PATRÍCIA METOLINA

**Degradação do Antibiótico Bacitracina Zíncica em Meio Aquoso através de
Processos Oxidativos Avançados**

São Paulo

2018

PATRÍCIA METOLINA

**Degradação do Antibiótico Bacitracina Zíncica em Meio Aquoso através de
Processos Oxidativos Avançados**

Dissertação apresentada à Escola Politécnica
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências

São Paulo

2018

PATRÍCIA METOLINA

**Degradação do Antibiótico Bacitracina Zíncica em Meio Aquoso através de
Processos Oxidativos Avançados**

Dissertação apresentada à Escola Politécnica
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração:
Engenharia Química

Orientador:
Prof. Dr. Antonio Carlos Silva Costa Teixeira

São Paulo

2018

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do autor: _____

Assinatura do orientador: _____

Catálogo-na-publicação

Metolina, Patrícia

DEGRADAÇÃO DO ANTIBIÓTICO BACITRACINA ZÍNCICA EM MEIO
AQUOSO ATRAVÉS DE PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS / P.

Metolina -- versão corr. -- São Paulo, 2018.

197 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São
Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1.Antibiótico bacitracina zíncica 2.Resistência Bacteriana 3.Processo
UV/H2O2 4.Processos Oxidativos Avançados 5.Modelagem Cinética
I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de
Engenharia Química II.t.

A todos aqueles que trabalham para
salvar o meio ambiente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, minha fonte de fé, por me ajudar a concretizar mais uma fase de aprendizado, logo após o segundo título de bacharel. Agradeço por dar-me forças para superar todas as dificuldades.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Carlos Silva Costa Teixeira, pela oportunidade da pesquisa, orientação e ensinamentos. A dedicação, a competência e a qualidade em que exerce suas atividades acadêmicas e de pesquisa revela uma vocação extremamente admirável e inspiradora.

Ao Prof. Dr. Felipe Lourenço Rebello por me receber em seu laboratório na Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP. Agradeço pelo apoio, ensinamentos e amizade para a condução dos ensaios biológicos. A Profa. Dra. Sueli Ivone Borrelly do IPEN – USP pelas importantes instruções nos ensaios de toxicidade.

Aos professores Dr. Roberto Guardani e Dr. Reinaldo Giudici, pelas valiosas contribuições ao meu trabalho. As sugestões e discussões realizadas durante a qualificação melhoraram consideravelmente a qualidade dos meus resultados.

A todos os professores do Departamento de Engenharia Química da Poli – USP, que contribuíram com conhecimentos importantes para o meu aprendizado na pós-graduação, os quais também foram utilizados na minha pesquisa.

A todos os membros do Grupo AdOx, Adriana, Ana Paula, Arlen, Bruna, Bruno, Cátia, Fabiane, Leandro, Leonardo, Marcelo, Paula e Priscila, pela ajuda no laboratório, nos manuseios de equipamentos, na troca de ideias e, enfim, na amizade de todos. Agradeço especialmente a Arlen, Adriana e Priscila, por compartilharmos as emoções e as inteligências múltiplas que precisamos desenvolver no laboratório; e ao Bruno e Leandro, pelos apoios e incentivos. Todos colaboraram muito para as minhas atividades do mestrado.

Aos funcionários técnicos Joel, Paulo e Rodrigo, pela assistência nas pesquisas no laboratório e amizade. E aos funcionários administrativos Alexandre, Elisete e Graça, pelos auxílios nas questões burocráticas.

Aos meus humildes pais e aos meus quatro irmãos, pelo amor incondicional e, especialmente, minha irmã médica Dra. Cristiane. Apesar de eu não seguir muito os seus passos de destaque em excelência acadêmica e profissional, sempre me incentivou a estudar muito.

Ao grande amor da minha vida Alexandre, por poder compartilhar todos os momentos. Agradeço imensamente por estar sempre ao meu lado e me iluminar nas horas mais difíceis. Aos meus sogros e aos meus cunhados pelo carinho e compreensão, apesar de acharem que eu vivo em outro mundo ao cursar essa pós-graduação. Aos meus amigos que adquiri ao longo da vida, pelo apoio moral e aos quais eu devo muitos encontros por conta do tempo só dedicado ao mestrado.

À indústria farmacêutica Takeda que motivou o tema da minha pesquisa. Agradeço pelo apoio técnico, pela atenção e valorização do meu trabalho.

Ao suporte financeiro proporcionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Coordenadoria de Pessoal de Nível Superior (CAPES) durante o período do mestrado.

“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe.”

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

A presença de antibióticos no ecossistema representa um sério risco à saúde humana e animal em virtude do desenvolvimento crescente de resistência bacteriana. Uma vez que a maioria dos antibióticos é persistente à degradação biológica, os processos oxidativos avançados são apontados como uma das tecnologias mais efetivas para decompor esses compostos em águas residuárias. A bacitracina zíncica (Bc-Zn) é um potente antibiótico constituído por uma mistura complexa de peptídeos não-biodegradáveis, conjugados ao zinco. Apesar de ser um antibiótico amplamente consumido na medicina humana e animal, é preocupante a escassez de estudos que investigam sua degradação e destino ambiental. O presente trabalho analisou a degradação da Bc-Zn através dos processos de fotólise direta e UV/H₂O₂ em diferentes condições de radiação UVC e concentração inicial de H₂O₂. Os parâmetros cinéticos rendimento quântico da fotólise, constantes cinéticas de pseudo-primeira ordem e constante cinéticas de segunda ordem foram satisfatoriamente estimados pela modelagem do sistema fotoquímico experimental. Os resultados revelaram que a fotólise direta permitiu degradar todos os congêneres da mistura de Bc-Zn nas maiores doses de radiação UVC empregadas. No entanto, não houve remoção de TOC após 120 minutos de irradiação. A adição de H₂O₂ acelerou substancialmente a fotodegradação do antibiótico, apresentando constantes cinéticas de pseudo-primeira ordem uma ordem de grandeza superiores às obtidas por fotólise direta. Além disso, remoção considerável de até 71% do TOC foi alcançada. A análise estatística demonstrou que a radiação UV foi um fator bem mais significativo para a fotodegradação da Bc-Zn em relação à concentração inicial de H₂O₂, sendo as melhores condições do processo alcançadas para a maior taxa específica de emissão de fótons ($1,11 \times 10^{-5}$ Einstein L⁻¹ s⁻¹). Ensaio biológicos com soluções tratadas por fotólise direta e UV/H₂O₂ indicaram remoção completa da atividade antimicrobiana residual, ainda que os produtos da fotodegradação tenham se mostrado não-biodegradáveis. Análises de toxicidade indicaram que o metal zinco presente no antibiótico é responsável pela a toxicidade no micro-organismo-teste *Vibrio fischeri*. Estudos adicionais devem ser realizados para identificar os sub-produtos formados, bem como para investigar a degradação da Bc-Zn em efluentes industriais reais.

Palavras-chave: Peptídeos não ribossomais (NRP). Antibiótico bacitracina zíncica. Processos oxidativos avançados (POA). Fotólise direta. Processo UV/H₂O₂. Tratamento de efluentes. Resistência bacteriana. Atividade antimicrobiana. Modelagem Cinética.

ABSTRACT

The presence of antibiotics in ecosystems represents a serious risk to human and animal health, caused by the increase in bacterial resistance. Since most antibiotics resist to biological degradation, advanced oxidation processes are pointed out as the most effective technologies for degrading these compounds in wastewater. Zinc bacitracin (Bc-Zn) is a potent antibiotic with a complex mixture of non-biodegradable peptides conjugated to zinc. Despite being a widely used antibiotic in human and animal medicine, the scarcity of studies dealing with its degradation and environmental fate is a matter of concern. In this work, Bc-Zn degradation by direct photolysis and the UV/H₂O₂ process was investigated for different UVC radiation conditions and initial H₂O₂ concentrations. Kinetic parameters, namely the photolysis quantum yield, pseudo-first order kinetic constants and second-order kinetic constants, were satisfactorily estimated from experimental data by modeling the photochemical system. The results showed that all the congeners of the Bc-Zn mixture were photolyzed at the highest UVC doses applied, while no TOC removal was observed after 120 minutes of irradiation. The addition of H₂O₂ substantially accelerated Bc-Zn photodegradation, with pseudo-first order kinetic constants of one order of magnitude higher than those observed under direct photolysis. In addition, a remarkable removal of up to 71% of TOC was achieved. Statistical analyses showed that UV radiation had a much more important effect on Bc-Zn photodegradation in comparison with initial H₂O₂ concentration, with the best process conditions achieved for the highest specific photon emission rate (1.11×10^{-5} Einstein L⁻¹ s⁻¹). Biological assays carried out with the solutions treated by direct photolysis and UV/H₂O₂ revealed no residual antimicrobial activity, though photodegradation products remained non-biodegradable. In addition, toxicity analyses indicated that the zinc metal present in the antibiotic is responsible for the toxic effect on the test microorganism *Vibrio fischeri*. Finally, further studies should be performed to identify the by-products formed and to investigate Bc-Zn degradation in real industrial wastewater.

Keywords: Nonribosomal peptides (NRP). Antibiotic zinc bacitracin. Advanced oxidation processes (AOP). Direct photolysis. UV/H₂O₂ process. Wastewater treatment. Antibiotic resistance. Antibacterial activity. Kinetic modeling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fontes e rotas de ocorrência de antibióticos no meio ambiente.	31
Figura 2 – Antibióticos detectados em amostras aquosas de rios em diferentes países.	32
Figura 3 – Proporção de POA estudados nas últimas décadas para a degradação e antibióticos.....	47
Figura 4 – Estrutura química e peptídica da bacitracina A e F.	69
Figura 5 – Estrutura e composição do antibiótico bacitracina. a) Estrutura de alguns congêneres da mistura de bacitracina. b) Principais vias oxidativas entre os congêneres da mistura de bacitracina. ..	70
Figura 6 – Esquema do processo de tratamento de efluente industrial contendo a bacitracina zínica.	74
Figura 7 – Aparato experimental utilizado para os experimentos de degradação da Bc-Zn.	77
Figura 8 – Diagrama simplificado do equipamento experimental.	78
Figura 9 – Espectro de emissão da lâmpada de vapor mercúrio de baixa pressão (75 W) medido com um espectrorradiômetro (Luzchem, SPR-4002). O inserto apresenta a ampliação do espectro entre 280 e 600 nm.....	79
Figura 10 – Matriz de Doehlert para dois fatores.....	80
Figura 11 – Cromatograma da bacitracina zínica em HPLC. a) Cromatograma típico da Bc-Zn obtido na literatura. b) Cromatograma da Bc-Zn obtido no presente estudo.....	83
Figura 12 – Sistema do Oxtop para medição de DBO ₅ por respirometria.	86
Figura 13 – Equipamento de Microtox para avaliação de toxicidade da <i>V. fischeri</i>	88
Figura 14 – Ensaio microbiológico para avaliação da atividade antibacteriana. Cultura de <i>S. aureus</i> em placas de Petri (à esquerda). Cultura de <i>S. aureus</i> em TSB (meio). Ensaio biológico em microplaca (à direita).	90
Figura 15 – Sistema fotoquímico modelo com recirculação.	92
Figura 16 – Curva de calibração para Fe ²⁺ e curvas das actinometrias em diferentes potências radiantes UVC.	100
Figura 17 – Espectros de absorção de soluções de Bc-Zn em diferentes concentrações. O inserto representa uma ampliação para o pico de absorção máxima em 254 nm.	101
Figura 18 – Ajuste linear da absorbância em 254 nm em função da concentração de Bc-Zn.....	102
Figura 19 – Espectro de absorção de soluções de Bc-Zn (100 mg L ⁻¹) em diferentes pH.	103
Figura 20 – Cargas apresentadas pela molécula da bacitracina A.....	104
Figura 21 – Especificação das macroespécies da Bc-Zn A em função do pH.	104
Figura 22 – Concentrações da soma das Bc-Zn A, B1, B2, B3 e F em relação ao tempo.	105
Figura 23 – Comparação entre o cromatograma da bacitracina (VETRANAL) e bacitracina zínica (grau técnico).	105
Figura 24 – Concentrações da soma das Bc-Zn A, B1, B2, B3 e F em relação ao tempo. A legenda apresenta os valores nominais das concentrações iniciais da mistura Bc-Zn.	106

Figura 25 – Concentrações da soma das Bc A, B1, B2, B3 e F em relação ao tempo. A legenda apresenta os valores nominais das concentrações iniciais da mistura Bc.	107
Figura 26 – Cromatogramas antes e após 14 dias da Bc e da Bc-Zn em pH 9.....	108
Figura 27 – Fotodegradação dos principais constituintes da mistura de Bc-Zn em função do tempo para 4,1 W UVC ($2,18 \times 10^{-6}$ Einstein $L^{-1} s^{-1}$).	110
Figura 28 – Fotodegradação dos principais constituintes da mistura de Bc-Zn em função do tempo para 11,3 W UVC ($6,01 \times 10^{-6}$ Einstein $L^{-1} s^{-1}$).	110
Figura 29 – Fotodegradação dos principais constituintes da mistura de Bc-Zn em função do tempo para 20,8 W UVC ($1,11 \times 10^{-5}$ Einstein $L^{-1} s^{-1}$).	111
Figura 30 – Absorbância em função do tempo de espécies com absorbância em 330 nm.....	113
Figura 31 – Evolução do pH com o tempo das diferentes condições de fotólise.....	113
Figura 32 – Evolução do TOC com o tempo para os experimentos de degradação da Bc-Zn por meio do processo UV/H ₂ O ₂	114
Figura 33 – Espectros de absorção da solução em diferentes tempos para o experimento de fotólise direta em 4,1 W UVC ($2,18 \times 10^{-6}$ Einstein $L^{-1} s^{-1}$).	115
Figura 34 – Espectros de absorção da solução em diferentes tempos para o experimento de fotólise direta em 11,3 W UVC ($6,01 \times 10^{-6}$ Einstein $L^{-1} s^{-1}$).	115
Figura 35 – Espectros de absorção da solução em diferentes tempos para o experimento de fotólise direta em 20,8 W UVC ($1,11 \times 10^{-5}$ Einstein $L^{-1} s^{-1}$). O inserto representa a curva de absorção em função do tempo no comprimento de onda de 254 nm.	116
Figura 36 – Dados experimentais e curvas preditas das concentrações normalizadas de Bc-Zn em função do tempo.....	117
Figura 37 – Evolução com o tempo da concentração total das Bc-Zn A, B2, B2, B3 e F do processo UV/H ₂ O ₂ em diferentes condições experimentais. O primeiro perfil mostra a degradação dos principais constituintes da Bc-Zn de todas as sete condições experimentais planejadas pela matriz de Doehlert. Os outros perfis destacam as condições indicados pela área sombreada na matriz de Doehlert. As barras representam o desvio-padrão de cada um dos dados experimentais.	120
Figura 38 – Absorbância em função do tempo durante o processo UV/H ₂ O ₂ . Condições experimentais: [Bc-Zn] ₀ = 50 mg L^{-1} , [H ₂ O ₂] ₀ = 14,27 mmol L^{-1} e $E_{p,0}$ = $1,11 \times 10^{-5}$ Einstein $L^{-1} s^{-1}$. A legenda 0' minutos indica a absorbância da mistura aquosa antes da adição de H ₂ O ₂ em 0 minutos. O inserto representa a absorbância em função do tempo em 254nm.	122
Figura 39 – Evolução do TOC em função do tempo para os experimentos de degradação da Bc-Zn por meio do processo UV/H ₂ O ₂ e fotólise direta. O primeiro perfil mostra os valores médios de TOC de todas as sete condições experimentais planejadas pela matriz de Doehlert. Os outros perfis destacam as condições indicados pela área sombreada na matriz de Doehlert. As barras representam o desvio-padrão do experimento 7, realizado em triplicata.	123

Figura 40 – Concentração de H_2O_2 residual durante os experimentos de degradação da Bc-Zn por meio do processo UV/ H_2O_2 . Os dados representam a média da concentração de H_2O_2 residual de experimentos em duplicata.	124
Figura 41 – Evolução do pH durante os experimentos de degradação da Bc-Zn por meio do processo UV/ H_2O_2	125
Figura 42 – Resultados dos ajustes realizado em MATLAB para determinação das constantes cinéticas de segunda ordem para degradação de Bc-Zn pelo processo UV/ H_2O_2 em diferentes condições experimentais.	129
Figura 43 – Diagrama de Pareto para a resposta Y_1 (k_{total}).	132
Figura 44 – Superfície de resposta para Y_1 (k_{total}).....	133
Figura 45 – Gráfico de contorno correspondente à superfície de resposta para a variável Y_1	134
Figura 46 – Diagrama de Pareto para a resposta Y_2 (% de redução de Bc-Zn após 1 minuto).	135
Figura 47 – Superfície de resposta para Y_2 (% de degradação da Bc-Zn após 1 minuto).	136
Figura 48 – Gráfico de contorno correspondente à superfície de resposta para a variável Y_2	136
Figura 49 – Diagrama de Pareto para análise da resposta Y_3 (% de remoção de TOC).....	137
Figura 50 – Superfície de resposta para Y_3 (% de remoção de TOC após 120 minutos).....	138
Figura 51 – Gráfico de contorno correspondente à superfície de resposta para a variável Y_3	138
Figura 52 – Diagrama de Pareto para a resposta $Y_{1,total}$ (k_{total}).	141
Figura 53 – Superfície de resposta para $Y_{1,total}$ (k_{total}).	141
Figura 54 – Gráfico de contorno correspondente à superfície de resposta para a variável $Y_{1,total}$	142
Figura 55 – Diagrama de Pareto para a resposta $Y_{2,total}$ (% de degradação de Bc-Zn após 1 minuto).	143
Figura 56 – Superfície de resposta para $Y_{2,total}$ (% de redução de Bc-Zn após 1 minuto).....	144
Figura 57 – Gráfico de contorno correspondente à superfície de resposta para a variável $Y_{2,total}$	144
Figura 58 – Diagrama de Pareto para a resposta $Y_{3,total}$ (% de remoção de TOC).	145
Figura 59 – Superfície de resposta para $Y_{3,total}$ (% de remoção de TOC).	146
Figura 60 – Gráfico de contorno correspondente à superfície de resposta para a variável $Y_{3,total}$	146
Figura 61 – Evolução com o tempo da concentração da Bc-Zn para taxa específica de emissão de fótons de $11,1 \times 10^{-6}$ Einstein $\text{L}^{-1} \text{s}^{-1}$	148
Figura 62 – Evolução do TOC com o tempo para os experimentos de degradação da Bc-Zn realizados com taxa específica de emissão de fótons de $11,1 \times 10^{-6}$ Einstein $\text{L}^{-1} \text{s}^{-1}$	148
Figura 63 – Evolução da concentração de H_2O_2 residual com o tempo para os experimentos de degradação da Bc-Zn realizados com taxa específica de emissão de fótons de $11,1 \times 10^{-6}$ Einstein $\text{L}^{-1} \text{s}^{-1}$	149
Figura 64 – Evolução do pH com o tempo para os experimentos de degradação da Bc-Zn realizados com taxa específica de emissão de fótons de $11,1 \times 10^{-6}$ Einstein $\text{L}^{-1} \text{s}^{-1}$	149

Figura 65 – Análise de DBO durante o tempo de 5 dias para solução de Bc-Zn. Dados realizados em triplicatas e as barras indicam o desvio-padrão. A ausência das barras indica desvios bastante pequenos.	150
Figura 66 – Análise de DBO durante o tempo de 5 dias. Medidas realizadas em triplicata. As barras indicam o desvio-padrão.	151
Figura 67 – Análise de DBO durante o tempo de 5 dias. Medidas realizadas em duplicata e triplicata. As barras indicam o desvio-padrão.	152
Figura 68 – Análise de DBO durante o tempo de 5 dias. Medidas realizadas em triplicata. As barras indicam o desvio-padrão.	153
Figura 69 – Análise de DBO durante o tempo de 5 dias. Medidas realizadas em triplicata. As barras indicam o desvio-padrão.	153
Figura 70 – Resultados do ensaio de toxicidade com <i>V. fischeri</i> . Ensaio realizado em duplicata e triplicata. As barras indicam o desvio-padrão.	154
Figura 71 – Inibição do crescimento da <i>S. aureus</i> em função da concentração Bc-Zn.	156
Figura 72 – Remoção porcentual da atividade antimicrobiana em diferentes experimentos.	157
Figura 73 – Remoção da atividade antimicrobiana em função do tempo de tratamento para a condição experimental 8.	158

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos antibióticos segundo o mecanismo de ação.	28
Tabela 2 – Dados de toxicidade de alguns antibióticos.....	37
Tabela 3 – Remoção de antibióticos através de processos oxidativos avançados (POA).	48
Tabela 4 – Reações envolvidas no processo UV/H ₂ O ₂ . Os parâmetros indicados por Φ e k_R representam, respectivamente, o rendimento quântico e as constantes de segunda ordem da reação considerada. ...	60
Tabela 5 – Valores do coeficiente de absorção molar e do rendimento quântico do H ₂ O ₂	61
Tabela 6 – Características do antibiótico bacitracina.	65
Tabela 7 – Solubilidade da bacitracina e da bacitracina zínica em diferentes solventes.	65
Tabela 8 – Planejamento experimental pela matriz de Doehlert (experimentos realizados em triplicata).	81
Tabela 9 – Fator de escala, segundo volumes e DBO esperado.	87
Tabela 10 – Etapas reacionais envolvidas na degradação da Bc-Zn através do processo UV/H ₂ O ₂	96
Tabela 11 – Taxas específicas de emissão de fótons em 254 nm obtidas por actinometria de ferrioxalato e potências radiantes correspondentes para diferentes condições experimentais planejadas.	99
Tabela 12 – Coeficientes de absorção molar da bacitracina em 254 nm em diferentes pH.	103
Tabela 13 – Resultados da fotólise da mistura de Bc-Zn em diferentes potências.	114
Tabela 14 – Valores dos parâmetros constantes para o cálculo do rendimento quântico da fotólise direta da bacitracina zínica em solução aquosa com pH 6,5.	117
Tabela 15 – Redução da concentração de H ₂ O ₂ após 120 minutos.	124
Tabela 16 – Resultados das constantes cinéticas de pseudo-primeira ordem para o processo UV/H ₂ O ₂	126
Tabela 17 – Valores das constantes cinéticas de segunda ordem do processo de degradação da Bc-Zn pelo processo UV/H ₂ O ₂	127
Tabela 18 – Valores das variáveis independentes (fatores, X_1 e X_2) e dependentes (respostas, Y_1 , Y_2 e Y_3) para os experimentos de degradação de Bc-Zn por meio do processo UV/H ₂ O ₂ segundo o projeto Doehlert.	131
Tabela 19 – Análise de variância (ANOVA) para a resposta Y_1 (k_{total}).	132
Tabela 20 – Análise de variância (ANOVA) para a resposta Y_2 (% de degradação da Bc-Zn após 1 minuto).	134
Tabela 21 – Análise de variância (ANOVA) para a resposta Y_3 (% de remoção de TOC).	137
Tabela 22 – Valores das variáveis independentes (fatores, X_1 e X_2) e dependentes (respostas Y_1 , Y_2 e Y_3) para os experimentos do projeto Doehlert.....	139
Tabela 23 – Análise de variância (ANOVA) para a resposta $Y_{1, total}$ (k_{total}).	140
Tabela 24 – Análise de variância (ANOVA) para a resposta $Y_{2, total}$ (% de degradação de Bc-Zn após 1 minuto).	142

Tabela 25 – Análise de variância (ANOVA) para a resposta $Y_{3,total}$ (% de remoção de TOC).....	145
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
Ala	Alanina
ANOVA	Análise de variância
AOP	<i>Advanced Oxidation Processes</i>
ARG	<i>Antibiotic-resistant gene</i>
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Bc	Bacitracina
Bc-Zn	Bacitracina zínica
BDD	<i>Boron-doped diamond</i>
CCD	<i>Contercurrent distribution</i>
CE ₅₀	Concentração efetiva para 50% dos organismos
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CIM	Concentração inibitória mínima
CL ₅₀	Concentração letal para 50% dos organismos
COD	Carbono orgânico dissolvido
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
Cond.	Condição
corr.	Corrigido
CSTR	<i>Continuous stirred-tank reactor</i>
Cys	Cisteína
DBO	Demanda biológica de oxigênio
DBO ₅	Demanda biológica de oxigênio após 5 dias
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	<i>European Commission</i>
EDO	Equações diferenciais ordinárias
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EP	<i>European Pharmacopoeia</i>
EPA	Agência de Proteção Ambiental (EUA)
EQSD	<i>Environmental Quality Standards</i>
ETE	Estação de Tratamento de Efluentes
EUA	Estados Unidos da América
Glu	Ácido glutâmico
His	Histidina

HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IC	Carbono inorgânico
Ile	Isoleucina
JP	<i>Japanese Pharmacopoeia</i>
LD	Limite de detecção
Leu	Leucina
LQ	Limite de quantificação
Lys	Lisina
MAR	<i>Multiple antibiotic-resistant</i>
NBR	Norma Brasileira
NRP	<i>Nonribosomal peptides</i>
Orn	Ornitina
PEC	<i>Predicted environmental concentration</i>
PFR	<i>Plug flow reactor</i>
PHA	Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental
Phe	Fenilalanina
PNEC	<i>Predicted non-effect concentration</i>
POA	Processos Oxidativos Avançados
RNA	Ácido ribonucleico
RQ	<i>Risk quotient</i>
SRNOM	<i>Suwannee River Natural Organic Matter</i>
TC	Carbono total
TOC	Carbono orgânico total
TSB	Triptona soja
UE	União Européia
UFC	Unidade de formação de colônias
UI	Unidades Internacionais
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta
Val	Valina
Vis	Visível
WFD	<i>Water Framework Directive</i>
WWTP	<i>Wastewater Treatment Plant</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

a	Termo constante da equação polinomial
Abs	Absorbância
$Abs_{254\text{ nm}}$	Absorbância em 254 nm
b	Coefficiente do termo X_1 da equação polinomial
b'	Coefficiente linear da curva de calibração
C	Concentração
c	Coefficiente do termo X_2 da equação polinomial
C_0	Concentração inicial
$C_{H_2O_2,n}$	Concentração de peróxido de hidrogênio na corrente de saída n
$C_{Bc-Zn,n}$	Concentração da bacitracina zíncica na corrente de saída n
$C_{HO^\bullet,n}$	Concentração de radical de hidroxil na corrente de saída n
$C_{i,0}$	Concentração inicial da espécie i
$C_{i,n}$	Concentração da espécie i na corrente de saída n
C_i	Concentração da espécie i
C_-	Controle negativo
C_+	Controle positivo
d	Coefficiente do termo quadrático X_1^2 da equação polinomial
e	Coefficiente do termo quadrático X_1^2 da equação polinomial
$E_{P,0}$	Taxa de emissão de fótons
f	Coefficiente do termo quadrático X_1X_2 da equação polinomial
f_m	Função de minimização do experimento m
FO	Função objetiva global para cálculos das constantes cinéticas de segunda ordem
fo	Função objetivo para determinação do rendimento quântico
I	Porcentagem de inibição da atividade antimicrobiana
$Ia_{i,\lambda}$	Taxa de radiação absorvida no comprimento de onda λ por uma espécie i por unidade de volume
k'	Constante cinética de pseudo-primeira ordem
k_2	Constante cinética de segunda ordem do H_2O_2 com radical hidroxil
k_3	Constante cinética de segunda ordem do H_2O_2 com radical perhidroxil
k_4	Constante cinética de segunda ordem da reação entre radicais hidroxil
k_5	Constante cinética de segunda ordem da reação entre radicais perhidroxil
k_6	Constante cinética de segunda ordem da reação entre radicais perhidroxil e hidroxil
k_7	Constante cinética de segunda ordem da reação entre a bacitracina zíncica e o radical hidroxil

$k_{fotólise}$	Constante cinética de pseudo-primeira ordem da fotólise da bacitracina zíncica
$k_{oxidativa}$	Constante cinética de pseudo-primeira ordem da parcela oxidativa do processo UV/H ₂ O ₂
k_{Rj}	Constante cinética de segunda ordem da reação j ($j= 1, ...,13$)
k_{total}	Constante de pseudo-primeira ordem total do processo UV/H ₂ O ₂
l	Comprimento do caminho óptico da cubeta espectrofotométrica
l_{reator}	Comprimento do caminho óptico no reator tubular
$r_{H_2O_2,n}$	Reação do peróxido de hidrogênio no tanque n
$r_{BC-Zn,n}$	Reação da bacitracina zíncica no tanque n
r_{UV,H_2O_2}	Reação de fotólise do peróxido de hidrogênio
$r_{UV,BC-Zn}$	Reação de fotólise da bacitracina zíncica
$r_{i,254\text{ nm}}$	Reação da espécie i em 254 nm
$r_{i,\lambda}$	Reação da espécie i no comprimento de onda λ
$r_{i,n}$	Reação da espécie i no fluxo de saída n
r_{lamp}	Raio externo da lâmpada UVC
r_{reator}	Raio interno do reator tubular fotoquímico
R	Radical
R^2	Coeficiente de determinação
Rm	Reação m ($m= 1,...,13$)
RX	Contaminante orgânico
RX^*	Contaminante orgânico excitado
$S_{y/x'}$	Desvio-padrão da intercepção de y da regressão linear
T	Temperatura
t	Tempo
V	Volume
v	Vazão volumétrica
V_R	Volume do reator tubular fotoquímico
V_r	Volume do reator CSTR
V_T	Volume do tanque
X	Aminoácido X
X_1	Variável codificada independente da taxa emissão de fótons
X_2	Variável codificada independente da concentração de H ₂ O ₂
$X_{1,ótimo}$	Variável codificada independente ótima da taxa emissão de fótons
$X_{2,ótimo}$	Variável codificada independente ótima da concentração de H ₂ O ₂
x_i	Variável independente i
x_i'	Variável real i

X_i	Variável codificada independente i
X_i'	Variável codificada real i
x_i^0	Variável independente i no ponto central
Y	Aminoácido Y
Y_1	Variável resposta da constante cinética de pseudo-primeira ordem do processo UV/H ₂ O ₂
Y_2	Variável resposta da porcentagem de degradação da Bc-Zn em 1 minuto do processo UV/H ₂ O ₂
Y_3	Variável resposta da porcentagem da remoção de TOC do processo UV/H ₂ O ₂
$Y_{1,total}$	Variável resposta da constante cinética de pseudo-primeira ordem de todos os experimentos executados no processo UV/H ₂ O ₂
$Y_{2,total}$	Variável resposta da porcentagem de degradação da Bc-Zn em 1 minuto de todos os experimentos executados no processo UV/H ₂ O ₂
$Y_{3,total}$	Variável resposta da porcentagem da remoção de TOC do processo de todos os experimentos executados no processo UV/H ₂ O ₂
Y_i	Variável dependente i ou resposta i

Letras gregas

$\alpha_{254\text{ nm}}$	Coeficiente de absorção em 254 nm
ΔX_i	Intervalo da variável codificada i ($i = 1,2$)
δ	Intervalo de variação do código de cada fator
ε	Coeficiente de absorção molar
$\varepsilon_{Bc-Zn,254\text{ nm}}$	Coeficiente de absorção molar da bacitracina em 254 nm
$\varepsilon_{H_2O_2,254\text{ nm}}$	Coeficiente de absorção molar do H ₂ O ₂ em 254 nm
$\varepsilon_{i,254\text{ nm}}$	Coeficiente de absorção molar da espécie i em 254 nm
λ	Comprimento de onda
Φ	Rendimento quântico
$\Phi_{Bc-Zn,254\text{ nm}}$	Rendimento quântico da fotólise de bacitracina zínica em 254 nm
$\Phi_{\text{Composto orgânico}}$	Rendimento quântico da fotólise do composto orgânico
$\Phi_{H_2O_2}$	Rendimento quântico da fotólise do peróxido de hidrogênio
$\Phi_{H_2O_2,254\text{ nm}}$	Rendimento quântico da fotólise do peróxido de hidrogênio em 254 nm
$\Phi_{i,254\text{ nm}}$	Rendimento quântico da fotólise da espécie i em 254 nm
$\Phi_{i,\lambda}$	Rendimento quântico da fotólise da espécie i no comprimento de onda λ

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	OBJETIVOS.....	25
	2.1 OBJETIVO GERAL	25
	2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	26
	3.1 ANTIBIÓTICOS NO MEIO AMBIENTE	26
	3.1.1 Antibióticos: Características e Portas de Entrada no Meio Ambiente	26
	3.1.2 Resistência Bacteriana a Antibióticos.....	33
	3.1.3 Ecotoxicidade dos Antibióticos	35
	3.2 MEDIDAS DE CONTROLE DE ANTIBIÓTICOS NO MEIO AMBIENTE.....	42
	3.2.1 Legislação	42
	3.2.2 Tecnologias Avançadas para Tratamento de Efluentes contendo Antibióticos	45
	3.2.3 Processos Oxidativos Avançados para Degradação de Antibióticos	46
	3.2.4 Fotólise Direta	57
	3.2.5 Processo UV/H ₂ O ₂	58
	3.3 BACITRACINA	62
	3.3.1 Bacitracina: Peptídeos Não-ribossomais.....	62
	3.3.2 Aplicações e Propriedades da Bacitracina	63
	3.3.3 Características Estruturais da Bacitracina	66
	3.3.4 Bacitracina no Meio Ambiente.....	71
4	MOTIVAÇÃO.....	73
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	75
	5.1 Reagentes	75
	5.2 Equipamentos e Procedimentos Experimentais	76
	5.2.1 Determinação do Coeficiente de Absorção Molar da Bacitracina Zíncica em Solução Aquosa.....	76
	5.2.2 Avaliação da Estabilidade da Solução de Bacitracina	76
	5.2.3 Experimentos de Fotodegradação da Bacitracina Zíncica.....	77
	5.3 Métodos Analíticos.....	82
	5.3.1 Determinação Actinométrica das Taxas de Emissão de Fótons	82
	5.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	82
	5.3.3 Espectrofotometria UV-Vis	84
	5.3.4 Carbono Orgânico Total (TOC).....	84
	5.3.5 Análise da Concentração de Peróxido de Hidrogênio Residual.....	85
	5.3.6 Demanda Bioquímica de Oxigênio.....	85

5.3.7 Ensaio de Toxicidade Aguda	87
5.3.8 Avaliação da Atividade Antimicrobiana	89
5.4 Modelagem Matemática do Sistema Fotoquímico e da Cinética das Reações Fotoquímicas	91
5.4.1 Modelagem do Sistema Fotoquímico em Batelada com Recirculação	91
5.4.2 Determinação do Rendimento Quântico da Fotólise Direta da Bacitracina	93
5.4.3 Modelagem Cinética do Processo UV/H ₂ O ₂	95
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
6.1 Caracterização das Condições Fotoquímicas e do Antibiótico Bacitracina Zíncica	99
6.1.1 Actinometria	99
6.1.2 Absorção de Radiação UV-Vis pela Bacitracina Zíncica em Solução Aquosa	101
6.1.3 Estabilidade da Bacitracina Zíncica em Solução Aquosa	104
6.2 Fotólise Direta da Bacitracina Zíncica em Solução Aquosa	110
6.2.1 Estimativa de Parâmetros Cinéticos da Fotólise da Bacitracina	114
6.3 Fotodegradação da Bacitracina Zíncica por meio do Processo UV/H₂O₂	118
6.3.1 Análise da Concentração de Peróxido de Hidrogênio Residual e do pH	124
6.3.2 Estimativa de Parâmetros Cinéticos do Processo UV/H ₂ O ₂	125
6.3.3 Análise Estatística dos Resultados do Processo UV/H ₂ O ₂	130
6.3.4 Análises dos Experimentos Adicionais	147
6.4 Análises Biológicas	150
6.4.1 Análise de Biodegradabilidade	150
6.4.2 Análise de Toxicidade por meio do Microorganismo-Teste <i>V. fischeri</i>	154
7 CONCLUSÕES	160
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	163
APÊNDICE A – CURVAS DE CALIBRAÇÃO	183
APÊNDICE B – CROMATOGRAMAS EM HPLC DA BACITRACINA ZÍNCICA	186
APÊNDICE C – CONCENTRAÇÃO E COMPOSIÇÃO INICIAL DA MISTURA DE BC-ZN NOS EXPERIMENTOS DE FOTO-OXIDAÇÃO	191
APÊNDICE D – AJUSTE DE CURVAS	194
APÊNDICE E – RESULTADOS DAS CONSTANTES DE PSEUDO-PRIMEIRA ORDEM DE CADA EXPERIMENTO UV/H₂O₂	195
APÊNDICE F – DISTRIBUIÇÃO DE RESÍDUOS EM RELAÇÃO AOS VALORES PREDITOS DOS MODELOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	196

1 INTRODUÇÃO

O princípio da conservação de massa e a primeira lei da termodinâmica, ou da conservação da energia, pressupõe que as atividades de transferência de matéria e energia conduzidas pelos processos de produção industrial geram um fluxo inevitável de resíduos, os quais provocam consequências ambientais adversas (ROMEIRO, 2012). A segunda lei da termodinâmica complementa essa concepção de desequilíbrio das atividades humanas no ecossistema, de forma que há um contínuo fluxo de entropia da produção industrial para o meio ambiente. Em outras palavras, os processos produtivos criam uma “ordem” na economia humana, à custa do aumento da “desordem” ou da deterioração entrópica e irreversível do meio ambiente (GEORGESCU-ROEGEN, 1986). Tais efeitos negativos caracterizam o conceito de poluição ambiental, fundamentado pela regência natural dos princípios físicos. No entanto, é importante ressaltar que os mesmos processos tecnológicos criados em proveito do homem necessitam ser desenvolvidos e disseminados a favor da conservação do meio ambiente, através de medidas eficientes de controle ambiental para minimizar os impactos da devolução de resíduos ao ecossistema (CALIJURI; CUNHA, 2013)

A poluição da água é uma das principais preocupações globais, dada sua importância fundamental para os seres vivos e para a manutenção dos ciclos biológicos, geológicos e químicos. Dessa forma, alterações substanciais no meio ambiente podem ser dimensionadas pela intensa contaminação dos recursos hídricos decorrentes das atividades antrópicas. Além de tudo, a crescente escassez de água potável no planeta agrava esse cenário. Consequentemente, a conservação das fontes hídricas naturais também se torna uma medida imperativa, além de reforçar uma atenção mais criteriosa com a qualidade da água destinada ao consumo.

Pesquisas relacionadas à alteração da qualidade da água devido ao lançamento de resíduos farmacêuticos têm adquirido um interesse crescente devido ao amplo e progressivo consumo de medicamentos pela sociedade contemporânea. Os contaminantes farmacêuticos, constituídos entre os micropoluentes de interesse emergente, caracterizam-se por serem substâncias bioativas e persistentes à biodegradação. Apesar de estarem presentes em concentrações na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ ou ng L^{-1} em efluentes líquidos, os fármacos são capazes de provocar efeitos adversos no ecossistema. Esses contaminantes vêm sendo continuamente detectados em diferentes matrizes aquosas (GOEL, 2015; LUO *et al.*, 2014) e introduzidos no meio ambiente através da disposição inapropriada de resíduos ou de tratamentos insuficientes de efluentes

gerados pela indústria, agricultura, pecuária e pelo consumo humano (KLAVARIOTI *et al.*, 2009). Em virtude da atividade biológica e de propriedades físico-químicas específicas, a maioria dos fármacos não é naturalmente biodegradável, podendo permanecer por longos períodos no ecossistema. Como resultado, a qualidade do solo e dos recursos hídricos vem sendo comprometida por esses contaminantes, os quais alcançam eventualmente águas destinadas ao consumo. Além disso, diversas alterações fisiológicas em organismos vivos têm sido recentemente descritas em vários estudos (KÜMMERER, 2004; GOEL, 2015).

Entre os compostos farmacêuticos presentes como micropoluentes no meio ambiente, os antibióticos são apontados como um grupo de risco prioritário devido a sua alta toxicidade em baixas concentrações em organismos vivos e a sua potencial causa de resistência entre populações bacterianas (HERNANDO *et al.*, 2006). A avaliação qualitativa de potenciais riscos à saúde humana e ao meio ambiente indicou a ordem: antibióticos > hormônios sexuais > medicamentos cardiovasculares > antineoplásicos; enquanto a classificação em termos de toxicidade relativa resulta: hormônios sexuais > medicamentos cardiovasculares = antibióticos > antineoplásicos (SANDERSON *et al.*, 2004). Antibióticos em águas superficiais são capazes de alterar processos fundamentais na ecologia aquática, tais como a nitrificação/desnitrificação, na fertilidade do solo na agricultura, além de atuarem como desreguladores endócrinos em animais (KÜMMERER, 2004; WATKINSON *et al.*, 2009). O crescimento rápido da resistência conjunta de antibióticos convencionais indica que, sem ações urgentes, o mundo está se conduzindo a uma “era pós-antibiótica”, na qual as estratégias terapêuticas anteriormente efetivas não terão mais efeito (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Nas últimas décadas não se têm descoberto novos antibióticos e metodologias sintéticas ainda são incapazes de substituir completamente os produtos naturais.

Esses fatos configuram uma séria preocupação ambiental quanto ao descarte de antibióticos e/ou de seus metabólitos, bem como um grande risco à saúde humana e animal, sendo necessárias ações mais severas para minimizar o problema. Medidas de precaução têm sido adotadas para deter o enorme consumo de antibióticos na criação de animais. As legislações em alguns países, a exemplo da Suíça e da União Europeia, avançam no intuito de obter maior controle do descarte desses micropoluentes no meio ambiente, mas ainda não são estabelecidos limites para o caso dos antibióticos.

Um dos motivos para a exposição crônica dos antibióticos no meio ambiente é a pouca disseminação de tecnologias apropriadas para remover esses contaminantes. Os processos

biológicos convencionais de tratamento de efluentes são insuficientes para degradar a maioria dos antibióticos, devido à própria natureza antibacteriana desses compostos (KIM *et al.*, 2007). Embora tecnologias avançadas como a aplicação de carvão ativado e membranas possibilitam uma apreciável remoção de micropoluentes, esses processos apenas concentram essas substâncias, transferindo-as de uma fase a outra. Consequentemente, tratamentos adicionais são necessários para que os contaminantes se transformem em compostos inertes no meio ambiente.

Nesse sentido, os processos oxidativos avançados (POA) são apontados como uma das tecnologias mais promissoras para a degradação de micropoluentes orgânicos em concentrações residuais. Esses processos consistem na geração de espécies radicalares que oxidam parcial ou completamente compostos orgânicos e têm sido efetivos para degradar antibióticos (BAUMGARTEN *et al.*, 2007; LUU; LEE, 2014). Ao longo dos últimos 30 anos, os POA têm sido particularmente investigados devido à versatilidade das tecnologias envolvidas e ao potencial de aplicação (KLAVARIOTI *et al.*, 2009). No entanto, para que esses processos sejam disseminados e aplicáveis em grande escala, a otimização do desempenho de reatores e o conhecimento da engenharia das reações químicas envolvidas na degradação específica de cada contaminante ainda constituem desafios a serem superados para que se minimizem, sobretudo, os custos operacionais. Entre os POA, o processo UV/H₂O₂ tem encontrado importante aplicação comercial para remediação de efluentes reais, devido a sua simplicidade e efetividade frente a diversos contaminantes de interesse emergente (PARSONS, 2004).

Embora haja uma grande preocupação quanto ao desenvolvimento de resistência bacteriana no meio ambiente, a falta de técnicas analíticas práticas e apropriadas dificultam a detecção e o estudo da degradação de antibióticos com estruturas moleculares mais complexas. O antibiótico bacitracina zíncica (Bc-Zn) se insere nessa abordagem mencionada. Devido à complexidade de sua estrutura molecular e à potente atividade antimicrobiana, resiste à transformação biológica e compromete o processo de tratamento biológico convencional nas estações de tratamento de efluentes (ETE) de indústrias farmacêuticas. A escassez de pesquisas que avaliam os destinos ambientais e a degradação desse composto é bastante preocupante, uma vez que a Bc-Zn é amplamente consumida, tanto na medicina humana quanto veterinária (BELL, 1992).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho consiste em estudar a degradação do antibiótico bacitracina em meio aquoso através da fotólise direta e processo UV/H₂O₂. Esses processos visam remover a atividade antimicrobiana residual e degradar a bacitracina em componentes

adequados para o seu lançamento direto no meio ambiente ou, eventualmente, de forma indireta via tratamento biológico complementar em ETE industrial.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho consiste em estudar a degradação do antibiótico bacitracina zínica (Bc-Zn) em soluções aquosas-modelo através da fotólise direta e do processo oxidativo avançado UV/H₂O₂.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar o comportamento do processo de fotodegradação dos principais componentes da mistura da bacitracina zínica;
- ✓ Analisar e comparar a eficiência da degradação da bacitracina zínica através dos processos de fotólise direta e UV/H₂O₂;
- ✓ Investigar os efeitos das variáveis de processos como a concentração de oxidante, intensidade da radiação UV para encontrar as condições ótimas de cada sistema reacional, avaliando também o pH, tempo de reação e congêneres da bacitracina zínica.
- ✓ Realizar a modelagem das reações envolvidas no processo UV/H₂O₂ e do sistema operacional fotoquímico para estimar os parâmetros cinéticos dos processos de degradação da bacitracina zínica;
- ✓ Avaliar a conformidade das soluções obtidas após tratamentos pelos processos estudados quanto à mineralização, biodegradabilidade, toxicidade e remoção da atividade antimicrobiana.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Inicialmente algumas terminologias são apresentadas para contextualizar as principais implicações da presença dos antibióticos no ecossistema e destacar as recentes investigações sobre o assunto. Em seguida, ações e medidas para a minimização desses compostos no meio ambiente são discutidas. As vantagens dos POA em relação a outras tecnologias e uma revisão sobre a aplicação desses processos na remoção de antibióticos são apresentadas. Posteriormente, uma abordagem geral sobre o antibiótico bacitracina é realizada para revisar os estudos sobre o composto, apontar suas peculiaridades e os problemas causados pela exposição dessa substância no meio ambiente. Essas considerações fazem-se necessárias no intuito de reunir um entendimento necessário sobre a bacitracina zínica e investigar a potencialidade da aplicação de um POA na degradação específica desse antibiótico.

3.1 ANTIBIÓTICOS NO MEIO AMBIENTE

3.1.1 Antibióticos: Características e Portas de Entrada no Meio Ambiente

Os antibióticos foram originariamente descobertos como compostos produzidos naturalmente por fungos e bactérias para inibir processos vitais de outros microrganismos (GUIMARÃES *et al.*, 2010). Ao longo dos anos essa definição foi expandida para incluir os antibióticos sintéticos produzidos em laboratório e os semi-sintéticos, desenvolvidos através da modificação química de produtos naturais (KÜMMERER, 2009a).

Atualmente, em torno de 260 compostos diferentes de antibióticos foram registrados para uso na medicina humana e animal (KÜMMERER; HENNINGER, 2003; RENWICK *et al.*, 2016). Os antibióticos de origem natural e seus derivados semi-sintéticos compreendem a maioria dos medicamentos em uso clínico e incluem os β -lactâmicos, as tetraciclínas, os aminoglicosídeos, os macrolídeos, estreptograminas e antibióticos peptídicos como os glicopeptídeos, lipodepsipeptídeos e peptídicos não ribossomais, entre outras classes. Os antibióticos obtidos via síntese química abrangem somente as sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (GUIMARÃES *et al.*, 2010; WONG; OLIVER; LININGTON, 2012).

Os antibióticos são explicitamente designados para apresentar um efeito em micro-organismos e nas respostas bacterianas e caracterizam-se por ser dose-dependentes. Em altas

concentrações, os antibióticos produzem ações antimicrobianas em células susceptíveis, enquanto que em concentrações sub-inibitórias podem induzir uma resposta inversa nas bactérias (BERNIER; SURETTE, 2013). Em concentrações elevadas, acima da inibitória, os antibióticos podem agir nas bactérias com efeito bactericida ou bacteriostático. Agentes bacteriostáticos apenas inibem o crescimento das células bacterianas, enquanto que os agentes bactericidas apresentam efeitos letais às bactérias. Os termos bactericida e bacteriostático são categorizações gerais e não absolutas, uma vez que um antibiótico pode ser bactericida para um patógeno, mas bacteriostático para outro. Dessa forma, os efeitos de cada antibiótico variam com o procedimento empregado e com a espécie avaliada (GRENNI *et al.*, 2018). Os principais alvos dos antibióticos na célula bacteriana são ações inibitórias na síntese da parede celular, interferências na integridade da membrana celular, alterações na síntese proteica, atividade anti-metabólica, alterações na síntese e integridade de ácidos nucleicos (GOEL, 2015; GOTHWAL; THATIKONDA, 2015). A Tabela 1 apresenta as principais classes de antibióticos segundo o principal mecanismo de ação antibiótica.

Geralmente, esses compostos apresentam estrutura molecular complexa, na qual diferentes funcionalidades estão presentes dentro de uma mesma molécula. Por esse motivo, sob diferentes condições de pH, eles podem ser neutros, catiônicos, aniônicos ou zwitteriônicos, adquirindo cargas positivas ou negativas. Consequentemente, as propriedades físico-químicas e biológicas como solubilidade, coeficiente de partição octanol/água, absorção, foto-reatividade, atividade e toxicidade podem variar com o pH (KÜMMERER, 2004). Em sua maioria, os antibióticos são moléculas relativamente pequenas, com massa molar inferior a 1000 Da (KÜMMERER, 2009a). No entanto, nem todos os compostos apresentam essas propriedades em comum. A classe de antibióticos peptídeos, que incluem os peptídeos não ribossômicos, glicopeptídeos e lipodepsipeptídeos, a exemplo respectivamente da bacitracina, vancomicina e daptomicina (Tabela 1), apresentam cadeias longas e ramificadas, com massas molares maiores que 1400 Da.

Os antibióticos são amplamente consumidos na medicina humana e veterinária, na agricultura, aquicultura e pecuária para prevenção e tratamento de doenças. Na criação de animais como gado, porcos e aves, eles são intensamente empregados como promotores de crescimento para melhorar a absorção de nutrientes no trato gastrointestinal desses animais. A administração de doses sub-terapêuticas é efetiva para controlar agentes infecciosos e

Tabela 1 – Classificação dos antibióticos segundo o mecanismo de ação.

Antibióticos	Alvo	Mecanismo de ação	Exemplos	Exemplo de estrutura química
β-lactâmicos	Enzima transpeptidase	Inibição da formação de ligação cruzada entre cadeias de peptideoglicano, impedindo a formação correta da parede celular bacteriana	Penicilinas Cefalosporinas Carbapeninas Monobactamas	<p>Amoxicilina</p>
	Enzima β-lactamase	Inibição da enzima de resistência bacteriana, que degrada antibióticos β-lactâmicos	Oxapeninas Sulfoxapeninas	<p>Oxapenina</p>
Macrolídeos Lincosamidas Streptograminas Cloranfenicol Oxazolidinonas	Subunidade 50S ribossômica	Inibição da síntese proteica bacteriana	Eritromicina Lincomicina Dalofopristina Quinupristina Linezolida	<p>Eritromicina</p>
Aminoglicosídeos Tetraciclínas	Subunidade 30S ribossômica	Inibição da síntese proteica bacteriana	Neomicina Estreptomicina Tetraciclínas	<p>Neomicina</p>

Fonte: Guimarães *et al.* (2010); Goel (2015); Pubchem (2017).

Tabela 1 (cont.) – Classificação dos antibióticos segundo o mecanismo de ação.

Antibióticos	Alvo	Mecanismo de ação	Exemplos	Exemplo de estrutura química
Glicopeptídeos	Dipeptídeo terminal D-Ala-D-Ala do peptideoglicano	Complexação com as cadeias peptídicas não ligadas e bloqueio da transpeptidação, impedindo a formação correta da parede celular bacteriana	Vancomicina, Teicoplanina	Vancomicina

Peptídeos não ribossomais	Membrana plasmática	Afetam permeabilidade da membrana bacteriana por facilitarem o movimento descontrolado de íons através da membrana	Bacitracina Gramicidina C Polimixina B	Bacitracina

Lipodepsipeptídeos	Membrana plasmática	Afeta permeabilidade da membrana bacteriana e bloqueia síntese de ácido pipoteicoico, componente da membrana externa de bactérias gram-positivas	Daptomicina	Daptomicina

Fonte: Guimarães *et al.* (2010); Goel (2015); Pubchem (2017).

Tabela 1 (cont.) – Classificação dos antibióticos segundo o mecanismo de ação.

Antibióticos	Alvo	Mecanismo de ação	Exemplos	Exemplo de estrutura química
Ansamicina	RNA polimerase dependente de DNA	Inibição da síntese de RNA	Rifampicina Rifamida Rifaximina	<p>Rifampicina</p>
Fluoroquinolonas	Enzima DNA girase	Bloqueio da replicação e reparo do DNA	Ciprofloxacina Enoxacina Levofloxacina	<p>Enoxacina</p>
Sulfonamidas	Enzima di-hidropteroato sintetase	Bloqueio da formação de cofatores do ácido fólico, importantes para síntese de ácidos nucleicos	Sulfadiazina Sulfametazol Sulfamenilamina	<p>Sulfadiazina</p>

Fonte: Goel (2015); Guimarães; *et al.* (2010); Pubchem (2017).

melhorar consideravelmente o desenvolvimento animal (HUGHES; HERITAGE, 2004). O consumo anual global, somente como suplemento na alimentação animal, foi estimado em aproximadamente 63 mil toneladas em 2010 e a projeção para 2030 é em torno de 105 mil, o que representa um crescimento de 67% (VAN BOECKEL *et al.*, 2015).

Após a administração oral, cerca de 80 a 90% dos antibióticos não são completamente metabolizados pelos organismos vivos (KÜMMERER, 2009a; YAN; SONG, 2014). Consequentemente, uma grande quantidade dessas substâncias é excretada através da urina e fezes de forma inalterada ou como metabólitos ainda ativos. O aporte de antibióticos ao meio ambiente é representado esquematicamente na Figura 1. Os resíduos das principais fontes de consumo, tais como o uso na medicina humana, na agricultura, no processamento de alimentos e na criação de animais, introduzem essas substâncias no solo, sedimentos e em diferentes matrizes aquosas. A aplicação de esterco e lodo como fertilizante no solo em conjunto com a irrigação com águas reutilizadas contribuem significativamente para a disseminação dos antibióticos (KUMAR *et al.*, 2005).

Figura 1 – Fontes e rotas de ocorrência de antibióticos no meio ambiente.

Fontes: Goel (2015); Hirsch *et al.* (1999); Homem e Santos (2011).

O escoamento superficial das unidades de criação de animais, aquicultura, agricultura, bem como de aterros sanitários conduzem os antibióticos para o solo, que entram também pelos sistemas de coleta de águas pluviais, contaminando águas subterrâneas e superficiais. Esses recursos hídricos contaminados podem potencialmente transportar os resíduos de antibióticos para fontes de águas potáveis. Hospitais e efluentes farmacêuticos industriais também constituem uma fonte significativa de contaminação das águas (MÉNDEZ *et al.*, 2017; MICHAEL *et al.*, 2013). No entanto, as estações de tratamento recebem a descarga desses efluentes e das atividades municipais, sendo, portanto, consideradas o principal foco de descarte dos antibióticos em receptores de água.

Diversas pesquisas reportam a contaminação residual por antibióticos em diferentes destinos ambientais. A Figura 2 destaca os principais antibióticos detectados em águas de rios na literatura recente, coletados do estudo de Hughes *et al.* (2013) por Goel (2015). A análise geral de todos os estudos indicou que a máxima concentração de antibiótico encontrada foi de $6,5 \text{ mg L}^{-1}$ para ciprofloxacina, enquanto a sulfapiridina revelou a maior frequência média de detecção. As concentrações médias da maioria dos antibióticos detectados são da ordem de ng L^{-1} , mas são incluídos antibióticos com concentrações médias maiores que $\mu\text{g L}^{-1}$.

Figura 2 – Antibióticos detectados em amostras aquosas de rios em diferentes países.

Fonte: Modificado de Goel (2015).

A falta de métodos analíticos adequados para detectar a existência de antibióticos pode subestimar a concentração residual e a frequência desses compostos no meio ambiente. Estima-se que menos de 15% de todos os fármacos presentes no meio ambiente sejam conhecidos atualmente (YAN; SONG, 2014). Os métodos publicados para antibióticos em matrizes ambientais são destinados a limitadas classes de antibióticos. Por esse motivo, é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis e robustos, capazes de abranger diferentes classes de antibióticos em diferentes compartimentos ambientais (ZHOU *et al.*, 2013).

O desenvolvimento de métodos analíticos para a detecção e quantificação apurada de antibióticos, tais como procedimentos eficientes de extração de matrizes aquosas ambientais, combinados com análises de alta sensibilidade por meio da cromatografia líquida e da espectrometria de massa, contribui consideravelmente para investigar esses compostos no meio ambiente. No entanto, a determinação de uma concentração-limite desses contaminantes em águas residuárias, baseados em estudos de toxicidade para diferentes microorganismos não são necessariamente suficientes. O fato é que os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da resistência bacteriana ocorrem em concentrações extremamente baixas, menores que 1 ng L^{-1} (GRENNI *et al.*, 2018). Desse modo, ensaios biológicos que avaliam a atividade antimicrobiana do antibiótico e de seus subprodutos podem ser essenciais para um maior conhecimento acerca das implicações ambientais desses compostos.

3.1.2 Resistência Bacteriana a Antibióticos

Na década de 1930 já haviam sido identificadas bactérias resistentes a sulfonamidas (*Streptococcus pyogenes*) e em 1940, bactérias resistentes à penicilina (*Staphylococcus aureus*) logo após esses compostos serem descobertos. Na década de 1950, o aparecimento de bactérias entéricas resistentes a múltiplos antibióticos marcou o início do problema (BERGLUND, 2015).

Atualmente, estima-se que no mundo todo, bactérias resistentes a antibióticos sejam responsáveis por mais de 700.000 mortes por ano (RENWICK *et al.*, 2016). Além disso, a resistência aos antibióticos tem se tornado mais frequente e generalizada e, em contrapartida, poucos novos compostos vêm sendo introduzidos no mercado. O número total de patentes de antibióticos submetidos declinou em aproximadamente 35% entre 2007 e 2012 (RENWICK *et al.*, 2016). As indústrias farmacêuticas, instituições acadêmicas ou governamentais não estão

investindo recursos necessários para produzir antibióticos novos e mais seguros. Em geral, as grandes companhias farmacêuticas têm descontinuado seus programas de pesquisa em novos antibióticos devido a razões econômicas (ALANIS, 2005).

A descarga das estações de tratamento de efluentes contendo concentrações residuais de antibióticos e a presença de bactérias de resistência múltipla a antibióticos (*multiple antibiotic-resistant*, MAR) ou genes resistentes a antibióticos (*antibiotic-resistant genes*, ARGs) são atualmente bem documentados em efluentes mesmo tratados. Os ARGs têm sido constatados em várias amostras ambientais. Genes de resistência à tetraciclina, aminoglicosídeos, quinolonas e β -lactâmicos foram detectados em estações de tratamento de efluentes, lagoas, águas subterrâneas, rios, mar e solos, sedimentos e eventualmente em água potável (GOEL, 2015).

Genes resistentes resultam da mutação espontânea do material genético, sendo propagados entre as populações bacterianas através da transferência horizontal ou vertical. Essa última ocorre através da divisão celular, na qual os genes são transferidos hereditariamente para as células descendentes. A resistência horizontal pode ser adquirida pelo meio ou mediada por plasmídeos e bacteriófagos, sendo transmitido entre os microrganismos. Em tais casos, o material genético extra-cromossomal é transferido entre espécies diferentes de bactérias por processos conhecidos como transformação, conjugação ou transdução (GOEL, 2015; GOTHWAL; THATIKONDA, 2015; KÜMMERER, 2009b).

Os mecanismos básicos do desenvolvimento de resistência têm sido estudados extensivamente através de combinações patógeno-antibióticos. Entretanto, questões mais abrangentes sobre outros mecanismos que aumentam a resistência, como ela é selecionada e como se espalha entre diferentes bactérias e diferentes ambientes são considerações bastante complexas e ainda não completamente esclarecidas. Em modelos farmacodinâmicos, sugere-se que a seleção de bactérias resistentes ocorre em concentrações de antibióticos elevadas, que excedem a concentração inibitória mínima (CIM) de bactérias suscetíveis, uma vez que células suscetíveis não mais crescem e são substituídas pelas resistentes. Entretanto, atenção tem sido direcionada a concentrações de antibióticos menores que a CIM de células suscetíveis, pois efeitos de longo prazo podem conduzir à seleção de bactérias resistentes (GULLBERG *et al.*, 2011; SANDEGREN, 2014). Alguns desses mecanismos estudados incluem a seleção de resistência por meio do enriquecimento de genes resistentes pré-existentes ou pela seleção de

um novo gene; pela geração de variabilidade genética e fenotípica; pelo aumento da taxa de evolução adaptativa e através de moléculas sinalizadoras (GRENNI *et al.*, 2018).

Evidências sugerem que doses sub-inibitórias de antibióticos apresentam diversos papéis no meio ambiente, atuando como substâncias reguladoras e moléculas sinalizadoras na comunicação inter-bacteriana. Esse efeito pode não estar relacionado diretamente à antibiose, mas podem conduzir efeitos adaptativos a longo prazo. Estudos recentes revelam que baixas concentrações de antibióticos alteram várias atividades fisiológicas nas bactérias, incluindo virulência, formação de biofilme, expressão dos genes e mudanças no metabolismo primário (BERNIER; SURETTE, 2013; ROOSE-AMSALEG; LAVERMAN, 2016). Em alguns casos, as bactérias podem desenvolver a capacidade de degradar os antibióticos como uma resposta homeostática ao estresse (DING; HE, 2010). No entanto, pesquisas recentes têm demonstrado que concentrações sub-inibitórias de antibióticos, cerca de centenas de vezes menores que os valores de CIM, podem conduzir à seleção de bactérias resistentes (ANDERSSON; HUGHES, 2012; SANDEGREN, 2014). Essas constatações são bastante preocupantes, uma vez que as concentrações dos antibióticos em efluentes estão nessa faixa de magnitude.

3.1.3 Ecotoxicidade dos Antibióticos

Os antibióticos podem agir como um importante fator de desequilíbrio na estrutura das comunidades bacterianas naturais, produzindo efeitos em organismos não-alvo com importantes funções ecológicas. Vários estudos reportam que a presença de antibióticos causa considerável redução na biodiversidade antimicrobiana e influencia o crescimento, as atividades enzimáticas bacterianas e determinadas ações ecológicas, como a produção de biomassa e as transformações nutricionais, conduzindo a perda da estabilidade funcional dos ecossistemas (PALLECCHI *et al.*, 2008). Uma recente revisão de Grenni *et al.* (2018) lista as alterações na comunidade bacteriana após a adição de antibióticos em solo e água, incluindo perturbações em processos bioquímicos realizados pelas bactérias como a nitrificação e desnitrificação, metanogênese, redução de sulfato, fertilidade do solo e degradação de matéria orgânica. Como exemplo, pesquisas demonstraram que concentrações ambientalmente significativas de fluoroquinolonas e sulfonamidas foram capazes de inibir parcialmente a desnitrificação. Analogamente, aplicações de adubo suíno contendo tilosina no solo alteraram as reações do nitrogênio mediadas por comunidades bacterianas (LAVERMAN *et al.*, 2015; ROOSE-AMSALEG; LAVERMAN, 2016).

Um dos métodos para avaliar os efeitos toxicológicos ocasionados pela presença residual de antibióticos no meio ambiente é baseado em quocientes de risco (ou RQ, *risk quotient*). Essa medida é calculada através da razão entre a concentração ambiental predita (ou PEC, *predicted environmental concentration*) e a concentração ambiental sem efeito predita (ou PNEC, *predicted non-effect concentration*), ou seja: $RQ = PEC/PNEC$. Quando essa razão é maior que a unidade, a substância avaliada é, grosso modo, considerada preocupante (AMIARD; TRIQUET, 2015). A PNEC é geralmente obtida através de cálculos com a CE_{50} (concentração efetiva para 50% dos organismos) e com a CL_{50} (concentração letal para 50% dos organismos), medidos através de ensaios de exposição da substância ao micro-organismo-teste (AMIARD; TRIQUET, 2015; GOTHWAL; THATIKONDA, 2015).

Várias pesquisas apresentam esses indicadores como uma medida geral de toxicidade em organismos sensíveis não-alvo, abrangendo espécies de bactérias, cianobactérias, plantas aquáticas, algas, peixes, crustáceos, mexilhões, anelídeos, dentre outros. Na Tabela 2 estão apresentados dados de toxicidade testados em organismos de diferentes níveis tróficos, reportados por algumas pesquisas. Observa-se que as concentrações tóxicas variam bastante dependendo do organismo-teste estudado, assim como se nota que algumas espécies apresentam uma maior suscetibilidade a determinados antibióticos.

Para exemplificar essas considerações, a toxicidade de antibióticos da classe das fluoroquinonas, tais como ciprofloxacina, lomefloxacina, ofloxacina, levofloxacina, clinafloxacina, enrofloxacina e flumequina, foi avaliada por Robinson *et al.* (2005) através de testes individuais com cinco organismos aquáticos: a cianobactéria *Microcystis aeruginosa*, a planta aquática *Lemna minor*, a água verde *Pseudokirckneriella subcapitata*, o crustáceo *Daphnia magna* e o peixe *Pimephales promelas*. Os valores de toxicidade variaram de 0,008 a 23 mg L⁻¹ e verificou-se que as espécies de crustáceo e peixe não apresentaram um efeito tóxico relevante em uma concentração próxima a 10 mg L⁻¹, enquanto a espécie de cianobactéria foi o organismo mais suscetível (CE_{50} mínima de 7,9 µ L⁻¹ para o antibiótico levofloxacina). No estudo de Kim *et al.* (2007), as sulfonamidas (sulfametazol, sulfacloropiridazina, sulfatiazol, sulfametazina, sulfadimetoxina), e trimetoprim foram avaliados quanto à toxicidade aguda empregando a bactéria marinha *Vibrio fischeri*, o crustáceo *D. magna* e a espécie de peixe *Oryzias latipes*. Dentre os antibióticos estudados, a espécie *D. magna* foi de forma geral o organismo-teste mais suscetível (CE_{50} média 356 m L⁻¹, valor obtido menor em relação aos outros dois organismos). O estudo de Di Delupis *et al.* (1992) avaliou a toxicidade aguda dos antibióticos aminosidina, bacitracina, eritromicina e lincomicina utilizando *D. magna*. Os

pesquisadores relataram que os quatro antibióticos apresentaram uma toxicidade elevada para o organismo-teste, sendo a bacitracina considerada a mais tóxica dentre eles (CE₅₀ (24 h) de 126, mg L⁻¹ e CE₅₀ (48 h) de 30,5 mg L⁻¹).

Em geral, os estudos em meio aquoso consideram os efeitos dos antibióticos de forma individual. Uma vez que esses compostos e seus subprodutos estão dispostos no meio ambiente como misturas com outros contaminantes antropogênicos, efeitos aditivos ou sinérgicos devem ser considerados para uma avaliação mais efetiva do risco ambiental. González-Pleiter *et al.* (2013) avaliaram a toxicidade de diferentes classes de antibióticos em cianobactérias e algas verdes de forma isolada (Tabela 2) ou em diferentes combinações. Os resultados detectaram sinergismo toxicológico considerável em misturas binárias ou multi-componentes de antibióticos, principalmente as que continham a tetraciclina. A combinação de tetraciclina e eritromicina apresentou RQ > 1, representando ecotoxicidade sinérgica preocupante para os micro-organismos aquáticos.

Tabela 2 – Dados de toxicidade de alguns antibióticos.

Antibiótico	Organismo	Parâmetro (tempo de exposição)	Valor (mg L ⁻¹)	Referência
Aminosidine sulfate (Neomicina E)	<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀ (24 h)	1055	Di Delupis <i>et al.</i> (1992)
		CE ₅₀ (48 h)	503	
Amoxicilina	<i>Anabaena sp. CPB4337</i>	CE ₅₀ (72 h)	56,3	González-Pleiter <i>et al.</i> (2013)
	<i>Pseudokirckneriella subcapitata</i>	CE ₅₀ (72 h)	> 1500	
Bacitracina	<i>Artemia salina (nauplii)</i>	CL ₅₀ (24 h)	34,1	Brambilla <i>et al.</i> (1994)
		CL ₅₀ (48 h)	21,8	
		CE ₅₀ (24 h)	34,1	Migliore <i>et al.</i> (1997)
		CE ₅₀ (48 h)	21,8	
	<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀ (24 h)	126,4	Di Delupis <i>et al.</i> (1992)
		CE ₅₀ (48 h)	30,5	
		CL ₅₀ (24 h)	126,4	Brambilla <i>et al.</i> (1994)
		CL ₅₀ (48 h)	30,5	
Ciprofloxacina	<i>Anabaena flos-aquae</i>	CE ₅₀ (72 h)	0,0102	Ebert <i>et al.</i> (2011)
	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	CE ₅₀ (72 h)	8,0	
	<i>Lemna minor</i>	CE ₅₀ (7 dias)	0,0625	Wagil <i>et al.</i> (2014)
	<i>Lemna minor</i>	CE ₅₀ (7 dias)	0,32	
	<i>Lemna minor</i>	CE ₅₀ (7 dias)	0,2	Robinson <i>et al.</i> (2005)
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	CE ₅₀ (5 dias)	0,02	
	<i>Pseudokirckneriella subcapitata</i>	CE ₅₀ (72 h)	18,7	

Tabela 2 (cont.) – Dados de toxicidade de alguns antibióticos.

Antibiótico	Organismo	Parâmetro (tempo de exposição)	Valor (mg L ⁻¹)	Referência
Clinafloxacina	<i>Lemna minor</i>	CE ₅₀ (7 dias)	0,062	Robinson <i>et al.</i> (2005)
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	CE ₅₀ (5 dias)	0,1	
	<i>Pseudokirckneriella subcapitata</i>	CE ₅₀ (72 h)	1,1	
Eritromicina	<i>Anabaena flos-aquae</i>	CE ₅₀ (144 h)	0,27	Ando <i>et al.</i> (2007)
	<i>Anabaena sp. CPB4337</i>	CE ₅₀ (72 h)	0,022	González-Pleiter <i>et al.</i> (2013)
	<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀ (24 h)	388	Di Delupis <i>et al.</i> (1992)
		CE ₅₀ (48 h)	211	
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	CE ₅₀ (6 dias)	0,023	Ando <i>et al.</i> (2007)
	<i>Pseudokirckneriella subcapitata</i>	CE ₅₀ (72 h)	0,35	González-Pleiter <i>et al.</i> (2013)
	<i>Anabaena flos-aquae</i>	CE ₅₀ (72 h)	0,2	Ebert <i>et al.</i> (2011)
Enrofloxacina	<i>Desmodemus subspicatus</i>	CE ₅₀ (72 h)	5,6	Wagil <i>et al.</i> (2014)
	<i>Lemna minor</i>	CE ₅₀ (7 dias)	0,1	
	<i>Lemna minor</i>	CE ₅₀ (7 dias)	0,13	
	<i>Lemna minor</i>	CE ₅₀ (7 dias)	0,11	
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	CE ₅₀ (5 dias)	0,05	
	<i>Pseudokirckneriella subcapitata</i>	CE ₅₀ (72 h)	3,1	
	<i>Artemia salina</i> (nauplii)	CE ₅₀ (24 h)	476,8	Migliore <i>et al.</i> (1997)
		CE ₅₀ (48 h)	307,7	
		CE ₅₀ 72 h)	96,4	
		CL ₅₀ (24 h)	477	
		CL ₅₀ (48 h)	308	
		CE ₅₀ (72 h)	96,4	
		CE ₅₀ (7 dias)	2,47	
Flumequina	<i>Microcystis aeruginosa</i>	CE ₅₀ (5 dias)	1,96	Brambilla <i>et al.</i> (1994)
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	CE ₅₀ (24 h)	> 8,8	
	<i>Pseudokirckneriella subcapitata</i>	CE ₅₀ (72 h)	5,0	
	<i>Pseudokirckneriella subcapitata</i>	CE ₅₀ (24 h)	16	
	<i>Vibrio fischeri</i>	CE ₅₀ (30 min)	> 0,8	
	<i>Lemna minor</i>	CE ₅₀ (7 dias)	2,47	
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	CE ₅₀ (5 dias)	1,96	
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	CE ₅₀ (24 h)	> 8,8	
	<i>Pseudokirckneriella subcapitata</i>	CE ₅₀ (72 h)	5,0	
	<i>Pseudokirckneriella subcapitata</i>	CE ₅₀ (24 h)	16	
Levofloxacina	<i>Anabaena sp. CPB4337</i>	CE ₅₀ (72 h)	4,8	González-Pleiter <i>et al.</i> (2013)
	<i>Lemna minor</i>	CE ₅₀ (7 dias)	0,05	Robinson <i>et al.</i> (2005)
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	CE ₅₀ (5 dias)	0,008	González-Pleiter <i>et al.</i> (2013)
	<i>Pseudokirckneriella subcapitata</i>	CE ₅₀ (72 h)	7,4	
	<i>Pseudokirckneriella subcapitata</i>	CE ₅₀ (72 h)	> 120	
Lincomicina	<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀ (24 h)	379	Di Delupis <i>et al.</i> (1992)
Lomefloxacina	<i>Lemna minor</i>	CE ₅₀ (7 dias)	0,11	Robinson <i>et al.</i> (2005)
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	CE ₅₀ (5 dias)	0,19	
	<i>Pseudokirckneriella subcapitata</i>	CE ₅₀ (72 h)	22,7	

Tabela 2 (cont.) – Dados de toxicidade de alguns antibióticos.

Antibiótico	Organismo	Parâmetro (tempo de exposição)	Valor (mg L ⁻¹)	Referência
Lomefloxacina	<i>Lemna minor</i>	CE ₅₀ (7 dias)	0,11	Robinson <i>et al.</i> (2005)
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	CE ₅₀ (5 dias)	0,19	
	<i>Pseudokirckneriella subcapitata</i>	CE ₅₀ (72 h)	22,7	
Norfloxacina	<i>Anabaena flos-aquae</i>	CE ₅₀ (6 dias)	0,029	Ando <i>et al.</i> (2007)
	<i>Anabaena sp. CPB4337</i>	CE ₅₀ (72 h)	5,6	González-Pleiter <i>et al.</i> (2013)
	<i>Lemna minor</i>	CE ₅₀ (7 dias)	0,34	Wagil <i>et al.</i> (2014)
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	CE ₅₀ (6 dias)	0,062	Ando <i>et al.</i> (2007)
	<i>Pseudokirckneriella subcapitata</i>	CE ₅₀ (72 h)	> 80	González-Pleiter <i>et al.</i> (2013)
Ofloxacina	<i>Lemna minor</i>	CE ₅₀ (7 dias)	0,13	Robinson <i>et al.</i> (2005)
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	CE ₅₀ (5 dias)	0,021	
	<i>Pseudokirckneriella subcapitata</i>	CE ₅₀ (72 h)	12,1	
Oxitetraciclina	Bactérias de lodo de esgoto	CE ₅₀ (0/10 h)	0,12/0,27	Halling-Sørensen <i>et al.</i> (2003)
	<i>Folsomia fimetaria</i>	CL ₁₀ /CE ₁₀	> 5000	Bauger <i>et al.</i> (2000)
	<i>Enchytraeus crypticus</i>	CL ₁₀ /CE ₁₀	> 5000	
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	CE ₅₀ (24 h)	5,4	Grinten <i>et al.</i> (2010)
	<i>Aporrectodea caliginosa</i>	CL ₁₀ /CE ₁₀	> 5000	Bauger <i>et al.</i> (2000)
	<i>Pseudokirckneriella subcapitata</i>	CE ₅₀ (24 h)	0,6	Grinten <i>et al.</i> (2010)
	<i>Vibrio fischeri</i>	CE ₅₀ (30 min)	> 0,1	
Sulfadimetoxina	<i>Artemia salina</i> (nauplii)	CL ₅₀ (24 h)	1866	Migliore <i>et al.</i> (1993)
		CL ₅₀ (48 h)	851	
		CL ₅₀ (72 h)	537	
		CL ₅₀ (96 h)	19,5	
		CL ₅₀ (24 h)	1866	Brambilia <i>et al.</i> (1994)
		CL ₅₀ (48 h)	851	
		CL ₅₀ 72 h)	537	
		CL ₅₀ (96 h)	19,5	
Sulfacoloropiridazina	<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀ (48 h)	375,3	Kim <i>et al.</i> (2007)
	<i>Oryzias latipes</i>	CE ₅₀ (48 h)	589,3	
	<i>Vibrio fischeri</i>	CL ₅₀ (15 min)	26,4	
Sulfadiazina	Bactérias de lodo de esgoto	CE ₅₀ (0/10 h)	15,9/16,8	Halling-Sørensen <i>et al.</i> (2003)
Sulfadimetoxina	<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀ (48 h)	248	Kim <i>et al.</i> (2007)
	<i>Oryzias latipes</i>	CE ₅₀ (48 h)	> 100	
	<i>Vibrio fischeri</i>	CL ₅₀ (15 min)	500	
Sulfametazina	<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀ (48 h)	174,4	Kim <i>et al.</i> (2007)
	<i>Oryzias latipes</i>	CE ₅₀ (48 h)	> 100	
	<i>Vibrio fischeri</i>	CL ₅₀ (15 min)	344,7	

Tabela 2 (cont.) – Dados de toxicidade de alguns antibióticos.

Antibiótico	Organismo	Parâmetro (tempo de exposição)	Valor (mg L ⁻¹)	Referência
Sulfametoxazol	<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀ (48 h)	189,2	Kim <i>et al.</i> (2007)
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	CE ₅₀ (24 h)	0,55	Grinten <i>et al.</i> (2010)
	<i>Oryzias latipes</i>	CE ₅₀ (48 h)	> 750	Kim <i>et al.</i> (2007)
	<i>Pseudokirckneriella subcapitata</i>	CE ₅₀ (24 h)	> 9,0	Grinten <i>et al.</i> (2010)
	<i>Vibrio fischeri</i>	CL ₅₀ (15 min)	78,1	Kim <i>et al.</i> (2007)
	<i>Vibrio fischeri</i>	CE ₅₀ (30 min)	> 1.5	Grinten <i>et al.</i> (2010)
Sulfatiazol	<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀ (48 h)	149,3	Kim <i>et al.</i> (2007)
	<i>Oryzias latipes</i>	CE ₅₀ (48 h)	> 500	
	<i>Vibrio fischeri</i>	CL ₅₀ (15 min)	1000	
Streptomicina	Bactérias de lodo de esgoto	CE ₅₀	0,47	Halling-Sørensen (2001)
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	CE ₅₀ (24 h)	0,034	Grinten <i>et al.</i> (2010)
	<i>Pseudokirckneriella subcapitata</i>	CE ₅₀ (24 h)	1,5	
	<i>Vibrio fischeri</i>	CE ₅₀ (30 min)	> 0.4	
Penicilina	Bactérias de lodo de esgoto	CE ₅₀	85	Halling-Sørensen (2001)
Tetraciclina	<i>Anabaena sp. CPB4337</i>	CE ₅₀ (72 h)	6,2	González-Pleiter <i>et al.</i> (2013)
	Bactérias de lodo de esgoto	CE ₅₀	2,2	Halling-Sørensen (2001)
	<i>Pseudokirckneriella subcapitata</i>	CE ₅₀ (72 h)	3,3	González-Pleiter <i>et al.</i> (2013)
Tilosina	<i>Folsomia fimetaria</i>	CL ₁₀ /CE ₁₀	> 5000	Bauger <i>et al.</i> (2000)
	<i>Enchytraeus crypticus</i>	CL ₁₀ /CE ₁₀	2501	
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	CE ₅₀ (24 h)	0,29	Grinten <i>et al.</i> (2010)
	<i>Aporrectodea caliginosa</i>	CL ₁₀ /CE ₁₀	> 5000	Bauger <i>et al.</i> (2000)
	<i>Pseudokirckneriella subcapitata</i>	CE ₅₀ (24 h)	0,0089	Grinten <i>et al.</i> (2010)
	<i>Vibrio fischeri</i>	CE ₅₀ (30 min)	> 1.8	
Trimetoprim	<i>Anabaena flos-aquae</i>	CE ₅₀ (144 h)	> 200	Ando <i>et al.</i> (2007)
	<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀ (48 h)	167,4	Kim <i>et al.</i> (2007)
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	CE ₅₀ (24 h)	6,9	Grinten <i>et al.</i> (2010)
	<i>Oryzias latipes</i>	CE ₅₀ (48 h)	> 100	Kim <i>et al.</i> (2007)
	<i>Pseudokirckneriella subcapitata</i>	CE ₅₀ (24 h)	> 9,0	Grinten <i>et al.</i> (2010)
	<i>Vibrio fischeri</i>	CL ₅₀ (15 min)	176,7	Kim <i>et al.</i> (2007)
	<i>Vibrio fischeri</i>	CE ₅₀ (30 min)	> 0,28	Grinten <i>et al.</i> (2010)

Outros efeitos nocivos causados por antibióticos incluem a neurotoxicidade de antibióticos aminoglicosídeos, cefalosporina, penicilinas, tetraciclina e outras classes de medicamentos (GRILL; MAGANTI, 2011). Certos antibióticos como a eritromicina, trimetoprim e amoxicilina atuam como desreguladores endócrinos em animais (EBELE *et al.*, 2017).

A assimilação de antibióticos pelas plantas devido à irrigação por águas reutilizadas representa outra questão discutida na literatura. A acumulação pode ou não afetar o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Entretanto, pode representar uma importante rota de exposição desses antibióticos ao homem e outras biotas, provocando reações tóxicas e alérgicas, além de induzir resistência a antibióticos em humanos (KUMAR *et al.*, 2005).

Migliore *et al.* (2003) investigaram a fitotoxicidade da enrofloxacin em culturas de plantas *Cucumis sativus*, *Lactuca sativa*, *Phaseolus vulgaris* e *Raphanus sativus*. Entre 50 e 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de enrofloxacin foram induzidos efeitos horméticos em plantas através da estimulação dose-dependente nos comprimentos de raízes primárias, hypocótilo, cotilédones e no número/comprimento de folhas. Novas considerações também sugerem que os antibióticos diminuem a biodegradação das folhas e de outras partes das plantas, as quais servem de fonte primária de alimento para a vida aquática (RICHARDSON; TERNES, 2011).

3.2 MEDIDAS DE CONTROLE DE ANTIBIÓTICOS NO MEIO AMBIENTE

3.2.1 Legislação

A decisão sobre quais micropoluentes devem ser regulamentados é uma questão complexa devido à natureza diversa dos micropoluentes, mesmo pertencentes a uma mesma família de compostos. Programas de pesquisa mais detalhados devem ser realizados para fornecer uma base científica de informações como a identificação da fonte, destino, transformação e toxicidade dos contaminantes em diferentes compartimentos ambientais (BUI *et al.*, 2016). O desenvolvimento recente da legislação ambiental na Suíça e na União Européia tem sido direcionado para controlar a descarga de traços de componentes orgânicos.

A Suíça é o país pioneiro na implantação de medidas de controle de micropoluentes. A proposta para o meio ambiente, aprovada pelo parlamento suíço em 2011, foi reduzir a carga desses contaminantes em 80% nas plantas selecionadas de estações de tratamento de efluentes. Posteriormente, esse controle nas ETEs foi regulamentado por uma série de consultas públicas de 2012 a 2014 a ser efetivado a partir de 2016 (AUDENAERT *et al.*, 2014). Os custos para a implantação de melhorias nas ETEs para o programa de 2016 a 2040 são estimados em 135 milhões por ano de dólares americanos (LOGAR *et al.*, 2014).

A União Européia tem implantado crescente fortalecimento da legislação ambiental. A Water Framework Directive (WFD; 2000/60/EC) estabeleceu uma “estratégia contra a poluição da água” e definiu passos a serem tomados para que haja um maior controle na emissão de micropoluentes orgânicos. A diretiva “Environmental Quality Standards” (EQSD, 2008/105/EC) limitou a concentração de 33 substâncias prioritárias (EUROPEAN COMMISSION, 2008). Em 2012, a Comissão Européia propôs a inclusão de 15 novas substâncias prioritárias constituídas por agrotóxicos, dioxinas, metais, produtos químicos de uso industrial e três fármacos: 17 α -ethinylestradiol, 17 β -estradiol e diclofenaco. No entanto, em 2013, a diretiva Diretiva 2013/39/UE aprovou a inclusão das 12 substâncias apenas na lista, excluindo os fármacos. Os dois hormônios (17 α -ethinylestradiol, 17 β -estradiol) e o anti-inflamatório diclofenaco foram inseridos em uma “lista de vigilância”, com o propósito de obter maiores informações e definir os limites adequados. Um dos motivos da exclusão foi o alto custo das mudanças nas ETEs necessárias para atender aos padrões exigidos (CUNHA *et al.*,

2016). Somente no Reino Unido, por exemplo, o custo foi estimado em cerca de US\$ 41 bilhões para a instalação de melhorias (GILBERT, 2012).

Embora esses esforços venham sendo efetuados, há muito mais substâncias preocupantes do que as definidas pela UE, incluindo diversos antibióticos. Além disso, não há ações completamente regulamentadas quando as normas de qualidade são excedidas (METZ; INGOLD, 2014). O alto investimento de recursos financeiros para a implantação de tecnologias para a remoção eficaz de micropoluentes, principalmente por parte das indústrias farmacêuticas, seria apenas impulsionado com legislações e controles mais rigorosos. O tempo exigido para a adequação das ETEs, mesmo através de recursos financeiros aprovados para essas mudanças, a exemplo do caso da Suíça, ainda podem representar incertezas quanto à disseminação dessas tecnologias de uma forma global.

Recentemente, a Diretiva 2015/495 (EUROPEAN COMMISSION, 2015) estabeleceu uma lista de vigilância com 10 substâncias/grupos que podem representar um risco significativo no meio ambiente aquático na UE. Pela primeira vez, os antibióticos (eritromicina, claritromicina e azitromicina) foram incluídos na lista, ao lado dos três fármacos mencionados anteriormente (17 α -ethinylestradiol, 17 β -estradiol e diclofenaco), além de mais um hormônio (estrone), alguns pesticidas, uma substância filtradora UV e um antioxidante (BARBOSA, 2016). Consequentemente, tais compostos passarão a ser monitorados, no intuito de definir os padrões de qualidade ambiental, indicando a possibilidade de fazerem parte da lista de substâncias prioritárias (GRENNI, 2018).

Devido a seu emprego excessivo como aditivo na alimentação animal por mais de 70 anos, somado ao grande risco proporcionado pelo desenvolvimento de resistência bacteriana, a União Europeia banuiu, em 1999, a utilização da bacitracina zínica (Bc-Zn) em conjunto com outras substâncias, como uma medida de precaução. Outros antibióticos proibidos são a espiramicina, tilosina e virginamicina (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 1998) que, assim como a bacitracina, são misturas complexas de seus próprios componentes. No entanto, em outros países do mundo, esses antibióticos ainda são amplamente utilizados como promotores de crescimento animal. Adicionalmente, a diretiva da Comissão Europeia 95/53/EC também alegou que os métodos microbiológicos prescritos para controlar o cumprimento dessa regra são inapropriados, devido à falta de especificidade em identificar os compostos (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 1995). A aplicação de técnicas multi-analíticas e mais sensíveis para monitorar os resíduos de

antibióticos ainda precisa ser incorporada na prática, visando maior fiscalização e tomada de decisões acerca dos limites de concentrações toleradas para esses micropoluentes.

Nos Estados Unidos, a Agência de Proteção Ambiental (EPA) publicou uma lista com 402 substâncias consideradas extremamente tóxicas, como parte de um programa de emergência em 1986 (JUSTIA, 1987). O propósito dessa medida foi proteger a população contra os efeitos adversos à saúde proporcionados pelo lançamento acidental desses compostos. A Bc-Zn foi incluída nessa lista de substâncias prioritárias. No entanto, após dois anos, a bacitracina e outros compostos foram dela retirados, reconhecidas como compostos que não preenchiam os critérios de toxicidade da listagem original. Atualmente, é o único antibiótico peptídico aprovado nos EUA para o uso na medicina humana e na criação de animais (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2013).

No Brasil, não há legislação específica para o controle de micropoluentes. As regulamentações vigentes para a manutenção da qualidade dos recursos hídricos consistem na portaria do Ministério da Saúde nº 2914/2011, que dispõe sobre os padrões de potabilidade da água, e nas resoluções estabelecidas pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). A *Resolução CONAMA 357/2005* institui sobre os padrões de classificação de corpos de água, a *Resolução CONAMA 430/2011* estabelece as condições do lançamento de efluentes e a *Resolução CONAMA 396/2008* define a qualidade da água subterrânea, incluindo a água destinada ao consumo humano (CUNHA *et al.*, 2016). Essas normas determinam diversos parâmetros físico-químicos e controlam substâncias como metais, solventes, agrotóxicos, pesticidas e contaminantes microbiológicos (BOGER *et al.*, 2015). No entanto, não há considerações acerca de concentrações limites para fármacos.

É importante ressaltar que após a publicação da *Resolução CONAMA 357/2005*, poucos avanços foram realizados quanto ao enquadramento dos corpos hídricos e apenas poucos rios são contemplados na norma (Cunha *et al.*, 2016). Além disso, o gerenciamento da poluição nas matrizes aquosas brasileiras ainda necessita de grandes avanços. O Brasil ainda não superou problemas básicos de saneamento, os quais persistem em diversas regiões do seu território. A água tratada não abastece ainda 16,7% da população, o acesso à coleta de esgoto abrange apenas 51,9% da população e menos da metade do esgoto do país (44,9%) é tratado (TRATABRASIL, 2018). Por essa razão, questões referentes ao controle de concentrações residuais de fármacos em efluentes, particularmente os antibióticos, podem estar longe de serem estabelecidas legalmente no país.

3.2.2 Tecnologias Avançadas para Tratamento de Efluentes contendo Antibióticos

Os processos biológicos convencionais de tratamento de efluentes são insuficientes para degradar a maioria dos antibióticos, devido à própria natureza antibacteriana desses compostos (KIM *et al.*, 2007). A maioria dos antibióticos estudados não é biodegradada através de condições aeróbicas e menos ainda em condições anaeróbicas (KÜMMERER, 2009a). Por esse motivo, uma variedade de tecnologias de tratamento para a remoção de antibióticos tem sido estudada por vários pesquisadores (GOTHWAL; THATIKONDA, 2014). Não há somente uma tecnologia capaz de transformar uma família completa de fármacos em subprodutos adequados e vários métodos são necessários para alcançar altas porcentagens de remoção desses micropoluentes.

O tratamento convencional urbano de águas residuárias geralmente consiste de um estágio primário, um secundário e às vezes de uma etapa terciária, no qual diferentes processos biológicos e físico-químicos estão envolvidos para cada estágio (MICHAEL *et al.*, 2013). O tratamento primário visa reduzir o conteúdo de sólidos no efluente através de meios mecânicos, como filtração e sedimentação. O tratamento secundário tipicamente depende de um processo biológico para remover a matéria e/ou nutrientes orgânicos com sistemas aeróbicos ou anaeróbicos. O processo de lodo ativado é o mais frequentemente utilizado, principalmente em estações de tratamento de efluentes industriais (HOMEM; SANTOS, 2011), sendo menos comuns os biorreatores de membrana, reatores de leito móvel com biofilme ou reatores de leito fixo (MICHAEL *et al.*, 2013). Dessa forma, a remoção biológica dos antibióticos depende de sua adsorção no lodo residual e degradação ou transformação durante o tratamento.

Vários processos de tratamento terciários de águas residuárias como adsorção, processos de oxidação, processos oxidativos avançados (POA), tratamento com membranas, reatores com membranas e processos híbridos têm sido extensivamente estudados (BUI *et al.*, 2016). No entanto, esses processos podem resultar em aumento considerável dos custos de gestão e, por essa razão, são atualmente subutilizados (GRENNI *et al.*, 2018). Embora tecnologias mais avançadas como a aplicação de carvão ativado e membranas apresentem uma apreciável remoção de micropoluentes, esses processos apenas concentram poluentes, transferindo-os de uma fase a outra. Consequentemente, tratamentos adicionais podem ser associados a essas tecnologias para que os contaminantes se transformem em compostos inertes no meio ambiente (GOEL, 2015; BO *et al.*, 2016).

Métodos oxidativos tradicionais, empregando Cl_2 , HClO , H_2O_2 , KMnO_4 e ClO_2 , são ineficazes para degradar significativamente a maioria dos micropoluentes e podem gerar espécies orgânicas halogenadas potencialmente cancerígenas. Além disso, esses métodos são mais eficazes no tratamento de matrizes aquosas com baixa carga de material orgânico, como água potável (HOMEM; SANTOS, 2011). Por essa razão, os processos oxidativos avançados têm sido apontados como os mais adequados e promissores no tratamento de água e efluentes contaminados com antibióticos (BUI *et al.*, 2016). Os POA apresentam elevada formação de radicais livres, cujas reações rápidas e não seletivas fazem com que possam ser aplicados para vários poluentes.

3.2.3 Processos Oxidativos Avançados para Degradação de Antibióticos

A versatilidade dos POA representa uma vantagem em relação aos outros processos por oferecerem vários métodos alternativos para geração do radical hidroxil, além de outras espécies radicalares que participam da degradação de compostos orgânicos. Essas tecnologias estão entre as mais promissoras para o tratamento de micropoluentes devido à possibilidade de operar a pressão e temperatura ambientes, tempo de reação relativamente curtos, alta eficiência, facilidade de controle, além de serem ambientalmente favoráveis na medida em que não produzem poluição secundária (OPPENLÄNDER, 2003; BO *et al.*, 2016). Diferentes tipos de POA têm sido pesquisados ao longo das últimas três décadas para o tratamento de efluentes contendo antibióticos, como ozonização (O_3), ozônio combinado com peróxido de hidrogênio ($\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$) e radiação UV (UV/O_3) ou ambos ($\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$), ozônio combinado com catalisadores ($\text{O}_3/\text{catalisadores}$), $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$, processos Fenton e foto-Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ e $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$, respectivamente), fotocatalíticos UV/TiO_2 , além de processos ultrassônicos. A Tabela 3 apresenta uma lista dos processos oxidativos avançados estudados nas últimas décadas para a remoção específica de antibióticos. A Figura 3 indica a relação da aplicação dos POAs com base nessas revisões. A maior parte das pesquisas aborda os processos de fotocatalise e ozonização, seguido de processos Fenton. É possível também observar a crescente atenção dada na última década aos processos eletroquímicos para a remoção de antibióticos. Em geral, os POA apresentaram elevadas porcentagens de degradação ou a remoção completa desses micropoluentes.

Figura 3 – Proporção de POA estudados nas últimas décadas para a degradação e antibióticos.

* Processos descritos como outros incluem: Fenton like e foto-Fenton like (5,0%), eletro-Fenton e foto-eletro-Fenton (3,0%), UV/H₂O₂ (1,0%), ultrassom (1,0%).

Tabela 3 – Remoção de antibióticos através de processos oxidativos avançados (POA).

Antibióticos/Classe	POA	Concentração inicial	Resultado	Referências
Amicacina (aminoglicosídeos)	UVA/TiO ₂	5 mg L ⁻¹	Degradação de 70% do antibiótico usando “ <i>nanobelts</i> ” de TiO ₂ sob radiação solar por 150 min	Chen <i>et al.</i> (2013)
Amoxicilina (β-lactâmicos)	Foto-Fenton	42 mg L ⁻¹	Aplicação de UVA e irradiação solar. A degradação não foi influenciada pelo tipo de radiação e foi aumentada com a presença de ferrioxalato e com o aumento de H ₂ O ₂ . Degradação total em 10 min.	Trovó <i>et al.</i> (2008)
	Foto-Fenton	500 mg L ⁻¹	Na melhor condição, a redução total do antibiótico foi alcançada em 1 min e remoção de TOC de 71%.	Elmolla; Chaudhuri (2009)
	O ₃	0,5 mmol L ⁻¹	90% de remoção após 4 min e 18% de mineralização após 20 min.	Andreozzi <i>et al.</i> (2005)
	UV/TiO ₂	1 - 100 mg L ⁻¹	Degradação sob radiação solar é três vezes mais rápida do que usando UV-A artificial. Máxima degradação de 85% em pH neutro.	Klauson <i>et al.</i> (2010)
	UV-A/TiO ₂ /Ge	10 mg L ⁻¹	Degradação de 91,6% em 240 min.	Chun <i>et al.</i> (2015)
	UV-Vis/(C ₃ N ₄)-Ag/TiO ₂	20 mg L ⁻¹	Remoção significativamente elevada. Amoxicilina é um poluente pouco fotosensibilizante, mas degrada em velocidade elevada	Leong <i>et al.</i> (2015)
Amoxicilina (β-lactâmicos) Ampicilina (β-lactâmicos) Cloxacilina (β-lactâmicos)	Fenton	104, 105, 103 mg L ⁻¹	Degradação completa dos antibióticos em 2 min na condição ótima de proporção molar H ₂ O ₂ /Fe ²⁺ = 10 e pH=3.	Elmolla; Chaudhuri (2009)
	Foto-Fenton	104, 105, 103 mg L ⁻¹	Degradação completa dos antibióticos em 2 min na condição ótima de proporção molar H ₂ O ₂ /Fe ²⁺ = 20 e pH=3.	Elmolla; Chaudhuri (2009)
	UV-A/TiO ₂	104, 105, 103 mg L ⁻¹	Degradação completa de todos antibióticos na melhor condição: 1,0 g L ⁻¹ de TiO ₂ e 100 mg L ⁻¹ de H ₂ O ₂ em pH 5.	Elmolla <i>et al.</i> (2010)
	UVA/TiO ₂ /H ₂ O ₂		As melhores condições de degradação para os antibióticos foram: 1,0 g L ⁻¹ de TiO ₂ em pH 11, com degradação de 71%, 91% e 100% para amoxicilina, ampicilina e cloxacilina, respectivamente.	
	UV-A/ZnO		Degradação completa de todos antibióticos na melhor condição: 0,5 g L ⁻¹ de ZnO em pH 11.	

Fontes: Homem; Santos (2011); Mendez *et al.* (2016); Lofrano *et al.* (2017).

Tabela 3 (cont.) – Remoção de antibióticos através de processos oxidativos avançados (POA).

Antibióticos/Classe	POA	Concentração inicial	Resultado	Referências
Ampicilina (β -lactâmicos)	Fenton Foto-Fenton	20 mg L ⁻¹	Degradação completa alcançada para ambos os processos nas condições otimizadas utilizadas: (pH = 3,7, 87 mmol L ⁻¹ Fe ²⁺ , 373 mmol L ⁻¹ H ₂ O ₂ para Fenton e pH = 3,5, 87 mmol L ⁻¹ Fe ²⁺ , 454 mmol L ⁻¹ H ₂ O ₂ para foto-Fenton)	Rozas <i>et al.</i> (2010)
Ampicilina (β -lactâmicos) Doxiciclina (Tetraciclina) Tilosina (Macrolídeos) Sulfatiazol (Sulfonamidas)	UV-A/TiO ₂	50 mg L ⁻¹	A velocidade de mineralização fotocatalítica do antibiótico foi menor do que as taxas de degradação do composto alvo. Os produtos da fotodegradação foram biodegradáveis e a atividade antimicrobiana, menor do que a da solução inicial	Adamek <i>et al.</i> (2016)
Azitromicina (Macrolídeos) Claritromicina (Macrolídeos) Roxitromicina (Macrolídeos)	O ₃	2 µg L ⁻¹	Degradação dos antibióticos em 90 - 99% dos antibióticos para doses de O ₃ > 2 mg L ⁻¹ .	Huber <i>et al.</i> (2005)
Bleomicina	Eletroquímico	44,6 mg L ⁻¹	Resultados mostraram uma leve redução da citotoxicidade, mutagenicidade e atividade microbiológica do fármaco.	Hirose <i>et al.</i> (2005)
Cefazolina (aminoglicosídeos)	UV-Vis/TiO ₂	0,1 mmol L ⁻¹	Degradação de 53% com suspensão de UV/TiO ₂ e 76% com suspensão de TiO ₂ N-dopado. O TiO ₂ dopado permitiu 80% de remoção da cefazolina sob radiação solar	Gurkan <i>et al.</i> (2012)
Ceftiofur (β -lactâmicos)	UV-Vis/ Au-TiO ₂	0,05 mmol L ⁻¹	Degradação de 95% e 65% de degradação empregando Au-TiO ₂ em UV-Vis e em radiação visível, respectivamente, em 2 h. Efeito < 5% na degradação de ceftiofur em radiação visível	Pugazhenthiran <i>et al.</i> (2014)
Ceftriaxona (β -lactâmicos)	O ₃	COD = 250 - 1400 mg L ⁻¹	Degradação de 95% foi alcançada em 60 min. A remoção de COD foi significativamente aumentada com o aumento do pH de 3 a 7.	Balcioglu; Ötör (2003)
Ciprofloxacina (fluoroquinolonas)	Eletroquímico	0,245 mmol L ⁻¹	Eletrodo de BDD ou anodo Pt e oxidante H ₂ O ₂ eletrogerado in situ durante 360 min, permitiram uma remoção de 96% do antibiótico	Antonin <i>et al.</i> (2015)
	Foto-Fenton + catalisador Fe-Lap-RD	0,15 mmol L ⁻¹	A degradação foi aumentada com o aumento de H ₂ O ₂ e a carga de catalisador. Na condição ótima, degradação completa foi alcançada	Bobu <i>et al.</i> (2008)

Fontes: Homem; Santos (2011); Mendez *et al.* (2016); Lofrano *et al.* (2017).

Tabela 3 (cont.) – Remoção de antibióticos através de processos oxidativos avançados (POA).

Antibióticos/Classe	POA	Concentração inicial	Resultado	Referências
Ciprofloxacina (fluoroquinolonas)	O ₃ O ₃ /H ₂ O ₂	23 - 136 µmol L ⁻¹	Degradação de 95% foi obtida para a maior concentração de O ₃ e menor concentração do antibiótico. A adição de pequena quantidade de H ₂ O ₂ melhora a degradação	De Witte <i>et al.</i> (2009)
	UV-A/TiO ₂	33 mg L ⁻¹	O curto tempo de meia vida sugere que a ciprofloxacina pode ser decomposta rapidamente na presença de fotocalisador ou de radiação UV	An <i>et al.</i> (2010)
Claritomicina (macrolídeos)	O ₃	0,1 mmol L ⁻¹	A remoção da atividade inibitória do antibiótico e dos seus subprodutos foi alcançada empregando-se uma dose teórica estequiométrica de O ₃ para a mineralização completa da claritomicina, 100 vezes menor.	Lange <i>et al.</i> (2006)
Claritomicina (macrolídeos) Eritromicina (macrolídeos) Roxitromicina (macrolídeos)	O ₃	0,2 - 0,6 µg L ⁻¹	Degradação entre 76 e 92% dos antibióticos e uma remoção da atividade antimicrobiana.	Ternes <i>et al.</i> (2003)
Cloranfenicol (anfenicóis)	UV-A/TiO ₂	25 mg L ⁻¹	A melhor combinação da remoção de cloranfenicol e seus subprodutos resultou em 1,6 g L ⁻¹ de TiO ₂ para 120 min, com toxicidade média residual de aproximadamente 10%.	Lofrano <i>et al.</i> (2016)
	UV-A/TiO ₂ UV-A/ZnO	50 mg L ⁻¹	ZnO e TiO ₂ P-25 foram os melhores catalisadores, resultando em uma degradação do antibiótico de 90% após 90 min de irradiação.	Chatzitakis <i>et al.</i> (2008)
	UV-C/H ₂ O ₂	20 mg L ⁻¹	Degradação de 98% foi obtido após 1,5 horas de exposição ao UVC com 3 mmol L ⁻¹ de peróxido de hidrogênio.	Da Rocha <i>et al.</i> (2013)
Clorotetraciclina (β-lactâmicos)	Eletroquímico	80 mg L ⁻¹	Remoção de 96% do antibiótico com o ânodo Ti-PbO ₂ em 49 min.	Zaviska <i>et al.</i> (2013)
Enrofloxacin (fluoroquinolonas)	Eletro-Fenton fotoeletro-Fenton solar	158 - 790 mg L ⁻¹	Nas melhores condições eletroquímicas empregadas, foram alcançadas: 67% do TOC com H ₂ O ₂ eletrogerado; remoção de 78% do TOC em eletro-Fenton; remoção de 96% do TOC em foto-eletro-Fenton e 97% de remoção do TOC em foto-eletro-Fenton solar.	Guinea <i>et al.</i> (2010)
	Eletroquímico O ₃ Fenton	1580 mg L ⁻¹	Todos os tratamentos reduziram o conteúdo orgânico do efluente sintético. O processo eletroquímico foi o mais eficiente na mineralização e o O ₃ na remoção de COD. O processo Fenton conduziu a formação de produtos persistentes.	Guinea <i>et al.</i> (2009)

Fontes: Homem; Santos (2011); Mendez *et al.* (2016); Lofrano *et al.* (2017).

Tabela 3 (cont.) – Remoção de antibióticos através de processos oxidativos avançados (POA).

Antibióticos/Classe	POA	Concentração inicial	Resultado	Referências
Enrofloxacin (fluoroquinolonas)	O ₃	COD = 250 - 1400 mg L ⁻¹	Após 60 min, 95% de remoção do antibiótico foram alcançados. A biodegradabilidade dos produtos foi melhor do que o composto original.	Balcioglu; Ötger (2003)
Epirubicina (antraciclina)	Eletroquímico	17,9 mg L ⁻¹	Degradação do antibiótico com a remoção da citotoxicidade, mutagenicidade e atividade microbiológica em 360 min.	Hirose <i>et al.</i> (2005)
Eritromicina (macrolídeos) Tilosina (macrolídeos)	O ₃ O ₃ /H ₂ O ₂	40 mg L ⁻¹	A ozonização resultou na total remoção dos antibióticos em 20 min. A adição de H ₂ O ₂ acelerou substancialmente a degradação.	Lin <i>et al.</i> (2009)
Espectinomicina (aminoglicosídeos)	O ₃	1 mmol L ⁻¹	A taxa de degradação aumenta com o aumento do pH. Degradação total do composto original foi alcançada em 10 s.	Qiang <i>et al.</i> (2004)
Flumequina (fluoroquinolonas)	UV-A/TiO ₂	19,1-95,7 µmol L ⁻¹	Na melhor condição, a flumequina foi completamente eliminada em 30 min. Após curto período de tratamento, os subprodutos podem ser tratados por sistemas biológicos convencionais.	Palominos <i>et al.</i> (2008)
Levofloxacin (fluoroquinolonas)	Fenton Fenton/S ₂ O ₈ ²⁻	27,1 mg L ⁻¹	Rápida decomposição da levofloxacin (LFX) foi observada durante os primeiros minutos para Fenton/S ₂ O ₈ ²⁻ e uma diminuição gradual durante o tempo de reação restante de 180 min. O melhor desempenho foi alcançado na proporção levofloxacin (LFX)/H ₂ O ₂ /Fe ²⁺ m/m/m de 1/20/2 e completa eliminação do composto-alvo após 6 min.	Epold <i>et al.</i> (2015)
Lincomicina (lincosamidas)	Eletroquímico	25 - 50 mg L ⁻¹	Difícil oxidação da lincomicina devido à pouca desprotonação, alcançando um COD de 30%.	Jara <i>et al.</i> (2007)
	Foto-Fenton	25 mg L ⁻¹	Degradação melhorada com a adição de ferrioxalato em comparação ao Fe(NO ₃) ₃ e FeSO ₄ . Antibiótico foi totalmente removido após 8 min com ferrioxalato.	Bautitz; Nogueira (2010)
	O ₃	1 mmol L ⁻¹	A taxa de degradação aumenta com o aumento do pH. Degradação total do composto original foi alcançada em 1 s.	Qiang <i>et al.</i> (2004)
	UV/TiO ₂	10 - 50 mg L ⁻¹	Degradação de 98% do antibiótico após 2 h. Remoção de 60% do TOC foi alcançada na melhor condição empregada.	Addamo <i>et al.</i> (2005)
Ofloxacin (fluoroquinolonas)	Eletroquímico	25 - 50 mg L ⁻¹	Degradação total com todos os ânodos testados (Aço inoxidável como cátodo e Ti/Pt, grafite, Ti/IrO ₂ /Ta ₂ O ₅ ou 3D GAC como ânodo).	Jara <i>et al.</i> (2007)

Fontes: Homem; Santos (2011); Mendez *et al.* (2016); Lofrano *et al.* (2017).

Tabela 3 (cont.) – Remoção de antibióticos através de processos oxidativos avançados (POA).

Antibióticos/Classe	POA	Concentração inicial	Resultado	Referências
Oxacilina (β -lactâmicos)	Ultrassom	203 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Degradação completa do antibiótico e da atividade antimicrobiana residual após 120 min.	Serna-Galvis <i>et al.</i> (2016)
Oxitetraciclina (tetraciclinas)	UV-A	10 - 40 mg L^{-1}	Degradação de 90% do antibiótico, após 240 min de irradiação e 14% de remoção de TOC. Inibição da atividade antimicrobiana de 47%.	Shaojun <i>et al.</i> (2008)
Penicilina (β -lactâmicos)	O_3	COD = 710 mg L^{-1}	A degradação do antibiótico aumenta com o aumento do pH. A redução do TOC se manteve baixa e a DBO_5/COD aumentou após 40 min.	Cokgor <i>et al.</i> (2004)
	O_3 UV Fenton Fenton-like foto-Fenton like	COD = 1555 mg L^{-1}	O_3 é dependente do pH, as melhores remoções de COD foram de 49% e TOC em condições alcalinas, enquanto a fotólise foi o método menos eficaz. Remoções relativamente altas de COD e TOC foram obtidas com os processos Fenton, sendo que a presença da radiação UV melhora significativamente a sua eficácia. Pouca melhora da biodegradabilidade de todos os processos.	Arslan-Alaton; Dogruel (2004)
Penicilina G (β -lactâmicos)	Fenton-like foto-Fenton like	COD = 600 mg L^{-1}	Remoção de 56% de COD e 42% de TOC na melhor condição para foto-Fenton like e remoção de 44% de COD e 5% de TOC para Fenton-like	Arslan-Alaton; Gurses (2004)
	O_3	COD = 200 - 600 mg L^{-1}	Remoções de 36% de TOC e 37% de COD foram alcançadas em pH neutro após 1 h.	Arslan-Alaton; Coglayan (2005)
	O_3 $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$	COD = 600 mg L^{-1}	Remoções de COD de 37% e 76% foram obtidas respectivamente para ozonização e peroxonização, em pH neutro após 1 hora.	Arslan-Alaton; Coglayan (2006)
Penicilina V (β -lactâmicos)	O_3	COD = 250 - 1400 mg L^{-1}	Degradação de 40% do antibiótico e remoção de 40% do TOC foram alcançadas.	Balcioglu; Ötker (2003)
Roxitrocmicina (macrolídeos)	O_3	0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$	A matriz aquosa afeta a estabilidade do O_3 , formação de radical e "scavenging". Degradação acima de 90% foi alcançada.	Huber <i>et al.</i> (2003)

Fontes: Homem; Santos (2011); Mendez *et al.* (2016); Lofrano *et al.* (2017).

Tabela 3 (cont.) – Remoção de antibióticos através de processos oxidativos avançados (POA).

Antibióticos/Classe	POA	Concentração inicial	Resultado	Referências
Sulfacetamida (sulfonamidas) Sulfadiazina (sulfonamidas) Sulfametaxazol (sulfonamidas) Sulfatiazol (sulfonamidas)	UV-A/TiO ₂	0,1 mmol L ⁻¹	Todos os compostos foram degradados completamente após 300 min de irradiação. A remoção de TOC variou entre 30 a 70%, com intermediários menos tóxicos do que o composto de origem.	Baran <i>et al.</i> (2006)
Sulfacloropiridazina (sulfonamidas) Sulfadimetoxina (sulfonamidas) Sulfamerazina (sulfonamidas) Sulfatiazol (sulfonamidas)	UV-C O ₃	50 mg L ⁻¹	Ozonização em doses típicas foi efetiva para a remoção de todos os compostos (> 90%).	Adams <i>et al.</i> (2002)
Sulfadiazina (sulfonamidas) Sulfametaxazol (aulfonamidas) Sulfapiridina (sulfonamidas) Sulfatiazol (sulfonamidas)	O ₃	2 µg/L	Degradação de 90-99% de todos os antibióticos foram alcançadas com dose de O ₃ > 2mg L ⁻¹ .	Huber <i>et al.</i> (2005)
Sulfadiazina (sulfonamidas) Sulfadimetoxina(sulfonamidas) Sulfamerazina (sulfonamidas) Sulfatiazol (sulfonamidas)	UV/TiO ₂	15 mg L ⁻¹	Após 30 min de irradiação, sulfadimetoxina e sulfatiazol foram completamente degradados. Eficiências de remoção de 80 e 90% foram alcançadas para sulfadiazina e sulfamerazina, respectivamente.	Calza <i>et al.</i> (2004)
Sulfadimetoxina (sulfonamidas) Sulfametazina (sulfonamidas) Sulfamethoxazol (sulfonamidas)	O ₃ O ₃ /H ₂ O ₂	40 mg L ⁻¹	A adição de H ₂ O ₂ acelerou substancialmente a degradação. A ozonização resultou em total remoção dos antibióticos em 20 min	Lin <i>et al.</i> (2009)
	Foto-Fenton	50 mg L ⁻¹	Após 2 min, degradação total da sulfametazina foi alcançada.	Pérez-Moya <i>et al.</i> (2010)
Sulfametazina (sulfonamidas)	UV/TiO ₂ UV/ZnO UVA/TiO ₂ /H ₂ O ₂	10 - 70 mg L ⁻¹	O aumento da quantidade de catalisador e a presença de H ₂ O ₂ aumentam a taxa de degradação. Quase a completa degradação foi alcançada para ambos os métodos nas melhores condições. TiO ₂ é mais eficiente que ZnO para remoção e mineralização do antibiótico.	Kaniou <i>et al.</i> (2005)

Fontes: Homem; Santos (2011); Mendez *et al.* (2016); Lofrano *et al.* (2017).

Tabela 3 (cont.) – Remoção de antibióticos através de processos oxidativos avançados (POA).

Antibióticos/Classe	POA	Concentração inicial	Resultado	Referências
Sulfametizol (sulfonamidas) Sulfametoxazol (sulfonamidas) Sulfamoxol (sulfonamidas) Sulfatiazol (sulfonamidas) Sulfisoxazol (sulfonamidas)	UV Fenton	100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Fotólise direta foi altamente pH dependente. Sulfametoxazol e sulfisoxazol foram mais prontamente fotodegradados em meio ácido e sulfametiazol e sulfatiazol em meio básico. Todas as sulfonamidas foram degradadas pelo reagente de Fenton.	Boreen <i>et al.</i> (2004)
Sulfametoxazol (sulfonamidas)	Eletroquímico	0,208 nmol L^{-1}	Aplicação de ânodo em BDD e cátodo em <i>carbon-felt</i> , pH 3 possibilitaram a remoção de 94% do antibiótico.	Dirany <i>et al.</i> (2010)
	Foto-Fenton	50 mg L^{-1}	O aumento da concentração de Fe permitiu melhora discreta nas velocidades de degradação e mineralização do poluente. O aumento da concentração de H_2O_2 até 120 mg L^{-1} reduziu a toxicidade da amostra.	Trovó <i>et al.</i> (2011)
	Foto-Fenton	200 mg L^{-1}	Condições de 50 a 1000 mg L^{-1} de H_2O_2 foram testadas. Degradação, mineralização e biodegradabilidade foram aumentadas com o aumento da concentração de H_2O_2 . Com 400 mg L^{-1} de H_2O_2 , remoção de 50% do TOC.	González <i>et al.</i> (2007)
	Foto-Fenton solar	50 mg L^{-1}	O aumento da concentração de ferro melhora levemente a degradação e mineralização do micropoluentes. A remoção de COD foi de 80% em solução com água destilada e 50% para água do mar.	Trovó <i>et al.</i> (2009)
	O_3	0,2 - 0,6 mg L^{-1}	Degradação de 92% do antibiótico, e remoção da atividade antimicrobiana através de testes com micro-organismos relevantes.	Ternes <i>et al.</i> (2003)
	O_3	200 mg L^{-1}	Após 15 min foi alcançada a completa degradação do antibiótico, mas uma mineralização de apenas 10% foi observada.	Dantas <i>et al.</i> (2008)
	O_3 $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$	0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Eficiência de remoção > 90% do antibiótico. A matriz aquosa afetou a estabilidade de O_3 e a formação de radicais.	Huber <i>et al.</i> (2003)
	O_3 $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$	0,150 mmol L^{-1}	Degradação completa do sulfametoxazol de ambos os processos com doses de O_3 de 0,2 mmol L^{-1} .	Gómez-Ramos <i>et al.</i> (2011)
	UV	10 mg L^{-1}	Remoção de 98% do antibiótico após 30 h de irradiação. No entanto, alta toxicidade dos foto-produtos foi observada.	Trovó <i>et al.</i> (2009)
	UV-A/ TiO_2	100 mg L^{-1}	Degradação de 82% do sulfametoxazol e 23% de remoção de TOC foram alcançadas com 0,5 $\text{g TiO}_2 \text{ L}^{-1}$.	Abellán <i>et al.</i> (2007)

Fontes: Homem; Santos (2011); Mendez *et al.* (2016); Lofrano *et al.* (2017).

Tabela 3 (cont.) – Remoção de antibióticos através de processos oxidativos avançados (POA).

Antibióticos/Classe	POA	Concentração inicial	Resultado	Referências
Sulfametoxazol (sulfonamidas)	UV-A/TiO ₂	5 - 500 mmol L ⁻¹	Degradação total do antibiótico, alcançada em 60 min.	Hu <i>et al.</i> (2007)
	UV-A/TiO ₂	25 - 200 mg L ⁻¹	Degradação de 90% do antibiótico e remoção de 40% do TOC. Baixa biodegradabilidade do efluente.	Abellán <i>et al.</i> (2007)
Tetraciclina (tetraciclina)	Foto-Fenton	24 mg L ⁻¹	Foto-Fenton com irradiação artificial ou solar alcançou completa degradação do antibiótico em 1 min.	Bautitz; Nogueira (2007)
	UV UV/TiO ₂	10 - 50 mg L ⁻¹	Após 5 h, 70% de tetraciclina foram degradadas em fotólise. Na presença de TiO ₂ mais de 98% de degradação foram obtidos após 2 h	Addamo <i>et al.</i> (2005)
	UV-A	10 - 40 mg L ⁻¹	Após 300 min de irradiação, somente 15% de remoção de TOC foram obtidos com conversão de 73% da tetraciclina.	Jiao <i>et al.</i> (2008)
	UV-A UV/TiO ₂ UV/ZnO	20 mg L ⁻¹	Após 15 min de irradiação, na ausência de catalisador, 80% de degradação foi alcançada. No mesmo intervalo de tempo de irradiação, degradação completa foi alcançada com TiO ₂ . Para UV/ZnO, degradação completa foi observada após 10 min.	Palominos <i>et al.</i> (2009)
	UV-A UV-C UV/TiO ₂	40 mg L ⁻¹	A degradação do antibiótico e remoção de TOC foram influenciadas pela fonte de irradiação (UV 254 nm > solar > UV 365 nm). Com UV-C/TiO ₂ e TiO ₂ solar foram alcançados 100% de degradação e para UV-A/TiO ₂ , 50% de degradação do composto original.	Reyes <i>et al.</i> (2006)
	Eletroquímico	20 mg L ⁻¹	Elevada remoção (99%) do antibiótico após 60 min de tratamento.	Moreira <i>et al.</i> (2014)
Trimetoprim (sulfonamidas)	O ₃	0,2 - 0,6 µg L ⁻¹	Degradação de 85% do antibiótico. A atividade antimicrobiana foi removida através de testes com micro-organismos relevantes.	Ternes <i>et al.</i> (2003)
	UV-A O ₃	50 mg L ⁻¹	A fotólise direta não foi eficaz para remoção do antibiótico. Remoção do antibiótico superior a 90% com uso de O ₃ .	Adams <i>et al.</i> (2002)
Vancomicina (glicopeptídeos)	UV-A/TiO ₂	50 mg L ⁻¹	Remoção total do antibiótico foi alcançada após 2 h de irradiação para duas concentrações de catalisadores.	Lofrano <i>et al.</i> (2014)

Fontes: Homem; Santos (2011); Mendez *et al.* (2016); Lofrano *et al.* (2017).

Embora haja um grande número de pesquisas que investigam a eficiência desses processos, a maioria deles foi estudada em escala de laboratório, enquanto há poucos trabalhos que são abordados em escala piloto ou em uma escala maior. Os processos bem sucedidos em escala de bancada não garantem o sucesso em escala real. Dessa forma, estudos conduzidos em escala piloto podem fornecer conhecimentos mais amplos acerca de um tratamento particular (BUI *et al.*, 2016). Uma vez que os métodos de tratamento para a remoção de antibióticos devem ser aplicados para qualquer planta de tratamento de água ou efluentes, é extremamente importante conduzir esses estudos em matrizes aquosas reais.

Entretanto, a grande desvantagem compartilhada por todos os POA é o alto custo de operação. Consequentemente, apesar de serem tecnologias poderosas, apresentam uma aplicação limitada em escala comercial. Por outro lado, com o advento de lâmpadas UV mais eficientes, catalisadores ativos no espectro visível, melhorias em projeto de reatores, auxílio da fluidodinâmica computacional e modelagem do campo de radiação, esses processos têm tido grande potencial para aplicação em maior escala (CHONG *et al.*, 2010). Além disso, o uso de energia solar pode reduzir custos.

Para aplicações em grande escala, somente os POA O_3 , UV/ H_2O_2 , O_3/H_2O_2 e UV/ O_3 têm sido geralmente considerados (BUI *et al.*, 2016). O processo O_3 /UV apresenta vantagens em relação ao UV/ H_2O_2 pelo fato do ozônio possuir potencial elevado de oxidação e uma absorção de radiação, em 254 nm, aproximadamente 170 vezes maior que a do H_2O_2 . No entanto, o consumo elevado de energia para a produção de O_3 no processo O_3 /UV limita sua aplicação na prática (BUI *et al.*, 2016). Segundo Hollender *et al.* (2009), a geração de ozônio requer inicialmente consumo energético para a produção de ar seco ou oxigênio (0,01 a 0,015 kWh por m^3 de oxigênio puro produzido) e uma demanda energética de 12 kWh para cada kg de O_3 produzido.

O processo UV/ H_2O_2 é uma tecnologia usualmente empregada em grande escala. A vantagem do uso do H_2O_2 em relação ao O_3 é sua maior estabilidade, possibilitando armazenar o oxidante antes de ser utilizado (BUI *et al.*, 2016). Porém, esse método não é apropriado para o tratamento de águas residuárias com baixa transmissão de radiação UV, dado o baixo coeficiente de absorção molar do H_2O_2 em 254 nm. O processo combinado de H_2O_2 e O_3 é considerado um POA com maior eficiência energética e mais apropriado para tratamento de águas com transmitância pequena da radiação UV (LEE *et al.*, 2009). Métodos combinados como a oxidação fotocatalítica solar podem reduzir custos e melhorias

significativas podem ser alcançadas (XIAO *et al.*, 2015). Sistemas integrados de POA com outros processos avançados de tratamento, como separação com membranas e adsorção em carvão ativado, têm sido estudados para a remoção completa de micropoluentes, permitindo que um método complemente o tratamento com suas vantagens, superando os desafios do outro processo (BO *et al.*, 2016).

Embora os tratamentos com processos oxidativos avançados apresentem um alto custo para alcançar a completa mineralização dos compostos orgânicos, a oxidação parcial do composto inicial a componentes intermediários menos tóxicos é uma alternativa viável. Desse modo, os antibióticos podem ser convertidos em intermediários que sejam biodegradáveis no meio ambiente ou em produtos inócuos ao ambiente aquático e à saúde humana. Entretanto, a oxidação de contaminantes orgânicos pode em alguns casos resultar na formação de intermediários mais tóxicos e persistentes do que o composto original (BUI *et al.*, 2016), inviabilizando a aplicação desses processos.

3.2.4 Fotólise Direta

Na fotólise direta, o poluente orgânico é destruído pela absorção da radiação UV incidente, sofrendo degradação a partir do seu estado excitado (PARSONS, 2005). As reações geralmente envolvidas estão representadas pelas Equações 1 a 7, em que RX representa um composto orgânico contendo um grupo funcional X:

Na Equação 1, a absorção de um fóton pelo contaminante RX leva esse composto ao estado eletrônico excitado RX^* , mais energético, o qual pode sofrer a desativação ao estado fundamental por processos radiativos (fluorescência e fosforescência), processos não-radiativos ou reações químicas. A etapa de reação predominante (Equação 2) é a cisão homolítica de ligações químicas e ocorre seguida ao aprisionamento (“cage”) de espécies ativas por moléculas de solvente. Os radicais escapam do “cage” e sofrem reações de oxidação/redução dependendo

da sua estrutura. Dessa forma, os poluentes orgânicos podem seguir diferentes mecanismos de reação na presença ou na ausência de oxigênio dissolvido (Equação 5). A recombinação dos radicais primários, devido ao “cage” de solvente (Equação 3) ocorre com grande probabilidade e a cisão heterolítica da ligação (Equação 4) em solventes polares como a água pode ocorrer através de processos intramoleculares de transferência de elétrons. Processos de transferência de elétrons e de energia na presença de oxigênio dissolvido podem ocorrer (Equações 6 e 7, respectivamente), no entanto, requerem estados tripleto excitados com tempos de vida relativamente longos (PARSONS, 2005).

3.2.5 Processo UV/H₂O₂

O mecanismo foto-oxidativo pelo processo UV/H₂O₂ envolve uma série de reações elementares radicalares, iniciada pela fotólise do peróxido de hidrogênio, o qual acarreta a produção de radicais hidroxil. As reações envolvidas na decomposição de H₂O₂ pela radiação UV podem ser explicadas basicamente pelo mecanismo de Haber-Weiss (OPPENLÄNDER, 2003), segundo quatro etapas, conforme demonstrado nas Equações 8 a 13:

A Equação 9 indica que quando a concentração de H₂O₂ é elevada o peróxido de hidrogênio atua como consumidor de radicais (*radical scavenger*). Desse modo, a otimização da concentração desse oxidante e do fluxo de emissão de fótons constitui um dos fatores determinantes na eficácia da degradação dos contaminantes alvos no processo UV/H₂O₂. Além disso, a taxa de decomposição fotoquímica do H₂O₂ é influenciada pelo pH. Em condições alcalinas, ocorre a desprotonação do H₂O₂, segundo a reação de equilíbrio ácido-base envolvendo as espécies H₂O₂/HO₂⁻. A espécie HO₂⁻ apresenta coeficiente de absorção molar significativamente maior que o H₂O₂ (12 vezes maior) e compete por fótons emitidos no sistema. Dessa forma, a dissociação fotoquímica de HO₂⁻ em HO· e O^{•-} predomina. Consecutivamente, o ânion radical O^{•-} reage com a água para formar o radical HO· e o ânion

HO^- (OPPENLÄNDER, 2003). Portanto, esse mecanismo desencadeado pela prevalência da espécie HO_2^- é menos efetivo para a degradação de compostos orgânicos do que a geração inicial de dois radicais hidroxil através da cisão fotoquímica do H_2O_2 .

Vários modelos cinéticos têm sido propostos para prever a decomposição de compostos orgânicos através do processo UV/ H_2O_2 . Os mecanismos geralmente considerados envolvem as reações envolvendo radicais livres; absorção de radiação UV dos componentes geralmente presentes na matriz aquosa; fotólise direta da matéria orgânica natural e dos compostos alvos; *scavenging* ou sequestro do radical hidroxil pela matéria orgânica natural e pelas espécies carbonatadas; e a gradual diminuição do pH como resultado da formação de ácidos (SONG *et al.*, 2008; HOWE *et al.*, 2012). A suposição do modelo cinético em estado pseudo-estacionário tem sido adotada por diversas pesquisas (LIAO e GUROL, 1995; Glaze *et al.*, 1995; STEFAN *et al.*, 1996; MARIANI *et al.*, 2015), segundo a qual se considera que a taxa de formação das espécies radicalares é igual à taxa de consumo, de modo que a taxa da reação global de produção de radicais é considerada nula.

Por outro lado, modelos cinéticos mais rigorosos têm sido investigados. Crittenden *et al.* (1999) propuseram um modelo detalhado do processo através da elucidação de 44 reações elementares para prever a degradação de compostos-alvo estudados. Esse modelo assume o estado não estacionário, compreendendo as reações fotoquímicas de iniciação, as reações elementares químicas e fotoquímicas e incorpora os efeitos da matéria orgânica natural e das mudanças de pH, demonstrando a complexidade dos mecanismos reacionais envolvidos. Recentemente, Rubio-Clemente *et al.* (2017) propuseram um modelo cinético em que se considera o impacto das espécies radicalares $\text{HO}^\bullet$, $\text{HO}_2^\bullet$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, $\text{CO}_3^{\bullet-}$, $\text{SO}_4^{\bullet-}$, $\text{H}_2\text{ClO}^\bullet$, $\text{Cl}^\bullet$ e $\text{Cl}_2^{\bullet-}$ no desempenho do processo UV/ H_2O_2 na degradação de um poluente orgânico. Adicionalmente, integraram-se os efeitos da matéria orgânica dissolvida, da absorção da radiação UV dos subprodutos, do sequestro de radicais e os efeitos das mudanças do pH na solução devido à formação de ácidos. Desse modo, os pesquisadores estudaram um total de 22 espécies químicas diferentes em um conjunto de 51 reações elementares, compostas por reações de fotólise (primeira ordem), reações de equilíbrio ácido-base e reações de segunda ordem.

O modelo cinético dinâmico apresentado por Edalatmanesh *et al.* (2007) em solução sintética destaca as principais espécies envolvidas no mecanismo UV/ H_2O_2 na degradação de um contaminante alvo. Embora no estudo se tenha investigado a degradação do fenol, o modelo pode ser estendido para outros compostos orgânicos, conforme mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 – Reações envolvidas no processo UV/H₂O₂. Os parâmetros indicados por Φ e k_R representam, respectivamente, o rendimento quântico e as constantes de segunda ordem da reação considerada.

Número da reação	Reação	Parâmetro Cinético
R1	$H_2O_2 \xrightarrow{h\nu} 2 HO \bullet$	$\Phi_{H_2O_2}$
R2	$H_2O_2 + HO \bullet \xrightarrow{k_{R2}} H_2O + HO_2 \bullet$	$k_{R2} = 2,7 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$
R3	$HO_2^- + HO \bullet \xrightarrow{k_{R3}} HO^- + HO_2 \bullet$	$k_{R3} = 7,5 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$
R4	$H_2O_2 + HO_2 \bullet \xrightarrow{k_{R4}} HO \bullet + H_2O + O_2$	$k_{R4} = 3,0 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$
R5	$H_2O_2 + O_2^- \bullet \xrightarrow{k_{R5}} HO \bullet + O_2 + HO^-$	$k_{R5} = 0,13 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$
R6	$O_2^- \bullet + H^+ \xrightarrow{k_{R6}} HO_2 \bullet$	$k_{R6} = 1,0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$
R7	$HO_2 \bullet \xrightarrow{k_{R7}} O_2^- \bullet + H^+$	$k_{R7} = 1,58 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$
R8	$HO \bullet + HO \bullet \xrightarrow{k_{R8}} H_2O_2$	$k_{R8} = 5,5 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$
R9	$HO \bullet + HO_2 \bullet \xrightarrow{k_{R9}} O_2 + H_2O$	$k_{R9} = 6,6 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$
R10	$HO_2 \bullet + HO_2 \bullet \xrightarrow{k_{R10}} H_2O_2 + O_2$	$k_{R10} = 8,3 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$
R11	$HO_2 \bullet + O_2^- \bullet \xrightarrow{k_{R11}} HO_2^- + O_2$	$k_{R11} = 9,7 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$
R12	$HO \bullet + O_2^- \bullet \xrightarrow{k_{R12}} O_2 + HO^-$	$k_{R12} = 7,0 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$
R13	$Composto\ orgânico + HO \bullet \xrightarrow{k_{R13}} Intermediários \xrightarrow{hv} CO_2 + H_2O$	k_{R13}
R14	$Composto\ orgânico \xrightarrow{hv} Intermediários \rightarrow CO_2 + H_2O$	$\Phi_{Composto\ orgânico}$
R15	$H_2O_2 \rightleftharpoons H^+ + HO_2^-$	$pK_a = 11,6$

Modificado de Edalatmanesh *et al.* (2007).

A sequência de reações da Tabela 4 amplia os mecanismos de iniciação, propagação e terminação de Haber-Weiss. A reação R15 representa a equação de equilíbrio da dissociação do peróxido de hidrogênio em água, no qual o H₂O₂ e a espécie HO₂⁻ formam um par conjugado ácido-base. Os radicais hidroxil gerados pela fotólise do H₂O₂ reagem rapidamente com o composto orgânico na reação R13. Além disso, o composto orgânico também pode ser decomposto pela fotólise direta conforme a reação R14. As velocidades com que as duas

reações fotolíticas ocorrem dependem da eficiência dessas transformações e da capacidade de absorção de radiação tanto das moléculas de H_2O_2 quanto do composto orgânico alvo. Esses dois parâmetros são quantificados respectivamente pelo rendimento quântico (Φ) e pelo coeficiente de absorção molar (ϵ), sendo específicos para cada comprimento de onda (λ). Os valores de coeficiente de absorção e rendimento quântico determinados na literatura para H_2O_2 em solução aquosa estão mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores do coeficiente de absorção molar e do rendimento quântico do H_2O_2 .

Parâmetro	Comprimento de onda (nm)	Valor	Referência
Coeficiente de Absorção	254	$18,7 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	Weeks e Matherson (1956)
	254	$19,6 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	Glaze <i>et al.</i> (1987)
	200 – 204	$179,21 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	Bolton (1999)
	250 – 254	$19,02 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	
	295 – 299	$0,88 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	
Rendimento Quântico	254	$0,50 \text{ mol Einstein}^{-1}$	Bolton e Carter (1994)
	313	$0,30 \text{ mol Einstein}^{-1}$	

A aplicação de modelos mais rigorosos do processo UV/ H_2O_2 para a degradação específica de compostos farmacêuticos em meio aquoso foi estudada por Wols *et al.* (2014). Esses pesquisadores levaram em consideração as reações dos constituintes presentes em matrizes aquosas reais como carbonato, nitrato, matéria orgânica natural, além das reações dos radicais hidroxil e carbonato com os fármacos. O modelo foi validado experimentalmente para 36 micropoluentes farmacêuticos (incluindo nove antibióticos), dentre os quais apenas cinco apresentaram uma discrepância entre os resultados medidos e preditos, revelando uma boa abrangência dos mecanismos reacionais propostos. Os parâmetros estimados para cada um dos 36 compostos incluem o rendimento quântico, o coeficiente de absorção molar e as constantes cinéticas de segunda ordem dos radicais carbonato e hidroxil.

3.3 BACITRACINA

A bacitracina foi descoberta em 1943 através do debridamento da ferida de uma menina de sete anos de idade. Margaret Tracey sofreu uma fratura exposta da tíbia provocada por um atropelamento e foi levada para o Hospital Presbiteriano, nos EUA. Na avaliação da flora bacteriana de feridas da paciente nesse hospital, identificou-se que o tecido danificado da perna estava infectado pela bactéria da espécie *Staphylococcus aureus*. Em uma posterior análise da infecção, notou-se que o estafilococo anteriormente presente havia desaparecido. Em seu lugar, desenvolveu-se uma determinada espécie de bacilo que produzia um composto com potente atividade antibiótica (JOHNSON; ANKER; MELENEY, 1945). Em homenagem à paciente, esse princípio ativo foi nomeado “bacitracina”, pela combinação de baci, proveniente da bactéria que a sintetiza, *Bacillus licheniformis* (variedade “Tracy I”) em adição a trac, do sobrenome da paciente (MING; EPPERSON, 2002).

3.3.1 Bacitracina: Peptídeos Não-ribossomais

A bacitracina está inserida no grupo dos antibióticos peptídeos não-ribossomais (NRP, do inglês *nonribosomal peptides*), que constituem um grupo de biomoléculas formadas por peptídeos que não são sintetizadas por ribossomos. Uma vez que esses peptídeos são independentes da codificação via RNA mensageiro, eles não se limitam aos 20 aminoácidos encontrados nas proteínas e incorporam aminoácidos não proteinogênicos (CABOCHE *et al.*, 2008; LUNDEEN *et al.*, 2016). Mais de 300 aminoácidos foram descobertos na natureza (AKRAM *et al.*, 2011) e dessa forma, os NRP apresentam uma grande diversidade na composição dos seus monômeros, constituindo-se por estruturas geralmente complexas. Ao contrário dos clássicos peptídeos ribossomais que são lineares, essas biomoléculas apresentam estruturas com variadas ramificações, segmentos cíclicos ou policíclicos (CABOCHE *et al.*, 2008; LUNDEEN *et al.*, 2016). A plataforma *Norine*, que inclui uma base de dados online dedicada somente aos peptídeos não ribossomais, registra uma quantidade atual de 1186 peptídeos extraídos da literatura científica (NONRINE, 2017)

Os NRP são sintetizados por bactérias e fungos através de um conjunto de complexos enzimáticos presentes nesses organismos, denominados sintetases peptídicas não-ribossomais. Cada sintetase é responsável pela incorporação de um aminoácido específico na cadeia final de peptídeo (CABOCHE *et al.*, 2008). Dependendo dos tipos de aminoácidos e da combinação

deles na estrutura desses antibióticos, o mecanismo de ação pode mudar drasticamente (MING; EPPERSON, 2002). Essa grande flexibilidade estrutural confere aos NRP uma valiosa fonte de ampla variedade de atividades biológicas. Além do uso como antibiótico, a exemplo da bacitracina e vancomicina, outras propriedades farmacológicas são exploradas, como a atividade imunossupressora (ciclosporina) e a atividade antitumoral (bleomicina). Outros compostos com importantes funções incluem os sideróforos (pioverdina e enterobactina); toxinas (microscistina) e os surfactantes (surfactina) (LUNDEEN *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, devido a essas características particulares, os antibióticos peptídicos têm sido alvo crescente de pesquisas que envolvem a engenharia biossintética para o desenvolvimento de novos antibióticos. A diversidade de combinação das estruturas modulares dessas moléculas representa uma fonte valiosa de informações para o desenvolvimento de proteínas sintéticas através da imitação dessas moléculas (KRIES *et al.*, 2015;). Estudos baseados na combinação e aprimoramento da sequência peptídica para potencializar a atividade antimicrobiana indicam uma expectativa positiva diante da grande necessidade de se introduzir novos antibióticos (MAHLAPUU *et al.*, 2016; GUIMARÃES *et al.*, 2010).

3.3.2 Aplicações e Propriedades da Bacitracina

A bacitracina é um potente antibiótico peptídico e tem ação direta contra bactérias gram-positivas. Pesquisas relatam a eficácia da atuação do fármaco contra bactérias das espécies *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Clostridium difficile*, bem como arqueobactérias *Methanobacterium*, *Mathanococcus*, e *Halococcus*, e bactérias infecciosas de ostras como *Perkinsus marinus*. Quando associada a íons de um metal como o cobre, atua como antifúngico, inibindo o crescimento do mofo *Neurospora crassa* (MING; EPPERSON, 2002).

Na medicina humana, a bacitracina é principalmente utilizada de forma tópica e oftálmica, pois a absorção pelo trato gastrointestinal é bastante reduzida. Geralmente, é um ingrediente empregado na formulação de pomadas na forma de complexo de zinco (bacitracina zínica) em conjunto com os antibióticos neomicina e polimixina B. Essa associação é designada como “triplos antibióticos”, pois essas substâncias atuam de forma sinérgica na prevenção e no tratamento tópico de uma variedade de infecções de pele (ARKY, 1997). A forma em solução é destinada para tratamento de infecções oculares (CIESIOŁKA *et al.*, 2014).

A administração oral é realizada quando há necessidade de esterilização gastrointestinal e considerada segura pela pouca absorção pelo sistema digestivo (ARKY, 1997). Desse modo, a bacitracina tem sido empregada para o tratamento de infecções gastrointestinais como colite e diarreias causadas por bactérias que apresentam resistência a determinados antibióticos (MING; EPPERSON, 2002). Devido à sua nefrotoxicidade, o uso sistêmico através de injeções intramusculares é limitado, pois pode provocar danos aos rins, sendo a bacitracina empregada nesse caso somente como um último recurso (CIESIOŁKA *et al.*, 2014).

O mecanismo de ação da bacitracina é a inibição da biossíntese da parede celular bacteriana ao impedir a complexação do transportador de lipídio C55-isoprenil com o pirofosfato (STONE *et al.*, 1971). Bactérias gram-positivas normalmente apresentam uma parede celular espessa, composta por um único polissacarídeo, a qual não está presente em células eucarióticas. Essa ação antimicrobiana do antibiótico é exercida de forma seletiva nos microrganismos patógenos alvos, pois atuam na inibição da síntese da parede bacteriana celular, não afetando, portanto, as células animais (MING; EPPERSON, 2002). Ciesiołka *et al.* (2014) descobriram que a bacitracina induz à degradação da molécula de RNA, característica não apresentada por antibióticos de outras classes terapêuticas. Por essas razões, estudos que investigam os mecanismos bioquímicos da atividade da bacitracina ainda têm sido realizados para ampliar e definir a sua aplicação farmacêutica.

A ampla utilização da bacitracina zíncica consiste na sua adição em alimentos de animais, sendo caracterizada entre as substâncias que atuam como promotores de crescimento, visando melhorar o peso corporal e prevenir doenças em animais rurais (MING; EPPERSON, 2002). O emprego da bacitracina zíncica na criação de gado, aves e porcos, melhora significativamente a eficiência da produção (KÜMMERER, 2004).

As principais características do antibiótico estão apresentadas na Tabela 6. A bacitracina é solúvel em água, metanol, etanol, isopropanol, *n*-butanol e ciclohexanol, levemente solúvel em ciclohexanona e insolúvel em solventes orgânicos como acetona, éter, benzeno, clorofórmio e acetato etílico (ANKER *et al.*, 1948). A Tabela 7 apresenta os dados de solubilidade da bacitracina A e da bacitracina zíncica em solventes puros, publicados por Weiss, Andrew e Wright (1957).

Na forma pura, a bacitracina apresenta 45 unidades internacionais (UI) por miligrama. De acordo com Craig e Konigsberg (1957), a máxima atividade da bacitracina pura é de 60

unidades por miligrama. A Farmacopeia Americana recomenda valores superiores a 65 UI de bacitracina por mg, calculada em base seca. No caso do complexo de bacitracina zínica, é recomendada uma concentração de metal zinco entre 4,0 a 6,0% na mistura da bacitracina, em base seca (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2008).

Tabela 6 – Características do antibiótico bacitracina.

Propriedades		Referências
Característica	Pó higroscópico branco ou bege pálido	Sin; Wong (2003)
Fórmula molecular	$C_{66}H_{102}N_{17}O_{16}S$	Chemical Book (2016)
Massa molar	1400-1500 g mol ⁻¹	Sin; Wong (2003)
Ponto de fusão	221-225 °C	Chemical Book (2016)

Tabela 7 – Solubilidade da bacitracina e da bacitracina zínica em diferentes solventes.

Solvente	Solubilidade em mg mL ⁻¹	
	Bacitracina	Bacitracina zínica
Água	> 20	5,1
Acetona	0,75	1,0
1,4-Dioxano	0,70	0,49
Etanol	9,1	2,0
Etilenoglicol	>20	7,95
Formamida	19,9	>20
Álcool isopropílico	1,85	0,16
Metanol	>20	6,55
Piridina	9,15	4,05
Benzeno	0,025	0,065
Álcool benzílico	>20	10,35
Dissulfeto de carbono	0,30	0,30
Tetracloroeto de carbono	0,18	0,12
Clorofórmio	-	0,01
Ciclohexano	0,075	0,06
Acetato etílico	0,047	1,3
Éter dietílico	0,065	0,02
Cloreto de etileno	0,025	1,1
Álcool amílico	1,65	2,6
Isotano	0,55	0,015
Metiletilcetona	0,20	0,85
Éter de petróleo	0,35	0,025
Tolueno	0,15	0,02
Acetato de isoamilo	0,09	0,45

Fonte: Weiss; Andrew; Wright (1957).

A bacitracina pode ligar-se com diversos íons metais divalentes para formar complexos. A ordem de afinidade da ligação metálica com íon de metais divalentes é estabelecida como

$\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} \sim \text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$ (GARBUTT *et al.*, 1961). No entanto, o estudo de Castagnola *et al.*, 2004, definiu que a ordem de afinidade é de $\text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$. Esses autores levaram em consideração a dimensão dos íons para acessar a cavidade cíclica polidentada da bacitracina. Desse modo o íon divalente de zinco, que apresenta tamanho menor em relação aos outros, apresenta uma melhor acessibilidade na estrutura da molécula. A estabilidade e a atividade microbiológica são significativamente aumentadas com a complexação com cátions de metais divalentes (WATERMAN *et al.*, 2016).

O aumento da atividade do antibiótico conferida à presença do metal de zinco é provavelmente devido ao fato de que esse cátion é necessário para a formação do complexo entre a bacitracina e o transportador de lipídio pirofosfato para a subsequente inibição da síntese de parede celular bacteriana (CASTAGNOLA *et al.*, 2004). Algumas pesquisas observaram que o grupo imidazol da histidina está envolvido com a ligação do metal (GARBUTT *et al.*, 1961; LUNDEEN *et al.*, 2016). O anel de tiazolina com nitrogênio ou enxofre e o grupo amino da isoleucina também foram sugeridos como envolvidos com a ligação de metal baseada em parte na liberação de próton na titulação (MIND; EPPERSON, 2002).

3.3.3 Características Estruturais da Bacitracina

A bacitracina é constituída de uma mistura de dodecapeptídeos cíclicos, produzido por determinadas espécies de *B. licheniformis* e *Bacillus subtilis*. Inicialmente, o antibiótico era considerado como um composto único. No entanto, mais de 30 congêneres têm sido identificados, como as bacitracinas A, B, C, D, E, F, H e I, sendo o número de componentes em menor composição ainda desconhecido (MORRIS, 1994; SIEGEL *et al.*, 1994; IKAI *et al.*, 1994). O componente A representa a maior parcela da mistura de polipeptídeos e possui a maior atividade antimicrobiana entre os constituintes (NEWTON; ABRAHAM, 1953b; CRAIG; KONIGSBERG, 1957; BELL, 1992). A existência do anel tiazolina na bacitracina foi apontada como uma estrutura essencial para a atividade antimicrobiana do fármaco (NEWTON; ABRAHAM, 1953b; CRAIG; KONIGSBERG, 1957; ISHIHARA; SHIMURA, 1979).

Na literatura não há uma única designação para todos os componentes congêneres, identificados da bacitracina. Conforme as técnicas de separação foram sendo desenvolvidas e aprimoradas, o número dos componentes da mistura foi aumentando e a nomenclatura das frações menores descobertas foi ampliada.

A mistura de bacitracina foi inicialmente separada por Barry, Gregory e Craig (1948), os quais demonstraram que o antibiótico era constituído ao menos por três moléculas diferentes, utilizando-se a técnica analítica CCD (*Contercurrent Distribution*). A hidrólise do constituinte em maior quantidade revelou que a bacitracina é composta ao menos pelos aminoácidos isoleucina (Ile), leucina (Leu), ácido glutâmico (Glu), lisina (Lys), ornitina (Orn), fenilalanina (Phe), histidina (His), ácido aspártico (Asp) e cisteína (Cys). Nas pesquisas seguintes, a presença de aminoácido com configuração D foi observada durante a separação de misturas racêmicas, indicando a complexidade da mistura da bacitracina. O anel tiazolina na bacitracina foi apontado como uma estrutura essencial para a atividade antimicrobiana do fármaco (NEWTON; ABRAHAM, 1953b; CRAIG; KONIGSBERG, 1957; ISHIHARA; SHIMURA, 1979).

Nos anos 1950, a técnica CCD foi melhorada, permitindo o avanço na separação da bacitracina. Newton e Abraham (1953a) identificaram dez componentes presentes no antibiótico, designados de acordo com a ordem de separação: A, A¹, B, C, D, E, F₁, F₂, F e G. Esses pesquisadores mostraram que o espectro de absorção da bacitracina divide-se em três grupos. As bacitracinas A, B e D apresentam absorção máxima no comprimento de onda 253 nm devido à presença do anel cromóforo da tiazolina. Os componentes C e G apresentam absorção máxima em 250 nm, enquanto as bacitracinas F₁, F₂ e F₃ apresentam absorção máxima em 288 nm, por conta do anel de tiazol em vez da tiazolina. Adicionalmente, o estudo indicou que todas as bacitracinas contêm os aminoácidos cisteína, ornitina, lisina, histidina, ácido aspártico, ácido glutâmico, fenilalanina, leucina e/ou isoleucina. As bacitracinas A, B, C, G e F possuem grupos amidas, enquanto os componentes D e E praticamente não apresentam esses grupos.

A análise HPLC a partir da década de 1970 substituiu o método antigo CCD para purificação da bacitracina. Consequentemente, frações menores da bacitracina B, C, D, E e F foram identificadas e o estudo da estrutura química dos componentes foi ampliado. O método HPLC utilizado por Tsuji *et al.* (1974) separou a bacitracina em 22 componentes através do emprego de uma coluna cromatográfica de um metro de comprimento. Vários componentes da bacitracina foram separados por HPLC e os métodos foram cada vez mais aprimorados para melhorar a seletividade e reduzir o tempo de análise (TSUJI; ROBERTSON, 1975; OKA *et al.*, 1989; BELL, 1992).

Posteriormente, o uso de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, a espectrometria de massa em tandem por meio de bombardeamento por átomos rápidos e ionização por *electrospray* permitiram melhor determinação dos componentes da bacitracina e da estrutura dos congêneres. Mais de trinta componentes foram separados da mistura de bacitracina por Ikai *et al.* (1995). Isso possibilitou investigar a configuração de 13 frações menores de bacitracina nomeadas como B1, B2, B3, D1, D2, D3, E, H1, H2, H3, I1, I2 e I3. O estudo de Kang *et al.* (2001) em cromatografia capilar separou a bacitracina em mais de 50 constituintes.

Várias nomenclaturas diferentes têm sido utilizadas para classificar os congêneres da bacitracina, os quais diferem entre si apenas por um aminoácido na cadeia peptídica. Devido a essa diferença, apresentam graus variados de atividade antibacteriana (BELL, 1991; PAVLI *et al.*, 2004). Os constituintes mais conhecidos do antibiótico são as bacitracinas A, B1, B2, B3, C, D, E, F1, F2, F3 e G. Apenas as formas A, B1, B2 e B3 apresentam grande importância terapêutica, representando 95% da atividade biológica da mistura (TSUJI; ROBERTSON, 1975). A monografia da USP especifica que a mistura de bacitracina comercial deve conter mais de 40% da bacitracina A, uma combinação aproximada de 70% de bacitracina A, B1, B2 e B3 e uma concentração menor que 6% da Bacitracina F (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2008).

Por compor a maior parte da mistura de bacitracina e apresentar a maior atividade antibacteriana, várias revisões da bacitracina A (Bc-A) foram publicadas desde sua identificação. A estrutura considerada “aceitável” da Bc-A foi somente proposta em 1966, na qual foram determinadas as sete posições de aminoácidos na estrutura do anel do antibiótico (BREWER, 1980). Em geral, os componentes da bacitracina são compostos por estrutura dodecapetídica apresentando um anel heptapeptídico ligada a uma cadeia lateral de pentapeptídeos. A Figura 4 apresenta a estrutura da bacitracina, destacando os 7 aminoácidos presentes no anel e 5 na cadeia lateral, além da diferença entre as estruturas das bacitracinas A e F através da substituição dos radicais indicados na extremidade da cadeia.

Figura 4 – Estrutura química e peptídica da bacitracina A e F.

Fonte: Adaptado de LUNDEEN *et al.* (2016).

A bacitracina B se distingue da A pela substituição da isoleucina pela valina em três posições diferentes (BREWER, 1980; MORRIS, 1994; TSUJI; ROBERTSON, 1975). As bacitracinas C, D também apresentam atividade antimicrobiana, mas são menos ativas do que as bacitracinas A ou B. A substituição da valina por leucina em três determinadas posições fornece bacitracinas D e E. A Figura 5a apresenta a estrutura da bacitracina e alguns congêneres através da substituição de aminoácidos em posições específicas da cadeia.

Pesquisadores demonstraram que a bacitracina F é uma forma degradada da bacitracina A, o que se explica pela oxidação da parte aminotiazolina terminal-N para ceto-tiazol, ou seja, a desaminação oxidativa do anel de tiazolina para tiazol, conforme mostra a Figura 5b (CRAIG *et al.*, 1952; BELL, 1992). Codington (1954) apresentou que a bacitracina F é bastante estável e a conversão da bacitracina A para F é lenta na forma seca (15 a 20% em dois anos à temperatura ambiente). Por outro lado, o estudo em solução aquosa mostrou que a reação é acelerada e influenciada pela alcalinidade. A 25 °C solução com pH 7 apresentou conversão completa em trinta e dois dias.

No entanto, pesquisadores tem considerado a hipótese de que os peptídeos da bacitracina F são formados pela transformação oxidativa de vários membros da família da bacitracina. Desse modo, Craig e Konigsberg (1957) também sugeriram que a bacitracina B pode ser convertida na bacitracina F. Pavli *et al.* (2004) mostraram que a degradação de componentes isolados da bacitracina B1, B2 e B3 em temperaturas elevadas origina os produtos de degradação H1, H2 e H3(Figura 5b). Esses pesquisadores também relataram que não houve degradação oxidativa adicional dos produtos F, H1, H2 e H3.

Figura 5 – Estrutura e composição do antibiótico bacitracina. a) Estrutura de alguns congêneres da mistura de bacitracina. b) Principais vias oxidativas entre os congêneres da mistura de bacitracina.

Fontes: Sin; Wong (2003); Pavli *et al.* (2006).

As estruturas dos outros compostos presentes em frações menores da bacitracina são pouco estudadas. As bacitracinas C e G contém glicina e as bacitracinas E e G são provavelmente formadas a partir de outras bacitracinas pela hidrólise de um grupo amina (PAVLI *et al.*, 2004).

3.3.4 Bacitracina no Meio Ambiente

Há poucos estudos disponíveis na literatura quanto à ocorrência dos componentes da bacitracina no meio ambiente. De fato, a complexidade apresentada pelos peptídeos não-ribossomais dificulta a identificação desse antibiótico (LUNDEEN *et al.*, 2016), principalmente em matrizes ambientais, já que vários outros componentes podem interferir na análise. Por essas razões, é necessário garantir se a detecção ausente da bacitracina em matrizes aquosas não consiste em problemas de não identificabilidade e/ou falta de sensibilidade dos métodos analíticos empregados para avaliar todos os congêneres que compõe a mistura do antibiótico.

Kummerer e Henninger (2003) avaliaram a concentração ambiental predita de antibióticos presentes em efluentes lançados por residências e hospitais através de cálculos baseados em dados de cinco hospitais, serviços e prescrições médicas na Alemanha. O volume de antibióticos emitidos foi bastante considerável, sendo as penicilinas e as cefalosporinas os antibióticos mais presentes, enquanto a bacitracina correspondeu a uma fração relativamente pequena de 2,5 kg anuais descartados no efluente municipal. Watkinson *et al.* (2009) analisaram a presença de 28 antibióticos em efluentes de três hospitais, cinco ETEs, seis rios e um local de captação de água potável na Austrália, mas não detectaram o antibiótico bacitracina pela técnica analítica empregada em nenhuma dessas amostras ambientais.

A maior parte do consumo da bacitracina está na pecuária, principalmente na suinocultura. Estudos reportam que a concentração de bacitracina em esterco de porcos se encontra na ordem de dezenas de mg kg^{-1} (base seca) (MARTINEZ-CARBALLO *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2010; JI *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2013). O estudo de Joy *et al.* (2014) avaliou o destino de três antibióticos mais utilizados na suinocultura (bacitracina A, clorotetraciclina e tilosina). Os pesquisadores relataram que a bacitracina A não foi detectada no esterco dos animais, porém a bacitracina F, metabólito da bacitracina A, foi encontrada em concentrações de 50 mg kg^{-1} (base seca) nesse mesmo resíduo.

O transporte de antibióticos e a presença de genes resistentes a antibióticos (ARGs) em solo e escoamento superficial após a aplicação de esterco na agricultura foi investigado por Joy *et al.* (2013). Dentre os antibióticos analisados, a bacitracina não foi detectada nessas amostras, além de não serem observados ARGs para esse composto, sugerindo a imediata degradação da substância nos resíduos de animais. Em contrapartida, Li *et al.* (2015) investigaram a co-ocorrência de ARGs no meio ambiente e revelaram que genes resistentes à bacitracina estavam entre os mais abundantes em 50 diferentes amostras ambientais, incluindo água de rios e efluentes da criação animal.

A degradação da bacitracina no meio ambiente e em ETE carece de investigações para predizer de forma mais precisa a sua persistência e atividade no meio ambiente. De acordo com Toscano e Storm (1982), a bacitracina resiste à hidrólise pela pepsina, tripsina e uma variedade de outras enzimas proteolíticas. A configuração biologicamente não usual da bacitracina como um antibiótico de síntese não ribossômica sugere estar relacionada com o propósito de proteger esses peptídeos da degradação das proteases, inibindo a transformação biológica (LUNDEEN *et al.*, 2016). Outra consideração é que a estrutura cíclica e a presença de quatro aminoácidos com quiralidade D, além da forma L padrão, confere uma estrutura especial e incomum, o que pode explicar sua resistência à degradação pela maioria das enzimas proteolíticas (MING; EPPERSON, 2002).

Recentemente, Lundeen *et al.* (2016) investigaram a degradação direta da bacitracina A através da fotólise e foto-oxidação indireta através da reação com oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) em águas naturais. A concentração de $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ de bacitracina A (VETRANAL) foi empregada no estudo e a degradação do antibiótico foi analisada através da radiação UVA de alta intensidade, em diferentes pH e concentrações de matéria orgânica. A bacitracina A não sofreu fotólise direta e a oxidação fotoquímica indireta pelo $^1\text{O}_2$ apresentou cinética de pseudo-primeira ordem. Quanto maior a concentração de matéria orgânica (SRNOM de 0 a 17 mg C L^{-1}), maior foi a velocidade de degradação da bacitracina A. Além disso, os pesquisadores sugeriram dois principais sítios de reação com o oxigênio singlete na estrutura molecular da bacitracina A e concluíram que o resíduo de histidina seria o alvo primário da foto-oxidação. Essa consideração foi sustentada pelo fato de que a coordenação da bacitracina A com metal Zn^{2+} ocorre no resíduo de histidina e a degradação da bacitracina diminuiu consideravelmente com a adição do metal na solução. A ligação com o zinco impediria o livre acesso de $^1\text{O}_2$ nesse sítio, sugerindo uma maior estabilidade do complexo de bacitracina zínica no meio ambiente.

4 MOTIVAÇÃO

A presente pesquisa baseou-se no estudo de caso de uma ETE industrial farmacêutica. A companhia iniciou o processo de formulação de um produto farmacêutico contendo a bacitracina zínica como princípio ativo. Após o processo de produção em batelada do medicamento, os tanques são submetidos a um processo de limpeza automatizado, gerando o efluente contendo o antibiótico.

Inicialmente, o efluente decorrente dessa limpeza era lançado diretamente na ETE industrial, composto por todos os outros resíduos químicos provenientes da formulação de outros compostos farmacêuticos em adição ao efluente sanitário produzido pela própria indústria. Consequentemente, esse descarte comprometeu a degradação biológica da estação, desestabilizando o tratamento e produzindo um odor extremante forte pela ETE.

Para contornar o problema, o efluente gerado passou a ser armazenado em um tanque de forma periódica até ser tratado por um processo físico-químico, antes de seu lançamento na ETE industrial. Esse processo consiste basicamente na transferência da Bc-Zn da fase líquida para a fase sólida através da adição de um agente floculante, no intuito de separar ambas as fases através de decantação. O sobrenadante é lançado na ETE industrial e uma quantidade considerável de lodo produzido é compactada e armazenada para ser consecutivamente transportado à incineração, externo à indústria. A Figura 6 ilustra esquematicamente o processo.

Embora o problema não esteja relacionado ao controle da emissão de efluentes contendo resíduos de Bc-Zn no meio ambiente, a disposição do antibiótico no efluente comprometeu a degradação biológica em ETE. Por essa razão, a atividade antimicrobiana do antibiótico representou um fator a ser removido do efluente. O presente estudo propôs-se a desenvolver uma alternativa para a solução da questão. A aplicação do processo UV e o processo UV/H₂O₂ foi investigada como uma opção de tratamento para o efluente armazenado (Figura 6) em relação ao processo físico-químico. A principal vantagem do tratamento pelo POA seria descartar o efluente tratado na própria ETE industrial. Adicionalmente, eliminar a produção de resíduos sólidos e o seu consecutivo transporte à incineração.

Figura 6 – Esquema do processo de tratamento de efluente industrial contendo a bacitracina zíncica.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Reagentes

Todas as soluções utilizadas foram preparadas em água deionizada ou em água ultrapura (Millipore Milli-Q®). Nos experimentos em geral utilizou-se a bacitracina zínica (Bc-Zn) grau técnico, em conformidade com o padrão de referência da USP, fornecida por uma indústria farmacêutica. Adicionalmente, Bc-Zn e bacitracina A (VETRANAL) foram adquiridas da Sigma Aldrich. Para as análises em HPLC, foram utilizados fosfato de potássio monobásico (grau HPLC), adquirido da J. T. Backer, acetronitrila (grau HPLC) e metanol (grau HPLC), ambos obtidos da Sigma-Aldrich, além de EDTA (grau de pureza > 99,5%) da Dojindo.

A solução de peróxido de hidrogênio 29% m/m, massa específica de $1,13 \text{ g cm}^{-3}$ (grau analítico da Synth) foi empregada nos experimentos. Todos os outros reagentes químicos utilizados foram de grau analítico: acetato de sódio (Synth), ácido acético glacial (Fmaia), ácido fosfórico (Vetec), ácido sulfúrico (Vetec), ácido glutâmico (Merck), ácido oxálico (Synth), ácido sulfúrico (Fmaia), cloreto de amônio (Merck), cloreto de cálcio (Vetec), cloreto férrico (Vetec), 1,10-fenantrolina (Química Moderna), fosfato de sódio monobásico (Vetec), hidróxido de potássio (Sigma Aldrich), hidróxido de sódio (Nuclear), metavanadato de amônio (Sigma-Aldrich), sulfato de magnésio (Mallinckrodt Chemicals), sulfato férrico (Synth) e sulfato ferroso (Synth).

Para os ensaios de atividade antimicrobiana, utilizou-se o caldo de caseína soja ou triptona soja (caldo CASO, Merck), padronizado de acordo com as Farmacopeias dos Estados Unidos (USP), Europeia (EP) e do Japão (JP). Catalase bovina (Sigma Aldrich) e cloreto de sódio padrão analítico (Synth) foram empregados para a realização dos experimentos microbiológicos em geral.

5.2 Equipamentos e Procedimentos Experimentais

5.2.1 Determinação do Coeficiente de Absorção Molar da Bacitracina Zíncica em Solução Aquosa

Os espectros de absorção de soluções de bacitracina zíncica em diferentes concentrações foram obtidos para verificar o comprimento de onda de máxima absorção e calcular o coeficiente de absorção molar da bacitracina zíncica em diferentes pH. Soluções aquosas do antibiótico em concentrações de 5 a 100 mg L⁻¹, em pH 3, 5, 7 e 9, foram submetidos a varreduras em comprimentos de onda entre 190 a 820 nm, empregando um espectrofotômetro Varian Cary 50.

5.2.2 Avaliação da Estabilidade da Solução de Bacitracina

Os experimentos para avaliar a hidrólise da Bc-Zn em meio aquoso foram conduzidos empregando soluções preparadas com concentração inicial de 50 mg L⁻¹ de Bc-Zn em pH 3, 5, 7 e 9. Essa concentração foi selecionada tendo em vista a informação de que efluentes industriais reais podem conter até 300 mg L⁻¹ de Bc-Zn e também considerando limitações analíticas. Paralelamente a essas soluções, a concentração inicial de 20 mg L⁻¹ de Bc-Zn em pH 7 foi analisada para verificar o efeito da diluição. Os frascos com as soluções foram mantidos em ambiente escuro, à temperatura de 25 °C e sob a agitação constante de 100 rpm em uma incubadora rotativa (Tecnal, modelo TE-421). Alíquotas de cada solução foram retiradas a cada três horas e analisadas em HPLC (item 4.3.2), ao longo de 24 horas.

Adicionalmente, a estabilidade dos principais congêneres (bacitracinas A, B1, B2, B3 e F) da bacitracina zíncica e bacitracina (VETRANAL) foi analisada durante 14 dias, através da retirada de alíquotas diárias para análise em HPLC (item 4.3.2). As mesmas concentrações e condições utilizadas para os experimentos de 24 h foram aplicadas: soluções de Bc-Zn e Bc em concentrações iniciais de 50 mg L⁻¹ em pH 3, 5, 7 e 9 e concentração inicial de 20 mgL⁻¹ em pH 7. As soluções foram mantidas no escuro, à temperatura de 25 °C e em agitação constante de 100 rpm em incubadora rotativa.

No intuito de avaliar, a influência do zinco na estabilidade do antibiótico, soluções de 48 mg L⁻¹ de bacitracina A (VETRANAL) foram simultaneamente acompanhadas nos tempos de 24 h e 14 dias nas mesmas condições acima mencionadas.

5.2.3 Experimentos de Fotodegradação da Bacitracina Zíncica

Os experimentos de fotólise e degradação foto-oxidativa da bacitracina zíncica em solução aquosa foram executadas em um sistema operado em batelada com recirculação e capacidade volumétrica de trabalho de 5 L. As Figuras 7 e 8 apresentam respectivamente o aparato experimental empregado e o seu esquema ilustrativo.

Figura 7 – Aparato experimental utilizado para os experimentos de degradação da Bc-Zn.

Figura 8 – Diagrama simplificado do equipamento experimental.

O sistema é composto principalmente por um reator tubular fotoquímico, um tanque agitado e uma bomba centrífuga. O reator fotoquímico consiste em um tubo de vidro borossilicato (73 mm de diâmetro interno e 1120 mm de comprimento) equipado com uma lâmpada tubular (28 mm de diâmetro externo), disposta concêntricamente, resultando em um volume útil anular de escoamento de 3,9 L. A lâmpada de baixa pressão de vapor de mercúrio (TUV Philips, 75 W) foi utilizada para a emissão de radiação UV em 254 nm e sua intensidade foi regulada de 1 a 100% através de um dispositivo eletrônico (Quicktronic® Intelligent Osram), acoplada a um *dimmer* analógico (Osram). O espectro de emissão da lâmpada está representado na Figura 9 e mostra a medida de potência dos diferentes comprimentos de onda emitidos em relação à emissão principal (254 nm); apenas 12% da potência da lâmpada são emitidos em outros comprimentos de onda.

O reator tubular conecta-se a um tanque encamisado agitado mecanicamente, o qual está acoplado a um banho termostático (Julabo, modelo EC) para manter a temperatura média do sistema reacional a 25 °C. A recirculação do sistema é promovida pela bomba centrífuga (Bomax). Uma vazão constante de 56 L h⁻¹, regulada através de uma válvula agulha acoplada a

um rotâmetro (Tecnal TE139, escala 0 – 95 L h⁻¹), foi utilizada para todos os experimentos conduzidos nesse sistema.

Figura 9 – Espectro de emissão da lâmpada de vapor mercúrio de baixa pressão (75 W) medido com um espectrorradiômetro (Luzchem, SPR-4002). O inserto apresenta a ampliação do espectro entre 280 e 600 nm.

Soluções de 5 L de bacitracina zíncica de 50 mg L⁻¹ foram alimentadas ao sistema através do tanque agitado de recirculação. Após o sistema atingir o estado estacionário, com o volume de trabalho totalmente preenchido, vazão constante e ausência de bolhas, a lâmpada UV foi acionada de acordo com as diferentes intensidades estabelecidas. Todos os experimentos (fotólise UV e UV/H₂O₂) foram realizados em triplicata em um tempo total de irradiação UV de 120 minutos. A cada tempo determinado, amostras foram coletadas para as análises da bacitracina em HPLC e determinação da concentração de carbono orgânico total (TOC) (item 5.3.4). Adicionalmente, alíquotas foram retiradas a cada 10 minutos para avaliar a concentração de peróxido de hidrogênio residual (item 5.3.5) nos experimentos de foto-oxidação e para medir o espectro de absorção da solução. Durante todos os experimentos, o pH da solução de bacitracina zíncica foi acompanhada utilizando o pHmetro (Tecnal, Tec-3MP).

Os experimentos de fotólise foram realizados em três diferentes condições nominais de potência UVC: 4 W, 12 W e 20 W. Para investigar os efeitos da foto-oxidação UV/H₂O₂ da bacitracina zíncica e determinar as condições ótimas, a matriz experimental de Doehlert foi

utilizada. Esse arranjo possibilita executar menos experimentos, os quais podem ser movidos através do domínio experimental, sendo considerado mais eficiente em comparação a outros arranjos como o de Box-Behnken e o composto central (FERREIRA *et al.*, 2004). Considerou-se a matriz de Doehlert para dois fatores neste estudo, variando-se a potência da fonte e a concentração inicial de peróxido de hidrogênio (Figura 10 e Tabela 8). Como variáveis respostas, foram consideradas Y_1 , Y_2 e Y_3 , que equivalem respectivamente à constante cinética de pseudo-primeira ordem (k_{total}), o percentual de degradação de Bc-Zn em 1 minuto e a remoção de TOC após 120 minutos de tratamento.

As concentrações iniciais de H_2O_2 ($[H_2O_2]_0$) foram determinadas através do cálculo estequiométrico para a mineralização total da Bc-Zn, considerando-se produção de 2 mols de radicais $\bullet OH$ para cada mol de peróxido de hidrogênio fotolisado. Os três níveis considerados para a concentração inicial de H_2O_2 representam 1, 1,5 e 2 vezes a quantidade estequiométrica de H_2O_2 estimada para mineralização da Bc-Zn. As potências utilizadas foram consideradas a partir da máxima potência em W da radiação UVC fornecida pela lâmpada. Na Tabela 8, constam apenas os valores nominais planejados dos cinco níveis de potência. Os valores reais da potência radiante UVC foram determinados posteriormente através da caracterização actinométrica (item 5.3.1).

Figura 10 – Matriz de Doehlert para dois fatores.

Tabela 8 – Planejamento experimental pela matriz de Doehlert (experimentos realizados em triplicata).

Exp.	Potência radiante UVC		Concentração inicial de H ₂ O ₂	
	*X ₁ codificado	Valor experimental (W)	*X ₂ codificado	Valor experimental (mmol L ⁻¹)
1'	-0,5	8	+0,866	14,27
1''	-0,5	8	+0,866	14,27
1'''	-0,5	8	+0,866	14,27
2'	-0,5	16	+0,866	14,27
2''	-0,5	16	+0,866	14,27
2'''	-0,5	16	+0,866	14,27
3'	+1,0	20	0	10,7
3''	+1,0	20	0	10,7
3'''	+1,0	20	0	10,7
4'	+0,5	16	-0,866	7,13
4''	+0,5	16	-0,866	7,13
4'''	+0,5	16	-0,866	7,13
5'	-0,5	8	-0,866	7,13
5''	-0,5	8	-0,866	7,13
5'''	-0,5	8	-0,866	7,13
6'	-1,0	4	0	10,7
6''	-1,0	4	0	10,7
6'''	-1,0	4	0	10,7
7'	0	12	0	10,7
7''	0	12	0	10,7
7'''	0	12	0	10,7

*Os valores codificados (X_i) foram calculados através dos valores experimentais (x_i) pela equação $X_i = (x_i - x_i^0)/\Delta x_i \times \delta$, no qual i representa i-ésimo valor da variável independente; x_i^0 , o valor do ponto central; Δx_i , o intervalo de variação e δ , o intervalo de variação do código de cada fator (SAUTOUR, 2001; FERREIRA et al., 2004).

Adicionalmente foram realizados experimentos com a bacitracina A (VETRANAL) na condição indicada pelo ponto central da matriz de Doehlert, para avaliar a influência do metal zinco nas análises de toxicidade; e experimento com a bacitracina zíncica na condição indicada pela condição 3, durante 24 h, para avaliar a biodegradabilidade. Posteriormente, experimentos adicionais para a degradação da bacitracina zíncica por meio do processo UV/H₂O₂ foram realizadas no intuito de alcançar as condições otimizadas.

5.3 Métodos Analíticos

5.3.1 Determinação Actinométrica das Taxas de Emissão de Fótons

As taxas específicas de emissão de fótons ($E_{P,0}$) pela lâmpada, para diferentes potências nominais da lâmpada, foram determinadas através do método da actinometria do ferrioxalato, descrito por Braun *et al.* (1991). Soluções de 5 L, contendo 0,75 mol L⁻¹ de ácido oxálico di-hidratado (H₂C₂O₄.2H₂O) e 0,075 mol L⁻¹ de sulfato férrico penta-hidratado (Fe₂(SO₄)₃.5H₂O) foram preparadas em sala escura (fracamente iluminada com luz vermelha) através da diluição completa dos compostos em água deionizada. Para avaliar cada potência UVC, essas soluções foram alimentadas ao reator fotoquímico e irradiadas durante 30 minutos, a uma vazão constante de recirculação de 56 L h⁻¹. A cada 2 minutos, alíquotas de 0,25 mL foram coletadas e misturadas vigorosamente com 24,75 mL de solução complexante, contidas em frascos âmbar. A solução complexante foi preparada em ambiente escuro, constituindo-se de 0,5 mol L⁻¹ de acetato de sódio, 0,5 mol L⁻¹ de ácido acético e 0,01 mol L⁻¹ de 1,10-fenantrolina. A reação global envolvida na redução fotoinduzida de íons férricos a íons ferrosos através de oxalato está representada pela Equação 14:

Os frascos foram deixados em repouso por 90 minutos no escuro para garantir a reação completa entre o actinômetro e a 1,10-fenantrolina. Após esse período, a absorbância de cada amostra foi determinada em um espectrofotômetro Varian Cary 50 no comprimento de onda de 510 nm. A concentração de íons Fe²⁺ reagidos foi calculada de acordo com uma curva de calibração previamente realizada. A taxa de emissão de fótons foi determinada através do rendimento quântico da reação de formação desse íon, igual a 1,25 de mols de Fe²⁺ por mols de fótons (HATCHARD; PARKER, 1956).

5.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A detecção e a quantificação da concentração da bacitracina zínica para os experimentos de hidrólise e fotodegradação foram realizadas através do equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Shimadzu, modelo LC20) acoplada a um detector UV-visível (SPD 20A). Utilizou-se uma coluna cromatográfica C18 (Phenomenex

Core-Shell Technology, 150 mm × 4.60 mm, 2,6 µm). Os dados foram processados e ajustados através do *software LCMS Solution*.

Os principais constituintes da mistura de bacitracina: bacitracina zínica A, B1, B2, B3 e F foram determinados em comprimento de 254 nm, seguindo como referência o método isocrático descrito pela *United States Pharmacopeia* (USP) para a bacitracina zínica (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2012). A fase móvel consistiu na mistura de metanol e acetonitrila, na proporção de 27:2. Para a fase aquosa, a solução tampão foi utilizada, contendo 50 mmol L⁻¹ de fosfato de potássio monobásico e 0,1 mmol L⁻¹ de EDTA em pH ajustado para 7,0. O método foi melhorado nesse estudo, estabelecendo-se uma proporção entre a fase orgânica e fase aquosa de 64:36, resultando em um tempo de análise de 20 minutos. O método proposto pela USP apresenta um tempo de análise de 120 minutos. Potts *et al.* (2012) otimizaram o mesmo método a um tempo de corrida de aproximadamente 50 minutos (Figura 11a). No presente trabalho, a diminuição considerável do tempo de análise (Figura 11b) deveu-se principalmente à diminuição do diâmetro das partículas da coluna cromatográfica empregada, (2,6 µm), em relação aos tamanhos comumente utilizados de 5 µm de diâmetro. A temperatura do forno foi mantida a 40 °C, com volume de injeção de 100 µL e vazão da fase móvel de 0,6 mL min⁻¹.

Figura 11 – Cromatograma da bacitracina zínica em HPLC. a) Cromatograma típico da Bc-Zn obtido na literatura. b) Cromatograma da Bc-Zn obtido no presente estudo.

Fonte: Potts et al. (2012)

Os cromatogramas dos padrões de bacitracina A (VETRANAL), bacitracina zínica obtida da Sigma Aldrich e da bacitracina grau técnico proveniente da indústria farmacêutica foram obtidos e comparados. A curva de calibração para obtenção da concentração de bacitracina zínica para os congêneres foi previamente obtida para cada um dos congêneres A, B1, B2, B3 e F. A faixa de concentração considerada foi de 0 a 100 mg L⁻¹ da mistura total de bacitracina, Figuras A1 a A4 (Apêndice A).

5.3.3 Espectrofotometria UV-Vis

As medidas de absorção das soluções foram realizadas no espectrofotômetro UV-Vis Varian Cary 50, empregando uma cubeta de quartzo (Suprasil[®]) com caminho óptico de 1 cm. Os espectros de absorção da solução de bacitracina zínica em diferentes pH e das amostras coletadas dos experimentos de fotólise foram obtidos no modo de varredura de comprimentos de onda de 190-820 nm com 1 nm de intervalo. Para a determinação de H₂O₂ residual e análise actinométrica, as medidas foram realizadas em comprimentos de onda previamente determinados.

5.3.4 Carbono Orgânico Total (TOC)

O carbono orgânico total (TOC) das amostras foi medido através dos equipamentos TOC-5000A (Shimadzu) e Vario TOC cube (Elementar Analysensysteme). O TOC foi determinado indiretamente pela diferença entre as concentrações de carbono total (TC) e de carbono inorgânico (IC) contidos em cada amostra. Ambos os equipamentos foram calibrados previamente com soluções padrão de hidrogenoftalato de potássio para as medidas de TC e

soluções padrão de carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3) e hidrogenocarbonato de sódio (NaHCO_3) para as medidas de IC, abrangendo a faixa de concentrações de carbono analisadas.

5.3.5 Análise da Concentração de Peróxido de Hidrogênio Residual

As concentrações residuais de peróxido de hidrogênio nos experimentos UV/ H_2O_2 foram determinadas através do método descrito por Nogueira *et al.* (2005). A técnica é baseada na reação do H_2O_2 com o metavanadato de amônio em meio ácido, resultando na formação do íon peroxovanádio de coloração vermelho-alaranjada, conforme a reação dada pela Equação 15:

Alíquotas de 1 mL das amostras coletadas a cada 10 minutos, durante os 120 minutos de duração total dos experimentos realizados no reator fotoquímico, foram misturadas com 1 mL da solução composta de $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ de metavanadato de amônio e $0,58 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico e, em seguida, completadas com água deionizada até 10 mL. As medidas foram realizadas em comprimento de onda de 450 nm no espectrofotômetro Varian Cary 50 (item 5.3.3). A concentração de H_2O_2 foi determinada através da proporção estequiométrica da reação ocorrida com o metavanadato e calculada empregando uma curva de calibração previamente obtida, Figura A5 (Apêndice A).

5.3.6 Demanda Bioquímica de Oxigênio

A determinação da demanda bioquímica de oxigênio das soluções de bacitracina zínica inicial, bacitracina A e as obtidas em cada experimento de fotodegradação foram executadas de acordo com o método respirométrico padrão 5210 D (APHA; AWWA; WEF, 2012), utilizando-se o dispositivo OxiTop, modelo IS 12. O método permite uma medida indireta do oxigênio consumido pelos microrganismos, disponível no ar presente em frascos âmbar hermeticamente fechados. O CO_2 gerado durante o processo de biodegradação da matéria orgânica é absorvido pelos grânulos de NaOH contidos nos reservatórios de borracha dispostos no interior da garrafa. Os recipientes são acoplados a sensores piezométricos, cuja leitura permite determinar a concentração de O_2 consumida a cada dia (Figura 12).

Figura 12 – Sistema do Oxtop para medição de DBO_5 por respirometria.

Os frascos contendo as amostras foram mantidos agitados, à temperatura constante de 20 °C durante um período de cinco dias em uma incubadora de DBO. Como nutrientes, foram utilizados volumes de 1 mL de soluções aquosas de cloreto de amônio ($0,71 \text{ mol L}^{-1}$), cloreto de cálcio ($0,25 \text{ mol L}^{-1}$), sulfato de magnésio ($0,41 \text{ mol L}^{-1}$), cloreto férrico ($0,018 \text{ mol L}^{-1}$) e tampão fosfato monobásico de sódio ($1,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0). Solução padrão contendo uma mistura de D(+) glicose ($7,5 \text{ g L}^{-1}$) e ácido glutâmico ($7,5 \text{ g L}^{-1}$) em pH ajustado a 7,0 foi utilizada como substrato adicional. A cultura de microrganismos (semente) foi fornecida pelo Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental (PHA-USP) e introduzida em cada frasco em um volume de 2 mL. Adicionalmente, alíquotas de inibidor de nitrificação foram inseridas em cada amostra. Ensaio de controle foram realizados para quantificar o DBO da semente e da água utilizada. Os volumes de amostras utilizadas seguiram o procedimento padrão do método respirométrico (DBO_5) associados à faixa específica de DBO esperada. As leituras obtidas nos sensores do Oxitop foram calculadas pela multiplicação por um fator de escala de acordo com a Tabela 9.

Tabela 9 – Fator de escala, segundo volumes e DBO esperado.

DBO esperado (mg L ⁻¹)	Volume total contido na garrafa (mL)	Fator de escala Oxitop
0-40	432	1
0-80	365	2
0-200	250	5
0-400	164	10
0-800	95	20,1
0-2000	43,5	50,3
0-4000	22,7	100,5

Fonte: Merck Brasil (2000).

5.3.7 Ensaios de Toxicidade Aguda

A toxicidade aguda da solução aquosa do antibiótico e dos produtos formados após os processos de tratamento estudados foi avaliada através da suscetibilidade do microrganismo-teste *Vibrio fischeri*. A *V. fischeri* é uma bactéria marinha gram-negativa, anaeróbica facultativa e bioluminescente, emitindo luz sob condições ambientais favoráveis e em concentrações de oxigênio superiores a 0,5 mg L⁻¹ (KNIE; LOPES, 2004). Desse modo, a luminescência está associada ao metabolismo bacteriano. Quanto maior a perda de luminescência, mais tóxica é a amostra avaliada. Essas bactérias foram adquiridas na forma liofilizada pela marca Biolux® e mantidas à temperatura de -20 °C até a sua utilização.

O ensaio foi executado de acordo com as normas da CETESB L5.227 (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 2001) e da ABNT NBR 15411-3:2012 para bactérias liofilizadas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2012), utilizando o kit adquirido da Biolux® - Umwelt (biomassa liofilizada de *V. fischeri* + solução reativadora). O pH de todas as soluções tratadas foi previamente ajustado a 7,0 quando necessário, através da adição de soluções de ácido sulfúrico ou hidróxido de potássio. Alíquotas variadas de solução de catalase bovina, preparados em tampão fosfato (50 mmol L⁻¹) em pH 7 foram adicionadas nas amostras tratadas com UV/H₂O₂ para a remoção de peróxido de hidrogênio residual, o que foi confirmado gotejando a solução obtida em uma solução de metavanadato de amônio. A adição desses compostos foi necessária para anular interferências causadas pelo pH ou pela presença de H₂O₂ residual que podem apresentar efeitos tóxicos nos microrganismos. As quantidades adicionadas foram feitas de forma que não ultrapassasse 5% do volume da amostra a ser testada.

O procedimento consiste na leitura da luz emitida pela cultura de bactérias pelo fotômetro do equipamento Microtox[®] M 500 (*ModernWater*). O aparelho é composto por um conjunto de poços para acondicionamento das cubetas no preparo das soluções, mantidas à temperatura de 15 °C, além de um poço para a leitura (temperatura não controlada) e um poço para a manutenção da cubeta com estoque de bactérias a 4 °C (Figura 13). A bactéria liofilizada foi hidratada com 1 mL da solução de reconstituição e mantida a 4° C durante todo o período de ensaio. A cada ensaio, as suspensões de bactérias foram diluídas na proporção de 100 µL de suspensão para 1000 µL de solução diluente (2% de NaCl) e mantidas em uma cubeta a 15 °C. A temperatura ambiente foi mantida abaixo de 17 °C para garantir a estabilidade térmica das suspensões.

Todas as soluções do experimento foram preparadas com as cubetas inseridas nos poços, no intuito de se manterem termicamente condicionadas. As cubetas com as amostras foram previamente ajustadas com 100 µL de solução osmótica (22% de NaCl), enquanto uma das cubetas foi utilizada como controle, adicionando-se 1,1 mL de solução diluente. Para cada cubeta de amostras e controle, as respectivas cubetas contendo 0,1 mL da suspensão de bactérias diluída foram preparadas. Essas cubetas contendo bactérias foram medidas no fotômetro (tempo inicial), seguido imediatamente da adição do conteúdo das cubetas contendo as amostras e do controle. As leituras foram novamente realizadas nos tempos de 5, 15 e 30 minutos para cada batelada de ensaios.

Figura 13 – Equipamento de Microtox para avaliação de toxicidade da *V. fischeri*.

As medidas obtidas de luminescência foram empregadas para calcular os valores da concentração efetiva para redução de 50% da quantidade de luz emitida pela *V. fischeri* (CE₅₀)

para a bacitracina zíncica, bacitracina A e óxido de zinco através de uma regressão linear da relação concentração-efeito. O cálculo da porcentagem do efeito inibitório ao organismo-teste das soluções examinadas foi baseado no valor do efeito gama (quociente entre a luz perdida e a luz remanescente).

5.3.8 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana seguiu o método turbidimétrico em microplacas, de acordo com Lourenço (2009) e foram realizadas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e no Instituto de Ciências Biomédicas da USP. O método possibilita analisar o crescimento microbiano uma vez que a turbidez é inversamente proporcional ao efeito antimicrobiano. O microrganismo-teste utilizado foi a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Segundo testes preliminares efetuados por Francisco *et al.* (2016), esse microrganismo apresentou condições de crescimento bastante adequados para avaliar a atividade antimicrobiana do antibiótico bacitracina zíncica.

O meio de cultura composto por caldo de caseína soja (ou triptona soja-TSB da Merck) foi preparado dissolvendo o nutriente em pó em água deionizada na concentração de 60 g L⁻¹ e 30 g L⁻¹. O meio de cultura e a água deionizada foram autoclavadas a 121 °C, durante 15 minutos.

Culturas de *S. aureus* foram mantidas em placas de Petri, em meio de cultura ágar Mueller-Hinton (Difco). Parte da cultura-mãe foi transferida para um frasco contendo 30 g L⁻¹ de meio de cultura do caldo de triptona-soja, o qual foi incubado a 37 °C durante não mais que 24 h. Alíquotas da suspensão desse último crescimento foram transferidas para frascos contendo o meio de cultura de 30 g L⁻¹ caldo de TSB, de forma que uma medida de 25% de transmitância fosse alcançada, em comprimento de onda de 580 nm no espectrofotômetro. Para o *S. aureus*, esse valor corresponde à densidade populacional de aproximadamente 10⁷ UFC mL⁻¹. O meio de cultura utilizado nos ensaios foi inoculado com 0,1% dessa suspensão mensurada de microrganismos.

As microplacas estéreis de 96 poços (8 × 12) foram preparadas através da diluição de 100 µL do meio de cultura com 60 g L⁻¹ de TSB contendo os microrganismo-teste com 100 µL das amostras a serem analisadas (Figura 14). Adicionalmente, controles positivos foram produzidos através da adição de 100 µL da cultura com 60 g L⁻¹ contendo os microrganismos com 100 µL

da água deionizada autoclavada. Controles negativos foram preparados através da adição de 200 μL do meio de cultura contendo 30 g L^{-1} de TSB sem o microrganismo. Todos os procedimentos de transferência de soluções foram realizados em condições assépticas em fluxo laminar.

Figura 14 – Ensaio microbiológico para avaliação da atividade antibacteriana. Cultura de *S. aureus* em placas de Petri (à esquerda). Cultura de *S. aureus* em TSB (meio). Ensaio biológico em microplaca (à direita).

Após o preparo, as microplacas foram inseridas no leitor de microplacas modelo *Synergy* H1 (BioTek) para incubação e medição das densidades ópticas. As microplacas foram mantidas a 37 °C, por um período de 24 h e agitação de 300 rpm. As medições da densidade óptica em comprimento de onda de 580 nm foram efetuadas a cada 15 minutos para avaliar a cinética da resposta do microrganismo (curva de crescimento). As absorbâncias medidas foram convertidas em porcentagem de inibição do crescimento (I) através da Equação 16, na qual A corresponde à medida da absorbância da amostra avaliada, enquanto C_- e C_+ correspondem às absorbâncias dos controles negativo e positivo, respectivamente.

$$I(\%) = \frac{Abs - C_-}{C_+ - C_-} \times 100 \quad (16)$$

As amostras analisadas nesses ensaios constituíram-se de soluções iniciais e finais de cada um dos tratamentos foto-oxidativos realizados (processos de fotólise e UV/H₂O₂). Nas amostras tratadas com UV/H₂O₂, foram adicionadas alíquotas de solução de catalase bovina para remover o peróxido de hidrogênio residual e evitar interferências desse composto nas

medidas. Soluções de bacitracina zíncica em concentrações de 5 a 300 mg L⁻¹ foram também avaliadas, no intuito de determinar a curva dose-resposta e a concentração inibitória mínima (CIM). Adicionalmente, o teste foi efetuado para acompanhar a atividade antimicrobiana da melhor condição cinética experimental da degradação de bacitracina obtida. Dessa forma, amostras foram coletadas em determinados intervalos de tempo, durante os 120 minutos de experimentos de foto-oxidação. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

5.4 Modelagem Matemática do Sistema Fotoquímico e da Cinética das Reações Fotoquímicas

5.4.1 Modelagem do Sistema Fotoquímico em Batelada com Recirculação

Embora o sistema fotoquímico opere em batelada, o volume do reator tubular fotoquímico não é desprezível em relação ao volume do tanque de agitação do sistema, e corresponde significativamente a 21,4% do volume total do sistema (Figura 7 e 8). Desse modo, a suposição em batelada simples para esse sistema pode não representar o reator de forma adequada e conseqüentemente, interferir na estimação dos parâmetros cinéticos das reações fotoquímicas. Por outro lado, as equações de projeto que representam o reator tubular fotoquímico em associação com o tanque de agitação envolvem a solução de sistemas de equações diferenciais parciais, e que torna a solução numérica do problema mais complexa. Modelos matemáticos simples devem ser priorizados para resolver as equações com habilidade, sem acarretar excessivo esforço computacional, mas que descrevam satisfatoriamente as características reais dos reatores considerados (FOGLER, 2009).

Reatores tubulares ideais (PFRs) podem ser modelados através de um grande número de tanques agitados de mistura perfeita (CSTRs) em séries com volumes iguais (LEVENSPIEL, 1999). Dessa forma, o sistema modelo proposto para o sistema fotoquímico considerou a representação do reator tubular real através de cinco CSTRs em série, associado a um tanque de recirculação, ambos perfeitamente misturados, conforme mostra a Figura 15. Como discutido posteriormente (seção 6.2.1), essa configuração mostrou-se bastante adequada.

Figura 15 – Sistema fotoquímico modelo com recirculação.

Os balanços molares do sistema modelo são representados pelas equações 17 a 21. As variáveis $C_{i,n}$ e $r_{i,n}$ correspondem respectivamente à concentração (mol L^{-1}) e a taxa reacional ($\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}$), referentes a cada espécie considerada i e estão indicados de acordo com o fluxo volumétrico de saída dos tanques ($n = 1, 2, \dots, 6$). A Figura 15 apresenta a numeração para a concentração de Bc-Zn ($C_{Bc-Zn,n}$). A vazão volumétrica (L s^{-1}) e os volumes (L) do tanque, do reator tubular e de cada um dos CSTRs são constantes e estão representados respectivamente, por v , V_T , V_R e V_r , sendo $V_r = \frac{V_R}{5}$.

Balanço molar no tanque de recirculação ($n=1$):

$$\begin{array}{cccc} \text{Entrada} & \text{Saída} & \text{Geração} & \text{Acúmulo} \\ \hline vC_{i,6} & - vC_{i,1} & + \int^V r_{i,1} dV & = \frac{d(C_{i,1} \cdot V_T)}{dt} \end{array} \quad (17)$$

Como as reações principais são fotoinduzidas e as espécies radicalares têm vida muito curta, da ordem de $10 \mu\text{s}$ na presença de matéria orgânica dissolvida (OPPENLÄNDER, 2003), considerou-se que no tanque de recirculação não há reação ($r_{i,1} = 0$). Desse modo, a Equação 17 reduz-se a:

$$\frac{dC_{i,1}}{dt} = \frac{v}{V_T} (C_{i,6} - C_{i,1}) \quad (18)$$

Balanço molar no reator (CSTR) 1:

$$\begin{array}{cccc} \text{Entrada} & \text{Saída} & \text{Geração} & \text{Acúmulo} \\ \hline vC_{i,1} & - vC_{i,2} & + \int^V r_{i,2} dV & = \frac{d(C_{i,2} \cdot V_r)}{dt} \end{array} \quad (19)$$

Nesse caso, as reações fotoquímicas ocorrem quando $t > 0$ (lâmpada ligada) e, simplificando a Equação, tem-se:

$$\frac{dC_{i,2}}{dt} = \frac{v}{V_r} (C_{i,1} - C_{i,2}) + r_{i,2} \quad (20)$$

Balanço molar nos reatores (CSTRs) de 2 a 5:

Estendendo o balanço molar de forma genérica e análoga ao CSTR 1, tem-se:

$$\frac{dC_{i,n}}{dt} = \frac{v}{V_r} (C_{i,n-1} - C_{i,n}) + r_{i,n} \quad , \quad n = 3, \dots, 6 \quad (21)$$

Para a condição inicial ($t = 0$), imediatamente antes de ligar a lâmpada, as concentrações da espécie i ($C_{i,n}$), no tanque de agitação e nos CSTRs são iguais à concentração inicial ($C_{i,0}$). O modelo proposto por essas equações diferenciais foi resolvido no software MATLAB R2017, considerando os processos de degradação analisados: fotólise direta e processo UV/H₂O₂.

5.4.2 Determinação do Rendimento Quântico da Fotólise Direta da Bacitracina

O rendimento quântico (Φ) é um parâmetro quantitativo que avalia a eficiência global de um processo fotoquímico. Essa medida para a fotólise UV direta para um dado composto ou espécie i , pode ser definida conforme a Equação 22 (PARSONS, 2005).

$$\Phi_{i,\lambda} = \frac{\text{número total de mols da espécie } i \text{ transformado}}{\text{número total de mols de fótons absorvidos por } i \text{ no sistema}} = \frac{-r_{i,\lambda} \text{ (mol L}^{-1} \text{ s}^{-1})}{Ia_{i,\lambda} \text{ (mol L}^{-1} \text{ s}^{-1})} \quad (22)$$

Na qual o termo à direita representa os termos cinéticos da Equação, ou seja, a razão entre taxa de degradação ($r_{i,\lambda}$) do composto i e a taxa de radiação UV absorvida do composto i por unidade de volume irradiado ($Ia_{i,\lambda}$) em um comprimento de onda (λ).

A taxa de reação fotoquímica sob radiação UV monocromática (254 nm) pode ser dada pela Equação 23.

$$-r_{i,254\text{ nm}} = \Phi_{i,254\text{ nm}} E_{p,0} \frac{\varepsilon_{i,254\text{ nm}} C_i}{\alpha_{254\text{ nm}} + \varepsilon_{i,254\text{ nm}} C_i} (1 - 10^{-(\alpha_{254\text{ nm}} + \varepsilon_{i,254\text{ nm}} C_i) l_{\text{reator}}}) \quad (23)$$

sendo $E_{p,0}$ a taxa específica de fótons incidentes ($\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}$); C_i , a concentração da espécie i (mol L^{-1}); $\alpha_{254\text{ nm}}$, o coeficiente de absorção (cm^{-1}) da solução sem considerar a espécie i e $\varepsilon_{i,254\text{ nm}}$, o coeficiente de absorção molar ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) no comprimento de onda de 254 nm. O termo l_{reator} indica o caminho óptico de propagação da radiação monocromática (cm) no reator fotoquímico e foi calculado pela diferença entre raio interno do reator fotoquímico ($r_{\text{reator}} = 3,65 \text{ cm}$) e o raio externo da lâmpada UV ($r_{\text{lamp}} = 1,4 \text{ cm}$).

Conforme a Lei de Beer-Lambert, tem-se que a absorbância (Abs) em 254 nm é dada por:

$$Abs_{254\text{ nm}} = (\alpha_{254\text{ nm}} + \varepsilon_{i,254\text{ nm}} C_i) l \quad (24)$$

em que l indica o caminho óptico da cubeta usada nas medidas espectrofotométricas (cm). Os termos que variam com o tempo são a concentração e a absorbância da mistura durante a fotólise, os demais são constantes. Substituindo a Equação 24 na Equação 23, tem-se:

$$-r_{i,254\text{ nm}} = \Phi_{i,254\text{ nm}} E_{p,0} \frac{\varepsilon_{i,254\text{ nm}} C_i l}{Abs_{254\text{ nm}}} \left(1 - 10^{-\frac{Abs_{254\text{ nm}}}{l} l_{\text{reator}}} \right) \quad (25)$$

Para o cálculo do rendimento quântico da bacitracina zíncica ($i = Bc - Zn$), no comprimento de onda de 254 nm:

$$-r_{Bc-Zn,n} = \Phi_{Bc-Zn,254\text{ nm}} E_{p,0} \frac{\varepsilon_{Bc-Zn,254\text{ nm}} C_{Bc-Zn,n} l}{Abs_{254\text{ nm}}} (1 - 10^{-\frac{Abs_{254\text{ nm}}}{l} l_{\text{reator}}}) \quad (26)$$

Essa expressão foi substituída nas equações dos balanços molares dos CSTRs 1 a 5 e calculadas numericamente através do software MATLAB R2017. A função objetivo (f_o) minimizada representa a soma dos quadrados das diferenças entre a concentração de Bc-Zn predita e experimental, conforme a notação da Equação 27.

Minimizar a função fo :

$$fo = \sum ([Bc - Zn]_{predita} - [Bc - Zn]_{experimental})^2 \quad (27)$$

Sujeito às equações: 18, 20, 21, 26 e $\Phi_{Bc-Zn,254nm} > 0$.

Para a resolução matemática no MATLAB, foi utilizado o *solver* de mínimos quadrados *lsnonlin* para o ajuste de curvas não lineares. O algoritmo de otimização empregado foi o método de Levenberg-Marquardt e a solução das equações diferenciais ordinárias (EDO) foi efetuada através da ode45.

5.4.3 Modelagem Cinética do Processo UV/H₂O₂

A determinação dos parâmetros cinéticos envolvidos na degradação de um contaminante orgânico através de um POA pode ser bastante exaustiva na medida em que são consideradas as diversas reações envolvidas no processo de foto-oxidação. Por esse motivo, a hipótese de cinética de pseudo-primeira ordem tem sido geralmente adotada para determinar as constantes das reações envolvidas na degradação de um composto orgânico em processos fotoquímicos. No entanto, essa abordagem é bastante genérica em relação à complexidade dos mecanismos reacionais químicos e fotoquímicos envolvidos. Modelos matemáticos mais sistemáticos têm sido propostos para determinar com maior rigor as variáveis cinéticas do processo UV/H₂O₂ e compreender melhor a interação entre as diversas espécies presentes no meio estudado (LIAO e GUROL, 1995; CRITTENDEN *et al.*, 1999; EDALATMANESH *et al.*, 2007; SONG *et al.*, 2008; CHANG *et al.*, 2010; RUBIO-CLEMENTE *et al.*, 2017).

O modelo aplicado no presente estudo foi baseado nas reações abordadas pelo estudo de Huang e Shu (1995). A Tabela 10 lista as etapas de reações ocorridas no processo UV/H₂O₂ para a degradação da Bc-Zn.

Tabela 10 – Etapas reacionais envolvidas na degradação da Bc-Zn através do processo UV/H₂O₂.

Etapas	Reação	
Iniciação:	$H_2O_2 \xrightarrow{\phi_{H_2O_2, 254nm}} 2HO^\bullet$	(28)
Propagação:	$H_2O_2 + HO^\bullet \xrightarrow{k_2} HO_2^\bullet + H_2O$	(29)
	$H_2O_2 + HO_2^\bullet \xrightarrow{k_3} HO^\bullet + H_2O + O_2$	(30)
	$2HO^\bullet \xrightarrow{k_4} H_2O_2$	(31)
Terminação:	$2HO_2^\bullet \xrightarrow{k_5} H_2O_2 + O_2$	(32)
	$HO^\bullet + HO_2^\bullet \xrightarrow{k_6} H_2O + O_2$	(33)
	$C_{66}H_{101}N_{17}O_{16}SZn + HO^\bullet \xrightarrow{k_7} produtos$	(34)
Degradação:	$C_{66}H_{101}N_{17}O_{16}SZn \xrightarrow{\phi_{Bc-Zn, 254nm}} produtos$	(35)

Fonte: Modificado de Huang e Shu (1995).

De acordo com Conte *et al.* (2012), as seguintes considerações foram admitidas para simplificar e definir as expressões cinéticas do processo:

1. As concentrações dos intermediários altamente reativos, como os radicais HO[•] e HO₂[•], foram aproximados ao estado estacionário;
2. A velocidade da segunda reação da etapa de propagação (Equação 30) é menor que as das outras reações e, portanto, essa reação foi desprezada;
3. As reações de terminação foram desprezadas frente às reações de propagação.

Através dessas suposições, as velocidades das reações de fotólise (r_{UV, H_2O_2} e $r_{UV, Bc-Zn}$) da Bc-Zn e de H₂O₂ podem ser descritas de modo similares à Equação 26. No caso de radiação monocromática em 254 nm, as equações para cada uma das espécies consideradas foram:

$$r_{UV, Bc-Zn} = \Phi_{Bc-Zn, 254nm} E_{p,0} \frac{\epsilon_{Bc-Zn, 254nm} C_{Bc-Zn, n} l}{Abs_{254nm}} (1 - 10^{-\frac{Abs_{254nm}}{l} l_{reator}}), \text{ para a Bc-Zn} \quad (36)$$

$$r_{UV, H_2O_2} = \Phi_{H_2O_2, 254nm} E_{p,0} \frac{\epsilon_{H_2O_2, 254nm} C_{H_2O_2, n} l}{Abs_{254nm}} (1 - 10^{-\frac{Abs_{254nm}}{l} l_{reator}}), \text{ para H}_2\text{O}_2 \quad (37)$$

As velocidades das reações fotoquímicas ocorridas no processo UV/H₂O₂ ($r_{H_2O_2, n}$ e $r_{Bc-Zn, n}$), bem como a concentração de radical HO[•] ($C_{HO^\bullet, n}$), são dadas por:

$$-r_{H_2O_2,n} = r_{UV,H_2O_2} + k_2 C_{H_2O_2,n} C_{HO^\bullet,n} \quad (38)$$

$$-r_{Bc-Zn,n} = r_{UV,Bc-Zn} + k_7 C_{Bc-Zn,n} C_{HO^\bullet,n} \quad (39)$$

$$C_{HO^\bullet,n} = \frac{2r_{UV,H_2O_2}}{k_2 C_{H_2O_2,n} + k_7 C_{Bc-Zn,n}} \quad (40)$$

em que n representa a numeração do fluxo de saída dos CSTRs ($n = 2, \dots, 6$) do sistema fotoquímico proposto. Dessa forma, as variáveis de concentração e de velocidades de reação das espécies consideradas foram calculadas para cada um dos tanques envolvidos.

Para estimar as constantes cinéticas k_2 e k_7 , a função objetiva de cada experimento UV/H₂O₂ foi constituída pela soma das duas parcelas correspondentes ao ajuste das duas curvas abordadas: da concentração de bacitracina e de H₂O₂ em função do tempo de todos os experimentos. Dessa forma, a função objetivo global (FO) consistiu na soma da função de minimização (f_m) de cada experimento m (Equação 41). A Equação 42 considera tanto a concentração de Bc-Zn quanto a concentração de H₂O₂.

Minimizar a função FO:

$$FO = \sum f_m \quad (41)$$

Sujeita às equações:

$$f_m = \sum ([Bc - Zn]_{predita} - [Bc - Zn]_{experimental})^2_m + \sum ([H_2O_2]_{predita} - [H_2O_2]_{experimental})^2_m \quad (42)$$

E as equações 18, 20, 21, equações 36 a 40, com k_2 e $k_7 > 0$.

O algoritmo considerado para a resolução numérica foi o método de *Neld-Mead simplex*, utilizando o solver *fminsearch* do MATLAB. Pelo fato de as escalas de tempo das variáveis e dos parâmetros estimados apresentarem ordens de grandeza bastante diferentes, além de uma grande variação na concentração das espécies nos primeiros instantes da reação, as EDOs foram consideradas rígidas (*stiff*). Desse modo, para garantir a convergência e manter a solução numérica estável, as equações diferenciais foram resolvidas pela ode15s no MATLAB, o qual é baseado nas fórmulas de diferenciação regressiva (método de Gear).

Adicionalmente, as constantes cinéticas de pseudo-primeira ordem (k') de todos os experimentos de degradação da Bc-Zn, tanto para o processo UV/H₂O₂ quanto para a fotólise direta, foram estimadas de acordo com a Equação 43.

$$-r_{Bc-Zn,n} = k' C_{Bc-Zn} \quad (43)$$

As constantes de pseudo-primeira ordem da parcela oxidativa do processo UV/H₂O₂ ($k_{oxidativa}$) da Bc-Zn, foram calculadas conforme a Equação 44.

$$-r_{Bc-Zn,n} = \Phi_{Bc-Zn,254nm} E_{p,0} \frac{\varepsilon_{Bc-Zn,254nm} l}{Abs_{254nm}} \left(1 - 10^{-\frac{Abs_{254nm} l_{reator}}{l}} \right) C_{Bc-Zn} + k_{oxidativa} C_{Bc-Zn} \quad (44)$$

Ou seja:

$$-r_{Bc-Zn,n} = k_{fotólise} C_{Bc-Zn} + k_{oxidativa} C_{Bc-Zn} \quad (45)$$

Essas expressões foram substituídas nas equações dos balanços molares do sistema modelo fotoquímico e resolvidas no MATLAB. O algoritmo de otimização empregado para a resolução das Equações 43 e 45 foi o método de Levenberg-Marquard. A solução das equações diferenciais ordinárias (EDO) foi efetuada através da ode45.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo está dividido em quatro seções principais: caracterizações da radiação UVC e do antibiótico bacitracina zínica (Bc-Zn); degradação da Bc-Zn através de fotólise; fotodegradação da Bc-Zn através de UV/H₂O₂ e a análise estatística desse processo; resultados das análises biológicas que avaliam a conformidade ambiental dos produtos gerados de todos os tratamentos empregados. Os parâmetros cinéticos estimados pelas modelagens da seção 5.4, tais como o rendimento quântico, as constantes cinéticas de pseudo-primeira ordem e as constantes cinéticas de segunda ordem, são apresentados durante a discussão dos processos de fotodegradação aplicados, uma vez que estão associados aos dados experimentais obtidos.

6.1 Caracterização das Condições Fotoquímicas e do Antibiótico Bacitracina Zínica

6.1.1 Actinometria

Os resultados das taxas de emissão de fótons ($E_{P,0}$) determinadas através da actinometria do ferrioxalato para as cinco diferentes potências radiantes planejadas, estão apresentadas na Tabela 11 e na Figura 16. As taxas de emissão de fótons foram convertidas em unidades de potência para comparação com os valores registrados no *dimmer* da lâmpada UV. A determinação espectrofotométrica das concentrações de íons Fe²⁺ foi realizada empregando-se a curva padrão (Figura 16), obtendo-se coeficiente de absorção molar de 10505 L mol⁻¹ cm⁻¹ para complexo Fe(II)-o-fenantrolina. Esse valor foi próximo ao determinado inicialmente por Hatchard e Parker (1956), de 11100 L mol⁻¹ cm⁻¹.

Tabela 11 – Taxas específicas de emissão de fótons em 254 nm obtidas por actinometria de ferrioxalato e potências radiantes correspondentes para diferentes condições experimentais planejadas.

Potência nominal planejada (W)	Taxa de emissão de fótons (Einstein s ⁻¹)	Taxa específica de emissão de fótons (Einstein L ⁻¹ s ⁻¹)	Potência radiante correspondente (W)
4,0	8,65×10 ⁻⁶	2,18×10 ⁻⁶	4,1
8,0	1,68×10 ⁻⁵	4,23×10 ⁻⁶	7,9
12,0	2,38×10 ⁻⁵	6,01×10 ⁻⁶	11,3
16,0	3,62×10 ⁻⁵	9,12×10 ⁻⁶	17,0
20,0	4,41×10 ⁻⁵	1,11×10 ⁻⁵	20,8

Figura 16 – Curva de calibração para Fe^{2+} e curvas das actinometrias em diferentes potências radiantes UVC.

Para a potência total da lâmpada (não limitada pelo *dimmer*) de 75 W, a potência em UVC correspondente e obtida pela actinometria foi de 20,8 W (eficiência radiante de 27,7%). Esse valor foi inferior ao descrito pelo fabricante da lâmpada de 25,5 W de potência radiante em UVC (eficiência de 34%).

6.1.2 Absorção de Radiação UV-Vis pela Bacitracina Zíncica em Solução Aquosa

Os experimentos de fotodegradação de bacitracina zíncica (Bc-Zn) foram conduzidos empregando o produto grau técnico fornecido pela indústria farmacêutica, uma vez que é esse o composto descartado como resíduo no efluente do processo de formulação do medicamento. Já que a maior parte dos estudos analíticos com a bacitracina emprega o padrão de referência da Farmacopeia Americana (USP), para avaliar eventuais diferenças foram comparados os espectros de absorção do complexo de Bc-Zn grau técnico e Bc-Zn padrão primário (Sigma-Aldrich).

Os espectros de absorção de radiação UV-Vis da solução da bacitracina zíncica do padrão primário para comprimentos de onda entre 190 e 820 nm, para diferentes concentrações em pH natural de 6,5 (próximo do pH do efluente industrial real) estão apresentados na Figura 17. Conforme observado, o pico de comprimento máximo de absorção foi de 254 nm.

Figura 17 – Espectros de absorção de soluções de Bc-Zn em diferentes concentrações. O inserto representa uma ampliação para o pico de absorção máxima em 254 nm.

Espectros de absorção similares foram obtidos para a bacitracina zíncica grau técnico em todas as concentrações consideradas, verificando-se igualmente o pico de máxima absorção em 254 nm, no pH 6,5. A partir desses resultados, os coeficientes de absorção molares do antibiótico foram estimados por ajustes lineares através da Lei de *Beer-Lambert* (Figura 18). Os valores dos coeficientes para a Bc-Zn padrão primário e grau técnico foram respectivamente de $3863 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $3850 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os cromatogramas HPLC de ambas as misturas de Bc-Zn apresentam grande similaridade, Figura B1 (Apêndice B).

Figura 18 – Ajuste linear da absorbância em 254 nm em função da concentração de Bc-Zn.

O comprimento de onda máximo de 254 nm também foi observado por Newton e Abraham (1953b), Ikai (1995), Capitan-Vallvey (2002) e Pavli e Kmetec (2006). Newton e Abraham (1953a) mostraram que as bacitracinas A e B apresentam absorção máxima no comprimento de onda 253 nm devido à presença do anel cromóforo da tiazolina e outros componentes; a bacitracina C apresenta absorção máxima em 250 nm; e a bacitracina F, em 288 nm, devido ao anel de tiazol. Essas considerações podem explicar o fato de ser notado um aumento de absorção em comprimento de ondas entre 240 e 290 nm nos espectros obtidos. Uma vez que as bacitracinas A e B estão presentes em proporção consideravelmente maior do que os outros congêneres (como será visto mais adiante), as bandas de absorção de frações menores, como as bacitracinas C e F, são indistinguíveis no espectro. Em outra perspectiva, esses espectros de absorção indicam a presença de uma importante parcela dos componentes A e B na mistura da Bc-Zn, os quais são responsáveis em maior parte pela atividade antimicrobiana do antibiótico.

A Bc-Zn é uma molécula relativamente grande e complexa, composta por aminoácidos e, dessa forma, o caráter da molécula pode apresentar significativas alterações em relação ao pH. Os espectros de absorção molar obtidos para diferentes pH estão apresentados na Figura 19. O efeito da mudança do pH na solução é bastante expressivo em meio ácido, em relação ao observado em pH natural (pH 6,5), conforme observado na Tabela 12. Isso indica que formas protonadas da Bc-Zn (em meio ácido) apresentam absorção menos acentuada de radiação UVC no comprimento de onda de 254 nm.

Figura 19 – Espectro de absorção de soluções de Bc-Zn (100 mg L⁻¹) em diferentes pH.

Tabela 12 – Coeficientes de absorção molar da bacitracina em 254 nm em diferentes pH.

pH	Coeficiente de absorção molar (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Diferença (%)
3,0	2502	35,0
5,0	2672	30,6
6,5	3850	-
9,0	3673	4,6

A Figura 20 representa as múltiplas cargas que a Bc-Zn A, principal constituinte do composto. Tais dados foram determinados através da plataforma online Chemicalize (ChemAxon, 2017). A Figura 21 indica a porcentagem da distribuição das 15 macroespécies produzidas em relação ao pH. Os maiores valores de pKa para meio ácido e básico são 3,74 e 13,46, respectivamente. Em pH 5,3, 8,2 e 10,70, as estruturas com carga +1, neutra e -1 representam a maior parte da composição, correspondendo a aproximadamente 92%, 93% e 85,5%, respectivamente.

Figura 20 – Cargas apresentadas pela molécula da bacitracina A.

Figura 21 – Especiação das macroespécies da Bc-Zn A em função do pH.

6.1.3 Estabilidade da Bacitracina Zíncica em Solução Aquosa

Os dados obtidos do experimento de hidrólise da Bc-Zn a 25°C em um tempo de 24 horas estão apresentados na Figura 22. Observa-se que a concentração de Bc-Zn em solução em pH 7,0 permanece praticamente constante, enquanto que em meio ácido e básico há discreta diminuição da concentração do antibiótico.

Figura 22 – Concentrações da soma das Bc-Zn A, B1, B2, B3 e F em relação ao tempo.

Apesar da indicação do nome comercial do produto bacitracina A (VETRANAL), obtido da Sigma-Aldrich, o composto não é constituído integralmente pela bacitracina A. Outros congêneres como a bacitracina B1, B2, B3, C1, C2, C3 e F estão presentes em parcelas significativas, conforme se observa nos cromatogramas comparativos da Figura 23. Por esse motivo, o produto referido comercialmente como Bc A foi considerado apenas como a mistura de bacitracina (Bc), sem o metal zinco complexado à molécula. A comparação entre os cromatogramas de Bc-Zn e Bc indica que a mistura de Bc contém uma proporção maior dos constituintes Bc A (média aproximada de 13% maior) e Bc F (média de 4 vezes maior). Por outro lado, a Bc apresenta proporções menores dos constituintes Bc B1 e Bc B2 (média de 62% menor) e Bc B3 (26% menor) do que a Bc-Zn.

Figura 23 – Comparação entre o cromatograma da bacitracina (VETRANAL) e bacitracina zínica (grau técnico).

No intuito de avaliar a hidrólise dos principais constituintes da bacitracina, considerando a existência da conversão entre as moléculas congêneres, analisou-se a estabilidade dos

principais componentes da mistura durante 14 dias. Diferentes condições de pH em concentrações de 20 e 50 mg L⁻¹ do antibiótico, para as soluções de Bc-Zn e Bc foram empregadas. Os resultados estão apresentados nas Figuras 24 e 25, para Bc-Zn e Bc, respectivamente. Observa-se que houve uma diminuição da concentração dos principais constituintes quantificados (A, B1, B2, B3 e F), tanto da Bc-Zn e como da Bc, em pH 3, 5 e 7, sendo essa diminuição bastante considerável em pH 9. Para a Bc-Zn, essas diminuições corresponderam a aproximadamente 12%, 10,6%, 25,7% e 62,5% em pH 3, 5, 7 e 9, respectivamente, após 14 dias. Para a Bc, diminuições de aproximadamente 12,6%, 12,1%, 25,3% e 64,3% foram observados para os mesmos crescentes valores de pH.

O efeito da concentração inicial na estabilidade da Bc e do complexo Bc-Zn foi analisado através das soluções com 20 mg L⁻¹ do antibiótico, em pH 7. Observou-se uma relativa diminuição dos congêneres analisados com o aumento da diluição, ao se comparar estas soluções com as de 50 mg L⁻¹ de antibiótico em mesmo pH 7. Essa diferença correspondeu a um valor médio aproximado de 6,7% para ambas as misturas Bc-Zn e Bc. De acordo com Waterman *et al.*, 2016, a estabilidade do antibiótico é significativamente aumentada com a complexação com o metal zinco. Esses pesquisadores sugeriram que o zinco é responsável por diminuir a mobilidade da bacitracina em vez de agir impedindo a degradação. No entanto, não foram constatadas diferenças significativas na estabilidade do antibiótico entre mistura de Bc e a de Bc-Zn quando submetidas às mesmas condições experimentais.

Figura 24 – Concentrações da soma das Bc-Zn A, B1, B2, B3 e F em relação ao tempo. A legenda apresenta os valores nominais das concentrações iniciais da mistura Bc-Zn.

Figura 25 – Concentrações da soma das Bc A, B1, B2, B3 e F em relação ao tempo. A legenda apresenta os valores nominais das concentrações iniciais da mistura Bc.

Vale-se ressaltar que a mistura de bacitracina é composta por mais de 30 congêneres (IKAI *et al.*, 1995), e a avaliação neste estudo apenas considera a soma dos componentes A, B1, B2, B3 e F, os quais representaram em torno de 75% da mistura total. Desse modo, a redução da quantidade desses compostos não indica necessariamente a degradação da mistura de bacitracina. Esses constituintes podem ser convertidos em outros congêneres não quantificados nesse estudo e que caracterizam a mistura da bacitracina, tais como F, E, G, H1, H2, H3 (BELL, 1992, PAVLI *et al.*, 2004). No entanto, não foi observada conversão significativa da bacitracina A na bacitracina F. Embora as bacitracinas C1, C2 e C3 apresentem uma pequena atividade antimicrobiana, sua quantificação não foi realizada neste estudo em geral, devido às interferências de outros compostos intermediários que surgem na análise cromatográfica com tempo de retenção próximos.

Outros compostos formados durante a hidrólise da mistura Bc-Zn aparecem nos cromatogramas, sendo que esses intermediários e/ou congêneres apresentaram um tempo de retenção entre os picos quantificados, e sugerem pequenas modificações estruturais nas moléculas. Essa consideração foi bastante evidenciada em pH 9 (Figura 26), no qual alguns picos apresentaram tempos proporcionais de retenção análogos aos obtidos no estudo de Pavli e Kmetec (2006). Esses pesquisadores investigaram a degradação da bacitracina em solução aquosa a 40°C e 50°C durante 8 dias e constataram que a oxidação da bacitracina em meio aquoso alcalino é maior do que a observada em soluções ácidas. Adicionalmente, os autores

identificaram duas vias de modificação dessas moléculas, através da oxidação e desamidação, sendo a primeira via mais rápida do que a segunda.

Figura 26 – Cromatogramas antes e após 14 dias da Bc e da Bc-Zn em pH 9.

Anker *et al.* (1948) reportaram que as soluções aquosas de bacitracina parcialmente purificadas, neutras ou levemente ácidas (pH 6,6) à temperatura de 0 a 5°C, não apresentaram alterações na atividade microbiológica após 8 a 12 meses. No entanto, quando essas soluções foram expostas à temperatura ambiente apresentaram perda de atividade entre 30 a 50% em duas semanas. Nesse mesmo período, quando essas soluções foram mantidas entre 35 e 37 °C, houve a perda total da atividade antimicrobiana. Ainda, segundo os autores, soluções de bacitracina mostraram-se estáveis a 0,01 mol L⁻¹ de HCl a 5 e a 37 °C, enquanto em solução alcalina acima de pH 9 o antibiótico foi rapidamente inativado em ambas as temperaturas. Essas observações concordam com os resultados obtidos no presente estudo, uma vez que em meio básico houve maior diminuição dos constituintes quantificados das misturas Bc e Bc-Zn. Além

disso, o estoque em pó da Bc-Zn utilizada nos experimentos foto-oxidativos foi mantido entre a 0-4°C, mantendo-se praticamente inalterado durante meses.

A estabilidade da bacitracina também foi estudada por Bond, Himelick e Macdonald (1949). Na forma seca em pó, o antibiótico manteve-se estável por um período de 15 meses às temperaturas de 5 a 37 °C, mas mostraram perda rápida da atividade em temperaturas mais elevadas, entre 56 e 80 °C. A estabilidade da solução aquosa do antibiótico é dependente do pH e da temperatura. Soluções aquosas com pH de 5 a 7, com ou sem tampão fosfato, apresentaram estabilidade por 3 meses sob refrigeração. No entanto, quando mantidas à temperatura ambiente, mostraram perda de aproximadamente 50% da atividade antimicrobiana em uma semana. Os autores também avaliaram a estabilidade da bacitracina para as preparações farmacêuticas. Pomadas de bacitracina preparadas em meio anidro de óleo de algodão, petrolato branco, petrolato líquido, lanolina, cera branca e óleo de amendoim mostraram-se estáveis, enquanto que pomadas miscíveis em água preparadas com polietilenoglicol, álcool cetílico e lauril sulfato de sódio perderam sua estabilidade.

O efluente real do estudo do caso industrial, gerado pela lavagem dos tanques de produção em batelada da pomada contendo bacitracina zíncica, é armazenado em um tanque em um período aproximado de 2 semanas, para o posterior tratamento físico-químico antes de ser lançado à ETE industrial. Nesse sentido, a avaliação da estabilidade do composto durante 14 dias procurou evidenciar efeitos da Bc-Zn em solução aquosa nesse período, além de comparar resultados de análise apresentados em pesquisas realizadas em períodos similares. Apesar do resíduo industrial gerado da formulação da pomada contendo bacitracina estar dissolvido em solução aquosa, excipientes presentes nele, como o petrolato branco e o álcool cetílico, atuam na estabilidade das moléculas de bacitracina, conforme reportado por Bond, Himelick e Macdonald (1949). Consequentemente, avaliações posteriores devem ser realizadas para verificar o grau de influência que esses compostos atuam na mistura de bacitracina zíncica. O fármaco comercializado, mantido à temperatura ambiente (15 a 30 °C) apresenta um prazo de validade de aplicação de 24 a 36 meses após a fabricação, indicando uma boa estabilidade do antibiótico com a adição dos excipientes. Nesse trabalho, apenas considerou-se o estudo do efluente aquoso sintético contendo somente o antibiótico Bc-Zn.

6.2 Fotólise Direta da Bacitracina Zíncica em Solução Aquosa

A fotólise direta da solução de Bc-Zn à concentração inicial de 50 mg L^{-1} foi estudada para as potências UVC de 4,1 W, 11,3 W e 20,8 W (Tabela 11). Os valores médios da fotodegradação dos constituintes da Bc-Zn A, Bc-Zn B (soma de B1, B2, B3) e Bc-Zn F para as três condições estudadas estão apresentados nas Figuras 27 a 29. O eixo secundário implementado nas curvas representa a concentração de Bc-Zn F, cujo valor máximo é correspondente a aproximadamente 2% da soma das concentrações dos congêneres avaliados. Valores de concentrações iniciais da Bc-Zn e a porcentagem de constituintes da mistura para cada um dos experimentos de fotólise, realizados em duplicata, estão mostrados na Tabela C1 (Apêndice C).

Figura 27 – Fotodegradação dos principais constituintes da mistura de Bc-Zn em função do tempo para 4,1 W UVC ($2,18 \times 10^{-6} \text{ Einstein L}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Figura 28 – Fotodegradação dos principais constituintes da mistura de Bc-Zn em função do tempo para 11,3 W UVC ($6,01 \times 10^{-6} \text{ Einstein L}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Figura 29 – Fotodegradação dos principais constituintes da mistura de Bc-Zn em função do tempo para 20,8 W UVC ($1,11 \times 10^{-5}$ Einstein L⁻¹ s⁻¹).

Os resultados indicaram que a fotodegradação dos componentes avaliados da mistura de Bc-Zn é maior com o aumento da taxa específica de emissão de fótons. Para as duas condições de fotólise com maior emissão de fótons, houve a redução das concentrações de Bc-Zn abaixo do limite de detecção, em torno de 80 minutos para a potência radiante UVC de 11,3 W e 40 minutos para a potência UVC de 20,8 W. Apesar de serem quantificadas apenas as concentrações dos congêneres A, B (soma de B1, B2 e B3) e F da Bc-Zn, observou-se degradação completa concomitante de todos os principais constituintes da bacitracina. As Figuras B2, B3 e B4 (Apêndice B) apresentam o desaparecimento dos picos que formam a configuração cromatográfica típica do antibiótico.

Para a condição de $6,01 \times 10^{-6}$ Einstein L⁻¹ s⁻¹ (Figura 28), notou-se que houve um aumento da concentração de Bc-Zn F. O fato desse constituinte ser o produto da oxidação de outros congêneres poderia evidenciar a ocorrência dessa conversão via mecanismo foto-oxidativo. No entanto, o efeito não foi observado de forma significativa na condição de menor emissão de fótons (Figura 27). A fotólise para $1,11 \times 10^{-5}$ Einstein L⁻¹ s⁻¹ resultou em degradação imediata da congênere F, uma vez que o composto está presente em quantidade proporcionalmente inferior em relação aos outros constituintes (Figura 29). A degradação da Bc-Zn F é importante, uma vez que o constituinte é considerado nefrotóxico na medicina humana (OKA *et al.*, 1989; IKAI *et al.*, 1994; SIN e WONG, 2003; PAVLI *et al.*, 2004; POTTS *et al.*, 2012), além de não apresentar atividade antimicrobiana importante.

Conforme visto na seção 6.1.2, o comprimento de onda de máxima absorção da Bc-Zn em solução aquosa corresponde a 254 nm é equivalente ao comprimento de onda de emissão da lâmpada UVC. Consequentemente, há uma significativa absorção de fótons pela Bc-Zn ($\epsilon_{254\text{nm}, \text{Bc}} = 3850 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), evidenciando a fotólise direta do antibiótico nessa condição. No estudo de Lundeen *et al.* (2016), a fotólise direta da bacitracina sob radiação UVA não foi constatada, indicando maior persistência do composto em ambiente aquático. No entanto, esses pesquisadores reportaram a oxidação fotoquímica indireta da Bc por oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) formado a partir da foto-sensitização da matéria orgânica sob UVA de alta intensidade. Nesse estudo, a degradação da Bc à concentração inicial de $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ seguiu uma cinética de pseudo-primeira ordem, apresentando constantes específicas de velocidade baixa, na faixa de $2,8$ a $7,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, os quais dependem da concentração de matéria orgânica presente. Além disso, os autores verificaram o importante papel do oxigênio singlete na foto-oxidação indireta da Bc ao constatarem redução considerável da degradação ao adicionarem supressores de $^1\text{O}_2$, como a azida de sódio e o isopropanol. Dessa forma, o mecanismo de ataque das espécies reativas de oxigênio, como radicais $\bullet\text{OH}$ e $^1\text{O}_2$ na molécula de Bc-Zn ainda necessita ser investigado no processo de fotólise indireta sob radiação UVC, a fim de compreender o papel dessas espécies, formadas a partir de compostos presentes na solução obtida com a degradação da Bc-Zn.

Os espectros de absorção da solução obtidos durante a fotólise em função do tempo (Figuras 33 a 35) revelaram o surgimento de outra banda em 330 nm. O perfil de concentração desses cromóforos em 330 nm foi acompanhado com o tempo, uma vez que a absorbância da solução é proporcional à concentração (lei de Beer-Lambert). Conforme mostra a Figura 30, as concentrações dessas espécies (não identificadas) durante as três condições de fotólise da Bc-Zn aumentaram em um primeiro momento sob radiação UVC e, em seguida, tenderam a diminuir. Adicionalmente, os espectros de absorção mostram que a banda nesse comprimento de onda aparece após o início da irradiação UV, indicando um possível mecanismo de geração desses intermediários através da fotólise da Bc-Zn e sua consequente degradação. Essa característica é mais evidenciada no experimento realizado com maior taxa de emissão de fótons (20,8 W UVC).

Figura 30 – Absorbância em função do tempo de espécies com absorbância em 330 nm.

A Figura 31 apresenta a evolução das medidas de pH em função do tempo durante os experimentos de fotólise. Observa-se ligeira redução do pH, mais pronunciada para potência radiante UVC de 20,8 W.

Figura 31 – Evolução do pH com o tempo das diferentes condições de fotólise.

Apesar de ser alcançada a degradação total da Bc-Zn nos experimentos de fotólise, a análise do carbono orgânico total das amostras coletadas durante o tempo total de 120 minutos não indicou mineralização significativa (Figura 32). O fato da Bc-Zn ser composta por peptídeos sugere que as ligações peptídicas podem ter sido rompidas pela fotólise, mas sem alterações significativas nos resíduos de aminoácidos. Uma vez que o anel cromóforo da tiazolina presente nas Bc-Zn A e B exibe absorção máxima em 253 nm (Newton e Abraham, 1953a), a manutenção da banda de absorção em torno desse valor nos espectros obtidos durante as fotólises sugere ainda a persistência dessa espécie em solução.

Figura 32 – Evolução do TOC com o tempo para os experimentos de degradação da Bc-Zn por meio do processo UV/H₂O₂.

6.2.1 Estimativa de Parâmetros Cinéticos da Fotólise da Bacitracina

A Tabela 13 apresenta os valores do percentual de degradação da Bc-Zn após 20 minutos e a constante cinética de pseudo-primeira ordem para as três condições de fotólise estudadas. Observa-se um expressivo aumento da velocidade de degradação da Bc-Zn com o aumento da taxa específica de emissão de fótons. As constantes cinéticas de pseudo-primeira ordem foram estimadas em MATLAB, conforme a Equação 43 e inseridas nas equações do sistema modelo fotoquímico (Seção 5.4.1). Os ajustes das curvas estão mostrados na Figura D1 (Apêndice D), obtendo-se coeficientes de determinação (R^2) de 99,35%, 99,43% e 99,59% para os experimentos de fotólise em potências radiantes UVC de 4,1 W, 11,3 W e 20,8 W, respectivamente.

Tabela 13 – Resultados da fotólise da mistura de Bc-Zn em diferentes potências.

Exp. Fotólise	Taxa específica de emissão fótons (Einstein L ⁻¹ s ⁻¹)	Degradação da Bc-Zn após 20 min (%)	$k_{\text{fotólise}}$ (s ⁻¹)
4,1 W	$2,18 \times 10^{-6}$	32,6	$3,76 \times 10^{-4}$
11,3 W	$6,01 \times 10^{-6}$	69,4	$9,48 \times 10^{-4}$
20,8 W	$1,11 \times 10^{-5}$	86,1	$1,92 \times 10^{-3}$

O rendimento quântico da Bc-Zn, conforme indicado na Seção 5.4.2, foi estimado através dos dados experimentais da fotólise. A concentração do composto e a absorvância são

variáveis em função do tempo. Desse modo, a absorbância da solução para as três condições de fotólise foi acompanhada durante os 120 minutos de duração total dos experimentos, conforme mostram as Figuras 33 a 35.

Figura 33 – Espectros de absorção da solução em diferentes tempos para o experimento de fotólise direta em 4,1 W UVC ($2,18 \times 10^{-6}$ Einstein $L^{-1} s^{-1}$).

Figura 34 – Espectros de absorção da solução em diferentes tempos para o experimento de fotólise direta em 11,3 W UVC ($6,01 \times 10^{-6}$ Einstein $L^{-1} s^{-1}$).

Figura 35 – Espectros de absorção da solução em diferentes tempos para o experimento de fotólise direta em 20,8 W UVC ($1,11 \times 10^{-5}$ Einstein $L^{-1} s^{-1}$). O inserto representa a curva de absorção em função do tempo no comprimento de onda de 254 nm.

As duas condições de fotólise com as menores potências radiantes UVC (Figura 33 e 34) não apresentaram alterações significativas nos valores de absorbância em 254 nm em função do tempo (diferenças menores que 5% em relação à média dos valores observados). Desse modo, as medidas foram consideradas constantes, sendo calculado um valor médio das absorbâncias em 254 nm. Conforme mostrado na Figura 35, a fotólise para a potência radiante UVC de 20,8 W apresentou diminuição da absorbância em relação ao tempo. Para essa condição, a Equação 46 da absorbância em função do tempo (em s), no comprimento de onda de 254 nm, foi ajustada através das medidas experimentais obtidas (inserto da Figura 35) e inserida na Equação 26 da Seção 5.4.1.

$$Abs(t) = -3 \times 10^{-16} t^4 + 4 \times 10^{-12} t^3 - 2 \times 10^{-8} t^2 - 3 \times 10^{-5} t + 0,1173 \quad (46)$$

A Figura 36 apresenta as curvas preditas em relação aos valores experimentais das concentrações normalizadas de Bc-Zn em função do tempo de fotólise. O resultado do valor do rendimento quântico da Bc-Zn estimado e os parâmetros constantes para a sua determinação estão mostradas na Tabela 14.

Figura 36 – Dados experimentais e curvas preditas das concentrações normalizadas de Bc-Zn em função do tempo.

Tabela 14 – Valores dos parâmetros constantes para o cálculo do rendimento quântico da fotólise direta da bacitracina zínica em solução aquosa com pH 6,5.

Parâmetros	Notação	Valor	Unidades
Coeficiente de absorção molar em 254 nm	$\epsilon_{254\text{nm}, \text{Bc}}$	3850	$\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$
Taxa de emissão de fótons em 4,1 W	$E_{p,0} (4,1 \text{ W})$	$2,18 \times 10^{-6}$	$\text{Einstein L}^{-1} \text{s}^{-1}$
Taxa de emissão de fótons em 11,3 W	$E_{p,0} (11,3 \text{ W})$	$6,01 \times 10^{-6}$	$\text{Einstein L}^{-1} \text{s}^{-1}$
Taxa de emissão de fótons em 20,8 W	$E_{p,0} (20,8 \text{ W})$	$1,11 \times 10^{-5}$	$\text{Einstein L}^{-1} \text{s}^{-1}$
Absorbância em 4,1 W (254 nm)	$Ab_{254 \text{ nm}} (4,1 \text{ W})$	0,127	-
Absorbância em 11,3 W (254 nm)	$Ab_{254 \text{ nm}} (11,3 \text{ W})$	0,078	-
Caminho óptico do reator	l_{reator}	2,25	cm
Caminho óptico da cubeta de medição	l	1,0	cm
Volume do tanque agitado	V_i	1,07	L
Volume total do reator fotoquímico	V_T	3,93	L
Volume de cada reator CSTR	$V_r = V_T/5$	0,786	L
Tempo total do tratamento	t	120	minutos
Rendimento quântico estimado	$\Phi_{(254\text{nm})}$	0,0141	mol Einstein^{-1}

Valores de rendimentos quânticos encontrados em estudos com compostos farmacêuticos incluem os obtidos por Snowberger *et al.*, 2016, os quais verificaram que os rendimentos quânticos das fluoroquinolonas como a ciprofloxacina, difloxacina, enrofloxacina, norfloxacina, perfloxacina e sarafloxacina em pH 7 foram respectivamente de 0,0728, 0,0665, 0,0565, 0,0981, 0,142 e 0,0563 mol Einstein^{-1} . No entanto, esses pesquisadores mostraram que os valores variaram significativamente com a forma em que as moléculas dos compostos se

encontram: catiônica, aniônica ou zwitteriônica. O estudo de Wols *et al.* (2014) investigou a degradação de 36 compostos farmacêuticos, incluindo 9 antibióticos. Os valores de rendimento quântico estimados variaram numa faixa entre 0,0009 a 0,041 mol Einstein⁻¹.

Embora o rendimento quântico tenha sido determinado através dos dados experimentais das concentrações dos principais congêneres da Bc-Zn, o valor obtido oferece uma estimativa bastante representativa da mistura total da qual se constitui o antibiótico. Isso porque os constituintes A, B1, B2 e B3 quantificados representam a grande parte da mistura (em torno de 73%) e a outra parcela consistem em um maior número de congêneres e em menores concentrações na mistura. Esses compostos degradam paralelamente às espécies consideradas durante o processo de fotólise, conforme observados nos cromatogramas das Figuras B2 a B4 (Apêndice B).

O sistema modelo fotoquímico considerando 5 CSTRs em série revelou uma estimativa satisfatória do rendimento quântico. A partir de 5 reatores em série, não houve diferenças superiores a 10^{-4} entre os valores estimados do rendimento quântico ao se considerar pelo menos 100 CSTRs em série e sem alterar significativamente os ajustes entre os valores medidos e preditos obtidos. Desse modo, o valor dos 5 reatores em série foi adotado para minimizar o esforço computacional.

6.3 Fotodegradação da Bacitracina Zíncica por meio do Processo UV/H₂O₂

A Figura 37 apresenta os dados experimentais obtidos da degradação da Bc-Zn (soma de A, B1, B2, B3 e F) para as sete condições planejadas de acordo com a matriz de Doehlert. As concentrações e composições iniciais da mistura de Bc-Zn dos experimentos, realizados em triplicata, do processo UV/H₂O₂ estão apresentados na Tabela C2 (Apêndice C). Adicionalmente, experimentos controle da solução de Bc-Zn com H₂O₂ sob ausência de radiação (conduzidos com a lâmpada do reator tubular fotoquímico desligada) foram executadas para as três concentrações de peróxido de hidrogênio utilizadas de 7,13 mmol L⁻¹, 10,7 mmol L⁻¹ e 14,3 mmol L⁻¹. Nos primeiros 10 minutos, a redução média relativa dos constituintes mensurados da Bc-Zn foi menor do que 5% e, portanto, considerada desprezível em relação à degradação fotoquímica.

Os resultados na Figura 37 revelam que nos experimentos realizados com a mesma potência radiante UVC, a diferença da concentração de H₂O₂ não resulta em diferença

expressiva na degradação dos constituintes da Bc-Zn. Por outro lado, experimentos sob a mesma concentração de H_2O_2 demonstram que o aumento da taxa de emissão de fótons aumenta consideravelmente a taxa de degradação dos congêneres da Bc-Zn.

Figura 37 – Evolução com o tempo da concentração total das Bc-Zn A, B2, B2, B3 e F do processo UV/H₂O₂ em diferentes condições experimentais. O primeiro perfil mostra a degradação dos principais constituintes da Bc-Zn de todas as sete condições experimentais planejadas pela matriz de Doehlert. Os outros perfis destacam as condições indicados pela área sombreada na matriz de Doehlert. As barras representam o desvio-padrão de cada um dos dados experimentais.

Analogamente à fotólise, os cromatogramas em HPLC de todos os experimentos revelam uma redução conjunta de todos os constituintes da família da bacitracina. Dessa forma, a taxa de degradação da mistura de Bc-Zn pode ser aproximada à taxa de redução dos constituintes quantificados. Além disso, a comparação entre as análises em HPLC dos produtos após 120 minutos de tratamento entre a fotólise e o processo UV/H₂O₂ revela que o pico com tempo de retenção em torno de 4 minutos nos cromatogramas da fotólise não foi detectado em nenhum dos cromatogramas do processo UV/H₂O₂, Figuras B2 a B5 (Apêndice B). Isso sugere uma decomposição maior das moléculas do antibiótico nesse último tratamento.

A presença do cromóforo caracterizado no comprimento de onda em 330 nm nos experimentos de fotólise não foi observada em nenhum dos experimentos foto-oxidativos UV/H₂O₂, sugerindo a ausência dessa espécie. Por outro lado, uma redução gradativa da absorbância em 254 nm com o tempo foi verificada em todos os experimentos de UV/H₂O₂, conforme exemplificado na Figura 38. Após a adição de H₂O₂ o pico da Bc-Zn não é visível e o valor da absorção em 254 nm da solução aumenta proporcionalmente com a concentração de H₂O₂ inicial adicionada na solução estudada. Consecutivamente, essa absorbância diminui com o tempo de tratamento (inserto da Figura 38).

A Figura 39 apresenta os resultados da análise de TOC em função do tempo tanto dos experimentos de fotólise quanto do processo UV/H₂O₂. Ao contrário da fotólise, todos os tratamentos com UV/H₂O₂ resultaram em diminuição significativa de TOC. A maior mineralização foi obtida no experimento 3, no qual se obtiveram 68,5% de remoção de TOC após os 120 minutos. A avaliação das sete condições experimentais através do planejamento Doehlert indica que a variação da taxa específica de emissão de fótons tem um efeito mais significativo na redução do TOC do que a variação na concentração de peróxido de hidrogênio.

Figura 38 – Absorbância em função do tempo durante o processo UV/H₂O₂. Condições experimentais: [Bc-Zn]₀ = 50 mg L⁻¹, [H₂O₂]₀ = 14,27 mmol L⁻¹ e $E_{p,0} = 1,11 \times 10^{-5}$ Einstein L⁻¹ s⁻¹. A legenda 0' minutos indica a absorbância da mistura aquosa antes da adição de H₂O₂ em 0 minutos. O inserto representa a absorbância em função do tempo em 254nm.

Figura 39 – Evolução do TOC em função do tempo para os experimentos de degradação da Bc-Zn por meio do processo UV/H₂O₂ e fotólise direta. O primeiro perfil mostra os valores médios de TOC de todas as sete condições experimentais planejadas pela matriz de Doehlert. Os outros perfis destacam as condições indicados pela área sombreada na matriz de Doehlert. As barras representam o desvio-padrão do experimento 7, realizado em triplicata.

6.3.1 Análise da Concentração de Peróxido de Hidrogênio Residual e do pH

Os resultados da concentração residual de H_2O_2 em função do tempo de fotodegradação da Bc-Zn estão mostrados na Figura 40. A Tabela 15 apresenta a percentagem de remoção do H_2O_2 após 120 minutos em relação à concentração inicialmente adicionada, classificados em ordem crescente de $[\text{H}_2\text{O}_2]_0$.

Figura 40 – Concentração de H_2O_2 residual durante os experimentos de degradação da Bc-Zn por meio do processo UV/ H_2O_2 . Os dados representam a média da concentração de H_2O_2 residual de experimentos em duplicata.

Tabela 15 – Redução da concentração de H_2O_2 após 120 minutos.

Exp.	$[\text{H}_2\text{O}_2]_0$ (mmol L ⁻¹)	Taxa específica de emissão de fótons ($\times 10^{-6}$ Einstein L ⁻¹ s ⁻¹)	Consumo de H_2O_2 após 120 min (%)
5	7,1	4,23	65,3
4	7,1	9,12	88,4
6	10,7	2,18	58,0
7	10,7	6,01	76,1
3	10,7	11,1	97,8
1	14,3	4,23	59,8
2	14,3	9,12	93,6

A análise dos dados de concentrações de H_2O_2 indicou que os experimentos realizados para os mesmos valores de $[\text{H}_2\text{O}_2]_0$ apresentaram uma diminuição considerável da concentração do oxidante para potências radiantes maiores. A partir de $9,12 \times 10^{-6}$ Einstein L⁻¹ s⁻¹, a radiação

UV deixa de ser um fator limitante para o consumo de H_2O_2 ao se considerar as altas taxas de remoção desse composto nos experimentos 2, 3 e 4.

A Figura 41 apresenta as medidas de pH em função do tempo para as 7 condições experimentais. Observou-se diminuição considerável do pH em quase todos os experimentos logo nos primeiros 10 minutos. Em seguida, um valor praticamente constante em torno de pH 4 é mantido até o tempo total de experimento de 120 minutos. Uma vez que a mistura de Bc-Zn se decompõe nos primeiros minutos em todos os experimentos, a diminuição do pH indica a formação de produtos de degradação ácidos. No experimento 3 houve ligeiro aumento de pH após os 90 minutos de tratamento, o que pode estar associado à degradação parcial de produtos.

Figura 41 – Evolução do pH durante os experimentos de degradação da Bc-Zn por meio do processo UV/ H_2O_2 .

6.3.2 Estimativa de Parâmetros Cinéticos do Processo UV/ H_2O_2

As constantes cinéticas de pseudo-primeira ordem da degradação da Bc-Zn foram decompostas em constantes cinéticas da fotólise ($k_{fotólise}$), do processo UV/ H_2O_2 ($k_{oxidativa}$) e total (k_{total}) e estão sumarizadas na Tabela 16. Esses valores foram estimados empregando o *software* MATLAB, considerando as equações do modelo fotoquímico em batelada com recirculação (Seção 5.4.1) e as Equações 43 e 45 (Seção 5.4.3).

Tabela 16 – Resultados das constantes cinéticas de pseudo-primeira ordem para o processo UV/H₂O₂.

Cond.	Taxa específica de emissão de fótons ($\times 10^{-6}$ Einstein L ⁻¹ s ⁻¹)	[H ₂ O ₂] ₀ (mmol L ⁻¹)	$k_{\text{fotólise}}$ ($\times 10^{-4}$ s ⁻¹)	$k_{\text{oxidativa}}$ ($\times 10^{-2}$ s ⁻¹)	k_{total}^* ($\times 10^{-2}$ s ⁻¹)	% Influência fotólise	% Influência oxidação
1	4,23	14,3	7,48	1,72	1,80 ($\pm 0,08$)	4,2	95,7
2	9,12	14,3	10,3	3,76	3,86 ($\pm 0,18$)	2,7	97,4
3	11,1	10,7	16,5	9,32	9,49 ($\pm 0,40$)	1,7	98,2
4	9,12	7,1	16,1	4,20	4,37 ($\pm 0,33$)	3,7	96,3
5	4,23	7,1	7,48	1,83	1,91 ($\pm 0,19$)	3,9	96,2
6	2,18	10,7	3,23	0,93	0,96 ($\pm 0,20$)	3,4	96,9
7	6,01	10,7	8,91	3,35	3,44 ($\pm 0,53$)	2,6	97,5

* Os valores entre parênteses indicam o desvio-padrão de cada medida realizada em triplicata. A estimativa de cada uma das constantes cinéticas dos 21 experimentos de UV/H₂O₂ está apresentada na Tabela E1 (Apêndice E). As constantes de pseudo-primeira ordem k_{total} , $k_{\text{fotólise}}$ e $k_{\text{oxidativa}}$ foram calculadas respectivamente através das Equações 43, 44 e 45 (Seção 5.4.3).

Os valores da Tabela 16 revelam que a parcela fotolítica da Bc-Zn apresenta influência pouco significativa na cinética de degradação da Bc-Zn (média de 3,2% do total). A maior parte da degradação deve-se ao processo UV/H₂O₂. Embora as diferenças entre as concentrações de peróxido de hidrogênio utilizadas não tenham demonstrado influência significativa na taxa de degradação da Bc-Zn, a adição desse reagente aumentou consideravelmente a sua velocidade em relação aos experimentos com radiação UVC somente. Os valores das constantes cinéticas gerais de pseudo-primeira ordem do processo UV/H₂O₂ são uma ordem de grandeza maiores que as constantes cinéticas da fotólise. Consequentemente, uma redução considerável do tempo de degradação das espécies de Bc-Zn foi constatada nos experimentos de UV/H₂O₂.

A constante de segunda ordem k_7 , correspondente à reação do radical HO• com a Bc-Zn, foi estimada de acordo com a modelagem descrita pelas Equações 36 a 42 da Seção 5.4.3 e Equações 18, 20 e 21 da Seção 5.4.1. O valor de k_7 e o valor de k_2 empregado (referente à constante cinética de segunda ordem da reação do radical HO• com o H₂O₂) estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 – Valores das constantes cinéticas de segunda ordem do processo de degradação da Bc-Zn pelo processo UV/H₂O₂.

	Constantes de segunda ordem (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	Valores da literatura (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	Referência
Valor considerado	$k_2 = 2,7 \times 10^7$	$2,7 \times 10^7$ $1,2-4,5 \times 10^7$	Buxton <i>et al.</i> (1988) Simunovic <i>et al.</i> (2011)
Valor estimado	$k_7 = 3,04 \times 10^9$	Não publicado	—

A maioria das pesquisas que investigam os modelos cinéticos do processo UV/H₂O₂ utilizam o valor da constante cinética de segunda ordem k_7 proposto inicialmente por Buxton *et al.* (1988) (LIAO e GUROL, 1995; CRITTENDEN, 1999; EDALATMANESH *et al.*, 2007; SONG *et al.*, 2008; CHANG *et al.*, 2010; WOLS *et al.*, 2014; RUBIO-CLEMENTE *et al.*, 2017). Os valores das constantes cinéticas de segunda ordem para 36 fármacos, determinados por Wols *et al.* (2014) situaram-se na faixa de 0,63 a 16×10^9 L mol⁻¹ s⁻¹ e numa média de $7,6 \times 10^9$ L mol⁻¹ s⁻¹. Comparado a esses valores, a constante cinética de segunda ordem estimada para a reação entre Bc-Zn e radicais hidroxil está na mesma ordem de grandeza.

A Figura 42 mostra os valores preditos e experimentais da concentração de Bc-Zn para as sete condições experimentais do planejamento Doehlert. O tempo médio de degradação

completa dos principais congêneres da Bc-Zn foi em torno de 4 minutos. Uma vez que as medidas da concentração de H_2O_2 foram realizadas a cada 10 minutos durante o tempo de tratamento de 120 minutos, os dados experimentais dessa variável no intervalo de tempo 0-10 minutos não foram coletados e, conseqüentemente, não foram empregados na modelagem. Desse modo, a Figura 45 apresenta apenas as curvas preditas da concentração do peróxido, utilizando-se a constante k_2 de $2,7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, valor frequentemente adotado na literatura. Conforme esperado, o decréscimo da concentração de H_2O_2 é mais pronunciado nas condições em que taxa de emissão de fótons é maior.

Os ajustes obtidos entre as curvas preditas e os dados experimentais da degradação da Bc-Zn mostraram coeficientes de determinação (R^2) elevados. Os melhores ajustes foram observados para os experimentos 1, 2, 4 e 7. Portanto, o modelo aplicado nesse estudo foi considerado adequado para representar a cinética de degradação do antibiótico.

Figura 42 – Resultados dos ajustes realizado em MATLAB para determinação das constantes cinéticas de segunda ordem para degradação de Bc-Zn pelo processo UV/H₂O₂ em diferentes condições experimentais.

6.3.3 Análise Estatística dos Resultados do Processo UV/H₂O₂

A influência dos fatores envolvidos na degradação da Bc-Zn por meio do processo UV/H₂O₂ foi analisada através do modelo de superfície de resposta, baseado no planejamento experimental pela matriz Doehlert. A Tabela 18 mostra os valores das variáveis independentes: a taxa específica de emissão de fótons e concentração inicial de H₂O₂, representados respectivamente por X_1 e X_2 , bem como os valores codificados correspondentes para cada condição experimental. São apresentados nessa mesma tabela os valores das respostas, ou variáveis dependentes Y_1 , Y_2 e Y_3 , que equivalem respectivamente à constante cinética de pseudo-primeira ordem (k_{total}), o percentual de degradação de Bc-Zn em 1 minuto e a remoção de TOC após 120 minutos de tratamento. Deve-se lembrar de que os efeitos das variáveis independentes são restritos ao domínio experimental estudado de cada uma.

O ajuste de regressão múltipla das respostas obtidas (Y_i , $i = 1, 2$ e 3) em relação às variáveis X_1 e X_2 foi feito pelo modelo polinomial de superfície de resposta (Equação 47):

$$Y_i = a + b X_1 + c X_2 + d X_1^2 + e X_2^2 + f X_1 X_2, \quad i = 1, 2, 3 \quad (47)$$

As respostas ótimas são encontradas para valores mais elevados de Y_i . Derivando-se a Equação 47 em relação às variáveis X_1 e X_2 e igualando-se a zero as equações resultantes, obtém-se:

$$X_1 = \frac{-fX_2 - b}{2d} \quad (48)$$

$$X_2 = \frac{-fX_1 - c}{2e} \quad (49)$$

Desse modo, quando $d < 0$ e $e < 0$, pode-se determinar o ponto ótimo global respectivamente para as variáveis X_1 e X_2 . Substituindo a expressão de X_2 em X_1 e vice-versa, obtêm-se as Equações 50 e 51:

$$X_{1,ótimo} = \frac{cf - 2eb}{4de - f^2} \quad (50)$$

$$X_{2,ótimo} = \frac{bf - 2de}{4de - f^2} \quad (51)$$

Tabela 18 – Valores das variáveis independentes (fatores, X_1 e X_2) e dependentes (respostas, Y_1 , Y_2 e Y_3) para os experimentos de degradação de Bc-Zn por meio do processo UV/ H_2O_2 segundo o projeto Doehlert.

Variáveis Independentes					Respostas		
Taxa específica de emissão de fótons			Concentração inicial de H_2O_2		Y_1	Y_2	Y_3
Cond.	X_1' * codificado	$E_{p,0}$ experimental ($\times 10^{-6}$ Einstein $L^{-1} s^{-1}$)	X_2' * codificado	$[H_2O_2]_0$ experimental (mmol L^{-1})	k_{total} ($\times 10^{-2} s^{-1}$)	% degradação o de Bc-Zn (1 min)	% remoção TOC após 120 min
1'	-0,509	4,23	0,866	14,27	1,84	70,2	n.d.
1''	-0,509	4,23	0,866	14,27	1,70	66,2	49,9
1'''	-0,509	4,23	0,866	14,27	1,85	67,9	51,5
2'	0,634	9,12	0,866	14,27	4,02	88,9	n.d.
2''	0,634	9,12	0,866	14,27	3,91	84,2	62,6
2'''	0,634	9,12	0,866	14,27	3,66	84,8	63,9
3'	1,099	11,1	0	10,70	9,95	100,0	n.d.
3''	1,099	11,1	0	10,70	9,34	99,1	69,5
3'''	1,099	11,1	0	10,70	9,19	100,0	67,5
4'	0,634	9,12	-0,866	7,13	4,70	93,1	n.d.
4''	0,634	9,12	-0,866	7,13	4,37	90,4	60,7
4'''	0,634	9,12	-0,866	7,13	4,03	92,9	58,0
5'	-0,509	4,23	-0,866	7,13	2,13	71,4	n.d.
5''	-0,510	4,23	-0,866	7,13	1,77	68,6	47,6
5'''	-0,511	4,23	-0,866	7,13	1,82	64,5	49,2
6'	-0,990	2,18	0	10,70	0,790	41,6	n.d.
6''	-0,990	2,18	0	10,70	0,920	48,5	32,0
6'''	-0,990	2,18	0	10,70	1,18	56,7	36,6
7'	0,093	6,01	0	10,70	3,06	84,6	64,7
7''	0,093	6,01	0	10,70	4,04	88,3	54,9
7'''	0,093	6,01	0	10,70	3,22	79,8	61,7

*Os valores (X_i') foram recodificados através dos valores experimentais obtidos (x_i') pela equação $X_i' = (x_i' - x_i^0)/\Delta x_i \times \delta$, no qual i representa o i -ésimo valor da variável independente; x_i^0 , o valor planejado do ponto central; Δx_i , o intervalo estabelecido de variação e δ , o intervalo estabelecido de variação do código de cada fator (SAUTOUR, 2001; FERREIRA et al., 2004). n.d.: não determinado devido a problemas com o equipamento.

Para a resposta Y_1 (constante cinética de pseudo-primeira ordem, k_{total}) o modelo de superfície de resposta em valores codificados X_1 e X_2 é dado pela Equação 52:

$$Y_1 = 3,162 \times 10^{-2} + 3,100 \times 10^{-2} X_1 - 1,652 \times 10^{-3} X_2 + 1,723 \times 10^{-2} X_1^2 - 1,255 \times 10^{-2} X_2^2 - 1,973 \times 10^{-3} X_1 X_2 \quad (52)$$

A análise de variância (ANOVA) da resposta Y_1 é apresentada na Tabela 19, obtida por meio do software *Statgraphics Centurion XVII*, considerando 95% de confiança e 15 graus de liberdade. Os valores X_1^2 , X_1X_2 e X_2^2 representam os termos quadráticos do modelo.

Tabela 19 – Análise de variância (ANOVA) para a resposta Y_1 (k_{total}).

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos quadrados	F	Valor p
X_1	0,0112973	1	0,0112973	135,82	0
X_2	0,0000278	1	0,0000278	0,33	0,5715
X_1^2	0,0007052	1	0,0007052	8,48	0,0107
X_1X_2	0,0000115	1	0,0000115	0,14	0,7157
X_2^2	0,0003381	1	0,0003381	4,06	0,0621
Total (erro)	0,0012477	15	0,0000832		
Total (corr.)	0,0146625	20			

O valor de p ($p < 0,05$) apresentado pelos termos X_1 e X_1^2 indica que a taxa específica de emissão de fótons exerce um efeito significativo na constante cinética de pseudo-primeira ordem da fotodegradação da Bc-Zn. Essas fontes de variação atuam positivamente na cinética de degradação da Bc-Zn, conforme se observa no diagrama de Pareto (Figura 43). Os outros termos atuam de forma negativa, mas sem efeito expressivo, embora X_2^2 represente um fator quase significativo para essa resposta, de acordo o limite estabelecido pela análise estatística.

Figura 43 – Diagrama de Pareto para a resposta Y_1 (k_{total}).

A Figura 44 apresenta a superfície de resposta para a variável Y_1 obtida MATLAB R2017. Os pontos obtidos pelos experimentos de 1 a 7, correspondentes à matriz Doehlert, estão representados nessa figura. O coeficiente de determinação R^2 foi de 91,49%, indicando um ajuste satisfatório da superfície de resposta. Observou-se aumento significativo de Y_1 ao se aumentar a taxa específica de emissão de fótons (X_1). Por outro lado, a resposta Y_1 ótima para cada condição da variável X_1 é encontrada para uma concentração inicial de H_2O_2 (X_2) praticamente na metade do domínio considerado de X_2 . Esse efeito pode ser mais bem analisado na superfície de contorno apresentada na Figura 45, no qual a superfície de resposta é caracterizada por uma região em sela devido à concavidade positiva para a variável resposta em relação a X_1 ($X_1^2 > 0$) e negativa em relação a X_2 ($X_2^2 < 0$). Calculando-se um ponto ótimo local para o domínio dessa superfície de resposta, uma vez que $d > 0$ e $e < 0$, tem-se que $X_1 = 1,099$, $X_2 = -0,1522$ (Equação 49). A máxima condição experimental de 20,8 W UVC restringe o alcance de um ponto ótimo global para Y_1 . Dessa forma, o ponto ótimo para o domínio considerado, em valores reais, foram $E_{p,0} = 11,1 \times 10^{-6} \text{ Einstein L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 10,1 \text{ mmol L}^{-1}$. Essa condição determinada está próxima a do experimento 3, resultando em $Y_1 = k_{total} = 8,67 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Figura 44 – Superfície de resposta para Y_1 (k_{total}).

Figura 45 – Gráfico de contorno correspondente à superfície de resposta para a variável Y_1 .

O ajuste do modelo de superfície de resposta para a variável Y_2 (% degradação de Bc-Zn em 1 minuto) em valores codificados X_1 e X_2 é dado pela Equação 53:

$$Y_2 = 82,236 + 23,01586 - 1,618 X_2 - 8,418 X_1^2 - 3,056 X_2^2 - 3,064 X_1 X_2 \quad (53)$$

O coeficiente de determinação (R^2) foi de 94,94%, indicando boa concordância entre os valores experimentais e calculados. A análise de variância (ANOVA) da resposta Y_2 está mostrada na Tabela 20, considerando 95% de confiança e 15 graus de liberdade.

Tabela 20 – Análise de variância (ANOVA) para a resposta Y_2 (% de degradação da Bc-Zn após 1 minuto).

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos quadrados	F	Valor p
X_1	5113,48	1	5113,48	268,85	0
X_2	28,6638	1	28,6638	1,51	0,2385
X_1^2	168,316	1	168,316	8,85	0,0094
$X_1 X_2$	27,6219	1	27,6219	1,45	0,2468
X_2^2	20,0456	1	20,0456	1,05	0,3209
Total (erro)	285,294	15	19,0196		
Total (corr.)	5637,88	20			

A Tabela 20 e o diagrama de Pareto na Figura 46 revelam que os termos X_1 e X_1^2 exercem efeito significativo na resposta Y_2 . O aumento da taxa de emissão de fótons aumenta consideravelmente o percentual de degradação da Bc-Zn no tempo de 1 minuto.

Figura 46 – Diagrama de Pareto para a resposta Y_2 (% de redução de Bc-Zn após 1 minuto).

As características quadráticas podem ser visualizadas pela superfície de resposta para a variável Y_1 (Figura 47). Uma vez que os termos quadráticos do modelo dado pela Equação 51 são negativos ($d < 0$ e $e < 0$), é possível determinar o ponto ótimo do domínio considerado, embora o ótimo global da superfície gerada esteja nas vizinhanças. O limite máximo do domínio experimental para X_1 é 1,099 ou $E_{p,0} = 11,1 \times 10^{-6}$ Einstein $L^{-1} s^{-1}$ e consequentemente, $X_2 = -0,8154$ (Equação 49), ou $[H_2O_2]_0 = 7,34$ mmol L^{-1} . Embora a concentração de H_2O_2 não exerça efeito significativo na resposta, esses valores determinam um valor de $Y_2 = 99,4\%$.

Figura 47 – Superfície de resposta para Y_2 (% de degradação da Bc-Zn após 1 minuto).

Figura 48 – Gráfico de contorno correspondente à superfície de resposta para a variável Y_2 .

O ajuste do modelo de superfície de resposta para a variável Y_3 (% remoção de TOC) em valores codificados de X_1 e X_2 resulta na Equação 54:

$$Y_3 = 59,153 + 14,987 X_1 + 1,728 X_2 - 7,865 X_1^2 - 2,742 X_2^2 + 0,828 X_1 X_2 \quad (54)$$

O coeficiente de determinação (R^2) foi de 92,33%, indicando boa concordância entre os valores experimentais e preditos. A análise de variância (ANOVA) da resposta Y_3 está mostrada na Tabela 21, considerando 95% de confiança e 9 graus de liberdade. Os valores X_1^2 , X_1X_2 e X_2^2 representam os termos quadráticos da Equação.

Tabela 21 – Análise de variância (ANOVA) para a resposta Y_3 (% de remoção de TOC).

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos quadrados	F	Valor p
X_1	1394,06	1	1394,06	97,6	0
X_2	18,8686	1	18,8686	1,32	0,28
X_1^2	125,895	1	125,895	8,81	0,0157
X_1X_2	1,34615	1	1,34615	0,09	0,7658
X_2^2	13,5932	1	13,5932	0,95	0,3548
Total (erro)	128,554	9	14,2837		
Total (corr.)	1676,3	14			

A Tabela 21 e o diagrama de Pareto na Figura 49 revelam efeitos significativos dos termos X_1 e X_1^2 quanto à resposta Y_3 ($p < 0,05$). O aumento da taxa específica de emissão de fótons aumenta consideravelmente o percentual de remoção do TOC após 120 minutos de tratamento. Os termos quadráticos X_1^2 e X_2^2 são negativos, ou seja, a função de resposta tanto para Y_1 quanto para Y_2 apresenta concavidade para baixo, sendo esse efeito considerado significativo para X_1^2 .

Figura 49 – Diagrama de Pareto para análise da resposta Y_3 (% de remoção de TOC).

Os valores de $d < 0$ e $e < 0$ do modelo para Y_3 (Equação 54) indicam a possibilidade de um ponto ótimo global na superfície de resposta. As Figuras 50 e 51 mostram as superfícies

de resposta e de contorno para Y_3 , indicando, no domínio considerado, a proximidade do ponto ótimo. Para o limite máximo do domínio experimental de $X_1 = 1,099$, $X_2 = 0,4810$ (Equação 49). Em valores reais: $E_{p,0} = 11,1 \times 10^{-6}$ Einstein $L^{-1} s^{-1}$ e $[H_2O_2]_0 = 12,68$ mmol L^{-1} , resultando em $Y_3 = 66,8\%$.

Figura 50 – Superfície de resposta para Y_3 (% de remoção de TOC após 120 minutos).

Figura 51 – Gráfico de contorno correspondente à superfície de resposta para a variável Y_3 .

Os três modelos de superfície de resposta gerados para Y_1 , Y_2 e Y_3 apresentaram uma distribuição de resíduos considerada satisfatória, como apresentado nas Figuras F1, F2 e F3 do Apêndice F (valores dos resíduos em função dos valores preditos).

Para alcançar o ótimo global para a análise de TOC foram realizados experimentos adicionais. Uma vez que o antibiótico Bc-Zn apresenta uma mistura de moléculas relativamente grandes, os resultados de TOC representa uma medida importante para avaliar o quanto os produtos de degradação da Bc-Zn são efetivamente decompostos. A Tabela 22 mostra os resultados gerados para a máxima taxa específica de emissão de fótons e três condições diferentes de concentração inicial de H_2O_2 , equivalentes a 2 vezes, 2,5 vezes e 3 vezes a estequiométrica calculada para a reação de oxidação teórica total da molécula de Bc-Zn.

Tabela 22 – Valores das variáveis independentes (fatores, X_1 e X_2) e dependentes (respostas Y_1 , Y_2 e Y_3) para os experimentos do projeto Doehlert.

Variáveis Independentes					Respostas		
Taxa específica de emissão de fótons			Concentração inicial de H_2O_2		Y_1	Y_2	Y_3
Cond.	X_1' * codificado	$E_{p,0}$ experimental ($\times 10^{-6}$ Einstein $L^{-1} s^{-1}$)	X_2' * codificado	$[H_2O_2]_0$ experimental (mmol L^{-1})	k_{total} ($\times 10^{-2} s^{-1}$)	% degradação de Bc-Zn (1 min)	% remoção TOC após 120 min
8'	1,099	11,1	0,866	14,27	1,83	100,0	n.d.
8''	1,099	11,1	0,866	14,27	1,40	100,0	69,7
8'''	1,099	11,1	0,866	14,27	1,53	100,0	70,8
9'	1,099	11,1	1,730	17,83	7,65	97,2	n.d.
9''	1,099	11,1	1,730	17,83	5,91	100,0	70,3
9'''	1,099	11,1	1,730	17,83	9,83	99,4	71,2
10'	1,099	11,1	2,595	21,40	4,58	97,6	n.d.
10''	1,099	11,1	2,595	21,40	4,35	100,0	66,2
10'''	1,099	11,1	2,595	21,40	6,68	100,0	67,0

*Os valores (X_i') foram recodificados através dos valores experimentais obtidos (x_i') pela equação $X_i' = (x_i' - x_i^0)/\Delta x_i \times \delta$, no qual i representa o i -ésimo valor da variável independente; x_i^0 , o valor planejado do ponto central; Δx_i , o intervalo estabelecido de variação e δ , o intervalo estabelecido de variação do código de cada fator (SAUTOUR, 2001; FERREIRA et al., 2004). n.d.: não determinado devido a problemas com o equipamento.

O ajuste do modelo de regressão múltipla levou em consideração os resultados dos experimentos adicionais em conjunto com os experimentos anteriores, ou seja, condições diferentes de UV/ H_2O_2 de 1 a 10. Dessa forma, o modelo de $Y_{1,total}$, em valores codificados de X_1 e X_2 , é dado por:

$$Y_{1,total} = 2,974 \times 10^{-2} + 3,826 \times 10^{-2}X_1 + 2,706 \times 10^{-3}X_2 + 3,197 \times 10^{-2}X_1^2 - 1,656 \times 10^{-2}X_2^2 + 1,524 \times 10^{-2}X_1X_2 \quad (55)$$

O coeficiente de determinação R^2 foi de 77,03%, indicando um ajuste menos adequado da superfície de resposta para o domínio experimental explorado. A análise de variância (ANOVA) da resposta Y_1 está mostrada na Tabela 23, considerando 95% de confiança e 24 graus de liberdade.

Tabela 23 – Análise de variância (ANOVA) para a resposta $Y_{1,total}(k_{total})$.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos quadrados	F	Valor p
X_1	0,0145495	1	0,0145495	26,45	0
X_2	0,00384429	1	0,00384429	6,99	0,0142
X_1^2	0,00351606	1	0,00351606	6,39	0,0185
X_1X_2	0,000991391	1	0,000991391	1,8	0,192
X_2^2	0,0057656	1	0,0057656	10,48	0,0035
Total (erro)	0,0132011	24	0,000550047		
Total (corr.)	0,0574626	29			

No diagrama de Pareto da Figura 52, observa-se que a adição dos experimentos 8, 9 e 10 aumentou os efeitos significativos na resposta Y_1 . Os termos X_1 e X_1^2 apresentam efeito positivo na resposta, enquanto os termos X_2 e X_2^2 influenciam-na negativamente. Essas características, que levam em consideração a curvatura da superfície nas direções de X_1 e X_2 , podem ser mais bem analisadas na superfície de resposta apresentada na Figura 53 e no respectivo gráfico de contorno na Figura 54. Ambas as figuras apresentam o domínio expandido para os experimentos adicionais, mas indicam o ótimo já visualizado na Figura 44. Calculando-se o ponto ótimo local para o domínio dessa superfície de resposta para a máxima taxa específica de emissão de fótons de $11,1 \times 10^{-6}$ Einstein $L^{-1} s^{-1}$, tem-se que $X_2 = 0,5873$, ou em valores reais, $[H_2O_2]_0 = 13,12$ mmol L^{-1} . Essas condições ótimas estão um pouco acima da alcançada anteriormente para a resposta de Y_1 , $Y_{1,total} = 1,16 \times 10^{-1} s^{-1}$.

Figura 52 – Diagrama de Pareto para a resposta $Y_{1,total}$ (k_{total}).

Figura 53 – Superfície de resposta para $Y_{1,total}$ (k_{total}).

Figura 54 – Gráfico de contorno correspondente à superfície de resposta para a variável $Y_{1,total}$.

Para a variável $Y_{2,total}$ (% degradação de Bc-Zn em 1 minuto), correspondente a todos os experimentos, o ajuste do modelo de superfície de resposta em valores codificados de X_1 e X_2 é dado pela Equação 56:

$$Y_{2,total} = 79,440 + 23,419 X_1 - 0,924 X_2 - 5,294 X_1^2 - 0,565 X_2^2 - 0,330 X_1 X_2 \quad (56)$$

O coeficiente de determinação R^2 foi de 95,55 %, indicando um ajuste adequado da superfície de resposta. A análise de variância (ANOVA) da resposta $Y_{2,total}$ é apresentada nas Tabela 24, considerando 95% de confiança e 24 graus de liberdade.

Tabela 24 – Análise de variância (ANOVA) para a resposta $Y_{2,total}$ (% de degradação de Bc-Zn após 1 minuto).

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos quadrados	F	Valor p
X_1	2454,56	1	2454,56	156,38	0
X_2	0,00737855	1	0,00737855	0	0,9829
X_1^2	96,4367	1	96,4367	6,14	0,0206
$X_1 X_2$	0,464342	1	0,464342	0,03	0,8649
X_2^2	6,71706	1	6,71706	0,43	0,5192
Total (erro)	376,715	24	15,6965		
Total (corr.)	8474,06	29			

A Tabela 24 e o diagrama de Pareto na Figura 55 revelam que os termos X_1 e X_1^2 exercem efeitos significativos na resposta Y_2 . O aumento da taxa específica de emissão de fótons aumenta consideravelmente o percentual de degradação da Bc-Zn no tempo de 1 minuto. O termo quadrático X_1^2 mantém-se negativo e importante na resposta da porcentagem de degradação da Bc-Zn em relação à dada pela Equação 53. No entanto, o termo X_2^2 tem seu sinal invertido para positivo, embora não represente um fator significativo. Desse modo, para o limite máximo do domínio experimental de $X_1 = 1,099$ ou $E_{p,0} = 11,1 \times 10^{-6}$ Einstein $L^{-1} s^{-1}$, $X_2 = -1,1384$ (Equação 49), ou $[H_2O_2]_0 = 15,39$ mmol L^{-1} , resultando em $Y_{2,total} = 98,05\%$.

Figura 55 – Diagrama de Pareto para a resposta $Y_{2,total}$ (% de degradação de Bc-Zn após 1 minuto).

Figura 56 – Superfície de resposta para $Y_{2,total}$ (% de redução de Bc-Zn após 1 minuto).

Figura 57 – Gráfico de contorno correspondente à superfície de resposta para a variável $Y_{2,total}$.

O modelo de regressão múltipla para a variável $Y_{3,total}$ (% remoção de TOC) em valores codificados X_1 e X_2 é dado pela Equação 57:

$$Y_{3,total} = 58,441 + 15,268 X_1 + 2,104 X_2 - 6,833 X_1^2 - 1,785 X_2^2 + 2,309 X_1 X_2 \quad (57)$$

O coeficiente de determinação (R^2) indicou concordância satisfatória entre os valores experimentais e preditos (94,32%). A análise de variância (ANOVA) para a resposta $Y_{3,total}$ está mostrada nas Tabela 25, considerando 95% de confiança e 15 graus de liberdade.

Tabela 25 – Análise de variância (ANOVA) para a resposta $Y_{3,total}$ (% de remoção de TOC).

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos quadrados	F	Valor p
X_1	1675,19	1	1675,19	175,44	0
X_2	32,9306	1	32,9306	3,45	0,083
X_1^2	121,558	1	121,558	12,73	0,0028
X_1X_2	15,4908	1	15,4908	1,62	0,2222
X_2^2	45,997	1	45,997	4,82	0,0443
Total (erro)	143,228	15	9,54853		
Total (corr.)	2519,86	20			

No diagrama de Pareto da Figura 58, os termos X_1 e X_1^2 e X_2^2 exercem efeito significativo na resposta $Y_{3,total}$ ($p < 0,05$). Similarmente aos resultados de Y_3 , ambos os termos quadráticos apresentam valores negativos ($d < 0$ e $e < 0$ da Equação de Y_3), indicando a tendência ao ponto de ótimo global na superfície de resposta. As Figuras 59 e 60 mostram a superfície de resposta e de contorno de $Y_{3,total}$, demonstra a proximidade de um ponto ótimo global que se alcançaria ao se aumentar a taxa de emissão de fótons. Uma vez que a resposta $Y_{3,total}$ é maior para o máximo valor do domínio experimental, $X_1 = 1,099$, então $X_2 = 1,300$ (Equação 49). Em valores reais, esses valores correspondem a $E_{p,0} = 11,1 \times 10^{-6}$ Einstein $L^{-1} s^{-1}$ e $[H_2O_2]_0 = 16,06$ mmol L^{-1} .

Figura 58 – Diagrama de Pareto para a resposta $Y_{3,total}$ (% de remoção de TOC).

Figura 59 – Superfície de resposta para $Y_{3,total}$ (% de remoção de TOC).

Figura 60 – Gráfico de contorno correspondente à superfície de resposta para a variável $Y_{3,total}$.

As distribuições dos resíduos das superfícies de respostas realizadas para $Y_{1,total}$, $Y_{2,total}$ e $Y_{3,total}$ foram consideradas uniformes e estão apresentadas nas Figuras F4, F5 e F6 (Apêndice F).

A otimização das três respostas (constante cinética de pseudo-primeira ordem, k_{total} , porcentagem de degradação da Bc-Zn em 1 minuto e porcentagem de remoção de TOC após

120 minutos) preditas pelos modelos de superfície de resposta mostrou que maior taxa específica de emissão de fótons ($11,1 \times 10^{-6}$ Einstein $L^{-1} s^{-1}$) é a melhor condição para todas as respostas. Embora as condições ótimas não tenham representado o ponto ótimo global das superfícies preditas, as condições otimizadas locais determinadas para as respostas Y_1 e Y_3 estão nas vizinhanças desses valores ótimos globais, os quais seriam alcançados com a aplicação de uma fonte de radiação UVC mais potente. A concentração inicial de H_2O_2 apresentou efeitos significativos quanto às respostas Y_1 e Y_3 entre 13 e 16 mmol L^{-1} . No entanto, a cinética de degradação da Bc-Zn é relativamente rápida, além de ser observada a degradação completa da Bc-Zn em um período menor que 10 minutos, frente aos 120 minutos de tratamento para todas as 10 condições experimentais empregadas. Dessa forma, uma vez que a Bc-Zn é uma molécula relativamente grande, a remoção do TOC caracteriza-se como a resposta mais representativa para estabelecer as condições ótimas do sistema reacional UV/ H_2O_2 .

6.3.4 Análises dos Experimentos Adicionais

Nessa seção estão apresentados os resultados das análises realizadas para os experimentos 8, 9 e 10, igualmente aos que foram conduzidos para os experimentos de 1 a 7. Uma vez que as melhores respostas foram obtidas para a máxima taxa específica de emissão de fótons de $11,1 \times 10^{-6}$ Einstein $L^{-1} s^{-1}$, esses experimentos são comparados ao experimento 3, conduzido sob essa mesma condição. Desse modo, as diferenças entre esses quatro experimentos são as concentrações iniciais de H_2O_2 utilizados.

Conforme observado na Figura 61, a taxa de degradação da Bc-Zn é maior para o experimento 8, seguido pelo experimento 3. Desse modo, a análise estatística indicou que a condição ótima de H_2O_2 encontra-se entre as concentrações utilizadas nesses dois experimentos. Para a análise de TOC, a porcentagem de remoção final de TOC aos 120 minutos indicou concentração inicial ótima de H_2O_2 entre a dos experimentos 8 e 9. Embora os resultados da remoção total de TOC sejam próximos, verifica-se na Figura 62 que a remoção de TOC é mais eficiente também para os experimentos 8 e 9.

A concentração de H_2O_2 residual apresentada na Figura 63 indica que há um decaimento bastante expressivo do oxidante nos experimentos 8, 9 e 10 em relação ao observado no experimento 3. No entanto, concentrações residuais abaixo do limite de quantificação de H_2O_2 foram obtidos no experimento 3 após 20 minutos. Nos outros experimentos, concentrações acima de 0,7 mmol L^{-1} ainda foram encontradas após 120 minutos de tratamento. As condições ótimas da concentração inicial de H_2O_2 (13 a 16 mmol L^{-1}), determinadas pela análise

estatística, contemplam as condições experimentais 3, 8 e 9. Apesar do aumento da concentração inicial de H_2O_2 (21,40 mmol L^{-1}), a condição 10 resulta em valores menores de constante cinética de pseudo-primeira ordem e de porcentagem de remoção de TOC após 120 minutos de tratamento em relação aos experimentos 8 e 9. Esse fato indica um possível excesso de H_2O_2 e o seu consequente consumo de radicais $\text{HO}^\bullet$ no sistema, reduzindo a eficiência do processo. Trabalhos futuros voltados à elucidação dos intermediários formados da decomposição da Bc-Zn poderão ajudar a prever a cinética de degradação desses outros compostos, além de uma análise mais detalhada do comportamento das espécies reativas de oxigênio nos 120 minutos de tratamento UV/ H_2O_2 .

Figura 61 – Evolução com o tempo da concentração da Bc-Zn para taxa específica de emissão de fótons de $11,1 \times 10^{-6}$ Einstein $\text{L}^{-1} \text{s}^{-1}$.

Figura 62 – Evolução do TOC com o tempo para os experimentos de degradação da Bc-Zn realizados com taxa específica de emissão de fótons de $11,1 \times 10^{-6}$ Einstein $\text{L}^{-1} \text{s}^{-1}$.

Figura 63 – Evolução da concentração de H_2O_2 residual com o tempo para os experimentos de degradação da Bc-Zn realizados com taxa específica de emissão de fótons de $11,1 \times 10^{-6}$ Einstein $\text{L}^{-1} \text{s}^{-1}$.

A análise de pH indicou o valor inicial do pH, em torno de 6,7, diminuiu rapidamente para um valor em torno de 4,0, seguido posteriormente por um ligeiro aumento para um valor próximo a 5. Esse efeito indica a formação e posterior degradação de produtos de degradação de caráter ácido (Figura 64).

Figura 64 – Evolução do pH com o tempo para os experimentos de degradação da Bc-Zn realizados com taxa específica de emissão de fótons de $11,1 \times 10^{-6}$ Einstein $\text{L}^{-1} \text{s}^{-1}$.

6.4 Análises Biológicas

As análises biológicas para averiguar a conformidade dos produtos gerados pelos tratamentos através de fotólise direta e processo UV/H₂O₂ constituíram-se nas análises de biodegradabilidade, toxicidade e atividade antimicrobiana residual.

6.4.1 Análise de Biodegradabilidade

A determinação da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) da solução de Bc-Zn inicial, sem tratamento, à concentração de 50 mg L⁻¹, indicou que não houve resposta quanto à atividade microbiana para a demanda de O₂ (Figura 65). A solução padrão (composta de glucose, ácido glutâmico e água destilada) foi analisada paralelamente a esses experimentos. Nessas condições, conforme mostra a Figura 67, essas soluções evidenciaram o aumento da atividade microbiana dos microrganismos inoculados.

Figura 65 – Análise de DBO durante o tempo de 5 dias para solução de Bc-Zn. Dados realizados em triplicatas e as barras indicam o desvio-padrão. A ausência das barras indica desvios bastante pequenos.

Esses resultados indicaram que a solução do antibiótico não é biodegradável, sugerindo a recalcitrância desse composto no meio ambiente. A própria natureza bactericida do composto pressupõe a sua resistência à degradação biológica. Esse fato confirma o relatado na literatura, no qual os peptídeos da bacitracina resistem à ação das enzimas proteolíticas da maioria dos

Figura 67 – Análise de DBO durante o tempo de 5 dias. Medidas realizadas em duplicata e triplicata. As barras indicam o desvio-padrão.

Os resultados dos produtos dos experimentos adicionais 8, 9 e 10 são apresentados na Figura 68 e apresentaram não-biodegradabilidade igualmente aos outros experimentos. Adicionalmente, experimentos sob 24 h de incidência de fótons na condição inicial do experimento 3 (50 mg L^{-1} de Bc-Zn, concentração inicial de $10,7 \text{ mmol L}^{-1}$ de H_2O_2 e $11,1 \times 10^{-6} \text{ Einstein L}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e experimento com o antibiótico bacitracina sem o metal zinco nas condições similares à do experimento 7 (48 mg L^{-1} de Bc, concentração de $7,13 \text{ mmol L}^{-1}$ de H_2O_2 e $6,01 \times 10^{-6} \text{ Einstein L}^{-1} \text{ s}^{-1}$) foram realizados e também indicaram a não-biodegradabilidade dos produtos gerados (Figura 68).

Figura 68 – Análise de DBO durante o tempo de 5 dias. Medidas realizadas em triplicata. As barras indicam o desvio-padrão.

A DBO do efluente real obtido da indústria farmacêutica do estudo de caso foi avaliada para averiguar a sua conformidade. A concentração determinada pela curva de calibração da Bc-Zn no efluente indicou uma concentração de 300 mg L⁻¹ do antibiótico. Os resultados observados na Figura 69 demonstraram que o efluente não é biodegradável, conforme esperado. A avaliação da concentração de 300 mg L⁻¹ de solução de Bc-Zn com e sem a adição de nutrientes do padrão está mostrada na mesma figura. Os resultados indicaram que a solução de 300 mg L⁻¹ apresenta baixa biodegradabilidade, valor médio de 20 mg L⁻¹ de demanda de O₂. A adição de nutrientes na solução de Bc-Zn aumenta a atividade microbiana e demonstra que o composto é inerte ao consórcio de micro-organismos da semente empregada.

Figura 69 – Análise de DBO durante o tempo de 5 dias. Medidas realizadas em triplicata. As barras indicam o desvio-padrão.

6.4.2 Análise de Toxicidade por meio do Microorganismo-Teste *V. fischeri*

As soluções com a concentração inicial de Bc e dos produtos após todos os tratamentos fotoquímicos realizados com a Bc-Zn foram submetidos ao ensaio de toxicidade. Uma vez que a catalase bovina foi adicionada para eliminar a presença de H₂O₂ residual nos produtos do processo UV/H₂O₂, experimentos de controle com catalase bovina foram efetuadas e demonstraram não interferir nas análises.

Os cálculos para determinação da CE₅₀ basearam-se no valor do efeito-gama (relação entre a luz perdida e a luz remanescente), seguida da aplicação da análise de regressão linear dos dados experimentais obtidos (ABNT NBR 15411-3:2012). Os resultados da resposta biológica após 15 e 30 minutos de exposição do micro-organismo *V. fischeri* a essas soluções estão mostrados na Figura 70. Os resultados mostram que todos os produtos são mais tóxicos que o composto inicial.

Figura 70 – Resultados do ensaio de toxicidade com *V. fischeri*. Ensaio realizado em duplicata e triplicata. As barras indicam o desvio-padrão.

O fato do antibiótico Bc-Zn estar sob a forma de complexo com o metal zinco, os resultados das análises de toxicidade sugeriram a suscetibilidade da *V. fischeri* ao metal. O efeito do metal na resposta da bactéria foi investigado através de testes biológicos com soluções de Bc-Zn na concentração inicial de 300 mg L⁻¹, soluções da bacitracina (VETRANAL) na

concentração inicial de 287 mg L⁻¹ e ZnSO₄.7H₂O na concentração de 58 mg L⁻¹. Ambas as concentrações de bacitracina e de zinco foram calculadas com base na concentração inicial de Bc-Zn estudada. As três soluções foram diluídas pela metade por seis vezes consecutivas, constituindo-se nas faixas de concentrações de 4,7 a 300 mg L⁻¹ para Bc-Zn, 4,5 a 287 mg L⁻¹ para Bc e 0,91 a 58 mg L⁻¹ para o ZnSO₄.7H₂O.

A concentração efetiva que causa 50% de redução da quantidade de luz emitida pela *V. fischeri* (CE₅₀) estimada para o antibiótico Bc-Zn foi de 12 mg L⁻¹. Para a solução de ZnSO₄.7H₂O, a CE₅₀ determinada foi de 6 mg L⁻¹. Uma vez que a norma da CETESB recomenda o ensaio com a solução de ZnSO₄.7H₂O para validar esses ensaios com esse microorganismos-teste, a toxicidade do Zn é documentada. A faixa da CE₅₀ aceitável pela CETESB é de 3,0 a 10 mg L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O e portanto, os ensaios com as amostras de microorganismos utilizadas estão adequadas (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 2001).

As soluções com a bacitracina sem formar o complexo com o metal zinco demonstraram a ausência da toxicidade do antibiótico para a bactéria estudada em todas as concentrações abordadas. Soluções após o tratamento da bacitracina sob a condição 7 do processo UV/H₂O₂ (48 mg L⁻¹ de Bc, concentração inicial de 7,13 mmol L⁻¹ de H₂O₂ e 6,01×10⁻⁶ Einstein L⁻¹ s⁻¹ em 120 minutos) também foi testada, indicando ausência de toxicidade. Portanto, foi possível afirmar que a presença do metal zinco no antibiótico atua como responsável pelo efeito tóxico na resposta do organismo-teste *V. fischeri*.

6.4.3 Análise da Atividade Antimicrobiana Residual

Similarmente aos ensaios de toxicidade, experimentos controle com catalase bovina foram efetuadas e mostraram não interferir nas análises da atividade antimicrobiana. As medidas utilizadas para avaliar a atividade antimicrobiana foram coletadas após 8,5 h de incubação do microorganismo com as soluções teste. Considerou-se esse período de tempo devido ao fato das bactérias ainda estarem na fase de crescimento, o que é satisfatório para a análise dos resultados.

A Figura 71 apresenta a curva dose-resposta da inibição do crescimento do microorganismo-teste *S. aureus* em função da concentração de Bc-Zn. A regressão não linear através

do modelo sigmoide de Boltzmann apresentou um ajuste satisfatório ($R^2 = 98,94\%$). Através desse ajuste foi determinado o valor da concentração que resulta em 50% de inibição do crescimento para o micro-organismo utilizado ou CE_{50} de 43 mg L^{-1} . A concentração inicial de 50 mg L^{-1} de Bc-Zn considerada nesse estudo representa, portanto, uma condição acima de 50% de inibição do crescimento.

Figura 71 – Inibição do crescimento da *S. aureus* em função da concentração Bc-Zn.

Os resultados da atividade antimicrobiana da solução inicial de Bc-Zn e dos produtos de todos os tratamentos de fotólise e UV/H₂O₂ são apresentados na Figura 72. Observa-se que houve remoção completa da atividade antimicrobiana por meio dos processos empregados após 120 minutos de tratamento. Isso sugere que todos os processos de degradação da Bc-Zn são apropriadas para a remoção da atividade antimicrobiana do composto, com base no microorganismo-teste empregado. A remoção da atividade antimicrobiana nos produtos da fotólise da Bc-Zn sugere que esse tratamento já é suficiente para alcançar o propósito.

Figura 72 – Remoção porcentual da atividade antimicrobiana em diferentes experimentos.

Para acompanhar a redução da atividade antimicrobiana da Bc-Zn com o tempo de tratamento UV/H₂O₂, amostras foram coletadas em intervalos de tempos determinados entre 0 a 120 minutos. O experimento foi realizado na condição 8 do processo UV/H₂O₂, próximas às condições ótimas estimadas pela análise estatística da Seção 5.3.3. A Figura 73 apresenta essas respostas inibitórias ao micro-organismo com o tempo do tratamento foto-oxidativo. Esses resultados demonstraram que a redução da atividade antimicrobiana acompanha aproximadamente a degradação dos congêneres da Bc-Zn. Após esse período e até 120 minutos não foi detectada inibição do crescimento da *S. aureus*. Essa observação indica que as estruturas responsáveis pela atividade antimicrobiana foram decompostas.

Figura 73 – Remoção da atividade antimicrobiana em função do tempo de tratamento para a condição experimental 8.

Apesar de ser demonstrada a remoção da atividade antimicrobiana para *S. aureus*, são necessárias análises dessa resposta com outros micro-organismos-testes para garantir a conformidade desse critério de avaliação em águas residuárias. Técnicas multi-analíticas mais práticas e abrangentes com micro-organismos-chaves de diferentes níveis tróficos ainda devem ser aprimoradas e implantadas nas ETEs para um monitoramento mais seguro quanto à remoção da atividade antimicrobiana residual após tratamento de efluentes contendo o antibiótico.

É importante ressaltar que pesquisas recentes reportam que a poluição com metais pesados em conjunto com a presença residual de antibióticos pode contribuir para o desenvolvimento de resistência bacteriana no meio ambiente (DING, 2010; MA *et al.*, 2016; GRENNI, 2018). Segundo esses estudos, os genes resistentes (ARGs) a metais e a antibióticos estão frequentemente localizados nos mesmos determinantes genéticos responsáveis tanto pela resistência de antibióticos quanto de metais. Por essa razão, pressupõe-se que a presença do metal zinco na bacitracina zínica pode potencializar o desenvolvimento dos genes resistentes ao próprio antibiótico. A remoção da atividade antimicrobiana do antibiótico em efluentes minimiza os efeitos adversos provocados pela presença do antibiótico. No entanto, a presença do metal zinco ainda constitui um fator de preocupação, segundo essas considerações, sendo

necessários outros processos consecutivos de tratamento mais apropriados para a sua remoção. Dessa forma, ensaios de atividade antimicrobiana residual empregando bacitracina não associada ao zinco devem ser realizados.

7 CONCLUSÕES

Este estudo possibilitou investigar a degradação do antibiótico bacitracina zínica (Bc-Zn) em meio aquoso através dos processos de fotólise direta e UV/H₂O₂, sob radiação UVC em 254 nm e analisar a conformidade ambiental dos produtos gerados. Adicionalmente, as condições experimentais do processo UV/H₂O₂ para a degradação da Bc-Zn foram otimizadas pelo modelo de superfície de resposta e parâmetros cinéticos de ambos os processos foram estimados através das modelagens cinética e operacional propostas, representando contribuições significativas para a engenharia de tratamento de micropoluentes através dos processos oxidativos avançados.

A avaliação da estabilidade dos principais congêneres que constituem a mistura da bacitracina (A, B1, B2, B3 e F) em meio aquoso, complexado ou não ao metal zinco, indicou decomposição dos peptídeos e/ou ocorrência da conversão oxidativa natural entre os constituintes. Essas transformações dependem do pH do meio e foram mais evidentes em pH 9, no qual uma redução média de aproximadamente 63 % dos principais constituintes foi observada durante o período de 14 dias. No entanto, não foi observada conversão significativa do constituinte A para F, conforme relatado na literatura.

O tratamento da Bc-Zn através da fotólise apresentou uma considerável redução dos principais congêneres do antibiótico durante o tempo de 120 minutos de radiação UV. A taxa de degradação aumenta com o aumento da taxa específica de incidência de fótons, sendo observada remoção completa de todos os constituintes do antibiótico para $6,01 \times 10^{-6}$ Einstein L⁻¹ s⁻¹ e $1,11 \times 10^{-5}$ Einstein L⁻¹ s⁻¹. Por outro lado, não foi verificada redução significativa do carbono orgânico total (TOC) nos experimentos de degradação fotolítica da Bc-Zn. A estimativa do rendimento quântico da fotólise direta da Bc-Zn através da modelagem matemática proposta indicou um ótimo ajuste entre as curvas preditas e os dados experimentais das três condições diferentes de fotólise realizadas, resultando em um valor de rendimento quântico de 0,0141 mol Einstein⁻¹, considerado adequado frente a valores descritos para outros antibióticos.

O processo UV/H₂O₂ aumentou consideravelmente a cinética de degradação da bacitracina em relação ao processo conduzido somente com radiação UVC. As constantes de pseudo-primeira ordem estimadas para todas as condições diferenciadas de UV/H₂O₂ estudadas foram praticamente uma ordem de grandeza superiores às constantes obtidas pela fotólise direta. Além disso, houve remoção significativa do TOC até 71%. A constante cinética de

segunda ordem da reação da Bc-Zn com o radical $\text{HO}^\bullet$, estimada pela modelagem matemática proposta, foi igual a $3,09 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. A análise estatística para as dez condições experimentais UV/ H_2O_2 através do planejamento Doehlert permitiu indicar as melhores condições para o domínio experimental considerado e maximizar as respostas da constante cinética de pseudo-primeira ordem, da taxa de degradação da Bc-Zn em 1 minuto de tratamento e da remoção do TOC após 120 minutos. A taxa de incidência de fótons apresentou efeito positivo bastante considerável em todas as respostas, enquanto a concentração inicial de H_2O_2 apresentou efeito positivo e significativo apenas quanto à constante cinética de degradação da Bc-Zn e à remoção do TOC. As condições ótimas foram constatadas para a máxima taxa específica de emissão de fótons, sendo iguais a $1,11 \times 10^{-5} \text{ Einstein L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e concentração inicial de H_2O_2 entre 13 e 16 mmol L^{-1} . Essas medidas determinaram as melhores respostas para a constante cinética da degradação da Bc-Zn de $1,16 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ e remoção de 70% do TOC. Entretanto, as superfícies de respostas indicaram a proximidade de uma condição otimizada do processo, que seria alcançada com a aplicação de maior potência radiante UVC, a qual foi limitada tecnicamente pela lâmpada empregada no reator fotoquímico.

Os produtos obtidos após os 120 minutos de todos os tratamentos realizados de fotólise e UV/ H_2O_2 foram analisados quanto à biodegradabilidade (DBO_5), toxicidade (teste biológico com a bactéria *V. fischeri*) e atividade antimicrobiana (teste biológico com a bactéria gram-positiva *S. aureus*). A análise de DBO sugeriu a não-biodegradabilidade da Bc-Zn e de todos os produtos obtidos pós-tratamentos fotoquímicos. Adicionalmente, testes com a adição de substratos à base de açúcares revelaram que não houve efeito inibitório na atividade biológica do consórcio de micro-organismos empregados. Em contraste, houve aumento da atividade microbiana dos produtos obtidos dos tratamentos fotoquímicos com a adição dos açúcares. Isso sugere a ação sinérgica de determinados constituintes da Bc-Zn e de seus intermediários com os substratos na resposta da DBO. A toxicidade aguda frente a *V. fischeri* indicou que o metal zinco presente na Bc-Zn é o responsável pelo efeito inibitório na resposta desse organismo-teste. Por outro lado, um relativo aumento do efeito inibitório na atividade da bactéria foi detectado para nos produtos de todos os tratamentos efetuados. Maiores investigações ainda devem ser exploradas para avaliar a constituição dos produtos resultantes do tratamento e disponibilidade do metal Zn para verificar as influências dessas espécies tanto nos resultados do DBO quanto de toxicidade com a bactéria *V. fischeri*.

A análise da atividade antimicrobiana residual dos produtos de todos os tratamentos efetuados revelou a remoção do efeito inibitório do antibiótico frente à bactéria *S. aureus*,

indicando que a fotólise já é um tratamento suficiente para alcançar essa finalidade. Adicionalmente, o acompanhamento da redução da atividade antimicrobiana em um dos tratamentos UV/H₂O₂ revelou que atividade diminui com a redução da concentração de Bc-Zn na solução. Após a degradação completa da Bc-Zn, a análise também evidenciou que os subprodutos da degradação do antibiótico não apresentaram atividade antimicrobiana residual até os 120 minutos de duração do tratamento. No entanto, ainda é necessária a realização desses ensaios com outras espécies de microrganismos, que possam ser mais sensíveis ao antibiótico estudado, para concluir com maior segurança quanto à redução da atividade antimicrobiana pelos processos estudados para degradação da Bc-Zn.

Este estudo introduziu conhecimentos em relação à degradação da bacitracina zínica em meio aquoso, sendo ainda necessária a investigação mais detalhada em relação aos intermediários formados e à influência das espécies reativas de oxigênio na degradação desses compostos. Essas avaliações se tornam necessárias, uma vez que o antibiótico apresenta estrutura molecular muito complexa quando comparada à dos fármacos em geral. A evolução do estudo da degradação da Bc-Zn em conjunto com os excipientes que fazem parte da constituição do medicamento formulado caracteriza-se como uma segunda etapa para investigar a influência desses compostos quanto à eficiência do processo UV/H₂O₂. O conhecimento dos mecanismos de reação envolvidos e a previsão das melhores condições de processo devem ser explorados, visando ao avanço para a aplicação efetiva do tratamento foto-oxidativo para o efluente industrial real. Neste caso, a toxicidade e atividade antimicrobiana devem ser avaliadas antes e após tratamento foto-oxidativo.

A bacitracina zínica representa uma classe de antibióticos pouco restudada em relação a sua degradação e destino ambiental, além de fazer parte do grupo dos peptídeos não-ribossômicos (NRP), os quais geralmente são formados por estruturas complexas e englobam outros compostos, além dos antibióticos. Avaliar a degradação dos peptídeos que compõe a molécula da Bc-Zn através de tratamentos foto-oxidativos, bem como a conformidade ambiental dos produtos obtidos, representa um caminho importante para estender esses conhecimentos para outros NRPs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELLÁN, M. N.; BAYARRI, B.; GIMÉNEZ, J.; COSTA, J. Photocatalytic degradation of sulfamethoxazole in aqueous suspension of TiO₂. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 74, n. 3, p. 233-241, 2007.
- ADAMEK, E.; BARAN, W.; SOBCZAK, A. Photocatalytic degradation of veterinary antibiotics: Biodegradability and antimicrobial activity of intermediates. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 103, p. 1-9, 2016.
- ADAMS, C.; ASCE, M.; WANG, Y.; LOFTIN, K.; MEYER, M. Removal of antibiotics from surface and distilled water in conventional water treatment processes. **Journal of Environmental Engineering**, v. 128, p. 253-260, 2002.
- ADDAMO, M.; AUGUGLIARO, V.; DI PAOLA, A.; GRACÍA-LÓPEZ, E.; LODDO, V.; MARCÍ, G.; PALMISANO, L. Removal of drugs in aqueous systems by photoassisted degradation. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 35, p. 765-774, 2005.
- AKRAM, M.; ASIF, H. M.; UZAIR, M.; AKHTAR, N.; MADNI, A.; SHAH, S. M. A.; HASAN, Z. H.; ULLAH, A. Amino acids: A review article. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 17, p. 3997-4000, 2011.
- ALANIS, A. J. Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? **Archives of Medical Research**, v. 36, p. 697-705, 2005.
- AMIARD, J-C; AMIARD-TRIQUET, C. Chapter 2 – Conventional Risk Assessment of Environmental Contaminants. **Aquatic Ecotoxicology**, p. 25-49, 2015.
- AN, T.; YANG, H.; LI, G.; SONG, W.; COOPER, W.J.; NIE, X. Kinetics and mechanism of advanced oxidation processes (AOPs) in degradation of ciprofloxacin in water. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 94, n. 3, p. 288-294, 2010.
- ANDERSSON, D.; HUGHES, D. Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. **Drug Resistance Updates**, v. 15, n. 3, p. 162-72, 2012.
- ANDO, T.; NAGASE, H.; EGUCHI, K.; HIROOKA, T.; NAKAMURA, T.; MIYAMOTO, K.; HIRATA, K. A novel method using cyanobacteria for ecotoxicity test of veterinary antimicrobial agents. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 601-606, 2007.
- ANDREOZZI, R.; CANTERINO, M.; MAROTTA, R.; PAXEUS, N. Antibiotic removal from wastewaters: the ozonation of amoxicillin. **Journal of Hazardous Materials**, v.122, p. 243-250, 2005.

ANKER, H. S.; JOHNSON, B. A.; GOLDBERG, J.; MELENEY, F. L. Bacitracin: Methods of Production, Concentration, and Partial Purification, with a Summary of the Chemical Properties of Crude Bacitracin. **Journal of Bacteriology**, v. 55, n. 2, p. 249-55, 1948.

ANTONIN, V. S.; SANTOS, M. C.; GARCIA-SEGURA, S.; BRILLAS, E. Electrochemical incineration of the antibiotic ciprofloxacin in sulfate medium and synthetic urine matrix. **Water Research**, v. 83, p. 31–41, 2015.

APHA, AWWA, WEF. **Standard Methods for examination of water and wastewater**. 22^a ed. Washington: American Public Health Association, 2012, 1360 p.

ARKY, A. **Physicians' Desk Reference for Non-Prescription Drugs, Models for Metalloproteins**. 18^a ed. Montvale: Medical Economics Company, 1997.

ARSLAN-ALATON, I.; CAGLAYAN, A. E. Ozonation of procaine penicillin G formulation effluent. Part I: Process optimization and kinetics. **Chemosphere**, v. 59, p. 31-39, 2005.

ARSLAN-ALATON, I.; CAGLAYAN, A. E. Toxicity and biodegradability assessment of raw and ozonated procaine penicillin G formulation effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 63, p. 131-140, 2006.

ARSLAN-ALATON, I.; DOGRUEL, S.; BAYKAL, E.; GERONE, G. Combined chemical and biological oxidation of penicillin formulation effluent. **Journal of Environmental Management**, v. 73, p. 155-163, 2004.

ARSLAN-ALATON, I.; GURSES, F. Photo-Fenton-like and Fenton-like oxidation of Procaine Penicillin G formulation effluent. **Journal of Photochemistry and Photobiology A**, v. 165, p. 165-175, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15411-3:2012**: Ecotoxicologia aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *Vibrio fischeri* (Ensaio de bactéria luminescente). Parte 3: Método utilizando bactérias liofilizadas. Rio de Janeiro, 2012, 29p.

AUDENAERT, W. T. M.; CHYS, M.; AUVINEN, H.; DUMOULIN, A.; ROUSSEAU, D.; HULLE, S. V. (Future) Regulation of trace organic compounds in WWTP effluents as a driver for advanced wastewater treatment. **Ozone News**, v. 42, n. 6, p. 17-23, 2014.

BALCIOGLU, I. A.; ÖTKER, M. Treatment of pharmaceutical wastewater containing antibiotics by O₃ and O₃/H₂O₂ processes. **Chemosphere**, v. 50, p. 85-95, 2003.

BARAN, W.; SOCHACKA, J.; WARDAS, W. Toxicity and biodegradability of sulfonamides and products of their photocatalytic degradation in aqueous solutions. **Chemosphere**, v. 65, p. 1295-1299, 2006.

BARBOSA, M. O.; MOREIRA, N. F. F.; RIBEIRO, A. R.; PEREIRA, M. F. R.; SILVA, A. M. T. Occurrence and removal of organic micropollutants: An overview of the watch list of EU Decision 2015/495. **Water Research**, v. 94, p. 257-279, 2016.

BARRY, G. T.; GREGOLY, J. D.; CRAIG, L. C. The nature of bacitracin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 175, p. 485-486, 1948.

BAUGER, A. J.; JENSEN, J.; KROGH, P. H. Effects of the antibiotics oxytetracycline and tylosin on soil fauna. **Chemosphere**, v. 40, p. 751-757, 2000.

BAUMGARTEN, S.; SCHRÖDER, H. F.; CHARWATH, C.; LANGE, M.; BEIER, S.; PINNEKAMP, J. Evaluation of advanced treatment technologies for the elimination of pharmaceutical compounds. **Water Science & Technology**, v. 56, n. 5, p. 1-8, 2007.

BAUTITZ, I. R.; NOGUEIRA, R. F. P. Degradation of tetracycline by photo-Fenton process e solar irradiation and matrix effect. **Journal of Photochemistry and Photobiology A**, v. 187, p. 33-39, 2007.

BAUTITZ, I. R.; NOGUEIRA, R. F. P. Photodegradation of lincomycin and diazepam in sewage treatment plant effluent by photo-Fenton process. **Catalysis Today**, v. 151, p. 94-99, 2010.

BELL, R. G. Preparative high-performance liquid chromatographic separation and isolation of bacitracin components and their relationship to microbiological activity. **Journal of Chromatography A**, v. 590, n. 1, p. 163-168, 1992.

BELL, R. G. Separation and isolation of the isomers of bacitracin by high-performance liquid chromatography and their relationship to microbial activity. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, v. 9, n. 10-12, p. 843-847, 1991.

BERGLUND, B. Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. **Infection Ecology and Epidemiology**, v. 5, 2015.

BERNIER, S. P.; SURETTE, M. G. Concentration-dependent activity of antibiotics in natural environments. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1-14, 2013.

BO, L.; SHENG, Z.; CHANG, C. C.; ZHANFENG, D.; HONGXIANG, L. Emerging Pollutants - Part II: Treatment. **Water Environment Research**, v. 87, n. 10, p. 1873-900, 2015.

BOBU, M.; YEDILER, A.; SIMINICEANU, I.; SCHULTE-HOSTEDE, S. Degradation studies of ciprofloxacin on a pillared iron catalyst. **Applied Catalysis B**, v. 83, p.15-23. 2008.

BOGER, B.; TONIN, F. S.; ZAMORA, P. G. P.; WAGNER, R.; GOMES, E. C. Micropoluentes emergentes de origem farmacêutica em matrizes aquosas do Brasil: uma revisão sistemática. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 4, p. 725-739, 2015.

BOLTON, J. R. **Ultraviolet Applications Handbook**. Ontario: Bolton Photosciences Inc., 1999.

BOLTON, J. R.; CARTER, S. R. **Homogeneous photodegradation of pollutants in contaminated water: An introduction**, in: **Aquatic and Surface Photochemistry**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1994.

BOND, G. C.; HIMELICK, R. E.; MACDONALD, L. H. The stability of bacitracin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, p. 30-34, 1949.

BOREEN, A. L.; ARNOLD, W. A.; MCNEILL, K. Photochemical fate of sulfa drugs in the aquatic environment: sulfa drugs containing five-membered heterocyclic groups. **Environmental Science & Technology**, v. 38, p. 3933-3940, 2004.

BRAMBILLA, G.; CIVITAREALE, C.; MIGLIORE, L. Experimental toxicity and analysis of bacitracin, flumequine, (1994) and sulphadimethoxine in terrestrial and aquatic organisms as a predictive model for ecosystem damage. **Química Analítica**, v.13, p. 73-77, 1994.

BRAUN, A. M.; MAURETTE, M. T.; OLIVEROS, E. **Photochemical Technology**. Chichester: John Wiley, 1991.

BREWER, G. A. Bacitracin. In FLOREY, K. **Analytical Profiles of Drug Substances**. v. 9, New York: Academic Press. Inc., 1980, p. 1-56.

BUI, X. T.; VO, T. P.; NGO, H. H.; GUO, W. S.; NGUYEN, T. T. Multicriteria assessment of advanced treatment technologies for micropollutants removal at large-scale applications. **Science of the Total Environment**, v. 563-564, p. 1050-1067, 2016.

BUXTON, G. V.; GREENSTOCK, C. L.; HELMAN, W. P.; ROSS, A. B. Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms, and hydroxyl radicals ($\bullet\text{OH}/\bullet\text{O}^-$) in aqueous solution. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 17, p. 513-886, 1988.

CABOCHE, S.; PUPIN, M.; LECLÈRE, V.; FONTAINE, A.; JACQUES, P.; KUCHEROV, G. NORINE: a database of nonribosomal peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 36, 2008.

CALIJURI GILBERT, N. Drug-pollution law all washed up: EU initiative to clean up waterways faces tough opposition. **Nature**, v. 491, p. 503-504, 2012.

CALIJURI, M. C.; CUNHA, D. G. F. **Engenharia Ambiental: Conceitos, Tecnologia e Gestão**. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2013.

CALZA, P.; MEDANA, C.; PAZZI, M.; BAIOCCHI, C.; PELIZZETTI, E. Photocatalytic transformations of sulphonamides on titanium dioxide. **Applied Catalysis B**, v. 53, p. 63-69, 2004.

CAPITAN-VALLVEY, L. F.; TITOS, CHECA, R.; NAVAS, N. High-performance liquid chromatography determination of Zn-bacitracin in animal feed by post-column derivatization and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 943, p. 227–234, 2002.

CASTAGNOLA, M.; ROSSETTI, D. V.; INZITARI, R.; LUPI, A.; ZUPPI, C.; CABRAS, M. B.; FADDA, M. B.; ONNIS, G.; PETRUZZELLI, R.; GIARDINA, B.; MESSANA, I. Different binding thermodynamics of Ni^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} to bacitracin A₁ determined by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 25, P. 846–852, 2004.

CHANG, M-W.; CHUNG, C-C.; CHERN, J-M., CHEN, T-S. Dye decomposition kinetics by $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$: Initial rate analysis by effective kinetic modelling methodology. **Chemical Engineering Science**, v. 65, p. 135-140, 2010.

CHATZITAKIS, A.; BERBERIDOU, C.; PASPALTSIS, I.; KYRIAKOU, G.; SKLAVIADIS, T.; POULIOS, I. Photocatalytic degradation and drug activity reduction of chloramphenicol. **Water Research**, v. 42, p. 386-394, 2008.

CHEMAXON. **Chemicalize**. Disponível em: < <https://chemaxon.com/products/chemicalize>>. Acesso em 30 set. 2017.

CHEMICAL BOOK. **Bacitracin**. Disponível em: <http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB9165863.htm>. Acesso em 20 dez. 2016.

CHEN, Q.; LIU, H.; XIN, Y.; CHENG, X. TiO_2 nanobelts: Effect of calcination temperature on optical, photoelectrochemical and photocatalytic properties. **Electrochimica Acta**, v.111, p. 284–291, 2013.

CHONG, M. N.; JIN, B.; CHOW, C. W. K. Saint, C. Recent developments in photocatalytic water treatment technology: A review. **Water Research**, v. 44, n. 10, p. 2997-3027, 2010.

CHUN, S. Y.; CHUNG, W. J.; KIM, S. S.; KIM, J. T.; CHANG, S. W. Optimization of the TiO_2/Ge composition by the response surface method of photocatalytic degradation under ultraviolet-A irradiation and the toxicity reduction of amoxicillin. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 27, p. 291–296, 2015.

CIESIOŁKA, J.; JEŻOWSKA-BOJCZUK, M.; WRZESIŃSKI, J.; STOKOWA-SOŁTYS, K.; NAGAJ J.; KASPROWICZ, A.; BŁASZCZYK, L.; SZCZEPANIK, W. Antibiotic bacitracin induces hydrolytic degradation of nucleic acids. **Biochimica and Biophysica Acta**, v, 1840, n. 6, p. 1782–1789, 2014.

CODINGTON, J. F. **Antibiotics Annual 1954–1955**. New York: Medical Encyclopedia, Inc., 1955, p. 1118–1124.

COKGOR, E. U.; ARSLAN-ALATON, I.; KARAHAN, O.; DOGRUEL, S.; ORHON, D. Biological treatability of raw and ozonated penicillin formulation effluent. **Journal of Hazardous Materials**, v. 116, p. 159-166, 2004.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Norma Técnica L5.227**: Teste de toxicidade com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*: método de ensaio, 2001.

CONTE, L. O.; FARIAS, J.; ALBIZZATI, E. D.; ALFANO, O. M. Photo-Fenton Degradation of the Herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in Laboratory and Solar Pilot-Plant Reactors. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.51, p. 4181–4191, 2012.

CRAIG, L. C.; KONISGSBERG, W. M. Further Studies with the Bacitracin Polypeptides. **J. Organic Chemistry**., v. 22, n. 11, p. 1345–135, 1957.

CRAIG, L. C.; WEISIGER, J. R.; HAUSMANN, W.; AND HARFENIST, E. J. The separation and characterization of bacitracin polypeptides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 199, 259-266, 1952.

CRITTENDEN, J. C.; SHUMIN, H.; HAND, D. W.; GREEN, S. A. A kinetic model for H₂O₂/UV process in a completely mixed batch reactor. **Water Research**, v. 33, p. 2315–2328, 1999.

CUNHA, D. L.; SILVA, S. M. C.; BILA, D. M.; OLIVEIRA, J. L. M.; SARCINELLI, P. N.; LARENTIS, A. L. Regulamentação do estrogênio sintético 17 α -etinilestradiol em matrizes aquáticas na Europa, Estados Unidos e Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 3, p. 1-13, 2016.

DA ROCHA, O. R. S.; PINHEIRO, R. B.; DUARTE, M.M.B.; DANTAS, R. F.; FERREIRA, A. P.; BENACHOUR, M.; DA SILVA, V.L. Degradation of the antibiotic chloramphenicol using photolysis and advanced oxidation process with UVC and solar radiation. **Desalination and Water Treatment**, v. 51, n. 37-39, p. 7269-7275, 2013.

DANTAS, R. F.; CONTRERAS, S.; SANS, C.; ESPLUGAS, S. Sulfamethoxazole abatement by means of ozonation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 150, p. 790-794, 2008.

DE WITTE, B.; DEWULF, J.; DEMEESTERE, K.; VAN LANGENHOVE, H. Ozonation and advanced oxidation by the peroxone process of ciprofloxacin in water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, p. 701-708, 2009.

DI DELUPIS, G. D.; MACRI, A.; CIVITAREALE, C.; MIGLIORE, L. Antibiotics of zootechnical use: effects of acute high and low dose contamination on *Daphnia magna* Straus. **Aquatic Toxicology**, v. 22, n. 1, p. 53-59, 1992.

DING, C.; HE, J. Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. **Applied Microbial Biotechnology**, v. 87, p. 925–941, 2010.

DIRANY, A.; SIRES, I.; OTURAN, N.; OTURAN, M. A. Electrochemical abatement of the antibiotic sulfamethoxazole from water. **Chemosphere**, v. 81, n. 5, p. 594–602, 2010.

EBELE, A. J.; ABDALLAH, M. A. E.; HARRAD, S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. **Emerging Contaminants**, v. 3, p. 1-16, 2017.

EBERT, I.; BACHMANN, J.; KÜHNEN, U., KÜSTER, A.; KUSSATZ, C.; MALETZKI, D.; SCHLÜTER, C. Toxicity of the fluoroquinolone antibiotics enrofloxacin and ciprofloxacin to photoautotrophic aquatic organisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, p. 2786–2792, 2011.

EDALATMANESH, M.; DHIB, R.; MEHRVAR, M. Kinetic Modeling of Aqueous Phenol Degradation by UV/H₂O₂ Process. **International Journal of Chemical Kinetics**, v. 40, n. 1, p. 34 – 43, 2008.

ELMOLLA, E. S.; CHAUDHURI, M. Photocatalytic degradation of amoxicillin, ampicillin and cloxacillin antibiotics in aqueous solution using UV/TiO₂ and UV/H₂O₂/TiO₂ photocatalysis. **Desalination**, v. 252, p. 46-52, 2010.

ELMOLLA, E.; CHAUDHURI, M. Optimization of Fenton process for treatment of amoxicillin, ampicillin and cloxacillin antibiotics in aqueous solution. **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, p. 666-672, 2009.

EPOLD, I.; TRAPIDO, M.; DULOVA, N. Degradation of levofloxacin in aqueous solutions by Fenton, ferrous ion-activated persulfate and combined Fenton/persulfate systems. **Chemical Engineering Journal**, v. 279, p. 452-462, 2015.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Implementing Decision (EU) 2015/495 of 20 March 2015 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council. **Official Journal of European Parliament**, L78, p. 40–42, 2015.

EUROPEAN UNION. Commission of the European Communities. Council Directive 95/53/EC. **Official Journal of the European Communities**, Legis. L265, 1995.

EUROPEAN UNION. Commission of the European Communities. Council Regulation (EC) no. 2821/98. Directive 70/524/EEC concerning additives in feeding stuffs. **Official Journal of the European Communities**, Legis. L347, v. 32, 1998.

EUROPEAN UNION. European Commission. 33 priority substances and 8 other pollutants. Annex I, Directive on Environmental Quality Standards (Directive 2008/105/EC). **Official Journal of the European Union**, 2008.

FERREIRA, S. L. C.; DOS SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; BOSQUE-SENDRA, J. M. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry-review. **Talanta**, v. 63, p. 1061, 2004.

FOGLER, H. S. **Elementos de Engenharia das Reações Químicas**. 4^a ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A, 2002.

FRANCISCO, F. L.; SAVIANO, A. M.; PINTO, T. J. A.; LOURENÇO, F. R. Design Space of a Rapid Colorimetric Microplate Bioassay for Bacitracin Using Response Surface Methodology (RSM). **Current Analytical Chemistry**, v. 12, p. 620-627, 2016.

GARBUTT, J. T.; MOREHOUSE, A. L.; HANSON, A. M. Metal Binding properties of bacitracin. **Agricultural and Food Chemistry**, v. 9, n. 4, p. 285-288, 1961.

GEORGESCU-ROEGEN, N. The entropy law and the economic process in retrospect. **Eastern Economic Journal**, v. 12, n. 1, p. 3-24, 1986.

GILBERT, N. Drug-pollution law all washed up: EU initiative to clean up waterways faces tough opposition. **Nature**, v. 491, p. 503-504, 2012.

GLAZE, W. H.; KANG, J.-W.; CHAPIN, D. H. The Chemistry of Water Treatment Processes Involving Ozone, Hydrogen Peroxide and Ultraviolet Radiation. **Ozone Science and Engineering**, v. 9, n. 4, p. 335-352, 1987.

GLAZE, W.; LAY, Y.; KANG, J. W. Advanced Oxidation Processes. A kinetic Model for the Oxidation of 1,2-Dibromo-3-chloropropane in Water by the Combination of Hydrogen Peroxide and UV Radiation. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 34, p. 2314–2323, 1995.

GOEL, S. Antibiotics in the Environment: A Review. In: **Emerging Micro-Pollutants in the Environment: Occurrence, Fate, and Distribution**. India: American Chemical Society, 2015, p. 19–42.

GÓMEZ-RAMOS, D. M. M.; MEZCUA, M.; AGÜERA, A.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R.; GONZALO, S.; RODRÍGUEZ, A.; ROSAL, R. Chemical and toxicological evolution of the antibiotic sulfamethoxazole under ozone treatment in water solution. **Journal of Hazardous Materials**, v. 192, p. 18-25, 2011.

GONZÁLEZ, O.; SANS, C.; ESPLUGAS, S. Sulfamethoxazole abatement by photo- Fenton. Toxicity, inhibition and biodegradability assessment of intermediates. **Journal of Hazardous Materials**, v. 146, p. 459-464, 2007.

GONZÁLEZ-PLEITER, M.; GONZALO, S.; RODEA-PALOMARES, I.; LEGANÉS, F.; ROSAL, R.; BOLTES, K.; MARCO, E.; FERNÁNDEZ-PIÑAS, F. Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: implications for environmental risk assessment. **Water Research**, v. 47, n. 6, p. 2050–2064, 2013.

GOTHWAL, R.; THATIKONDA, S. *Antibiotic Pollution in the Environment: A Review*. **CLEAN - Soil, Air, Water**, v. 43, n. 4, p. 479-489, 2015.

GRENNI, P.; ANCONA, V.; CARACCIOLO, A. B. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. **Microchemical Journal**, v. 136, p. 25–39, 2018.

GRILL, M.F.; MAGANTI, R. K. Neurotoxic effects associated with antibiotic use: Management considerations. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 72, n. 3, p. 381–393, 2011.

GRINTEN, E. V.; PIKKEMAAT, M. G.; BRANDHOF, E. J. V.; STROOMBERG, G. J.; KRAAK, M. S. Comparing the sensitivity of algal, cyanobacterial and bacterial bioassays to different groups of antibiotics. **Chemosphere**, v. 80, p. 1–6, 2010.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUINEA, E.; BRILLAS, E.; CENTELLAS, F.; CAÑIZARES, P.; RODRIGO, M. A.; SÁEZ, C. Oxidation of enrofloxacin with conductive-diamond electrochemical oxidation, ozonation and Fenton oxidation: a comparison. **Water Research**, v. 43, p. 2131-2138, 2009.

GUINEA, E.; GARRIDO, J. A.; RODRÍGUEZ, R. M.; CABOT, P.-L.; ARIAS, C.; CENTELLAS, F.; BRILLAS, E.; Degradation of the fluoroquinolone enrofloxacin by electrochemical advanced oxidation processes based on hydrogen peroxide electrogeneration. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 2101-2115, 2010.

GULLBERG, E.; CAO, S.; BERG, O.; ILBÄCK, C.; SANDEGREN, L.; HUGHES, D.; ANDERSSON, D. I. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 7, p. 1–10, 2011.

GURKAN, Y. Y.; TURKTEN, N.; HATIPOGLU, A.; CINAR, Z. Photocatalytic degradation of cefazolin over N-doped TiO₂ under UV and sunlight irradiation: Prediction of the reaction paths via conceptual DFT. **Chemical Engineering Journal**, v.184, p. 113–124, 2012.

HALLING-SØRENSEN, B. Inhibition of aerobic growth and nitrification of bacteria in sewage sludge by antibacterial agents. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 40, n. 4, p. 451–460, 2001.

HALLING-SØRENSEN, B.; SENDELØV, G.; INGERSLEV, F.; JENSEN, L. B. Reduced antimicrobial potencies of oxytetracycline, tylosin, sulfadiazin, streptomycin, ciprofloxacin, and olaquinox due to environmental processes. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 44, n. 1, p. 7–16, 2003.

HATCHARD, C. G.; PARKER, C. A. A new sensitive chemical actinometer - II. Potassium ferrioxalate as a standard chemical actinometer. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 235, n. 1203, p. 518-536, 1956.

HERNANDO, M. D.; MEZCUA, M.; FERNANDEZ-ALBA, A. R.; BARCELO, D. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. **Talanta**, v. 69, n. 2, p. 334–42, 2006.

HIROSE, J.; KONDO, F.; NAKANO, T.; KOBAYASHI, T.; HIRO, N.; ANDO, Y.; TAKENAKA, H.; SANO, K. Inactivation of antineoplastics in clinical wastewater by electrolysis. **Chemosphere**, v. 60, p. 1018-1024, 2005.

HIRSCH, R.; TERNES, T.; HABERER, K.; KRATZ, K. L. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **Science of the Total Environment**, v. 225, n. 1–2, p. 109–118, 1999.

HOLLENDER, J.; ZIMMERMANN, S. G.; KOEPKE, S.; KRAUSS, M.; MCARDELL, C. S.; ORT, C.; SINGER, H.; VON GUNTEN, U.; SIEGRIST, H. Elimination of organic micropollutants in a municipal wastewater treatment plant upgraded with a full-scale post-ozonation followed by sand filtration. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 20, p. 7862–7869, 2009.

HOMEM, V.; SANTOS, L. Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices - A review. **Journal of Environmental Management**, v. 92, n. 10, p. 2304–2347, 2011.

HOWE, K. J.; HAND, D. W.; CRITTENDEN, J. C.; TRUSSELL, R. R.; TCHOBANOGLOUS, G. **Principles of Water Treatment**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2012.

HU, L.; FLANDERS, P. M.; MILLER, P.; SANDERSON, L.; STRATHMANN, T. J. Oxidation of sulfamethoxazole and related antimicrobial agents by TiO₂ photocatalysis. **Water Research**, v. 41, p. 2612-2626, 2007.

HUANG, C-R.; SHU, H-YEE. The reaction kinetics, decomposition pathways and intermediate formations of phenol in ozonation, UV/O, and UV/H₂O₂ processes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 41, p. 47-64, 1995.

HUBER, M. M.; CANONICA, S.; PARK, G. Y.; VON GUNTEN, U. Oxidation of pharmaceuticals during ozonation and advanced oxidation processes. **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 5, p. 1016-1024, 2003.

HUBER, M.; KORHONEN, S.; TERNES, T.; VON GUNTEN, U. Oxidation of pharmaceuticals during water treatment with chlorine dioxide. **Water Research**, v. 39, p. 3607-3617, 2005.

HUGHES, P.; HERITAGE, J. Antibiotic growth-promoters in food animals. In: **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Rome: FAO Animal Production and Health Papers Series, 2004.

HUGHES, S. R.; KAY, P.; BROWN, L. E. Global Synthesis and Critical Evaluation of Pharmaceutical Data Sets Collected from River Systems. **Environmental Science & Technology**, v. 47, p. 661–677, 2013.

IKAI, Y.; OKA, H.; HAYAKAWA, J.; MATSUMOTO, M.; SAITO, M.; HARADA, K.; MAYUMI, Y.; SUZUKI, M. Total structures and antimicrobial activity of bacitracin minor components. **The Journal of Antibiotics**, v. 48, n. 3, p. 233-42, 1995.

ISHIHARA, H.; SHIMURA, K. Thiazoline ring formation in bacitracin biosynthesis. **FEBS Letters**, v. 99, p. 109-12, 1979.

JARA, C. C.; FINO, D.; SPECCHIA, V.; SARACCO, G.; SPINELLI, P. Electrochemical removal of antibiotics from wastewater. **Applied Catalysis B**, v. 70, p. 479-487, 2007.

JI, X.; SHEN, Q.; LIU, F.; MA, J.; XU, G.; WANG, Y.; WU, M. Antibiotic resistance gene abundances associated with antibiotics and heavy metals in animal manures and agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai; China. **Journal of Hazardous Materials**, v. 235, p. 178–85, 2012.

JIAO, S.; ZHENG, S.; YIN, D.; WANG, L.; CHEN, L. Aqueous photolysis of tetracycline and toxicity of photocatalytic products to luminescent bacteria. **Chemosphere**, v. 73, p. 37-382, 2008.

JOHNSON B, ANKER H, MELENEY F. Bacitracin: a new antibiotic produced by a member of the *B. subtilis* group. **Science**, v. 102, n. 2650, p. 376–377, 1945.

JOY, S. R., SNOW, D. D.; GILLEY, J. E.; WOODBURY, B.; BARTELT-HUNT, S. L. Fate of antimicrobials and antimicrobial resistance genes in simulated swine manure storage. **Science of the Total Environment**, v. 481, p. 69–74, 2014.

JOY, S. R.; BARTELT-HUNT, S. L.; SNOW, D. D.; GILLEY, J. E.; WOODBURY, B. L.; PARKER, D. B.; MARX, D. B.; LI, X. Fate and transport of antimicrobials and antimicrobial resistance genes in soil and runoff following land application of swine manure slurry. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 21, p. 12081-12088, 2013.

JUSTIA. **District Court for the District of Columbia - 674 F. Supp. 894** (D.D.C. 1987). Disponível em: < <http://law.justia.com/cases/federal/district-courts/FSupp/674/894/1521165/>>. Acesso em 1 jul. 2017.

KANG, J. W.; DE REYMAEKER, G.; VAN SCHEPDAEL, A.; ROETS, E.; HOOGMARTENS J. Analysis of bacitracin by micellar electrokinetic capillary chromatography with mixed micelle in acidic solution. **Electrophoresis**, v. 22, n.7, p. 1356-62, 2001.

KANIOU, S.; PITARAKIS, K.; BARLAGIANNI, I.; POULIOS, I. Photocatalytic oxidation of sulfamethazine. **Chemosphere**, v. 60, p. 372-380, 2005.

KIM, S. D.; CHO, J.; KIM, I. S.; VANDERFORD, B. J.; SNYDER, S. A. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. **Water Research**, v. 41, n. 5, p. 1013–1021, 2007.

KLAUSON, D.; BABKINA, J.; STEPANOVA, K.; KRICHEVSKAYA, M.; PREIS, S. Aqueous photocatalytic oxidation of amoxicillin. **Catalysis Today**, v. 151, p. 39-45, 2010.

KLAVARIOTI, M.; MANTZAVINOS, D.; KASSINOS, D. Removal of Residual Pharmaceuticals from Aqueous Systems by Advanced Oxidation Processes. **Environment International**, v. 35, n. 2, p. 402-417, 2009.

KNIE, J.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004.

KRIES, H.; NIQUILLE, D. L.; HILVERT, D. A subdomain swap strategy for reengineering nonribosomal peptides. **Chemistry & Biology**, v. 22, n. 5, p. 640-648, 2015.

KUMAR, K.; GUPTA, S. C.; BAIDOO, S. K.; CHANDER, Y.; ROSEN, C. J. Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. **Journal of Environmental Quality**, v. 34, p. 2082–2085, 2005.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part II. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 417–434, 2009a.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 417–434, 2009b.

KUMMERER, K. **Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks**. 2^a ed. Freiburg: Springer, 2004. 527p.

KUMMERER, K.; HENNINGER, A. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluents. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 9, p. 1203–1214, 2003.

LANGE, F.; CORNELISSEN, S.; KUBAC, D.; SEIN, M. M.; VON SONNTAG, J.; HANNICH, C. B.; GOLLOCH, A.; HEIPIEPER, H. J.; MÖDER, M.; VON SONNTAG, C. Degradation of macrolide antibiotics by ozone: a mechanistic case study with clarithromycin. **Chemosphere**, v. 65, p. 17-23, 2006.

LAVERMAN, A. M.; CAZIER, T.; YAN, C.; ROOSE-AMSALEG, C.; PETIT, F.; GARNIER, J.; BERTHE, T. Exposure to vancomycin causes a shift in the microbial community structure without affecting nitrate reduction rates in river sediments. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 22, p. 13702–13709, 2015.

LEE, C. E.; HOWE, J. J.; THOMSON, B. M. **State of Knowledge of Pharmaceutical, Personal Care Product, and Endocrine Disrupting Compound Removal during Municipal Wastewater Treatment**. Albuquerque: New Mexico Environment Department, University of New Mexico, 2009.

LEONG, K. H.; LIU, S. L.; SIM, L. C.; SARAVANAN, P.; JANG, M.; IBRAHIM, S. Surface reconstruction of titania with g-C₃N₄ and Ag for promoting efficient electrons migration and enhanced visible light photocatalysis. **Applied Surface Science**, v. 358, p. 370–376, 2015.

LEVENSPIEL, O. **Engenharia das Reações Químicas**. São Paulo: Blucher, 2000.

LI, B.; YANG, Y.; MA, L.; JU, F.; GUO, F.; TIEDJE, J. M.; ZHANG, T. Metagenomic and network analysis reveal wide distribution and cooccurrence of environmental antibiotic resistance genes. **The ISME Journal**, v. 9, n. 11, p. 2490–2502, 2015.

LIAO, C. H.; GUROL, M. D. Chemical oxidation by photolytic decomposition of hydrogen peroxide. **Environmental Science & Technology**, v. 29, n. 12, p. 3007-3014, 1995.

LIN, A.Y.-C.; LIN, C.-F.; CHIOU, J.-M.P.; HONG, K.A. O₃ and O₃/H₂O₂ treatment of sulphonamide and macrolide antibiotics in wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, v. 171, p. 452-458, 2009.

LOFRANO, G.; CAROTENUTO, M.; UYGUNER-DEMIREL, C. S.; VITAGLIANO, A.; SICILIANO, A.; GUIDA, M. An integrated chemical and ecotoxicological assessment for the photocatalytic degradation of vancomycin. **Environmental Technology**, v. 35, p. 1234-1242, 2014.

LOFRANO, G.; LIBRALATO, G.; ADINOLFI, R.; SICILIANO, A.; IANNECE, P.; GUIDA, M.; GIUGNI, M.; GHIRARDINI, V. A.; CAROTENUTO, M. Photocatalytic degradation of the antibiotic chloramphenicol and effluent toxicity effects. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 123, p. 65-71, 2016.

LOFRANO, G.; PEDRAZZAN, R.; LIBRALATO, G.; CAROTENUTO, M. Advanced Oxidation Processes for Antibiotics Removal: A Review. **Current Organic Chemistry**, v. 21, p. 1054-1067, 2017.

LOGAR, I.; BROUWER, R.; MAURER, M.; ORT, C. Cost-benefit analysis of the Swiss national policy on reducing micropollutants in treated wastewater. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 21, p. 12500-12508, 2014.

LOURENÇO, F. R. **Doseamento microbiológico de apramicina – desenvolvimento e validação de método empregando leitura cinética em microplacas**. 2009. 155p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

LUNDEEN, R. A.; CHU, C.; SANDER, M.; MCNEILL, K. Photooxidation of the Antimicrobial, Nonribosomal Peptide Bacitracin A by Singlet Oxygen under Environmentally Relevant Conditions. **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 16, p. 8586–8595, 2016.

LUO, Y.; GUO, W.; NGO, H.; NGHIEM, L. D.; HAI, F.; ZHANG, J.; LIANG, S.; WANG, X. C. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, v. 473, p. 619–641, 2014.

LUU, H. T.; LEE, K. Degradation and changes in toxicity and biodegradability of tetracycline during ozone/ultraviolet-based advanced oxidation. **Water Science and Technology**, v. 70, n. 7, p. 1229–1235, 2014.

MA, Y.; METCH, J. W.; YANG, Y.; PRUDEN, A.; ZHANG, T. Shift in antibiotic resistance gene profiles associated with nanosilver during wastewater treatment. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 3, 2016.

MAHLAPUU, M.; HÅKANSSON, J.; RINGSTAD, L.; BJORN, C. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.6, p. 194, 2016.

MARIANI, M. L.; ROMERO, R. L.; ZALAZAR, C. S. Modeling of degradation kinetic and toxicity evaluation of herbicides mixtures in water using the UV/H₂O₂ process. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 14, n. 3, p. 608-617, 2015.

MARTINEZ-CARBALLO, E.; GONZALEZ-BARREIRO, C.; SCHARF, S.; GANS, O. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. **Environmental Pollution**, v. 148, p. 570–579, 2007.

MÉNDEZ, E; GONZÁLEZ-FUENTES, M. A.; REBOLLAR-PEREZ, G.; MÉNDEZ-ALBORES, A.; TORRES, E. Emerging pollutant treatments in wastewater: Cases of antibiotics and hormones. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 52, n. 3, p. 235–253, 2016.

MERCK BRASIL. **Procedimento de Análise DBO₅ – Método Respirométrico Simplificado – Oxtop**: Standard Methods. 19^a ed., 1995, 54 p.

METZ, F.; INGOLD, K. Sustainable Wastewater Management: Is it Possible to Regulate Micropollution in the Future by Learning from the Past? A Policy Analysis. **Sustainability**, v. 6, p. 1992-2012, 2014.

MICHAEL, I.; RIZZO, L.; MCARDELL, C. S.; MANAIA, C. M.; MERLIN, C.; SCHWARTZ, T.; DAGOT, C.; FATTA-KASSINOS, D. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review. **Water Research**, v. 47, p. 957-995, 2013.

MIGLIORE, L.; BRAMBILLA, G.; GRASSITELLIS, A.; DI DELUPIS, G. D. Toxicity and bioaccumulation of sulphadimethoxine in Artemia (Crustacea, Anostraca). **International Journal of Salt Lake Research**, v. 2, n. 2, p. 141-152, 1993.

MIGLIORE, L.; CIVITAREALE, C.; BRAMBILLAM, G.; DI DELUPIS, G. D. Toxicity of several important agricultural antibiotics to Artemia. **Water Research**, v. 31, n. 7, p. 1801-1806, 1997.

MIGLIORE, L.; COZZOLINO, S.; FIORI, M. Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. **Chemosphere**, v. 52, n. 7, p. 1233-1244, 2003.

MING, L-J.; EPPERSON, J. D. Metal binding and structure - activity relationship of the metallo-antibiotic peptide bacitracin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 91, p. 46–58, 2002.

MOREIRA, F. C.; GARCIA-SEGURA, S.; BOAVENTURA, R. A. R.; BRILLAS, E.; VILAR, V. J. P. Degradation of the antibiotic trimethoprim by electrochemical advanced oxidation processes using a carbon–PTFE air diffusion cathode and a boron-doped diamond or platinum anode. **Applied Catalysis B**, v. 160–161, p. 492–505, 2014.

MORRIS, M. Primary Structural Confirmation of Components of the Bacitracin Complex. **Biological Mass Spectrometry**, v. 23, n. 2, p. 61–70, 1994.

NEWTON, G. G. F.; ABRAHAM, E. P. Observation on the nature of Bacitracin A. **Biochemical Journal**, v. 53, p. 604–613, 1953b.

NEWTON, G. G. F.; ABRAHAM, E. P. Some Properties of the Bacitracin Polypeptides. **Biochemical Journal**, v. 53, n. 4, p. 597–604, 1953a.

NOGUEIRA, R. F.; OLIVEIRA, M. C.; PATERLINI, W. C. Simple and fast spectrophotometric determination of H₂O₂ in photo-Fenton reactions using metavanadate. **Talanta**, v. 66, n. 1, p. 86–91, 2005.

NONRINE. **Non-Ribossomal Peptide**. Disponível em: <<http://bioinfo.lifl.fr/norine/>>. Acesso em: 5 mai. 2017.

OKA, H.; IKAI, Y.; KAWAMURA, N.; YAMADA, M.; HARADA, K.; YAMAZAKI, Y.; SUZUKI, M. Improvement of chemical analysis of antibiotics. XV. Isocratic high-performance liquid chromatographic methods for the analysis and preparative separation of the components of bacitracin. **Journal of Chromatography**, v. 462, p. 315–22, 1989.

OPPENLÄNDER, T. **Photochemical Purification of Water and Air: Advanced Oxidation Processes (AOPs): Principles, Reaction Mechanisms, Reactor Concepts**. Weinheim: Wiley-VCH, 2003.

PALLECCHI, L.; BARTOLONI, A.; PARADISI, F.; ROSSOLINI, G. M. Antibiotic resistance in the absence of antimicrobial use: mechanisms and implications. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 6, p. 725–732, 2008.

PALOMINOS, R.; FREER, J.; MONDACA, M. A.; MANSILLA, H. D. Evidence for hole participation during photocatalytic oxidation of the antibiotic flumequine. **Journal of Photochemistry and Photobiology A**, v. 193, p. 139–145, 2008.

PALOMINOS, R.; MONDACA, M. A.; GIRALDO, A.; PEÑUELA, G.; PÉREZ-MOYA, M.; MANSILLA, H. D. Photocatalytic oxidation of the antibiotic tetracycline on TiO₂ and ZnO suspensions. **Catalysis Today**, v. 144, p. 100–105, 2009.

PARSONS, S. **Advanced Oxidation Processes for Water and Wastewater Treatment**. IWA Publishing, London, 2005.

PAVLI, V.; KMETEC, V. Pathways of Chemical Degradation of Polypeptide Antibiotic Bacitracin. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 11, p. 2160–2167, 2006.

PAVLI, V.; KMETEC, V.; VEHOVEC, T. Isolation of Peptide Components of Bacitracin by Preparative HPLC and Solid Phase Extraction (SPE). **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 27, n. 15, p. 2381-2396, 2004.

PÉREZ-MOYA, M.; GRAELLS, M.; CASTELLS, G.; AMIGÓ, J.; ORTEGA, E.; BUHIGAS, G.; PÉREZ, L. M.; MANSILLA, H. D. Characterization of the degradation performance of the sulfamethazine antibiotic by photo-Fenton process. **Water Research**, v. 44, p. 2533-2540, 2010.

POTTS, A. R.; PSUREK, T.; JONES, C.; PARRIS, L.; WISE, A. Validation of a quantitative HPLC method for bacitracin and bacitracin zinc using EDTA as a mobile-phase modifier. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 70, p. 619– 623, 2012.

PUBCHEM. **Compound**. Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 1 mai. 2017.

PUGAZHENTHIRAN, N.; MURUGESAN, S.; SATHISHKUMAR, P.; ANANDAN, S. Photocatalytic degradation of ceftiofur sodium in the presence of gold nanoparticles loaded TiO₂ under UV-visible light. **Chemical Engineering Journal**, v. 241, p. 401–409, 2014.

QIANG, Z.; ADAMS, C.; SURAMPALLI, R. Determination of ozonation rate constants for Lincomycin and Spectinomycin. **Ozone: Science & Engineering**, v. 26, p. 525-537, 2004.

RENEWICK, M. J.; SIMPKIN, V.; MOSSIALOS, E. **Targeting innovation in antibiotic drug discovery and development**: The need for a One Health – One Europe – One World Framework. European Observatory on Health Systems and Policies, Copenhagen, 2016.

REYES, C.; FÉRNANDEZ, J.; FREER, J.; MONDACA, M. A.; ZAROR, C.; MALATO, S.; MANSILLA, H. D. Degradation and inactivation of tetracycline by TiO₂ photocatalyst. **Journal of Photochemistry and Photobiology A**, v. 184, p. 141-146, 2006.

RICHARDSON, S. D.; TERNES, T. A. Water analysis: emerging contaminants and current issues. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 12, p. 4614-4648, 2011.

ROBINSON, A. A.; BELDEN, J. B.; LYDY, M. J. Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 423–430, 2005.

ROMEIRO, A. R. Sustainable development: an ecological economics perspective. **Estudos Avançados**, v. 26, n. 74, p. 65–92, 2012.

ROOSE-AMSALEG, C.; LAVERMAN, A. M. Do antibiotics have environmental side-effects? Impact of synthetic antibiotics on biogeochemical processes. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 4000–4012, 2016.

ROZAS, O.; CONTRERAS, D.; MONDACA, M. A.; PÉREZ-MOYA, M.; MANSILLA, H. D. Experimental design of Fenton and photo-Fenton reactions for the treatment of ampicillin solutions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 177, p. 1025-1030, 2010.

RUBIO-CLEMENTE, A.; CHICA, E.; PENUELA, G. A. kinetic model describing the UV/H₂O₂ photodegradation of phenol from water. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly**, v. 23, n. 4, p. 547–562, 2017.

SANDEGREN, L. Selection of antibiotic resistance at very low antibiotic concentrations. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v. 119, p. 103–107, 2014.

SANDERSON, H.; BRAIN, R. A.; JOHNSON, D. J.; WILSON, C. J.; SOLOMON, K. R. Toxicity classification and evaluation of four pharmaceuticals classes: Antibiotics, antineoplastics, cardiovascular, and sex hormones. **Toxicology**, v. 203, p. 27–40, 2004.

SAUTOUR, M.; ROUGET, A.; DANTIGNY, P.; DIVIES, C.; BENSOUSSAN, M. Application of Doehlert design to determine the combined effects of temperature, water activity and pH on conidial germination of *Penicillium chrysogenum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 5, p. 900-906, 2001.

SERNA-GALVIS, E. A.; SILVA-AGREDO, J.; GIRALDO-AGUIRRE, A. L.; FLÓREZ-ACOSTA, O. A.; TORRES-PALMA, R. A. High frequency ultrasound as a selective advanced oxidation process to remove penicillinic antibiotics and eliminate its antimicrobial activity from water. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 31, p. 276-283, 2016.

SHAOJUN, J.; SHOURONG, Z.; DAQIANG, Y.; LIANHONG, W.; LIANGYAN, C. Aqueous oxytetracycline degradation and the toxicity change of degradation compounds in photoirradiation process. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, p. 806-813, 2008.

SHRIVASTAVA, A.; GUPTA, V. B. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. **Chronicles of Young Scientists**, v. 2, n.1, p. 21-25, 2011.

SIEGEL, M. M.; HUANG, J.; LIN, B.; TSAO, R.; EDMONDS, C. G. Structures of Bacitracin A and Isolated Congeners: Sequencing of Cyclic Peptides with Blocked Linear Side Chains by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Biological Mass Spectrometry**, v. 23, p. 186-204, 1994.

SIMUNOVIC, M.; KUSIC, H.; KOPRIVANAC, N.; BOZIC, A. L. Treatment of simulated industrial wastewater by photo-Fenton process: Part II. The development of mechanistic model. **Chemical Engineering Journal**, v. 173, n. 2, p. 280-289, 2011.

SIN, D. W. M.; WONG Y. C. Analytical methodologies for identifying a polypeptide antibiotic. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 11, p. 799-809, 2003.

SNOWBERGER, S.; ADEJUMO, H.; HE, K.; MANGALGIRI, K. P.; HOPANNA, M.; SOARES, A. D.; BLANEY, L. Direct Photolysis of Fluoroquinolone Antibiotics at 253.7 nm: Specific Reaction Kinetics and Formation of Equally Potent Fluoroquinolone Antibiotics. **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 17, p. 9533-4952, 2016.

SONG, W.; RAVINDRAN, V.; PIRBAZARI, M. Process optimization using a kinetic model for the ultraviolet radiation-hydrogen peroxide decomposition of natural and synthetic organic compounds in groundwater. **Chemical Engineering Science**, v. 63, p. 3249–3270, 2008.

STEFAN, M. I.; HOY, A. R.; BOLTON, J. R. Kinetics and mechanism of the degradation and mineralization of acetone in dilute aqueous solution sensitized by the UV photolysis of hydrogen peroxide. **Environmental Science & Technology**, v. 30, n. 7, p. 2382–2390, 1996.

STONE, K. J.; STROMINGER, J. L. Mechanism of Action of Bacitracin: Complexation with Metal Ion and C55-Isoprenyl Pyrophosphate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 68, n. 12, p. 3223–3227, 1971.

TERNES, T. A.; STÜBER, J.; HERRMANN, N.; MCDOWELL, D.; RIED, A.; KAMPMANN, M.; TEISER, B. Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater. **Water Research**, v. 37, p. 1976-1982, 2003.

TRATABRASIL. **Principais estatísticas.** Disponível em: <
<http://www.tratabrasil.org.br/saneamento/principais-estatisticas/>>. Acesso em: 9 jul. 2018.

TOSCANO, W. A.; STORM, D. R. Bacitracin. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 16, p. 199-210, 1982.

TROVÓ, A. G.; MELO, S. A. S.; NOGUEIRA, R. F. P. Photodegradation of the pharmaceuticals amoxicillin, bezafibrate and paracetamol by the photo-Fenton process e application to sewage treatment plant effluent. **Journal of Photochemistry and Photobiology A**, v. 198, 215-220, 2008.

TROVÓ, A. G.; NOGUEIRA, R. F. P.; AGÜERA, A.; FERNANDEZ-ALBA, A. R.; MALATO, S. Degradation of the antibiotic amoxicillin by photo-Fenton process– chemical and toxicological assessment. **Water Research**, v. 45, p. 1394-1402, 2011.

TROVÓ, A. G.; NOGUEIRA, R. F. P.; AGÜERA, A.; SIRTORI, C.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Photodegradation of sulfamethoxazole in various aqueous media: persistence, toxicity and photoproducts assessment. **Chemosphere**, v. 77, p. 1292-1298, 2009.

TSUJI, K.; ROBERTSON, J. H.; BACH, J. A. Quantitative high-pressure liquid chromatographic analysis of bacitracin, a polypeptide antibiotic. **Journal of Chromatography**, v. 99, p. 597–608, 1974.

TSUJI, K.; ROBERTSON, J. H. Improved high-performance liquid chromatographic method for polypeptide antibiotics and its application to study the effects of treatments to reduce microbial levels in bacitracin powder. **Journal of Chromatography A**, v. 112, P. 663-672, 1975.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Literature review of contaminants in livestock and poultry manure and implications for water quality**, Washington: EPA, 2013.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. **Bacitracin Zinc. Official Monographs.** United States, 2012.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. USP 31-NF. **Bacitracin Monograph.**, p. 1483–1485, 2008.

VAN BOECKEL, T. P.; BROWER, C.; GILBERT, M.; GRENFELL, B. T.; LEVIN, S. A.; ROBINSON, T. P.; TEILLANT, A.; LAXMINARAYAN, R. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 112, n. 18, p. 5649-54, 2015.

WAGIL, M.; KUMIRSKA, J.; STOLTE, S.; PUCKOWSKI, A.; MASZKOWSKA, J.; STEPNOWSKI, P.; BIALK-BIELINSKA, A. Development of sensitive and reliable LCMS/MS methods for the determination of three fluoroquinolones in water and fish tissue samples and preliminary environmental risk assessment of their presence in two rivers in northern Poland. **Science of the Total Environment**, v. 493, p. 1006–1013, 2014.

WATERMAN, R.; LEWIS, J.; WATERMAN, K. C. Accelerated Stability Modeling for Peptides: A Case Study with Bacitracin. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 5, p. 1692-1698, 2017.

WATKINSON, A. J.; MURBY, E. J.; KOLPIN, D. W.; COSTANZO, S. D. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: from wastewater to drinking water. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 8, p. 2711-23, 2009.

WEEKS, J. L.; MATHERSON, M. S. The Primary Quantum Yield of Hydrogen Peroxide Decomposition. **Journal of the American Chemical Society**, v. 78, n. 7, p. 1273–1278, 1956.

WEISS, P. J.; ANDREW, M. L.; WRIGHT, W. W. Solubility of antibiotics in twenty-four solvents: use in analysis. **Antibiotics and Chemotherapy (Northfield)**, v. 7, n. 7, p. 374-7, 1957.

WOLS, B. A.; HARMSSEN, D. J. H.; BEERENDONK, E. F.; HOFMAN-CARIS, C. H. M. Predicting pharmaceutical degradation by UV (LP)/H₂O₂ processes: A kinetic model. **Chemical Engineering Journal**, v. 255, p. 334–343, 2014.

WONG, W. R.; OLIVER, A. G.; LININGTON, R. G. Development of antibiotic activity profile screening for the classification and discovery of natural product antibiotics. **Chemistry and Biology**, v. 19, n. 11, p. 1483–1495, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antibiotic resistance**, 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/>>. Acesso em: 19 fev. 2018

XIAO, J.; XIE, Y.; CAO, H. Organic Pollutants Removal in Wastewater by Heterogeneous Photocatalytic Ozonation. **Chemosphere**, v. 121, p. 1-17, 2015.

YAN, S.; SONG, W. Photo-transformation of pharmaceutically active compounds in the aqueous environment: a review. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 16, n. 4, p. 697-720, 2014.

ZAVISKA, F.; DROGUI, P.; BLAIS, J.; MERCIER, G.; L. A. ROCHEBROCHARD D'AUZAY, S. Electrochemical oxidation of chlortetracycline using Ti/IrO₂ and Ti/PbO₂ anode electrodes: Application of experimental design methodology. **Journal of Environmental Engineering**, v. 139, n. 6, p. 810–821, 2013.

ZHAO, L.; DONG, Y. H.; WANG, H. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 1069–75, 2010.

ZHOU, L.; YING, G. G.; LIU, S.; ZHANG, R. Q.; LAI, H. J.; CHEN, Z. F.; PAN, C. G. Excretion masses and environmental occurrence of antibiotics in typical swine and dairy cattle farms in China. **Science of the Total Environment**, v. 444; p. 183-195, 2013.

APÊNDICE A – CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados através do ajuste linear de dados de concentrações experimentais baixas de analito e calculados pelas fórmulas: $LD = 3,3 \times \frac{S_{y/x'}}{b'}$ e $LQ = 10 \times \frac{S_{y/x'}}{b'}$, em que $S_{y/x'}$ é o desvio-padrão da interceptação de y da regressão linear (ou erro padrão da estimativa) e b' é o coeficiente linear da curva (SHRIVASTAVA; GUPTA, 2011).

Figura A1 – Curva de calibração obtida para a bacitracina zíncica A. A linha pontilhada em azul na curva indica o limite de confiança de 95%. Curva ajustada: $y = 6811,25x$.
 $LQ = 0,19 \text{ mmol L}^{-1}$ e $LD = 0,57 \text{ mmol L}^{-1}$.

Figura A2 – Curva de calibração obtida para as bacitracinas zíncica B1 e B2. A linha pontilhada em azul na curva indica o limite de confiança de 95%. Curva ajustada: $y = 7988,94x$. LQ = 0,21 mmol L⁻¹ e LD = 0,62 mmol L⁻¹.

Figura A3 – Curva de calibração obtida para a bacitracina zíncica B3. A linha pontilhada em azul na curva indica o limite de confiança de 95%. Curva ajustada: $y = 5101,2x$. LQ = 0,26 mmol L⁻¹ e LD = 0,78 mmol L⁻¹.

Figura A4 – Curva de calibração obtida para a bacitracina zíncica F. A linha pontilhada em azul na curva indica o limite de confiança de 95%. Curva ajustada: $y = 601,594x$. LQ = 0,24 mmol L⁻¹ e LD = 0,73 mmol L⁻¹.

Figura A5 – Curva de calibração obtida para H₂O₂. A linha pontilhada em azul na curva indica o limite de confiança de 95%. Curva ajustada: $y = 601,594x$. LQ = 0,11 mmol L⁻¹ e LD = 0,34 mmol L⁻¹.

APÊNDICE B – CROMATOGRAMAS EM HPLC DA BACITRACINA ZÍNCICA

Figura B1 – Cromatogramas comparativos em HPLC entre a mistura de Bc-Zn grau técnico e o padrão primário de referência.

Figura B2 – Cromatogramas HPLC em diferentes tempos durante a fotólise da Bc-Zn em 4,1 W UVC ($2,18 \times 10^{-6}$ Einstein $L^{-1} s^{-1}$).

Figura B3 – Cromatogramas HPLC em diferentes tempos durante a fotólise da Bc-Zn em 11,3 W UVC ($6,01 \times 10^{-6}$ Einstein $L^{-1} s^{-1}$).

Figura B4 – Cromatogramas HPLC em diferentes tempos durante a fotólise da Bc-Zn em 20,8 W UVC ($1,11 \times 10^{-5}$ Einstein $L^{-1} s^{-1}$).

Figura B5 – Cromatogramas HPLC em diferentes tempos durante o processo UV/H₂O₂ na condição 7 ([Bc-Zn]₀ = 50 mg L⁻¹, 6,01×10⁻⁶ Einstein L⁻¹ s⁻¹ e [H₂O₂]₀ = 10,7 mmol L⁻¹).

APÊNDICE C – CONCENTRAÇÃO E COMPOSIÇÃO INICIAL DA MISTURA DE BC-ZN NOS EXPERIMENTOS DE FOTO- OXIDAÇÃO

Tabela C1 – Concentração e composição inicial da mistura de Bc-Zn nos experimentos de fotólise.

		Concentração de Bc-Zn (mg L ⁻¹)				Composição da Bc-Zn				Erro amostral da média geral			
Exp.	Exp.	A	B (B1+B2+B3)	F	Soma (A+B+F)	A	B	F	Soma (A+B+F)	A	B	F	Soma (A+B+F)
Fotólise 4W	1A	21,87	12,60	1,07	35,55	43,7%	25,2%	2,1%	71,1%	3,2%	7,5%	3,6%	4,6%
	1B	21,38	12,81	0,98	35,18	42,8%	25,6%	2,0%	70,4%	5,4%	6,0%	5,5%	5,6%
	Média	21,63	12,71	1,02	35,36	43,3%	25,4%	2,0%	70,7%	4,3%	6,8%	1,0%	5,1%
Fotólise 11W	1A	22,04	14,59	0,96	37,58	44,1%	29,2%	1,9%	75,2%	2,5%	7,0%	7,5%	0,9%
	1B	22,28	14,11	1,00	37,39	44,6%	28,2%	2,0%	74,8%	1,4%	3,5%	2,9%	0,3%
	Média	22,16	14,35	0,98	37,49	44,3%	28,7%	2,0%	75,0%	2,0%	5,3%	5,2%	0,6%
Fotólise 20W	1A	22,14	13,78	1,04	36,96	44,3%	27,6%	2,1%	73,9%	2,0%	1,1%	0,2%	0,8%
	1B	23,41	14,28	1,06	38,75	46,8%	28,6%	2,1%	77,5%	3,6%	4,7%	2,7%	4,0%
	Média	22,78	14,03	1,05	37,85	45,6%	28,1%	2,1%	75,7%	0,8%	2,9%	1,4%	1,6%
Média Geral		22,19	13,70	1,02	36,90	44,4%	27,4%	2,0%	73,8%	2,3%	5,0%	2,5%	2,4%

Tabela C2 – Concentração e composição inicial da mistura de Bc-Zn nos experimentos de UV/H₂O₂.

Exp.	Exp.	Concentração de Bc-Zn (mg L ⁻¹)				Composição da Bc-Zn				Erro amostral da média geral			
		A	B (B1+B2+B3)	F	Soma (A+B+F)	A	B	F	Soma (A+B+F)	A	B	F	Soma (A+B+F)
1	1A	22,29	14,01	1,08	37,37	44,6%	28,0%	2,2%	74,7%	1,4%	2,8%	4,0%	0,3%
	1B	22,53	13,93	1,04	37,50	45,1%	27,9%	2,1%	75,0%	0,3%	2,2%	0,4%	0,6%
	1C	23,60	14,53	1,08	39,21	47,2%	29,1%	2,2%	78,4%	4,4%	6,6%	4,3%	5,2%
	Média	22,80	14,16	1,06	38,03	45,6%	28,3%	2,1%	76,1%	0,9%	3,9%	2,9%	2,0%
2	2A	22,29	13,70	1,05	37,04	44,6%	27,4%	2,1%	74,1%	1,4%	0,5%	1,4%	0,6%
	2B	21,90	13,01	1,10	36,01	43,8%	26,0%	2,2%	72,0%	3,1%	4,5%	5,9%	3,4%
	2C	22,90	13,83	0,98	37,72	45,8%	27,7%	2,0%	75,4%	1,3%	1,5%	5,3%	1,2%
	Média	22,36	13,52	1,04	36,92	44,7%	27,0%	2,1%	73,8%	1,0%	0,8%	0,7%	0,9%
3	3A	21,96	13,01	1,09	36,06	43,9%	26,0%	2,2%	72,1%	2,8%	4,6%	5,3%	3,2%
	3B	22,66	13,66	1,05	37,37	45,3%	27,3%	2,1%	74,7%	0,3%	0,2%	1,6%	0,3%
	3C	21,61	13,08	0,99	35,68	43,2%	26,2%	2,0%	71,4%	4,4%	4,1%	4,1%	4,3%
	Média	22,08	13,25	1,04	36,37	44,2%	26,5%	2,1%	72,7%	2,3%	2,8%	0,9%	2,4%
4	4A	23,62	14,57	0,98	39,17	47,2%	29,1%	2,0%	78,3%	4,5%	6,9%	5,3%	5,1%
	4B	22,98	14,35	1,07	38,40	46,0%	28,7%	2,1%	76,8%	1,7%	5,3%	3,4%	3,0%
	4C	23,76	13,34	1,04	38,14	47,5%	26,7%	2,1%	76,3%	5,1%	2,1%	0,4%	2,3%
	Média	23,45	14,09	1,03	38,57	46,9%	28,2%	2,1%	77,1%	3,8%	3,4%	0,5%	3,5%
5	5A	23,59	14,64	1,11	39,34	47,2%	29,3%	2,2%	78,7%	4,4%	7,4%	7,2%	5,6%
	5B	21,76	13,21	1,07	36,04	43,5%	26,4%	2,1%	72,1%	3,7%	3,1%	3,4%	3,3%
	5C	21,93	13,13	1,02	36,08	43,9%	26,3%	2,0%	72,2%	3,0%	3,7%	1,4%	3,2%
	Média	22,43	13,66	1,07	37,15	44,9%	27,3%	2,1%	74,3%	0,8%	0,2%	3,0%	0,3%

Tabela C2 (cont.) – Concentração e composição inicial da mistura de Bc-Zn nos experimentos de UV/H₂O₂.

Exp.	Exp.	Concentração de Bc-Zn (mg L ⁻¹)				Composição da Bc-Zn				Erro amostral da média geral			
		A	B (B1+B2+B3)	F	Soma (A+B+F)	A	B	F	Soma (A+B+F)	A	B	F	Soma (A+B+F)
6	6A	23,19	13,32	1,09	37,60	46,4%	26,6%	2,2%	75,2%	2,6%	2,2%	5,2%	0,9%
	6B	22,93	13,66	1,10	37,70	45,9%	27,3%	2,2%	75,4%	1,5%	0,2%	6,7%	1,2%
	6C	21,79	12,98	1,04	35,81	43,6%	26,0%	2,1%	71,6%	3,6%	4,8%	0,7%	3,9%
	Média	22,64	13,32	1,08	37,03	45,3%	26,6%	2,2%	74,1%	0,2%	2,3%	4,2%	0,6%
7	7A	21,93	14,54	1,00	37,47	43,9%	29,1%	2,0%	74,9%	3,0%	6,7%	3,3%	0,5%
	7B	22,63	14,68	0,97	38,28	45,3%	29,4%	1,9%	76,6%	0,1%	7,7%	6,1%	2,7%
	7C	22,81	14,27	1,00	38,08	45,6%	28,5%	2,0%	76,2%	0,9%	4,7%	3,6%	2,2%
	Média	22,46	14,50	0,99	37,95	44,9%	29,0%	2,0%	75,9%	0,6%	6,4%	4,3%	1,8%
8	8A	23,81	12,85	1,00	37,66	47,6%	25,7%	2,0%	75,3%	5,4%	5,7%	3,3%	1,1%
	8B	22,66	12,85	0,96	36,47	45,3%	25,7%	1,9%	72,9%	0,2%	5,7%	7,3%	2,1%
	8C	22,17	13,33	1,04	36,54	44,3%	26,7%	2,1%	73,1%	1,9%	2,2%	0,5%	1,9%
	Média	22,88	13,01	1,00	36,89	45,8%	26,0%	2,0%	73,8%	1,2%	4,5%	3,3%	1,0%
9	9A	22,06	13,66	0,99	36,72	44,1%	27,3%	2,0%	73,4%	2,4%	0,2%	4,0%	1,5%
	9B	21,95	14,13	1,05	37,13	43,9%	28,3%	2,1%	74,3%	2,9%	3,7%	2,0%	0,4%
	9C	22,78	13,45	1,07	37,30	45,6%	26,9%	2,1%	74,6%	0,8%	1,3%	3,5%	0,1%
	Média	22,26	13,75	1,04	37,05	44,5%	27,5%	2,1%	74,1%	1,5%	0,9%	0,5%	0,6%
10	10A	22,10	12,61	1,03	35,75	44,2%	25,2%	2,1%	71,5%	2,2%	7,5%	0,0%	4,1%
	10B	22,77	13,68	0,98	37,43	45,5%	27,4%	2,0%	74,9%	0,7%	0,4%	4,9%	0,5%
	10C	23,04	12,86	0,96	36,85	46,1%	25,7%	1,9%	73,7%	1,9%	5,7%	7,3%	1,1%
	Média	22,64	13,05	0,99	36,68	45,3%	26,1%	2,0%	73,4%	0,2%	4,3%	4,1%	1,6%
Média Geral		22,60	13,63	1,03	37,26	45%	27,3%	2,1%	74,5%	1,2%	2,9%	2,5%	1,5%

APÊNDICE D – AJUSTE DE CURVAS

Figura D1 – Dados experimentais e curvas preditas dos experimentos de fotólise para estimar as constantes de pseudo-primeira ordem.

**APÊNDICE E – RESULTADOS DAS CONSTANTES DE PSEUDO-PRIMEIRA
ORDEM DE CADA EXPERIMENTO UV/H₂O₂**

Tabela E1 – Constantes de pseudo-primeira ordem estimadas para o processo UV/H₂O₂ para as dez condições experimentais em triplicata.

Exp.	Incidência de fótons ($\times 10^{-6}$ Einstein L⁻¹ s⁻¹)	[H₂O₂]₀ (mmol L⁻¹)	$k_{\text{fotólise}}$ ($\times 10^{-4}$ s⁻¹)	$k_{\text{oxidativa}}$ ($\times 10^{-2}$ s⁻¹)	k_{geral} ($\times 10^{-2}$ s⁻¹)
1'	4,23	14,27	7,48	1,76	1,84
1''	4,23	14,27	7,48	1,62	1,7
1'''	4,23	14,27	7,48	1,78	1,85
2'	9,12	14,27	10,25	3,92	4,02
2''	9,12	14,27	10,25	3,81	3,91
2'''	9,12	14,27	10,25	3,56	3,66
3'	11,1	10,70	16,45	9,78	9,95
3''	11,1	10,70	16,45	9,17	9,34
3'''	11,1	10,70	16,45	9,02	9,19
4'	9,12	7,13	16,13	4,54	4,7
4''	9,12	7,13	16,13	4,20	4,37
4'''	9,12	7,13	16,13	3,87	4,03
5'	4,23	7,13	7,48	2,05	2,13
5''	4,23	7,13	7,48	1,70	1,77
5'''	4,23	7,13	7,48	1,75	1,82
6'	2,18	10,70	3,23	0,76	0,79
6''	2,18	10,70	3,23	0,89	0,92
6'''	2,18	10,70	3,23	1,15	1,18
7'	6,01	10,70	8,91	2,97	3,06
7''	6,01	10,70	8,91	3,95	4,04
7'''	6,01	10,70	8,91	3,14	3,22
8'	11,1	14,27	12,49	18,19	18,32
8''	11,1	14,27	12,49	13,92	14,04
8'''	11,1	14,27	12,49	15,21	15,33
9'	11,1	17,83	11,72	7,53	7,65
9''	11,1	17,83	11,72	5,79	5,91
9'''	11,1	17,83	11,72	9,71	9,83
10'	11,1	21,40	10,29	4,47	4,58
10''	11,1	21,40	10,29	4,25	4,35
10'''	11,1	21,40	10,29	6,57	6,68

APÊNDICE F – DISTRIBUIÇÃO DE RESÍDUOS EM RELAÇÃO AOS VALORES PREDITOS DOS MODELOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Figura F1 – Distribuição de resíduos para a resposta Y_1 .

Figura F2 – Distribuição de resíduos para a resposta Y_2 .

Figura F3 – Distribuição de resíduos para a resposta Y_3 .

Figura F4 – Distribuição de resíduos para a resposta $Y_{1, \text{total}}$.

Figura F5 – Distribuição de resíduos para a resposta $Y_{2, \text{total}}$.

Figura F6 – Distribuição de resíduos para a resposta $Y_{3, \text{total}}$.