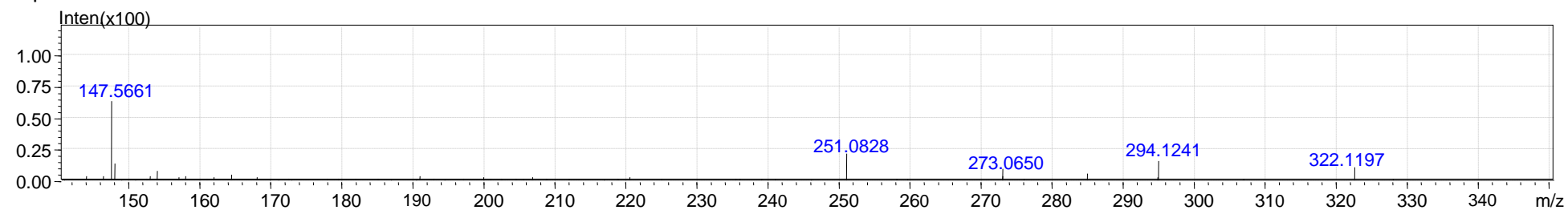
Espectro do t15'



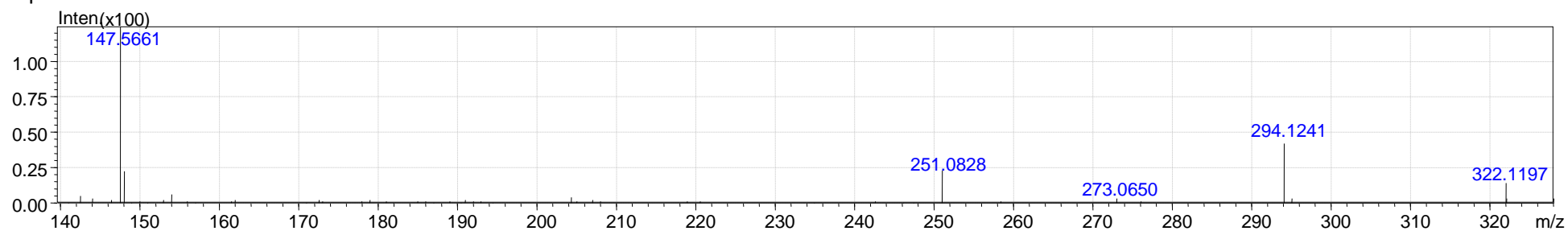
Espectro do t30'



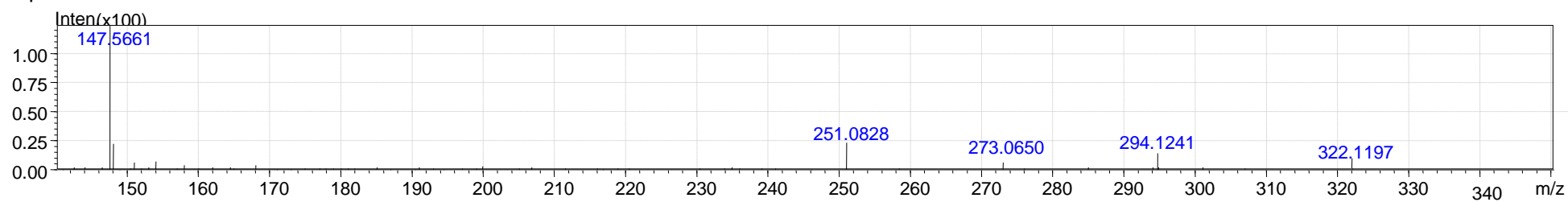
Espectro do t45'



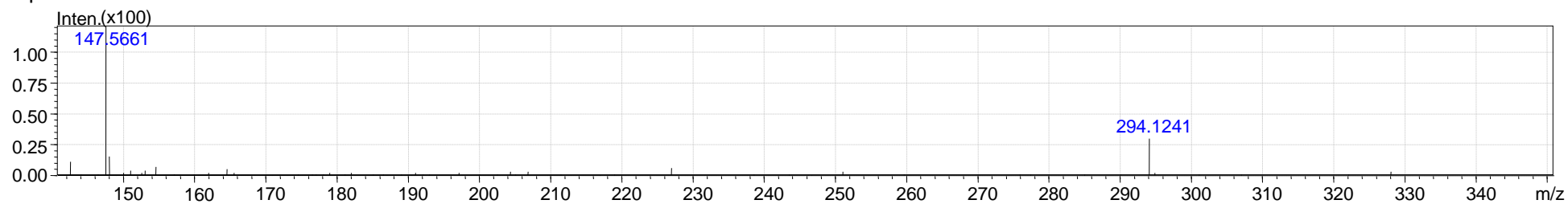
Espectro do t60'



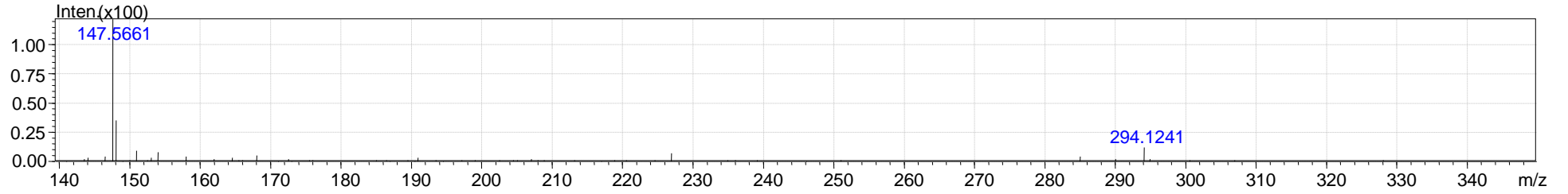
Espectro do t2h



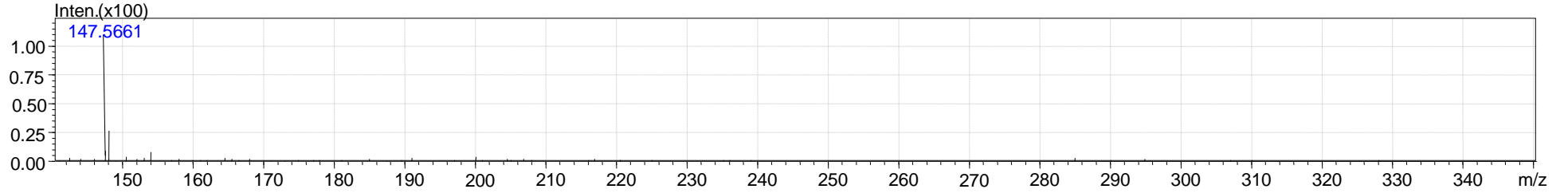
Espectro do t4h



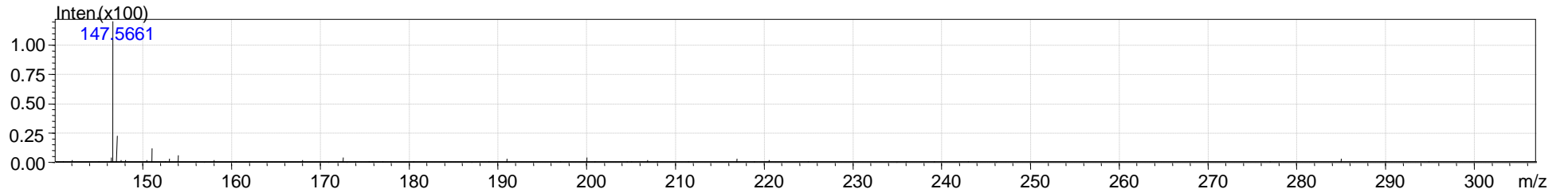
Espectro do t8h



Espectro do t12h



Espectro do t24h



A partir dos espectros de massas podemos perceber que o norfloxacino é degradado logo nos primeiros minutos do ensaio de cloração. O pico referente à sua molécula protonada $[M+H]^+$ 320.1401 aparece apenas em t_0' , quando não há cloração efetiva da amostra. Em todos os outros tempos ele não é detectado. Este fato sugere que, apesar de não ser totalmente mineralizado, como demonstrado pela análise de COT, o norfloxacino é degradado nos primeiros minutos da cloração. A partir do tempo t_5' há o surgimento de outros 5 picos, referentes às moléculas protonadas $[M+H]^+$ 322.1197, $[M+H]^+$ 294.1307, $[M+Na]^+$ 273.0641, $[M+H]^+$ 251.0837 e $[M+H]^+$ 147.5661; atribuídos à formação de subprodutos.

O pico $[M+H]^+$ 147.5661 aparece com alta intensidade nos espectros de todos os tempos estudados. Os picos $[M+H]^+$ 322.1197, $[M+H]^+$ 273.0641 e $[M+H]^+$ 251.0837 estão presentes em todos os espectros até o tempo de reação de 2h. O pico do íon $[M+H]^+$ 294.1307 aparece até o tempo de 8h.

Os espectros de massas obtidos pela injeção direta das amostras no LCMS-IT-TOF forneceram dados que nos permitiram propor fórmulas moleculares para quatro dos cinco subprodutos encontrados. Foram considerados subprodutos todos aqueles que, além de não serem detectados no branco e em t_0' , foram detectados em pelo menos duas das alíquotas dos processos de degradação e com diferença de intensidade absoluta entre eles abaixo de 20%. A Tabela 5 apresenta os dados do íon molecular encontrado, sua massa molecular e a possível fórmula molecular.

Tabela 5: Fórmula molecular do norfloxacino e dos possíveis subprodutos identificados a partir dos dados obtidos por injeção direta em espectrômetro de massas.

Composto	Fórmula Molecular	Massa molecular ^a	$[M+H]^+$ Teórico	$[M+H]^+$ Experimental	Erro (ppm)	DBE ^b
NOR	$C_{16}H_{18}FN_3O_3$	319.3308	320.1405	320.1401	-3,92	9
SP-1	$C_{15}H_{16}FN_3O_4$	321.1125	322.1203	322.1197	-5,88	9
SP-2	$C_{14}H_{16}FN_3O_3$	293.2935	294.1248	294.1241	-2,38	8
SP-3	$C_{12}H_{11}FN_2O_3$	250.0754	251.0826	251.0828	1,34	8
SP-4	$C_{12}H_{10}FN_2O_3Na$	272.0573	273.0646	273.0650	1,46	8

Composto	Fórmula Molecular	Massa molecular ^a	[M+H] ⁺ Teórico	[M+H] ⁺ Experimental	Erro (ppm)	DBE ^b
SP-5	-	-	-	147.5661	-	-

^amassa molecular calculada pelo software LCMSsolution/ *Accurate Mass Calculator*.

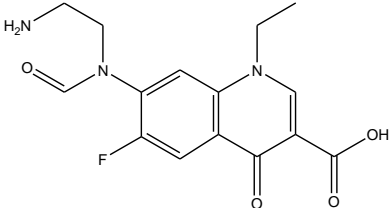
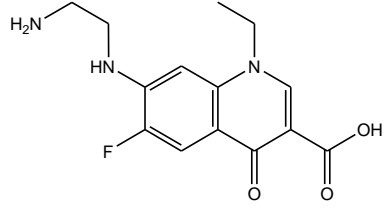
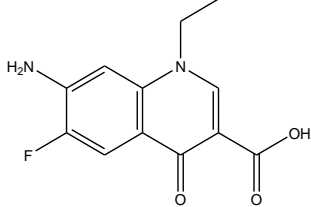
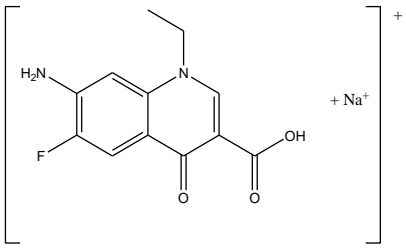
^b *Double Bond Equivalence* (equivalência de duplas ligações).

Não foi possível propor uma fórmula molecular para o subproduto SP-5 que obedecesse a regra do nitrogênio e para a qual a diferença entre o valor de [M+H]⁺ teórico e experimental ficasse abaixo de 10 ppm. Sabe-se, pelas razões isotópicas encontradas, que não se trata de uma molécula clorada, pois não há picos referentes aos isótopos de cloro. Devido ao valor de *m/z* encontrado acredita-se que pode ter havido abertura do anel quinolônico e/ou perda de grupamentos ligados a esse anel. Jiang et al. (2012) propuseram subprodutos de degradação do NOR, por processos de ozonização, que pressupõem a abertura do núcleo quinolônico. Babić; Periša; Škorić (2013) também reportam subprodutos do NOR com abertura e rearranjo deste anel, para processos de fotólise. Contudo, para este trabalho, não foi encontrada uma molécula que se encaixasse nas condições especificadas acima.

5.2.1 Elucidação estrutural e rotas de degradação

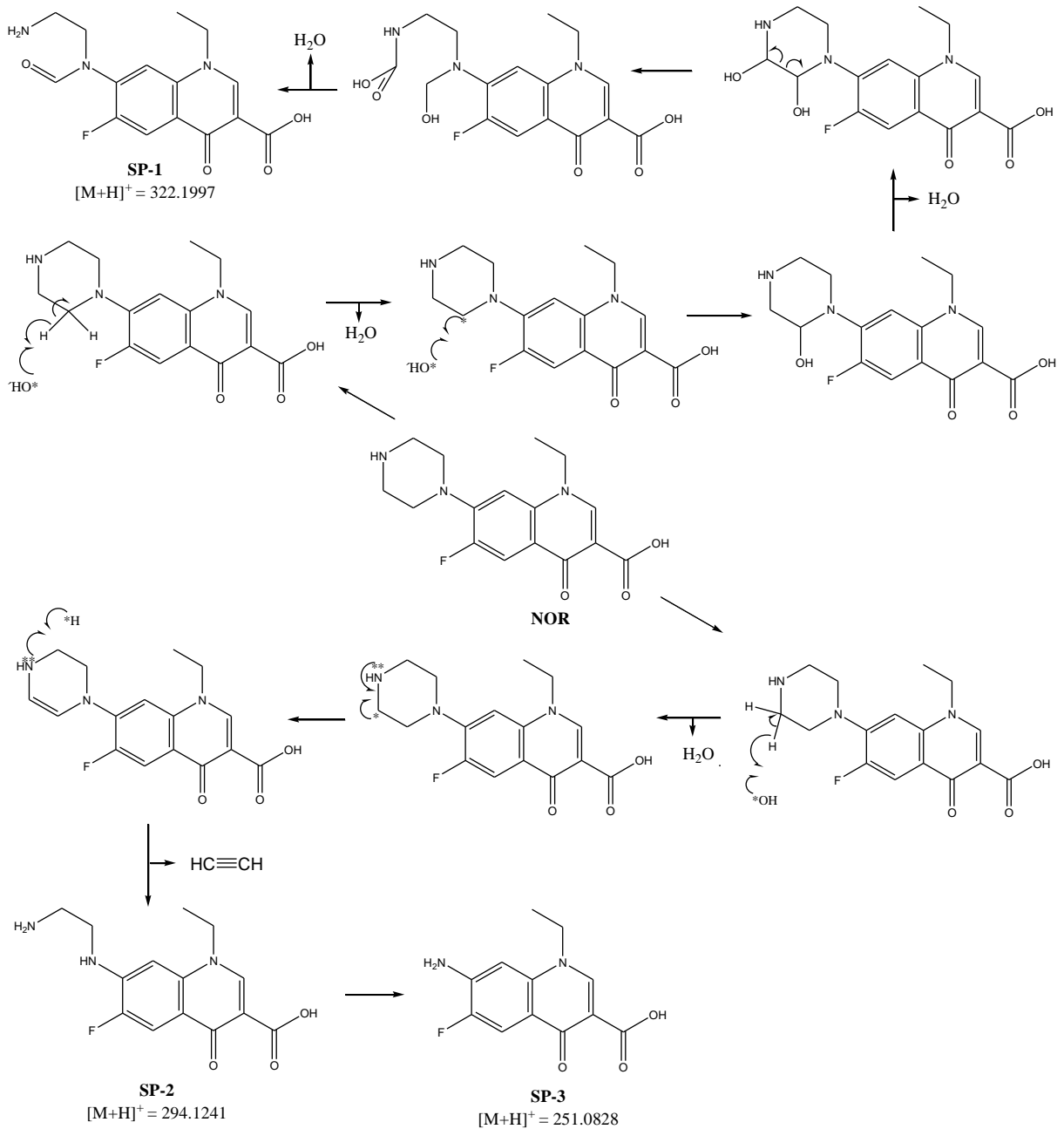
A partir das fórmulas moleculares encontradas e dos valores de [M+H]⁺ experimental foram propostas fórmulas estruturais para os subprodutos. A Tabela 6 apresenta a fórmula estrutural proposta para todos os subprodutos identificados.

Tabela 6: Estruturas químicas propostas para os subprodutos identificados após a cloração do norfloxacinó em água.

[M+H]⁺ experimental	Estrutura química
322.1197	
294.1241	
251.0828	
273.0650	

Após a identificação e a caracterização dos subprodutos foi possível propor uma rota de degradação do norfloxacinó durante o processo de cloração. A rota proposta leva em conta que as reações com NaClO são reações de oxidação e envolvem compostos de cloro livre e espécies radicalares. A formação de espécies radicalares é considerada a partir do fato de que a solução de NaClO não foi preparada em ambiente livre de luz. As vidrarias utilizadas no preparo são de vidro translúcido e transparente e água utilizada é de alto grau de pureza, e como sugerido por Linden; Watts (2007) a decomposição fotocatalítica de espécies de cloro em solução livre de material orgânico pode se dar de forma espontânea. A rota proposta é apresentada na Figura 14.

Figura 14: Rota de degradação proposta para o norfloxacino durante os ensaios de cloração.



O subproduto SP-1 é formado pela hidroxilação do anel piperazina seguida de abertura do mesmo. Na sequência, ocorre oxidação do carbono primário ligado ao N4 e um radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) promove a oxidação do carbono ligado ao N1. Por fim, a liberação de CO_2 leva a formação do subproduto final. Este mesmo produto de degradação foi encontrado por Wang; He; Huang, (2010b) ao submeterem o NOR à cloração com ClO_2 .

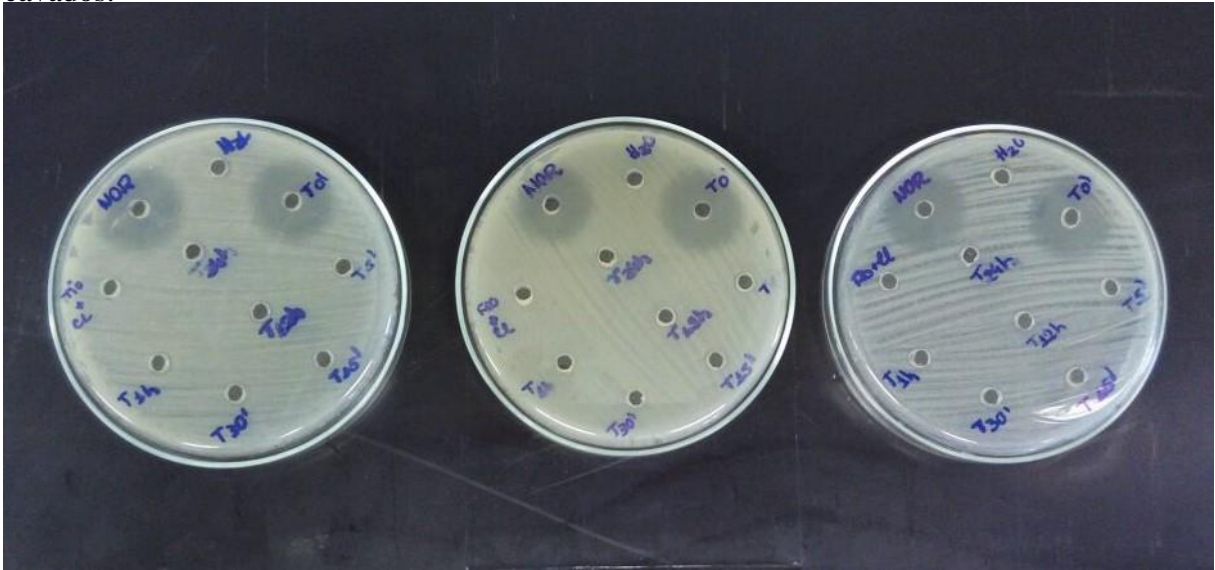
Os subprodutos SP-2 e SP-3 são formados pelo ataque de uma hidroxila radicalar ($\bullet\text{OH}$) ao anel piperazina, levando à formação de um carbono radical ($\bullet\text{C}$). O movimento de um dos elétrons do par de elétrons livres do N4, para estabilização da molécula, leva a formação de uma insaturação. A abstração de um hidrogênio radical por esse mesmo nitrogênio força a quebra homolítica da ligação N-C e eventual liberação de um grupo etino, levando à formação de SP-2. Mecanismo semelhante leva à formação do subproduto SP-3. O subproduto SP-4 apresenta razão massa carga (m/z) 273.0650, o que nos faz crer que é uma molécula cationizada $[\text{M}+\text{Na}]^+$, também denominada *adduct* de sódio.

Os subprodutos SP-2 e SP-3 corroboram dados da literatura, para a oxidação de fluoroquinolonas através de compostos de cloro, que previram a abertura do anel piperazina. Contudo, diferente do que é proposto por alguns autores, os resultados de MS não mostraram subprodutos clorados. Por exemplo Dodd et al. (2005) e Deborde et al. (2013) ao trataram de estudos de cloração utilizando compostos de cloro livre e fluoroquinolonas com N4 secundário e terciário, relataram o aparecimento de moléculas que possuem um ou mais átomos de cloro ligados ao anel quinolônico. No presente estudo, entretanto, tal fato não foi constatado, pois não foi observada a formação de compostos com a razão isotópica referente aos átomos de cloro ^{35}Cl e ^{37}Cl .

5.3 ANTIBIOGRAMA

Após incubação por 24h, verificou-se que, em todas as placas, houve formação de halo de inibição apenas em torno dos poços de controle positivo (solução de NOR 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e do poços onde havia solução do tempo inicial t_0 '. Não houve formação do halo em torno dos poços que continham soluções cloradas de NOR. A Figura 15 mostra o resultado dos antibiogramas.

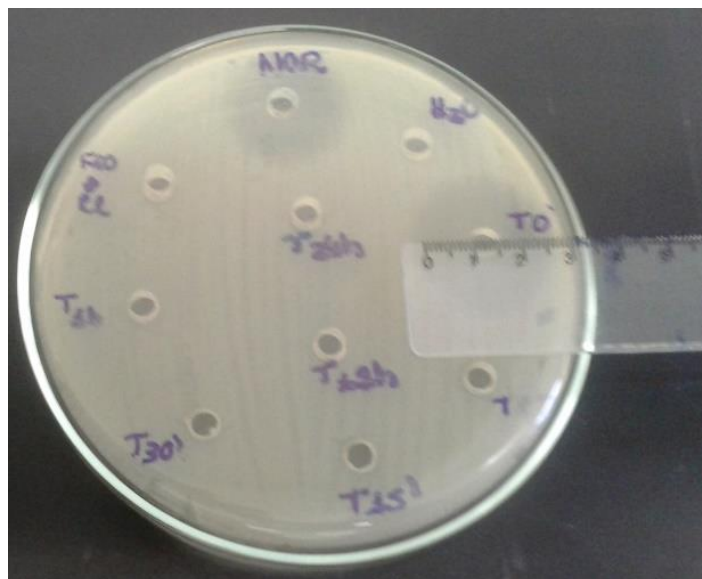
Figura 15: Resultado dos antibiogramas pela técnica de difusão em ágar por meio de orifícios cavados.



Fonte: A autora.

Segundo o parâmetro de Karaman et al., 2003 a avaliação da susceptibilidade de uma bactéria à determinada solução deve ser feita em comparação a um controle positivo. No caso deste estudo, o controle positivo foi feito com a solução pura de NOR na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Os halos em torno do poço contendo o controle positivo foram medidos com auxílio de uma régua e apresentaram raios de 12,5 mm. Os halos em torno dos poços de t_0 apresentaram raios de mesmo tamanho (Figura 16) e os demais poços não apresentaram halos de inibição em torno deles.

Figura 16: Detalhe da medição dos halos de inibição.



Fonte: A autora

Como o resultado da MS demonstrou, o NOR é degradado nos primeiros minutos de cloração, assim, ele só está presente nas soluções controle e no t0'. A falta do halo de inibição de crescimento bacteriano em torno dos outros poços leva a crer que os subprodutos de cloração do NOR, pelo menos na concentração em que se apresentam nessas soluções, não possuem atividade antibacteriana contra a cepa de *E. coli* utilizada.

Alguns autores acreditam que a atividade antibacteriana das quinolonas esteja relacionada ao seu núcleo quinolônico e por isso, quinolonas que não possuem o anel piperazina (por exemplo, o ácido nalidíxico) ainda são ativas contra diferentes tipos de bactérias. Assim, modificações estruturais na porção piperazina, não seriam suficientes para eliminar a atividade antibacteriana das fluoroquinolonas (SHEN; BARANOWSKI; PERNET, 1989; DODD et al., 2005). Com base nestas observações, os subprodutos propostos deveriam manter a atividade antibacteriana.

Contudo, estudos mais recentes têm demonstrado que a modificação de grupos funcionais auxiliares (por exemplo, aqueles ligados aos C6 e C7) nas moléculas de FQ também podem diminuir significativamente a potência antibacteriana do composto original. Paul; Dodd; Strathmann (2010) avaliaram a capacidade antimicrobiana de subprodutos formados após fotólise e fotocatalise do CIP e descobriram que os subprodutos formados, a maioria com modificações na porção piperazina da molécula, tiveram sua atividade antibacteriana inibida. Os autores justificam esse fato apontando que o substituinte no C7 desempenha um papel fundamental para a especiação ácido-base e lipofilicidade das FQ em condições fisiológicas e que, juntamente com o núcleo quinolônico, esteja envolvido em reconhecimento e ligação do fármaco à enzima DNA topoisomerase.

Guimarães et al. (2014) afirmaram que a adição de um grupo piperazina no C7 amplia a ação contra as bactérias Gram-negativas e que a presença de centros carregados em fármacos pode ser essencial para permitir sua passagem através da membrana celular e assim garantir a atividade biológica.

No presente estudo, as soluções a partir de 5 min de reação já não mais apresentaram atividade antimicrobiana sobre a cepa de *E. coli* tratada. A partir desse tempo, apenas os subprodutos, a maioria com modificação no anel piperazina, puderam ser encontrados, sugerindo que as transformações no anel piperazina possam alterar a capacidade de permeação celular e a afinidade pela enzima topoisomerase do fármaco.

Contudo, estudos mais específicos tem de ser realizados para a confirmação desta hipótese. A atividade antibacteriana de uma substancia não está relacionada somente às suas propriedades moleculares, mas depende também de sua concentração no meio. O fato de não haver atividade antibacteriana pode estar relacionado com as propriedades das moléculas às quais os microrganismos estão expostos, mas também pode ocorrer pelo fato desses microrganismos estarem expostos a concentrações subinibitórias desses compostos. A realização deste estudo, no entanto, é dificultada pela indisponibilidade de padrões desses subprodutos.

5.4 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA COM ARTEMIA SALINA

O resultado do teste de comparação da toxicidade aguda das soluções cloradas e não cloradas de norfloxacino é apresentado na Tabela 7. Foram considerados organismos mortos aqueles que não apresentavam motilidade após 24h de incubação em solução.

Tabela 7: Número de organismos vivos e mortos após 24h de incubação em soluções cloradas e não cloradas de norfloxacino.

Soluções	Nº de organismos vivos (V) e mortos (M) em cada uma das replicatas do experimento.						Média de organismos vivos
	Replicata 1		Replicata 2		Replicata 3		
	(V)	(M)	(V)	(M)	(V)	(M)	
Controle negativo (solução salina)	10	0	10	0	10	0	10
Controle positivo (DMSO - 2mg/l)	0	10	0	10	0	10	0
Branco (NaClO 10mg/L +Na ₂ S ₂ O ₃ 10mg/L)	9	0	8	2	10	0	9
NOR (10mg/L)	7	3	6	4	8	2	7
t0'	6	4	8	2	8	2	7,33
t5'	3	7	4	6	4	6	3,66
t15'	5	5	4	6	3	7	4
t30'	3	7	3	7	3	7	3
t45'	3	7	3	7	3	7	3
t60'	4	6	3	7	3	7	3,33
t2h	3	7	2	8	2	8	2,33
t4h	1	9	1	9	2	8	1,33
t8h	1	9	2	8	2	8	1,66
t12h	2	8	1	9	1	9	1,33

Soluções	Nº de organismos vivos (V) e mortos (M) em cada uma das replicatas do experimento.						Média de organismos vivos
	Replicata 1		Replicata 2		Replicata 3		
	(V)	(M)	(V)	(M)	(V)	(M)	
t24h	1	9	2	8	1	9	1,33

Como esperado, não houve mortalidade dos microcrustáceos nos ensaios de controle negativo (solução salina 35%) e houve mortalidade de 100% nos ensaios de controle positivo. Para a solução do “branco” a média de mortalidade das *Artemias* foi de 10%. Para as soluções de NOR puro e t0’ a média de mortalidade foi de 30%.

A partir do tempo t5’, a porcentagem de microcrustáceos vivos é praticamente a metade da porcentagem de organismos vivos nas soluções do norfloxacino e no t0’ (não clorada). Essa relação permanece entre 30 e 40% de organismos vivos até o tempo t2h, quando cai para 23%. As menores porcentagens de microcrustáceos vivos são notadas a partir do tempo t4h e ficam entre 16% e 13%.

Tais resultados indicaram que as soluções cloradas, ou seja, aquelas em que há presença de subprodutos são mais tóxicas ao microcrustáceo do que as soluções do fármaco puro (não clorado), o que leva a crer que os subprodutos de cloração apresentam maior toxicidade aguda às *Artemias* do que o próprio norfloxacino.

Resultados semelhantes foram obtidos por Deborde et al. (2013) ao testarem a toxicidade dos subprodutos de cloração do LEV frente a bactéria marinha *Alivibrio fischeri*. Dentre os dois subprodutos identificados por esses autores, um deles também pressupõe uma modificação na porção piperazina da molécula. Os testes de toxicidade indicaram que os subprodutos podem ser mais tóxicos ao microrganismo do que o composto original.

Outro fato interessante de se notar é o de que a maior taxa de mortalidade acontece a partir do tempo t4h, quando há maior concentração do subproduto SP-5, que não pôde ser identificado, sugerindo que tal molécula pode ser mais tóxica para as *Artemias*.

O teste de toxicidade com *Artemia salina*, como mencionado, é apenas um teste preliminar. Outros estudos aprofundados têm de ser realizados para confirmação do grau de

toxicidade de determinada substância, porém, os resultados apresentados já são um indício da possível toxicidade dos subprodutos de cloração do norfloxacino.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho promoveu ensaios de cloração do norfloxacino, a terceira fluoroquinolona mais utilizada no Brasil. Os ensaios de cloração tiveram o intento de averiguar o potencial de degradação e a possibilidade de formação de subprodutos desse fármaco quando em contato com o hipoclorito de sódio, um dos desinfetantes mais utilizados em estações de tratamento de água, de médio e pequeno porte no País.

As análises de TOC demonstraram que o norfloxacino é degradado durante a etapa de cloração, porém, não é mineralizado. A análise, por espectrometria de massa de alta resolução, permitiu a detecção de cinco subprodutos da degradação do norfloxacino por NaClO. Contudo, apenas quatro desses subprodutos puderam ser identificados, um deles ainda permanece incógnito.

Foi proposta uma rota de degradação, que leva à formação dos subprodutos identificados. A rota sugere que as espécies químicas que tomam parte do processo de oxidação sejam os radicais hidroxila, espécies altamente reativas produzidas pela exposição da solução do agente de desinfecção (NaClO) à luz solar.

Os subprodutos gerados na etapa de cloração foram submetidos à avaliação de seu potencial antibacteriano frente a uma cepa de *Escherichia coli* e de sua toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, que avalia toxicidade aguda. Os resultados mostraram que os subprodutos formados perderam a capacidade de inibir o crescimento bacteriano no meio e que alguns dos subprodutos podem ser mais tóxicos do que a molécula do fármaco precursor.

7. PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

Durante a etapa de revisão da literatura foi notada uma carência de trabalhos que elucidam quais são os subprodutos de degradação gerados pela cloração de fármacos. Menor ainda é o número de trabalhos que fazem uma comparação de sua toxicidade antes e após a etapa de cloração. Tendo em vista que a cloração é o processo de desinfecção mais utilizado em nosso País, são necessário estudos em escala real, que comprovem e identifiquem esses subprodutos em efluentes de estações de tratamento de água.

Também são necessários estudos mais específicos de toxicidade para que saibamos a real dimensão da influência desses subprodutos para os organismos aquáticos nos diferentes níveis tróficos.

Pensando ainda mais a frente, o entendimento da formação dos subprodutos de desinfecção pode levar ao desenvolvimento de metodologias que previnam sua formação ou garantam sua total remoção durante as etapas de tratamento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBINI, A.; MONTI, S. Photophysics and photochemistry of fluoroquinolones. **Chemical Society Reviews**, v. 32, n. 4, p. 238, 2003.

ALMEIDA, C. M. M. Desinfecção com dióxido de cloro. **Chemistry A European Journal**, v. 105, p. 21–30, 2008.

AMPARO, M. R. **Desenvolvimento e validação de métodos SPE-LC-MS e MEPS-LC-MS para quantificação de fluoroquinolonas em matrizes aquosas**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2013.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, volume 2. 5ª Ed. Brasília, 2010.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Antimicrobianos - Bases teóricas e usos clínicos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm>. Acesso em: 23/03/2017.

ARDREY, R. E. **Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An Introduction**. Huddersfield, England: John Wiley & Sons Ltd, 2003. v. 1

BABIĆ, S.; PERIŠA, M.; ŠKORIĆ, I. Photolytic degradation of norfloxacin, enrofloxacin and ciprofloxacin in various aqueous media. **Chemosphere**, v. 91, n. 11, p. 1635–1642, 2013.

BARBOSA, J.; BARRON, D.; JIMÉNEZ-LOZANO, E. Electrophoretic behaviour of quinolones in capillary Effect of pH and evaluation of ionization constants. **Journal of Chromatography A**, v. 839, n. 2377, p. 183–192, 1999.

BELTRAN, F. J., A. AGUINACO e J. F. GARCIA-ARAYA. Mechanism and kinetics of sulfamethoxazole photocatalytic ozonation in water. **Water Research**, v.43, n.5, Mar, p.1359-69. 2009

BENEDETTI, S. **AVALIAÇÃO DO TEOR DE CARBONO ORGÂNICO TOTAL NA**

QUALIDADE DA ÁGUA : APLICAÇÃO NA RADIOFARMÁCIA . [s.l.] Universidade de São Paulo, 2012.

BISUTTI, I.; HILKE, I.; RAESSLER, M. Determination of total organic carbon – an overview of current methods. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 23, n. 10-11, p. 716–726, nov. 2004.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria n.º 2.914, de 12 de Dezembro de 2011. Dispõe sobre normas de potabilidade de água para o consumo humano. Brasília, 2011.

CAMOZZATO, A. C.; CAMPOS, V. Quinolonas: gênese e propriedades terapêuticas da terceira geração. *Revista Brasileira de Medicina*. v. 56, p. 386 – 400, 1999.

CENTER FOR DISEASE DYNAMICS, ECONOMICS & POLICY. 2015. State of the World's Antibiotics, 2015. CDDEP: Washington, D.C.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada a espectrometria de massas acoplada a espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623–636, 2008.

CROTTI, A. E. M. et al. Espectrometria de massas com ionização por “Electrospray”: Processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287–292, 2006.

DA CRUZ, L. H. et al. Degradação fotocatalítica de sulfametoxazol, trimetoprima e diclofenaco em solução aquosa. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1270–1274, 2010.

DANIEL, L. A. et al. **Métodos Alternativos de Desinfecção da Água**. São Carlos - SP: [s.n.].

DASS, C. **Fundamentals of contemporary mass spectrometry**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2007.

DEBLONDE, T.; COSSU-LEGUILLE, C.; HARTEMANN, P. Emerging pollutants in wastewater : A review of the literature. **International Journal of Hygiene and**

Environmental Health, v. 214, p. 442–448, 2011.

DEBORDE, M. et al. Aqueous chlorination of levofloxacin: Kinetic and mechanistic study, transformation product identification and toxicity. **Water Research**, v. 47, n. 1, p. 121–129, 2013.

DEMEESTERE, K. et al. Fluoroquinolone antibiotics: An emerging class of environmental micropollutants. **Science of the Total Environment**, v. 500–501, p. 250–269, 2014.

DODD, M. C. et al. Interactions of fluoroquinolone antibacterial agents with aqueous chlorine: Reaction kinetics, mechanisms, and transformation pathways. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 18, p. 7065–7076, 2005.

FATTA-KASSINOS, D.; MERIC, S.; NIKOLAOU, A. Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: Current state of knowledge and future research. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 1, p. 251–275, 2011.

FLOXACIN. Responsável técnico: Fernando C. Lemos. Campinas, São Paulo: MSD, 2013. Bula de remédio.

FRADE, V. M. F. et al. Environmental contamination by fluoroquinolones. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 1, p. 41–54, 2014.

FREITAS, J. R. L. **Caracterização dos produtos de degradação do captopriol por espectrometria de massas de alta resolução e avaliação da toxicidade após a fotocatalise heterogênea (TiO₂/UV-c)**. [s.l.] Universidade Federal de Ouro Preto, 2014.

GAMA, M. R. Processos fenton como alternativa na remoção de interferentes endócrinos e outros micropoluentes ambientais. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 777–787, 2012.

GOLET, E. M. et al. Trace Determination of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Urban Wastewater by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. v. 73, n. 15, p. 3632–3638, 2001.

GOLET, E. M. et al. Environmental Exposure Assessment of Fluoroquinolone Antibacterial

Agents from Sewage to Soil. **Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 15, p. 3243–3249, 2003.

GOLET, E. M.; ALDER, A. C.; GIGER, W. Environmental Exposure and Risk Assessment of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Wastewater and River Water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland. **Environmental S**, v. 36, n. 17, p. 3645–3651, 2002.

GUIMARÃES, J. R. et al. Ocorrência e degradação de quinolonas por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 868–885, 2014.

GUIMARÃES, J. R.; NOUR, E. A. A. Tratando nossos esgotos: Processos que imitam a natureza. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v. Ed. especi, p. 19–30, maio 2001.

HALLING-SORENSEN, B. et al. Occurrence, fate and effects of pharmaceuticals substance in the environment - A review. **Chemosphere**, v. 36, n. 2, p. 357–393, 1998.

HANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J. A.; FLOWER, R. J. Fundamentos da farmacologia. 6ª ed - Editora Elsevier, 2008. 829 p. ISBN: 9788535222432.

HARI, A. C. et al. Effects of pH and cationic and nonionic surfactants on the adsorption of pharmaceutical to a natural aquifer material. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 8, p. 2592–2598, 2005.

HIRSCH, R. et al. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **Science of the Total Environment**, v. 225, n. 1–2, p. 109–118, 1999.

HOFFMANN, E. DE; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry - Principles and Applications**. Third ed. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd, 2007.

IKEHATA, K.; JODEIRI NAGHASHKAR, N.; GAMAL EL-DIN, M. Degradation of Aqueous Pharmaceuticals by Ozonation and Advanced Oxidation Processes: A Review. **Ozone: Science & Engineering**, v. 28, n. 6, p. 353–414, 2006.

IMS HEALTH. Ranking de antibióticos mais vendidos [mensagem pessoal]. Mensagem

recebida por < HTustumi@br.imshealth.com > em 19 jun. 2017.

JARDIM, W. F.; CANELA, M. C. **Fundamentos da oxidação química no tratamento de efluentes e remediação de solos** Caderno Temático. Campinas, 2004: [s.n.].

JIANG, W. et al. Spectroscopic study of degradation products of ciprofloxacin, norfloxacin and lomefloxacin formed in ozonated wastewater. **Water Research**, v. 46, n. 16, p. 5235–5246, 2012.

JIN, X.; PELDSZUS, S. Selection of representative emerging micropollutants for drinking water treatment studies: A systematic approach. **Science of the Total Environment**, v. 414, p. 653–663, 2012.

JOHNSON, A. C.; BELFROID, A.; DI CORCIA, A. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. **Science of the Total Environment**, v. 256, n. 2–3, p. 163–173, 2000.

KARAMAN, I. et al. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, n. 2–3, p. 231–235, 2003.

KARTHIKEYAN, K. G.; MEYER, M. T. Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. **Science of the Total Environment**, v. 361, n. 1–3, p. 196–207, 2006.

KLAMERTH, N. et al. Degradation of fifteen emerging contaminants at ??g L⁻¹ initial concentrations by mild solar photo-Fenton in MWTP effluents. **Water Research**, v. 44, n. 2, p. 545–554, 2010.

KOLPIN, D. W. et al. Pharmaceuticals , Hormones , and Other Organic Wastewater Contaminants in U . S . Streams, 1999 - 2000 : A National Reconnaissance. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 6, p. 1202–1211, 2002.

KOSJEK, T.; HEATH, E. Applications of mass spectrometry to identifying pharmaceutical transformation products in water treatment. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 10, p. 807–820, 2008.

- KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 417–434, [s.d.].
- LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35–61, 2009.
- LAXMINARAYAN, R. et al. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: An analysis of national pharmaceutical sales data. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 742–750, 2014.
- LE-MINH, N. et al. Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes. **Water research**, v. 44, n. 15, p. 4295–323, ago. 2010.
- LI, W. et al. Occurrence, distribution and potential affecting factors of antibiotics in sewage sludge of wastewater treatment plants in China. **Science of the Total Environment**, v. 445–446, p. 306–313, 2013.
- LIBÂNIO, M. Fundamentos da qualidade e tratamento de água. 3^a ed - Campinas. Editora Átomo, 2010. 496 p. ISBN: 978-8576701651.
- LINDBERG, R. H. et al. Screening of Human Antibiotic Substances and Determination of Weekly Mass Flows in Five Sewage Treatment Plants in Sweden. **Environmental Chemistry**, v. 39, n. 10, p. 3421–3429, 2005.
- LINDEN, K. G.; WATTS, M.J. Chlorine photolysis and subsequent OH radical production during UV treatment of chlorinated water. **Water Research**, v.41, p. 2871 – 2878, 2007.
- LOCATELLI, M. A. F. **Avaliação da presença de antibióticos e drogas ilícitas na bacia do Rio Atibaia**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 2011.
- MAGALDI, S.; CAMERO, T. Susceptibilidad de *Candida albicans* ‘in vitro’ mediante los pozos de difusión. **Bol. Venez. Infect.** 7(1): 5-8, 1
- MATUMOTO, P. Y.; ALCÂNTARA, F. C. DE. Metodologia Analítica De Citrato De Sildenafil. **Revista Acadêmica Oswaldo Cruz**, v. 2, 2014.

MELO, S. A. S. et al. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 188–197, 2009.

MELO, V. V.; DUARTE, I. D. P.; SOARES, A. Q. **Guia Antimicrobianos Guia de antimicrobianos**. Goiás: [s.n.].

MEYER, B. et al. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 5, p. 31–34, 1982.

MILANI, M. G.; ZIOLLI, R. L. Avaliação do potencial tóxico de novos compostos e de compostos de interesse ambiental através do ensaio de toxicidade aguda utilizando *Artemia salina*. p. 1–9, 2007.

MITSCHER, L. A. Bacterial Topoisomerase Inhibitors : Quinolone and Pyridone Antibacterial Agents. n. 785, 2005.

MORETTI, P. E. **Antibiograma - Microiologia, Fundamentos e Aplicações**. [s.l.: s.n.].

NIE, X. et al. Residues of fluoroquinolones in marine aquaculture environment of the Pearl River Delta , South China. **Environmental Geochemistry Health**, n. 34, p. 323–335, 2012.

PAIVA, R. DE. **Métodos de extração com partição a baixa temperatura para a determinação de marcadores biológicos de exposição ao benzeno , em urina , por UHPLC-MS / MS** . [s.l.] Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP, 2016.

PALLO-ZIMMERMAN, L. M.; BYRON, J. K.; GRAVES, T. K. Fluoroquinolones: then and now. **Compendium: continuous education for veterinarians**, v. 32, n. July, p. 1–9, 2010.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Introdução à Espectroscopia. Tradução da 5ª edição norte-americana. 2ª edição brasileira. São Paulo: Editora Cengage Learning. 733p. ISBN: 978-85-221-2338-4

PAUL, T.; DODD, M. C.; STRATHMANN, T. J. Photolytic and photocatalytic decomposition of aqueous ciprofloxacin: Transformation products and residual antibacterial activity. **Water Research**, v. 44, n. 10, p. 3121–3132, 2010.

PENG, H. et al. Chemosphere Sorption and solubility of ofloxacin and norfloxacin in water – methanol cosolvent. **Chemosphere**, v. 103, p. 322–328, 2014.

PERUZZO, F. M.; CANTO, E. L. Química na abordagem do cotidiano. 2ª ed. - São Paulo: Editora Moderna, 2002. 584p. ISBN: 85-16-03384-8

PICÓ, Y.; ANDREU, V. Fluoroquinolones in soil — risks and challenges. p. 1287–1299, 2007.

PIERONE, M. de P.; PIRES, E. C. Desenvolvimento de um tratamento de efluentes da produção do antibiótico Cefamicina C em pequena escala. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo - USP. 2011. Disponível em: <<http://www.bv.fapesp.br/pt/bolsas/58714/desenvolvimento-de-um-tratamento-de-efluentes-da-producao-do-antibiotico-cefamicina-c-em-pequena-esc/>>. Acesso em: 12/09/2017.

PIMENTEL, M. P. et al. O Uso de *Artemia* sp. como Organismo-Teste para Avaliação da Toxicidade das Águas Residuárias do Beneficiamento da Castanha de Caju Antes e Após Tratamento em Reator Biológico Experimental. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 6, n. 1, p. 15–22, 2011.

PISTOS, C., TSANTILI-KAKOULIDOU, A., KOUPPARIS, M.,. Investigation of the retention/pH profile of zwitterionic fluoroquinolonas in reversed-phase and ioninteraction high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39:438-443.2005.

POSTIGO, C.; RICHARDSON, S. D. Transformation of pharmaceuticals during oxidation / disinfection processes in drinking water treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 279, p. 461–475, 2014.

PULGARÍN, C. et al. Degradation of 32 emergent contaminants by UV and neutral photo-fenton in domestic wastewater effluent previously treated by activated sludge. **Water Research**, v. 46, n. 6, p. 1947–1957, 2012.

RATOLA, N. et al. Occurrence of organic microcontaminants in the wastewater treatment process. A mini review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 239–240, p. 1–18, 2012.

REMANE, D. et al. Systematic investigation of ion suppression and enhancement effects of fourteen stable-isotope-labeled internal standards by their native analogues using atmospheric-pressure chemical ionization and electrospray ionization and the relevance for multi-anal. **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, n. 24, p. 3567–3577, 2010.

RODRIGUES, M. V. N. et al. O emprego de técnicas hífenadas no estudo de plantas medicinais. **Multi Ciência**, n. October 2006, p. 14, 2006.

RODRÍGUEZ-GIL, J. L. et al. Heterogeneous photo-Fenton treatment for the reduction of pharmaceutical contamination in Madrid rivers and ecotoxicological evaluation by a miniaturized fern spores bioassay. **Chemosphere**, v. 80, n. 4, p. 381–388, 2010.

ROSAL, R. et al. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. **Water Research**, v. 44, n. 2, p. 578–588, 2010.

ROSS, L.; RILEY, M. Solubilities of Some Variously Quinolone Antimicrobials Substituted. **International journal of pharmaceutics**, v. 63, p. 237–250, 1990.

SANTOS, L. H. M. L. M. et al. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, n. 1–3, p. 45–95, 2010.

SANTOS, L. V. DE S.; MEIRELES, A. M.; LANGE, L. C. Degradation of antibiotics norfloxacin by Fenton, UV and UV/H₂O₂. **Journal of Environmental Management**, v. 154, p. 8–12, 2015.

SARMAH, A. K.; MEYER, M. T.; BOXALL, A. B. A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. **Chemosphere**, v. 65, n. 5, p. 725–759, 2006.

SCHMITT-KOPPLIN, P. et al. Development of capillary electrophoresis methods for the analysis of fluoroquinolones and application to the study of the influence of humic substances on their photodegradation in aqueous phase. **Journal of Chromatography A**, v. 837, n. 1–2,

p. 253–265, 1999.

SHEN, L. L.; BARANOWSKI, J.; PERNET, A. G. Mechanism of Inhibition of DNA Gyrase by Quinolone Antibacterials: Specificity and Cooperativity of Drug Binding to DNA.

Biochemistry, v. 28, n. 9, p. 3879–3885, 1989.

SINCERO, A.P.; SINCERO, G.A. Physical-Chemical Treatment of Water and Wastewater. IWA Publishing, 2002. 784 p. ISBN: 978-1843390282.

SKOOG, A.D. WEST, D.M. HOLLER, F.J. CROUCH, R.M. Fundamentos de Química Analítica, Tradução da 8ª Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2006.

SOUZA, L. M. **Aplicações da Espectrometria de Massas e da Cromatografia Líquida na Caracterização Estrutural de Biomoléculas de Baixa Massa Molecular**. [s.l.]

Universidade Federal do Paraná - UFPR, 2008.

STEVANI, C.V. **Transformações Químico-ambientais II** - reações redox na presença de metais e microrganismos. Instituto de Química, Universidade Federal de São Paulo - USP, 2004.

oxidação com desinfetantes STURINI, M. et al. Sunlight-induced degradation of fluoroquinolones in wastewater effluent: Photoproducts identification and toxicity.

Chemosphere, v. 134, p. 313–318, 2015.

TAMTAM, F. et al. Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. **Science of the Total Environment**, v. 393, n. 1, p. 84–95, 2008.

TEIXEIRA, C. P. D. A. B.; JARDIM, W. D. F. **Processos Oxidativos Avançados: conceitos teóricos. Caderno Temático**. [s.l.: s.n.].

TEIXEIRA, D. C. **Avaliação da remoção de norfloxacino em solução aquosa utilizando a ozonização**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

TERNES, T. A. et al. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **Science of the Total Environment**,

v. 225, n. 1–2, p. 81–90, 1999.

UNITED STATES GEOLOGICAL SURVEY - USGS. Environmental Health - Toxic Substances Hydrology Program. Disponível em:]

UNITED STATES PHARMACOPEIA. Monography Development-Antivirals and Antimicrobials. Disponível em:

<http://www.pharmacoepia.cn/v29240/usp29nf24s0_m57650.html>. Acesso em: 17/03/2017.

VALCÁRCEL, Y. et al. Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the Madrid Region (Spain) and potential ecotoxicological risk. **Chemosphere**, v. 84, n. 10, p. 1336–1348, 2011.

VALDEQUÍMICA. Ficha de informação de segurança de produtos químicos (FISPQ). Norfloxacino, versão 1- 2015. disponível em: < <http://www.valdequimica.com.br/wp-content/uploads/2016/06/NORFLOXACINO-BASE-FP.pdf>>. Acesso em: 25/04/2016.

VAN DOORSLAER, X. et al. Fluoroquinolone antibiotics: An emerging class of environmental micropollutants. *Science of the Total Environment*, v. 500–501, p. 250–269, 2014.

VON GUNTEN, U.; DODD, M. C.; BUFFLE, M. O. Oxidation of antibacterial molecules by aqueous ozone: Moiety-specific reaction kinetics and application to ozone-based wastewater treatment. **Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 6, p. 1969–1977, 2006.

VON SPERLING, M. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. 4ª Edição. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2014. 472p. (Princípios do tratamento biológico de águas residuárias; v.1).ISBN: 978-85-423-0053-6.

WANG, P.; HE, Y. L.; HUANG, C. H. Oxidation of fluoroquinolone antibiotics and structurally related amines by chlorine dioxide: Reaction kinetics, product and pathway evaluation. **Water Research**, v. 44, n. 20, p. 5989–5998, 2010a.

WANG, P.; HE, Y. L.; HUANG, C. H. Oxidation of fluoroquinolone antibiotics and structurally related amines by chlorine dioxide: Reaction kinetics, product and pathway

evaluation. **Water Research**, v. 44, n. 20, p. 5989–5998, 2010b.

WATKINSON, A. J. et al. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 8, p. 2711–2723, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Guidelines for drinking-water quality.WHO chronicle**. Geneva - Switzerland: [s.n.].

WUNDERLIN, D. A. et al. Occurrence and bioaccumulation of pharmaceuticals in a fish species inhabiting the Suquía River basin (Córdoba, Argentina). **Science of the Total Environment**, v. 472, p. 389–396, 2014.

XU, Y. et al. The occurrence and removal of selected fluoroquinolones in urban drinking water treatment plants. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 12, p. 729, 2015.

XU, Y. et al. Evaluation of the oxidation of enrofloxacin by permanganate and the antimicrobial activity of the products. **Chemosphere**, v. 144, p. 113–121, 2016.

YAMASHITA, M.; FENN, J. B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. **Journal of Physical Chemistry**, v. 88, n. 20, p. 4451–4459, 1984.

YING, G. G. et al. Simultaneous determination of four classes of antibiotics in sediments of the Pearl Rivers using RRLC-MS/MS. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 16, p. 3424–3432, 2010.

ZHANG, H.; HUANG, C. H. ZHANG, H.; HUANG, C. H. Oxidative transformation of fluoroquinolone antibacterial agents and structurally related amines by manganese oxide. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 12, p. 4474–4483, 2005. Oxidative transformation of fluoroquinolon. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 12, p. 4474–4483, 2005.

ZIOLLI, R. L.; JARDIM, W. F. Mecanismo de fotodegradação de compostos orgânicos catalisada por TiO₂. **Quimica Nova**, v. 21, n. 3, p. 319–325, 1998.

