



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA**  
**AMBIENTAL**

Degradação de microcontaminantes emergentes  
e Inativação de *E. coli* resistentes a antibióticos  
por Processos Oxidativos Avançados

**CAMPINA GRANDE**

**2016**

**Andreza Costa Miranda**

**Degradação de microcontaminantes emergentes e inativação de cepa de *E. coli*  
resistentes a antibióticos por Processos Oxidativos Avançados**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Ambiental. Ambiental para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Ambiental.

**Orientador: Prof. Dr. Wilton Silva Lopes**

**Co-orientador: Prof. Dr. Luigi Rizzo**

Campina Grande – PB

2016

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

M672d Miranda, Andreza Costa.

Degradação de microcontaminantes emergentes e inativação de E. coli resistentes a antibióticos por Processos Oxidativos Avançados [manuscrito] / Andreza Costa Miranda. - 2016.  
148 p. : il.

Digitado.

Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologia, 2016.

"Orientação: Prof. Dr. Wilton Silva Lopes, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental".

1. Resistência a antibióticos. 2. Processos Oxidativos Avançados. 3. Cromatografia líquida. 4. Citotoxicidade. 5. Microcontaminantes. I. Título.

21. ed. CDD 628

## DEDICATÓRIA

*A minha mãe Marlene do Nascimento Costa  
pelo apoio incondicional, amor e amizade. É o bem  
mais precioso que já existiu na face da terra, a  
mãe nunca te abandona em momento algum.*

## **CERTEZA**

De tudo ficaram 3 coisas:

A certeza de que estamos sempre começando

A certeza de que precisamos continuar

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar

Portanto devemos:

Fazer da interrupção um novo caminho

Da queda, um passo de dança

Do medo, uma escada

Do sonho, uma ponte

Da procura, um encontro

**Fernando Sabino**

## **AGRADECIMENTOS**

**“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”**

*(Antoine de Saint-Exupéry)*

Inicialmente, a mais profunda gratidão a **Wilton Silva Lopes**, meu orientador, que tive a oportunidade de conhecer desde as minhas primeiras atividades de iniciação científica. Desde essa época, pude descobrir o grande profissional e a pessoa generosa que é. O meu muito obrigada pelas oportunidades que a mim foram oferecidas durante o doutorado, pela paciência e por acreditar no meu trabalho e, acima de tudo, obrigada por sua amizade.

Ao professor **Luigi Rizzo**, pela disponibilidade em orientar no período do doutorado sanduíche na Universidade de Salerno–Itália, pelas discussões sempre repletas de ensinamentos que me fizeram crescer e aprender muito. Agradeço a sua gentileza, dedicação e oportunidade oferecida.

Aos Professores **Beatriz Ceballos** e **José Etham**, pela disponibilidade em ajudar, esclarecer dúvidas, dar sugestões e aceitar em compor a banca de defesa.

A **Josivandro do Nascimento Silva** pela disponibilidade em ajudar nas análises de cromatografia e na realização da pesquisa, pela gentileza em esclarecer dúvidas, por estar sempre por perto apoiando com palavras de otimismo e amizade. Muito obrigada por tudo!

Aos amigos do Laboratório de Química Sanitária e Ambiental – LAQUISA, Virgínia Albuquerque, Eyre Katrine, Alúcio Silva e Railson Ramos. A todos os colegas do programa de pós graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental em especial Geovania Cordeiro, Fernanda do Monte e Edilma Dantas pela amizade construída. Agradeço por estarem comigo nos momentos bons e ruins, sempre me apoiando e fazendo-me acreditar que tudo daria certo.

As minhas amigas Sátiva Villar e Vanessa Silva pela amizade sincera (há mais de 10 anos) e pelas palavras de apoio e incentivo que nunca faltaram.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba e ao secretário Josemberg Moura por sempre se dispor a ajudar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e ao Programa de Doutorado-sanduiche no Exterior (PDSE) por ter subsidiado a pesquisa de doutorado no exterior.

## RESUMO

Alguns micropoluentes têm causado preocupações às autoridades no que diz respeito à quão tóxico podem ser a organismos humanos e os tratamentos convencionais utilizados nas estações de tratamento de água que não são eficientes em suas remoções. Dentre os micropoluentes, atualmente presentes no ambiente, destacam-se microcistina-LR, pesticidas organofosforados (profenofós), fármacos veterinários (Ivermectina) e bactérias resistentes a antibióticos. Os baixos níveis de concentração dos microcontaminantes encontrados no ambiente exigem etapas de tratamento eficientes e desenvolvimento de técnicas analíticas para quantificação e identificação segura desses compostos. Essa tese foi dividida em duas etapas. Na primeira etapa foi comparado os processos oxidativos avançados  $H_2O_2/UV$ ,  $TiO_2/UV$  e  $N-TiO_2/UV$  com a cloração na inativação de cepas de *Escherichia coli* resistente a antibióticos presentes em água superficial. Sob estas condições, a cloração com concentração inicial de cloro em 1,0 mg/L foi o processo mais eficiente a obter a inativação de uma população inicial de  $10^6$  UFC/100mL. Além disso, os processos de desinfecção com  $H_2O_2/UV$  e cloração foram avaliadas em termos de potencial de citotoxicidade por meio do teste colorimétrico MTT com linhagem de células derivadas dos seres humanos, os resultados mostraram que ambos os processos de desinfecção afetaram similarmente a viabilidade das células HepG2. Na segunda etapa do trabalho foram realizados estudos com três fases fundamentais: (1) Avaliar a degradação dos microcontaminantes (profenofós, microcistina-LR e ivermectina) por processo  $H_2O_2/UV$ ,  $H_2O_2$  e UV; (2) validar metodologia de técnicas analíticas para quantificação dos microcontaminantes em amostras de água por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CLAE/MS) e; (3) Identificar os subprodutos formados com o auxílio do espectrômetro de massas com interface de ionização electrospray (ESI). A validação do método para identificação e quantificação dos microcontaminantes foi realizada por HPLC-ESI-MS/MS. Os resultados de validação calculados atenderam todas as exigências das normas consultadas e mostrou-se adequado para analisar amostras de água contendo os contaminantes estudados. Na etapa de degradação, dentre os processos utilizados, o processo  $H_2O_2/UV$  apresentou os melhores resultados de fotodegradação, seguido por radiação UV.

**Palavras-chaves:** resistência a antibióticos, profenofós, microcistina-LR, ivermectina, cromatografia líquida, espectrometria de massa, subprodutos de oxidação, citotoxicidade

## **ABSTRACT**

Some micropollutants have been causing concern to health authorities with regard how they can be toxic to humans and if the conventional water treatment plants are effective for their removal. Among micropollutants currently present in the environment stand out microcystin-LR, organophosphorus pesticides (profenofos), veterinary drugs (Ivermectin) and antibiotic resistant bacteria. The low concentration of these micropollutants found in the environment requires efficient treatment and development of analytical techniques for the quantification and identification these compounds. This work was divided in two phase. In the first phase the Advanced Oxidation Processes (AOPs), namely H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV, TiO<sub>2</sub> /UV and N-TiO<sub>2</sub> /UV, have been compared with chlorination in the inactivation of an AR *Escherichia coli* (*E. coli*) strain in surface water.. Under the investigated conditions, chlorination (1.0 mg/L) was the faster process (2.5 min) to achieve total inactivation (6 Log). Among POA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV resulted in the best inactivation rate. Moreover, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV and chlorination processes were evaluated in terms of cytotoxicity potential by means of MTT colorimetric test on a human-derived cell line and they similarly affected HepG2 cells viability. In the second phase, three fundamental aspects were evaluated: (1) degradation of micropollutants, profenofós (PFF), microcystin-LR (MC-LR) and ivermectin (IV) by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e UV; (2) validate the method for LC-MS/MS; (3) identification of oxidation by-products (OBPs) in finished water. The LC-MS/MS method for quantification of MC-LR and PFF showed good linearity with fitness coefficient (r) >0.99 and (r) >0.98, respectively. The precision, obtained was considered satisfactory. The limits of detection (LD) and quantification (LQ) were lower the Brazilian drinking water standard, suggesting the applicability of the method for the drinking water quality control .Among POA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV resulted in the best degradation of the micropollutants.

**Keywords:** antibiotic resistance, profenofos, microcystin LR, ivermectin, liquid chromatography, mass spectrometry, cytotoxicity MTT assay, oxidation by-products

## **LISTA DE FIGURAS**

### **CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Figura 2.1: Estruturas moleculares dos principais pesticidas organofosforados.....	9
Figura 2.2: Arranjo estrutural do pesticida do profenofós .....	10
Figura 2.3: Estrutura química da Ivermectina .....	12
Figura 2.4: Esquema da estrutura molecular da microcistina .....	15
Figura 2.5: Faixa de radiação UV e espectros de radiação de diferentes lâmpadas UV .....	22
Figura 2.6: Ilustração esquemática do processo fotocatalítico .....	26
Figura 2.7: Esquema de componentes típicos da CLAE.....	31
Figura 2.8: Esquema de nebulização de fonte IEN .....	32
Figura 2.9: Diagrama funcional do sistema de EM triplo quadrupolo .....	35

### **CAPÍTULO 3: BACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS**

Figura 3.1: Rio Tusciano localizado na província de Salerno.....	53
Figura 3.2: Reator fotocatalítico do trabalho.....	54
Figura 3.3: Espectro de intensidade de luz de 250 W da lâmpada usada em experimentos de fótons.....	55
Figura 3.4: Inativação de <i>E. coli</i> RA utilizando H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e UV-A (lâmpada germicida 250 W) .....	59
Figura 3.5: Inativação de <i>E. coli</i> RA por Fotocatálise Heterogênea (lâmpada germicida 250 W) com concentração fixa de 0,05 g/L.....	60
Figura 3.6: Viabilidade celular normalizada de células de HepG2 após 24 h de exposição para as amostras de água tratada pelo processo H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV. ....	63
Figura 3.7: viabilidade celular normalizada por células HepG2 após 24 h exposta as amostras de água tratada por cloração. ....	64

### **CAPÍTULO 4: DEGRADAÇÃO DE PESTICIDA ORGANOFOSFORADO**

Figura 4.1: Valor predito x Valor observado para o modelo quadrático usando resposta global. ....	81
Figura 4.2: Curva de distribuição de superfície plotado para remoção de PFF em função de: (A) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e tempo (min); (B) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e pH; (C) pH e tempo.....	82
Figura 4.3: Degradação de PFF usando lâmpada UV (lâmpada germicida 45 W) .....	83

Figura 4.4: Espectro de massa com os picos resultantes da fotodegradação no tempo de 5 min.....	85
Figura 4.5: Espectro de massa com os picos resultantes da fotodegradação no tempo de 15 min.....	86
Figura 4.6: Fragmentos clássicos dos subprodutos gerados por processo fotocatalítico .....	86
Figura 4.7: Rota de degradação proposta para o profenofós .....	88

## **CAPÍTULO 5: DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA-LR**

Figura 5.1: Estrutura da molécula de MC-LR ( $C_{49}H_{74}N_{10}O_{12}$ ).....	98
Figura 5.2: Curva de degradação de MC-LR .....	103
Figura 5.3: Espectro de massas no tempo de reação de 5 min.....	105
Figura 5.4: Espectro de massas no tempo de degradação de 15 min.....	105
Figura 5.5: Subprodutos de MC-LR no processo de UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	107

## **CAPÍTULO 6: DEGRADAÇÃO DE FÁRMACO VETERINÁRIO**

Figura 6.1: Espectros de absorção para solução de 10, 20, 30, 40, 50 mg/L de Ivermectina.....	118
Figura 6.2: Degradação de 30 mg/L de ivermectina usando concentração 4,0 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e pH=9.....	121
Figura 6.3: Curva de distribuição de superfície plotado em função do ponto central de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . .....	124
Figura 6.4: Fórmula molecular dos fragmentos encontrados por espectrometria de massa na condição 02 do planejamento Box-Behnken.....	127

## **LISTA DE TABELAS**

### **CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Tabela 2.1: Potencial de oxidação de algumas espécies.....	19
Tabela 2.2: Vantagens e desvantagens para tratamento de contaminantes químicos em água .....	20
Tabela 2.3: Processos de oxidação avançada para o tratamento de água .....	21

### **CAPÍTULO 4: DEGRADAÇÃO DE PESTICIDA ORGANOFOSFORADO**

Tabela 4.1: Faixa experimental e níveis de variáveis independentes .....	77
Tabela 4.2: DBB com as respostas observadas e os valores previstos para eficiência de remoção de PFF. ....	79
Tabela 4.3: A análise de variância para o modelo polinomial quadrático na eficiência de remoção de PFF. ....	80
Tabela 4.4: Fórmula molecular dos íons precursores identificados pela dissociação induzida do PFF .....	84
Tabela 4.5: Dados de cálculo para LD e LQ em HPLC-MS. ....	90
Tabela 4.6: Dados utilizados para os cálculos de precisão .....	91

### **CAPÍTULO 5: DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA-LR**

Tabela 5.1: Valores dos LD e LQ .....	108
Tabela 5.2: Valores da precisão do método para MC-LR.....	109
Tabela 5.3: Valores da exatidão do método para MC-LR.....	109

### **CAPÍTULO 6: DEGRADAÇÃO DE FÁRMACO VETERINÁRIO**

Tabela 6.1: Distribuição dos fatores e níveis utilizados na matriz de planejamento Box Behnken .....	120
Tabela 6.2: Matriz Box-Behnken para a degradação de 30 mg/L de Ivermectina .....	122
Tabela 6.3: Análise de variância (ANOVA) após o planejamento Box-Behnken para a variável resposta degradação de Ivermectina. Os valores destacados em vermelhos são significativos, enquanto os destacados em preto são não significativos.....	125

## **LISTA SE ABREVIATURAS**

<b>BRA</b>	Bactéria resistente a antibiótico
<b>BRMD</b>	Bactérias resistente à múltipla droga
<b>BC</b>	Banda de condução
<b>BV</b>	Banda de valência
<b>CV</b>	Coefficiente de variação
<b>CE</b>	Contaminantes emergentes
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>DDB</b>	Design Bos-Behnken
<b>DIV</b>	Degradação de ivermectina
<b>DPR</b>	Desvio padrão relativo
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfoxido
<b>DAD</b>	Dose de assimilação diária
<b>EM</b>	Espectrometria de massas
<b>HepG2</b>	Carcinoma hepatocelular do fígado
<b>ID</b>	Intermediário de degradação
<b>IEN</b>	Ionização por Eletronebulização
<b>IV</b>	Ivermectina
<b>LD</b>	Limite de detecção
<b>LQ</b>	Limite de quantificação
<b>MRV</b>	Material de referência certificado
<b>MSR</b>	Metodologia de Superfície de Resposta
<b>MTT</b>	Ensaio de captação do corante Tetrazolium (atividade metabólica mitocondrial)
<b>OMS</b>	Organização mundial de saúde
<b>POA</b>	Processos oxidativos avançados
<b>RA</b>	Resistente a antibiótico
<b>SPD</b>	Subprodutos de desinfecção
<b>SBP</b>	Subprodutos
<b>THM</b>	Trihalometano

ANDREZA COSTA MIRANDA

Degradação de microcontaminantes emergentes e Inativação de *E. coli* resistentes a antibióticos por processos oxidativos avançados

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, da Universidade Estadual da Paraíba, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Engenharia ambiental.

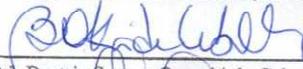
Área de concentração: Tecnologias de tratamento de águas e resíduos

Aprovada em 13/09/2016

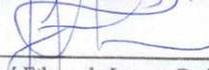
BANCA EXAMINADORA



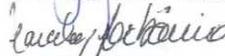
Prof. Dr. Wilton Silva Lopes (Orientador)  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



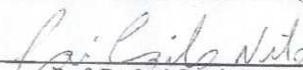
Prof. Dr. Beatriz Susana Ovruski de Ceballos  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. José Etham de Lucena Barbosa  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Marcelo Libânio  
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)



Prof. Dr. José Capelo Neto  
Universidade Federal do Ceará (UFCE)

## **SUMÁRIO**

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1. CONTAMINANTES ESPECÍFICOS DA TESE	4
1.2. ESTRUTURA DA TESE	4
1.3. REFERÊNCIAS	6
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>8</b>
2.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS CONTAMINANTES ESTUDADOS:	8
2.1.1. PESTICIDA ORGANOFOSFORADO – PROFENOFÓS	8
2.1.2. FÁRMACO VETERINÁRIO - IVERMECTINA	10
2.1.3. CIANOTOXINAS – MICROCISTINA	13
2.1.4. BACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS	17
2.2. PRINCÍPIOS DE PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS	19
2.2.1. PROCESSO H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV	23
2.2.2. FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA	25
2.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS	30
2.3.1. ANALISADORES DE MASSAS	33
2.4. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	35
2.4.1. SELETIVIDADE	36
2.4.2. LINEARIDADE	37
2.4.3. LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	37
2.4.4. PRECISÃO	38
2.4.5. EXATIDÃO	39
2.4.6. ROBUSTEZ	41

<b>2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>42</b>
<b><u>3. DESINFECÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS</u></b>	<b><u>48</u></b>
<b>3.1. INTRODUÇÃO</b>	<b>50</b>
<b>3.2. METODOLOGIA</b>	<b>52</b>
3.2.1. AMOSTRA DA ÁGUA DO RIO TUSCIANO	52
3.2.2. SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS DE E. COLI RESISTENTES	53
3.2.3. PREPARAÇÃO DA ÁGUA DE ESTUDO	54
3.2.4. EXPERIMENTO DE DESINFECÇÃO COM POAS	54
3.2.5. EXPERIMENTO COM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV	55
3.2.6. EXPERIMENTOS FOTOCATALÍTICOS	55
3.2.7. EXPERIMENTOS DE CLORAÇÃO	56
3.2.8. CONTAGEM DE BACTÉRIAS	56
3.2.9. CULTURA DE CÉLULAS HEPG2	57
3.2.10. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	57
<b>3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>58</b>
3.3.1. INATIVAÇÃO DE E. COLI RESISTENTES POR UV E H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV	58
3.3.2. INATIVAÇÃO DE E. COLI RESISTENTES A ANTIBIÓTICO POR FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA	59
3.3.3. TESTE DE CLORAÇÃO	61
3.3.4. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS SUBPRODUTOS FORMADOS NO PROCESSOS DE CLORAÇÃO E H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV	62
<b>3.4. CONCLUSÃO</b>	<b>64</b>
<b>3.5. REFERÊNCIAS</b>	
<b><u>4. DEGRADAÇÃO DE PESTICIDA ORGANOFOSFORADO</u></b>	<b><u>72</u></b>

<b>4.1. INTRODUÇÃO</b>	<b>73</b>
<b>4.2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>75</b>
4.2.1. REAGENTES	75
4.2.2. EXPERIMENTOS DO PROCESSO FOTOCATALÍTICO HOMOGÊNEO - H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV	75
4.2.3. OTIMIZAÇÃO USANDO PLANEJAMENTO DESIGN BOX-BEHNKEN	76
4.2.4. PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	77
4.2.6. PARÂMETROS PARA VALIDAÇÃO DO MÉTODO	78
<b>4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>79</b>
4.3.1. EXPERIMENTOS DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV PELO PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO BOX-BEHNKEN	79
4.3.2. IDENTIFICAÇÃO DOS SUBPRODUTOS DE PFF	83
4.3.3. CONSUMO DE ENERGIA ESPECÍFICA	89
4.3.4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO EM HPLC-MS	89
<b>4.4. CONCLUSÃO</b>	<b>91</b>
<b>4.5. REFERÊNCIAS</b>	<b>92</b>
<b>5. DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA-LR</b>	<b>95</b>
<b>5.1. INTRODUÇÃO</b>	<b>97</b>
<b>5.2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>99</b>
5.2.1. REAGENTES E SOLUÇÕES	99
5.2.2. CULTIVO DAS CEPAS DE MICROCYSTIS AERUGINOSA E PREPARAÇÃO DA ÁGUA DE ESTUDO	99
5.2.3. EXPERIMENTO FOTOQUÍMICO	100
5.2.4. PARÂMETROS PARA VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	100
5.2.5. PARÂMETROS ANALÍTICOS	102
<b>5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>102</b>
5.3.1. RESULTADOS DO EXPERIMENTO DE OXIDAÇÃO	102
5.3.2. SUBPRODUTOS DE MC-LR POR PROCESSO H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV	104

5.3.3. RESULTADOS DA VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CLAE-MS/MS	107
<b>5.4. CONCLUSÃO</b>	<b>110</b>
<b>5.5. REFERÊNCIAS</b>	<b>111</b>
<b><u>6. DEGRADAÇÃO DE FÁRMACO VETERINÁRIO</u></b>	<b><u>114</u></b>
<b>6.1. INTRODUÇÃO</b>	<b>116</b>
<b>6.2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>118</b>
6.2.1. CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A DEGRADAÇÃO DA IVERMECTINA	118
6.2.2. ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO	119
6.2.3. PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO BOX-BEHNKEN	119
<b>6.3. RESULTADOS</b>	<b>120</b>
6.3.1. EFEITO DAS VARIÁVEIS H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , TEMPO E PH NA DEGRADAÇÃO DE IVERMECTINA	122
6.3.2. ESPECTROMETRIA DE MASSA	126
<b>6.4. CONCLUSÃO</b>	<b>128</b>
<b>6.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>129</b>

# **CAPÍTULO 1**

**Introdução e estrutura da tese**

---

# 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento das instrumentações analíticas automatizadas e altamente sensíveis ocorreu em meados do século XX e início do século XXI. Esse avanço analítico possibilitou inúmeras descobertas de substâncias presentes no meio ambiente que antes não eram detectáveis, apesar de existirem há bastante tempo (Barber 2013; Birkholz et al. 2014). Quando essas substâncias passaram a ser detectadas analiticamente os pesquisadores não tinham o conhecimento sobre os efeitos ecotoxicológicos da época e passaram a denominar de contaminantes emergentes (CE) (Birkholz *et al.*, 2014).

Estes contaminantes, especificamente os microcontaminantes ou micropoluentes emergentes, estão presentes nas substâncias novas, dentre as milhares que são produzidas anualmente e as que estarão entrando no mercado, sobre as quais irão conhecer os riscos ambientais e risco à saúde daqui há algumas décadas, e nas substâncias não tão recentes, já amplamente consumidas e que, nos dias de hoje, tem preocupado pesquisadores no mundo todo quanto a sua presença no ambiente devido à suspeita de efeitos prejudiciais causados à saúde e a biota por causa das exposições crônicas (Houtman 2010).

Os microcontaminantes pertencem a diversas classes de compostos, incluindo os agrotóxicos, drogas ilícitas, fármacos, produtos de higiene pessoal, estrogênios, alquilfenóis e seus derivados, além dos subprodutos provenientes dos processos de desinfecção de água e alguns microrganismos e cianotoxinas (Pal et al. 2014). Estas substâncias são constantemente introduzidas no ambiente em larga escala e ocasionam impactos negativos à saúde ambiental por um período de tempo relativamente longo (Rodriguez et al. 2011). Apresentam propriedades físicas e químicas como persistência, volatilidade ou lipofilicidade e são tipicamente detectadas com concentrações muito reduzidas (ng, µg ou pg/L) e com significância toxicológica de complexa avaliação (Taylor & Senac 2014).

Dentre estes microcontaminantes estão as drogas antimicrobianas, tanto na medicina veterinária quanto humana. O uso abusivo de antibióticos tem causado grande impacto na saúde pública, já que os microrganismos patogênicos são dinâmicos e, constantemente, alteram seu fenótipo com mecanismo de adaptação as pressões do meio ambiente. Frente ao constante uso dos antimicrobianos, os microrganismos desenvolvem alternativas para anular seu efeito e adquirir o perfil de resistência à ação desses fármacos (Oliveira &

Freitas 2013). As estações de tratamento de águas residuárias são as principais rotas de bactérias resistentes a antibióticos (BRAs) no meio ambiente, principalmente as baseadas em processos biológicos (Rizzo, Sannino, et al. 2014). O lançamento das BRAs no meio ambiente pode estar ligado a três fatores: (i) descarga de esgotos sem tratamento prévio, (ii) ausência do processo de desinfecção nos efluentes de ETAs e (iii) processos de desinfecção inadequado como cloração ou radiação ultravioleta. A entrada desses microrganismos resistentes aos ecossistemas aquáticos naturais possibilita a transferência de genes resistentes que modificam o genoma bacteriano dos microrganismos pertencentes ao meio (Hoa et al. 2011 e Verlicchi et al. 2010).

Nos contextos supracitados, pode-se considerar que os corpos de água naturais são potenciais reservatórios de microcontaminantes emergentes incluindo as BRA, cianotoxina, fármacos e pesticidas. Ao passo que estas fontes de água são destinadas para o uso de abastecimento público, sérias preocupações surgem para as empresas produtoras de água potável, pois o método de tratamento convencional (coagulação/floculação, sedimentação e filtração) não remove os microcontaminantes da água. Ademais, o processo unitário comumente utilizado na barreira de segurança das ETAs, apenas com desinfetantes químicos, como dióxido de cloro, cloraminas e, em especial, o cloro, não removem eficazmente os microcontaminantes alvo. Além disso, o uso do cloro como oxidante promove a formação de subprodutos de desinfecção (SPD) como trihalometanos, ácidos haloacéticos, entre outros compostos halogenados, que podem causar riscos à saúde pública. A desinfecção com cloro é eficaz na inativação de microrganismos patogênicos presentes na água, mas também são poderosos oxidantes de matéria orgânica (ácidos fúlvicos e húmicos) e contaminantes antropogênicos presentes em muitas fontes de águas naturais, e cada contaminante submetido ao processo de oxidação química, produz um conjunto de subprodutos que podem ser mais tóxicos do que o composto original.

Deste modo, diferentes técnicas de tratamentos para serem utilizadas nas ETAs estão sendo analisadas como ozônio, peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radiação ultravioleta (UV) e processos oxidativos avançados (POAs). Os POAs são alternativas de tratamento de água com significativa importância na restauração ambiental, degradando diversos micropoluentes. Podem, ainda, ser combinados com outras tecnologias de tratamento, utilizados como pré ou pós-tratamento para melhoria de sua eficiência. Atualmente, existe uma diversidade de POAs que são classificados de acordo com a fase do catalizador e a

presença ou ausência de radiação UV. No entanto, todos eles são baseados no princípio de produzir radicais hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ). Os processos oxidativos avançados têm sido amplamente estudado para remoção de grande variedade de contaminantes. Porém, apesar de na literatura científica estarem disponíveis vários estudos, muitos POAs precisam ser analisados quando aplicados em águas destinadas ao abastecimento público, para que assim a segurança da água seja garantida, evitando por conseguinte a formação de subprodutos de oxidação prejudiciais à saúde.

### Motivação

A seleção do processo de tratamento de água depende da qualidade requerida ao final do processo e de sua aplicação (como desinfecção, descarte no ambiente ou reuso). Os tratamentos oxidativos, baseados em tecnologias fotoquímicas, empregam energia radiante com comprimento de onda que geram quantidades desprezíveis de calor e, conseqüentemente, não são conduzidos em altas temperaturas. Esta condição traz vantagens operacionais: (i) melhores condições de equilíbrio para reações exotérmicas; (ii) condições mais favoráveis para operação na fase aquosa; e (iii) minimização de produtos secundários indesejáveis quando o processo é bem projetado (Cassano, 1995).

Nas últimas décadas, foram desenvolvidos processos fotoquímicos para operação em larga escala. Na Europa, muitas estações de tratamento de água potável usam tecnologia de desinfecção UV. Nos Estados Unidos, há mais de 500 plantas com reatores fotoquímicos com capacidade operacional de 158 a 3200  $\text{m}^3 \text{h}^{-1}$ . Em Québec (Canadá) o tratamento é feito desde 1986.

A empresa responsável pelo tratamento de água no Norte da Holanda desenvolveu um projeto em escala piloto com a aplicação do processo  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$  na degradação de vários micropoluentes, incluindo pesticidas (atrazina), disruptores do sistema endócrino (bisfenol A), microcistina e produtos farmacêuticos, utilizando lâmpada de média pressão e concentração de peróxido de 6 mg/L e obteve resultado acima de 80%. Devido ao sucesso da aplicação do processo  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$  foi instalado, em 2004, um sistema em larga escala com o fluxo de 4000  $\text{m}^3 \text{h}^{-1}$ . No ano de 2007, outro sistema foi instalado na Holanda para remoção de pesticidas com um fluxo de 6000  $\text{m}^3/\text{h}$  (Linden & Mohseni 2013). Resultados assim estimulam o investimento nos tratamentos fotoquímicos, dada sua capacidade de mineralizar substâncias potencialmente tóxicas e recalcitrantes. Espera-se que o desenvolvimento desta área estimule a aplicabilidade dos POAs na

fotodegradação de compostos orgânicos em escala real, além de combiná-los com métodos tradicionais.

### **1.1. Contaminantes específicos da tese**

- (I) Bactérias resistentes a antibióticos (BRAs);
- (II) O organofosforado profenofós (PFF);
- (III) As microcistinas (MCs);
- (IV) Fármaco veterinário ivermectina (IV);

### **1.2. Estrutura da tese**

Capítulo 1: Refere-se à introdução, contendo a relevância e motivação do trabalho.

Capítulo 2: Corresponde à revisão de literatura sobre os conceitos e características das técnicas utilizadas para degradar os contaminantes alvos do trabalho. Abordagem geral de cada microcontaminantes estudados. Teoria das técnicas analíticas aplicadas, em especial, a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CLAE-IEN - EM/EM) e, por fim, uma breve revisão sobre validação de método analítico.

Capítulo 3: Desinfecção de água superficial por cloração e Processos Oxidativos Avançados: Inativação de cepas de *E. coli* resistentes a antibióticos (RA) e avaliação da citotoxicidade. Este capítulo reporta a comparação do efeito da cloração com POAs na desinfecção de cepas de *E. coli* (RA) isoladas de água superficial do rio Tusciano (Itália), e a avaliação da citotoxicidade dos subprodutos gerados na desinfecção por cloro e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV, pela viabilidade celular normalizada por células HepG2. Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do programa PDSE (Programa de Doutorado Sanduiche no Exterior) na Universidade de Salerno – Itália, pelo departamento de Engenharia Civil e Ambiental.

Capítulo 4: Degradação de Profenofós em solução aquosa por Processo Oxidativo Avançado homogêneo. Este capítulo refere-se a degradação dos PFF pelo processo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV, usando Luz UV-C de baixa pressão em escala de laboratório. Serão apresentados a via de degradação do contaminante e os subprodutos formados nos processos oxidativos. Os subprodutos serão identificados com espectrômetro de massa triplo quadrupolo.

Capítulo 5: Degradação de microcistina-LR (MC-LR) pelo processo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV: Identificação dos subprodutos de oxidação e validação do método por HPLC-MS. Este capítulo teve como objetivo validar uma metodologia analítica para quantificação de MC-LR em amostras de água; investigar a degradação de microcistina-LR em solução aquosa, aplicando peróxido (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), radiação ultravioleta (UV-C) e (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV); verificar os subprodutos formados na fotodegradação de MC-LR no processo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV; e sugerir uma rota de degradação da molécula.

Capítulo 6: Este capítulo descreve a otimização da degradação de ivermectina utilizando o processo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV: quantificação e identificação dos fragmentos gerados por espectroscopia UV e espectrometria de massa. O estudo de degradação foi otimizado através do planejamento Box-Beheken, composto de três níveis e três fatores, resultando em um total de dezoito experimentos. Em seguida, o melhor percentual de degradação de ivermectina foi selecionado para detectar os íons dos fragmentos gerados na degradação por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV

### 1.3.Referências

- Bai, X. et al., 2015. The drinking water treatment process as a potential source of affecting the bacterial antibiotic resistance. *Science of The Total Environment*, 533, pp.24–31.
- Barber, L.B., 2013. *Emerging Contaminants*, Elsevier Ltd.
- Birkholz, D.A., Stilson, S.M. & Elliott, H.S., 2014. 2.11 - *Analysis of Emerging Contaminants in Drinking Water – A Review*, Elsevier Ltd..
- Frontistis, Z. et al., 2015. UV and simulated solar photodegradation of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol in secondary-treated wastewater by hydrogen peroxide or iron addition. *Catalysis Today*, 252, pp.84–92.
- Hoa, P.T.P. et al., 2011. Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. *Science of the Total Environment*, 409(15), pp.2894–2901.
- Houtman, C.J., 2010. Emerging contaminants in surface waters and their relevance for the production of drinking water in Europe. *Journal of Integrative Environmental Sciences*, 7(4), pp.271–295.
- Linden, K.G. & Mohseni, M., 2013. *Advanced Oxidation Processes: Applications in Drinking Water Treatment*, Elsevier Ltd.
- Oliveira, J. De & Freitas, F.A. De, 2013. Os mecanismos de resistência bacteriana da Salmonella sp. frente à utilização de antibióticos. *Centro Científico Conhecer*, 9(16), pp.1131–1153.
- Pal, A. et al., 2014. Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle. *Environment International*, 71, pp.46–62.
- Rizzo, L., Sannino, D., et al., 2014. Applied Catalysis B : Environmental Effect of solar simulated N-doped TiO<sub>2</sub> photocatalysis on the inactivation and antibiotic resistance of an E. coli strain in biologically treated urban wastewater. “*Applied Catalysis B, Environmental*”, 144, pp.369–378.
- Rizzo, L., Ferro, G. & Manaia, C.M., 2014. Wastewater disinfection by solar heterogeneous photocatalysis: effect on tetracycline resistant / sensitive Enterococcus strains. , 16(3), pp.455–462.
- Rodriguez, S., Santos, A. & Romero, A., 2011. Effectiveness of AOP’s on abatement of emerging pollutants and their oxidation intermediates: Nicotine removal with Fenton's Reagent. *Desalination*, 280(1-3), pp.108–113.
- Verlicchi, P. et al., 2010. Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options. *Journal of Hydrology*, 389(3-4), pp.416–428.
- Zhang, D. et al., 2014. Removal of pharmaceuticals and personal care products in aquatic plant-based systems: A review. *Environmental Pollution*, 184, pp.620–639.

# **CAPÍTULO 2**

## **Revisão bibliográfica**

---

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Características gerais dos contaminantes estudados:

#### 2.1.1. *Pesticida organofosforado – Profenofós*

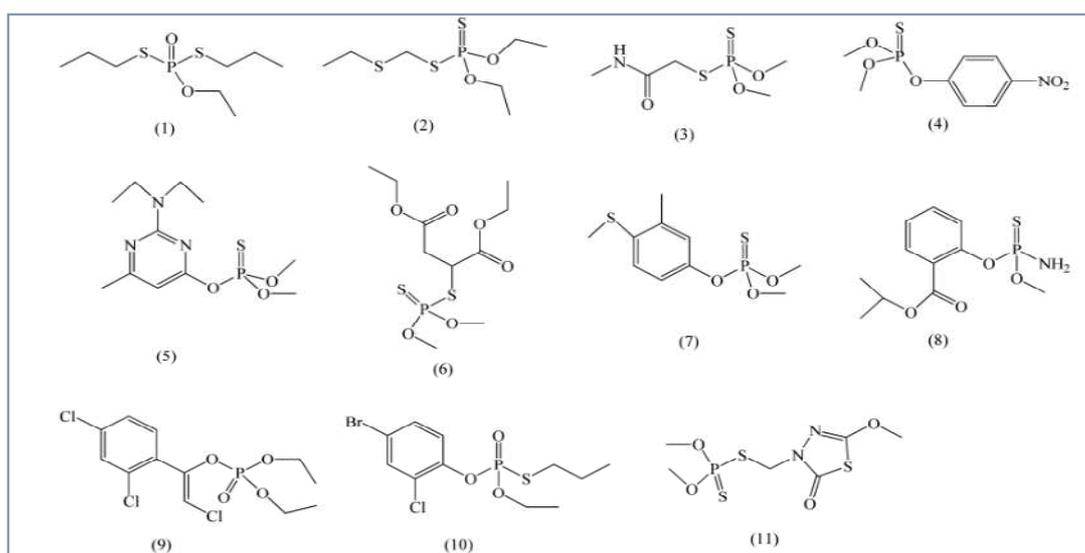
Nas últimas décadas, o aumento surpreendente da produção agrícola, batizado de revolução verde, tem como resultado o desenvolvimento de pesticidas sintéticos no controle de ervas daninhas e insetos. Os pesticidas são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, utilizados nos setores de produção, colheita, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas de alimentos, pastagens, proteção de florestas (nativas ou plantadas) e de outros ecossistemas (ambientes urbanos, hídricos e industriais) com a finalidade de alterar a composição da flora ou da fauna e preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (Kingston 2011).

Os problemas ambientais ocasionados pelo uso incorreto de pesticidas estão relacionados principalmente com o destino que estes compostos têm no meio ambiente, como a contaminação de solos agrícolas, de águas superficiais e subterrâneas, na atmosfera e nos alimentos (Cooper e Dobson, 2007). Os pesticidas em contato com o solo estão vulneráveis aos processos físico-químicos que controlam seu destino no ambiente, como adsorção, retenção, transformações de natureza biológica (degradação por microrganismos) ou química (quebra da molécula por fotólise ou hidrólise). A biodegradação pode ser considerada o principal mecanismo de degradação dos agrotóxicos no solo, devido à ação microbiana nas moléculas dos pesticidas (Aktar et al. 2009).

Os pesticidas podem ser transportados no ecossistema pelos processos de lixiviação, volatilização ou escoamento superficial, pondo em risco os recursos hídricos superficiais e subterrâneo a uma provável contaminação. Os pesticidas estão divididos em quatro classes toxicológicas, são elas: I = rótulo vermelho, II = rótulo amarelo, III = rótulo azul e IV = rótulo verde. A classe I abrange os compostos considerados altamente tóxicos para seres humanos, a II, os mediamente tóxicos, a III, os pouco tóxicos e a IV, os compostos considerados praticamente não-tóxicos.

Os pesticidas estão classificados de acordo com o tipo de praga que podem combater como botânicos, inorgânicos ou orgânicos. Os orgânicos estão divididos em compostos, cuja função orgânica básica contem: uma base nitrogenada, clorada, clorofosforado ou fosforado. A base fosfato forma uma classe de pesticidas organofosforados (POF) (Richardson & Makhaeva 2014). Os POF foram desenvolvidos para fins agrícola devido a sua elevada relação custo benefício. Por outro lado, a utilização desenfreada dos POF pode contaminar o solo, água subterrânea e superficial (Richardson & Makhaeva 2014).

As estruturas moleculares dos principais POF utilizados no mundo estão apresentadas na Figura (2.1), denominadas de: fenamifos (1), forato (2), dimetoato (3), metil paration (4), metil pirimifós (5), malation (6), fentião (7), isocarbofós (8), clorfenvinfos (9), profenofós (10) e metidationa (11) (Liu et al. 2013).



**Figura 2.1:** Estruturas moleculares dos principais pesticidas organofosforados.

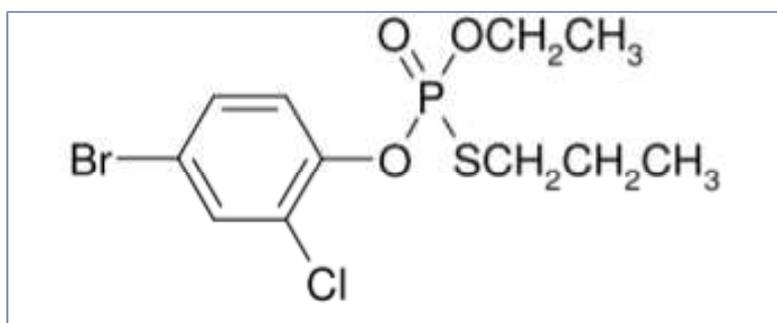
A maioria dos compostos organofosforados são inibidores da acetilcolinesterases como a acetilcolina (ACh), neurotransmissor responsável pelo funcionamento do sistema nervoso central (Grisolia 2005). Normalmente, a acetilcolina - após ser liberada - é degradada rapidamente por enzimas conhecidas como colinesterases. Os organofosforados são capazes de competir com a acetilcolina pelo sítio receptor localizado nas colinesterases e, dessa forma, bloqueiam a quebra da acetilcolina.

A extensão da inibição da enzima depende muito de fatores estéricos, isto é, do modo

como o inibidor se encaixa na enzima e também da natureza dos grupos orgânicos presentes. O acúmulo de acetilcolina nas junções da musculatura lisa, em humanos, provoca uma opressão torácica, salivação, lacrimejamento, aumento da sudorese, náuseas, vômitos, cólicas, diarreia e uma constrição das pupilas oculares (Grisolia 2005).

O profenofós (PFF) possui ação acaricida e inseticida, sendo o mais utilizado pelos agricultores. O uso mais comum é no combate em culturas de algodão, amendoim, batata, café, cebola, ervilha, feijão, feijão-vagem, girassol, mandioca, melancia, milho, pepino, repolho, soja, tomate e trigo. Estes alimentos, por sua vez, são diariamente consumidos pelos brasileiros. As vias de contaminação do PFF são: oral, inalatória, dérmica e mucosas. As causas indiretas à saúde humana, devido ao uso excessivo do pesticida profenofós, segue um caminho devastador quando acumulado no tecido gastro intestinal.

A estrutura do PFF é formado por um subgrupo S-alquil fosforotioato ligado a um anel benzeno halogenado, Figura (2.2). O mesmo é classificado como um pesticida moderadamente perigoso. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a molécula de profenofós possui toxicidade moderada (Classe toxicológica II) em contato dérmico ou ingestão do produto.



**Figura 2.2:** Arranjo estrutural do pesticida do profenofós

### 2.1.2. Fármaco veterinário - Ivermectina

Fármacos, de um modo geral, são produzidos com características de estabilidade suficientes para atingir o objetivo terapêutico ao qual são propostos, ou seja, são desenvolvidos para serem persistentes. Metabólitos dos fármacos, administrados em humanos e parte significativa não metabolizada, são excretados no esgoto doméstico e resistem aos processos convencionais de tratamento nas ETEs (Daughton 2016). Corpos d'água podem também ser contaminados por condições inadequadas de armazenagem e destinação de produtos não utilizados, ou com prazo de validade expirado, assim como

tratamentos administrados na aquicultura (Kemper 2008). Os fármacos administrados em animais também têm uma parte significativa excretada pelas fezes, cujo esterco, usado como fertilizante sem cuidado prévio, constitui uma via de contaminação de águas subterrâneas e dos solos, onde pode provocar a bioacumulação por meio de plantas e microrganismos. O mesmo pode ocorrer com a aplicação de lodo, proveniente de ETEs, na agricultura. Outra rota de entrada de fármacos no ambiente aquático é a disposição de resíduos de indústrias farmacêuticas em aterros sanitários, que podem contaminar a água subterrânea no entorno do aterro (Tiwari et al. 2011).

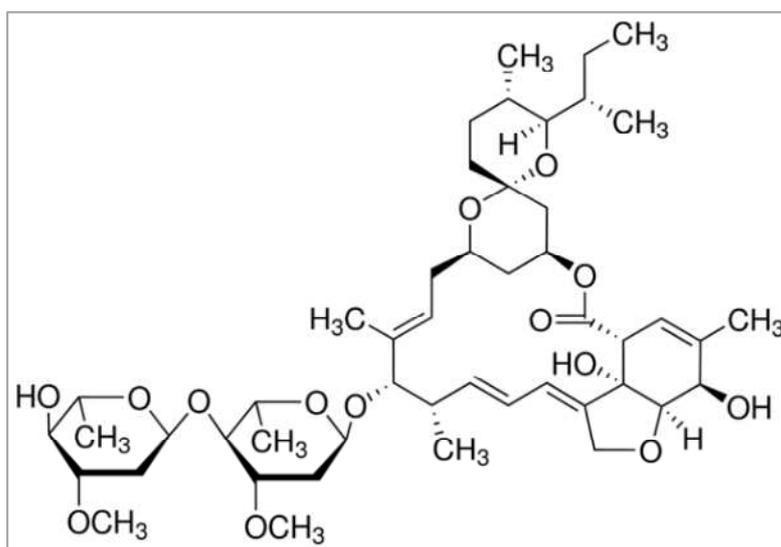
Quando não lançados diretamente no ambiente aquático, os fármacos podem alcançar o corpo hídrico por meio da lixiviação do solo. O princípio ativo e seus metabólitos podem se espalhar no ambiente a partir da aplicação de biossólidos oriundos de tratamento de esgoto sanitário. Mesmo quando o fármaco apresenta alta capacidade de adsorção no solo, ele pode ser encontrado em ambientes aquáticos, ainda que em menores concentrações. Atualmente, alguns motivos que levam preocupação à sociedade científica mundial são: o elevado potencial de disseminação de contaminantes entre os vários compartimentos ambientais, a ausência de estudos detalhados sobre o comportamento dos fármacos no meio ambiente, e a carência de dados quantitativos por tais substâncias que, por sua vez, resulta na carência de métodos de determinações analíticas adequadas às diversas matrizes ambientais (Woodward 2009).

A utilização de medicamentos veterinários é uma prática amplamente empregada e de grande valia para a profilaxia e tratamento de enfermidades em animais de produção, principalmente os antiparasitários (medicamentos de uso frequente na medicina veterinária). Uma gama destes produtos é encontrada no mercado. As avermectinas são os medicamentos veterinários mais usados na pecuária para tratamento de um amplo espectro de doenças parasitárias. Este medicamento compõe um grupo químico das lactonas macrocíclicas que são produtos da fermentação das bactérias gram-positivas, denominadas actinomicetos *Streptomyces* (Hou et al. 2006). O princípio ativo das avermectinas reage na junção neuro-muscular dos insetos, ou seja, nos receptores neurotransmissores e, com isso, bloqueia a transmissão de estímulos (Chung et al. 1999).

As avermectinas são compostas por abamectina, doramectina, eprimectina e ivermectina, Essas substâncias são utilizadas contra uma variedade de nematódeos e artrópodes (Lehner et al. 2009).

A ivermectina é uma lactona macrocíclica, pertencente à família das avermectinas,

originalmente isolada em 1975 como produto de fermentação da bactéria *Streptomyces avermitilis*, pertencente ao filo actinomiceto (Atakisi et al. 2009). Ela é composta por uma mistura de duas moléculas ativas, denominadas H2B1a,  $\geq 80\%$ , e H2B1b,  $\leq 20\%$  que diferem estruturalmente pela natureza do radical ligado ao carbono 25: 1-metilpropil e 2-propil, respectivamente, representadas na Figura (2.3). A avermectina B1 (abamectina, precursora da ivermectina) é a mais importante das avermectinas produzidas naturalmente. Nessa produção ocorrem duas moléculas homólogas, a B1a, que é produzida em muito maior quantidade, e a B1b. A ivermectina é, então, produzida pela saturação de uma dupla ligação na posição C22-23 (Beasley et al. 2006).



**Figura 2.3:** Estrutura química da Ivermectina

Após sua administração, cerca de 90% do fármaco pode ser excretado pelo organismo através das fezes, leite e urina, provocando mudanças nos organismos invertebrados que participam da degradação fecal (Tišler & Kožuh Eržen 2006). A concentração de ivermectina, nas fezes e no solo, pode ser considerado um importante indicador de impacto ecológico. Esta substância liga-se fortemente às fezes e podem persistir no solo durante um longo período de tempo, reduzindo a abundância e a diversidade da fauna presente no estrume, além de atrasar a degradação de compostos orgânicos, podendo interferir no reciclo dos nutrientes do solo (Iglesias et al. 2006). O deflúvio da água das chuvas, em pastagens, é um dos principais meios de transporte de resíduos de fármacos veterinários em cursos d'água. Dessa forma, os fármacos veterinários podem ser considerados poluentes de fontes difusas e suas concentrações nos corpos d'água podem variar de acordo com as chuvas, afetando os ecossistemas e a saúde

humana (Schweitzer et al. 2010), uma vez que muitos medicamentos podem resistir ao tratamento convencional de água.

### 2.1.3. Cianotoxinas – *Microcistina*

As cianobactérias ou "algas azuis" constituem um grupo diversificado de bactérias fotossintéticas oxigênicas que habitam uma grande variedade de ambientes aquáticos e terrestres, e mostram grande diversidade morfológica (Francis et al. 1988). Pertencem a um antigo grupo de microrganismos presentes no planeta há três bilhões de anos e apresentam uma combinação de características encontradas tanto em algas como em bactérias (Codd 2000; Berg et al. 1988). Em condições naturais, as cianobactérias vivem em equilíbrio com os demais grupos de algas. No entanto, em situações de enriquecimentos nutricionais, ou seja, eutrofização do corpo d'água e condições hidrológicas estáveis, pode ocorrer o aumento de abundância das espécies de cianobactérias, dando origem às florações (Dittmann & Wiegand 2006). As florações das cianobactérias causam impactos sociais, econômicos e ambientais, não apenas por sua biomassa contribuir para problemas estéticos, como alterações na coloração da água (camada esverdeada na superfície) e odor desagradável, mas também, por alterar o sabor da água tratada para abastecimento. A decomposição das florações de algas leva a desoxigenação, alterando a química da água e afetando a capacidade de sobrevivência dos organismos aquáticos. As florações de cianobactérias tóxicas comprometem a disponibilidade hídrica para os usos mais nobres, tais como: abastecimento público, dessedentação animal, recreação de contato primário, irrigação de hortaliças, aquicultura e pesca, dentre outros (Ding et al. 1998; Jang et al. 2003; Ding et al. 1999). Atualmente, há cerca de 150 gêneros de cianobactérias, das quais 40 são conhecidas como produtoras de toxinas – as cianotoxinas (Saker et al. 1999). No Brasil, os gêneros mais comuns de cianobactérias formadoras de florações são *Microcystis*, *Nodularia*, *Cylindrospermopsis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon* e *Planktothrix* (Sant'Anna & Azevedo 2000).

As cianotoxinas são conhecidas como toxinas produzidas por cianobactérias. Constituem um amplo grupo de produtos naturais tóxicos. Em ambientes aquáticos, as cianotoxinas, normalmente, permanecem contidas nas células de cianobactérias e são liberadas em quantidade considerável após a lise celular, que ocorre durante a fase de senescência (morte natural), estresse celular ou uso de algicidas, como sulfato de cobre ou cloro. A produção desses metabólitos secundários bioativos, com altas propriedades

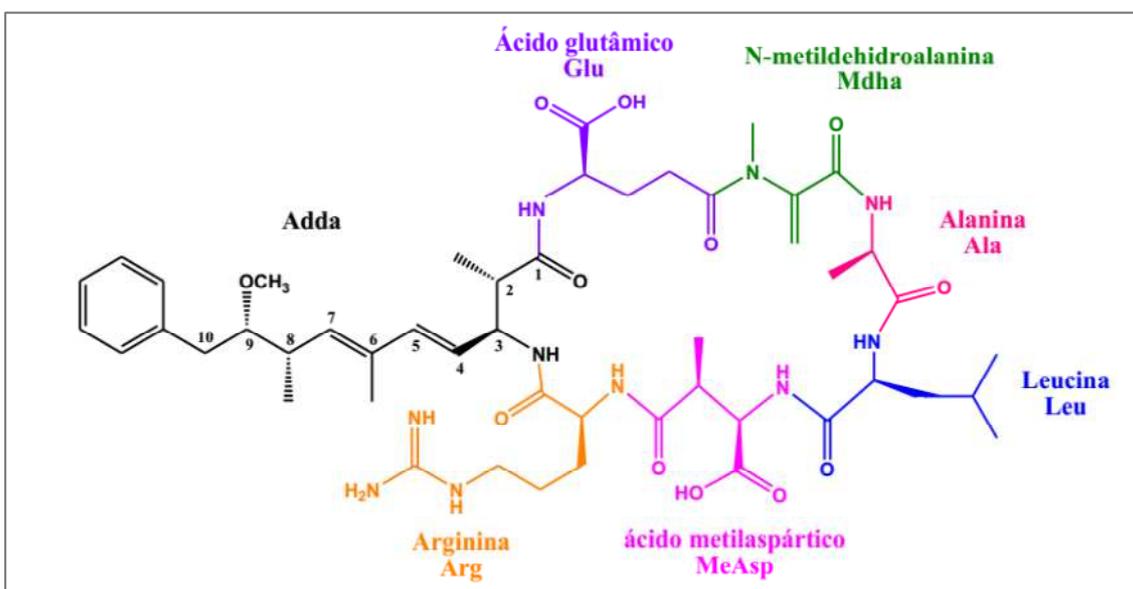
tóxicas pode afetar direta ou indiretamente a saúde de muitos animais, inclusive a do homem (Hunter et al. 2009; Marie et al. 2012; Codd et al. 1999). As toxinas de cianobactérias constituem um grupo quimicamente heterogêneo, apresentando assim, diferentes propriedades toxicológicas. Elas podem ser divididas em três grupos principais, com base na estrutura química: peptídeos cíclicos, alcalóides e lipopolissacarídeos (Merel et al. 2013; Codd et al. 1999). Comumente, as cianotoxinas são classificadas em categorias distintas, relacionadas aos efeitos tóxicos provocados nos organismos afetados. Do ponto de vista toxicológico, as cianotoxinas abrangem quatro classes principais, as quais são bastante diversificadas estruturalmente: neurotoxinas, hepatotoxinas, citotoxinas e dermatoxinas. As principais e mais perigosas toxinas produzidas pelos gêneros de cianobactérias mais comuns são: microcistinas, nodularinas, cilindrospermopsinas e saxitoxinas (Cood 1995; Araújo et al. 2010).

Grande parte dos envenenamentos por cianobactérias envolve hepatotoxicidade aguda causada por hepatotoxinas, que apresentam uma ação mais lenta, podendo causar mortes num intervalo de poucas horas a poucos dias (Carmichael 1992). Dentre essas hepatotoxinas, as microcistinas (MCs) constituem o grupo mais comum e com maior incidência de acidentes por contaminação de humanos e animais.

As MCs foram as primeiras hepatotoxinas identificadas e isoladas do gênero *Microcystis aeruginosa* (Francis et al. 1988). São as cianotoxinas mais facilmente encontradas nas florações de cianobactérias em água doce, como lagos, reservatórios e áreas recreacionais (Carmichael 1992). As hepatotoxinas são as toxinas mais comuns produzidas por alguns gêneros de cianobactérias, tais como: *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria* e *Nostoc* (Carmichael 1992). Constituem uma família de toxinas que têm recebido atenção considerável, devido a sua potente atividade hepatotóxica. Essa forte toxicidade implica graves problemas ecológicos e um risco à saúde dos seres humanos e animais (Codd et al. 1999). As MCs são de particular preocupação, uma vez que casos agudos de intoxicação por essas toxinas podem causar morte rápida em humanos e outros animais. Elas têm causado mortalidade em animais domésticos e selvagens, doenças em seres humanos, e quando expostos por meio de hemodiálise, até mesmo a morte (Carneiro & Leite 2008; Carmichael 1992). Tem sido relatado que as MCs são as toxinas específicas do fígado em condições *in vitro* e *in vivo*. As consequências são: lesões no citoesqueleto, necrose hepática e hemorragia no fígado, além de causarem tumor no fígado (Carneiro & Leite 2008).

As MCs compõem o maior grupo de toxinas de cianobactérias. Há cerca de 150 isoformas de MCs identificadas (Sharma et al. 2012), as quais compartilham a mesma estrutura (D-Alanina-X-D-MeAsp-Y-Adda-DGlu-Mdha), onde X e Y são os L-aminoácidos variáveis, MeAsp é o ácido metilaspártico, DGlu é o ácido glutâmico, Adda e Mdha são os aminoácidos (3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienóico) e N-metildehidroalanina, respectivamente. As MCs são nomeadas de acordo com os L-aminoácidos variáveis que elas contêm, formando uma série de variantes da molécula. A mais comum, mais tóxica e, conseqüentemente, a mais estudada é a MC-LR que apresenta os L-aminoácidos leucina (L) e arginina (R) nas posições variáveis (Lawton & Robertson 1999). Conseqüentemente, esforços significativos de investigação têm sido dirigidos para a identificação e erradicação das MCs em águas naturais, principalmente, a microcistina - LR (MC-LR), objeto de estudo desse trabalho.

A MC-LR, com estrutura química cíclica (D-Alanina-L-Leucina-DMeAsp-L-Arginina-Adda-D-Glu-Mdha), Figura (2.4), é uma hepatotoxina produzida principalmente pela espécie *Microcystis aeruginosa*, mas também pelas *Anabaena flos-aquae*, *Oscillatoria agardhii* e *Nostoc sp* (Harada et al. 1990).



**Figura 2.4:** Esquema da estrutura molecular da microcistina

A MC-LR é liberada quando as cianobactérias morrem ou são destruídas. As pessoas são expostas a essas toxinas com mais frequência através da ingestão de água potável ou durante atividades de lazer, quando a água é ingerida. Os efeitos da toxicidade das MC-

LR, em humanos, são diversos, entre eles estão: gastroenterites, náuseas, vômitos, febre, sintomas de gripe, dor de garganta, irritação nos ouvidos e olhos, erupções, mialgias, dores abdominais, incluindo dores causadas por hepatomegalia, consolidação pulmonar, distúrbios visuais, cianose, danos hepáticos e hemorragias internas, convulsões e até morte (Namikoshi et al. 1992). Relatos têm mostrado o aumento da incidência de câncer de fígado em humanos e envenenamentos de animais em diferentes países, devido ao consumo de água contaminada (Van Halderen et al. 1995). No Brasil, ocorreram dois casos graves de envenenamentos atribuídos a cianobactéria. No primeiro caso, uma floração de *Anabaena* e *Microcystins* ocorrida na Represa de Itaparica-BA foi responsável por 2000 gastroenterites, resultando em 88 mortes, a maioria em crianças (Zegura et al. 2003). O segundo caso ocorreu no Instituto de Doenças Renais em Caruaru-PE, em 1996, causando a morte de 55 pacientes por intoxicação hepática devido à contaminação da água utilizada para hemodiálise com microcistina (Jochimsen et al. 1998). Em algumas regiões do país, a situação é bastante alarmante, pois vários reservatórios e açudes utilizados para o abastecimento público apresentam frequentes florações de algas tóxicas. A alta toxicidade das cianotoxinas gera impacto sobre os aspectos ambiental, social e econômico da sociedade moderna (Antoniou et al. 2005). O efeito tóxico e a presença dessas cianobactérias, em águas naturais, continuam representando um risco à saúde dos seres humanos através da água potável (Meriluoto & Codd 2005). Diante disso, a Organização Mundial da Saúde estabeleceu o valor limite para MC-LR total em água potável como sendo de 1 µg/L (WHO 1998). Assim, vários estudos têm sido citados na literatura sobre a degradação da MC-LR, como meios de investigação e inativação dessa toxina (Antoniou et al. 2008; Dawson 1998; Meriluoto & Codd 2005). Estudos demonstraram que a tecnologia de tratamento de água, predominante nas ETAs convencionais, possibilita a remoção de grande parte das células e indivíduos intactos de algas e cianobactérias, por outro lado, é ineficiente para remoção de cianotoxinas dissolvidas. Dessa forma, torna-se necessária uma tecnologia de tratamento de água complementar que possa atuar em conjunto, visando a otimização do processo. Várias tecnologias têm se destacado nos últimos anos, entre elas: oxidação química, microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração osmose reversa, adsorção utilizando carvão ativado e os Processos Oxidativos Avançados. Torna-se fundamental a aplicação de técnicas para o controle de MC-LR, bem como técnicas analíticas precisas e sensíveis para a sua investigação e monitoramento, uma vez que a MC-LR constitui uma ameaça considerável para a saúde humana.

#### *2.1.4. Bactérias resistentes a antibióticos*

As Bactérias Resistentes a Antibióticos (BRAs) tornam-se cada vez mais disseminadas no ambiente, e sua prevalência e evolução causam graves problemas para a saúde pública. A resistência aos antibióticos é o resultado do uso excessivo, inadequado e indiscriminado de antimicrobianos. O desenvolvimento das bactérias resistentes pode ser entendido como resposta de uma evolução naturalmente seletiva.

Em condições ideais, as bactérias se multiplicam rapidamente, em tempo cronológico de minutos a horas, favorecendo condições naturais de mutações espontâneas e variações genéticas significativas. O agente antimicrobiano inibe e mata algumas espécies de bactérias. Mas, quando administrado com dosagens inferiores, as células sobreviventes tendem a ter vantagens seletivas de sobrevivência e, contudo, podem desenvolver características mais resistentes. Assim, as bactérias resistentes tornam-se predominante, por um processo de evolução natural, caracterizada como darwinismo.

O uso de antibióticos em populações bacterianas sensíveis à ação das drogas podem tornar-se resistentes, basicamente, por dois processos. Primeiro, por mutação espontânea, em que as bactérias que transportam mutação no material genético confere resistência e sobrevivem ao uso das drogas, enquanto as sensíveis são eliminadas. Assim, as células resistentes transferem essas características às células-filhas, caracterizando a evolução ou transmissão vertical (Tenover 2006) e, no segundo processo, por transferência gênica horizontal, os genes podem ser adquiridos de outros microrganismos da mesma geração. Esse fenômeno envolve uma célula doadora que contribui parte de seu genoma para uma célula receptora, que pode ser de uma espécie ou até mesmo de um gênero diferente (Oliveira & Freitas 2013). Após a transferência, parte do DNA da doadora é incorporado ao DNA da receptora, que passa a ser denominada de recombinante, e o restante é degradado por enzimas. Alguns genes, adquiridos horizontalmente, podem proporcionar efeitos deletérios à célula bacteriana que os recebeu. Dessa maneira, essas bactérias serão eliminadas da população, as quais estão inseridas. Por outro lado, os genes que conferem aos microrganismos patogênicos vantagem seletiva, em relação ao hospedeiro, têm o potencial de serem rapidamente espalhados dentro da população bacteriana (Byarugaba 2010).

A prevalência da resistência bacteriana resultou numa complexa interação entre antibióticos, microrganismos, hospedeiros e o meio ambiente. O principal fator

determinante dessa prevalência, em termos de origem e grau, é a própria pressão seletiva dos antibióticos. Sob esta seleção, as cepas dominantes e resistentes são disseminadas nos hospedeiros e no meio ambiente. A minimização desse problema pode vir das prescrições médicas, tornando-as mais cautelosas e prudentes, e das farmácias onde os fármacos só poderão ser repassados por ordens médicas.

As preocupações eram geralmente direcionadas às bactérias resistentes a um único antibiótico, porém, bactérias resistentes a múltiplas drogas (BRMD) estão sendo objeto de preocupação dos pesquisadores e profissionais de saúde pública. O uso demasiado dos antibióticos tem-se generalizado e cepas bacterianas resistentes aos múltiplos antibióticos tornaram-se cada vez mais comuns. Em alguns casos, existem microrganismos patogênicos que são resistentes a todos ou quase a totalidade dos antibióticos atualmente disponíveis, ocasionando sérias implicações para a saúde humana e animal (Al-Bahry et al. 2015). As BRMD são responsáveis pela inutilidade de muitos antibióticos, e na maioria das vezes, infecções causadas por essas bactérias dobram os riscos de doenças severas e prolongadas, ocasionando hospitalização e morte. Se esta situação continuar, em poucos anos, infecções causadas por BRMD serão dificilmente tratáveis e poderão tornar-se incontroláveis.

O surgimento das BRMD pode ter sido originado das mutações, quando populações de bactérias sensíveis foram expostas às concentrações subletais de dois ou mais antibióticos ao mesmo tempo, ou seja, populações bacterianas resistentes a um determinado antibiótico e, por conseguinte, expostas a outro. E, por fim, outra via de mutação ocorre por rearranjo genético de transferência horizontal, por processos de conjugação, transformação ou transdução dos dados aos receptores (Al-Bahry et al. 2015). A transferência horizontal ocorre, comumente, dentro de reservatórios ambientais, onde bactérias e agentes antimicrobianos coexistem (Al-Bahry et al. 2015).

Bactérias resistentes se espalham no ambiente por diferentes rotas, incluindo efluentes de esgotos tratados ou não, lodo de ETEs e resíduos agrícolas (Hoa et al. 2011). Os produtos farmacêuticos podem ser dispersos pela mesma rota e são responsáveis pela origem e disseminação das bactérias resistentes.

Os fármacos veterinários também são responsáveis pelas resistências bacterianas, pois muitos antibióticos não são absorvidos no trato intestinal dos animais, e estima-se que 25% a 75% são excretados através da urina e das fezes para o meio ambiente (Al-Bahry et al. 2015). Estes antibióticos são introduzidos tanto no solo como nas águas

subterrâneas e superficiais, e as bactérias presentes nestes ambientes sofrem a pressão seletiva dos antibióticos. Além disso, a disseminação também pode vir de fossas sépticas e locais de armazenamento de esterco, contaminando as bacias hidrográficas vizinhas e fontes de águas subterrâneas.

Antibióticos têm sido detectados em instalações de tratamento de águas residuárias, e estudos comprovaram que os antibióticos não são degradados durante os processos de tratamento biológico (Bai et al. 2015). Bactérias resistentes, presentes no intestino humano, entram no ambiente através do esgoto, e, devido ao seu grande volume, transmite doenças de veiculação hídrica, incluindo vírus e bactérias patogênicas. Nas regiões áridas ou locais onde a água subterrânea é utilizada, o risco de transmissão de BRAs é potencializado, principalmente, quando instaladas fossas sépticas inadequadamente ou com rachaduras (Al-Bahry et al. 2015).

## 2.2. Princípios de processos oxidativos avançados

Os Processos Oxidativos Avançados (POAs) são diferentes sistemas reacionais que se baseiam na formação de agentes oxidantes com elevado potencial de oxidação (Tabela 1), como os radicais hidroperoxila ( $\text{HO}_2^*$ ), superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) e radical hidroxila ( $\text{OH}^*$ ), sendo este último, o radical mais importante para o processo de oxidação. O radical hidroxila ( $\text{OH}^*$ ) participa como principal agente oxidante com base em processos físico-químicos capazes de produzir mudanças profundas na estrutura química das moléculas. Trata-se de uma espécie de elevado poder oxidativo que deve ser produzido *in situ* e que pode permitir a completa mineralização de inúmeras espécies químicas de relevância ambiental, em tempos relativamente curtos, atuando rapidamente em compostos orgânicos e inorgânicos em água destinada para o consumo humano (Glaze et al. 1987; Linden & Mohseni 2013). A atribuição da oxidação avançada foi, inicialmente, estabelecido por Glaze et al. (1987) que definiram os POAs como processo que envolve a geração e uso de espécie transitória poderosa, denominado de radical hidroxila ( $\text{OH}^*$ ).

**Tabela 2.1:** Potencial de oxidação de algumas espécies

Espécie	Potencial de oxidação (eV)
$\text{F}_2$	3,03
<b><math>\text{OH}^*</math></b>	<b>2,80</b>

O ( <sup>1</sup> D)	2,42
O <sub>3</sub>	2,07
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,78
HO <sub>2</sub> •	1,70
MnO <sup>4</sup>	1,68
ClO <sub>2</sub>	1,57
HClO	1,49
Cl <sub>2</sub>	1,36
O <sub>2</sub>	1,23
Br	1,09
I	0,54

Os radicais hidroxilas podem ser gerados através de reações, utilizando oxidantes fortes, como: ozônio (O<sub>3</sub>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e semicondutores - dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) e óxido de zinco (ZnO) - e por meios fotoquímicos (incluindo a luz solar). A Tabela (2) cita as principais vantagens e desvantagens dos POA (Linden & Mohseni 2013).

**Tabela 2.2:** Vantagens e desvantagens para tratamento de contaminantes químicos em água

#### **Vantagens**

Alta taxa de reações químicas

Degradação de poluentes ao invés de concentrá-los

Não geram resíduos sólidos

Mineralização de diversos poluentes

Dependendo do processo, podem requerer pequenas dimensões de construção

Não seletivos, capacidade de oxidar compostos recalcitrantes e não biodegradáveis

#### **Desvantagens**

Pode produzir subprodutos desconhecidos

Pode ser necessário fornecer processo subsequente para extinguir o oxidante residual

Existem diversas variedades de POAs que podem gerar os radicais OH• em soluções aquosas e são, geralmente, classificados por fotoquímicos e não fotoquímicos Tabela (3).

Dentre os métodos fotoquímicos, existem duas estratégias para geração de radicais OH•:

- (i) Fotólise homogênea – soluções contendo  $H_2O_2$ ,  $O_3$  ou uma combinação dos dois;
- (ii) Fotólise heterogênea – presença de partículas coloidais de semicondutor, como o  $TiO_2$  na interface partícula/solução.

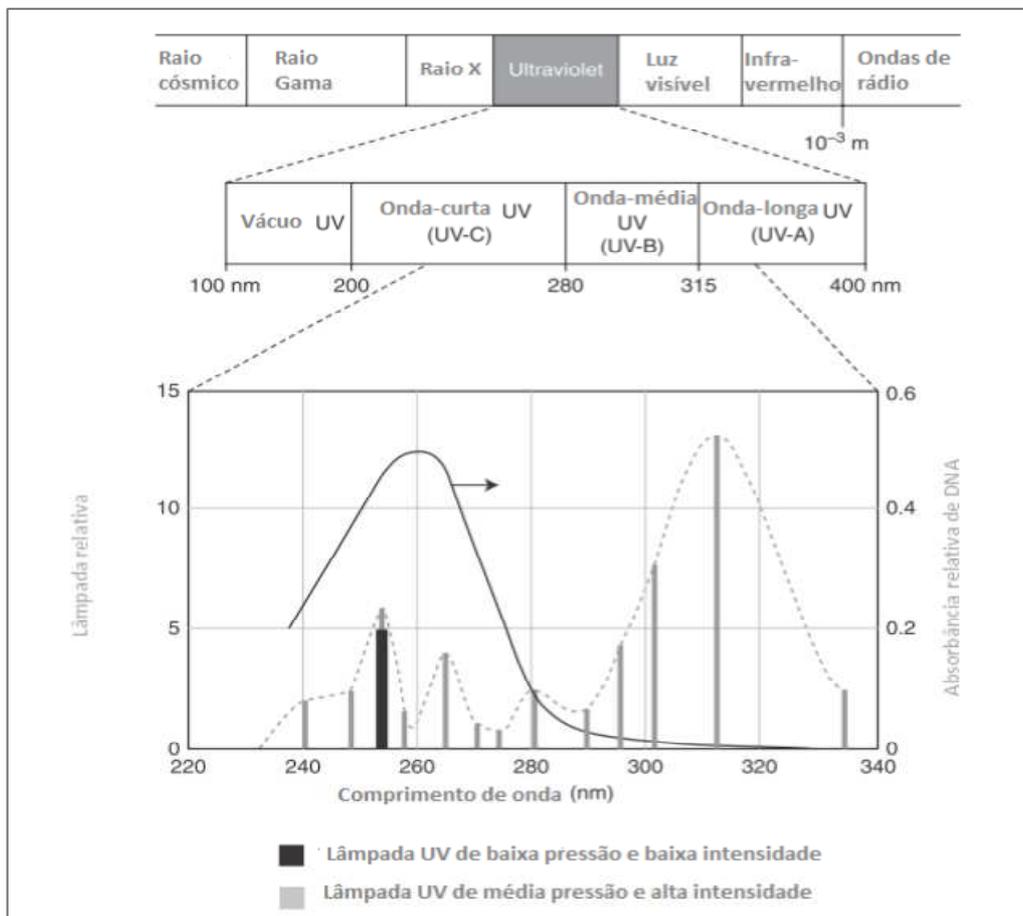
**Tabela 2.3:** Processos de oxidação avançada para o tratamento de água

Processos não fotoquímicos	Processos fotoquímicos
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reação Fenton (<math>Fe^{2+}/H_2O_2</math>)</li> <li>• Oxidação eletroquímica</li> <li>• <b>Radiólise</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Plasma não-térmico</li> <li>-Ultra-som</li> </ul> </li> <li>• <b>Ozonização</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>-meio alcalino (<math>O_3/OH^-</math>)</li> <li>-com peróxido de hidrogênio (<math>O_3/H_2O_2</math>)</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vácuo + UV (V/UV)</li> <li>• Reação com Foto-Fenton (UV/<math>Fe^{2+}/H_2O_2</math>)</li> <li>• Peróxido + UV (UV/<math>H_2O_2</math>)</li> <li>• Ozônio + UV (<math>O_3/UV</math>)</li> <li>• Fotocatálise heterogênea</li> </ul>

A luz é uma das formas de energia de radiação que se estende desde as ondas cósmicas até as ondas de rádio, sendo classificada com 16 tipos diferentes, dependendo do comprimento de onda. A energia é transmitida por radiação em pacotes discretos, chamados fótons. Quando um fóton atinge uma molécula, e provoca a sua excitação, tal transferência de energia, por radiação para a molécula, pode conduzir a uma reação química. Este fenômeno é classificado como fotoquímico.

Normalmente, o comprimento de onda da radiação fotoquímica é na faixa de 100 a 1000nm (Figura 2.5). Na faixa de 700 a 1000nm a radiação é classificada como infravermelha, não é visível para o olho humano e, com exceção de alguns tipos de fotossíntese bacteriana, o infravermelho não possui energia suficiente para resultar em processos fotoquímicos significativos. Entre 400 e 700nm estão na gama da luz visível. Esta faixa de radiação atua no processo da fotossíntese das plantas e algas. Comprimentos de onda de 100 a 400nm são, genericamente, a radiação UV (ultravioleta) e divide-se em quatro categorias: (i) UVA (315 a 400nm); (ii) radiação UVB (280 a 315nm); (iii) radiação UVC (entre 200 a 280nm) e, finalmente, (iv) VUV radiação (vácuo ultra violeta

com comprimentos de onda compreendidos entre 100 a 200nm). Cada um dos comprimentos de onda na radiação UV provoca diferentes reações fotoquímicas (Faretra et al. 2009).



**Figura 2.5:** Faixa de radiação UV e espectros de radiação de diferentes lâmpadas UV

Fonte: (Sievers 2011).

Existem, basicamente, três leis básicas da fotoquímica: (i) Lei de Grotthuss-Draper, afirma que é necessário absorção da luz pela molécula, esta lei parece óbvia, no entanto, as moléculas que não são afetadas pela luz, com comprimento de onda específico, não podem ser envolvidas por uma reação fotoquímica; (ii) a quantidade de fótons que atingem as moléculas, devem ser pelo menos, igual ou superior ao número de moléculas, só assim pode ocorrer uma reação fotoquímica completa e; (iii) a energia de um fóton absorvida pela molécula deve ser, igual ou maior do que a ligação mais fraca na molécula. Se a energia absorvida na molécula for menor do que a ligação mais fraca, não ocorrerá uma reação fotoquímica. Neste caso, a energia absorvida irá ser convertida em calor ou até

mesmo a molécula irá redesenhar o fóton que absorveu, fenômeno conhecido como fluorescência ou fosforescência (Faretra et al. 2009).

### 2.2.1. Processo $H_2O_2/UV$

O peróxido de hidrogênio é um dos oxidantes mais versátil que existe, quando utilizado em conjunto com agentes catalíticos - compostos de ferro, luz UV, semicondutores - é convertido em radicais hidroxilas ( $OH^\bullet$ ). O processo que combina peróxido de hidrogênio com irradiação ultravioleta é um dos POAs mais utilizados e, tem sido usado com êxito na remoção de contaminantes presentes em águas e efluentes industriais. O processo combinado de  $H_2O_2/UV$  é muito mais eficiente do que o uso de cada um deles separadamente, devido a maior produção de radicais hidroxila. Segundo Legrini et al. (1993), o mecanismo mais comumente aceito para a fotólise de peróxido com luz UV é a quebra da molécula em dois radicais  $OH^\bullet$  para cada molécula de  $H_2O_2$  (Equação 1).



A fotólise de  $H_2O_2$  se realiza quase sempre utilizando lâmpadas de vapor de mercúrio de baixa ou média pressão. Geralmente, se usam lâmpadas de 254 nm, porém, a absorção de  $H_2O_2$  é máxima a 220 nm. O uso de lâmpadas de Xe/Hg seriam mais conveniente, por emitir luz na faixa 210-240 nm, porém mais caras. Quando o  $H_2O_2$  é exposto ao comprimento de onda de 220 nm, se decompõe em radical  $OH^\bullet$  com rendimento quântico igual a um, ou seja, para todo fóton absorvido, um radical  $HO^\bullet$  é formado (Linden & Mohseni 2013).

A estabilidade do  $H_2O_2$  varia em função do pH e da temperatura. Em altas temperaturas e em meio alcalino há o favorecimento da sua decomposição. No entanto, este composto fotoreativo sofre interferência negativa na produção de  $HO^\bullet$  quando utilizado em excesso. Akgerman e Alnaizy (2000) mostraram que o processo tornou-se menos eficiente provavelmente pela autodecomposição de  $H_2O_2$  em  $HO_2^\bullet$  (com menor poder oxidante) e água, conforme Equação 2.



O  $H_2O_2$  tem várias aplicações, devido às suas propriedades, sendo imperativo a indução do seu uso a uma ação seletiva (Akgerman & Alnaizy 2000). Assim, controlando-se: temperatura, concentração, tempo de reação, adição ou não de catalisadores, este pode ser utilizado para oxidar um determinado poluente mesmo na presença de outro, ou originar diferentes produtos de oxidação para uma mesma espécie oxidável (Avan 1998; Andreozzi 1999). Se for utilizado em meio ácido, o peróxido de hidrogênio é um poderoso agente oxidante e uma potente fonte de geração de radicais livres, porém em soluções alcalinas é estável e se decompõe em água e oxigênio molecular, conforme Equação 3.



A velocidade de decomposição do peróxido e hidrogênio, Equação 4, aumenta à medida que o pH atinge o valor do pKa (11,7), assim como com o acréscimo da temperatura (Mattos et al., 2003).



O peróxido de hidrogênio pode reagir com a matéria orgânica presente na água, por mecanismos diretos e indiretos, podendo se comportar tanto como agente oxidante ou agente redutor na reação direta, conforme Equações 5 e 6, respectivamente (Legrini et al. 1993).



São muitos os mecanismos propostos para a quebra do  $H_2O_2$  que descrevem diferentes rotas de degradação da matéria orgânica. Esta diversidade evidência as interferências sofridas pelo sistema, inerente as condições operacionais como: temperatura, pH, concentração de peróxido de hidrogênio e presença ou ausência de matéria orgânica e/ou contaminantes.

Andreozzi (1999) demonstrou algumas reações paralelas que acontecem na degradação de substrato (Equações 7 a 10). Os radicais hidroxilas gerados atacam, diretamente o substrato S, oxidando-o a  $S^*$  (7), ou o próprio peróxido de hidrogênio,

devido ao excesso de oxidante, pode levar a formação de radicais hidroperóxil ( $\text{HO}\cdot_2$ ), conforme Equação 8. Assim como, o radical hidroperóxil pode reagir com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  formando radicais hidroxilas (Equação 9), que podem gerar mais  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



As reações (7) e (11) consomem radicais  $\text{OH}\cdot$  e diminuem a probabilidade de oxidação, portanto, deve-se determinar em cada caso a quantidade ótima de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para evitar um excesso, que poderia prejudicar a degradação.

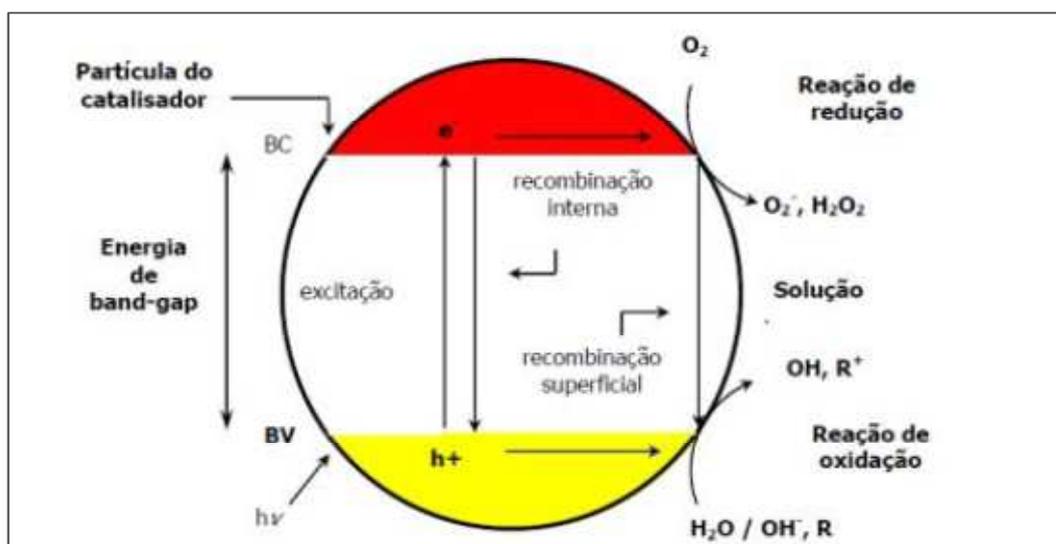
#### 1.1.1. 2.2.2. Fotocatálise Heterogênea

A fotocatálise heterogênea é um processo que inclui uma grande variedade de reações catalíticas que ocorrem sob o efeito da luz. Não existe uma definição única para fotocatálise, e pode ser definida como: catálise das reações da fotoquímica, fotoativação de catalisadores ou ativação fotoquímica de processos catalíticos (Sievers & Gmbh 2011). Enfim, fotocatalisadores, são substâncias que interferem nas reações químicas, baixando a energia de ativação e conseqüentemente aumentando a velocidade da reação.

A fotocatálise heterogênea pode ser aplicada na degradação de compostos alvos, tanto no meio gasoso como soluções aquosas. A catálise heterogênea clássica pode ser decomposta em cinco passos independentes: (1) transferência dos compostos da fase de fluido para a superfície; (2) adsorção de, pelo menos, um dos compostos; (3) reação na fase adsorvida; (4) dessorção do produto e; (5) remoção dos produtos da região da interface. A reação fotocatalítica ocorre na fase de adsorção.

Fotocatálise utilizando partículas semicondutoras tem sido amplamente investigada e observaram grandes promessas para a remoção de inúmeros contaminantes orgânicos e inorgânicos. Entre os muitos semicondutores com propriedades catalíticas (por exemplo,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{WO}_3$ , CDs,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , etc.), o  $\text{TiO}_2$  mostrou-se ser o mais promissor. O  $\text{TiO}_2$  é altamente fotorreativo, barato, quimicamente inerte, estável, e não tóxico.

Em fotocatalise heterogênea, tanto a redução como a oxidação pode ocupar espaço na superfície do semiconductor foto-excitado, como se mostra na Figura (2.6). O princípio da fotocatalise heterogênea envolve a ativação de um semiconductor (geralmente  $\text{TiO}_2$ ) por luz solar ou artificial. Um semiconductor é caracterizado por bandas de valência (BV) e bandas de condução (BC) sendo a região entre elas chamada de “band-gap”. A absorção de fótons com energia superior à energia de “band gap” resulta na promoção de um elétron da banda de valência para a banda de condução com geração concomitante de uma lacuna ( $h^+$ ) na banda de valência (Nogueira et al 1998).



**Figura 2.6:** Ilustração esquemática do processo fotocatalítico

Fonte: (Nogueira 1998)

As lacunas foto-geradas têm potenciais bastante positivos, na faixa de +2,0 a +3,5V. Este potencial é suficientemente positivo para gerar radicais  $\bullet\text{OH}$  a partir de moléculas de água adsorvidas na superfície do semiconductor. A eficiência da fotocatalise depende da competição entre o processo em que o elétron é retirado da superfície do semiconductor e o processo de recombinação do par elétron/lacuna o qual resulta na liberação de calor. Esta recombinação de elétrons no estado excitado é capaz de iniciar uma ampla gama de reações químicas. No entanto, a oxidação pelos radicais hidroxila é o principal mecanismo para a destruição de contaminantes orgânicos, mas também através de outras espécies de radicais, derivadas do oxigênio ( $\text{O}_2$ ,  $\text{HO}_2^\bullet$ , etc.) formadas pela captura de elétrons fotogerados (Kormann 1988; MacManus-Spencer et al. 2011; Nishida & Ohgaki 1994). A produção de radicais hidroxila pode ocorrer através de várias

vias, mas, como acontece com muitos outros POAs analisados, é facilmente formado a partir do peróxido de hidrogênio. (Reação 11 a 17):

A produção de peróxido de hidrogênio ocorre principalmente através dos seguintes três mecanismos de reação. No primeiro mecanismo, o peróxido é criado pela redução do oxigênio com dois elétrons na banda de condução (BC). Na medida que a concentração de aceptores de elétrons (por exemplo, oxigênio) é acrescentada em solução, o rendimento destes elétrons aumentam na BC, elevando assim o rendimento do peróxido de hidrogênio. A presença de aceptores de elétrons diminui a combinação de elétrons excitados na lacuna e, assim, aumenta a formação de peróxido de hidrogênio e outros radicais (Crittenden et al. 1996; Herrmann 1999).



O peróxido de hidrogênio é produzido segundo mecanismo através da oxidação da água pela lacuna na banda de valência ( $h_{BV}$ ). Este mecanismo ocorrer apenas na ausência de aceptores de elétrons e na presença de doadores de elétrons (por exemplo,  $H_2O$ ,  $OH^-$ ) (Turchi & Ollis 1990).



Uma vez que o peróxido de hidrogênio é formado, pode dissociar-se na presença de radiação UV para formar radicais hidroxila. Outros radicais (por exemplo, radicais superóxido ou hidroperóxido) formam radicais hidroxila, a princípio o radical hidroperóxido é formado quando o oxigênio é reduzido por um elétron na BC (Turchi & Ollis 1990):



A desprotonação do radical hidroperóxido em pH neutro resulta na formação de um radical superóxido ( $\bullet O_2^-$ ) que, por sua vez, reage com o peróxido de hidrogênio.





Finalmente, os radicais hidroxila podem ser formados a partir da redução direta do  $H_2O_2$  pelos elétrons da BC:



Além disso, os radicais hidroxila podem ser produzidos através da reação pela lacuna com um íon hidróxido.



Experiências realizadas com os sistemas que compõem o  $TiO_2/UV$  relatam interferências que podem afetar o sistema, devido a presença de ânions (cloreto, fosfato e bicarbonato), cátions e moléculas neutras que competem com o contaminante em locais reativos na superfície das partículas do catalisador, obstruindo os sítios ativos. O efeito de cátions e ânions é fortemente dependente do pH. O pH de carga zero para o  $TiO_2$  é em torno de 6 e para pH baixo (3 e 4) a velocidade de reação é significativamente retardada, devido a adsorção do anion sobre a superfície do catalisador carregado positivamente (Fagan et al. 2016).

Num sistema de reação de  $TiO_2/UV$  os catalisadores podem ser suportados ou dispersos no sistema. Para o projeto, são necessários ensaios de bancada e em escala piloto, rigorosos, para determinar a dose ótima de  $TiO_2$  em cada tipo de água a ser tratada. Uma dose baixa de  $TiO_2$  pode resultar em sítios ativos limitante para ocorrer as reações e gerar quantidades insuficientes de radicais, ao passo que uma dose elevada de  $TiO_2$  pode reduzir a transmitância da luz UV. Fagan et al. (2016) constataram que 500 mg/L de  $TiO_2$  em suspensão ocorreu a absorção, superior a 95%, da luz UV a 330 nm, afetando, negativamente, a eficiência do sistema de fotodegradação em solução aquosa. Segundo Linden & Mohseni (2013) borbulhar ar no sistema, para obter concentrações superiores de oxigênio dissolvido (OD), favorece as reações de fotodegradação.

O  $TiO_2$  é o semiconductor mais utilizado em processos fotocatalíticos, devido algumas características favoráveis, dentre as quais, se destacam: ativação por luz solar,

insolubilidade em água, baixo custo, ausência de toxicidade e imobilização em sólidos. Quando o  $\text{TiO}_2$  é imobilizado, dispensa o uso de um sistema de separação, pós-tratamento, o qual, é necessário quando utilizado o  $\text{TiO}_2$  suspenso em solução. No entanto, o procedimento mais eficiente para o tratamento de águas contaminadas é utilizando o catalisador em suspensão, mas a sua recuperação ou separação dificulta o uso desta técnica em grande escala. Por tanto, para contornar esta dificuldade, avalia-se a imobilização, de catalisador, em diferentes materiais suportes, considerando que o uso deste material possibilite a sua reutilização. Por outro lado, dependendo da forma e o tipo do material suporte, pode ocorrer a redução na eficiência do processo, ocasionado pela diminuição do transporte de massa para a superfície do catalisador.

- Os principais componentes de um sistema de  $\text{TiO}_2/\text{UV}$  incluem:
  - (i) Injetor de  $\text{TiO}_2$  e um sistema de separação (Opção 1)
  - (ii) Reator de leito fluidizado com material suporte impregnado com  $\text{TiO}_2$  (Opção 2)
  - (iii) Lâmpadas UV e sistema de limpeza para as lâmpada
  - (iv) Dispositivo de mistura estático
  - (v) Bombas para entrada do afluente e tubulações
  - (vi) Sistemas de monitoramento
  
- Outras considerações comparativas e confiabilidade

Além da eficiência e uso energético, existem outros fatores que devem ser considerados quando avalia a pretensão de instalação de POA, como confiabilidade, robustez e fácil implementação (Linden & Mohseni 2013). A confiabilidade é uma chave determinante na escolha de uma tecnologia para uma dada aplicação. A confiabilidade é, geralmente, definida como a probabilidade condicional, a um dado nível de confiança, de que um sistema irá executar suas funções de maneira satisfatória, por um período de tempo, dentro dos limites de desempenho pré-estabelecidos e, em especial, operar sob condições ambientais de aplicação e contextos operacionais com um certo nível de stress associado.

Os POAs, especificamente,  $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$ , e  $\text{UV}/\text{O}_3$  são os processos mais aplicados devido a sua confiabilidade de atenderem as metas de tratamento, sob condições

específicas, ao passo que os fotocatalíticos, UV/TiO<sub>2</sub>, ozonização catalítica, e reações de Fenton não garantem confiabilidade de aplicação real, devido à falta de pesquisas e aplicações em grande escala, a necessidade de adição e remoção de agentes químicos no processo e a desativação catalítica ainda precisa ser avaliado de maneira mais cautelosa. Além das características de confiabilidade mencionadas acima, a confiabilidade mecânica também é muito importante quando se comparam diferentes processos. Tecnologias com menos componentes substituíveis ou com poucos movimentos mecânicos e hidráulicos são considerados mais confiáveis porque irão exigir menos manutenção.

### **2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas**

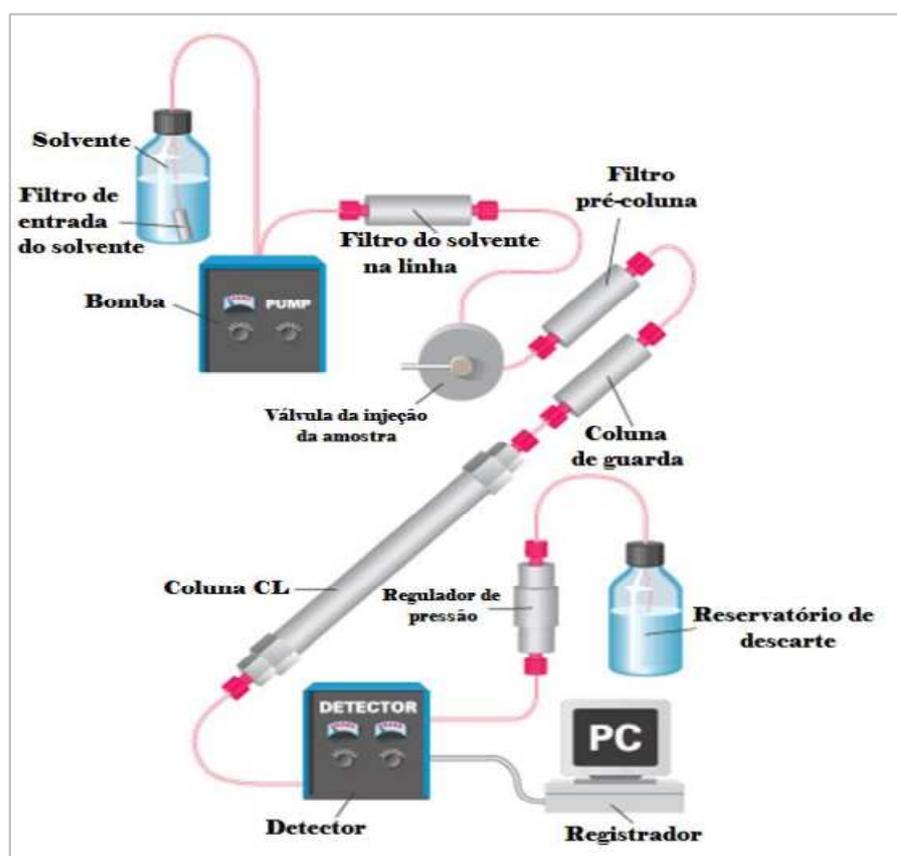
As técnicas de separação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) emprega colunas recheadas com materiais especialmente preparados, implicam em interações físico-químicas entre os compostos presentes na amostra e na fase estacionária. A CLAE permite realizar separações e análises quantitativas de uma variedades de compostos em diversos tipos de amostras, por meio de duas fases: uma estacionária (fixa na coluna cromatográfica) e outra móvel.

Nas últimas três décadas, ocorreu o desenvolvimento de vários detectores, tais como: (i) detectores espectrofotométricos que operam em comprimento de onda variável; (ii) detectores eletroquímicos, por fluorescência ou por fluorescência induzida por *laser*; e (iii) detectores de espectrômetro de massas. Este último, favorece uma faixa mais ampla de compostos a serem identificados e, particularmente, favorece análises de compostos em baixas concentrações presentes em amostras complexas (Chiaradia et al. 2008).

Quando utiliza a cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (CLAE-EM), algumas dificuldades de compatibilidade são encontradas, como por exemplo, vazão do eluente do sistema cromatográfico, relacionado à velocidade de bombeamento do sistema de vácuo no projeto da fonte de íons do espectrômetro de massas. As vazões utilizadas em CLAE são altas, na ordem de 1,0 mL/min, de maneira que não é possível bombear o eluente da CLAE, diretamente, para o interior da fonte do detector, em especial, os espectrômetros de massas que operam em pressões na ordem de  $1,3 \times 10^{-4}$  Pa (Maldaner & Jardim 2009). Além do problema existente com relação à vazão, os compostos que são separados por CLAE são, relativamente, pouco voláteis e/ou sensíveis à temperatura, de maneira que, não é possível ionizá-los utilizando as técnicas de ionização, comumente, aplicadas na EM. Desta forma, para o acoplamento da CLAE/EM

é necessário o desenvolvimento de interfaces como fonte de ionização. Dentre as fontes de ionização desenvolvidas, as mais empregadas são Ionização por Eletronebulização (IEN) (Collins et al 2011).

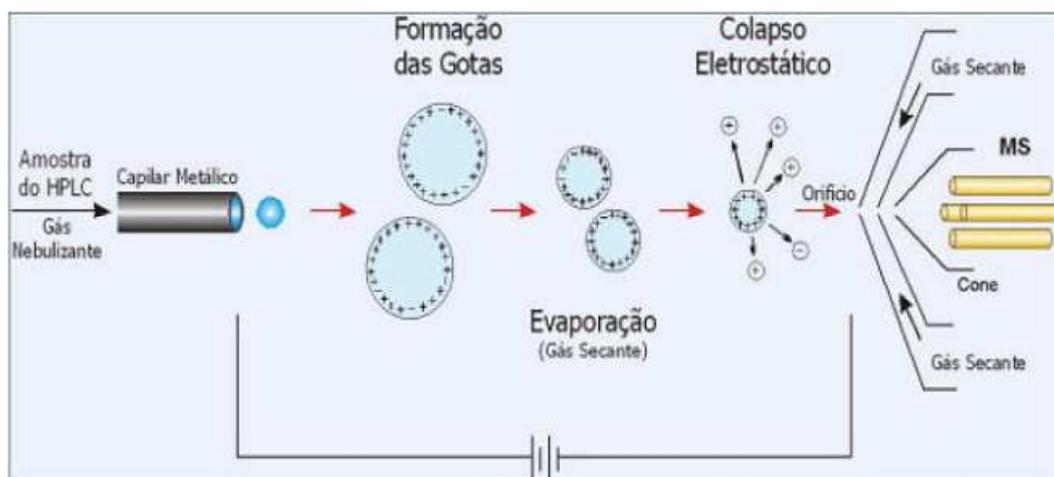
A CLAE caracteriza-se por ser uma ferramenta analítica de grande impacto na atualidade para determinação de diversos compostos orgânicos, favorecendo quantificação e identificação, com alto grau de seletividade e sensibilidade. Em geral, um sistema de cromatografia líquida utilizado como uma entrada para um espectrômetro de massa, consiste de um amostrador automático, uma bomba analítica e coluna, conforme mostra a figura (2.7). O EM é constituído de unidades fundamentais: uma fonte de ionização, na qual são gerados os íons na fase gasosa, um analisador e um detector.



**Figura 2.7:** Esquema de componentes típicos da CLAE

Na fonte de Ionização por Eletronebulização (IEN), a Fase Móvel (FM), a qual o analito de interesse se encontra dissolvido, passa através de um capilar sob pressão atmosférica e mantido com alta voltagem. Na saída do capilar são formadas pequenas gotas altamente carregadas “spray” que são dessolvatadas ao se deslocarem em sentido contrário do posicionamento de um eletrodo. A dessolvatação é assistida por um fluxo

contínuo de gás seco (geralmente N<sub>2</sub>) na região do “spray”. À medida que ocorre a dessolvatação, o tamanho das gotas é reduzido até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares fica maior que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). Neste momento, ocorrem as “forças repulsivas de Coulomb”, que geram gotas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas originais. Uma série de explosões passa a ocorrer até que são produzidos íons do analito alvo a partir destas gotas (Figura 2.8), os quais são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização (Crutchfield & Marzinke 2015).



**Figura 2.8:** Esquema de nebulização de fonte IEN  
Fonte:(De Julio et al. 2010)

Como a IEN, a ionização ocorre diretamente na solução. Compostos sensíveis à temperatura podem ser ionizados sem sofrer degradação. Uma vez que, a IEN são gerados íons com múltiplas cargas, esta técnica pode ser aplicada a compostos com massas molares relativamente grandes, pois como o espectrômetro de massas mede a razão massa/carga ( $m/z$ ) dos íons, o intervalo de “massa” de aplicabilidade do instrumento pode ser expandido por um fator equivalente ao número de cargas do íon, isto é, um íon com  $m/z$  1000 e com 20 cargas representa um composto com uma massa molar de 20 000 Da (Maldaner & Jardim 2009). Devido ao modo de obtenção dos íons pela fonte IEN, a ionização de compostos altamente polares é facilitada (Collins et al 2011). Uma vez que a IEN é dependente da concentração do analito no efluente da coluna cromatográfica, o uso de divisores de fluxo para diminuir a vazão do efluente para o interior da interface, não afeta de forma notável sua detectabilidade. O uso desses divisores só ocorre quando

a vazão utilizada no cromatógrafo ultrapassar 1 ou 0,5 mL min<sup>-1</sup> (Maldaner & Jardim 2009; Collins et al 2011).

A fonte de ionização por eletronebulização, acoplada com a CLAE, propicia um método fácil de ionização de substâncias não voláteis e termolábeis, tornando-se uma das técnicas mais robustas, abrangentes, reprodutíveis e sensíveis para o monitoramento de amostras com grau de complexidade expressiva. Os fatores que podem afetar a etapa de ionização no sistema CLAE/EM-ESI são os tamanhos das gotas inicialmente produzidas, e a taxa de fluxo do líquido; quanto menores as gotas produzidas maior será a dessolvatação, possibilitando, assim, maior eficiência na produção de íons (De Julio et al. 2010). Outro fator importante na utilização do ESI são os compostos polares/iônicos diferentes do analito alvo, encontrados muitas vezes em amostras matrizes, que por sua vez, competem com a ionização, podendo afetar a exatidão e a precisão, ou acarretar a perda absoluta da sensibilidade. Isso ocorre pela elevada concentração de interferentes, podendo até mesmo impedir completamente a transferência de carga para o composto de interesse. Geralmente, isso ocorre com composto de concentração na ordem de ng/mL. Esse fator pode ser corrigido pelas técnicas de *clean up* das amostras, pelo uso do padrão interno deuterado e no preparo das soluções analíticas no extrato da matriz (Iglesias 2013).

### 2.3.1. Analisadores de massas

Os tipos mais comuns de analisadores de massas que vêm sendo utilizados em trabalhos para determinação de amostras ambientais são: Quadrupolo, Triplo quadrupolo, *Ion Trap*, Quadrupolo – TOF, *Ion Trap* com Ressonância Ciclotrônica de Íons e Transformada de Fourier (Collins et al 2011).

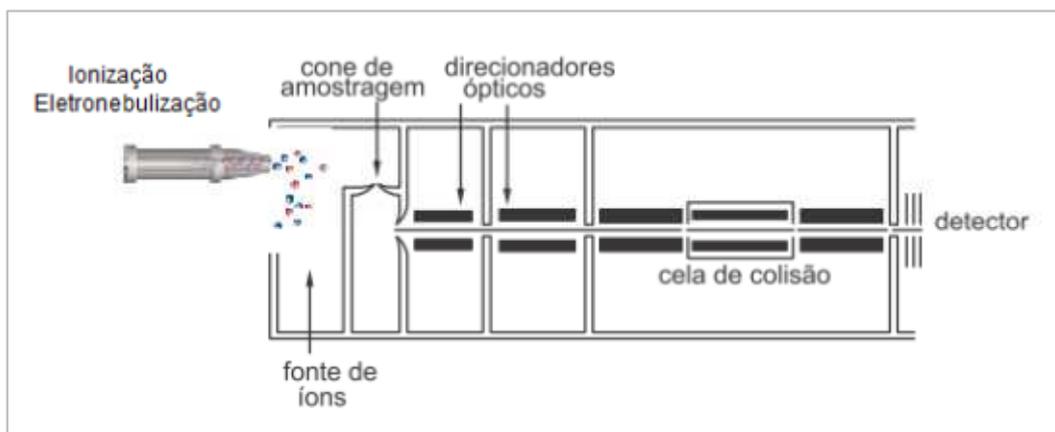
- Triplo quadrupolo

Este instrumento é constituído por três quadrupolos em série, porém o segundo quadrupolo não é utilizado para separar íons de mesma razão  $m/z$ , mas sim como cela de colisão, na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo, geralmente por dissociação induzida por colisão com um gás inerte “*collision-induced dissociation*” - DIC, e também, é empregado como direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo. Na DIC, o íon precursor proveniente do primeiro quadrupolo é

acelerado por um potencial elétrico para uma região de alto vácuo no interior do segundo quadrupolo, onde sofre repetidas colisões com um gás inerte de elevada energia (geralmente Ar, He ou N<sub>2</sub>), o que leva a um aumento na energia potencial deste íon até ocasionar sua fragmentação, conduzindo a formação dos íons produto. Quando DIC é realizada em baixa energia, as reações de fragmentação levam, geralmente, a perda de fragmentos neutros (H<sub>2</sub>O, MeOH, CO, CO<sub>2</sub> etc.), dependendo da natureza do íon precursor. Esta perda de fragmentos neutros é muito importante na determinação estrutural da molécula do analito, uma vez que fornece informações acerca de grupos funcionais presentes na molécula. Quando o DIC é realizado sob elevada energia, as reações de fragmentação geram informações estruturais mais significativas, visto que pode levar à quebra das moléculas em posições características. Porém, quando a energia é muito elevada, pode levar a uma fragmentação descontrolada (Azevedo 2004). Além de informações estruturais, o DIC pode melhorar a detectabilidade do método quando usado para gerar íons característicos de uma molécula e, assim, realizar sua detecção a partir deste íon fragmento. A molécula do analito alvo se encontra em presença de outras moléculas de mesma massa molar nominal, e o uso do DIC reduz o ruído e aumenta a detectabilidade. Todos os quadrupolos são controlados para transmitir íons de uma única razão  $m/z$  ou de um intervalo de razões  $m/z$  para gerar informação analítica mais exata (Maldaner & Jardim 2009).

- Ion-trap

Neste instrumento, a seleção, a decomposição e a subsequente análise dos íons são realizados na mesma parte do instrumento, de maneira que estes processos ocorrem separados apenas pelo tempo. Para isso, o *trap* é ajustado para capturar todos os íons que entram no espectrômetro de massas, e os íons de  $m/z$  que não são de interesse são levados à instabilidade para ocasionar sua ejeção do “*trap*”. O(s) íon(s) remanescente(s) no “*trap*” é(são) dissociado(s). Os íons produzidos na dissociação do íon de  $m/z$  selecionado tornam-se sequencialmente instáveis e são liberados do *trap* para gerar o espectro de massas (Chiaradia et al. 2008). Na Figura (2.9) encontra-se esquematizado um diagrama do detector de EM, em especial, o diagrama representa um sistema EM-ESI-Triplo quadrupolo.



**Figura 2.9:** Diagrama funcional do sistema de EM triplo quadrupolo  
(Adaptado: Chiaradia, 2009)

## 2.4. Validação de métodos analíticos

A necessidade de qualificar as medições químicas está sendo cada vez mais exigida e reconhecida. A validação do método analítico envolve um procedimento que comprova que o método oferece os resultados esperados com credibilidade, precisão e exatidão.

Conforme Lanças (2004), validação é uma ação ou efeito de validar, dar validade, tornar válido, tornar legítimo ou legal ou seja, visa diminuir ou controlar os fatores que levam à imprecisão (erro aleatório) ou inexatidão (erro sistemático) de uma resposta apresentada.

No contrário, os resultados analíticos não confiáveis podem resultar em decisões desastrosas e prejuízos financeiros irreparáveis. Portanto, a validação metodológica consiste no desenvolvimento, e posterior controle, de determinada metodologia analítica implantada em um laboratório, parte fundamental de um programa de garantia de qualidade.

Para que ocorra o credenciamento da qualidade assegurada e demonstração de competência técnica, diversos órgãos internacionais e nacionais exigem a validação de métodos analíticos como um requisito fundamental. Há vários órgãos internacionais que normatizam esta matéria como: ICH (“International Conference on Harmonization”), IUPAC (“International Union of Pure and Applied Chemistry”), ISO (“International Organization for Standardization”), entre outros. No Brasil, há duas agências que disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos: ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial). Segundo INMETRO (2011), o

processo de validação de um método deve estar descrito em um procedimento, e os estudos para determinar os parâmetros de validação devem ser realizados com equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando corretamente e adequadamente calibrados. Do mesmo modo, o responsável pela realização dos estudos deve ser competente na área e precisa ter conhecimento suficiente sobre o trabalho, sendo capaz de tomar as decisões apropriadas durante a realização do mesmo.

No processo de validação, os parâmetros analíticos são escolhidos de acordo com a intenção e o objetivo do uso do método. Normalmente, os principais parâmetros encontrados para validação do método são: seletividade, linearidade, faixa linear de trabalho, limite de detecção e de quantificação, precisão, exatidão, e robustez (Raya-Rodriguez 2009). Estes parâmetros são sucintamente descritos a seguir.

#### *2.4.1. Seletividade*

É a capacidade que o método possui de medir, exatamente, uma espécie de interesse em mistura ou matrizes na presença de outros componentes da matriz, tais como: impurezas e produtos de degradação. A seletividade é o primeiro passo para o desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e, caso ela não seja assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas.

Conforme Ribani et al. (2004), a avaliação da seletividade pode ser obtida de várias maneiras. Para os métodos cromatográficos, por exemplo, compara-se a matriz ausente do analito de interesse e a matriz adicionada com o analito (padrão), mas nesse caso, nenhum outro componente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra.

Outra maneira de avaliar a seletividade é comparando uma curva analítica com adição da substância de interesse na amostra (método adição de padrão ou padronização externa com superposição da matriz) com uma curva analítica sem a presença da matriz (padronização externa ou padronização externa sem superposição da matriz). Caso elas sejam paralelas, o método será seletivo, ou seja, não há interferência da matriz na determinação do analito de interesse. O método adição de padrão é aplicado quando não for possível obter a matriz isenta de analito de interesse.

#### 2.4.2. Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. Na prática, a linearidade é determinada por gráficos de calibração ou curvas de calibração, seguido de um tratamento estatístico (Raya-Rodriguez 2009), para assegurar a qualidade da curva de calibração analítica, determinadas regras são necessárias:

- II. Alguns pontos da curva podem ser excluídos, desde que se mantenham cinco pontos. O maior e menor devem permanecer;
- III. Deve-se evitar excluir dois pontos sequenciais;
- IV. A curva será iniciada pelo menor valor mensurável ou pelo menor valor de interesse para a quantificação.

A linearidade do método pode ser determinada a partir da relação matemática entre o sinal medido e a concentração ou massa da espécie de interesse, geralmente obtida por uma equação de reta  $y = ax + b$ , chamada de curva analítica. Os coeficientes  $a$  e  $b$  da curva analítica podem ser estimados a partir de um conjunto de medições experimentais usando o método matemático, conhecido como regressão linear. Além destes, calcula-se o coeficiente de correlação  $r$  ou o coeficiente de determinação  $r^2$ , parâmetros estes que permitem uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximos de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90.

#### 2.4.3. Limite de detecção e quantificação

A sensibilidade de um método é definida pelos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado como um valor exato, sob as condições experimentais estabelecidas. E o limite de quantificação corresponde a menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e precisão (Raya-Rodriguez 2009).

A determinação do LD e do LQ pode-se utilizar três maneiras distintas:

- I. Visual: distingue-se o sinal do ruído pela visualização da menor concentração possível;
- II. Sinal-ruído: Para o LD, o sinal da menor concentração do analito é 3 vezes maior do que o ruído do sistema (N), ou seja,  $LD = 3N$  e para o LQ, o sinal da menor concentração do analito é 10 vezes maior do que o ruído do sistema (N), ou seja,  $LQ = 10N$ ;
- III. Método baseado em parâmetros da curva analítica, os quais podem ser calculados como:

$$LD = 3 * \frac{s}{S} \quad \text{Equação 18}$$

$$LQ = 10 * \frac{s}{S} \quad \text{Equação 19}$$

Onde  $s$  é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e  $S$  é a inclinação (slope) ou coeficiente angular da curva analítica.

#### 2.4.4. Precisão

Expressa a concordância entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra (Lanças 2004). Ou seja, quanto mais próximos estiverem os valores, a amplitude será menor e a precisão será maior. Conforme o Inmetro, a precisão pode ser usualmente expressa pelo desvio padrão e coeficiente de variação. O coeficiente de variação - CV, usualmente expresso em %, também conhecido como Desvio Padrão Relativo (DPR), é calculado da seguinte forma:

$$CV = DPR = \frac{DP}{CMD} * 100 \quad \text{Equação 20}$$

A precisão pode ser verificada através da repetitividade, da precisão intermediária ou em condições de reprodutibilidade. A seguir, apresenta-se um resumo da aplicação de cada um destes testes.

- Repetitividade: mesmo método, mesma amostra, mesmo laboratório, pelo mesmo operador. Todos os ensaios usando o mesmo equipamento em um curto intervalo de tempo.

- Precisão intermediária: mesmo método, mesma amostra, mesmo laboratório, e com diferentes analistas, equipamentos e tempos.
- Reprodutibilidade: mesmo método, mesma amostra, e com diferentes laboratórios e analistas, bem como diferentes equipamentos.

#### 2.4.5. Exatidão

A exatidão é o grau de concordância entre o resultado de um valor encontrado e um valor aceito como verdadeiro ou aceito como referência. É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita cujo valor é indeterminado por natureza. Lanças (2004) relata que valores baixos de exatidão são, geralmente, ocasionados por erros sistemáticos que provocam desvios ou tendências nos resultados. Assim, uma exatidão expressa como 105% estaria significando uma tendência positiva de desvio de 5%, enquanto uma exatidão expressa como 95% significa uma tendência negativa de 5%. Erros sistemáticos típicos na exatidão de resultados analíticos provêm de equipamentos não calibrados ou aferidos, interferentes na amostra, baixa recuperação na extração, medidas volumétricas incorretas, seringas contaminadas, entre outros. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: (I) Material de Referência Certificado (MRC); (II) comparação de métodos, e (III) ensaios de recuperação.

##### (I) Material de Referência Certificado

O Material de Referência Certificado (MRC), quando disponível, é acompanhado de um certificado que possui o valor de concentração de uma dada substância ou outra grandeza para cada parâmetro, e uma incerteza associada. Seu uso é de controle preferido, pois estão diretamente relacionados com padrões internacionais. Entretanto, o alto custo do MRC e a abrangência limitada de matrizes e analitos restringem seu uso. O processo de avaliação por meio de MRC consiste em analisar os valores da média e da estimativa do desvio padrão, obtido pelo laboratório para uma série de replicatas da mesma amostra padrão, e comparar com os valores certificados do material de referência, podendo a exatidão do método ser calculada, conforme a Equação 21.

$$MRC (\%) = \frac{\text{Concentração média medida}}{\text{Concentração de MRC}} * 100\%$$

*Equação 21*

## (II) Comparação dos métodos

A exatidão também pode ser estabelecida mediante comparação entre resultados obtidos, empregando-se o método em desenvolvimento, e os resultados conseguidos através de um método de referência (outro método validado). Para calcular a exatidão, avalia-se o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos, ou seja, após análise de diferentes amostras com ambos os métodos, as diferenças obtidas para cada amostra são calculadas e comparadas com o valor desejado (nesse caso, zero). Estabelece-se, então, o nível de confiança de acordo com o intervalo de concentração (Ribani, et al. 2004).

## (III) Ensaio de recuperação

O fator de recuperação  $R$ , definido como sendo uma proporção entre a quantidade da substância de interesse presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada. A recuperação é o número obtido da porcentagem de erro ou perda da substância em análise.

As medições de recuperação são as mais comuns, devido à dificuldade em se obterem MRC - que, para certas aplicações, nem existem - e são expressas em termos de porcentagem da quantidade medida da substância, em relação à quantidade adicionada na matriz (branco ou placebo) em um determinado número de ensaios, podendo ser calculado pela Equação 22.

$$\text{Exatidão por adição de padrão (\%)} = \frac{V_f - V_b}{V_p} * 100 \quad \text{Equação 22}$$

Sendo:  $V_f$  - Valor do analito presente na matriz após adição do padrão;  $V_b$  - valor do analito no branco da matriz;  $V_p$  - valor do analito no padrão.

O método de adição padrão é trabalhoso, mas é, especialmente, importante quando a amostra é muito complexa, porque as interações com a matriz são significativas, e quando houver dificuldade de encontrar um padrão interno adequado ou uma matriz isenta da substância de interesse, se faz necessário a aplicação deste método.

#### 2.4.6. *Robustez*

Lanças (2004) afirma que robustez é uma medida da capacidade de um método de não sofrer alterações, devido a pequenas variações das condições experimentais, deliberadamente introduzidas nos parâmetros do método. Em cromatografia, as condições experimentais sujeitas às variações, podem ser: concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel no CLAE, programação da temperatura, natureza do gás de arraste em cromatografia gasosa (CG), bem como o tempo de extração, agitação, etc.

A robustez mede a confiabilidade do método em condições normais de operação, permitindo se fixar as tolerâncias dos fatores envolvidos no método. Segundo INMETRO (2011), quanto maior for a robustez do método, maior será a confiança em sua precisão.

## 2.5. Referências bibliográficas

- Akgerman, A. & Alnaizy, R., 2000. Advanced oxidation of phenolic compounds. *Advances in Environmental Research*, 4(3), pp.233–244.
- Aktar, M.W., Sengupta, D. & Chowdhury, A., 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary toxicology*, 2(1), pp.1–12.
- Al-Bahry, S.N. et al., 2015. Antibiotic Resistant Bacteria in Terrestrial and Aquatic Environments and their Use as Bio-Indicators of Pollution. *The International Arabic Journal of Antimicrobial Agents*, 4, pp.1–11.
- Andreozzi, R., 1999. Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery. *Catalysis Today*, 53(1), pp.51–59.
- Antoniou, M.G. et al., 2008. Unveiling new degradation intermediates/pathways from the photocatalytic degradation of microcystin-LR. *Environmental Science and Technology*, 42(23), pp.8877–8883.
- Antoniou, M.G., de la Cruz, A. a & Dionysiou, D.D., 2005. Cyanotoxins: New generation of water contaminants. *Journal of Environmental Engineering (Reston, VA, United States)*, 131(September), pp.1239–1243.
- Aráoz, R., Molgó, J. & Tandeau de Marsac, N., 2010. Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicon*, 56(5), pp.813–828.
- Atakisi, E. et al., 2009. Effects of therapeutic dose of ivermectin on plasma nitric oxide and total antioxidant. , pp.425–429.
- Avan, P.O., 1998. 5 Processos Oxidativos Avançados. , pp.73–120.
- Azevedo, D.A., 2004. Espectrometria de Massas. , pp.1–106.
- Bai, X. et al., 2015. The drinking water treatment process as a potential source of affecting the bacterial antibiotic resistance. *Science of The Total Environment*, 533, pp.24–31.
- Beasley, C.A. et al., 2006. Identification of impurities in ivermectin bulk material by mass spectrometry and NMR. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(4), pp.1124–1134.
- Berg, K. et al., 1988. Isolated rat liver perfusion studies with cyclic heptapeptide toxins of *Microcystis* and *Oscillatoria* (freshwater cyanobacteria). *Toxicon*, 26(9), pp.827–837.
- Byarugaba, D.K., 2010. Mechanisms of antimicrobial resistance. In *Antimicrobial Resistance in Developing Countries*. pp. 15–26.
- Carmichael, W.W., 1992. Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*, 72, pp.445–459.
- Carneiro, T.G. & Leite, F., 2008. Cianobactérias e suas toxinas. *Revista Analytica*, 32, pp.2–7.
- Chiaradia, M.C., Collins, C.H. & Jardim, I.C.S.F., 2008. O estado da arte da cromatografia associada a espectrometria de massas acoplada na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Química Nova*, 31(3), pp.623–636.
- Chung, K. et al., 1999. Agricultural avermectins: An uncommon but potentially fatal cause of pesticide poisoning. *Annals of Emergency Medicine*, 34(1), pp.51–57.
- Codd, G. et al., 1999. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. *European Journal of Phycology*, 34, pp.405–415.
- Codd, G., 2000. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecological Engineering*, 16(1), pp.51–60. Available at: [www.elsevier.com/locate/ecoleng](http://www.elsevier.com/locate/ecoleng).

- Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P.S., 2011. *Fundamentos de cromatografia* 4th ed. Unicamp, ed., Campinas, SP.
- Cood, G., 1995. Cyanobacterial toxins: Occurrence, properties and biological significance. *Water Science and Technology*, 32(4), pp.149–156.
- Cooper, J. & Dobson, H., 2007. The benefits of pesticides to mankind and the environment. *Crop Protection*, 26(9), pp.1337–1348.
- Crittenden, J.C. et al., 1996. Solar detoxification of fuel-contaminated groundwater using fixed-bed photocatalysts.
- Crutchfield, C.A. & Marzinke, M.A., 2015. Bioanalytical development and validation of liquid chromatographic-tandem mass spectrometric methods for the quantification of total and free cefazolin in human plasma and cord blood. *Practical Laboratory Medicine*, 1(1), pp.12–21.
- Daughton, C.G., 2016. Pharmaceuticals and the Environment (PiE): Evolution and impact of the published literature revealed by bibliometric analysis. *Science of The Total Environment*, 562, pp.391–426.
- Dawson, R.M., 1998. The toxicology of microcystins. *Toxicon*, 36(7), pp.953–962.
- Ding, W.X. et al., 1999. Genotoxicity of microcystic cyanobacteria extract of a water source in China. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 442(2), pp.69–77.
- Ding, W.X. et al., 1998. Microcystic cyanobacteria causes mitochondrial membrane potential alteration and reactive oxygen species formation in primary cultured rat hepatocytes. *Environmental health perspectives*, 106(7), pp.409–13.
- Dittmann, E. & Wiegand, C., 2006. Cyanobacterial toxins--occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Molecular nutrition & food research*, 50(1), pp.7–17.
- Fagan, R. et al., 2016a. A review of solar and visible light active TiO<sub>2</sub> photocatalysis for treating bacteria, cyanotoxins and contaminants of emerging concern. *Materials Science in Semiconductor Processing*, 42, pp.2–14.
- Fagan, R. et al., 2016b. A review of solar and visible light active TiO<sub>2</sub> photocatalysis for treating bacteria, cyanotoxins and contaminants of emerging concern. *Materials Science in Semiconductor Processing*, 42, pp.2–14.
- Faretra, G., Scaramuzzi, G. & Ricci, M.D., 2009. *UV e Ozono: Tecnologie per depurazione senza additivi chimici* BE-MA., Milano, Itália.
- Francis, G., L-amino, T. & Murthy, K.-, 1988. Letter To the Editor Naming of Cyclic Heptapeptide Toxins of Cyanobacteria ( Blue-Green Algae ). *Advances*, (11), pp.971–973.
- Glaze, W.H., Kang, J.W. & Chapin, D.H., 1987. The Chemistry of Water Treatment Processes Involving Ozone, Hydrogen Peroxide and Ultraviolet Radiation. *Ozone: Science & Engineering: The Journal of the International Ozone Association*, 9(9), pp.335–352.
- Grisolia, C.K., 2005. *Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução. Riscos ao homem e ao meio ambiente, pela avaliação de genotoxicidade, carcinogenicidade e efeitos sobre a reprodução* Editora & U. de Brasília, eds., Brasília.
- Van Halderen, A. et al., 1995. Cyanobacterial (blue-green algae) poisoning of livestock in the western Cape Province of South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, 66(4), pp.260–4.
- Harada, K. et al., 1990. Structural determination of geometrical isomers of microcystins LR and RR from cyanobacteria by two-dimensional NMR spectroscopic techniques. *Chemical research in toxicology*, 3(5), pp.473–481.

- Herrmann, J., 1999. Heterogeneous photocatalysis: fundamentals and applications to the removal of various types of aqueous pollutants. *Catalysis Today*, 53(1), pp.115–129.
- Hoa, P.T.P. et al., 2011. Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. *Science of the Total Environment*, 409(15), pp.2894–2901.
- Hou, X. lin et al., 2006. Multi-Residue Analysis of Avermectins in Bovine Liver and Muscle by Liquid Chromatography–Fluorescence Detector. *Chromatographia*, 65(1-2), pp.77–80.
- Hunter, P.D. et al., 2009. Using remote sensing to aid the assessment of human health risks from blooms of potentially toxic cyanobacteria. *Environmental science & technology*, 43(7), pp.2627–2633.
- Iglesias, H.A., 2013. Introdução ao Acoplamento Cromatografia Líquida - Espectrometria de massas. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), pp.1–13.
- Iglesias, L.E. et al., 2006. Environmental impact of ivermectin excreted by cattle treated in autumn on dung fauna and degradation of faeces on pasture. *Parasitology Research*, 100(1), pp.93–102.
- INMETRO, 2011. Orientação sobre validação de métodos analíticos: Documento de caráter orientativo DOQ-CGCRE-008.
- Jang, M.H. et al., 2003. Toxin production of cyanobacteria is increased by exposure to zooplankton. *Freshwater Biology*, 48(9), pp.1540–1550.
- Jochimsen, E.M. et al., 1998. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *The New England journal of medicine*, 338(13), pp.873–8.
- De Julio, M. et al., 2010. A methodology for optimising the removal of cyanobacteria cells from a brazilian eutrophic water. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 27(1), pp.113–126.
- Kemper, N., 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*, 8(1), pp.1–13.
- Kingston, R., 2011. Pesticides and Herbicides. *Textbook of Critical Care*, 86(10), pp.1362–1365.
- Kormann, C., 1988. Photocatalytic production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and organic peroxides in aqueous suspensions of TiO<sub>2</sub>, ZnO, and desert sand. *Environmental science & technology*, 22(7), pp.798–806.
- Lanças, F.M., 2004. *Validação de Métodos Cromatográficos de Análises* RIMA, ed.,
- Lawton, L. a. & Robertson, P.K.J., 1999. Physico-chemical treatment methods for the removal of microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) from potable waters. *Chemical Society Reviews*, 28(4), pp.217–224.
- Legrini, O., Oliveros, E. & Braun, A.M., 1993. Photochemical processes for water treatment. *Chemical Reviews*, 93(2), pp.671–698.
- Lehner, A.F. et al., 2009. ESI+ MS/MS confirmation of canine ivermectin toxicity. *Journal of Mass Spectrometry*, 44(1), pp.111–119.
- Linden, K.G. & Mohseni, M., 2013. *Advanced Oxidation Processes: Applications in Drinking Water Treatment*, Elsevier Ltd.
- Liu, X. et al., 2013. Graphene-coated silica as a highly efficient sorbent for residual organophosphorus pesticides in water. *Journal of Materials Chemistry A*, 1(5), p.1875.
- MacManus-Spencer, L.A. et al., 2011. Aqueous photolysis of the organic ultraviolet filter

- chemical octyl methoxycinnamate. *Environmental Science and Technology*, 45(9), pp.3931–3937.
- Maldaner, L. & Jardim, I.C.S.F., 2009. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. *Química Nova*, 32(1), pp.214–222.
- Marie, B. et al., 2012. Effects of a toxic cyanobacterial bloom (*Planktothrix agardhii*) on fish: Insights from histopathological and quantitative proteomic assessments following the oral exposure of medaka fish (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*, 114-115, pp.39–48.
- Merel, S. et al., 2013. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment International*, 59, pp.303–327.
- Meriluoto, J. & Codd, G. a, 2005. *Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*, Namikoshi, M. et al., 1992. Identification of 12 hepatotoxins from a Homer Lake bloom of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis*, and *Microcystis wesenbergii*: Nine new microcystins. *J. Or*, 57(3), pp.866–872.
- Nishida, K. & Ohgaki, S., 1994. Photolysis of aromatic chemical compounds in aqueous TiO<sub>2</sub> suspensions. In *Water Science and Technology*. pp. 39–46.
- Nogueira, R.F.P.. J., 1998. Heterogeneous photocatalysis and its environmental. *Química Nova*, 1(1), pp.69–72.
- Oliveira, J. De & Freitas, F.A. De, 2013. Os mecanismos de resistência bacteriana da Salmonella sp. frente à utilização de antibióticos. *Centro Científico Conhecer*, 9(16), pp.1131–1153.
- Raya-Rodriguez, M.T., 2009. *Guia Prático relacionado à Validação e Garantia da Qualidade de Ensaios Laboratoriais* 1st ed. R. DE METROLOGIA, ed.,
- Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L.F.C., 2004. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 27, pp.771–780.
- Richardson, R.J. & Makhaeva, G.F., 2014. Organophosphorus Compounds. In *Encyclopedia of Toxicology*. pp. 714–719.
- Saker, M.L., Thomas, A.D. & Norton, J.H., 1999. Cattle mortality attributed to the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in an outback region of North Queensland. *Environmental Toxicology*, 14(1), pp.179–182.
- Sant’Anna, C.L. & Azevedo, M.T.P., 2000. Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil. *Nova Hedwigia*, 71(3), pp.359–385.
- Schweitzer, N. et al., 2010. Effects of ivermectin-spiked cattle dung on a water-sediment system with the aquatic invertebrates *Daphnia magna* and *Chironomus riparius*. *Aquatic Toxicology*, 97(4), pp.304–313.
- Sharma, V.K. et al., 2012. Destruction of microcystins by conventional and advanced oxidation processes: A review. *Separation and Purification Technology*, 91, pp.3–17.
- Sievers, M. & Gmbh, C., 2011. 4 . 13 Advanced Oxidation Processes.
- Tenover, F.C., 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American journal of medicine*, 119(6 Suppl 1), pp.S3–10; discussion S62–70.
- Tišler, T. & Kožuh Eržen, N., 2006. Abamectin in the aquatic environment. *Ecotoxicology*, 15(6), pp.495–502.
- Tiwari, D., Devi, A. & Chandra, R., 2011. Synthesis of cardanol based phenolic resin with aid of microwaves . Covered in Official Produc. , 3(2), pp.171–175.
- Turchi, C.S. & Ollis, D.F., 1990. Photocatalytic degradation of organic water

- contaminants: Mechanisms involving hydroxyl radical attack. *Journal of Catalysis*, 122(1), pp.178–192.
- Woodward, K.N., 2009. *Veterinary Pharmacovigilance*,
- World Health Organization, 1998. Cyanobacterial toxins : Microcystin-LR in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. *World Health Organization*, 2, pp.1–14.
- Zegura, B., Sedmak, B. & Filipic, M., 2003. Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 41(1), pp.41–48.

# **CAPÍTULO 3**

## **Bactérias Resistentes a Antibióticos**

---

### 3. DESINFECÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

Desinfecção de água superficial por cloração e processos oxidativos avançados: inativação de cepas de *E. coli* resistentes a antibióticos e avaliação da Citotoxicidade

#### Resumo

A liberação de antibióticos para o meio ambiente pode resultar na seleção de linhagem de microrganismos resistentes a diversos antibióticos que afetam, gravemente, a saúde humana. Bactérias resistentes a antibióticos foram detectadas em numerosos ambientes aquáticos, os quais são utilizados como fonte de abastecimento. A desinfecção da água pode ser uma solução para minimizar a propagação de microrganismos resistentes. No entanto, o processo convencional de cloração pode resultar na formação de subprodutos de desinfecção danosos à saúde. Neste estudo, foram comparados os processos oxidativos avançados (POA), designadamente, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV, TiO<sub>2</sub>/UV e N-TiO<sub>2</sub>/UV com o processo de cloração para inativação de cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) resistentes a antibióticos (RA), presentes em água superficial. O TiO<sub>2</sub> P25 comercial e o TiO<sub>2</sub> dopado com nitrogênio (N-TiO<sub>2</sub>) foram investigados nos experimentos de fotocatalise heterogênea. O N-TiO<sub>2</sub> foi preparado pelo método de sol-gel, com duas temperaturas diferentes de síntese (0 e -20 °C). Sob estas condições, a cloração com concentração inicial de cloro em 1,0 mg/L foi o processo mais eficiente, com tempo de contato de 2,5min, a obter a inativação de uma população inicial de 10<sup>6</sup> UFC/100mL. Entre os POAs, o processo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV resultou na melhor taxa de inativação, em 45 minutos de tratamento. A inativação de *E. coli* com o N-TiO<sub>2</sub>, sintetizado a 0°C, não foi observada após 120 minutos de tratamento, apenas alcançou 4,5 log de inativação com 45 minutos de reação. Além disso, foi avaliado o potencial de citotoxicidade, por meio do teste colorimétrico 3-(4,5-dime-thylthiazol-2-il)-2,5-diphenylte-trazolium, com linhagem de células derivadas dos seres humanos a partir dos processos de desinfecção com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV e cloração. Os resultados mostraram que ambos os processos de desinfecção afetaram similarmente a viabilidade das células HepG2.

**Palavras – Chave:** Resistência a antibióticos, água potável, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV, fotocatalise, teste de citotoxicidade MTT

*Surface water disinfection by chlorination and advanced oxidation processes: inactivation of an antibiotic resistant E. coli strain and cytotoxicity evaluation.*

**Abstract**

The release of antibiotics into the environment can result in antibiotic resistance (AR) spread, which in turn can seriously affect human health. Antibiotic resistant bacteria have been detected in different aquatic environments used as drinking water source. Water disinfection may be a possible solution to minimize AR spread but conventional processes, such as chlorination, result in the formation of dangerous disinfection by-products. In this study Advanced Oxidation Processes (AOPs), namely H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV, TiO<sub>2</sub>/UV and N-TiO<sub>2</sub>/UV, have been compared with chlorination in the inactivation of an AR Escherichia coli (E. coli) strain in surface water. TiO<sub>2</sub> P25 and nitrogen doped TiO<sub>2</sub> (N-TiO<sub>2</sub>), prepared by sol-gel method at two different synthesis temperatures (0 and -20°C), were investigated in heterogeneous photocatalysis experiments. Under the investigated conditions, chlorination (1.0 mg L<sup>-1</sup>) was the faster process (2.5 min) to achieve total inactivation (6 Log). Among POA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV resulted in the best inactivation rate: total inactivation (6 Log) was achieved in 45 min treatment. Total inactivation was not observed (4.5 Log), also after 120 min treatment, only for N-doped TiO<sub>2</sub> synthesized at 0°C. Moreover, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV and chlorination processes were evaluated in terms of cytotoxicity potential by means of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium colorimetric test on a human-derived cell line and they similarly affected HepG2 cells viability.

**Keywords:** antibiotic resistance, drinking water, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV, photocatalysis, cytotoxicity MTT assay

### 3.1. Introdução

A desinfecção com cloro tem sido utilizada desde o início do século XX para melhorar a qualidade sanitária da água potável, através da remoção de microrganismos patogênicos presentes na água de distribuição (Richardson et al. 2007). O cloro é o desinfetante mais, comumente, utilizado devido a sua altíssima eficiência na inativação de microrganismos prejudiciais à saúde, além de ter um custo relativamente baixo. No entanto, estudos conduzidos desde 1970 revelaram que a cloração gera subprodutos de desinfecção (SPD) potencialmente prejudiciais à saúde (Kurzawa-Zegota et al. 2014; Bull R. J et al. 2011). Desde então, centenas de espécies de SPD têm sido identificados e novos continuam sendo descobertos, devido ao desenvolvimento de métodos analíticos mais precisos (Cho M et al. 2004).

Frequentemente, águas destinadas para abastecimento público, quando submetida a processo de desinfecção com cloro, contém SPD como os trihalometanos (THMs) e ácidos haloacéticos (HAAs): haloacetoneitrilas (HANs), halocetonas (HKs), tricloronitrometano (Dotson et al. 2010, Cho et al. 2004). Esses subprodutos são originados quando ocorre a presença de compostos orgânicos em meio aquoso que reagem com o cloro.

Bactérias e Genes Resistentes a Antibióticos, bem como os antimicrobianos estão sendo detectados em vários ambientes aquáticos, incluindo rios e lagos (Scott Bergeron et al. 2015, Young et al. 2013, Storteboom et al. 2010, Chee-Sanford et al. 2001), águas balneares costeiras (Leonard, A. Fet al. 2015) e águas residuárias (Rizzo et al 2013, Zhang et al. 2009, Schwartz et al. 2003). Alguns autores consideram que as BRA e GRA são reconhecidas como poluentes emergentes (Zhuang et al. 2015, Pruden et al. 2006) e são as causas de grandes preocupações para os pesquisadores de qualidade de água.

O uso excessivo de antibióticos leva ao surgimento de microrganismos resistentes (Frauke et al. 2015, Saif et al 2014). Em particular, as estações de tratamento de esgotos (ETEs) são consideradas um dos principais 'hotspots' de GRA e BRA na contaminação do meio ambiente (Amos et al 2014, Blaak et al. 2014, Ribeiro et al. 2014, Laroche et al. 2010). O ecossistema aquático é considerado uma fonte crítica de depósitos de microrganismos resistentes a antibióticos. No geral, o método convencional de desinfecção de água não elimina efetivamente microrganismos resistentes, principalmente nas ETEs que utilizam o processo de cloração na etapa final do tratamento, pois ocorre o processo de seleção natural dos microrganismos. Assim, o sistema pode facilitar a disseminação das BRA em

água superficial e subterrânea, e influenciar diretamente na saúde humana (Timothy et al 2011). As BRA representam um problema global de saúde que requer melhor compreensão do seu destino em corpos aquáticos e de sua propagação pelo sistema de abastecimento de água (Bai X et al. 2015, Ramanan et al 2013).

Está sendo, sistematicamente, investigada a influência de diferentes processos de tratamento de água no combate às bactérias resistentes, como por exemplo: o uso de membrana e processo de oxidação avançada. Esses processos são cruciais para o controle de riscos microbiológicos na água potável. O cloro é um oxidante que atua na membrana celular dos microrganismos (Bai X et al 2015), sendo considerado o desinfetante mais utilizado em vários países. Historicamente, a qualidade microbiológica da água potável, nos sistemas de distribuição, foi o principal motivo do uso de cloro nas estações de tratamento de água (Zhang Y. et al. 2009). Estudos anteriores mostraram que a cloração é eficiente na remoção efetiva das BRA e GRA, presentes em água potável e águas residuais (Zhuang et al. 2015), mas os compostos indesejáveis contidos nessas águas podem influenciar significativamente no desempenho da desinfecção. A presença de traços de antibióticos, BRA e GRA na fonte de água é um problema emergente, e afeta, significativamente, a saúde pública e a indústria de produção de água potável (Ramanan et al. 2013).

A presença de antibióticos nas águas superficiais é indicativo da persistência contínua de lançamento do esgoto *in natura* ou tratados, parcialmente, nos corpos de água receptores. Quando esses contaminantes estão presentes nas águas de superfície, que são destinadas para as Estações de Tratamento de Água (ETA), eles não são removidos completamente (Schwartz et al 2009), podendo alcançar a água de consumo humano (Bai X. et al. 2015). A exposição crônica pelo consumo de água potável, contendo traços de antibióticos, aumenta a preocupação de tais compostos na água, mesmo que ainda não estejam claras as implicações associadas à saúde humana (Anastasi et al. 2013).

No processo de cloração, quando o cloro reage com antibióticos e outros contaminantes orgânicos, ocorre a oxidação e a formação de subprodutos de desinfecção. Estudos já apontaram alguns efeitos, como genotoxicidade e toxicidade aguda de subprodutos de compostos orgânicos, resultantes da desinfecção com cloro (Kurzawa-Zegota et al. 2014). Os riscos aumentam em países como o Brasil, onde a grande maioria das ETAs empregam a desinfecção com cloro. Dessa forma, estudos complementares devem ser realizados, principalmente, ensaios biológicos para avaliar os efeitos tóxicos

que os subprodutos da desinfecção proporcionam. Esses ensaios são considerados valiosos para avaliar os efeitos adversos dos microcontaminantes na saúde.

Os Processos de Oxidação Avançada (POAs), por exemplo: Fenton, foto-Fenton, fotocatalise - TiO<sub>2</sub>, UV/O<sub>3</sub>, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, têm sido investigados com êxito para a remoção de uma grande variedade de contaminantes (Coleman et al. 2012, Armstrong et al. 1981). Apesar de vários estudos sobre a inativação de microrganismos e remoção de fármacos por POA estarem disponíveis na literatura científica (Benotti et al. 2009, Stackelberg et al. 2004), muitos deles precisam ser aprofundados para a inativação de BRA em água de distribuição e em água para o reuso, principalmente, para BRA, presentes em ambiente naturais (Murcia et al. 2013, Zapata et al. 2010).

Portanto, o objetivo desse trabalho foi comparar o efeito da cloração e dos processos oxidativos avançados na desinfecção de cepas de *Escherichia Coli* resistentes a antibióticos isoladas da água de superfície, nomeadamente, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV TiO<sub>2</sub>/UV e N-TiO<sub>2</sub>/UV. Subsequentemente, avaliar a citotoxicidade dos subprodutos formados da desinfecção com cloro e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV com o uso de 3-(4,5-dime-thylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylte-trazolium teste colorimétrico (MTT) derivado de uma linhagem de células humanas.

## **3.2. Metodologia**

### *3.2.1. Amostra da água do rio Tusciano*

As amostras das águas superficiais foram coletadas no rio Tusciano (37 km, Taxa de fluxo aproximadamente de 300 L/s, Bacia Hidrográfica de 42 km<sup>2</sup>), na província de Salerno (Sul da Itália). Foram monitorados quatro pontos distintos ao longo do rio (A, B, C e D), de acordo com a Figura (3.1). No entanto, o ponto “A” foi o único utilizado para a realização dos testes de desinfecção, com as seguintes características: pH (8,3), COD (2,5 mg. L<sup>-1</sup>) e *E. coli* (5 x 10<sup>1</sup> UFC/100 mL).



**Figura 3.1:** Rio Tusciano localizado na província de Salerno.

(A) Primeiro ponto de coleta – área protegida; (B) Segundo ponto de coleta; (C) Terceiro ponto de coleta – Área urbana; e (D) Quarto ponto de coleta – Área urbana

### 3.2.2. Seleção e identificação das cepas de *E. coli* resistentes

A seleção e identificação das bactérias *E. coli* resistentes a múltiplos antibióticos ocorreu nas águas do rio Tusciano, em quatro pontos distintos do rio, iniciando do ponto de águas limpas (A) e finalizando no local de maior grau de poluição (D). Para cada coleta foi realizado o processo de filtração em membrana para seleção de cepas de *E. coli*, particularmente, 50 mL de água de cada um dos pontos foram filtradas através do filtro de membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore Billerica, MA, USA). A seleção das cepas de *E. coli* resistentes foram cultivadas em meios de cultura Triptona Bile X-Glucuronida (TBX, Oxoid Basingstoke, UK), com tempo de incubação de 24h a 37 °C, em pH  $7,2 \pm 2$ . O TBX é um meio de cultura cromogênico e seletivo para identificação presuntiva de *E. coli*, e contém: triptona (20 g/L), sais biliares (1,5 g/L), ágar (15 g/L) e, X-Glucuronida (0,075 g/L). O meio de cultura TBX foi suplementado com a mistura de três antibióticos: 2 mg/L de Ciprofloxacina (CPX), 16 mg/L de Ampicilina (AMP) e 8 mg/L de tetraciclina. As cepas cultivadas foram utilizadas nos experimentos de cloração e POAs. As cepas de *E. coli* mais resistentes a antibióticos em maior número foram encontradas nos pontos C e D.

### 3.2.3. Preparação da água de estudo

Inicialmente, as águas coletadas no ponto “A” do rio Tusciano foram autoclavadas a 120 °C, por um período de 15 minutos para a eliminação dos microrganismos, naturalmente presentes no meio. Ao esfriar foi adicionado o inóculo da cepa de *E. coli* resistente. Esse inóculo foi preparado em cultura de caldo nutriente LB Broth (LB, Sigma-Aldrich, Italy) em volume total de 14 mL, com a seguinte composição: triptona (10 g/L); extrato de levedura (5 g/L); e NaCl (5 g/L). Em seguida, o inóculo foi incubado a 37 °C por 18 horas, de modo a obter uma densidade celular de  $1-2 \times 10^7/100$  mL, e posteriormente, centrifugadas a 3000 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as cepas foram ressuspensas em solução salina estéril (0,9% de NaCl) até obter um volume inicial de 14 mL.

### 3.2.4. Experimento de desinfecção com POAs

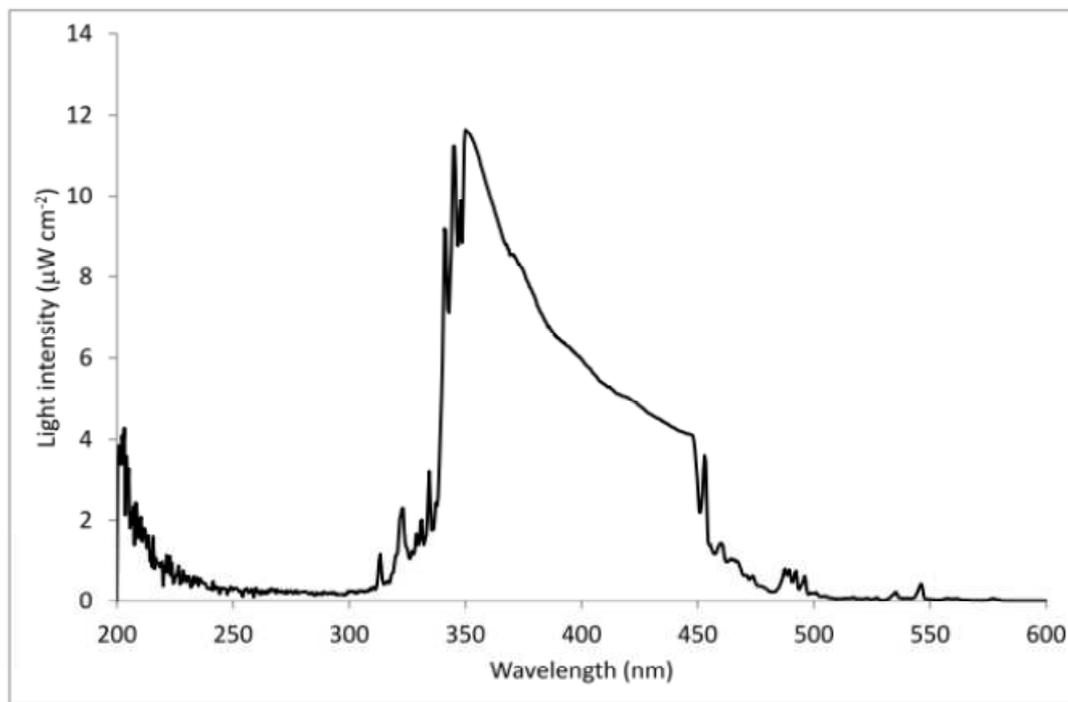
Dois diferentes experimentos com POAs foram avaliados: (i) processo de fotocatalise homogênea, combinação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e irradiação UV e (ii) fotocatalise heterogênea. Ambos os testes fotocatalíticos foram realizados no reator de vidro cilíndrico com capacidade de 1L (14 cm de diâmetro) preenchido com 500 mL da água de estudo. O reator foi colocado dentro de um recipiente com água para manter uma temperatura constante de aproximadamente 30 °C. Os experimentos foram conduzidos dentro de uma caixa equipada com uma lâmpada de 250 W (Procomat, Florença - Itália), fixada a 33 cm a partir do nível da água de superfície do reator, Figura (3.2).



**Figura 3.2:** Reator fotocatalítico do trabalho.

Um espectrômetro de modelo FC-2000 da Ocean Optics (Florida, USA) foi utilizado para medir os espectros de irradiância da lâmpada UV (Figura 3.3). Os experimentos de

controle do  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{TiO}_2$  e radiação UV ocorreram independentemente. Nos ensaios de fotocatalise heterogênea foram avaliados dois fotocatalisadores: o comercial- $\text{TiO}_2$  Degussa P25 e o  $\text{TiO}_2$  dopado com nitrogênio (N- $\text{TiO}_2$ ).



**Figura 3.3:** Espectro de intensidade de luz de 250 W da lâmpada usada em experimentos de fôtons

### 3.2.5. Experimento com $\text{H}_2\text{O}_2$ /UV

Os ensaios de decaimento das bactérias foram realizados com concentração inicial de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em 20 mg/L. As concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foram medidas pelo método colorimétrico, baseado no uso do Titânio (IV) Oxissulfato –  $\text{O}_5\text{STi}$  – (Sigma-Aldrich) que forma um complexo amarelo e detectável por absorvância em 410 nm no espectrômetro (Sistema Perkin Elmer Lambda 25 - UV/vis). A curva de calibração foi plotada com soluções padrões de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água destilada, no intervalo de 0,1 –100 mg/L. Para eliminar o residual de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , após cada coleta do experimento, uma solução de catalase de fígado bovino (0.1 g/L, Sigma - Aldrich, USA) era adicionada numa proporção de 0,1/5 (v/v).

### 3.2.6. Experimentos fotocatalíticos

O fotocatalisador de  $\text{TiO}_2$  dopado com Nitrogênio (N- $\text{TiO}_2$ ) foi preparado pelo método sol-gel usando duas temperaturas de síntese (0 e  $-20^\circ$ ), de acordo com o método

descrito por Vaiano et al. (2015). Na síntese do catalisador foi utilizado o surfactante não iônico (Sigma-Aldrich) como agente dispersante. O Triton X-100 foi dissolvido em álcool isopropílico (99,8%) e o pH da solução foi ajustado para 2, com ácido nítrico (65%), e em seguida foi adicionado na solução o titânio (IV) isopropóxido (97%). Um banho criostato foi utilizada para controlar e monitorar a temperatura durante a síntese do sol-gel. Quando a temperatura de síntese foi alcançada, a solução aquosa de amoníaco (30%) foi adicionada como precursor de nitrogênio. O precipitado obtido foi calcinado por 30 minutos a 450 °C. A taxa molar de N/Ti foi igual a 18,6 e corresponde a uma formulação do catalisador otimizado encontrado no trabalho de Sannino et al., (2013). As amostras do N-TiO<sub>2</sub> resultou em uma aparência amarelada e foi nomeado xNDt onde x é a temperatura de síntese. Ambas as amostras apresentaram energia de band-gap de 2,5 eV. A área da superfície específica (ASE) foi de 98 e 147 m<sup>2</sup>/g para 0NDt e -20NDt, respectivamente. O aumento da ASE com a diminuição da temperatura de síntese induziu a diminuição do tamanho médio do cristalito de 9 para 6 nm (Vaiano et al., 2015). A concentração do N-TiO<sub>2</sub> aplicado nos teste fotocatalítico foi de 0,05 g/L

### 3.2.7. Experimentos de cloração

O experimento de cloração foi testado com solução de hipoclorito de sódio (1 mg/L), adicionada no reator, ressaltando que o pH da água não foi ajustada durante os experimento. As amostras do reator foram coletadas em 0, 2,5, 5,0, 7,5, 10, 15 e 30 minutos e, imediatamente, após cada coleta, uma solução de tiosulfato de sódio (1,5%) era adicionada para remover o cloro residual antes da contagem das bactérias sobreviventes. O cloro residual foi medido pelo teste colorimétrico com o Kit portátil da HACH.

### 3.2.8. Contagem de bactérias

As amostras coletadas nos experimentos eram armazenadas em microtubos tipo Eppendorf, e posteriormente, eram realizadas a contagem das bactérias remanescentes pelo método de diluição seriada. As diluições seriadas foram preparadas em solução salina 1/10, em seguida, 200µL da solução diluída era espalhada na placa de Petri contendo o meio de cultura TBX. As amostras foram distribuídas de maneira uniforme sobre a superfície das placas sem danificar o meio, e incubadas a 37°C por um período de 24 horas.

### 3.2.9. Cultura de células HepG2

As células HepG2 foram obtidas do centro de biotecnologia avançada (Genôva, Itália). As células foram preparadas em meio mínimo essencial de Eagle para cultivos celulares, em placa de Petri 100 x 10 mm, contendo as seguintes composições: meio Eagle suplementado com 10% (v/v) de soro bovino, 1% (v/v) de aminoácidos não essenciais, 0,2 mM de L-glutamina e 50 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich). As células foram mantidas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico umidificado, e incubadas por duas semanas.

### 3.2.10. Ensaio de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram feitos com as amostras coletadas dos experimentos de desinfecção com cloro e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV, na intenção de avaliar a toxicidade dos subprodutos formados. As amostras foram submetidas a extração em fase sólida usando cartucho C18, para concentrar os subprodutos de desinfecção formados. Os cartuchos foram eluídos à 5 mL com dimetilsulfoxido (DMSO).

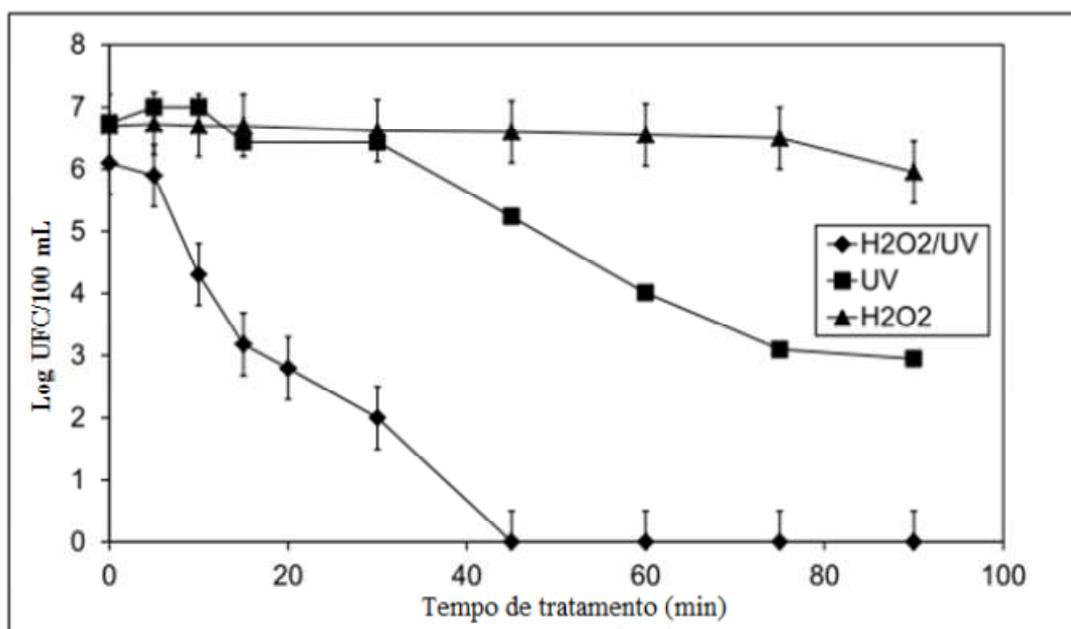
Para cada tratamento de desinfecção, as amostras, previamente preparadas com DMSO, foram diluídas (1:2000) em cultura de células HepG2, obtendo uma concentração final de DMSO de 0,05%. Em seguida, a cultura de células HepG2 com densidade de 9.0 x 10<sup>4</sup>/cm, contendo as amostras em estudo, foi cultivada em microplacas de 96 poços com volume de 100µL, por um período de incubação de 24 horas. Em seguida, foi adicionado uma solução de MTT com concentração de 0,125 mg/mL e, novamente incubada por 1h a 37 °C. Após esse período de incubação ocorreu a formação de cristais de formazan, a partir da metabolização do MTT que foram dissolvidos em DMSO, e posteriormente, medidos em absorbância de 595 nm usando um leitor de microplacas (Bio-Rad 237 Laboratories, Milan, Italy). Paralelamente, foi verificada a citotoxicidade da catalase e do Tiosulfato de sódio, substâncias que inibi a ação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e do cloro, respectivamente, como teste de controle. Todas as amostras foram em triplicatas e os dados obtidos foram tratados com teste estatístico ANOVA e as diferenças foram avaliadas pelo teste *t Student* (p <0,05). A saber, o ensaio de MTT ocorre através da captação do corante Tetrazolium, a partir da atividade metabólica mitocondrial, esse teste é baseado na conversão de enzimas desidrogenase mitocondrial intactas de células vivas (Mosmann, 1983). O ensaio

compara e avalia a morfologia e atividade metabólica pelo teste de MTT [3-(4,5-dimetilazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio], Vermelho Neutro (VN) e Azul de Tripan.

### 3.3. Resultados e discussão

#### 3.3.1. Inativação de *E. coli* resistentes por UV e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV

Os resultados dos ensaios de desinfecção com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e irradiação UV na inativação de *E. coli* resistentes estão apresentados na Figura (3.4). Os experimentos com concentração inicial de 20 mg/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não obtiveram nenhum resultado significativo até 75 minutos de tratamento, apenas foi observado 1 Log de inativação após 90 minutos de reação. Os testes com radiação UV mostraram que em 30 minutos de reação não foram suficientes para inativar as *E. coli* resistentes, por outro lado, quando se aplica um tempo maior de exposição ocorrer uma maior inativação das bactérias. Nos experimentos de UV-A observa-se que em 75 minutos de exposição ocorreu a inativação de 4 Log de unidades formadoras de colônias. Os resultados obtidos no processo de desinfecção com irradiação UV-A no comprimento de onda de 350-450 nm (Figura 3.4) podem ser justificados pelo fato de que a irradiação danifica a membrana celular ao passo que a luz vai sendo absorvida nas membranas (Malato et al. 2009). Sabe-se que os comprimentos de onda UV-A não são suficientes para modificar diretamente a base do DNA, mas desempenham um papel importante na formação de espécies de oxigênio reativo na água que pode causar danos no DNA (Rizzo et al. 2014, Sannino et al. 2014). Por outro lado, quando testes são realizados com radiação UV-C os danos ocorrem diretamente no DNA das células e resulta no bloqueio de replicação do DNA e RNA (Malato et al. 2009). É importante mencionar que ao utilizar a luz UV-A pode ocorrer uma possível mutação de *E. coli* sobreviventes após o processo de desinfecção por UV (Cheng et al. 2013, Dodd et al. 2012). Particularmente, a intensidade de danos na membrana celular depende do tempo de exposição, intensidade da lâmpada e do comprimento de onda aplicada na irradiação UV, assim como, das espécies que estão sendo afetadas e da concentração inicial das bactérias presentes no meio (Rizzo et al. 2014). É possível que diferentes células interajam de diferentes maneiras com os constituintes dissolvidos na água, e conseqüentemente, pode afetar a viabilidade do processo de desinfecção (Pang et al. 2015).



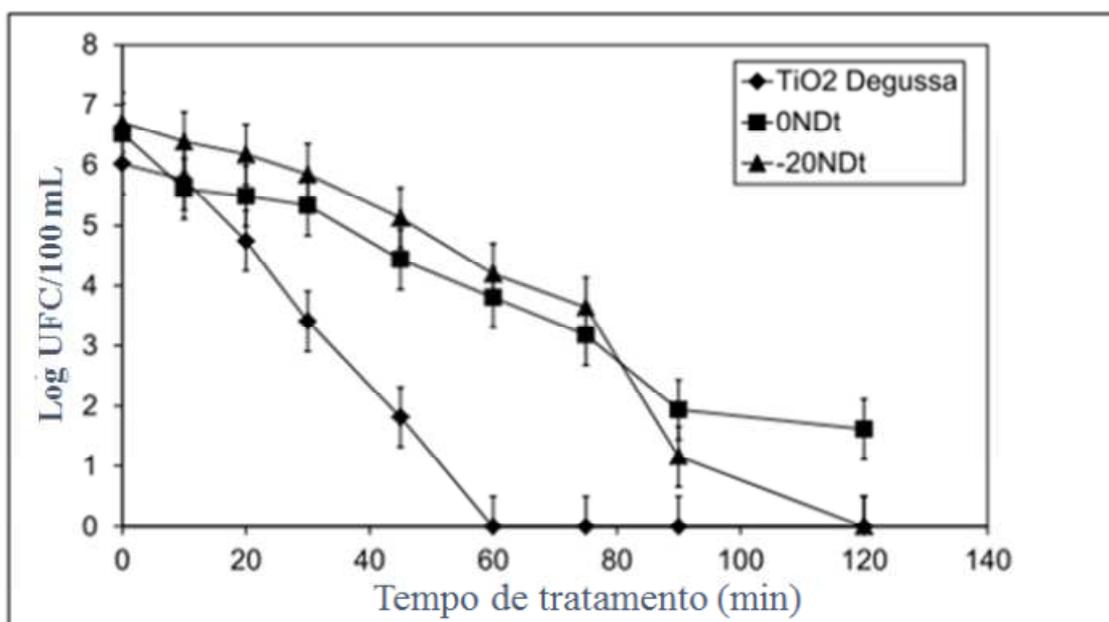
**Figura 3.4:** Inativação de *E. coli* RA utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e UV-A (lâmpada germicida 250 W)

De acordo com os resultados obtidos, o processo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV foi mais eficiente quando comparado com os testes de UV-A e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aplicados individualmente. O processo combinado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV resultou em uma inativação 7 UFC/100mL após 45 minutos de tratamento. Essa eficiência de inativação pode estar relacionada com os seguintes aspectos: (1) A difusão do peróxido na membrana celular, causando um estresse osmótico e facilitando a difusão excessiva do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dentro da célula e; (2) ausência de matéria orgânica, sais e turbidez na água de superfície evitando partículas no meio que atuariam como escudo, e conseqüentemente, dificultaria a penetração da luz e a difusão do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Fiorentino et al. (2015) verificaram a taxa de inativação da cepa de *E. coli* resistentes a desinfecção de águas residuárias utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV-A e obteve um resultado de inativação de *E. coli* 6 UFC/mL com dose de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 50 mg/L e 90 minutos de irradiação. Rubio et al (2013) realizaram ensaios com água de característica salina para inativação de *E. coli* resistentes, no estudo eles utilizaram 10 mg/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e irradiação UV-A e conseguiram uma inativação de 5 UFC/mL no tempo de 4 horas.

### 3.3.2. Inativação de *E. coli* resistentes a antibiótico por fotocatalise heterogênea

Os experimentos de desinfecção com fotocatalise heterogênea alcançou uma inativação de 7 UFC/100 mL com 60 e 120 minutos de irradiação com TiO<sub>2</sub> comercial e -20NDt, respectivamente (Figura 3.5). O comportamento da inativação obtida nesse

estudo foi semelhante com os resultados obtidos no trabalho de Pathakoti et al. (2013). Os autores observaram que o  $\text{TiO}_2$  comercial tem uma taxa de inativação superior ao  $\text{TiO}_2$  dopado com nitrogênio sob irradiação UV-A/B. A baixa atividade fotocatalítica de -20NDt em relação ao  $\text{TiO}_2$  Degussa foi, possivelmente, devido a menor emissão da luz na região visível (350 nm). No entanto, ao comparar os fotocatalisadores dopados com nitrogênio, observa-se que o -20NDt foi mais eficaz do que o 0NDt. A inativação total (6,5 log) foi observada após 120 minutos de tratamento com o -20NDt, enquanto 4,5 Log de inativação foi observada para o fotocatalisador 0NDt. O melhor desempenho de desinfecção observado com -20NDT foi possivelmente devido a sua maior área superficial ( $147 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) com relação ao fotocatalisador 0NDt ( $98 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ).



**Figura 3.5:** Inativação de *E. coli* RA por Fotocatálise Heterogênea (lâmpada germicida 250 W) com concentração fixa de 0,05 g.L<sup>-1</sup>

No estudo anterior realizado por Dunlop et al. (2014), na inativação de cepas de *E. coli* resistente a antibiótico em água residuária, aplicando o processo de desinfecção com fotocatalise, sob radiação solar, obteve uma inativação total de 6 Log de UFC/mL com 60 minutos de radiação e dosagem de 0,2 g/L de  $\text{TiO}_2$  dopado com nitrogênio. Por outro lado, nesse trabalho foi utilizado uma dosagem de 0,05 g/L do mesmo catalisador e resultou na diminuição de 3 unidade de Log com 60 minutos de radiação. A diferença dos resultados pode ser justificada pela diferença da quantidade do catalisador utilizado, que foi 75% inferior a dosagem aplicada por Dunlop et al., (2014), e resultou na diminuição

de sítios fotoativos na solução. Rizzo et al.(2014) investigou a inativação de *E. coli* resistentes em água residuária urbana, aplicando 0,05 g/L de TiO<sub>2</sub> P25 e obteve resultado de inativação total de 7 Log de UFC/mL após 60 minutos de tratamento.

### 3.3.3. Teste de cloração

A dose inicial de cloro de 1 mg/L foi suficiente para atingir uma inativação total de *E. coli* resistente de 7 log de UFC/100 mL após o tempo de contato de 2,5 min. Experimentos realizados por Fiorentino et al. (2015) na desinfecção de águas residuais urbanas inoculados com cepas de *E. coli* resistentes e uma dose de cloro de 2,5 mg/L e tempo de contato de 15 minutos obtiveram resultados de 5 log de inativação. Basicamente, a diferença entre os resultados podem ser justificados pela qualidade da água em estudo águas residuárias urbanas são tipicamente caracterizados por elevada concentração de compostos que consomem cloro, tal como os compostos inorgânicos. Por outro lado as características da água matriz utilizada neste trabalho tem baixíssima concentração de interferentes e desta forma não influenciaram no processo de desinfecção por não apresentar concorrentes na água. Em particular, sólidos e constituintes dissolvidos na água afetam a demanda de cloro e pode diminuir a taxa de inativação de bactérias. Diversas pesquisas avaliaram o processo de cloração em águas residuária e observaram que após o processo de desinfecção ocorre a prevalência de GRA e (Oh J. et al. 2014). Desta forma o trabalho apresentado nesta tese demonstra que a desinfecção com cloro em água destinada para abastecimento humano apresenta um efeito positivo na inativação de BRA. Por outro lado, trabalhos que analisam a desinfecção em águas residuárias observaram a possível mobilidade dos genes na comunidade microbiana existente no meio após a desinfecção com cloro (Sannino et al. 2014, Anastasi et al. 2013, Timothy et al. 2011, Larocheet. 2010). Pang et al. (2015) demonstraram que o processo de cloração não contribuiu para a inativação de cepas de *E. coli* RA com curto tempo de contato (TC) e com baixas concentrações de cloro, favorecendo a resistência de *E. coli* após a cloração. Estudos realizados por Oh et al. (2014) e Zhuang et al. (2015) evidenciaram que é necessário uma dosagem superior a 30 mg/L de Cl<sub>2</sub> para remover 90% de BRA e GRA com tempo de contato de 15 minutos. Rizzo et al. (2013) avaliaram o efeito do cloro na dose de 2 mg/L no efluentes da ETE para inativação de 5,0 Log de *E. coli* RA com tempo de contato de 60 minutos e para a inativação das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (99,97% de inativação) foram necessário 120 minutos. Os

resultados de resistência a cloração podem variar dependendo da qualidade da água de estudo e do tipo de cepa que está sendo estudada. Vale salientar que as altas concentrações de antibióticos podem favorecer o desenvolvimento de BRA e dificultar a desinfecção por cloração. Nossos resultados da desinfecção de *E. coli* RA não apresentou tolerância à cloração e obteve taxa de inativação elevada (7,0-Log) com 1 mg Cl<sub>2</sub>. L<sup>-1</sup> em 5 minutos de contato. Por fim, estes contrastes de resultados, com relação à resistência no processo de desinfecção com cloro, podem ser justificados pelas estruturas, os tipos de espécie bacterianas presentes no meio, a qualidade da água de estudo e a presença de interferentes na água.

#### 3.3.4. *Avaliação da citotoxicidade dos subprodutos formados no processos de cloração e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV*

A citotoxicidade dos subprodutos formado no processo de desinfecção foram testadas pelo ensaio de atividade metabólica mitocondrial (MTT). Para esse ensaio foi utilizada uma linhagem celular estável constituída por células de carcinoma hepático humano HepG2. Os resultados do teste de controle com as amostras contendo catalase e tiosulfato de sódio, compostos utilizadas para eliminar o residual H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e cloro, respectivamente, observados na Figura (3.6) demonstraram que não houve redução significativa da viabilidade metabólica da célula. As amostras submetidas ao processo de desinfecção com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV e cloro obtiveram um ligeiro efeito citotóxico, ou seja, ocorreu a inibição da atividade metabólica celular, através da presença do cloro e do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. No entanto, a única amostra que resultou em uma inviabilidade celular de forma significativa foi a coletada de 30 minutos no processo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV, e a medida que o teste procedeu essa inviabilidade não mais ocorreu.

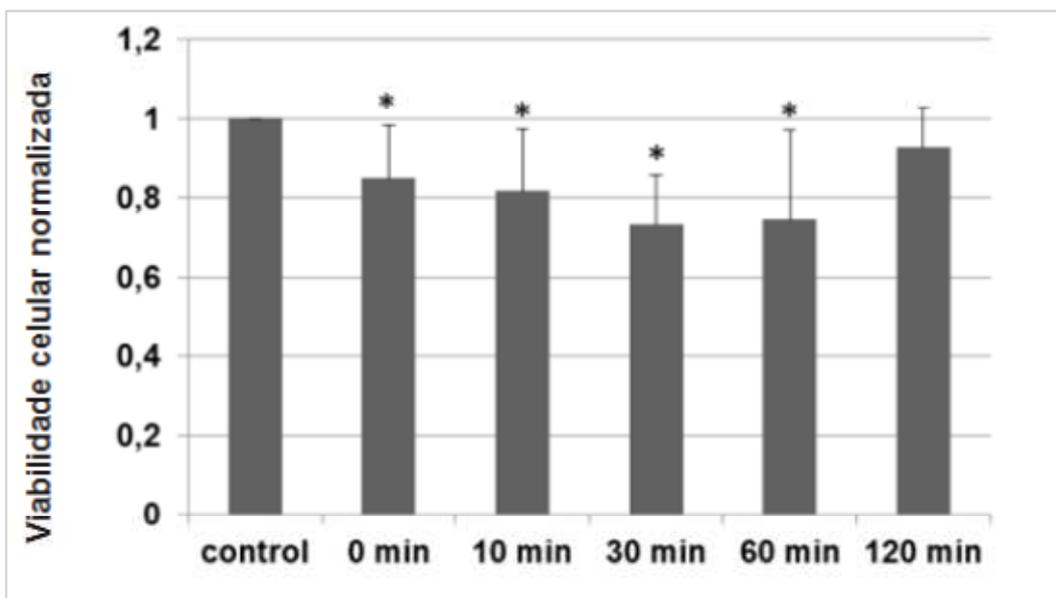


Figura 3.6: Viabilidade celular normalizada de células de HepG2 após 24 h de exposição para as amostras de água tratada pelo processo  $H_2O_2/UV$ .

Possivelmente, o tratamento realizado no curto período de tempo influencia na formação de subprodutos de oxidação e uma diminuição na viabilidade celular. No tempo de 30 minutos foi identificada uma leve citotoxicidade e ao passo que aumenta o tempo de reação (até 120 min) ocorre um desaparecimento gradual dos subprodutos de oxidação que causam a inviabilidade celular.

A formação dos subprodutos de desinfecção durante o processo de cloração pode ocorrer com maior tempo de contato, isso vai depender da demanda de oxidante requerido para tratar a água. Assim, os experimentos de cloração para avaliar a citotoxicidade foram prolongados até 420 minutos (Figura 3.7). Embora isso não seja um tempo de contato de desinfecção realista (tipicamente na faixa de 30-60 min para o processo de cloração), esse tempo foi útil para compreender melhor o efeito do processo de cloração na água tratada e avaliar a citotoxicidade dos subprodutos de desinfecção formados. Os resultados observados na figura (3.7) foram coerentes com a questão de que a citotoxicidade é aumentada à medida que o tempo de contato com o cloro é estendido, de acordo com Rizzo et al.(2007) o longo tempo de contato da água com o cloro pode resultar na formação de subprodutos de cloração.

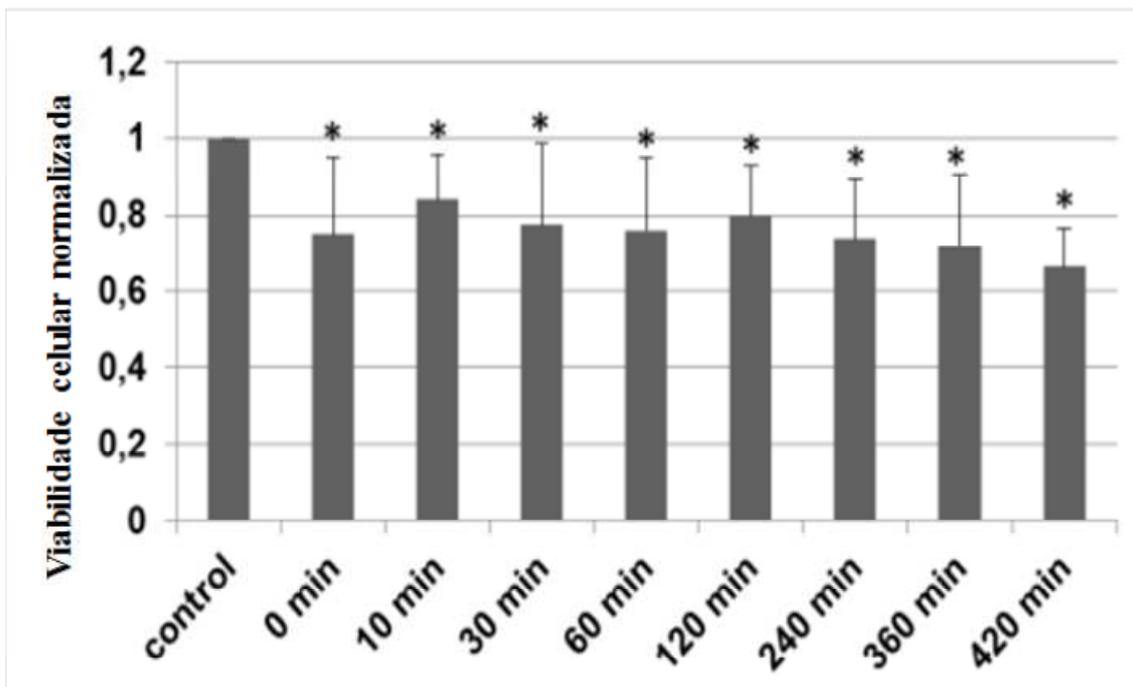


Figura 3.7: viabilidade celular normalizada por células HepG2 após 24 h exposta a amostras de água tratada por cloração.

### 3.4. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, a fotodegradação com UV-A não foi eficaz na inativação das bactérias resistentes. A aplicação da radiação UV sozinha não é segura para o processo de desinfecção, sendo necessário a combinação de um catalisador para que a inativação total ocorra. O processo de desinfecção de  $H_2O_2/UV$  (20 mg de  $H_2O_2/L$ ) mostrou ser mais eficiente do que os processos fotocatalíticos. O processo homogêneo obteve uma inativação total após 45 minutos de reação e o processo heterogêneo com  $TiO_2$  comercial (0,05 g/L) foram necessários 60 minutos de tratamento. O catalisador -20NDt foi mais eficiente do que o fotocatalisador 0NDt obtendo uma inativação de 6,5 Log e 4,5 Log, respectivamente, ambos catalisadores sintetizados foram testados com 120 minutos de exposição.

### 3.5. Referências

- Amos, G.C., Hawkey, P.M., Gaze, W.H., Wellington, E.M. Wastewater effluent contributes to the dissemination of CTX-M-15 in the natural environment. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 69, p. 1785–1791, 2014.
- Anastasi, E.M., Wohlsen, T.D., Stratton, H.M., Katouli, M. Survival of Escherichia coli in two sewage treatment plants using UV irradiation and chlorination for disinfection. *Water Res.*, v. 47, p. 6670–6679, 2013.
- Armstrong, J.L., Shigeno, D.S., Calomiris, J.J., Seidler, R.J. Antibiotic-resistant bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 242, p. 277-283, 1981.
- Bai X., Ma X., Xu F., Li J., Zhang H., Xiao X. The drinking water treatment process as a potential source of affecting the bacterial antibiotic resistance. *Science of the Total Environment*, v. 533, p. 24–31, 2015.
- Benotti, M. J., Trenholm, R. A., Vanderford, B. J., Holady, J. C., Stanford, B. D., e Snyder, S. A. Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water. *Environmental Science & Technology*, v. 43, n. 3, p. 597–603, 2009.
- Blaak, H., de Kruijf, P., Hamidjaja, R.A., van Hoek, A.H., de RodaHusman, A.M., Schets, F.M. Prevalence and characteristics of ESBL-producing E. coli in Dutch recreational waters influenced by wastewater treatment plants. *Vet. Microbiol.*, v. 171, p. 448–459, 2014.
- Bull R. J., Reckhow D. A. Li X, Humpage AR, Joll C, Hrudey SE. Potential carcinogenic hazards of non-regulated disinfection by-products: Haloquinones, halo-cyclopentene and cyclohexene derivatives, N-halamines, halonitriles, and heterocyclic amines. *Toxicology*, 286: 1-19, 2011.
- Chee-Sanford J C, Aminov R I, Krapac I J, Garrigues-Jeanjean N, Mackie R I. Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(4): 1494 – 1502

Cheng, W.X., Chen, H., Su, C., Yan, S.H. Abundance and persistence of antibiotic resistance genes in livestock farms: a comprehensive investigation in eastern China. *Environ. Int.* 61, 1–7, 2013.

Cho M, Chung H, Choi W, Yoon J. Linear correlation between inactivation of E. coli and OH radical concentration in TiO<sub>2</sub> photocatalytic disinfection. *Water Res.* v. 38: 1069-1077, 2004

Coleman, B.L., Salvadori, M.I., McGeer, A.J., Sibley, K.A., Neumann, N.F., Bondy, S.J., et al. The role of drinking water in the transmission of antimicrobial-resistant E. coli. *Epidemiol. Infect.* 140, 633–642, 2012.

Dodd M C. Potential impacts of disinfection processes on elimination and deactivation of antibiotic resistance genes during water and wastewater treatment. *Journal of Environmental Monitoring*, v. 14, n. 7, p. 1754 – 1771, 2012.

Dotson AD, Keen VS, Metz D, Linden KG. UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment of drinking water increases post-chlorination DBP formation. *Water Res.* v. 44: 3703-3713, 2010.

Dunlop P., Ciavola M., Rizzo L., Byrne J. A. Inactivation and injury assessment of Escherichia coli during solar and photocatalytic disinfection in LDPE bags, *Chemosphere*, v. 85, p. 1160–1166, 2011.

Dunlop P.S., Ciavola M., Rizzo L., McDowell D. A., Byrne J. A. Effect of photocatalysis on the transfer of antibiotic resistance genes in urban wastewater, *Catal. Today*, 2014.

Escobar-Hoyos LF, Hoyos-Giraldo LS, Londono-Velasco E, Reyes-Carvajal I, Saavedra-Trujillo D, Carvajal-Varona S, et al. Genotoxic and clastogenic effects of monohaloacetic acid drinking water disinfection by-products in primary human lymphocytes. *Water Res.* v. 47: 3282-3290, 2013.

Fiorentino A., Ferro G., Alferez M. C., López M. I., Ibanez P. F., Rizzo, L. Inactivation and regrowth of multidrug resistant bacteria in urban wastewater after disinfection by solar-driven and chlorination processes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 148, 43–50, 2015.

Fiorentino, A., Ferro, G., Alferez, M.C., Polo-Lopez, M.I., Fernandez-Ibanez, P., Rizzo, L. Inactivation and regrowth of multidrug resistant bacteria in urban wastewater after disinfection by solar-driven and chlorination processes. *J. Photochem. Photobiol. B.* 148, 43–50, 2015

Frauke Luddeke, Stefanie Heb, Claudia Gallert, Josef Winter, Hans Gude, Herbert Leoffler. Removal of total and antibiotic resistant bacteria in advanced wastewater treatment by ozonation in combination with different filtering techniques. *Water research* v. 69, p. 243 e 251, 2015.

Huang, J-J, Xi J., Hu, H-Y., Yi Li, Sun-Qin Lu, Fang Tang, Yu-Chen Pang UV light tolerance and reactivation potential of tetracycline-resistant bacteria from secondary effluents of a wastewater treatment plant, *Journal of environmental sciences*, 2015.

Kurzawa-Zegota .M, Ali A., Najafzadeh M., Gopalan R.C., Plewa MJ, Anderson D. Effect of drinking water disinfection by-products in human peripheral blood lymphocytes and sperm. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* v. 770: 136-143, 2014.

Laroche, E., Petit, F., Fournier, M., Pawlak, B., 2010. Transport of antibiotic resistant *Escherichia coli* in a public rural karst water supply. *J. Hydrol.* v. 392 n. 1–2, p. 12–21, 2010.

Leonard, A. F. C., Zhang L., Balfour, A. J., Garside R., Gaze, W. H. Human recreational exposure to antibiotic resistant bacteria in coastal bathing waters." *Environment International*, 2015.

Liu, y., Li, j., Qiu, X., Burda, C. Novel TiO<sub>2</sub> nanocatalysts for wastewater purification: tapping energy from the sun. *Water Science and Technology*, v. 54, p. 47–54, 2006.

Malato S., Fernández-Ibáñez P., Maldonado M. I., Blanco J., Gernjak W. Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: recent overview and trends. *Catal. Today*, v.147, p. 1–59, 2009.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

Murcia J. J., Hidalgo M. C., Navío J. A., Vaiano V., Sannino D., Ciambelli P. Cyclohexane photocatalytic oxidation on Pt/TiO<sub>2</sub> catalysts. *Catal. Today*, v. 209, p. 164–169, 2013.

Oh, J., Salcedo D. E., Medriano C. A., Kim S. Comparison of different disinfection processes in the effective removal of antibiotic-resistant bacteria and genes. **Journal of Environmental Sciences** 26, 1238–1242, 2014

Pang Y., Huang J., Xi J., Hu, H., Zhu Y., Effect of ultraviolet irradiation and chlorination on ampicillin-resistant *Escherichia coli* and its ampicillin resistance gene. **Front. Environ. Sci. Eng.** 2015.

Pathakoti, K., Morrow, S., Han, C., Pelaez, M., He, X., Dionysiou, D.D., et al. Photoinactivation of *Escherichia coli* by sulfur-doped and nitrogen-fluorine-codoped TiO<sub>2</sub> nanoparticles under solar simulated light and visible light irradiation. *Environ. Sci. Technol.* 47, 9988–9996, 2013

Pruden A, Pei R, Storteboom H, Carlson K H. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 23, p. 7445-7450, 2006

Ramanan, L., Adriano, D., Chand, W. Antibiotic resistance bacterial the need for global solutions. **Lancet Infect. Dis**, v.13, n. 12, p. 1057–1098, 2013.

Ribeiro, A.F., Bodilis, J., Alonso, L., Buquet, S., Feuilloley, M., Dupont, J., Pawlak, B. Occurrence of multi-antibiotic resistant *Pseudomonas* spp. in drinking water produced from karstic hydrosystems. **Sci. Total Environ**, v. 490, p. 370–378, 2014.

Richardson, S. D., Plewa, M. J., Wagner, E. D., Schoeny, R., e Demarini, D. M. Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: a review and roadmap for research. **Mutation Research**, v. 636, n. 1-3, p. 178–242, 2007.

Rizzo L, Manaia C, Merlin C, Schwartz T, Dagot C, Ploy M C, Michael I, Fatta-Kassinos D. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. **Science of the Total Environment**, v. 447, p. 345-360, 2013.

Rizzo L., G. Ferro, Manaia C.M., Wastewater disinfection by solar heterogeneous photocatalysis: effect on tetracycline resistant/sensitive *Enterococcus* strains, **Global NEST J.** v. 16, p. 455–462, 2014.

Rizzo, L., Della Sala, A., Fiorentino A. Li Puma, G. Disinfection of urban wastewater by solar driven and UV lamp e TiO<sub>2</sub> photocatalysis: Effect on a multidrug resistant Escherichia coli strain.

**Water research**, v. 53, p. 145 e152, 2014

Rizzo, L., Nikolaou, A., Andrzejewski, P. Disinfection of drinking waters and DBPs formation: chlorination. Control of Disinfection By-Products in Drinking Water Systems, Chapter 1.1 - Chlorination, pp. 3–28, 2007.

Rubio, D., Nebot, E., Casanueva, J. F. & Pulgarin, C. Comparative effect of simulated solar light, UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and photo-Fenton treatment (UV-Vis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>,<sup>3+</sup>) in the Escherichia coli inactivation in artificial seawater. **Water Res.** **47**, 6367–6379 (2013).

Saif N. Al-Bahry, I.Y. Mahmoud, J.R. Paulson, S.K. Al-Musharafi. Antibiotic resistant bacteria in terrestrial and aquatic environments: A review. **iMedPub Journals**, v. 4, n.. 3-2, 2014.

Sannino D, Rizzo, L, Vaiano V., Sacco O., Scarpa A., Pietrogiacomini D. Effect of solar simulated N-doped TiO<sub>2</sub> photocatalysis on the inactivation and antibiotic resistance of na E. coli strain in biologically treated urban wastewater. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 144, p. 369-378, 2014.

Schwartz T, Kohlen W, Jansen B, Obst U. Detection of antibiotic- resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. **Microbiology Ecology**, v. 43, n. 3, p. 325 – 335, 2003.

Scott Bergeron, Raj Boopathy, Rajkumar Nathaniel, Angie Corbin, Gary LaFleur. Presence of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in raw source water and treated drinking water. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.102, p. 370374, 2015.

Shi, P., Jia, S.Y., Zhang, X.X., Zhang, T., Cheng, S.P., Li, A.M. Metagenomic insights into chlorination effects on microbial antibiotic resistance in drinking water. **Water Res.** **47**, 111–120, 2013.

Stackelberg, P. E., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Zaugg, S. D., Henderson, A. K., e Reissman, D. B. Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a

conventional drinking-water-treatment plant. *The Science of the Total Environment*, v. 329, n. 1-3, p. 99–113, 2004.

Storteboom H, Arabi M, Davis J G, Crimi B, Pruden A. Identification of antibiotic-resistance-gene molecular signatures suitable as tracers of pristine river, urban, and agricultural sources. *Environmental Science & Technology*, v. 44, n. 6, p. 1947 – 1953, 2010.

Timothy, R.W., Janis, W., David, M.L. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect. Dis*, v. 11, p. 355–362, 2011.

Tsai T. M., Chang H. H., Chang K. C., Liu Y. L., Tseng C. C. A comparative study of the bactericidal effect of photocatalytic oxidation by TiO<sub>2</sub> on antibiotic-resistant and antibiotic-sensitive bacteria, *J. Chem. Technol. Biotechnol*, v. 85, p. 1642–1653, 2010.

Young, S., Juhl, A., O'Mullan, G.D. Antibiotic-resistant bacteria in the Hudson river estuary linked to wet weather sewage contamination. *J. Water Health* 11, 297–310, 2013.

Zapata A., Oller I., Rizzo L., Hilgert S., Maldonado M. I., Sánchez-Pérez J. A., Malato S., Evaluation of operating parameters involved in solar photo-Fenton treatment of wastewater: interdependence of initial pollutant concentration, temperature and iron concentration, *Appl. Catal*, v 97, p. 292–298, 2010.

Zhang Y, Xi C., , Marrs C F, Ye W, Simon C, Foxman B, Nriagu J. Prevalence of antibiotic resistance in drinking water treatment and distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*, v.75, n. 17, p. 5714 – 5718, 2009.

Zhuang Y, Zhang Y, Geng J., Ren H., Zhang Y., Ding L., Xu K. Inactivation of antibiotic resistance genes in municipal wastewater effluent by chlorination and sequential UV/chlorination disinfection *Science of the Total Environment*, v. 512–513, p. 125–132, 2015.

# **CAPÍTULO 4**

**Degradação de pesticida organofosforado**

---

## 4. DEGRADAÇÃO DE PESTICIDA ORGANOFOSFORADO

*Degradação de profenofós em solução aquosa por processo oxidativo avançado*

### Resumo

Este trabalho investigou a degradação do inseticida organofosforado profenofós em solução aquosa utilizando uma combinação de radiação ultravioleta (UV) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Os experimentos de degradação com aplicação do processo  $H_2O_2$ /UV tomaram como base o planejamento estatístico Design Box-Behnken (DBB) com 3 fatores e 3 níveis. Os fatores avaliados no planejamento foram: concentração de  $H_2O_2$ , tempo de reação e pH da solução. As condições ótimas observadas no planejamento do DBB na degradação do profenofós ocorreram no tempo de 20 minutos e concentração de  $H_2O_2$  de 1,0 mM. O pH da solução não apresentou influência significativa nas condições estudadas. Além de estudar as melhores condições de degradação foi também investigado os subprodutos formados nos experimentos de fotodegradação com  $H_2O_2$ /UV. A identificação dos fragmentos formados foi realizada com o auxílio do espectrômetro de massas com interface de ionização electrospray (ESI). A princípio foram aplicadas sucessivas energias de colisão no íon profenofós na fonte de ionização para auxiliar na identificação dos fragmentos formados após a clivagem da molécula. Essa técnica fornece informações da massa molar, bem como a estrutura do analito após várias quebras sucessivas e exemplifica o provável caminho de degradação do profenofós. Os fragmentos gerados pela clivagem induzida na fonte de ionização foram comparados com os fragmentos formados nos experimentos de fotodegradação no processo  $H_2O_2$ /UV. Os fragmentos identificados e que se assemelharam em ambos os experimentos foram os com  $m/z$  346, 304, 285, 221 e 141. Os experimentos de dissociação induzida auxiliou na investigação dos subprodutos gerados nos experimentos de fotodegradação com  $H_2O_2$ /UV.

**Palavras-chave:** Profenofós,  $H_2O_2$ /UV, subprodutos de degradação

#### 4.1. Introdução

O pesticidas organofosforados (POF) constituem uma categoria heterogênea de compostos químicos largamente utilizados na agricultura, no controle de vetores e contra praga doméstica.(El-Kady et al. 2013 e Sharma et al. 2014.). Os organofosforados tem sido utilizado na substituição dos compostos organoclorados, por apresentar baixo custo, facilidade de síntese e biodegradabilidade (Zheng et al. 2007). Embora os pesticidas organofosforados ofereçam algumas vantagens sobre os compostos organoclorados e por degradarem rapidamente em água, existe sempre a possibilidade de permanecerem resíduos e subprodutos em níveis relativamente nocivos para o consumo humano. Eles apresentam uma alta toxicidade com os valores DL<sub>50</sub> variando entre 10-50 mg/Kg. A sua ação tóxica no organismo se processa pela inibição da enzima colinesterase com conseqüente acúmulo de acetilcolina nas fibras nervosas, o que impede a transmissão de novos impulsos gerando uma série de efeitos no organismo tais como convulsões, paradas respiratórias e coma (Singleton et al. 2015 e Yu et al. 2016).

O profenofós (PFF) é um dos organofosforados mais utilizados na América Latina pelos agricultores nas atividades de administração foliar e nas diversas espécies de cereais, frutas, grãos, entre outros. O Brasil é considerado o maior consumidor de pesticidas da América Latina, em 1981 o país gastou US\$ 988 milhões em pesticidas, em 1997 gastou US\$ 2,2 bilhões e atingiu US\$ 4,495 bilhões em 2004. Embora o país seja um dos maiores consumidores de pesticidas não existem dados comprovados em casos de envenenamento ou morte (Cordeiro et al. 2013). Por outro lado, países mais rigorosos no controle de pesticidas como os Estados Unidos, o uso do profenofós é aplicado apenas nas culturas de algodão (Edwards & Tchounwou 2005). A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda como valor máximo permitido em água 0,1 µg/L para cada pesticida e 0,5 µg/L para o total de pesticidas (Thuy et al. 2008). Enquanto a legislação brasileira, Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde, estabelece 60 µg/L na concentração máxima permitida de PFF em água para abastecimento (BRASIL, 2011).

O profenofós é classificado como um pesticida moderadamente perigoso (classe toxicológica II) e toxicidade moderada após administração oral e dérmica (Jabeen et al. 2015). A constante aplicação do profenofós em terras agricultáveis tem ocasionado vários níveis de contaminação em ambientes aquáticos e são frequentemente detectados nas águas naturais em concentrações traços de ng/L até µ/L (Mogda K. Mansour, Afaf A.I. El-Kashoury 2009). Estudos toxicológicos e epidemiológicos comprovaram que traços de resíduos de pesticidas ocasionam efeitos negativos à saúde humana por serem altamente lipossolúveis e facilmente absorvidos por todas as vias: oral, dérmica, respiratória, pele e mucosas (Van Dyk & Pletschke

2011, Dadson et al. 2013 e ). Existem muitas evidências sobre a toxicidade aguda do profenofós para organismos aquáticos, por isso é crucial a eliminação deste contaminante em águas superficiais e subterrânea para garantir a segurança da saúde pública (Janaki Devi et al. 2012 e Ismail et al. 2009)

A maioria dos pesticidas não são removidos pelos processos de tratamento físico-químicos (coagulação/floculação, sedimentação e filtração) (Aieta & Berg 2014). Na etapa que envolve o processo de desinfecção com cloro ocorre formação de subprodutos 100 vezes mais tóxicos do que os pesticidas originais (Li et al. 2016). Deste modo, outros processos mais eficientes como adsorção em carvão ativado, membranas e processos oxidativos avançados (POA) são necessários para produção de água potável do ponto de vista da segurança (Pehkonen & Zhang 2010).

Os POA têm despertado interesse devido a sua eficiência na remoção de poluentes em meio aquoso (Sanches et al. 2010). Os processos oxidativos avançados (POA) baseiam-se na produção de radicais livres altamente oxidantes como o radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ) pela excitação envolvendo agentes oxidantes no meio, denominados oxidantes secundários. Existem duas estratégias para geração de radicais  $\bullet\text{OH}$  que incluem os processos homogêneos e heterogêneos.

Os processos homogêneos inclui  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3/\text{UV}$  e  $\text{O}_3/\text{UV}$ . Entretanto, o processo  $\text{O}_3/\text{UV}$  requer um gerador de ozônio *in situ* além de requerer uma remoção do residual de ozônio da água tratada, tornando-o complexo e dispendioso (Moussavi et al. 2014). O processo  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$  é classificado como o mais antigo dentre os vários POA existentes (Maroneze et al. 2014). A fotólise da molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  origina dois radicais  $\bullet\text{OH}$  por *quantum* de radiação absorvida. As fontes disponíveis comercialmente para geração de luz com comprimento de onda na região do espectro UV, para formação do radical  $\bullet\text{OH}$  pela fotólise do  $\text{H}_2\text{O}_2$  são limitadas por três tipos: lâmpadas de deutério, xenônio e vapor de mercúrio, sendo as de vapor de mercúrio as mais utilizadas em aplicações laboratoriais e industriais. Entretanto, as lâmpadas de baixa pressão podem não ser a melhor escolha para o processo  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ , pois são praticamente monocromáticas com o pico de emissão de 254 nm, quando utilizadas são necessários estudos prévios para evitar elevadas concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pois o próprio peróxido de hidrogênio pode atuar como sequestrador de radicais  $\bullet\text{OH}$  reduzindo a eficiência do sistema (von Sonntag 2008 e Faretra et al. 2009). O sistema  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$  tem se mostrado eficiente na degradação de diversos poluentes. Podem-se destacar aplicações bem-sucedidas desse sistema para degradação de microcontaminantes emergentes em águas superficiais (Miralles-Cuevas et al. 2016), tratamento de corantes em águas residuárias (Shu & Chang 2005)

compostos nitroaromáticos (Einschlag et al., 2002), águas subterrâneas contaminadas por gasolina (Cater et al., 2000), compostos fenólicos (Beltrán et al., 1997), benzeno, cloroetano, pesticidas e cetonas (Glaze et al., 1987). Uma vez que não há adição de outros compostos químicos além do peróxido de hidrogênio, os efluentes tratados podem ser utilizados em diferentes pontos de demanda de água, desde que atendam aos objetivos de qualidade necessárias.

Nesse contexto, o presente trabalho avaliou a degradação do profenofós utilizando radiação UV-C na atividade fotocatalítica do processo homogêneo ( $H_2O_2/UV$ ). Para isso, a oxidação do PFF foi otimizada através do POA/ $H_2O_2/UV$  utilizando o planejamento Design Box-Behnken (DBB). Os subprodutos da degradação foram analisados por Espectroscopia de massas. O método desenvolvido foi validado por cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massas. Os principais objetivos do trabalho foram: (1) investigar a capacidade de oxidação do sistema  $H_2O_2/UV$  a partir da otimização do Design Box-Behnken (DBB), (2) investigar os intermediários de degradação fotocatalítica de  $H_2O_2/UV$  em solução aquosa contendo PFF e (3) validar o método analítico desenvolvido no trabalho.

## **4.2. Materiais e métodos**

### *4.2.1. Reagentes*

O padrão de profenofós foi obtido comercialmente de Sigma-Aldrich. Nas análises de cromatografia líquida foram utilizados Acetonitrila (Panreac, grau HPLC) e Metanol (J.T. Baker, grau HPLC) e a água ultrapura com resistividade de 18,2 M $\Omega$  e 0,05  $\mu$ S/cm.

### *4.2.2. Experimentos do processo fotocatalítico homogêneo - $H_2O_2/UV$*

O sistema experimental foi formado por uma câmara fotocatalítica retangular com dimensões (0,46 m de altura e 0,70 m de comprimento e 0,40 m de largura). Na parte superior foram acopladas três lâmpadas germicidas do tipo FL T8 de 15 W cada, que emitiam radiação UV-C no comprimento de onda de 254 nm e um sistema de agitação contínua. Os teste ocorreram em placas de Petri utilizando 50 mL da solução. As lâmpadas foram posicionadas à uma distância de 11 centímetros da superfície da amostra. A intensidade de radiação foi medida através de um radiômetro com comprimento de onda de 254 nm, Coleparmer instrument Co. Chicago, III, 60648, séries 9811. A medição foi realizada em vários pontos da câmara e obteve a média de 9 mJ/cm<sup>2</sup>.

Os experimentos ocorreram em batelada de acordo com o planejamento experimental Design Box-Behnken. As soluções de PFF foram preparadas com concentração de 1 mg/L em água destilada e postas na placa de Petri. O pH foi ajustado com soluções de 1M de NaOH e 1 M de HCl utilizando o pHmetro Modelo HI 2223-01. Os experimentos iniciavam 30 minutos após as lâmpadas estarem ativadas. As amostras eram coletadas em tempo pré-determinados pelo planejamento. A cada coleta as amostras eram acidificadas a pH 3, filtradas em membranas de 0,45 µm e acondicionadas em *vials* para serem analisadas por CLAE-EM/EM.

#### 4.2.3. Otimização usando planejamento Design Box-Behnken

Para determinar as condições ótimas operacionais foi aplicada a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) em design experimental para análise de dados e modelo de resposta. Então foi escolhido o planejamento Design Box-Behnken (DBB) com 3 fatores e 3 níveis. O DBB é eficaz para estudar os efeitos individuais e sinérgicos dos fatores sobre as respostas com um número mínimo de experimentos. A Metodologia de Superfície de Resposta consiste em um grupo de técnicas matemáticas e estatísticas desenvolvidas para ilustrar graficamente a relação entre diferentes variáveis experimentais e as respostas. O primeiro passo para aplicação da MSR é a obtenção de uma estimativa apropriada da relação funcional entre a variável dependente (resposta) e as variáveis independentes (fatores estudados). No passo seguinte, o comportamento do sistema é explicado pelo modelo de equação polinomial de segunda ordem (Equação 1). A função polinomial representa uma boa descrição da relação entre os fatores e a resposta dentro de um domínio experimental delimitado.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \beta_{ij} X_i X_j \quad \text{Equação (4.1)}$$

Onde Y é a resposta prevista ou de output (variáveis dependentes), *i* e *j* são os números indexados para o modelo,  $\beta_0$  é a constante da equação;  $\beta_i$ ,  $\beta_j$ ,  $\beta_{ij}$  são os coeficientes linear, quadrático e modelo de interação, respectivamente, *n* é o número de variáveis,  $X_i$  e  $X_j$  são as variáveis independentes codificadas. O design experimental de 3 níveis incluiu 3 variáveis ( $X_1$ , concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ( $X_2$ , pH) e ( $X_3$ , Tempo). Os níveis baixos, médio e alto de cada variável foram codificadas como -1, 0 e +1, respectivamente, os fatores e níveis experimentais estabelecidos para o planejamento fatorial 3<sup>3</sup> estão apresentados na Tabela (4.1).

**Tabela 4.1:** Faixa experimental e níveis de variáveis independentes

Variáveis independentes	Símbolo	Faixa e Níveis		
		-1	0	+1
Concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)	X <sub>1</sub>	0,4	0,7	1,0
pH	X <sub>2</sub>	5,0	6,5	8,0
Tempo (min)	X <sub>3</sub>	5	12,5	20

Foi calculado um total de 15 experimentos, incluindo 12 experimentos fatoriais e 3 repetições planejadas com o pacote de *Software Design Expert Statistica* (Versão 10.0). Cada experimento foi realizado em triplicata e de forma aleatória a fim de minimizar as influências dos fatores externos em relação as respostas observadas.

#### 4.2.4. Procedimentos analíticos

As concentrações das amostras de PFF resultantes dos experimentos de degradação no processo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV foram determinadas pelo sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-Ultimate 3000 da Thermo Scientific/Dionex) equipado com amostrador automático, bomba quaternária e compartimento de coluna. A separação do PFF foi realizada em uma coluna analítica KINETEX C18 (2,6 µm x 100 mm x 2,1 mm) com temperatura mantida em 35 °C e uma coluna de guarda (3 x 2,1 mm) da marca Phenomex. A fase móvel utilizada foi acetronitrila/metanol (50:50 v/v) com taxa de fluxo de 100 µL/min. O tempo de retenção do PFF foi obtido em 5 minutos e as amostras foram injetadas com volume de 50µL. A quantificação da concentração do PFF foi obtida a partir da curva de calibração com os pontos 10, 15, 25, 50, 100, 200, 300, 1000 µg/L. Os padrões foram preparados com água deionizada e solução padrão de PFF previamente ajustada para pH=3 com HCl.

#### 4.2.5. Identificação dos subprodutos da peroxidação

A identificação dos subprodutos da degradação do PFF foi realizada através de um Espectrometro de Massas (LCQ Fleet) equipado com analisador Ion Trap (Thermo Scientific) com interface de ionização Electrospray (ESI) no modo positivo. As análises foram realizadas por Monitoramento de Íon Especifico com intervalo de varredura de m/z= 110 a 500. A temperatura do capilar, sheath gás, gás auxiliar e gás de arraste foram 350 °C, 30, 10 e 0 (unidades arbitrarias), respectivamente. Previamente aos experimentos de fotólise foi feita uma identificação dos prováveis subprodutos formados a partir da energia de colisão aplicada no cone de ionização. Essa técnica é conduzida com a infusão do padrão de PFF para otimizar os

fragmentos obtidos a partir das colisões de energia previamente aplicados para o íon pai de  $m/z=375$ . Foram aplicadas energias de 30 eV e 25 eV.

#### 4.2.6. Parâmetros para validação do método

O método analítico de CLAE-EM/EM para identificação do profenofós foi validado seguindo as diretrizes do INMETRO (DOQ-CGCRE-008 de 2011) e ANVISA (Resolução RE nº 899 de 2003). Os parâmetros investigados na validação incluíram a seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e recuperação.

A linearidade do método foi representada pela curva de calibração que relacionou a resposta do instrumento e as concentrações conhecidas do analito. A curva de calibração incluiu análise da amostra em branco e 8 amostras contendo padrão do profenofós (10, 15, 25, 50, 100, 200, 300, 1000  $\mu\text{g/L}$ ). Essa variação de concentração contemplou uma faixa de valor que se esperava encontrar na amostra em estudo. O gráfico da calibração foi apresentado juntamente com a equação da reta ( $y= ax + b$ ), análise de regressão e os dados de correlação ( $r$  de Pearson) e determinação ( $r^2$ ).

Os limites de detecção ( $LD=3s/S$ ) e de quantificação ( $LQ=10s/S$ ) do método foram calculados empregando o método baseado em parâmetros da curva de calibração. Onde  $s$  é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e  $S$  é a inclinação (“slope”) ou coeficiente angular da curva analítica.

A precisão do método foi verificada pela repetibilidade e determinada em uma mesma amostra (precisão intradia). A precisão foi calculada a partir da estimativa do desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV). O cálculo do DPR foi a partir de três concentrações que contemplam a faixa de variação da curva de calibração (baixa, média, e alta) e para cada concentração foram feitas seis determinações. O DPR (%) foi calculado a partir da razão do desvio padrão ( $s$ ) pela concentração média determinada (CMD) das seis determinações por concentração. O cálculo do desvio padrão relativo ( $DPR = s/CMD$ ) superiores a 15% não são aceitáveis.

A exatidão do método foi determinada na mesma corrida analítica (exatidão-intradia). Para calcular a exatidão foram selecionadas três níveis de concentrações (baixa, média e alta) pelos ensaios em triplicata. O processo utilizado para avaliar a exatidão do método foi pelo ensaio de recuperação (R). A exatidão foi estimada pelo cálculo do erro relativo (ER), por meio da razão

entre a concentração média experimental, das seis determinações por concentração, pela concentração teórica correspondente, em porcentagem.

Os ensaios de recuperação foi calculado pela análise de amostras fortificadas utilizando água superficial do açude Epitácio Pessoa como matriz de estudo. Os resultados foram obtidos em porcentagem,  $(C_1 - C_2/C_3) \times 100$ , sendo  $(C_1)$  concentração do analito na amostra fortificada,  $(C_2)$  concentração do analito na amostra não fortificada e  $(C_3)$  concentração do analito adicionada à amostra fortificada. Segundo a ANVISA é desejável que as porcentagens de recuperação do analito sejam próximos a 100%, porém, admite-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata.

### 4.3.Resultados e discussão

#### 4.3.1. Experimentos de $H_2O_2/UV$ pelo planejamento estatístico Box-Behnken

A otimização na remoção de PFF foi realizada utilizando os gráficos de MSR tridimensional (3D). O DBB com 3 fatores e 3 níveis foi aplicado para otimizar o efeito mútuo das três invariáveis independentes (Concentração, pH e Tempo) sobre a eficiência de remoção do PFF, o que foi tomado como resposta. A criação do design e os resultados dos testes de MSR foram tabulados (Tabela 4.2).

**Tabela 4.2:** DBB com as respostas observadas e os valores previstos para eficiência de remoção de PFF.

Experimentos	Variáveis em níveis não codificados e codificados			Resultados (Degradação %)	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Previstos	Observados
1	0,4(-)	5,0(-)	12,5(0)	90	90
2	1,0(+)	5,0(-)	12,5(0)	98	98
3	0,4(-)	8,0(+)	12,5(0)	90,6	90,6
4	1,0(+)	8,0(+)	12,5(0)	96,7	96,7
5	0,4(-)	6,5(0)	5,0(-)	56,8	56,8
6	1,0(+)	6,5(0)	5,0(-)	75,7	75,7
7	0,4(-)	6,5(0)	20(+)	94,4	94,4
8	1,0(=)	6,5(0)	20(+)	98,5	98,5
9	0,7(0)	5,0(-)	5,0(-)	74	74
10	0,7(0)	8,0(+)	5,0(-)	75,3	75,3
11	0,7(0)	5,0(-)	20(+)	96,9	96,9
12	0,7(0)	8,0(+)	20(+)	98,5	98,5

13	0,7(0)	6,5(0)	12,5(0)	96,1	96,4
14	0,7(0)	6,5(0)	12,5(0)	96,1	96,8
15	0,7(0)	6,5(0)	12,5(0)	96,1	95

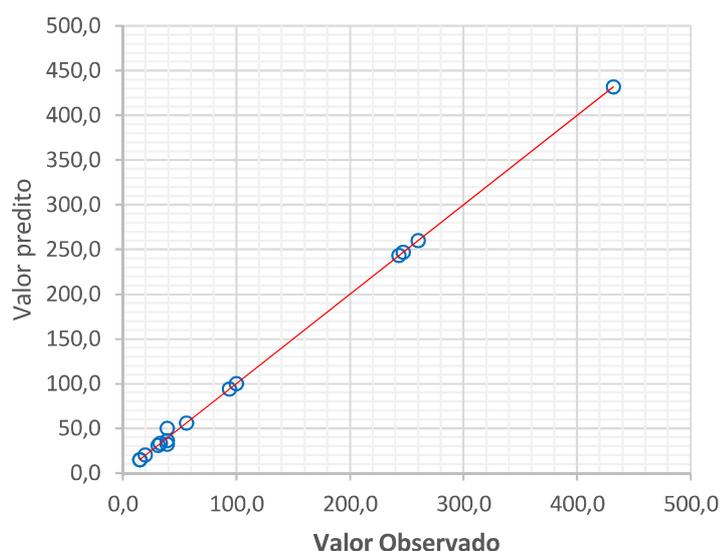
O teste-t de Student foi utilizado para determinar a significância dos coeficientes (Fatores) de regressão usando o valor-p. De forma geral, valores de valor-F muito grandes e valor-p muito pequeno indicam os termos mais significativos de um modelo (Tabela 4.3).

**Tabela 4.3:** A análise de variância para o modelo polinomial quadrático na eficiência de remoção de PFF.

Fator	Soma Quadrática	DF	Média dos Quadrática	F	Prob > F
X1 (L)	13107,2	1	13107,2	146,722	0,006747
X1 (Q)	4609,6	1	4609,6	51,6	0,018834
X2 (L)	11,3	1	11,3	0,126	0,756614
X2 (Q)	616	1	616	6,896	0,11956
X3 (L)	X3 (L)	1	139278	1559,083	0,000641
X3 (Q)	X3 (Q)	1	46178,6	516,924	0,001929
X1(L) e X2(L)	X1(L) e X2(L)	1	90,2	1,01	0,420685
X1(L) e X2(Q)	X1(L) e X2(Q)	1	990,1	11,083	0,0796
X1(Q) e X2(L)	X1(Q) e X2(L)	1	162	1,813	0,310407
X1(L) e X3(L)	X1(L) e X3(L)	1	5476	61,299	0,015925
X1(Q) e X3(L)	X1(Q) e X3(L)	1	2556,1	28,613	0,033217
X2(L) e X3(L)	X2(L) e X3(L)	1	2,3	0,025	0,88848
Erro puro	178,7	2	89,3		
SQ total	219380,9	14			
R <sup>2</sup>	0,99078				

Os resultados da análise de variância (ANOVA) para a resposta PFF estão apresentado na Tabela (4.3), onde é observado o coeficiente de determinação  $R^2 = 99\%$ . Isto indica que a variação da resposta pode ser explicada pelo modelo. O percentual de degradação de PFF variou de 74% a 98,57%. Os efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) estão destacados em vermelho, sugerindo que a concentração de  $H_2O_2$  e o Tempo de reação influenciou fortemente a degradação de PFF.

A avaliação do modelo também foi feita pela análise do gráfico de valores preditos versus valores observados, apresentado na Figura (4.1). A boa correlação entre eles confirma mais uma vez que o modelo quadrático está bem ajustado aos dados experimentais obtidos no planejamento.



**Figura 4.1:** Valor predito x Valor observado para o modelo quadrático usando resposta global.

Os gráficos de metodologia de superfície de resposta foram baseados no modelo quadrático. Na figura (18) observa a influência de interação da concentração de  $H_2O_2$  e o tempo de contato com UV na degradação de PFF, o gráfico evidencia que o aumento da degradação é atribuído com o aumento da concentração do agente oxidante e o tempo de contato. Observa-se que com a concentração acima de 0,7 mM ( $H_2O_2$ ) e com o tempo de reação acima de 12 minutos, ocorre uma degradação em torno de 90 à 98% na remoção do PFF. Os resultados obtido na MSR observados na Figura (4.2) mostraram que com a diminuição do tempo de reação ocorre simultaneamente a diminuição da eficiência da degradação.

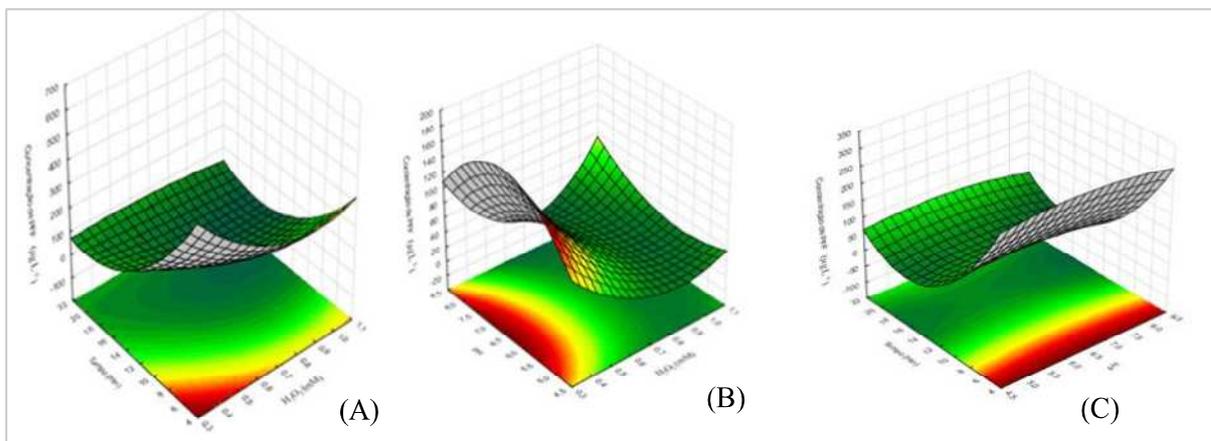
(A): Em relação a concentração de  $H_2O_2$  quando estar fixada em 0,7 ou 1 mM a degradação máxima ocorre adotando-se um tempo superior à 12 minutos;

(B): Nota-se que a região de máximo é atingida quando a concentração de  $H_2O_2$  é superior à 0,7 mM independente do pH;

(C): Observa-se que a degradação de PFF não é influenciada pelo pH e que as regiões de máximo ocorre com o aumento do tempo de reação: adotando o tempo superior a 12 minutos.

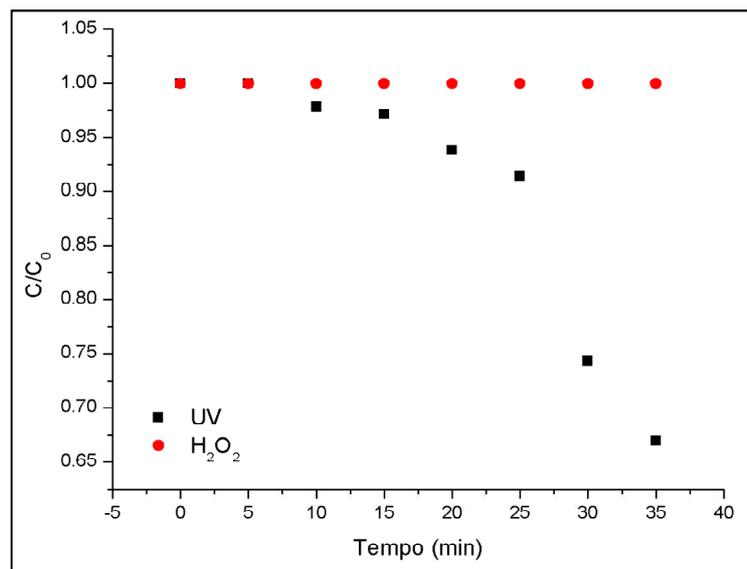
A elevada degradação de PFF avaliada neste estudo observou-se que a reação independe do pH. Em muitos casos a fotodegradação de compostos orgânicos, utilizando processo  $H_2O_2$ /UV necessita de um meio básico para que as etapas de hidroxilação, desidrogenação e

ruptura de ligações químicas sejam favorecidas, no entanto, neste caso não foi observado esse comportamento



**Figura 4.2:** Curva de distribuição de superfície plotado para remoção de PFF em função de: (A)  $H_2O_2$  e tempo (min); (B)  $H_2O_2$  e pH; (C) pH e tempo

Os experimentos de degradação do profenofós pelo processo combinado de  $H_2O_2$ /UV, foram eficientes para remover profenofós em solução aquosa, ao passo que, o teste com UV direta e com  $H_2O_2$  não foram eficazes na degradação total do PFF no tempo de 30 minutos de reação (Figura 4.3). Observa-se que o processo de peroxidação não resultou em variação do PFF nos 35 minutos de reação e não ocorreu o consumo de peróxido neste tempo avaliado. O emprego do peróxido de hidrogênio como agente de desinfecção de água pode ocorrer, porém mostra-se ineficiente quando aplicado em processos de oxidação em pesticida organofosforado. A aplicação da fotólise (UV-C) em 35 minutos obteve uma remoção de 37% (632  $\mu\text{g/L}$ ) da concentração inicial de PFF que foi de 1000  $\mu\text{g/L}$ , demonstrando que para ocorrer uma degradação superior a 70% seria necessário o aumento do tempo da dose de radiação UV. No trabalho de Yiqun Chen et al (2015) observou que a degradação de profenofós foi insignificante apenas sob irradiação UV-C, o que poderia ser causado pela quantidade de fótons insuficiente para atingir a estrutura da molécula, visto que, a quantidade de fótons devem ser pelo menos igual ou superior ao número de moléculas presente no meio que estar sendo irradiado, só assim pode ocorrer uma reação fotoquímica completa.



**Figura 4.3:** Degradação de PFF usando lâmpada UV (lâmpada germicida 45 W)

Os experimentos de degradação de PFF em solução aquosa por meio do processo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV observou ser eficiente na degradação efetiva do PFF nos 12 minutos de reação nas condições ótima testada com pH 8 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na concentração de 1 mM, alcançando uma degradação de 98%, resultado observado no planejamento estatístico. Trabalhos que utilizaram H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV para remover altas concentrações de PFF também foram estudados, à exemplo de Fatemeh et al. (2014) que trabalhou com concentração inicial de PFF de 10 mg/L, tempo de reação de 90 minutos, pH 8 e concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 0,1 M, nestas condições os resultados demonstraram uma eficiência de 93% na remoção do PFF. Badawy et al. (2006) em seus estudos de oxidação química, com reações de Fenton e Foto-Fenton, observou que a taxa de degradação de PFF com concentração inicial de 50 mg/L e tempo de reação de 90 minutos, obteve uma eficiência de 40 e 80%, respectivamente. O uso da radiação UV-C tem efeito sinérgico importante para a oxidação de profenofós na presença do agente catalisador. Chen et al. (2015) em seus estudos com processo fotoquímico utilizando UV/Fe(VI) demonstrou ser uma alternativa eficiente para a remoção de PFF (10 mg/L) em 15 minutos de tratamento obteve uma eficiência de 60%.

#### 4.3.2. Identificação dos subprodutos de PFF

Nos ambientes naturais o PFF pode sofrer diferentes formas de degradação: física, química e biológica. As transformações metabólicas do PFF em plantas, água e solo são semelhantes, e o principal produto formado é o 4-bromo-2-clorofenol com  $m/z = 207$ . Este

processo envolve a clivagem do éster de fosforotioato, o qual pode ser conjugado por reações enzimáticas (Burkhard & Guth 1979). Essas transformações metabólicas em ambientes naturais pode ocorrer no período de meia-vida no solo entre 30 a 120 dias e na água com o pH 7 e temperatura à 25 °C por um período de meia-vida de 30 a 90 dias (Ismail et al. 2013; Ismail et al. 2009; Cordeiro et al. 2013). Os principais fragmentos gerados por via metabólica são íons com  $m/z = 345, 331, 313, 304, 287, 221, 207, 171, 142, \text{ e } 146$ . Por outro lado, quando aplicada a degradação acelerada por processo de oxidação avançada também pode ser encontrados fragmentos semelhantes aos processos metabólicos. Trabalho realizado por Zamy et al. (2004) utilizando radiação policromática ( $\gamma = 285 \text{ nm}$ ) por um período de uma hora obteve subprodutos com  $m/z = 345, 331, 309, 295 \text{ e } 207$ . Chen et al. (2015) investigou os subprodutos de oxidação do PFF pelo sistema UV/Fe(VI) e identificou os fragmentos de  $m/z = 304, 207 \text{ e } 191$ . Neste trabalho, foi realizado uma infusão do padrão de PFF para otimizar os fragmentos obtidos a partir das colisões de energia previamente aplicados para o íon pai  $m/z = 375$  (Tabela 4.4). A mesma técnica foi utilizada por Lucie Havlíkova et al. (2016).

**Tabela 4.4:** Fórmula molecular dos íons precursores identificados pela dissociação induzida do PFF

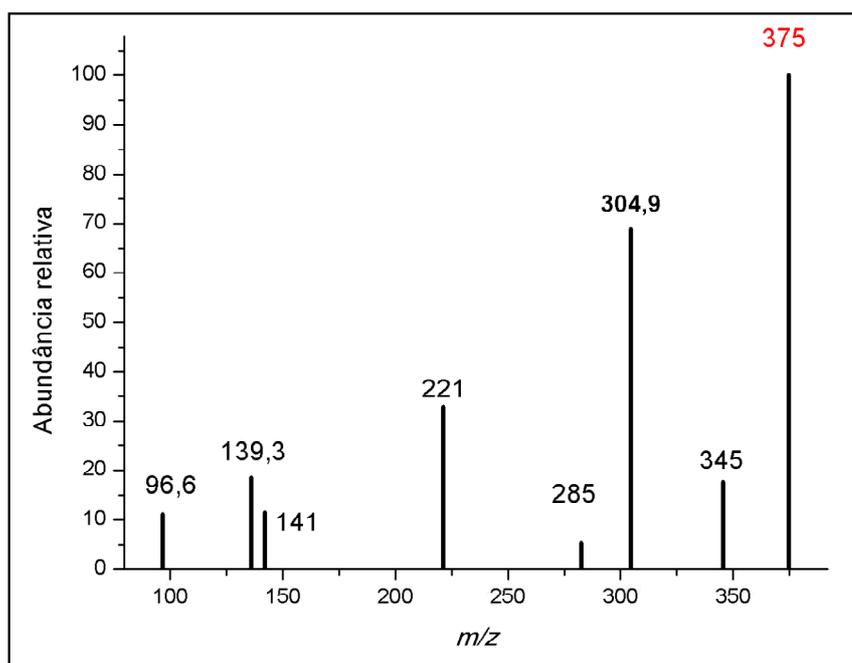
Composto	Energia de colisão (eV)	Íon precursor ( $m/z$ )	Fórmula molecular	Voltagem do cone (V)
IDP1	30	375 -> 346	$C_{11}H_{15}BrClO_3PS$	45
IDP2	25	346 -> 304	$C_9H_{12}BrClO_3PS$	45
IDP3	30	304 -> 287	$C_6H_5BrClO_3PS$	45
IDP4	25	286 -> 221	$C_6H_5BrClO_2PS$	45
IDP5	25	221 -> 171	$C_6H_5BrO$	45
IDP6	25	171 -> 171	$C_6H_5BrO$	45

ID-Intermediários de degradação induzida a partir da energia de colisão aplicada

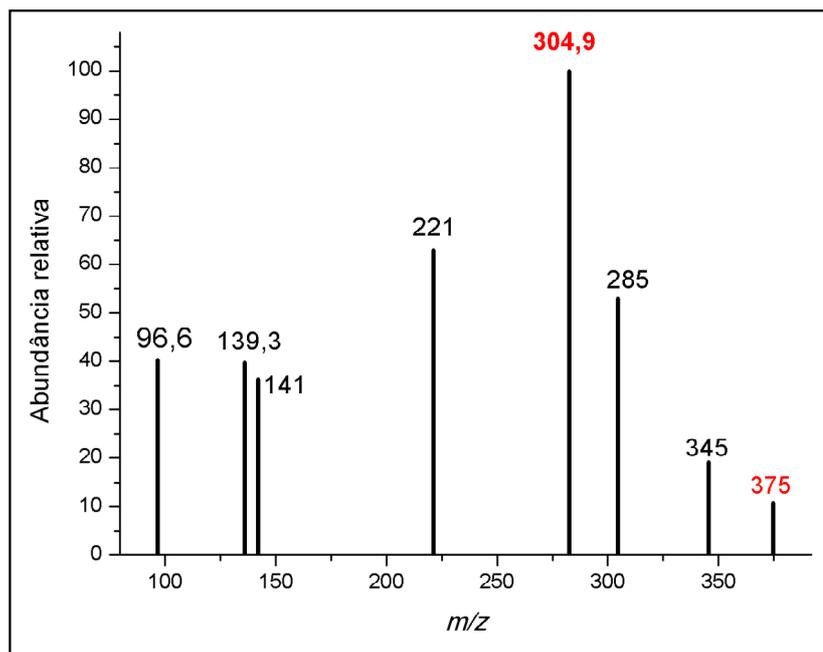
Observa-se que a primeira energia de colisão aplicada (30 eV) ocorre a transição de  $m/z 375$  para 346 ocorrendo a liberação do fragmento  $m/z = 29$  que corresponde ao fragmento  $C_2H_5^+$ . Na segunda aplicação de energia (25 eV) ocorre a liberação do fragmento  $m/z = 41$  que é o  $C_3H_6$ , obtendo o íon de  $m/z = 304$ . Na terceira energia aplicada (30 eV) ocorre a transição de 304 para 286 onde ocorre a liberação de água ( $H_3O^+$ ). Na quarta aplicação (25 eV) ocorre a transição de 286 para 221 liberando o fragmento de  $m/z=65$  o que corresponde a liberação do fósforo, enxofre e três oxigênio. Na última energia de colisão (25 eV) ocorre a transição de 221 para 171 liberando o fragmento de íon de  $m/z=50$  que corresponde o  $ClCH_3$ . Os fragmentos gerados a partir da energia de colisão serviram de base para comparar os fragmentos gerados no

processo de fotodegradação do PFF e ao mesmo tempo propor uma rota de degradação do composto.

Nas Figuras 4 e 5 estão apresentados os principais subprodutos formados no processo fotocatalítica de  $H_2O_2/UV$  referentes ao tempo de exposição UV-C de 5 e 15 minutos, respectivamente. Os principais fragmentos de íons emergido no cromatograma no tempo de 5 minutos foram os de  $m/z$ : 375 e 304 e no tempo de 20 minutos foram os picos de  $m/z$ : 304, 285 e 221. A medida que o tempo aumentava a concentração do PFF era substancialmente diminuída. O pico do íon pai permaneceu mesmo após 20 minutos de reação, no entanto, a intensidade era muito baixa, fazendo com que os íons fragmentados prevaleçam sobre o íon pai. De acordo com o espectro de massas obtido (Figura 4.4 e 4.5) observa-se que o fragmento de sinal  $m/z$  304 foi o que apresentou maior intensidade. Este mesmo fragmento também pode ser encontrado por outros trabalhos como o de Yiqun Chen et al. (2015) quando aplicou o processo de fotodegradação com ferro (VI) e radiação UV-C em 15 minutos de fotodegradação.

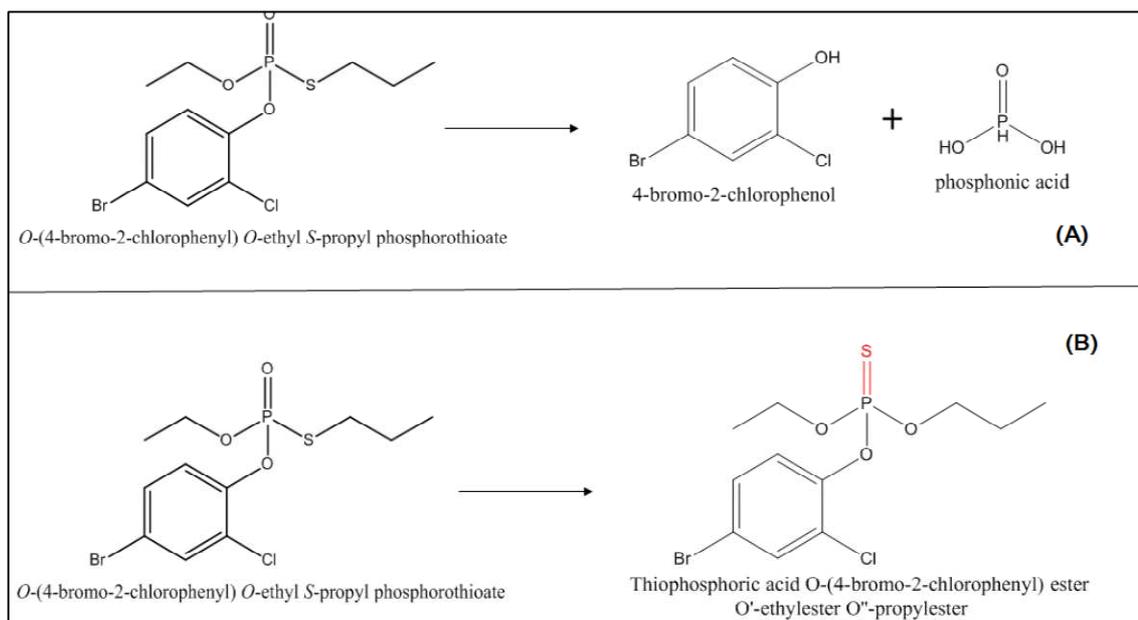


**Figura 4.4:** Espectro de massa com os picos resultantes da fotodegradação no tempo de 5 min.



**Figura 4.5:** Espectro de massa com os picos resultantes da fotodegradação no tempo de 15 min.

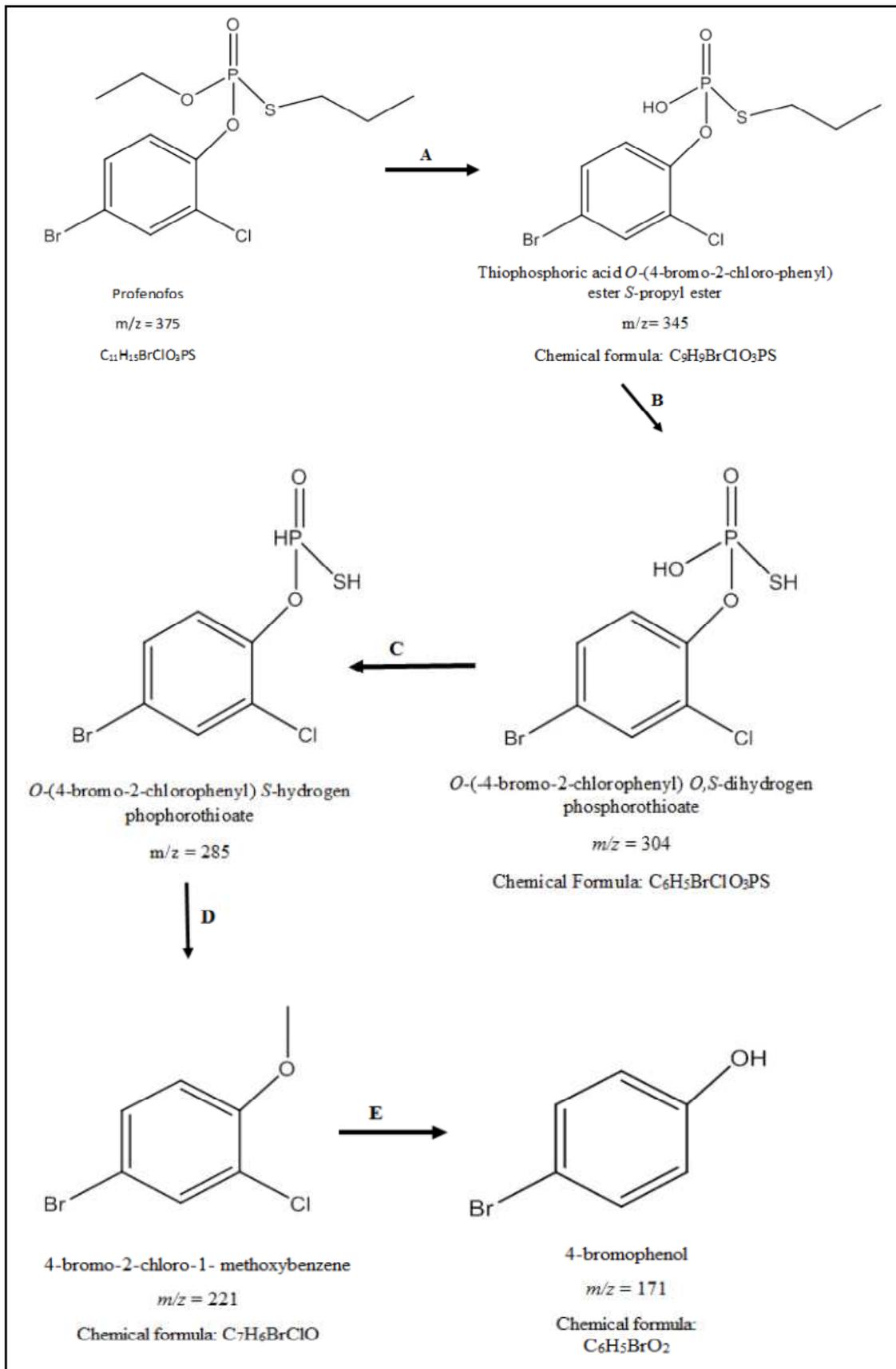
Segundo Zamy et al. (2004) a molécula de PFF descreve dois comportamentos clássicos na formação de subprodutos gerados por fotólise. O primeiro comportamento (A) ocorre a partir da liberação do ácido fosfórico da molécula de PFF resultando no fragmento 4-Bromo-2-Clorofenol e o segundo caminho (B) ocorre a isomerização do elemento enxofre (figura 4.6).



**Figura 4.6:** Fragmentos clássicos dos subprodutos formados por processo fotocatalítico. Zamy et al. (2004)

As estruturas dos subprodutos formados e o esquema geral da rota de degradação proposto neste trabalho podem ser observadas na Figura (4.7). As estruturas foram construída com o auxílio do programa ChemBioDraw 14.0.

Devido a capacidade de oxidação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV o processo de desmetilação conduz a formação do fragmento O-4-bromo-2-clorofenilo O, S-dihidrogenofosfato de fosforotioato de  $m/z$  M-H<sup>+</sup> =304. A oxidação adicional do P-S e P-O era susceptível de avançar devido a formação de ortofosfato. Tendo em vista que a ortofosfato do ortofosfato a partir da clivagem da ligação P-S e P-O ocorreu para se obter 4-bromo-2-cloro-1-metoxiibenzeno. O fragmento de  $m/z = 171$  que refere-se ao produto 4-bromofenol (Zamy et al. 2004) como produto intermediário de degradação do PFF.



**Figura 4.7:** Rota de degradação proposta para o profenofós

#### 4.3.3. Consumo de energia específica

A oxidação fotocatalítica provou ser um método eficaz para degradar composto organofosforados em meio aquoso, porém outras características são importantes para serem avaliadas na aplicabilidade deste processo, além das leis básicas da fotoquímica o aspecto econômico também é crucial. Na maioria das vezes os estudos dos POAs são direcionados apenas para a eficiência de degradação dos compostos alvos e poucos são direcionados para o aspecto econômico, à exemplo, consumo de energia necessária para degradar o contaminante alvo. Em resumo, observa-se a eficiência de degradação *versus* consumo de energia que é calculada através da potência (W) fornecida. Em particular, em nossos estudos avaliamos o gasto de energia específica ( $E_s$ ) necessária para degradar 1 mg/L profenofós pelo processo combinado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV e radiação UV-C. O consumo de energia do processo fotocatalítico com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV foi baseado no tempo necessário para remover 98% da concentração inicial de PFF. A energia consumida específica ( $E_s$ ) foi calculada a partir da potência (W) da lâmpada UV-C, que representa apenas uma parte da energia elétrica total expressa em (kWh/mg) e pode ser estimada a partir da seguinte Equação (4.2):

$$E_s = \frac{P_{uv} * t}{[\Delta PFF \text{ mg.L}^{-1}] * V} \quad \text{Equação (4.2)23}$$

Onde  $P_{uv}$  (kW) é o consumo da potência elétrica por cada lâmpada (3) UV de 15W utilizadas nos experimentos, totalizando 45W, a variação da concentração de PFF ( $\Delta PFF$  mg/L), tempo ( $t$ ) e  $V$  o volume irradiado (L). Neste estudo o processo combinado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV é um processo viável para degradar os compostos organofosforados. A partir dos dados de remoção de 98% nos 12 minutos de reação foi calculado o consumo energético específico de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV que resultou em 0,18kWh/mg, enquanto que a fotólise nos 15 minutos de reação obteve uma remoção de aproximadamente 3% (970  $\mu\text{g/L}$ ) e os resultados dos cálculos obtidos nessa condição foi de 0,62kWh.mg<sup>-1</sup>. Portanto comprova que a combinação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV favorece a diminuição do consumo energético na degradação de compostos persistentes.

#### 4.3.4. Validação do método analítico em HPLC-MS

A *seletividade* é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto de interesse em presença de outros interferentes. As análises realizadas pelo Espectrômetro de Massas nas amostras de PFF, detectou o analito na matriz no tempo de retenção de 4,1 minutos.

Segundo a ANVISA, a seletividade em métodos cromatográficos só é válida quando existe a garantia da pureza do pico atribuído ao analito alvo-

A *Linearidade* foi obtida pela adição de uma série de concentrações conhecidas do padrão de PFF autêntico na matriz da amostra ausente. A curva de calibração correspondeu ao modelo matemático que estabeleceu uma relação entre a resposta instrumental (área/altura da banda cromatográfica) e a concentração do analito. A curva foi construída com 5 (cinco) padrões de concentrações conhecidas (10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 e 1000 µg/L) e injetado 6 (seis) vezes cada padrão. A curva proporcionou uma relação matemática expressa  $y = 297,21x + 23508$ . O coeficiente de correlação (r) foi de 0,9857, o critério mínimo aceitável pela ANVISA e INMETRO é de 0,99 e 0,90, respectivamente.

Os *Limites de detecção (LD)* e *limite de quantificação (LQ)* foram determinados de acordo com o INMETRO baseado em parâmetros da curva analítica. Para calcular os valores do LD e LQ foram desenvolvidas três curvas de calibração com os padrões de 10, 50 e 75 ng/mL e de cada curva foi obtida uma equação da reta. A partir das equações das três curvas construídas foi obtido os respectivos coeficientes lineares e calculado o desvio padrão dos mesmos. As equações das três curvas analíticas construídas, o coeficiente linear (s), o desvio padrão (DP) e o coeficiente angular (S) estão apresentados na Tabela (4.5)

**Tabela 4.5:** Dados de cálculo para LD e LQ em HPLC-MS.

Parâmetros	Equações	R <sup>2</sup>	Coef. Linear (s)
CC1	$Y=376,73 + 24149$	0,987	24149
CC2	$Y=326,48x + 24255$	0,9848	24255
CC3	$Y= 198,13x + 25558$	0,9986	25558
DP	-	-	784,6
Coef. Angular da CC			297,2

\*CC: Curva de calibração

O resultado do LD foi de 7,92 µg/L, representa a concentração mais baixa para a qual um grau aceitável de incerteza pode ser alcançado. Segundo o INMETRO a importância desta determinação e os problemas associados a ela advêm do fato de que a probabilidade de detecção não muda rapidamente de zero para um quando seu limiar é ultrapassado. Por outro lado, o LQ foi determinado com as concentrações de 10 vezes a relação do desvio padrão/coeficiente angular (s/S) o que correspondeu na prática ao padrão de calibração de menor concentração no valor de 26,4 µg/L.

A *precisão (intra-corrída), exatidão e recuperação* do método, foram realizadas com 3 (três) níveis de concentrações (10, 50 e 100 µg/L) com 6 (seis) determinações por concentração, resultando na precisão de 8,7%, 6,5% e 2,5%. Conforme estipulado nas recomendações da ANVISA que não se admiti valores superiores a 5%, portanto os valores obtidos não estão conforme o estipulado nas recomendações da ANVISA. No entanto estar de acordo com as recomendações publicadas pela United States Food and Drug Administration (USFDA) que estabelecem critérios de aceitabilidade de precisão não mais que 15%. Os dados utilizados para calcular a precisão estão apresentados na Tabela (4.6), juntamente com os valores dos coeficientes de variação (CV).

**Tabela 4.6:** Dados utilizados para os cálculos de precisão

Conc. (ng/ml)	Área						Média	DP	CV%
	1°	2°	3°	4°	5°	6°			
10	23173	26688	27433	29207	24376	28105	26497	2297,3	8,7
50	41407	40562	35401	42170	42755	40930	40537	2641,1	6,5
100	54253	51852	53816	52672	53542	50773	52818	1320,3	2,5

#### 4.4. Conclusão

A fotodegradação do profenofós foi investigada em solução aquosa pela combinação de UV e peróxido de hidrogênio. Os resultados mostraram que em condições ótimas de degradação (1 mg/L de PFF; 20 min de radiação UV; 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; e pH 8) alcançou 98,5% de degradação do profenofós de acordo com os resultados obtidos nos gráficos de MSR. O impacto de oxidação direta com UV e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sozinho na remoção do pesticidas também foram conduzidos, porém não apresentaram remoção significativa no período de 30 minutos. A degradação de PFF através do processo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV resultou na geração de vários subprodutos de oxidação tendo como subproduto de maior intensidade o O-4-bromo-2-clorofenill O,S-dihidrogênio Fosforotioato, ortofosfato. Outros subprodutos também foram identificados neste trabalho como os de *m/z* 221, 140 e 97. O processo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV expressa eficazmente o processo de degradação completo do pesticida organofosforado PFF

#### 4.5.Referências

- Aieta, E.M. & Berg, J.D., 2014. A Review of Chlorine Dioxide in Drinking Water Treatment Author ( s ): E . Marco Aieta and James D . Berg Source : Journal ( American Water Works Association ), Vol . 78 , No . 6 , Chlorine Dioxide. *American watter works association*, 78(6), pp.62–72.
- Badawy, M.I., Ghaly, M.Y. & Gad-Allah, T.A., 2006. Advanced oxidation processes for the removal of organophosphorus pesticides from wastewater. *Desalination*, 194(1-3), pp.166–175.
- Chen, Y. et al., 2015. UV/ferrate(VI) oxidation of profenofos: efficiency and mechanism. *Desalination and Water Treatment*, 55(2), pp.506–513.
- Cordeiro, G.S. et al., 2013. Degradation of profenofos in an electrochemical flow reactor using boron-doped diamond anodes. *Diamond and Related Materials*, 32, pp.54–60.
- Dadson, O.A. et al., 2013. Metabolism of profenofos to 4-bromo-2-chlorophenol, a specific and sensitive exposure biomarker. *Toxicology*, 306, pp.35–39.
- Van Dyk, J.S. & Pletschke, B., 2011. Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment. *Chemosphere*, 82(3), pp.291–307.
- Edwards, F.L. & Tchounwou, P.B., 2005. Environmental Research and Public Health Environmental Toxicology and Health Effects Associated with Methyl Parathion Exposure – A Scientific Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2(3), pp.430–441.
- El-Kady, A.A. et al., 2013. Utilization of activated carbon prepared from agricultural waste for the removal of organophosphorous pesticide from aqueous media. *Desalination and Water Treatment*, 51(37-39), pp.7276–7285.
- Faretra, G., Scaramuzzi, G. & Ricci, M.D., 2009. *UV e Ozono: Tecnologie per depurazione senza addiTivi chimici* BE-MA., Milano, Itália.
- Fatemeh, V. et al., 2014. E nvironment A sia. *EnvironmentAsia*, 7(1), pp.104–111.
- Ismail, M. et al., 2009. Evaluation of the acute toxicity of profenofos and its effects on the behavioral pattern of fingerling common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 82(5), pp.569–573.
- Jabeen, H. et al., 2015. Optimization of profenofos degradation by a novel bacterial consortium PBAC using response surface methodology. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 100, pp.89–97.
- Janaki Devi, V. et al., 2012. Genotoxic effects of profenofos on the marine fish, *Therapon jarbua*. *Toxicology mechanisms and methods*, 22(2), pp.111–7.
- Li, W. et al., 2016. Impact of prechlorination on organophosphorus pesticides during drinking water treatment: Removal and transformation to toxic oxon byproducts. *Water Research*, 105, pp.1–10.
- Maroneze, M.M. et al., 2014. Avaliação do desempenho do sistema UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no tratamento de efluentes provenientes do processo de tratamento térmico de emulsões de água e óleo. *Revista Ambiente e Agua*, 9(3), pp.445–458.
- Miralles-Cuevas, S. et al., 2016. Comparison of UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV/S<sub>2</sub>O<sub>8</sub><sup>2-</sup>, solar/Fe(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and solar/Fe(II)/S<sub>2</sub>O<sub>8</sub><sup>2-</sup> at pilot plant scale for the elimination of micro-contaminants in

- natural water: An economic assessment. *Chemical Engineering Journal*.
- Mogda K. Mansour , Afaf A.I. El-Kashoury, M.A.R. and K.M.K., 2009. Oxidative and biochemical alterations induced by profenofos insecticide in rats. *Nature and Science*, 7(2), pp.1–5.
- Moussavi, G. et al., 2014. Comparing the efficacy of UVC, UVC/ZnO and VUV processes for oxidation of organophosphate pesticides in water. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 290(1), pp.86–93.
- Pehkonen, S.O. & Zhang, Q., 2010. Critical Reviews in Environmental Science and Technology The Degradation of Organophosphorus Pesticides in Natural Waters : A Critical Review The Degradation of Organophosphorus Pesticides in Natural Waters: A Critical. *Environmental Science and Technology*, (November 2013), pp.37–41.
- Sanches, S., Barreto Crespo, M.T. & Pereira, V.J., 2010. Drinking water treatment of priority pesticides using low pressure UV photolysis and advanced oxidation processes. *Water Research*, 44(6), pp.1809–1818..
- Sharma, P. et al., 2014. Organophosphorous compounds and oxidative stress: a review. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 96(5), pp.681–698.
- Shu, H.Y. & Chang, M.C., 2005. Pilot scale annular plug flow photoreactor by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for the decolorization of azo dye wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 125(1-3), pp.244–251.
- Singleton, S.T. et al., 2015. Longitudinal assessment of occupational exposures to the organophosphorous insecticides chlorpyrifos and profenofos in Egyptian cotton field workers. *International journal of hygiene and environmental health*, 218(2), pp.203–11..
- von Sonntag, C., 2008. Advanced oxidation processes: mechanistic aspects. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 58(5), pp.1015–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18824799>.
- Thuy, P.T. et al., 2008. To what extent are pesticides removed from surface water during coagulation-flocculation? *Water and Environment Journal*, 22(3), pp.217–223.
- Yu, R. et al., 2016. Concentrations of organophosphorus pesticides in fresh vegetables and related human health risk assessment in Changchun, Northeast China. *Food Control*, 60, pp.353–360.
- Zamy, C., Mazellier, P. & Legube, B., 2004. Phototransformation of selected organophosphorus pesticides in dilute aqueous solutions. *Water Research*, 38(9), pp.2304–2313.
- Zheng, Y.Z. et al., 2007. Decontamination of vegetables sprayed with organophosphate pesticides by organophosphorus hydrolase and carboxylesterase (B1). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136(3), pp.233–241.

# **CAPÍTULO 5**

## **Degradação de Microcistina-LR**

## 5. DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA-LR

*Degradação de microcistina-LR por processo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV: Identificação dos subprodutos de oxidação e validação do método por HPLC-MS*

### Resumo

O processo de eutrofização das águas naturais favorece o crescimento de cianobactérias, as denominadas florações ou *blooms*. As florações de algas e cianobactérias produtoras de toxinas hepatotóxicas e neurotóxicas em mananciais destinados ao abastecimento tem causado sérias preocupações as autoridades sanitárias por serem responsáveis por alterações organolépticas das águas e causadoras de graves intoxicações humana e animal. Além do mais, os tratamentos convencionais de água se mostram ineficientes para a remoção total destas toxinas, sendo necessário novas tecnologias aplicáveis. O presente trabalho foi pautado em três objetivos, o primeiro foi validar metodologia analítica para quantificação de MC-LR em amostras de água, o segundo investigou a degradação de microcistina-LR em solução aquosa aplicando peróxido (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), radiação ultravioleta (UV) e processo oxidativo avançado (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV) e o terceiro objetivo foi verificar os subprodutos formados na fotodegradação de MC-LR no processo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV e sugerir uma rota de degradação da molécula de MC-LR. A validação do método para identificação e quantificação de MC-LR foi realizada por HPLC-ESI-MS/MS pelos parâmetros de seletividade, limites de detecção e quantificação, exatidão, precisão, linearidade e recuperação, os resultados calculados atenderam todas as exigências das normas consultadas. Na etapa de degradação, dentre os processos utilizados, o processo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV apresentou os melhores resultados, seguido por radiação UV. A radiação UV resultou numa degradação de 98% no tempo de radiação de 60 minutos e o processo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV apresentou eficiência superior a 98% em 20 minutos de reação. Os subprodutos da fotodegradação que apresentaram maior intensidade relativa foram os de *m/z* 444, 553 e 681.

**Palavras-chave:** Microcistina-LR, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV, Subprodutos de degradação

## Degradation of microcystin-LR by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV process: Identification of oxidation byproducts and validation of the method by HPLC-MS

### Abstract

The natural waters eutrophication process favors the growth of cyanobacteria, the so-called blooms. The blooms of algae and cyanobacteria producing hepatotoxic and neurotoxic toxins in springs, which are intended for supply, have been causing serious concerns to sanitary authorities for being responsible for organoleptic changes of the water and causing serious human and animal intoxications. In addition, conventional water treatments are inefficient for the total removal of these toxins, therefore new technologies are required. The present work was based in three objectives, the first one was to validate the analytical methodology for the quantification of microcystin-LR in water samples, the second investigated the degradation of microcystin-LR in aqueous solution through the application of peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ultraviolet radiation (UV) and advanced oxidative process (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV) and the third objective was to verify byproducts formed in the photodegradation with the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV process and to suggest a route of degradation of the molecule. The method's validation for identification and quantification of MC-LR was performed by HPLC-ESI-MS/MS by the selectivity parameters, limits of detection and quantification, accuracy, precision, linearity and recovery, the calculated results met all the consulted standards requirements. In the degradation phase, among the processes used, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV process presented the best results, followed by UV radiation. UV radiation resulted in a degradation of 98% in the 60 minute radiation time and the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV process presented efficiency above 98% in 20 minutes of reaction. The byproducts of photodegradation with the highest relative intensity were  $m/z= 444, 553$  and  $681$ .

**Keywords:** Microcistin-LR, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV, degradation byproducts.

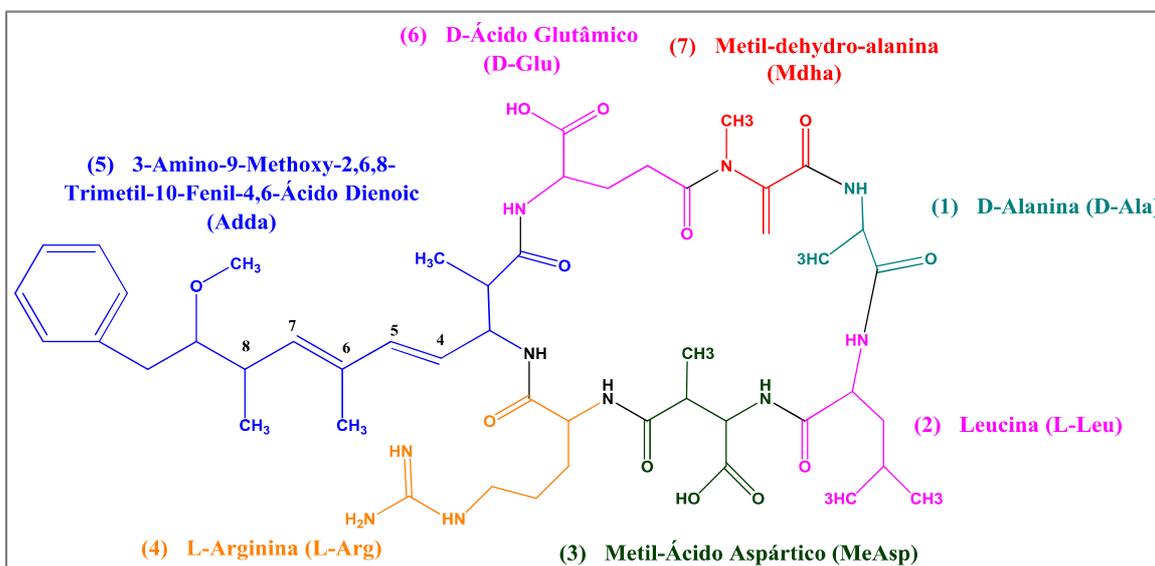
## 5.1. Introdução

A ocorrência de florescências de cianobactérias é um fenômeno aparentemente influenciado pela química da água e pelas condições climáticas. Em adição o aumento da quantidade de nutrientes e/ou matéria orgânica num ecossistema aquático contribui para o processo de eutrofização, além de outros fatores como temperatura, luminosidade, pH e estabilidade física das massas de água. O desenvolvimento de florescências cianobacterianas traz inúmeras consequências indesejáveis, tais como: (1) diminuição da transparência da massa hídrica; (2) alteração da características organolépticas da água; (3) produção de espumas; (4) depleção da concentração de oxigênio dissolvido; (5) mortandades de animais aquáticos; e (6) ocorrência de toxinas (Codd 2000; Carneiro & Leite 2008; Carmichael 1992). É no contexto da produção de toxinas que a ocorrência de florescências de cianobacterias adquire contornos mais graves, uma vez que a água doce é essencial para o abastecimento público e para atividades recreacionais.

Atualmente, cerca de 150 gêneros de cianobactérias são identificados totalizando 2000 espécies, entre as quais pelo menos 40 são consideradas como produtoras de toxinas (Chorus et al. 2010; Tyler et al. 2009). As cianotoxinas são classificadas em diferentes classes, de acordo com o seu modo de ação e efeito tóxico: neurotoxinas, hepatotoxinas e dermatotoxinas. As hepatotoxinas incluem as microcistinas e a nodularina.

As microcistinas (MCs) são classificadas como heptapeptídios cíclicos e podem ser produzidas pelas espécies de *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Planktothrix* e outros diversos gêneros (Pearson et al. 2010; Moreira et al. 2013). A nomenclatura microcistina (MC) deve-se ao fato de ter sido inicialmente detectada na espécie *Microcystis aeruginosa* (Carmichael 1992). Cerca de 80 variantes de MCs já foram isoladas e reportadas (Hoeger et al. 2005; Pichardo et al. 2006; Brooke et al. 2006). As microcistinas-LR, microcistina-RR e microcistina-YR são as espécies mais comuns nas florações de cianobactérias, em especial a microcistina-LR (Carmichael 1992; Chorus & Bartram 1999). As microcistinas são constituídas quimicamente por sete aminoácidos (Figura 5.1) possuindo uma porção invariável da molécula que contém três D-aminoácidos:  $\beta$ -eritro- $\beta$ -metil ácido aspártico, alanina e  $\gamma$ -ácido glutâmico (D- $\beta$  MeAsp, D-Ala e D-Glu), dois L-aminoácidos variáveis (Leucenina e Arginina) e dois aminoácidos raros (Mdha e Adda). O Mdha é o N-metildehidroalanina e o Adda, responsável pelo

caráter tóxico da molécula é o 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8, trimetildeca-4,6-ácido dienóico (Francis et al. 1988; Carmichael 1992).



**Figura 5.1:** Estrutura da molécula de MC-LR (C<sub>49</sub>H<sub>74</sub>N<sub>10</sub>O<sub>12</sub>).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu um valor guia para a variante MC-LR em 1µg/L para águas de consumo humano e 10µg/L para águas de recreio. Vale salientar, que os valores limites estabelecidos pela OMS têm em consideração apenas os efeitos agudos da MC-LR, não contemplando os efeitos crônicos e cancerígenos (Chow et al. 1999; Kaya K 1998). As frequentes florações de cianobactérias produtoras de toxinas surgem durante as estações de verão e início de outono, em fontes de águas naturais destinadas a consumo humano, resultando em grandes preocupações para as indústrias produtoras de água potável (He et al. 2015). Embora as MCs existam principalmente como toxinas intracelulares, a lise celular (resultante da ruptura de aspecto natural ou de forças físicas externas) pode levar à libertação da toxina extracelular no ambiente aquático (Schopf et al. 1994). Processos de tratamento de água convencional, como coagulação, floculação e filtração, podem ser eficaz para as toxinas intracelulares, visto que as células são parcialmente removidas por essas etapas, porém não são eficazes para remover as toxinas extracelulares (Roegner et al. 2014), além disso, tais processos simplesmente ocorre a transferência de uma fase para outra, podendo resultar na ruptura celular e o retorno da toxina para o início do tratamento e no meio ambiente (Chorus & Bartram 1999; Lawton & Robertson 1999). Portanto, é urgente e necessário o

desenvolvimento de tecnologias de tratamento eficazes para remover cianotoxinas da água contaminada.

Os Processos de Oxidação Avançada (POA) que baseiam na formação de radicais hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ), estimula interesses por alguns pesquisadores por ser uma tecnologia promissora frente aos processos de tratamento convencional de águas existentes, esses processos podem operar em conjunto ou paralelo com o tratamento convencional na degradação de micropoluentes (Jacobs et al. 2013; Sorlini et al. 2013; Pinho 2014; He et al. 2015). A combinação de UV e  $\text{H}_2\text{O}_2$  se destaca em meios aos POAs o que atrai a atenção dos estudiosos na aplicação deste processo em possíveis instalações de ETA (Zong et al. 2013, He et al. 2015; Wang et al. 2015). O objeto principal do trabalho foi reportar a degradação induzida de MC-LR pelo processo de radiação UV-254 nm e  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ . Identificar os principais intermediários de degradação e propor um rota de degradação da cianotoxina usando espectrometria de massas para a fotodegradação de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$  e validar o método de CLAE-MS/MS.

## **5.2. Material e métodos**

### *5.2.1. Reagentes e Soluções*

O padrão de Microcistina-LR foi obtido comercialmente através da National Research Council-Canadá, o mesmo foi utilizado como adquirido, dissolvido em 500  $\mu\text{L}$  de uma solução  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$  a 50% (V/V) com concentração de 10  $\mu\text{g}/\text{L}$ . Para as análises de cromatografia líquida foram utilizados Acetonitrila (Panreac, grau HPLC), Metanol (J.T. Baker, grau HPLC) e água ultrapura com resistividade de 18,2  $\text{M}\Omega$ ; 0,05  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

### *5.2.2. Cultivo das cepas de *Microcystis aeruginosa* e preparação da água de estudo*

As cepas de *Microcystis aeruginosa* foram cultivadas em sala climatizada (24 °C) e com fôton período de 12/12, fornecidos por lâmpadas fluorescentes de 40W com intensidade luminosa em torno de 1200 LUX,. Para a obtenção da toxina (MC-LR), primeiramente, as células foram cultivadas até alcançarem um crescimento celular de aproximadamente  $10^6/\text{mL}$ , em seguida foram submetidas ao processo de ruptura celular para extrair a toxina intracelular a partir das etapas de congelamento/descongelamento por 3 repetições consecutivas. Posteriormente, alíquotas de 100 mL das amostras contendo células lisadas foram filtradas em membrana de celulose (Millipore®) com

porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$ . As amostras filtradas foram submetidas a extração em fase sólida usando o cartucho C18 para concentrar as toxinas. Os cartucho C18 foram previamente condicionados com 6 mL de metanol e 6 mL de água ultra pura, as amostras foram eluidas no cartucho em fluxo contínuo que não excedia 5mL/min. Os cartuchos foram secos e finalmente eluido à 5 mL em uma mistura de metanol + ácido fórmico 0,1%.

### 5.2.3. *Experimento fotoquímico*

Os experimentos de irradiação com concentração inicial de MC-LR ocorreram em câmara fotocatalítica (0,46 m de altura e 0,70 m de comprimento e 0,40 m de largura) onde foram acopladas três lâmpadas germicidas de 15W cada, que emitem radiação UV no comprimento de onda de 254 nm e um sistema de agitação mecânica. Os experimentos ocorreram em placa de Petri com volume de 50 mL com uma distância de 11 cm das lâmpadas. A intensidade da radiação foi medida com um radiômetro com comprimento de onda de 254 nm, Coleparmer instrument Co. Chicago, III, 60648, séries 9811. A medição foi realizada em vários pontos da câmara e obteve a média de 9  $\text{mJ}/\text{cm}^2$

### 5.2.4. *Parâmetros para validação do método Analítico*

O método desenvolvido para a quantificação microcistina-LR foi validado seguindo as diretrizes do INMETRO (DOQ-CGCRE-008 de 2011) e ANVISA (Resolução RE nº 899 de 2003). Os parâmetros investigados na validação incluíram a seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e recuperação.

A linearidade do método foi determinada a partir da relação matemática entre o sinal medido e a concentração do analito de interesse, obtida por uma equação de reta  $y=ax+b$ , chamada de curva de calibração. Os coeficientes a e b da curva de calibração foram estimados a partir de um conjunto de medições experimentais (0,5, 1, 2,5; 5, 10, 15, 30, e 50  $\mu\text{g}/\text{L}$ ), usando o método matemático conhecido como regressão linear, além destes foi calculado o coeficiente de determinação ( $r^2$ ), que permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximos de 1,0 menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão.

Os limites de detecção ( $\text{LD}=3s/S$ ) e de quantificação ( $\text{LQ}=10s/S$ ) do método foram calculados empregando o método baseado em parâmetros da curva de calibração. Onde s é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão

do branco da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e  $S$  é a inclinação (“slope”) ou coeficiente angular da curva analítica.

A precisão do método foi verificada pela repetibilidade e determinada em uma mesma amostra (precisão intradia). A precisão foi calculada a partir da estimativa do desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV). O cálculo do DPR foi a partir de três concentrações que contemplam a faixa de variação da curva de calibração (baixa, média, e alta) e para cada concentração foram feitas seis determinações. O DPR (%) foi calculado a partir da razão do desvio padrão ( $s$ ) pela concentração média determinada (CMD) das seis determinações por concentração. O cálculo do desvio padrão relativo ( $DPR = s/CMD$ ) superiores a 15% não são aceitáveis.

A exatidão do método foi determinada na mesma corrida analítica (exatidão-intradia). Para calcular a exatidão foram selecionados três níveis de concentrações (baixa, média e alta), com 3 (três) réplicas cada. O processo utilizado para avaliar a exatidão do método foi pelo ensaio de recuperação (R). A exatidão foi estimada pelo cálculo do erro relativo (ER), por meio da razão entre a concentração média determinada experimentalmente pela concentração teórica correspondente.

Os ensaios de recuperação foram calculados adicionando-se soluções do padrão de MC-LR na água matriz isenta da cianotoxina. As amostras matriz foram fortificadas com o padrão de MC-LR em pelo menos três diferentes concentrações: baixa, média e alta. Concentrações dentro da faixa da curva de calibração. A recuperação foi calculada segundo a Equação (5.1).

$$Recuperação(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} * 100 \quad \text{Equação (5.1)}$$

Sendo ( $C_1$ ) concentração da água matriz fortificada com MC-LR com concentração conhecida; ( $C_2$ ) concentração de MC-LR presente na água matriz sem ser fortificada com o padrão e; ( $C_3$ ) concentração teórico do padrão de MC-LR adicionado na matriz. Empregando-se esses valores na Equação (1), encontra-se a recuperação. Nos procedimentos de validação, a recuperação deve estar na faixa de 70 a 120%.

### 5.2.5. Parâmetros analíticos

As concentrações das amostras de MC-LR foram determinadas pelo sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-Ultimate 3000 da Thermo Scientific/Dionex) equipado com amostrador automático, bomba quaternária e compartimento de coluna. A separação de MC-LR foi realizada em uma coluna analítica KINETEX C18 (2,6  $\mu\text{m}$  x 100 mm x 2,1 mm) com temperatura mantida em 30 °C e uma coluna de guarda (3 x 2,1 mm) da marca phenomex. A fase móvel utilizada foi H<sub>2</sub>O e Acetonitrila, ambas contendo 0,1% de ácido fórmico. A eluição da MC-LR ocorreu no modo isocrático (50% de H<sub>2</sub>O + 50% Acetonitrila) e com uma taxa de fluxo de 0,1 mL/min, resultando no tempo de retenção de 4 minutos. O volume de injeção foi de 50  $\mu\text{L}$ .

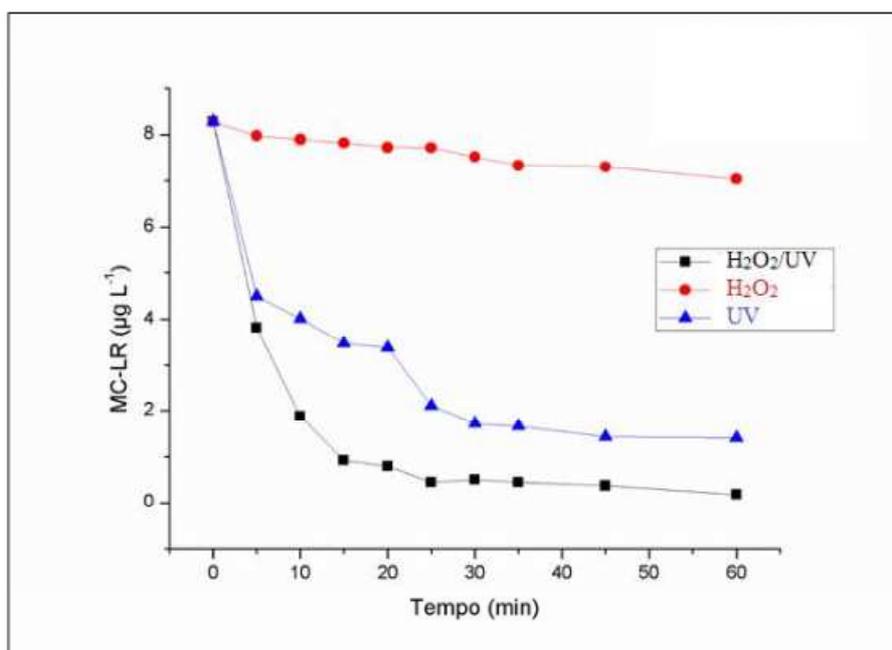
Espectro de Massa (LCQ FLEET) triplo quadrupolo da marca Thermo Scientific de interface Electron-Spray Ion (ESI) foi usado nos experimentos de fotodegradação na identificação do composto alvo e dos subprodutos formados. O Ion Max Electrospray Ionization (ESI) foi aplicado no modo de ionização positiva. O sistema foi controlado pelo software Xcalibur. Para uma melhor seletividade das amostras e da curva analítica, foram realizados no modo de aquisição por Monitoramento de Íon Específico com intervalo de varredura de 800 a 1100 m/z para MC-LR em 995,55 (M+1)<sup>+</sup>. A voltagem do Spray foi de 5kV para o modo positivo. A temperatura do capilar de transferência de íon, sheath gás, gás auxiliar e gás de arraste foram 350 °C, 30, 10 e 0 (unidades arbitrárias), respectivamente

## 5.3. Resultados e discussão

### 5.3.1. Resultados do experimento de oxidação

Na Figura (5.2) estão apresentados os resultados obtidos na degradação de MC-LR com concentração inicial de 10  $\mu\text{g/L}$  em solução aquosa com o oxidante peróxido de hidrogênio. Observa-se que o processo de peroxidação não resultou em degradação significativa da MC-LR, a eficiência máxima da degradação foi de 9% no tempo de 60 minutos com a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 4 mmol/L. Por meio da determinação do peróxido de hidrogênio residual, verificou-se que não houve consumo do agente oxidante na condição avaliada. O agente oxidante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provou mais uma vez ser ineficiente na degradação de MC-LR. Segundo Wang et al. (2015) relataram que a aplicação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sem atividade fotocatalítica é incapazes de degradar satisfatoriamente compostos

orgânicos, tais como o MC. Estudo realizado previamente (He et al. 2015) observou que a degradação de MC-LR só ocorreu após 16 horas de reação com concentração de 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Barrington et al. (2013) aplicou o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na remoção de cianobactérias e cianotoxina (MC-LR) em efluentes de lagoa de estabilização e obteve uma redução significativa após três semanas de aplicação.



**Figura 5.2:** Curva de degradação de MC-LR

Na degradação de microcistina-LR em solução aquosa com aplicação do processo de fotólise. Observou-se uma elevada porcentagem de degradação ou modificação da MC-LR de aproximadamente 80% após 20 minutos de irradiação e a partir deste intervalo a taxa de decaimento permaneceu constante até o tempo de 35 minutos, e na medida que o tempo reacional aumentava uma degradação de 98% foi alcançada em 60 minutos. Observa-se também que a reação ocorreu mais rapidamente nos primeiros 20 minutos, quando atingiu, aproximadamente 80% de degradação da cianotoxina. Por outro lado quando He et al. (2015) aplicou a fotólise de MC-LR com 254 nm não obteve redução significativa da cianotoxina. Para o autor o processo demonstrou uma aparente limitação, no entanto, os nossos resultados observou uma degradação significativa com 20 minutos de reação.

Na degradação de MC-LR em solução aquosa por meio do processo de peroxidação assistida por radiação ultravioleta (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) com concentração de peróxido inicial de 4

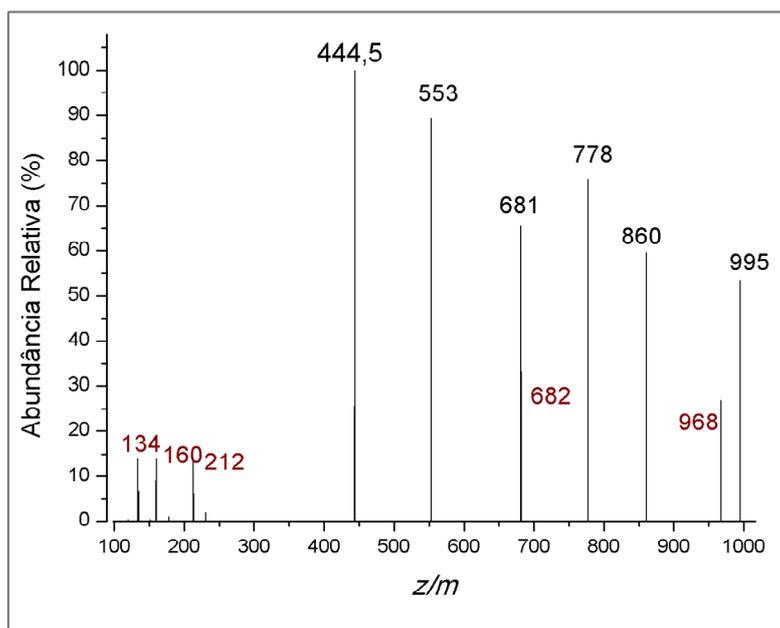
mM, observou-se que a remoção foi superior a 53% nos primeiros cinco minutos de irradiação. A concentração de 0,7 µg/L de MC-LR foi alcançada com 15 minutos de reação. Através da determinação de peróxido de hidrogênio residual verificou-se o consumo do agente oxidante em 30% após 20 minutos de reação. Resultados semelhantes também foram observados por Zong et al. (2013) e Barrington et al. (2013) na remoção de MC-LR por UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A fotólise com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> parece ser o processo mais eficiente na degradação do composto alvo, no entanto, é necessário que se conheça os subprodutos formados nos processos de fotodegradação para identificar o quão tóxicos podem ser. A alta eficiência na eliminação da toxicidade da MC-LR pode ser atribuído através da clivagem nas ligação do Adda e Mdha (Wang et al. 2015).

### 5.3.2. Subprodutos de MC-LR por processo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV

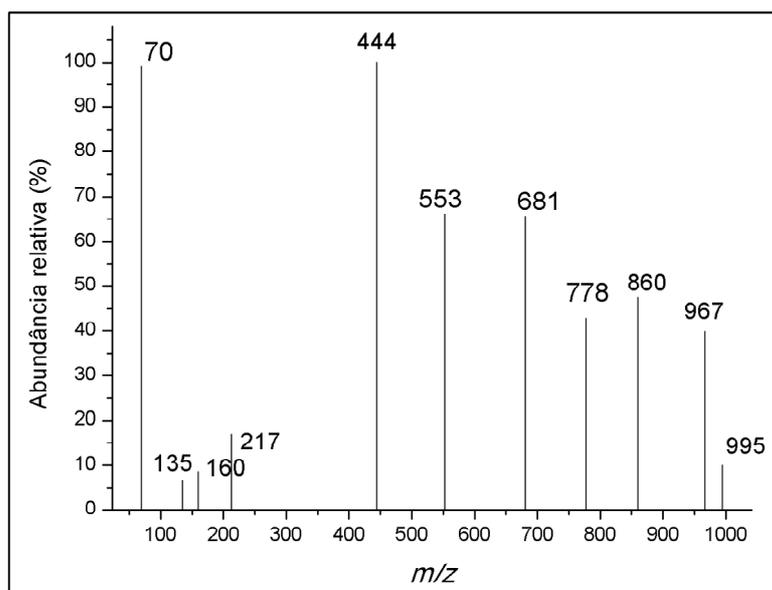
A molécula protonada de MC-LR (C<sub>49</sub>H<sub>74</sub>O<sub>12</sub>N<sub>10</sub>) de massa (M + H)<sup>+</sup> = 995, foi selecionada em um segmento de modo de aquisição por monitoramento de íons específico (SIM). O espectro de massa foi calculado pela infusão de 500 µL do padrão de MC-LR (100 ng/mL) para otimizar as condições de análise no LCQ-FLeet. A identificação de subprodutos formados pela reação H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV foi realizado pelas análises de espectrometria de massas (EM) de acordo com a sensibilidade do LCQ Fleet – MS/MS, no monitoramento dos valores de *m/z* (o que equivale a *m/z* × TR × abundância relativa dos íons associado ao composto). Para as amostras submetidas à reação de UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no tempo de reação de 5 e 15 minutos foi possível verificar a intensidade do sinal 995 *m/z* em torno de 50% e 10%, e a concentração quantificada nesse tempo de reação foi de 3,82 µg/L e 0,7 µg/L, respectivamente, indicando que a MC-LR foi significativamente degradada a uma concentração inferior requerida pelas regulamentações.

Embora a MC-LR apresente uma estrutura complexa, a alta eficiência de degradação pelo processo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV pode ser atribuída pela clivagem das ligações peptídicas (Chang et al. 2014). Segundo Lawton & Robertson (1999) relata que o radical OH• reagi facilmente com ligações insaturadas, tais como aquelas incluídos na porção Adda da microcistina, este grupo é comumente utilizado como um cromóforo para análise da toxina e a clivagem dessa porção resulta na eliminação da toxicidade. Neste estudo foi possível verificar que ocorreu a decomposição da MC-LR devido aos fragmentos de íons formados, a exemplo, os fragmentos com baixo peso molecular de 70, 135, 161 e 212 Da. Os fragmentos de íons dominantes no período reacional de *m/z* observados nas Figuras

(5.3 e 5.4) foram 444, 553, 681, 778, 860 e 967. Além desses outros SBP-MCLR foram detectados juntos com os íons dominantes na região do espectro de massas. Esses íons foram gerados pela clivagem de ligações peptídicas resultando em porções liberadas, estes resultados são obtidos através dos números de íons correspondentes pela diferença do íon precursor ( $m/z$  995).



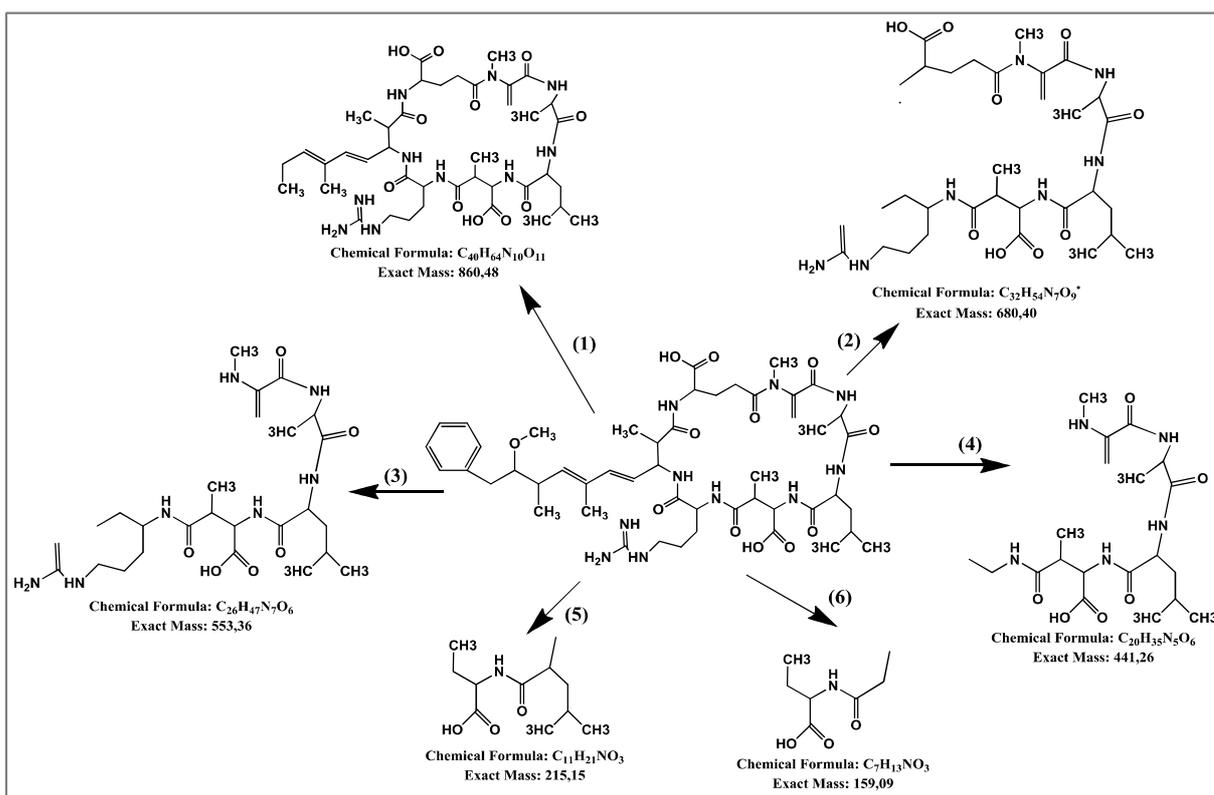
**Figura 5.3:** Espectro de massas no tempo de reação de 5 min.



**Figura 5.4:** Espectro de massas no tempo de degradação de 15 min

Em todas as alíquotas retiradas nos tempos de 5, 10, 15, 20 e 30 minutos no processo de degradação foram encontrados os mesmos fragmentos de íons ( $m/z$ : 70, 135, 161, 212, 444, 553, 681, 778, 860 e 967), identificados como subprodutos da MC-LR. No entanto, ocorreram variações entre as intensidades relativas dos picos normalizados.

Estudos prévios para identificação de intermediários e subprodutos de MC-LR, por oxidação química convencional (Zong et al. 2015) e oxidação avançada (Al Momani e Jarrah, 2010 e He *et al.*, 2015), identificaram os intermediários de peso molecular semelhantes aos nossos estudos. Por outro lado, quando comparando os resultados obtidos por Miao et al. (2010) e Chang et al. (2014) os autores identificaram intermediários de peso molecular de  $m/z$  855, 853, 835, 827, 815 e 795 aplicando o processo de ozonização e com intensidade relativa em torno de 100%, o que diverge dos fragmentos de íons identificados neste trabalho. Apesar dos picos intermediários identificados no espectrograma do trabalho tenham sido elevados -  $m/z$  681, 778, 860 e 967 - com abundância relativa em torno de 50 %, não justifica que o processo não tenha sido eficiente, pois a formação destes intermediários com peso molecular elevado obteve baixa intensidade no espectrograma. Os fragmentos de íons mais abundante identificados no espectrograma no tempo de atividade fotocatalítica de 15 minutos foram os íons 444, 553 e 681 com intensidade relativa de 70, 70 e 100%, respectivamente. O fragmento de  $m/z$  681 pode ser apontado pelo resultado da decomposição total do grupo Adda, permanecendo os grupos intactos de D-Glu, Mdha, D-Ala, L-Leu, MeAsp e L-Arg, o íon  $m/z$  553 é identificado pela perda do grupo Adda e D-Glu, resultando na fórmula química de  $C_{24}H_{40}N_8O_7$  e o fragmento 444 pode ser representado  $[Ala-Leu-MeAsp+L-Arg+H]^+$ . Zong *et al.*, (2015) estudaram o efeito da cloração nas MC-LR e os potenciais riscos de subprodutos de desinfecção e identificaram diversos subprodutos incluindo os de  $m/z$  213, 553 os quais correspondem aos fragmentos de íons  $[Glu-Mdha+H]^+$  e  $[Mdha-Ala-Leu-MeAsp-Arg+H]^+$  respectivamente. Estudos anteriores, (Chang *et al.*, 2014), também identificaram o fragmento  $m/z = 213$ , caracterizando o íon como sendo do grupo aldeído gerado da porção  $[L-Arg + MeAsp + H]^+$ . De acordo com Chang et al. (2014), os fragmentos de íons  $m/z$  70, 135 e 160 pode ser caracterizado como sendo  $[MeAsp+H]^+$  e/ou  $[L-Arg+H]^+$ , por estar relacionado com a decomposição do grupo. Sabe-se que os fragmentos são identificados por tentativas de clivagem alterando a massa específica do peptídeo em estudo ou apenas identificando o fragmento do peptídeo intacto, na Figura (5.5) observa-se a possível rota de degradação da MC-LR por reação de UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figura 5.5:** Subprodutos de MC-LR no processo de UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A análise da estrutura molecular, MC-LR, sugere as possíveis rupturas das ligações químicas, e como foram iniciadas as clivagens. Observa-se que as ligações duplas conjugadas foram as mais afetadas pela oxidação. A princípio, a maior parte dos intermediários identificados apresenta uma estrutura molecular cíclica intacta e ao decorrer da degradação os intermediários foram sendo linearizados. Os peptídeos com peso molecular mais baixos podem ser identificados pela clivagem da porção MeAsp e L-Arg.

### 5.3.3. Resultados da validação do método por CLAE-MS/MS

A *seletividade* é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto de interesse em presença de outros interferentes. A análise realizada pelo Espectrômetro de Massas (LCQ FLEET) triplo quadrupolo com amostra contendo microcistina-LR, detectou visivelmente o analito pelo cromatograma no tempo de retenção de 4,5 minutos. Segundo a ANVISA, a seletividade em métodos cromatográficos só é válida quando existe a garantia da pureza do pico atribuído ao analito alvo, mas para

isto deve ter o auxílio de um detector. Segundo Lanças (2004) o detector de EM é a forma mais segura para verificar a pureza de um pico cromatográfico.

A *Linearidade* foi obtida pela adição de uma série de concentrações conhecidas do padrão autêntico de microcistina-LR a água matriz em estudo, afim de eliminar possíveis interferentes da matriz. A curva de calibração correspondeu ao modelo matemático que estabeleceu uma relação entre a resposta instrumental (área/altura da banda cromatográfica) e a concentração do analito. A curva com 9 (nove) intervalos de concentrações conhecidas (0,5, 1, 2,5; 5, 10, 15, 30, e 50 µg/L) proporcionou uma relação matemática expressa em  $y = 1331,8x + 140,95$ . O coeficiente de correlação (r) foi de 0,9998, o critério mínimo aceitável pela ANVISA e INMETRO é de 0,99 e 0,90, respectivamente. Este parâmetro permitiu avaliar a qualidade da curva obtida.

O *Limite de detecção (LD)* e *limite de quantificação (LQ)* foram determinados de acordo com a ANVISA baseado em parâmetros da curva analítica.

Para calcular os valores do LD e LQ foram desenvolvidas 3 (três) curvas de calibração com os padrões de 0,5, 1, 2,5; 5, 10, 15, 30, e 50 µg/L e para cada curva foi obtida uma equação da reta. A partir das equações das três curvas construídas calculou-se os respectivos coeficientes lineares e o desvio padrão das mesmas. As equações das três curvas analíticas construídas, o coeficiente linear (s), o desvio padrão (DP) e o coeficiente angular (S) estão apresentados na Tabela (5.1).

**Tabela 5.1:** Valores dos LD e LQ

Parâmetros	Equações	R <sup>2</sup>	Coef. Linear (s)
CC1	$Y=1330,9x + 172,82$	0,9997	172,82
CC2	$Y=1393,7x + 115,01$	0,9998	115,01
CC3	$Y= 1147x + 44,068$	0,9992	44,068
DP	-	-	64,48
Coef. Angular da CC			1331,8

\*CC: Curva de calibração

O resultado do LD foi de 0,14 µg/L, esse valor representa a concentração mais baixa para a qual um grau aceitável de incerteza pode ser alcançado. Segundo o INMETRO a importância desta determinação e os problemas associados a ela advêm do fato de que a

probabilidade de detecção não muda rapidamente de zero para um quando seu limiar é ultrapassado. O LQ foi determinado com as concentrações de 10 vezes a relação do desvio padrão e coeficiente angular (s/S) o que correspondeu na prática ao padrão de calibração de menor concentração no valor de 0,5 µg/L.

A *precisão (intra-corrída)*, *exatidão* e *recuperação* do método, foram realizadas com 3 (três) níveis de concentrações (10, 30 e 50 µg/L) com 6 (seis) réplicas cada, resultando na precisão de 3,89%, 5,0% e 3,8%, conforme estipulado nas recomendações da ANVISA que não se admiti valores superiores a 5%. Portanto os valores obtidos estão conforme estipulado nas recomendações da ANVISA. Os dados detalhados para calcular a o método de precisão (*intra-corrída*) precisão estão apresentados na Tabela (5.2).

**Tabela 5.2:** Valores da precisão do método para MC-LR

Conc. (ng/ml)	Área						Média	DP	CV%
	1°	2°	3°	4°	5°	6°			
10	13770	13358	12824	13288	12308	13372	13153,3	512,087	3,89
30	41955	39307	36693	42469	41539	40217	40363,3	2142,8	5,0
50	66497	69995	67853	67644	63851	63263	66517,1	2563,12	3,85

Os ensaios de exatidão e recuperação foram determinados na mesma corrida (exatidão intra-corrída). A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. O desvio padrão (S) calculado não deve exceder 15%. O cálculo aplicado para avaliar a *exatidão* do método foi baseado no ensaio de tendência de recuperação, como preconiza a ANVISA, os resultados obteve um grau de concordância de 105%, 103% e 100%. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela (5.3).

**Tabela 5.3:** Valores da exatidão do método para MC-LR

Concentração teórica (µg/L)	Concentração medida			Média	S	S (%)	Exatidão (%)
10	10,371	10,626	10,473	10,49	0,128	13	105
30	30,907	30,626	30,835	30,78	0,146	15	103
50	49,759	49,906	49,622	49,76	0,142	14	100

A *recuperação* foi calculado pela análise de amostras fortificadas e os resultados obtidos em porcentagem. A água matriz continha 0,60 µg/L do analito, partir dessa informação, dos valores das amostras fortificadas medidas e dos valores das concentrações do analito teórico (10, 30 e 50 µg/L) adicionada à amostra foi possível calcular a recuperação do método. Conforme estipulado nas recomendações pela ANVISA (80-120%), os resultados obtidos foram: 99, 100 e 98% para os 3 (três) níveis de concentrações (10, 30 e 50 µg L<sup>-1</sup>), respectivamente. Esses valores de recuperação foram desejáveis e demonstraram a sensibilidade do método. Vale salientar que não é necessário que este valor seja de 100%, mas exige que a recuperação seja consistente, precisa e reprodutiva.

#### **5.4. Conclusão**

Os processos de degradação da MC-LR avaliados neste estudo apresentaram resultados adequada para os objetivos deste trabalho. O processo de peroxidação se mostrou inadequado na degradação da MC-LR inferior a 8% na condição avaliada. Os processos de UV e de UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se mostraram altamente eficazes na degradação da toxina, apresentando taxas e eficiências de degradação elevadas, superiores a 98% em 60 e 15 minutos de reação, respectivamente. Os resultados esperados na validação do método por HPLC-ESI-MS/MS foram satisfatório e ficaram dentro dos valores estabelecidos pelas normas. A validação do método analítico comprovou que o método aplicado oferece credibilidade, precisão e exatidão. Portanto os resultados analíticos obtidos pelo HPLC-MS foram confiáveis. A metodologia aplicada nas análises podem ser utilizada posteriormente em qualquer amostra que se objetiva identificar a toxina MC-LR. A identificação dos subprodutos formados pelo espectro de massas (LCQ FLEET) triplo quadrupolo de interface Electron-Spray Ion (ESI) auxiliou na proposta da rota de degradação da MC-LR.

## 5.5. Referências

- Barrington, D.J., Reichwaldt, E.S. & Ghadouani, A., 2013. The use of hydrogen peroxide to remove cyanobacteria and microcystins from waste stabilization ponds and hypereutrophic systems. *Ecological Engineering*, 50, pp.86–94..
- Brooke, S. et al., 2006. Decrease in toxicity of microcystins LA and LR in drinking water by ozonation. *Toxicon*, 48(8), pp.1054–1059.
- Carmichael, W.W., 1992. Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*, 72, pp.445–459.
- Carneiro, T.G. & Leite, F., 2008. Cianobactérias e suas toxinas. *Revista Analytica*, 32, pp.2–7.
- Chang, J. et al., 2014. Ozonation degradation of microcystin-LR in aqueous solution: Intermediates, byproducts and pathways. *Water Research*, 63, pp.52–61.
- Chorus, I. et al., 2010. Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews*, 3(4), pp.323–347.
- Chorus, I. & Bartram, J., 1999. *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*,
- Chow, C.W.K. et al., 1999. The impact of conventional water treatment processes on cells of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Water Research*, 33(15), pp.3253–3262.
- Codd, G., 2000. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecological Engineering*, 16(1), pp.51–60.
- Francis, G., L-amino, T. & Murthy, K.-, 1988. Letter To the Editor Naming of Cyclic Heptapeptide Toxins of Cyanobacteria ( Blue-Green Algae ). *Advances*, (11), pp.971–973.
- He, X. et al., 2015. Destruction of microcystins (cyanotoxins) by UV-254nm-based direct photolysis and advanced oxidation processes (AOPs): Influence of variable amino acids on the degradation kinetics and reaction mechanisms. *Water Research*, 74, pp.227–238.
- Hoeger, S.J., Hitzfeld, B.C. & Dietrich, D.R., 2005. Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in drinking water treatment plants. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203(3 SPEC. ISS.), pp.231–242.
- Jacobs, L.C. V et al., 2013. Photocatalytic degradation of microcystin-LR in aqueous solutions. *Chemosphere*, 90(4), pp.1552–1557..chemosphere.2012.09.004.
- Kaya K, S.T., 1998. A photodetoxification mechanism of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR by ultraviolet irradiation. *Chem Res Toxicol.*, 11(3), pp.159–163.
- Lanças, F.M., 2004. *Validação de Métodos Cromatográficos de Análises* RIMA, ed.,
- Lawton, L. a. & Robertson, P.K.J., 1999. Physico-chemical treatment methods for the removal of microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) from potable waters. *Chemical Society Reviews*, 28(4), pp.217–224.
- Miao, H.F. et al., 2010. Detoxification and degradation of microcystin-LR and -RR by ozonation. *Chemosphere*, 79(4), pp.355–361. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.02.024>.
- Moreira, C., Vasconcelos, V. & Antunes, A., 2013. Phylogeny and biogeography of cyanobacteria and their produced toxins. *Marine Drugs*, 11(11), pp.4350–4369.

- Pearson, L. et al., 2010. *On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin*,
- Pichardo, S. et al., 2006. Toxic effects produced by microcystins from a natural cyanobacterial bloom and a *Microcystis aeruginosa* isolated strain on the fish cell lines RTG-2 and PLHC-1. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51(1), pp.86–96.
- Pinho, L.X., 2014. Photocatalytic Degradation of Cyanobacteria and Cyanotoxins using Suspended and Immobilized TiO<sub>2</sub>, p.168.
- Roegner, A.F. et al., 2014. Microcystins in potable surface waters: Toxic effects and removal strategies. *Journal of Applied Toxicology*, 34(5), pp.441–457.
- Schopf, J.W., 1994. Disparate rates, differing fates: tempo and mode of evolution changed from the Precambrian to the Phanerozoic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(15), pp.6735–6742.
- Sorlini, S., Gialdini, F. & Collivignarelli, C., 2013. Removal of cyanobacterial cells and Microcystin-LR from drinking water using a hollow fiber microfiltration pilot plant. *Desalination*, 309, pp.106–112.
- Tyler, A.N. et al., 2009. Strategies for monitoring and managing mass populations of toxic cyanobacteria in recreational waters: a multi-interdisciplinary approach. *Environmental health : a global access science source*, 8 Suppl 1(ii), p.S11..
- Wang, B. et al., 2015. The combined effects of UV-C radiation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on *Microcystis aeruginosa*, a bloom-forming cyanobacterium. *Chemosphere*, 141, pp.34–43..
- Zong, W. et al., 2015. Microcystin-associated disinfection by-products: The real and non-negligible risk to drinking water subject to chlorination. *Chemical Engineering Journal*, 279, pp.498–506.
- Zong, W., Sun, F. & Sun, X., 2013. Oxidation by-products formation of microcystin-LR exposed to UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Toward the generative mechanism and biological toxicity. *Water Research*, 47(9), pp.3211–3219.

# **CAPÍTULO 6**

**Degradação de fármaco veterinário**

---

## 6. DEGRADAÇÃO DE FÁRMACO VETERINÁRIO

*Otimização da degradação de ivermectina utilizando o processo oxidativo avançado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV: quantificação e identificação dos fragmentos gerados por espectrometria de massa*

### Resumo

Os fármacos veterinários usados no tratamento e prevenção de doenças tem preocupado a comunidade científica em diversos países. Uma vez no ambiente, os fármacos e seus metabólitos podem se disseminar para águas superficiais e subterrâneas, solos e sedimentos, causando a contaminação de organismos e plantas e sendo acumulados via cadeia alimentar. Neste trabalho foi empregado o Processo Oxidativo Avançado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV para a degradação do antiparasitário ivermectina. A degradação foi otimizada através do planejamento Box-Behnken composto de três níveis e três fatores, resultando em um total de dezoito experimentos. As variáveis utilizadas neste experimento foram X<sub>1</sub> (concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/%), X<sub>2</sub> (tempo/min) e X<sub>3</sub> (pH). A concentração final de ivermectina foi obtida a partir de uma curva de calibração previamente construída a partir de soluções com concentração conhecida. Os resultados obtidos demonstram que a interação das variáveis X<sub>1</sub> e X<sub>3</sub> são as mais significativas para a degradação do antiparasitário em questão. O percentual de degradação obtido foi acima de 70%. Os principais fragmentos encontrados após a infusão das amostras em um espectrômetro de massa foram: 913, 897, 753 e 609 m/z. Estes dados deixam claro que ainda ocorre a presença de ivermectina em solução aquosa.

**PALAVRAS-CHAVE:** Água, Ivermectina, Espectroscopia UV, Espectrometria de Massa

## Abstract

The veterinary drugs used in the treatment and prevention of diseases have worried the scientific community in several countries. Once in the environment, drugs and their metabolites can spread to both surface and groundwater, soils and sediments, causing the contamination of organisms and plants and being accumulated via food chain. In this study, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / UV Advanced Oxidation Process was used for the degradation of the antiparasitic ivermectin. The degradation was optimized through the Box-Behnken design, composed of three levels and three factors, resulting in eighteen experiments. The variables used in this experiment were X<sub>1</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration), X<sub>2</sub> (time / min) and X<sub>3</sub> (pH). The final ivermectin concentration was obtained from a calibration curve previously constructed based on solutions of known concentration. The results obtained demonstrate that the interaction of variables X<sub>1</sub> and X<sub>3</sub> is the most significant for the degradation of the antiparasitic in question. The percentage of degradation obtained was above 70%. The main fragments found after the samples infusion in the mass spectrometer were: 913, 897, 753 and 609 m/z. These data make it clear that there is still the presence of ivermectin in aqueous solution even after the photodegradation process.

**Key Words:** Water, Ivermectin, UV Spectroscopy, Mass Spectrometry.

## 6.1. Introdução

Substâncias ativas farmacologicamente destinadas a uso veterinário são amplamente utilizadas e necessárias para garantir a criação de animais em larga escala, como suínos, ovinos, peixes e bovinos (Woodward, 2009). Embora os benefícios sejam inúmeros e particularmente importante para saúde animal o contato dos fármacos nos compartimentos ambientais pode atuar negativamente (Havlíková *et al.*, 2016). A pesquisa realizada por Kolpin *et al.*, (2002) foi direcionada para identificar e quantificar a presença de fármacos nos ecossistemas aquáticos e pouco se entendiam sobre os reais efeitos e mudanças associados ao meio ambiente. Na tentativa de elucidar os potenciais impactos ambientais causados por compostos farmacêuticos Sanderson *et al.*, (2003), Richards *et al.*, (2004) e Daughton (2016) estudaram os riscos e efeitos tóxicos de fármacos nos ecossistemas aquáticos e verificaram que muitos dos compostos analisados representaram um efeito tóxico com concentração inferior a 1 mg/L. Desde 1980 foram desenvolvidas inúmeras pesquisas sobre o residual de fármacos de uso humano e veterinário no ambiente na tentativa de correlacionar e elucidar os efeitos tóxicos causados na saúde humana (Cooper *et al.*, 2008, Fick Lindberg *et al.*, 2010).

As principais rotas dos fármacos veterinários podem vir da armazenagem e destinação de produtos não utilizados, ou com prazo de validade expirado, assim como tratamentos administrados na aquicultura, poluindo especificamente os corpos d'água (Sanderson *et al.*, 2007). Os fármacos administrados em animais também têm uma parte significativa excretada pelas fezes, cujo esterco, usado como fertilizante sem cuidado prévio, constitui uma via de contaminação de águas subterrâneas e dos solos, onde pode provocar a bioacumulação por meio de plantas e micro-organismos (Halley *et al.*, 1993). Na União Europeia (UE), antibióticos e anti-helmínticos (Antiparasitários) são os grupos mais importantes dos produtos farmacêuticos veterinários utilizados, ambos com um volume de mercado superior a 200 milhões de euros por ano (Tolls, 2001). A ivermectina (IV) é uma lactona macrocíclica pertencente à família das Avermectinas, utilizada para o tratamento de parasitoses na espécie humana e amplamente empregada em medicina veterinária como endectocida considerado potente, eficaz e seguro desde 1981 (Sanderson *et al.*, 2007). O composto é normalmente utilizado para o tratamento e prevenção de parasitas internos e externos de gado, cavalos e outros animais de pasto (por exemplo, gastrointestinais e do trato respiratório nematóides, moscas, larvas, carrapatos,

pioelhos e ácaros). Além disso, na África é administrado anualmente por pelo menos 18 milhões de pessoas contra a cegueira dos rios (oncocercose) e pode ser utilizado de forma semelhante para filariose linfática (espécies *Wuchereria bancrofti* e *Brugia timori*) (Woodward, 2009). A IV é um antiparasitário mais vendido na América do Norte, mais de 50% do gado é tratado com o anti-helmíntico na dose padrão de 0.2 mg/kg de peso corpóreo, além de ser utilizado no tratamento de piolhos do mar que afetam principalmente as atividades de aquicultura (Sanderson *et al.*, 2007). Devido a sua natureza lipofílica, a ivermectina se acumula principalmente no tecido adiposo, no fígado e no tecido cerebral (Liebig *et al.*, 2010). Embora seja rara a toxicidade em vertebrados, ela pode causar midríase, ataxia, depressão e morte.

Após sua administração, cerca de 90% do fármaco pode ser excretado pelo organismo sem ser metabolizado nas fezes e na urina, provocando mudanças nos organismos invertebrados que participam da degradação fecal (Löffler *et al.*, 2005). O primeiro estudo realizado com intervenção da IV nos microrganismo que decompõe o esterco ocorreu em (1987) que objetivava avaliar a toxicidade e o destino da IV no meio ambiente. Um estudo realizado por Nessel *et al.*, (1989) avaliou a toxicidade da ivermectina com a espécie *Daphnia magna* e verificaram uma sensibilidade com concentração inferior a 10 ng/L. Iglesias *et al.*, (2006) avaliaram o impacto da ivermectina na colonização e degradação das fezes por 60 dias e observaram que os níveis de ivermectina no solo permaneceram intactos neste período, afetando negativamente a biota do solo. Os autores concluíram que a ivermectina presente nas fezes reduz a abundância e a diversidade da fauna presente no estrume, além de atrasar a degradação dos compostos orgânicos que interferem no reciclo dos nutrientes do solo. A ineficiência da degradação sob condições aeróbias se deve ao fato deste composto apresentar peso molecular elevado formado por dois homólogos contendo 80% de Avermectina B1a [C<sub>48</sub>H<sub>74</sub>O<sub>14</sub>], e 20% de Avermectina B1b [C<sub>47</sub>H<sub>72</sub>O<sub>14</sub>], com massa molécula de 871,10 e 861,10 g/mol, respectivamente. Devido a sua baixa mobilidade no solo a IV acaba contaminando o lençol freático. O seu caráter lipofílico faz com que a sua total remoção em meio aquoso seja baixa por sistemas convencionais de tratamento, fato que limita as opções de remoção.

Nesse contexto o processo de oxidação avançado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV tem sido apontado como um dos processos mais indicado para oxidar compostos resistentes a degradação devido ao forte potencial de oxidação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV. Neste processo ocorre a dissociação

da molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela luz UV originando radicais  $\text{OH}\cdot$ . Os radicais gerados promovem a oxidação da IV gerando fragmentos menores até atingir a degradação total ou parcial, formando  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . O objetivo principal deste estudo consistiu em avaliar a degradação de ivermectina em solução aquosa pelo processo oxidativo avançado e avaliar as influências do tempo de reação e das concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  através do planejamento Box-Behnken e sugerir uma rota de degradação do composto por via de infusão por espectrometria de massas.

## 6.2. Materiais e métodos

### 6.2.1. Curva de calibração para a degradação da ivermectina

Inicialmente foi preparado uma solução de Ivermectina  $500 \text{ mg/L}$  em metanol. A partir desta solução foram preparados soluções padrão de concentração  $10, 20, 30, 40, 50 \text{ mg/L}$  para a obtenção de uma curva analítica a partir dos dados de espectroscopia UV obtidos em um Espectrofotômetro UV-vis da Shimadzu (Modelo UV-1800).

A determinação das concentrações das amostras desconhecidas foram obtidas a partir da curva analítica obtidas dos espectros de absorção de concentrações padrão (Figura 6.1).

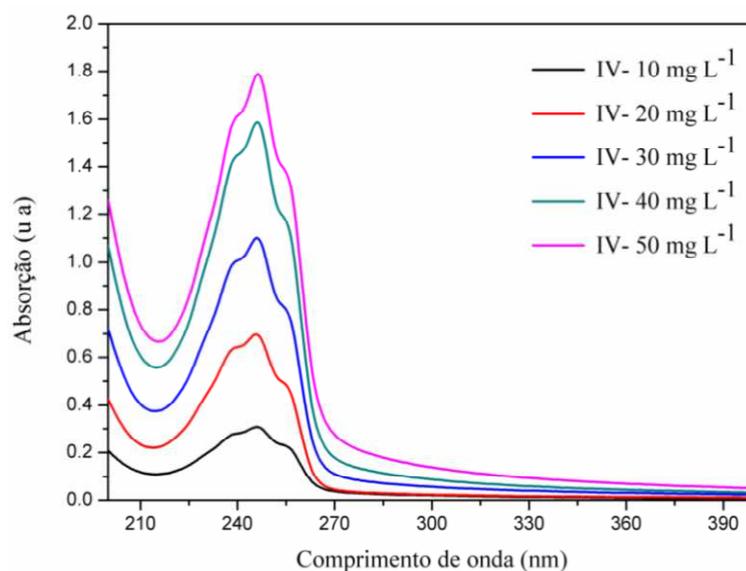


Figura 6.1: Espectros de absorção para solução de  $10, 20, 30, 40, 50 \text{ mg/L}$  de Ivermectina.

A partir dos espectros de absorção a concentração final das amostras foram obtidas a partir da equação abaixo:

$$\text{Absorção (u a)} = 0,0385 \times C_{\text{final}} - 0,0584 \quad R^2 = 0,988$$

Onde  $C_{\text{final}}$  é a concentração final de ivermectina

### 6.2.2. Ensaio de degradação

O reator fotoquímico utilizado para a realização dos ensaios de degradação de Ivermectina apresenta a seguinte configuração: Largura x Altura x Profundidade = 100 x 65 x 60 cm, dez lâmpadas fluorescente tubular germicida da marca G-light (T8 15 W) com potência de 15 W cada. A distância entre as amostras e as lâmpadas foi mantida em 20 cm. A dose de radiação medida a esta distância (20 cm) foi  $8,16 \pm 1,21 \text{ mW cm}^{-2}$  (Este dado foi medido utilizando um radiômetro configurado em um comprimento de onda 254 nm).

As condições iniciais para determinar a curva cinética de degradação foram: 30 mg/L Ivermectina, 4,0 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  e pH= 9. Após o termino de cada experimento as amostras foram centrifugadas a 2000 g para remover sólidos suspensos em solução resultante da oxidação. Estas condições foram utilizadas para determinar o tempo de equilíbrio na degradação da Ivermectina.

### 6.2.3. Planejamento estatístico box-behnken

Após a execução dos experimentos para determinar o tempo de equilíbrio para a degradação de 30 mg/L de Ivermectina, as informações das condições mais favoráveis foram extraídas e aplicadas em um planejamento de três fatores com três níveis do tipo Box-Behnken (Tabela 6.1).

O percentual de degradação das amostras foram obtidas a partir da Equação abaixo:

$$\text{Degradação (\%)} = \frac{C_{\text{inicial}} - C_{\text{final}}}{C_{\text{inicial}}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Tabela 6.1: Distribuição dos fatores e níveis utilizados na matriz de planejamento Box Behnken

Fatores	-	0	+
X <sub>1</sub> : H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)	4,0	5,5	7
X <sub>2</sub> : Tempo (min)	30	60	90
X <sub>3</sub> : pH	5	7	9

Os dados experimentais foram analisados utilizando metodologia de superfície de resposta e ajustado para um modelo polinomial de segunda ordem. A equação quadrática para as variáveis são:

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum_i \sum_j \beta_{ij} X_i X_j \quad \text{Equação 2}$$

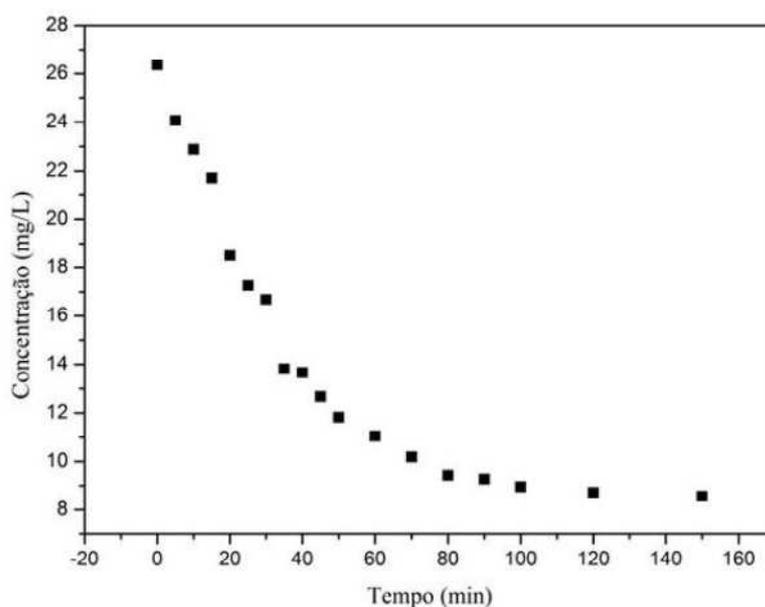
Onde Y é a resposta predita,  $\beta_0$  é uma constante,  $\beta_i$  é o coeficiente do modelo de primeira ordem,  $\beta_{ii}$  é o coeficiente quadrático para o fator i, e  $\beta_{ij}$  é o coeficiente do modelo linear para as interações entre os fatores i e j. Xi é o valor codificado para os principais efeitos

A validação do modelo foi avaliada pela Análise de Variância (ANOVA). A qualidade do ajuste do modelo polinomial foi expressada pelo coeficiente de determinação R<sup>2</sup> e ajuste R<sup>2</sup> e sua significância estatística observada pelo teste-F de Fisher. Os termos do modelo foram selecionados ou rejeitados baseados no valor-p com nível de confiança de 95%.

### 6.3. Resultados

A toxicidade da ivermectina foi comprovada para diversos tipos de organismos que atuam na degradação dos excrementos dos animais, nos microrganismos presentes nos sedimentos e nos microcústáceo *Daphnia* sp. Na Figura (6.2) apresenta o perfil de degradação da ivermectina em solução aquosa pelo processo oxidativo com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV, no comprimento de onda 254 nm. O radical OH· tem elevado poder de oxidação (E<sub>0</sub>= 2,8 V) e pode oxidar a maioria dos compostos orgânicos provocando, em alguns casos, a completa mineralização através de etapas de hidroxilação, desidrogenação e ruptura de ligações químicas.

Os resultados indicam que a taxa de decaimento da concentração de ivermectina é alta e significativa. Nota-se que o tempo de equilíbrio ocorre próximo dos 60 min. Nestas condições os resultados mostraram que a degradação com mais de 90% de IV não é efetiva. Os experimentos realizados na ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou apenas com radiação UV foram realizadas para efeito de comparação e não resultou em degradação significativa da ivermectina, por meio da determinação de peróxido de hidrogênio residual, verificou-se que não houve consumo do agente oxidante na condição avaliada. O emprego do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como agente de desinfecção de água, quando ocorre de forma isolada, mostra-se ineficiente quando aplicado em processos de degradação de substâncias orgânicas. Observa-se uma elevada porcentagem de degradação ou modificação das moléculas de ivermectina (70%) com 60 minutos de irradiação e, a partir deste intervalo, a taxa de degradação manteve-se constante até o tempo de 2 horas e 30 min. Havlíková *et al.*, (2016) utilizaram o processo fotocatalítico para avaliar a degradação de IV em solução aquosa. Para efeito de comparação, os autores realizaram experimentos com 2 g/L de TiO<sub>2</sub> e obtiveram degradação de 90% após 5 horas de irradiação com lâmpada UV de 366 nm, para uma dose inicial de 10 mg/L de IV.



*Figura 6.2:* Degradação de 30 mg/L de ivermectina usando concentração 4,0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e pH=9

### 6.3.1. Efeito das variáveis $H_2O_2$ , tempo e pH na degradação de ivermectina

A matriz experimental do planejamento Box-Behnken e os resultados estão apresentados na Tabela (6.2), onde estão relacionados a distribuição das variáveis codificadas, numéricas, absorção máxima em 245 nm, percentual de degradação experimental e teórica dos ensaios realizados.

Tabela 6.2: Matriz Box-Behnken para a degradação de 30 mg/L de Ivermectina

Experimento	Variáveis								
	Codificadas			Numéricas			Degradação (%)		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Absorção	Experimental	Teórica
1	-1	-1	0	4	30	7	0,231	74,94372	74,94372
2	1	-1	0	7	30	7	0,196	77,97403	77,97403
3	-1	1	0	4	90	7	0,226	75,37662	75,37662
4	1	1	0	7	90	7	0,27	71,56710	71,56710
5	-1	0	-1	4	60	5	0,794	26,19913	26,19913
6	1	0	-1	7	60	5	0,389	61,26407	61,26407
7	-1	0	1	4	60	9	0,278	70,87446	70,87446
8	1	0	1	7	60	9	0,344	65,16017	65,16017
9	0	-1	-1	5,5	30	5	0,867	19,87879	19,87879
10	0	1	-1	5,5	90	5	0,783	27,15152	27,15152
15	0	-1	1	5,5	30	9	0,306	68,45022	68,45022
12	0	1	1	5,5	90	9	0,252	73,12554	73,12554
13	0	0	0	5,5	60	7	0,728	31,91342	30,28283
14	0	0	0	5,5	60	7	0,677	36,32900	30,28283
15	0	0	0	5,5	60	7	0,725	32,17316	30,28283
16	0	0	0	5,5	60	7	0,761	29,05628	30,28283
17	0	0	0	5,5	60	7	0,792	26,37229	30,28283
18	0	0	0	5,5	60	7	0,798	25,85281	30,28283

Analisando visualmente as superfícies de resposta observa-se condições distintas, quando se fixa o ponto médio de uma variável (Figura 6.3):

(A): Quando a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  é fixada em 5,5 mM a degradação máxima ocorre em  $\text{pH} > 7,5$  adotando-se um tempo superior a 80 minutos;

(B): Em relação a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nota-se que para valores de  $\text{pH}$  básico ocorre duas regiões de máximo: adotando concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  entre 3,5-5,0 ou 6,5-7,5 mM;

(C): Nota-se que a região de máximo é atingida quando se tem valores de  $\text{pH} > 8$  e a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  é 5,5 mM para tempos entre 20-40 min ou 70-100 min de exposição no reator de degradação.

É de se esperar que a baixa degradação de ivermectina, em  $\text{pH}$  ácido, seja negligenciada. Uma vez que a fotodegradação de compostos orgânicos, utilizando o processo oxidativo avançado  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ , necessita de um meio básico para que as etapas de hidroxilação, desidrogenação e ruptura de ligações químicas sejam favorecidas.

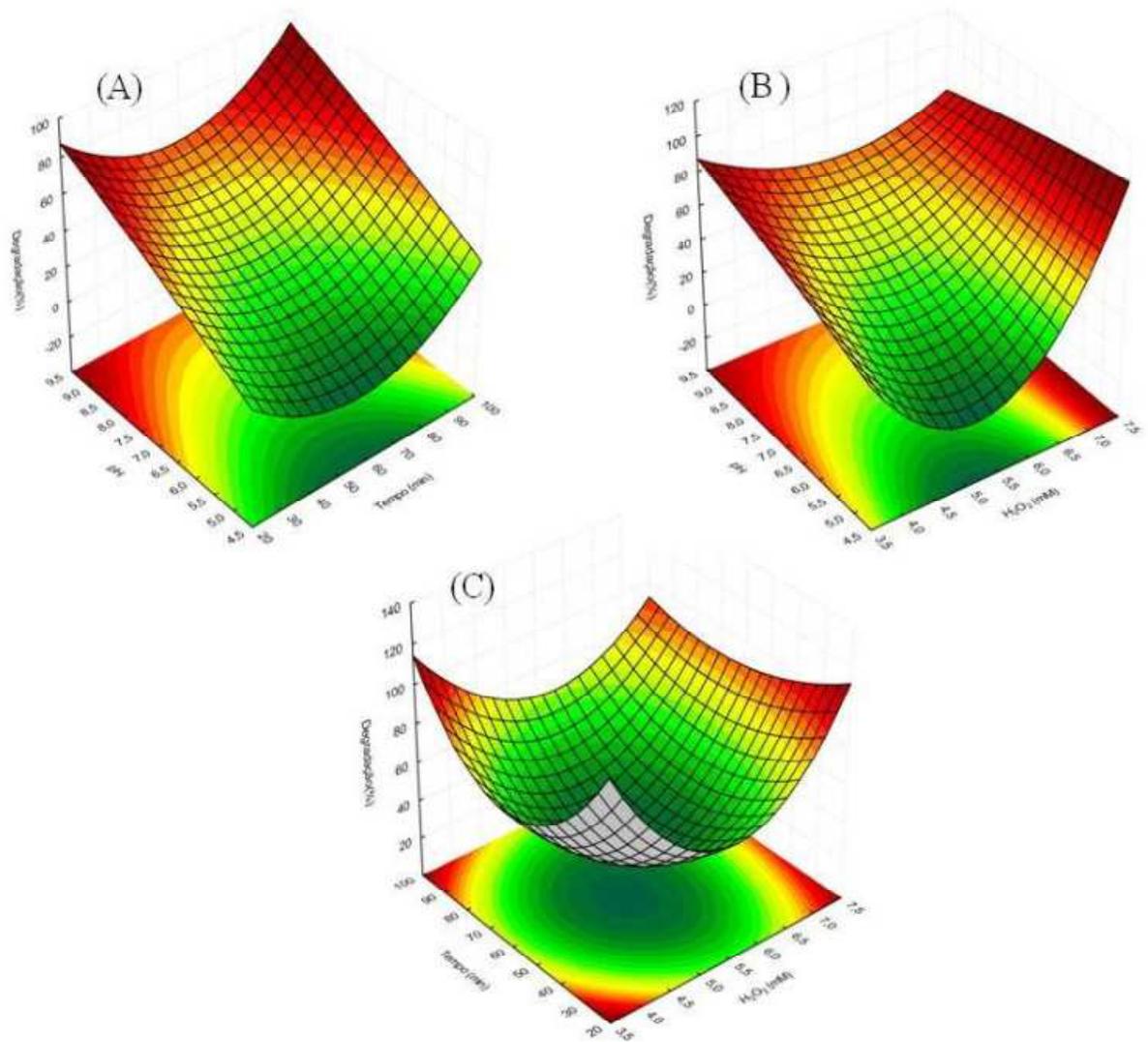


Figura 6.3: Curva de distribuição de superfície plotado em função do ponto central de  $H_2O_2$ .

ANOVA é uma técnica analítica utilizado para identificar a importância do modelo e seus parâmetros fazendo uso do teste-F de Fisher e teste-t de Student. O teste-t de Student foi utilizado para determinar a significância dos coeficientes (Fatores) de regressão usando o valor-p. De forma geral, valores de valor-F muito grandes e valor-p muito pequeno indicam os termos mais significativos de um modelo (Tabela 6.3).

Tabela 6.3: Análise de variância (ANOVA) após o planejamento Box-Behnken para a variável resposta degradação de Ivermectina. Os valores destacados em vermelhos são significativos, enquanto os destacados em preto são não significativos

Fatores	Soma dos quadrados (SQ)	Graus de liberdade	Média quadrática	F-valor	P-valor
X <sub>1</sub>	38,620	1	38,620	2,4378	0,179194
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	3111,432	1	3111,432	196,4036	0,000033
X <sub>2</sub>	0,000	1	0,000	0,0000	1,000000
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1410,646	1	1410,646	89,0445	0,000226
X <sub>3</sub>	1837,220	1	1837,220	115,9713	0,000120
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	5,387	1	5,387	0,3401	0,585106
X <sub>1</sub> x X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	11,696	1	11,696	0,7383	0,429473
X <sub>1</sub> <sup>2</sup> x X <sub>3</sub>	113,476	1	113,476	7,1630	0,044011
X <sub>1</sub> <sup>2</sup> x X <sub>3</sub>	40,150	1	40,150	2,5344	0,172265
X <sub>1</sub> x X <sub>3</sub>	415,736	1	415,736	26,2426	0,003699
X <sub>1</sub> <sup>2</sup> x X <sub>3</sub>	264,201	1	264,201	16,6772	0,009505
X <sub>2</sub> x X <sub>3</sub>	1,687	1	1,687	0,1065	0,757420
Erro	79,210	5	15,842		
Total SQ	8586,904	17			

R<sup>2</sup>= 0,99078; Ajuste R<sup>2</sup>= 0,96864

O modelo matemático empírico, codificado e de 2º ordem, encontrados, com os seus respectivos coeficientes estatísticos para a degradação de ivermectina (DIV) pode ser representado pela equação abaixo. Esse modelo foi obtido a partir da regressão do modelo quadrático a partir dos dados experimentais.

$$\text{DIV (\%)} = 431,91 - 125,40 * X_1 - 2,15 * X_2 + 11,82 * X_1^2 - 0,04 * X_1 * X_2 + 0,02 * X_2^2$$

O resultado da análise de variância (ANOVA) para a resposta DIV está apresentado na Tabela 15 onde é observado o coeficiente de determinação R<sup>2</sup>= 99%. Isto indica que a variação da resposta pode ser explicada pelo modelo. O percentual de

degradação de ivermectina variou de 25,85% a 77,97%. Os efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) estão destacados em vermelho, sugerindo que a concentração de  $H_2O_2$  e o pH do meio influenciaram fortemente o DIV.

### 6.3.2. Espectrometria de massa

A ivermectina é composta por dois compostos homologas, sendo o 5-O-dimetil-22,23-di-hidroavermectina o principal componente (80%) ( $C_{48}H_{74}O_{14}$  = 875,1 g/mol) e 5-O-dimetil-25-(1-metilpropil)-22,23-di- hidroavermectina -25-(1-metil-etil) a ivermectina como componente secundário (20%) ( $C_{47}H_{72}O_{14}$  = 861,7 g/mol). O espectro de massa de uma amostra padrão mostra um pico em 897 m/z correspondente a fórmula molecular  $C_{48}H_{74}O_{14}Na$  e 913 m/z correspondente  $C_{48}H_{74}O_{14}K$ .

Observando a Tabela (6.2) o maior percentual de degradação de ivermectina foi referente ao segundo experimento realizado. Para detectar os íons dos fragmentos gerados na degradação por  $H_2O_2/UV$  a amostra foi filtrada em membrana com tamanho de poro 0,45  $\mu m$ . Em seguida foi realizada a infusão de 500  $\mu L$  (10  $\mu L/min$ ) em um Espectrômetro de massa (LCQ Fleet-Thermo Scietific) no modo positivo com uma variação de 200 a 1100 m/z. Foram identificados quatro picos principais: 913,42 m/z  $[M + K]^+$ ; 897,38 m/z  $[M + Na]^+$ ; são os dois íons filhos que formam a ivermectina. Foi identificado outros dois picos: um em 753,33 m/z e 609,27 m/z os quais correspondem aos fragmentos I e II, respectivamente (Figura 6.4).

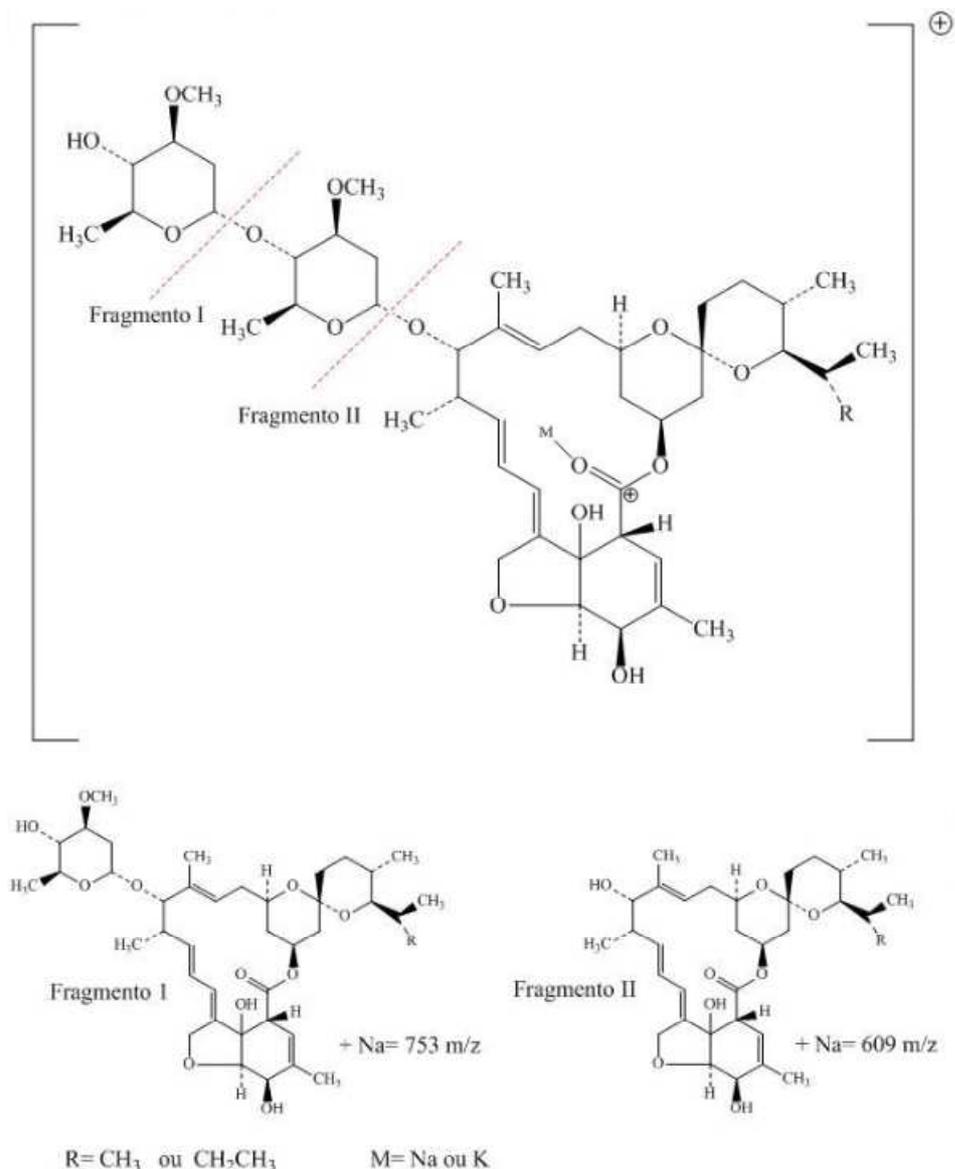


Figura 6.4: Fragmentos de ivermectina encontrados por espectrometria de massa na condição 02 do planejamento Box-Behnken

O íon resultante da fragmentação I em 183 m/z ( $C_7H_{12}O_{14}Na$ ) não foi identificado devido a janela de varredura do espectro de massa. No entanto, o íon resultante da fragmentação II, em 329 m/z ( $C_{14}H_{26}O_7Na$ ), foi identificado e o íon em 897 m/z ( $C_{48}H_{74}O_{14}Na$ ) e 913 m/z ( $C_{48}H_{74}O_{14}K$ ). A presença destes dois últimos íons indica a não total fotodegradação de ivermectina na amostra 02 do planejamento Box-Behnken. Todavia, a otimização da fotodegradação de uma amostra de ivermectina concentrada

indicou que os principais fatores a serem levados em conta é a concentração de  $H_2O_2$  e pH.

#### **6.4. Conclusão**

Os resultados apresentados indicam que o tratamento  $H_2O_2/UV$  utilizado pode reduzir a concentração de ivermectina, gerando três fragmentos, como indicado pelos resultados de Espectrometria de Massa. Os experimentos de degradação de Ivermectina utilizando o processo oxidativo avançado  $H_2O_2/UV$  em meio aquoso atingiu um percentual de remoção próximo a 80%. O planejamento estatístico Box-Behnken indica que a redução da concentração de  $30\text{ mg L}^{-1}$  depende principalmente da interação entre a variável  $H_2O_2$  e  $pH > 7,5$ . Os principais fragmentos encontrados por espectrometria de massas foram 897, 753 e 609 m/z. Os próximos passos deste trabalho é adaptar/validar esta metodologia para a quantificação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa bem como, avaliar a toxicidade de ivermectina após os ensaios de fotodegradação

## 6.5. Referências bibliográficas

- Cooper, E. R., Siewicki, T. C., & Phillips, K. (2008). Preliminary risk assessment database and risk ranking of pharmaceuticals in the environment. *Science of the Total Environment*, 398(1-3), 26–33.
- Daughton, C. G. (2016). Pharmaceuticals and the Environment (PiE): Evolution and impact of the published literature revealed by bibliometric analysis. *Science of The Total Environment*, 562, 391–426.
- Fick, J., Lindberg, R. H., Tysklind, M., & Larsson, D. G. J. (2010). Predicted critical environmental concentrations for 500 pharmaceuticals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 58(3), 516–523.
- Halley, B. A., VandenHeuvel, W. J. A., & Wislocki, P. G. (1993). Environmental effects of the usage of avermectins in livestock. *Veterinary Parasitology*, 48(1-4), 109–125.
- Havlíková, L., Šatínský, D., & Solich, P. (2016). Aspects of decontamination of ivermectin and praziquantel from environmental waters using advanced oxidation technology. *Chemosphere*, 144, 21–28.
- Iglesias, L. E., Saumell, C. A., Fernández, A. S., Fusé, L. A., Lifschitz, A. L., Rodríguez, E. M., Fiel, C. A. (2006). Environmental impact of ivermectin excreted by cattle treated in autumn on dung fauna and degradation of faeces on pasture. *Parasitology Research*, 100(1), 93–102.
- Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., & Buxton, H. T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental Science and Technology*, 36(6), 1202–1211.
- Liebig, M., Fernandez, Ivarro Alonso, Blöbaum-Gronau, E., Boxall, A., Brinke, M., Carbonell, G., ... Duisy, K. (2010). Environmental risk assessment of ivermectin: A case study. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 6(SUPPL. 1), 567–587.
- Löffler, D., Römbke, J., Meller, M., & Ternes, T. A. (2005). Environmental fate of pharmaceuticals in water/sediment systems. *Environmental Science and Technology*, 39(14), 5209–5218.
- Nessel, R. J., Hallace, D. H., & Mehner, T. A. (1989). Environmental Fate of Ivermectin in a Cattle Feedlot. *Chemosphere*, 18(7-8), 1531–1541.

- Richards, S. M., Wilson, C. J., Johnson, D. J., Castle, D. M., Lam, M., Mabury, S. a, ... Solomon, K. R. (2004). Effects of pharmaceutical mixtures in aquatic microcosms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(4), 1035–1042.
- Sanderson, H., Johnson, D. J., Wilson, C. J., Brain, R. A., & Solomon, K. R. (2003). Probabilistic hazard assessment of environmentally occurring pharmaceuticals toxicity to fish, daphnids and algae by ECOSAR screening. *Toxicology Letters*, 144(3), 383–395.
- Sanderson, H., Laird, B., Pope, L., Brain, R., Wilson, C., Johnson, D., ... Solomon, K. (2007). Assessment of the environmental fate and effects of ivermectin in aquatic mesocosms. *Aquatic Toxicology*, 85(4), 229–240.
- Tolls, J. (2001). Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A review. *Environmental Science and Technology*.
- Woodward, K. N. (2009). *Veterinary Pharmacovigilance: Adverse Reactions to Veterinary Medicinal Products*. (K. N. Woodward, Ed.).