UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP

Instituto de Química de São Carlos – IQSC

Tanare Cambraia Ribeiro Ferreira

**Identificação e pré-concentração dos
produtos da fotodegradação de
antimicrobianos**

São Carlos

2014

Tanare Cambraia Ribeiro Ferreira

Identificação e pré-concentração dos produtos da fotodegradação de antimicrobianos

Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em acervo
reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2014

Dedicatória

À minha mãe Eloiza,
educadora dedicada que
ao longo da minha jornada
quando a mim não me bastava, foi em Deus em ti que me abandonava.
Guiou o meu caminho...
mostrando-me em cada momento compreensão,
luta, paciência, fé, inteligência e dedicação.
Se o exemplo é o maior ensinamento
cumpristes a sua missão. Obrigada!

Agradecimentos

Agradeço à Santíssima Trindade e Nossa Senhora, pelo discernimento, proteção em tudo que fiz e pelas decisões tomadas.

À minha família, por sempre apoiar as minhas decisões e ser inspiração em meus momentos de fragilidade. Em especial ao meu pai José Alencar, à minha mãe Eloiza e à minha irmã Renata por compreenderem a minha ausência durante esta jornada e por me amarem incondicionalmente.

Ao meu orientador Dr. Álvaro José Santos Neto pela confiança em meu trabalho, pelas valiosas opiniões que tanto contribuíram para o desenvolvimento do projeto e pela dedicação empregada em tudo que faz.

Ao Laboratório de Cromatografia do Instituto de Química de São Carlos pela excelente infraestrutura.

À Capes pela concessão da bolsa de doutorado.

Aos alunos de iniciação científica Amanda H. Imamura e Leonardo P. Medinilha, pela dedicação e responsabilidade empregada neste trabalho.

Aos colegas do CROMA, pela excelente convivência e em especial ao Dr. Guilherme Miola Titato pelo apoio técnico.

A todos que estiveram presentes neste projeto, transformando-o em realidade. Em especial ao meu namorado Gabriel pelo carinho e compreensão e as minhas amigas Suellen A. Alves e Renata Colombo pelo apoio, incentivo e pelos trabalhos realizados em parceria.

Resumo

A identificação de intermediários formados durante os processos de tratamentos de efluentes tem se tornado alvo de estudos. Entretanto, uma das questões mais importantes nos estudos de intermediários formados durante a fotólise ou degradação de fármacos por processos oxidativos avançados publicados atualmente é a concentração inicial utilizada. Altas concentrações dificultam a compreensão da real situação que ocorre na natureza, onde esses compostos são encontrados em baixas concentrações. Dentro deste contexto, o presente estudo, avaliou a pré-concentração de intermediários formados durante a fotólise em solução aquosa e em esgoto sintético da sulfametazina (SMZ), do ciprofloxacino (CIP) e do enrofloxacino (ENR) em diferentes concentrações (25 mg L⁻¹ e 250 µg L⁻¹ para SMZ; 10 mg L⁻¹ e 100 µg L⁻¹ para CIP e ENR) utilizando espectrometria de massas sequencial de alta resolução (Q-ToF e LIT-Orbitrap MS). Foram identificados oito intermediários da fotodegradação da SMZ, dentre estes os de *m/z* nominal 140 e 229 ainda não relatados na literatura. A metodologia desenvolvida para a SMZ foi aplicada a análises de produtos de transformação vindos de reator anaeróbio. As análises da biodegradação da SMZ permitiram a identificação de três produtos de transformação. O *m/z* 295 foi comum aos dois processos, fotólise e biodegradação. O *m/z* 227 foi descrito pela primeira vez como produto de biodegradação anaeróbia da SMZ. Tanto para o CIP quanto para o ENR foram identificados 10 intermediários, apesar da similaridade entre os dois fármacos, apenas um produto de degradação foi comum aos dois, o *m/z* 346, além do próprio CIP que é intermediário do ENR. Dentre as fases extratoras avaliadas, a Oasis HLB se mostrou mais eficiente na recuperação dos intermediários. A pré-concentração de intermediários formados durante a fotodegradação dos antimicrobianos estudados permitiu a avaliação da degradação destes em concentrações menores do que aquelas atingidas pelos trabalhos já publicados que abordaram rotas de degradação. Os perfis de degradação em diferentes concentrações e em diferentes matrizes apresentam indícios de serem diferente, tanto no perfil quanto na composição proporcional entre os produtos formados. Esses resultados são promissores, visto que permitem uma aproximação às concentrações ambientalmente relevantes.

Abstract

Identification of intermediate products formed during effluent treatment has become the focus of some studies. However, one of the most important issues during the photolysis of drugs or degradation by advanced oxidation processes is the high and invariable initial concentration of the treated drug. High concentrations, used in currently publications, potentially hinder the understanding of the real situation that occurs in nature, where low concentrations of these drugs are usually found. Here we focused in the identification of the degradation products of sulfamethazine (SMZ), ciprofloxacin (CIP) and enrofloxacin (ENR) obtained by photolysis in aqueous and synthetic wastewater medium. Solid-phase pre-concentration and chromatographic separation of the products obtained during the degradation process at different concentrations (25 mg L⁻¹ and 250 µg L⁻¹ for SMZ ; 10 mg L⁻¹ and 100 µg L⁻¹ for CIP and ENR) was developed in association with high-resolution tandem mass spectrometry (Q-ToF and LIT-Orbitrap MS). Eight photodegradation products of SMZ, among them those of nominal *m/z* 140 and 229 not reported yet in the literature, were identified. The methodology developed for SMZ was applied to transformation products analysis coming from anaerobic reactor. The biodegradation analysis of SMZ allowed the identification of three transformation products. The *m/z* 295 was common to processes, photolysis and biodegradation. The *m/z* 227 was first described as a product of anaerobic biodegradation of SMZ. Both for the CIP as well as for the ENR, ten intermediates have been identified, despite the similarity between the two drugs, only one degradation product is common to both, the one with nominal *m/z* 346, besides the CIP itself which is an intermediate of ENR. Among the evaluated extracting phases, the Oasis HLB was more efficient in recovering the intermediaries. The pre-concentration of intermediates formed during the photochemical degradation of antimicrobials allowed the evaluation of the degradation at lower concentration than the previously published papers that addressed routes for degradation. The degradation profile at different concentrations and matrices showed evidences of being different, both profile and regarding proportional composition of the products formed. These results are promising, as they provide an approach for application at environmentally relevant concentrations.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1-1- Principais vias para a contaminação ambiental por fármacos e efeitos relacionados.	20
Figura 1-2- Estrutura geral das sulfonamidas.....	22
Figura 1-3- Dinâmica do consumo de sulfonamidas e trimetopim na Dinamarca durante os anos 1990-2009.....	23
Figura 1-4- Os possíveis destinos de resíduos sulfonamidas e genes de resistência (SNsR).	24
Figura 1-5- Relação entre a estrutura e a atividade antibacteriana das fluoroquinolonas.	25
Figura 1-6 - Espectro eletromagnético (Comprimento de onda de 100 – 780 nm), destaque para a região do UV	27
Figura 1-7: Esquema das etapas empregadas na extração em fase sólida.	30

Capítulo 3

Figura 3-1- Reator Acoplado ao Sistema de Recirculação.....	44
Figura 3-2- Esquema representativo de cada etapa realizada (Continua)	46
Figura 3-3- Protocolo utilizado na pré-concentração.	50

Capítulo 4

Figura 4-1-Cromatograma total de íons (TIC) da solução da sulfametazina degradada por 1 hora (em colchetes, zoom do cromatograma do íon extraído ($m/z \pm 0,005$ u) de alguns intermediários), indicando os picos correspondentes com base na m/z nominal de cada íon de interesse.	57
Figura 4-2- Fotodegradação da sulfametazina (25 mg L^{-1}) e os produtos de degradação formados ao decorrer de 6 horas. (a) SMZ e intermediários; (b) Apenas SMZ; (c) Apenas intermediários.	58
Figura 4-3- Fotodegradação da sulfametazina ($0,25 \text{ mg L}^{-1}$) em água e os produtos de degradação formados ao decorrer de 1 hora. (a) SMZ e intermediários; (b) Apenas SMZ; (c) Apenas intermediários.....	66
Figura 4-4- Fotodegradação da sulfametazina ($0,25 \text{ mg L}^{-1}$) em esgoto sintético e os produtos de degradação formados ao decorrer de 1 hora.....	67
Figura 4-5- Rota de degradação proposta para a fotólise da Sulfametazina: * não detectados no presente estudo, mas propostos por García-Galán et al..(5) Novos intermediários.....	68
Figura 4-6- Cromatogramas (íons extraídos) dos intermediários encontrados durante a biodegradação da sulfametazina e suas estruturas propostas obtidas a partir de análises realizadas por LC-QqToF (ESI (+) MS) após 72 horas de exposição ao reator anaeróbico. 1) Metabólito hidroxilado da SMZ; 2) formil-SMZ e 3) conjugação com glicose.....	71
Figura 4-7- Espectro de massas obtido a partir de análises realizadas por LC-QqToF (ESI (+) MS/MS) após 72 horas de exposição ao reator anaeróbico para identificação da estrutura do intermediário de m/z 227.....	72

Figura 4-8-Espectros de massas obtidos a partir de análises realizadas por LC–QqToF (ESI (+) MS/MS) após 72 horas de exposição ao reator anaeróbio para identificação da estrutura do intermediário de m/z 307 (1) e m/z 295 (2).	73
Figura 4-9- Comparação dos cromatogramas (íons extraídos) dos intermediários encontrados. Os picos 4,13 e 19 correspondem à água residuária sem pré-concentração por SPE e os picos 20,32 e 39 da amostra pré-concentrada por SPE.	74
Figura 4-10- Perfil de formação dos produtos oriundos da biodegradação anaeróbia da sulfametazina.	75

Capítulo 5

Figura 5-1- Estruturas químicas de ciprofloxacino e enrofloxacin.	79
Figura 5-2-Cromatograma total de íons (TIC) da solução do ciprofloxacino degradada por 20 min (em colchetes, zoom do cromatograma do íon extraído ($m/z \pm 0,005$ u) de alguns intermediários), indicando os picos correspondentes com base na m/z nominal de cada íon de interesse.	81
Figura 5-3- Fotodegradação do ciprofloxacino (10 mg L^{-1}) e os produtos de degradação formados ao decorrer de 6 horas. (a) CIP e intermediários; (b) Apenas CIP; (c) Apenas intermediários.	82
Figura 5-4- Fotodegradação do ciprofloxacino ($0,10 \text{ mg L}^{-1}$) em água e os produtos de degradação formados ao decorrer de uma hora. (a) CIP e intermediários; (b) Apenas CIP; (c) Apenas intermediários.	88
Figura 5-5- Fotodegradação do ciprofloxacino ($0,10 \text{ mg L}^{-1}$) em esgoto sintético e os produtos de degradação formados ao decorrer de uma hora. (a) CIP e intermediários; (b) Apenas CIP; (c) Apenas intermediários. Fonte: Autoria própria.	89
Figura 5-6- Espectro de massas obtido a partir de análises realizadas por LC–QqToF (ESI (+) MS/MS) para identificação das estruturas dos intermediários de m/z 330. 1: m/z 330 A (8 eV) ; 2: m/z 330 B ($35,5 \text{ eV}$).	90
Figura 5-7- Rota de degradação proposta para a fotólise do ciprofloxacino.	92
Figura 5-8- Estrutura da quinolona.	93
Figura 5-9- Cromatograma total de íons (TIC) da solução do enrofloxacin degradada por 15 min (em colchetes, zoom do cromatograma do íon extraído ($m/z \pm 0,005$ u) de alguns intermediários), indicando os picos correspondentes com base na m/z nominal de cada íon de interesse.	94
Figura 5-10- Fotodegradação do enrofloxacin (10 mg L^{-1}) e os produtos de degradação formados ao decorrer de 6 horas. (a) ENR e intermediários; (b) Apenas ENR; (c) Apenas intermediários.	96
Figura 5-11- Esquema representativo do protocolo avaliado para pré-concentração	97
Figura 5-12- Cromatogramas totais de íons (TIC). 1: Branco- solução degradada do enrofloxacin sem pré-concentração. 2: Amostra pré-concentrada com cartuchos em sequência- Oasis-HLB (A) seguida da Strata-X (B). 3: Amostra pré-concentrada com cartuchos em sequência- Strata-X (B) seguida da Oasis-HLB (A). 4: Amostra pré-concentrada com cartucho preenchido com Oasis HLB (A) + Strata-X (B).	99

Figura 5-13-Fotodegradação do enrofloxacino ($0,10 \text{ mg L}^{-1}$) em água e os produtos de degradação formados ao decorrer de uma hora. (a) ENR e intermediários; (b) Apenas ENR; (c) Apenas intermediários.....	103
Figura 5-14- Fotodegradação do enrofloxacino ($0,10 \text{ mg L}^{-1}$) em esgoto sintético e os produtos de degradação formados ao decorrer de uma hora. (a) ENR e intermediários; (b) Apenas ENR; (c) Apenas intermediários.....	104
Figura 5-15- Espectro de massas obtido para identificação das estruturas dos intermediários de m/z 390. 1: m/z 390 A (20 eV) - LC-QqToF (ESI (+) MS/MS); 2: m/z 390 B (35% CE) – LIT-Orbitrap (HESI (+) MS/MS).....	106
Figura 5- 16- Rota de degradação proposta para a fotólise do enrofloxacino.	108

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1-1- Comparação das características de diferentes analisadores de massa sequenciais	34
--	----

Capítulo 3

Tabela 3-1- Composição do esgoto sintético	43
Tabela 3-2- Fases extratoras utilizadas (continua)	48
Tabela 3-3- Combinações de fases extratoras e eluentes	49

Capítulo 4

Tabela 4- 1-Área normalizada em porcentagem (%) da sulfametazina e dos seus intermediários para cada combinação de sorvente-eluyente.	62
Tabela 4- 2- Recuperação relativa da sulfametazina e intermediários em água ultrapura e esgoto sintético.	64
Tabela 4- 3- Produtos de fotodegradação da sulfametazina e diferenças relativas à molécula intacta.	69

Capítulo 5

Tabela 5-1- Área normalizada em porcentagem (%) do ciprofloxacino e dos seus intermediários para as combinações de fase extratora e solvente.	85
Tabela 5- 2- Recuperação relativa do ciprofloxacino e intermediários em água ultrapura e esgoto sintético.	86
Tabela 5-3- Produtos de fotodegradação do ciprofloxacino e diferenças relativas à molécula intacta.	91
Tabela 5-4- Área normalizada em porcentagem (%) do enrofloxacin e seus intermediários de cada combinação de sorvente-eluyente.....	98
Tabela 5-5- Recuperação relativa do enrofloxacin e intermediários em água e esgoto sintético.....	101
Tabela 5- 6- Produtos de fotodegradação do enrofloxacin e diferenças relativas à molécula intacta.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN- acetonitrila

ATC- *Anatomical Therapeutic Chemical*

CID- dissociação induzida por colisão

CIP- ciprofloxacino

DQO- demanda química de oxigênio

ENR- enrofloxacino

ESI- ionização por *electrospray*

eV- elétron-volt

FDA- *Food and Drug Administration*

FQs- fluoroquinolonas

GC- cromatógrafo a gás ou cromatografia gasosa

HESI- *heated electrospray*

HPLC- cromatografia líquida de alta eficiência

LC- cromatografia líquida

m/z - relação massa/carga

Mapa- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MeOH- metanol

MS- espectrometria de massas

MS/MS- espectrometria de massas sequencial (ou em série)

OMS- Organização Mundial de Saúde

PABA- ácido para-aminobenzóico

QIT- armadilha de íons quadrupolar (*ion trap 3D*)

Q-LIT ou QTRAP- quadrupolo-armadilha linear de íons

QqQ- triplo quadrupolo

Q-ToF- quadrupolo-tempo de voo

SMZ- sulfametazina

SNs- sulfonamidas

SPE- extração em fase sólida

STV- sólidos totais voláteis

t- toneladas

TMP- trimetropim

TIC- cromatograma total de íons (TIC – *Total Ion Chromatogram*)

UASB- *upflow anaerobic sludge blanket* (Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo)

UV- radiação ultravioleta

SUMÁRIO

Introdução Geral	16
Capítulo 1: Contaminação por antimicrobianos e seus produtos de transformação	18
1 Introdução	19
1.1 Sulfonamidas	21
1.2 Fluoroquinolonas	24
1.3 Radiação Ultravioleta (UV) aplicada ao tratamento de efluentes	26
1.4 Preparo de amostras	28
1.4.1 Extração em fase sólida – SPE	28
1.5 Espectrometria de massas e análises de fármacos em amostras ambientais	30
Referências	35
Capítulo 2: Objetivos	39
1 Objetivo Geral	40
1.1 Objetivos Específicos	40
Capítulo 3: Estratégia de análise	41
Parte experimental	42
1 Materiais e Reagentes	42
2 Preparo de Soluções	42
2.2 Soluções dos antimicrobianos em água ultrapura:	42
2.3 Soluções dos antimicrobianos em esgoto sintético:	42
3 Execução da degradação e amostragem	43
4 Degradação biológica	50
5 Softwares	52
6 HPLC-MS/MS	52
6.2 Análise em LC-ESI-QqToF/MS	52
6.3 Análise em LC-Orbitrap/MS	53
Referências	54
Capítulo 4: Sulfametazina	55
Resultados e discussão	56

1 Avaliação dos intermediários formados durante a fotólise da sulfametazina	56
2 Fotólise da sulfametazina em alta concentração	56
3 Triagem para a escolha da melhor combinação de sorvente-eluyente	60
4 Fotólise da sulfametazina em baixa concentração	64
5 Rota de degradação	67
6 Avaliação dos intermediários formados durante biodegradação da sulfametazina em reator anaeróbio....	70
Conclusão	76
Referência	77
Capítulo 5: Fluoroquinolona	78
Resultados e discussão	80
1 Ciprofloxacino	80
1.1 Avaliação dos intermediários formados durante a fotólise do ciprofloxacino	80
1.2 Fotólise do ciprofloxacino em alta concentração	80
1.3 Triagem para a escolha da melhor combinação de sorvente-eluyente.....	83
1.4 Fotólise do ciprofloxacino em baixa concentração	86
1.5 Rota de degradação.....	87
2 Enrofloxacin.....	94
2.1 Avaliação dos intermediários formados durante a fotólise do enrofloxacin	94
2.2 Fotólise do enrofloxacin em alta concentração	95
2.3 Triagem para a escolha da melhor combinação de sorvente-eluyente.....	97
2.4 Fotólise do enrofloxacin em baixa concentração.....	100
2.5 Rota de degradação.....	102
Conclusão	109
Referências	111
Capítulo 6: Conclusão geral e perspectivas	113
Conclusão geral.....	114
Perspectivas.....	115
Anexo 1: Espectros de MS e/ou MS/MS da sulfametazina e dos intermediários.....	117
Anexo 2: Espectros de MS e/ou MS/MS do ciprofloxacino, do enrofloxacin e dos intermediários	127

Espectros de MS e/ou MS/MS do ciprofloxacino e dos intermediários.....	129
Espectros de MS e/ou MS/MS do enrofloxacinó e dos intermediários.....	139

Introdução Geral

Estudam-se atualmente tratamentos alternativos de efluente, que sejam eficientes na remoção de fármacos presentes neste meio, pois, por apresentarem ação biocida e complexas estruturas químicas, esses xenobióticos são refratários ao tratamento convencional de efluente, que consiste na degradação biológica. Assim, esses micropoluentes permanecem e dispersam-se em diferentes ambientes aquáticos.

Substâncias farmacologicamente ativas levantaram grande preocupação nos últimos anos. Medicamentos de uso humano e veterinário são continuamente liberados no ambiente. A quantidade de produtos farmacêuticos e os seus metabolitos bioativos que são introduzidos no meio ambiente é provavelmente baixa. Entretanto, seu contínuo lançamento pode levar a uma alta concentração em longo prazo e promover efeitos adversos contínuos em organismos aquáticos e terrestres. De todos os contaminantes emergentes, os antibióticos causam uma das maiores preocupações por apresentarem potencial para gerar resistência nos microrganismos.

Os antibióticos presentes no meio ambiente provocam o aumento da resistência bacteriana. A resistência bacteriana dificulta o tratamento de doenças, podendo exigir doses mais elevadas do antibiótico, bem como o uso daqueles mais potentes.

A contaminação do efluente doméstico e hospitalar por compostos farmacêuticos deve-se a absorção parcial do fármaco ingerido pelo paciente, eliminando a parcela não absorvida juntamente com os metabólitos e lançando-os no esgoto. Além disso, muitos medicamentos são descartados incorretamente, pelo vaso sanitário por exemplo, quando a sua administração não é mais necessária ou o prazo de validade é extrapolado.

Apesar de vários estudos referentes à degradação de fármacos, poucos são aqueles que reproduzem a real condição em que são encontrados no meio ambiente, em concentrações de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$. Diversos estudos baseiam-se na degradação desses micropoluentes em concentrações mais elevadas que aquelas encontradas no meio ambiente.

Em estudos prévios, a degradação em alta concentração é conveniente na caracterização de intermediários formados. No entanto, a concentração do composto farmacêutico a ser degradado influencia em diversos parâmetros reacionais, alterando a cinética de reação e podendo até resultar em diferentes produtos de degradação. A degradação em baixa concentração gera intermediários de difícil detecção complicando a análise da cinética de reação. Empregando-se técnicas de preparo de amostra, o problema pode ser

contornado pré-concentrando a amostra e removendo-se possíveis interferentes da matriz em que o analito estiver presente.

Nesse âmbito, o seguinte trabalho foi desenvolvido a fim de acompanhar a fotólise de três antimicrobianos (ciprofloxacina, enrofloxacino e sulfametazina) em baixa concentração. Para verificar o perfil da fotólise em baixa concentração, empregou-se a extração em fase sólida (SPE) e análise em sistema de cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas quadrupolo-tempo de voo, usando ionização *electrospray*, LC-ESI-QToF/MS.

Para melhor organização, esta tese foi dividida em seis capítulos compreendendo a descrição da importância do trabalho realizado no contexto atual, além da discussão das estratégias desenvolvidas para a análise dos produtos de transformação obtidos através da fotólise de antimicrobianos e os resultados encontrados.

Capítulo 1

**Contaminação por antimicrobianos e seus produtos
de transformação**

1 Introdução

Uma grande variedade de compostos orgânicos tem sido encontrada em ambientes aquáticos, tais como efluentes provenientes das estações de tratamento de esgotos e águas superficiais. Dentre esses estão compreendidos os compostos ditos emergentes, ou seja, compostos orgânicos sintéticos presentes nos bens de consumo da vida moderna, os quais têm sido foco de grande preocupação, pois podem trazer sérios prejuízos à saúde humana e dos animais. Esses compostos podem ser provenientes da utilização de fertilizantes na agricultura (descartes e lixiviações), do uso de antimicrobianos na criação de animais (excreção pela urina e fezes) e da utilização de inúmeros fármacos e produtos de higiene por seres humanos, gerando esgotos sanitários contaminados.

Nesse contexto, cabe ressaltar que segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), (1) o Brasil é o quinto maior consumidor de medicamentos do mundo. Além disso, de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) a produção de alimentos no país deverá crescer 21,1% nos próximos anos, passando dos atuais 153,26 milhões de toneladas (t) ano para 185,60 milhões (t), um incremento de 35 milhões até 2022, vindo a se tornar o maior produtor de alimentos do mundo. (2) Consequentemente, esses dois setores de grande relevância econômica para o país geram impacto considerável ao ambiente.

Algumas das principais rotas de entrada dessas substâncias no meio ambiente ocorrem por meio do descarte no sistema de esgoto ou no solo (Figura 1-1). (3)

Os produtos farmacêuticos são continuamente lançados ao meio ambiente e possuem uma degradação natural relativamente lenta, sendo assim frequentemente encontrados. (3) Muitos profissionais de saúde recomendam que os medicamentos sejam descartados pela descarga do banheiro. O meio aquático é atingido quando o esgoto é diretamente lançado nos rios, ou quando os resíduos não são completamente eliminados nas estações de tratamento de esgoto.

No Brasil, um recente estudo na bacia do rio Atibaia, região de Campinas, encontrou oito antimicrobianos. A maioria estava presente em concentrações na ordem de ng L^{-1} . No entanto a região com maior atividade antropogênica chegou a apresentar contaminações de 1,3 e 2,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ para dois dos antimicrobianos estudados. (4)

Figura 1-1- Principais vias para a contaminação ambiental por fármacos e efeitos relacionados.

Fonte: Adaptado de HALLING-SORENSEN, B. et. al., 1998.

A presença de resíduos de fármacos e outros compostos xenobióticos na água potável é uma questão de saúde pública, uma vez que pouco se sabe sobre o potencial efeito na saúde associado com o consumo em longo prazo da mistura destes compostos na água. (5)

Os fármacos são substâncias biologicamente ativas, consequentemente eles podem interferir em sistemas biológicos, tais como receptores e enzimas específicas. (6) Os resíduos de produtos farmacêuticos, devido à sua baixa concentração no ambiente, são improváveis de originar efeitos agudos. Entretanto, os crônicos podem ser esperados. (7)

Possíveis efeitos adversos podem ser divididos em três grupos principais. Em primeiro lugar, os produtos farmacêuticos podem exercer toxicidade para os organismos aquáticos. Segundo, os hormônios sintéticos utilizados tanto como medicamentos para humanos quanto usados no crescimento de animais podem interferir na ação dos hormônios naturais. Terceiro, a deposição de antibióticos no ambiente pode induzir a resistência bacteriana. (8)

A ausência de adequados processos de tratamento de água e esgotos, associada à diversidade desses contaminantes, os quais vêm sendo encontrado nos esgotos sanitários e

industriais, motiva o desenvolvimento de novos processos de tratamento que garantam uma eficiência na remoção de poluentes emergentes. Muitos dos contaminantes não são removidos pelos sistemas de tratamento de água convencionais e podem, assim, causar danos irreversíveis à saúde da comunidade aquática e à humana.

Outro importante fator a ser considerado é que durante os processos de tratamento os poluentes ao serem parcialmente degradados geram inúmeros produtos de degradação que podem se tornar moléculas mais tóxicas do que a precursora. Entretanto, os trabalhos que abordam este tópico utilizam concentrações iniciais da molécula principal da ordem de mg L^{-1} , enquanto que os fármacos são encontrados na natureza em concentrações na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} . (9) Sendo assim, é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos que permitam a detecção destes subprodutos gerados nos processos de degradação em baixas concentrações.

O trabalho de revisão publicado por Kümmerer et al. (9) descreve que uma das questões mais importantes nos estudos de degradações de fármacos por fotólises ou por processos oxidativos avançados publicados atualmente é a concentração inicial utilizada. Muitos grupos de pesquisa apontam que o uso das concentrações dos contaminantes com valores superiores aos ambientalmente relevantes é necessário no momento, devido à restrição imposta pelos métodos analíticos atualmente disponíveis. Justificativa obviamente válida, entretanto este fato dificulta a compreensão da real situação que ocorre na natureza.

Os principais fatores que dificultam a análise de produtos de degradação são: a estrutura química dos intermediários ser desconhecida, embora se possa supor que os principais produtos de degradação estejam estruturalmente relacionados à molécula precursora; rara existência de padrão para auxiliar na elucidação da estrutura e o fato dos produtos de degradação estarem presentes em baixas concentrações. (10)

1.1 Sulfonamidas

A produção mundial e o consumo de medicamentos têm aumentado a uma taxa superior à taxa de crescimento da população global. (11) Na terapia de infecções microbianas, o uso de anti-infecciosos tem sido particularmente importante. As sulfonamidas (SNs) pertencem a uma importante classe de anti-infecciosos usada há muito tempo e ainda amplamente prescritas hoje em dia. (11)

O termo sulfonamida é utilizado para referir-se aos derivados da para-amino-benzeno-sulfonamida (sulfanilamida). O grupo p-NH₂ desses compostos é essencial e só pode ser substituído por radicais capazes de serem convertidos *in vivo* em grupos amino livre. Essas substituições possuem efeitos variáveis sobre a atividade antibacteriana da molécula. As sulfonamidas são análogos estruturais e antagonistas competitivos do ácido para-aminobenzóico (PABA) e impedem a sua utilização pelas bactérias na síntese do ácido fólico ou vitamina B9. Mais especificamente, as sulfonamidas são inibidores competitivos da di-hidropteroato-sintetase, a enzima bacteriana responsável pela incorporação do PABA no ácido di-hidropteróico, precursor imediato do ácido fólico. Os microrganismos sensíveis são aqueles que precisam sintetizar seu próprio ácido fólico, as bactérias capazes de utilizar o folato pré-formado não são afetadas. (12)

Os derivados de sulfanilamida têm sido utilizados como drogas antibacterianas na medicina humana e veterinária desde 1940. (13) A fórmula geral das SNs é apresentada na Figura 1-2. Essas são consideradas pela Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) como drogas sintéticas bacteriostáticas para uso sistêmico. (14) Na agricultura as SNs são usadas como agentes antiprotozoários (15) e herbicidas (13), e ao serem complexados com Ag⁺ e Zn⁺² possuem ação antifúngica.

Figura 1-2- Estrutura geral das sulfonamidas.

Fonte: Autoria própria

Dados que demonstrem o consumo de fármacos no Brasil não são facilmente encontrados. Autores de um estudo europeu que avaliou a presença de produtos farmacêuticos em águas superficiais estimam que o consumo de medicamentos usados na medicina humana e na veterinária já alcançou 100.000 toneladas por ano. (16) De acordo com dados norte americanos publicados pelo FDA (Food and Drug Administration) (17), em 2010 foram gastos 28,7 milhões de libras em antibióticos de uso terapêutico e não terapêutico em animais e 7,3 milhões de libras em antibióticos de uso na medicina humana. Em 2009, relatórios desse mesmo departamento relatam que o consumo de sulfonamidas para uso veterinário é estimado em 517.873 kg ano⁻¹.

Um trabalho realizado na Dinamarca apresenta o consumo de sulfonamidas e trimetopim (TMP) de 1990-2009 (Figura 1-3). De acordo com os autores, em meados da década de 90 ocorreu uma diminuição da utilização de SN fato justificado por restrições administrativas relacionadas ao uso destes compostos em ração animal. Entretanto, em 2009, o consumo já se igualou ao de 1994. Nesse mesmo ano, o consumo de SNs e TMP por kg de carne produzida foi de: porcos - 4,82 mg; gado - 17,2 mg; frangos - 0,033 mg e peixes - 58,5 mg. (18) Esses dados ilustram a tendência mundial de consumo de sulfonamidas na pecuária e na medicina humana.

Figura 1-3- Dinâmica do consumo de sulfonamidas e trimetopim na Dinamarca durante os anos 1990-2009.

Fonte: Adaptado de DANMAP, 2009.

A primeira publicação contendo dados quantitativos sobre a presença de SN em águas de rios foi em 1982. (13) A ocorrência de antibióticos no ambiente é um fato preocupante, visto que está relacionada com a prevalência e a geração de microrganismos resistentes às drogas essenciais para saúde humana (Figura 1-4). O uso de antibióticos na medicina veterinária aumenta a resistência de microrganismos às drogas, incluindo a resistência cruzada. (19) As SNs têm causado maior resistência nos microrganismos, quase o dobro das tetraciclínas e muitas vezes maior que outros antibióticos. (20)

Figura 1-4- Os possíveis destinos de resíduos sulfonamidas e genes de resistência (SNsR).

Fonte: Adaptado de BARAN, W. et. al., 2011.

1.2 Fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas (FQs) constituem uma classe de agentes antimicrobianos sintéticos estruturalmente relacionados com o ácido nalidíxico que foram introduzidos no mercado na metade dos anos 1980. São largamente utilizadas na medicina humana e na medicina veterinária. (21) Eles são indicados em tratamentos de infecções no trato urinário, respiratório, gastrointestinal e também em infecções causadas por microrganismos que resistem aos antibióticos mais usuais. (22)

As fluoroquinolonas possuem um átomo de flúor na posição 6 e algumas delas têm um radical piperazina adicional na posição 7 (Figura 1-5). A diferença entre os vários compostos pertencentes à classe das fluoroquinolonas reside em modificações nas posições 1, 5, 7 e 8. Seu amplo espectro de atividade contra as bactérias gram-negativas e também gram-

positivas deve-se ao grupo fluoro e ao anel piperazinil em sua estrutura, que propiciam maior eficiência na penetração da parede bacteriana. (21,23)

Figura 1-5- Relação entre a estrutura e a atividade antibacteriana das fluoroquinolonas.

Fonte: adaptado de: <http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/fw/c762.htm>. Acesso 17/07/2014

O mecanismo de ação das fluoroquinolonas se baseia na inibição da enzima topoisomerase IV de bactérias Gram-positivas. A seletividade para enzimas bacterianas em relação às enzimas correspondentes em células humanas é cerca de 1.000 vezes maior. O alvo das FQs nas bactérias gram-negativas é a topoisomerase II ou DNA-girase, que apresenta as mesmas funções da topoisomerase IV. (24) Quebras transitórias no DNA são causadas pelas DNA-topoisomerasas que mudam o número de ligações no DNA superenrolando, assim ele se torna topologicamente relaxado devido à quebra temporária em uma fita (tipo I) ou em ambas as fitas ao mesmo tempo (tipo II). (24) Topoisomerasas são essenciais para a viabilidade celular em células procarióticas e eucarióticas.

Os fármacos da classe das FQs ocupam a quarta colocação entre os antimicrobianos mais prescritos na medicina humana e são também largamente utilizados na terapia veterinária (25), sendo apenas parcialmente metabolizados no corpo. Assim, uma fração significativa é excretada inalterada ou, em menor grau, como metabólitos, conservando a estrutura quinolônica, derivando da adição de grupos funcionais reativos ou por conjugação covalente a moléculas polares. (26) Além disto, heterocíclicos, como as FQs são apenas parcialmente removidos por estações de tratamento de águas (26). Tais antimicrobianos de

largo espectro estão, portanto, presentes no ambiente e podem ter um efeito seletivo sobre as comunidades microbianas, estimulando assim, a resistência bacteriana, mesmo em concentrações muito baixas. (27)

Um vasto número de FQs (mais de vinte compostos químicos divididos em quatro gerações) tem sido desenvolvido e está comercialmente disponível em todo o mundo, (28) assim, é importante entender os riscos ambientais envolvidos com estes fármacos. Diante do grande interesse dado ao destino ambiental desses compostos, uma série de métodos analíticos está atualmente disponível para monitorar FQs em amostras ambientais (incluindo águas residuais, superficiais, potáveis, lodo, sedimentos etc.) (29–32).

Le-Minh et al. (2010)(33) e Homem e Santos (2011)(34) relataram a ineficiência dos métodos tradicionais de tratamento na remoção de fármacos. Aqueles autores mencionam também a dificuldade no controle dos produtos de degradação, diretamente ligados com as atividades bacterianas, o risco de formação de produtos de degradação que ainda apresentem atividade, mesmo quando o fármaco inicial possui alta taxa de degradação, e a escassez de artigos que mostrem processos de tratamento desses resíduos.

1.3 Radiação Ultravioleta (UV) aplicada ao tratamento de efluentes

O uso da luz UV em tratamentos de efluentes contaminados tem sido amplamente abordado na literatura. Para que ocorra a fotólise direta, o contaminante precisa absorver a radiação incidente e, partindo de um estado excitado, sofrer a degradação. A limitação deste processo ocorre quando a efluente a ser tratado apresenta uma baixa eficiência em fotodissociação causada pela turbidez do meio. (35)

A radiação ultravioleta (UV) compreende a região do espectro eletromagnético entre os comprimentos de onda 100 e 400 nanômetros (nm). Essa região é subdividida em outras quatro, como mostra a Figura 1-6. As regiões do UV-A, UV-B e UV-C são aquelas que podem ser observadas na luz solar e em fontes artificiais de radiação. (36)

A faixa do espectro de UV que apresenta interesse para aplicações da fotólise em água é a UV-C (200-280 nm), onde tanto os poluentes quanto os constituintes da água (matéria orgânica dissolvida e compostos inorgânicos) absorvem a radiação. (36) Logo, as lâmpadas de mercúrio de baixa pressão são mais utilizadas nos fotorreatores, pois têm aproximadamente 85% de sua energia emitida no comprimento de 254 nm. A energia associada à radiação de tal comprimento de onda pode ser utilizada para decompor

diretamente compostos orgânicos ou promover, nos processos fotocatalíticos, a geração de radicais livres que tem alto potencial de oxidação.

Figura 1-6- Espectro eletromagnético (Comprimento de onda de 100 – 780 nm), destaque para a região do UV.

Fonte: Adaptado de <http://www.naturaltec.com.br>, Acesso em 30/08/2014

O estado eletronicamente excitado gerado através da absorção de luz é altamente energético. As reações químicas mais comuns formadas a partir do estado excitado dos compostos estão representadas nas equações abaixo. A quebra homolítica, representada pela Equação 2, é a dominante. (35)

1.4 Preparo de amostras

Devido à complexidade e diversidade das matrizes presente em amostras ambientais, analisar contaminantes orgânicos em nível traço é sempre um desafio. A supressão de sinal é um dos grandes problemas causados pelas matrizes complexas nas análises em LC-MS. Os chamados efeitos de matriz podem ser prejudiciais para importantes parâmetros de um método analítico (limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), linearidade, precisão e exatidão). Ante esse fato, o preparo de amostra se torna uma importante etapa das análises em amostras ambientais. O objetivo do preparo de amostra consiste no isolamento dos compostos de interesse, procurando reduzir ou eliminar os interferentes da matriz para adequação ao sistema de detecção.

Muitos trabalhos apresentam estudos de pré-concentração de fármacos, entretanto, trabalhos que avaliam a pré-concentração de intermediários gerados durante os processos de tratamento são raros.

As técnicas de preparo de amostras têm sido automatizadas, para possibilitar a eliminação de erro humano de manipulação, diminuir o tempo de assistência do analista durante a análise, evitar o risco de contato com substâncias prejudiciais à saúde e aumentar significativamente o número de análises de amostras por tempo. (37)

1.4.1 Extração em fase sólida – SPE

A SPE é uma das técnicas de extração mais empregadas no preparo de amostras (38) e suas inúmeras aplicações somente são possíveis devido à diversidade e versatilidade dos materiais extratores contidos nos dispositivos de extração, permitindo diferentes modos de operação e mecanismos de separação.

Na análise de amostras ambientais a SPE tem sido muito utilizada na extração e pré-concentração de fármacos, pesticidas organoclorados, organofosforados e nitrogenados, clorofenóis, ftalatos, sulfonatos aromáticos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, entre outros analitos. (39)

A técnica de SPE apresenta mecanismos de separação semelhantes aos da cromatografia líquida de baixa pressão. Entre outros formatos, a SPE emprega sorventes recheados em cartuchos ou imobilizados em discos. A eluição da amostra ocorre por gravidade ou pressão com o auxílio de uma seringa ou bomba a vácuo. (37)

O processo de extração em fase sólida pode ser realizado em linha (*online*) ou fora de linha (*offline*). No sistema *offline* a etapa de extração e/ou pré-concentração do analito é realizada separadamente das linhas do sistema cromatográfico. Após o preparo a amostra é introduzida no sistema cromatográfico por meio de um injetor como qualquer outra amostra. Já no sistema *online* a etapa de extração e/ou pré-concentração é realizada em um sistema acoplado ao sistema cromatográfico, onde são inseridos alguns acessórios. (40)

Os diferentes modos de operação na SPE podem ser classificados em: (a) concentração do analito, onde o objetivo principal é passar através do cartucho, um grande volume de amostra, a fim de aprisionar somente o analito; (b) isolamento do analito (*clean-up*), no qual o objetivo é isolar o analito dos interferentes independentemente de alguma pré-concentração dos analitos; (c) isolamento da matriz, onde a intenção é reter os interferentes da matriz e não o analito e (d) estocagem da amostra muito usada para evitar o transporte de grandes volumes de amostras. (40)

As etapas envolvidas na SPE (Figura 1-7) podem ter pequenas variações dependendo do modo de operação, mas basicamente são divididas em: (40)

- Condicionamento do cartucho: ativação do sorvente com solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra, para deixar os sítios ativos disponíveis, sendo que o material contido no cartucho não pode secar. A secagem, em alguns materiais, pode criar vários problemas, como caminhos preferenciais ou inativação, comprometendo a separação.

- Introdução da amostra: dependendo do volume de amostra (μL até L) pode ser feita com pipeta, micropipeta, seringa ou recipientes ou dispositivos para volumes maiores. A transferência da amostra para o cartucho deve ser quantitativa e lenta para ter resultados reprodutíveis.

- Limpeza da coluna: lavagem com solvente para retirar os interferentes, atentando para que o solvente não possua força para retirar o analito.

- Eluição e coleta do analito: ideal eluir com pequeno volume de eluente, de forma que a solução coletada já se encontre em concentração apropriada para a análise.

Os mecanismos de separação usados em SPE são os mesmos da cromatografia líquida: adsorção, partição (fase normal e reversa), troca iônica e exclusão por tamanho (40). Para escolha da fase sólida apropriada, uma grande variedade de sorventes está disponível comercialmente e estes apresentam similaridades aos usados na cromatografia líquida. Os grupos mais frequentemente usados como sorventes a base de sílica podem ser divididos, dependendo do solvente de condicionamento e eluição, nas categorias: *fase reversa* (sorvente

é menos polar que o solvente de eluição); *fase normal*, (solvente é menos polar que o sorvente) e troca iônica (40).

Figura 1-7- Esquema das etapas empregadas na extração em fase sólida.

Fonte: Autoria própria.

1.5 Espectrometria de massas e análises de fármacos em amostras ambientais

Devido à consciência da comunidade científica das consequências da presença de produtos farmacêuticos no meio ambiente, os métodos analíticos para sua determinação em matrizes ambientais complexas estão em constante evolução e o número de métodos descritos na literatura tem crescido consideravelmente. Inicialmente, a maioria dos métodos analíticos relatado na literatura para análise de resíduos de produtos farmacêuticos foram baseados em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) (41), o que muitas vezes requer a derivatização dos compostos. No entanto, nas últimas décadas a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) e a LC-MS/MS (sequencial) têm experimentado um progresso tanto em termos do desenvolvimento da tecnologia como na aplicação. A LC-MS/MS é indicada como a técnica de escolha para analisar os fármacos e seus metabólitos e é especialmente adequada para a análise ambiental por causa da sua detectabilidade. (42)

O acoplamento das técnicas de cromatografia líquida e de espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS ou LC-MS²) surgiu como uma solução para conseguir a seletividade e a detectabilidade necessárias para análise de alguns compostos e tem sido uma técnica instrumental amplamente utilizada na análise quantitativa de poluentes orgânicos.⁽⁴³⁾ A espectrometria de massa sequencial pode ser conseguida em um arranjo onde dois analisadores de massa são utilizados em sequência, separados por uma câmara de colisão capaz de gerar a fragmentação dos íons de interesse. Usualmente, o primeiro analisador isola os íons de interesse formados na fonte. Em seguida eles são fragmentados na câmara intermediária para que no segundo analisador ocorra nova etapa de isolamento. Além desta última forma de análise sequencial, denominada MS/MS no espaço, existe a possibilidade de o processo MS/MS ser executado sequencialmente no tempo. Analisadores denominados como aprisionadores ou armadilhas de íons (*ion traps*) podem sequencialmente no tempo: isolar, fragmentar e promover a varredura espectral dos fragmentos formados, inclusive em sucessivas etapas, denominadas MSⁿ.

Diferentes tipos de instrumentos possuem a capacidade de MS/MS (sequencial no espaço ou no tempo). Dentre eles temos: triplo quadrupolos (QqQ); quadrupolo-tempo de voo (Q-ToF); armadilha de íons quadrupolar (QIT – *ion trap 3D*); quadrupolo-armadilha linear de íons (Q-LIT (*ion trap 2D*)) e LIT-Orbitrap.

Os analisadores do tipo triplo quadrupolo possuem a seguinte configuração: primeiro quadrupolo (Q1), uma cela de colisão (q2) e o terceiro quadrupolo (Q3). É possível operar esse equipamento em quatro modos com dissociação induzida por colisão (*Collision Induced Dissociation* – CID). São eles: varredura do íon produto (*product ion scan*) – um íon precursor com uma dada razão m/z é selecionado e determinam-se todos os íons produtos resultantes da dissociação; varredura do íon precursor (*precursor ion scan*) – o íon produto é escolhido para determinar seu íon precursor. O íon produto é isolado no terceiro quadrupolo, enquanto o íon de razão m/z do precursor é rastreado pelo primeiro quadrupolo. Com isso, todos os íons precursores que produzam íons daquela razão m/z do produto serão detectados; varredura de perda neutra (*neutral loss*) – todas as reações que levariam à perda de um determinado fragmento neutro com massa (m) são detectadas. Os dois analisadores devem manter uma diferença de m/z constante entre eles (m/z Q1 subtraída de m/z Q3 igual à m (perda neutra) de interesse) e proceder à varredura concomitantemente; e por último, monitoramento de reações selecionadas (*Selected Reaction Monitoring* – SRM) – uma reação de fragmentação é selecionada. As razões m/z selecionadas são isoladas tanto no primeiro

quanto no segundo analisador não ocorrendo varredura, com isso ocorre um aumento da detectabilidade para o monitoramento selecionado. (44)

Nos analisadores do tipo tempo de voo, em um túnel de voo de 1 a 2 m de comprimento sem campo magnético ocorre a separação de íons com a mesma energia cinética, mas com m/z diferentes. A configuração desses instrumentos pode ser do tipo ToF simples ou como sistemas híbridos onde o analisador quadrupolo está em série com um tempo de voo (QToF). Neste sistema híbrido, para análises no modo de espectrometria de massas em série (MS/MS) com varredura dos íons produtos os íons são direcionados ortogonalmente da região quadrupolo (após o processo eventual de fragmentação) ao tempo de voo, através de um acelerador. (45,46) Esses analisadores oferecem informações espectrais completas com resolução de média à alta, medida de m/z com bom grau de exatidão (*degree of accuracy*) e o modo de varredura total possibilita uma boa sensibilidade. Nos analisadores de massas do tipo ToF, ou nos sistemas híbridos do tipo QToF é possível analisar, por meio de medição precisa de razão m/z , a composição elementar dos compostos avaliados. Com isso permite idealmente a quantificação e a confirmação inequívocas dos analitos, bem como a triagem e quantificação relativa de compostos desconhecidos ou produtos de degradação.

O analisador do tipo *Ion Trap* quadrupolar (QIT) é um sistema composto por uma armadilha ou aprisionador de íons. Ele é composto por três eletrodos, dois deles possuem formato hiperbólico e são isolados nas pontas e no meio destes se encontra um terceiro que apresenta forma de anel. Um campo elétrico capaz de confinar ou desestabilizar seletivamente os íons é gerado devido à diferença de potencial oscilante aplicada entre o anel e os eletrodos hiperbólicos. (47) É possível realizar fragmentações em múltiplos estágios (MS^n) com esse tipo de analisador. Todas as fragmentações ocorrem em um mesmo local, porém em tempos diferentes. Com isso apresenta melhor sensibilidade na varredura que os QqQ, porém não é capaz de realizar aquisições nos modos de varredura de íons precursores e de varredura de perda neutra. (47,48) Para análise de matrizes mais complexas, estes instrumentos podem apresentar uma menor robustez, baixa repetibilidade e faixa dinâmica muito estreita para a quantificação. (49)

O quadrupolo-*Ion-Trap* linear (Q-LIT) apresenta uma configuração semelhante ao QqQ. O Q3 pode operar tanto como uma armadilha de íons com ejeção axial de íons, quanto como um filtro de massas convencional. (50) Várias vantagens encontradas no QqQ e no QIT se agrupam no Q-LIT. Sem que ocorra a perda de desempenho em relação a seus precursores, é possível que se opere em modos similares aos do QqQ. Além disso, existe a possibilidade de acumular os íons para realizar análises de caracterização estrutural por meio de

fragmentações múltiplas. Os íons produtos também podem ser acumulados no LIT, possibilitando uma varredura melhorada de íons produtos com maior sensibilidade. Com essas características, este instrumento se torna uma ferramenta bastante interessante para análises onde se deseja quantificar e confirmar a identidade de compostos que possuem padrões de fragmentação pobres. (48)

Os analisadores Orbitrap possuem um dispositivo de captura de íons que consiste de um eletrodo externo do tipo barril e um eletrodo interno coaxial fusiforme, os quais formam um campo eletrostático onde os íons são injetados de maneira tangencial. A frequência das oscilações harmônicas dos íons presos em órbita ao longo do eixo do campo eletrostático é independente da velocidade do íon, porém inversamente proporcional à raiz quadrada da m/z , de modo que a armadilha pode ser operada como um analisador de massas, utilizando a detecção da imagem da corrente e a transformada de Fourier do sinal no domínio do tempo. O acoplamento do quadrupolo ao orbitrap (lançado pela Thermo Scientific com o nome de Q-Exactive) reuniu a seleção inicial dos íons por um quadrupolo e a alta resolução e massa exata (HR/AM) do analisador de massas Orbitrap. (51) O quadrupolo integrado permite a seleção de íons precursores. A fragmentação MS/MS ocorre por dissociação induzida por colisão na cela de alta energia (HCD), antes da detecção no Orbitrap HR/AM. O processamento avançado do sinal aumenta o poder de resolução do sistema para 140.000 FWHM no modo *full-scan*, com velocidade máxima de varredura. Esta combinação de características proporciona alto nível de confiabilidade em análises quantitativa e qualitativa simultâneas. Essa tecnologia torna o espectrômetro de massa Q-Exactive capaz de identificar, quantificar e confirmar um número maior de metabólitos em nível de traços, contaminantes, peptídeos e proteínas em misturas complexas (51). Além da configuração Q-Orbitrap existem vários outros arranjos, sendo também bastante comum a combinação LIT-Orbitrap (denominada comercialmente LTQ Orbitrap).

A Tabela 1-1 apresenta uma comparação das características de diferentes analisadores de massa sequenciais.

Tabela 1-1- Comparação das características de diferentes analisadores de massa sequenciais.

	QqQ	QIT	Q-LIT	Q-TOF	LIT-Orbitrap
Intervalo de massa	++	+++	++/+++	+++	++++
Poder de resolução	+	++	++	++/+++	+++
Faixa dinâmica	++++	+++	+++	++/+++	+++/++++
Precisão de Massas	+	+	+	++++	++++
Taxa de aquisição de dados (por cromatografia rápida)	+ /++++ (dependendo do modo de varredura)	+ /++	++/++++ (dependendo do modo de varredura)	+++	+ /++
Custo	++/+++	++	+++	+++	+++/++++
Vantagens	<ul style="list-style-type: none"> ● Elevada seletividade e sensibilidade no modo SRM 	<ul style="list-style-type: none"> ● Moderada a alta sensibilidade em modo full-scan ● Moderada sensibilidade no modo SIR ● Múltiplos estágios MSⁿ ● Tamanho compacto 	<ul style="list-style-type: none"> ● Elevada seletividade e sensibilidade no modo SRM ● Moderada a alta sensibilidade em modo full-scan ● Capacidade MS⁵ ● Maior capacidade de estocagem de íons que o QIT 	<ul style="list-style-type: none"> ● Alta sensibilidade em modo full-scan 	<ul style="list-style-type: none"> ● Moderada a alta sensibilidade em modo full-scan ● Múltiplos estágios MSⁿ ● Grande capacidade para cargas espaciais
Limitações	<ul style="list-style-type: none"> ● Baixa sensibilidade em modo full-scan 	<ul style="list-style-type: none"> ● Capacidade limitada de estocagem de íons 	<ul style="list-style-type: none"> ● Baixa precisão em massa nominal 	<ul style="list-style-type: none"> ● Menor sensibilidade em análises quantitativas que o QqQ 	<ul style="list-style-type: none"> ● Não é totalmente compatível ao UHPLC quando em alta resolução

+: Baixo; ++: Moderada; +++: Alta; ++++: Muito alta.

Fonte: Adaptado de FARRÉ, M. et al., 2012.

Referências

- 1 Organização Mundial de Saúde (OMS). Disponível em: <http://www.ofluminense.com.br/editorias/ciencia-e-saude/brasil-e-o-quinto-maior-consumidor-de-medicamento-do-mundo>. Acesso em: 12-07-2013.
- 2 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), 2012. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/noticias/arquivos/2012/03/07/producao-de-alimentos-deve-crescer-21-1-ate-2022-segundo-mapa>. Acesso em: 20-07-2013.
- 3 HALLING-SORENSEN, B., NORS NIELSEN, S. , LANZKY, P. F., INGERSLEV, F. , HOLTEN LIITZHOFL , H.C., JORGENSEN, S.E.; SECTION OCCURRENCE, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment- A Review. **Chemosphere**, v. 36, n. 2, p. 357–393, 1998.
- 4 LOCATELLI, M.A.F.; SODRÉ, F.F.; JARDIM, W.F. Determination of antibiotics in Brazilian surface waters using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 60, n. 3, p. 385–93, 2011.
- 5 STACKELBERG, P.E.; FURLONG, E.T.; MEYER, M.T.; ZAUGG, S.D.; HENDERSON, A.K.; REISSMAN, D.B. Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. **The Science of the total environment**, v. 329, n. 1-3, p. 99–113, 2004.
- 6 OUR, I.; CARSON, R.; SPRING, S.; NIELSEN, O. Drugs in the environment 1. v. 40, p. 691–699, 2000.
- 7 RADJENOVIĆ, J.; PETROVIĆ, M.; BARCELÓ, D. Advanced mass spectrometric methods applied to the study of fate and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 1132–1144, 2007.
- 8 HUBER, M.M.; GÖBEL, A.; JOSS, A.; HERMANN, N.; LÖFFLER, D.; MCARDELL, C.S.; RIED, A.; SIEGRIST, H.; TERNES, T. A; GUNTEN, U. V. Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewater effluents: a pilot study. **Environmental science & technology**, v. 39, n. 11, p. 4290–9, 2005.
- 9 FATTA-KASSINOS, D.; VASQUEZ, M.I.; KÜMMERER, K. Transformation products of pharmaceuticals in surface waters and wastewater formed during photolysis and advanced oxidation processes - degradation, elucidation of byproducts and assessment of their biological potency. **Chemosphere**, v. 85, n. 5, p. 693–709, 2011.
- 10 WITTE, B. DE; LANGENHOVE, H. VAN; DEMEESTERE, K.; DEWULF, J. Advanced Oxidation of Pharmaceuticals: Chemical Analysis and Biological Assessment of Degradation Products. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 41, n. 3, p. 215–242, 2011.
- 11 BARAN, W.; ADAMEK, E.; ZIEMIAŃSKA, J.; SOBCZAK, A. Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. **Journal of hazardous materials**, v. 196, p. 1–15, 2011.
- 12 LAURENCE L. B., BRUCE A. C., BJÖRN C. K. As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman. **McGraw Hill Brasil**, p. 2112, 2012

- 13 SMITH, A. E.; MILWARD, L. J. Thin-layer chromatographic detection of the herbicide asulam in soils and the identification of sulphanilamide as a minor soil degradation product. **Journal of Chromatography A**, v. 265, p. 378–381, 1983.
- 14 WHO, Anatomical Therapeutic Chemical classification index. Disponível em: <http://www.who.int/entity/classifications/atcddd/en/>. Acesso em: 10-07-2013.
- 15 DUBEY, J.P.; DUBEY, J. Review of Neospora caninum and neosporosis in animals. **The Korean journal of parasitology**, v. 41, n. 1, p. 1–16, 2003.
- 16 KAMPA, E.; VIDAURRE, R.; LAASER, C.; POLICY, E.E. State-of-art review of policy instruments to limit the discharge of pharmaceutical products into European waters in "Knowledge and Need Assessment on Pharmaceutical Products in Environmental Waters". **KNAPPE**, D3.1, 2008.
- 17 SUMMARY REPORT on Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food- Producing Animals. **Food and Drug Administration Department of Health and Human Services**, 2009.
- 18 VIRGILI, U.R.I.; OF, T.; WASTEWATER, B.; Oxidation, T.M. **DOCTORAL THESIS Xavier Bernat Camí Treatment of biorefractory wastewater through**. 2010.
- 19 SARMAH, A.K.; MEYER, M.T.; BOXALL, A.B. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. **Chemosphere**, v. 65, n. 5, p. 725–59, 2006.
- 20 LANZ, R.; KUHNERT, P.; BOERLIN, P. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical Escherichia coli from different animal species in Switzerland. **Veterinary microbiology**, v. 91, n. 1, p. 73–84, 2003.
- 21 PUPO, M.T.; GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.
- 22 PATRICK, G.L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 1995.
- 23 SPELTINI, A.; STURINI, M.; MARASCHI, F.; PROFUMO, A. Fluoroquinolone antibiotics in environmental waters: sample preparation and determination. **Journal of separation science**, v. 33, n. 8, p. 1115–31, 2010.
- 24 DRLICA, K.; MALIK, M.; KERNS, R.J.; ZHAO, X. Quinolone-mediated bacterial death. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 385–92, 2008.
- 25 KHETAN, S.K.; COLLINS, T.J. Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to Green Chemistry. **Chemical reviews**, v. 107, n. 6, p. 2319–64, 2007.
- 26 WATKINSON, A J.; MURBY, E.J.; COSTANZO, S.D. Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: implications for environmental discharge and wastewater recycling. **Water research**, v. 41, n. 18, p. 4164–76, 2007.
- 27 ADAM, H.J.; SCHUREK, K.N.; NICHOL, K. A; HOBAN, C.J.; BAUDRY, T.J.; LAING, N.M.; HOBAN, D.J.; ZHANEL, G.G. Molecular characterization of increasing fluoroquinolone resistance in Streptococcus pneumoniae isolates in Canada, 1997 to 2005. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 198–207, 2007.

- 28 MARTINEZ, M.; MCDERMOTT, P.; WALKER, R. Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 172, n. 1, p. 10–28, 2006.
- 29 KOSJEK, T.; HEATH, E.; PETROVIĆ, M.; BARCELÓ, D. Mass spectrometry for identifying pharmaceutical biotransformation products in the environment. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 1076–1085, 2007.
- 30 HERNÁNDEZ, F.; SANCHÓ, J. V.; IBÁÑEZ, M.; GUERRERO, C. Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 466–485, 2007.
- 31 XIAO, Y.; CHANG, H.; JIA, A.; HU, J. Trace analysis of quinolone and fluoroquinolone antibiotics from wastewaters by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1214, n. 1-2, p. 100–8, 2008.
- 32 JIA, A.; WAN, Y.; XIAO, Y.; HU, J. Occurrence and fate of quinolone and fluoroquinolone antibiotics in a municipal sewage treatment plant. **Water research**, v. 46, n. 2, p. 387–94, 2012.
- 33 LE-MINH, N.; KHAN, S.J.; DREWES, J.E.; STUETZ, R.M. Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes. **Water research**, v. 44, n. 15, p. 4295–323, 2010.
- 34 HOMEM, V.; SANTOS, L. Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices--a review. **Journal of environmental management**, v. 92, n. 10, p. 2304–47, 2011.
- 35 STEFAN, M.I. UV photolysis: background. In: S Parsons (Ed.); **Advanced Oxidation Processes for Water and Wastewater Treatment**. IWA, 2004, p. 356.
- 36 PHILLIPS, R. **Sources and applications of ultraviolet radiation**. New York: Academic Press, 1983.434p.
- 37 QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68–76, 2001.
- 38 HENNION, M.C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. **Journal of chromatography. A**, v. 856, n. 1-2, p. 3–54, 1999.
- 39 WEIGEL, S.; BESTER, K.; HÜHNERFUSS, H. New method for rapid solid-phase extraction of large-volume water samples and its application to non-target screening of North Sea water for organic contaminants by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 912, n. 1, p. 151–61, 2001.
- 40 LANÇAS, F.M. **Extração em Fase sólida (SPE)**. São Carlos: 2004.96p.
- 41 TERNES, T.A. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, n. 8, p. 419–434, 2001.
- 42 FARRÉ, M.; KANTIANI, L.; PETROVIC, M.; PÉREZ, S.; BARCELÓ, D. Achievements and future trends in the analysis of emerging organic contaminants in environmental samples by mass spectrometry and bioanalytical techniques. **Journal of chromatography. A**, v. 1259, p. 86–99, 2012.

- 43 SMYTH, W.F. Electrospray ionisation mass spectrometric behaviour of selected drugs and their metabolites. **Analytica Chimica Acta**, v. 492, n. 1-2, p. 1–16, 2003.
- 44 [Http://www.espectrometriademassas.com.br/capitulos/assuntos/assunto.asp?codcapitulo=8&codassunto=63&numero=9](http://www.espectrometriademassas.com.br/capitulos/assuntos/assunto.asp?codcapitulo=8&codassunto=63&numero=9) http 1. Acesso em: 25-08-2014
- 45 GUILHAUS, M.; SELBY, D.; MLYNSKI, V. Orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry. **Mass spectrometry reviews**, v. 19, n. 2, p. 65–107, 2000.
- 46 CHERNUSHEVICH, I. V; LOBODA, A V; THOMSON, B. A. An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. **Journal of mass spectrometry : JMS**, v. 36, n. 8, p. 849–65, 2001.
- 47 PICÓ, Y.; BLASCO, C.; FONT, G. Environmental and food applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: an overview. **Mass spectrometry reviews**, v. 23, n. 1, p. 45–85, 2004.
- 48 HAGER, J.W.; BLANC, J.C.Y. Le High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with a new quadrupole/linear ion trap instrument. **Journal of Chromatography A**, v. 1020, n. 1, p. 3–9, 2003.
- 49 SOLER, C.; HAMILTON, B.; FUREY, A.; JAMES, K.J.; MAN, J.; PICO, Y. Comparison of four mass analyzers for determining carbosulfan and its metabolites in citrus by liquid chromatography / mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, v.20 p. 2151–2164, 2006.
- 50 HAGER, J.W.; YVES LE BLANC, J.C. Product ion scanning using a Q-q-Q linear ion trap (Q TRAP) mass spectrometer. **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, v. 17, n. 10, p. 1056–64, 2003.
- 51 Novo espectrômetro de massa Q-Exactive Quadrupolo-Orbitrap. **Analytica**, v. 9 n. 53, p. 28, 2011.

Capítulo 2

Objetivos

Objetivos

1 Objetivo Geral

Degradar através da fotólise os antimicrobianos sulfametazina, ciprofloxacino e enrofloxacino, separar cromatograficamente e identificar os principais produtos de degradação, e desenvolver método para a pré-concentração e monitoramento dos produtos de degradação obtidos ao longo dos processos de degradação, em diferentes concentrações.

1.1 Objetivos Específicos

- (1) Fotólise dos antimicrobianos em alta concentração em meio aquoso.
- (2) Desenvolvimento de método cromatográfico por HPLC para análise dos produtos das degradações dos antimicrobianos.
- (3) Identificação dos produtos de degradação por MS/MS.
- (4) Desenvolvimento de métodos de SPE, testando-se diferentes sorventes e condições de eluição dos produtos de degradação.
- (5) Quantificação da recuperação dos analitos ante os sorventes e as condições de eluição, utilizando-se HPLC.
- (6) Desenvolvimento de um método por SPE em comum para diferentes analitos.
- (7) Avaliação da fotólise dos antimicrobianos em baixa concentração em meio aquoso e em esgoto sintético.

Capítulo 3

Estratégia de análise

Neste capítulo será apresentada a estratégia utilizada para realizar as análises, os experimentos, bem como os materiais e equipamentos utilizados.

Parte experimental

1 Materiais e Reagentes

Os padrões analíticos da sulfametazina (SMZ) ($\geq 99\%$), trimetropim (TRI) ($\geq 99\%$), ciprofloxacino (CIP) ($\geq 98\%$) e de enrofloxacino (ENRO) ($\geq 99\%$) foram adquiridos da Sigma–Aldrich. A água utilizada foi purificada pela estação Milli-Q da Millipore. Os solventes orgânicos metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) (grau HPLC) e o ácido fórmico (96%) foram adquiridos da Tedia.

Os cartuchos extratores Strata X e Strata XA foram adquiridos da Phenomenex; os cartuchos Chromabond HR-X e Chromabond HR-XA foram adquiridos da Macherey-Nagel e os Oasis HLB da Waters. Os *frits* de SPE e os cartuchos de SPE vazios de 6 mL, para confecção de novos cartuchos, com 100 mg de fase extratora, foram adquiridos da Supelco.

2 Preparo de Soluções

2.2 Soluções dos antimicrobianos em água ultrapura:

Para as degradações em concentração elevada foram preparadas soluções dos antimicrobianos em água ultrapura a 25 mg L^{-1} para SMZ e 10 mg L^{-1} para os demais antimicrobianos estudados.

Nas degradações em baixa concentração, a partir de soluções estoques em água ultrapura as soluções de $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ para SMZ e $0,10 \text{ mg L}^{-1}$ para os demais antimicrobianos foram preparadas por diluição em água ultrapura. Todas as soluções foram preparadas momentos antes de iniciar as degradações.

2.3 Soluções dos antimicrobianos em esgoto sintético:

O esgoto sintético utilizado para simular as condições de um esgoto real doméstico foi preparado como descrito por Torres (1) e a sua composição está descrita na Tabela 3-1.

Tabela 3-1– Composição do esgoto sintético.

Composição	Quantidade para 1 L
Sacarose	35,0 mg
Amido	114,0 mg
Extrato de carne	208,0 mg
Óleo de soja	51,0 mg
NaCl	250,0 mg
MgCl ₂ .6H ₂ O	7,0 mg
CaCl ₂ .2H ₂ O	4,5 mg
NaHCO ₃	200,0 mg
Detergente	3 gotas

Fonte: TORRES, P., 1992.

Nas degradações dos antimicrobianos realizadas em esgoto sintético, as soluções na concentração de 0,25 mg L⁻¹ para SMZ e 0,10 mg L⁻¹ para os demais antimicrobianos foram preparadas pela diluição das soluções estoque em esgoto sintético. Todas as soluções foram preparadas momentos antes de iniciar as degradações.

3 Execução da degradação e amostragem

A radiação ultravioleta (UV) é amplamente utilizada para desinfecção de água potável devido à sua eficácia contra uma vasta gama de agentes patogênicos. A luz UV também pode promover a degradação de compostos orgânicos fotolábeis por fotólise direta devido ao potencial deles em absorver tal radiação. (2)

Com o objetivo de avaliar a formação de produtos de degradação gerados durante a fotólise dos antimicrobianos, foram realizados experimentos em um reator, com capacidade de 250 mL acoplado a um sistema de recirculação (a temperatura foi mantida a 25°C) utilizando uma lâmpada UV-C de 9 W (Figura 3-1). A lâmpada utilizada no presente trabalho foi caracterizada utilizando-se um espectralímetro da Luzchem, SPR-01-235-850 nm. As degradações foram efetuadas em soluções preparadas em meio aquoso e em esgoto sintético. Alíquotas foram retiradas em tempos pré-determinados. Tomou-se o cuidado de não retirar alíquotas totalizando um volume maior do que 10% da capacidade máxima do reator.

Figura 3-1- Reator Acoplado ao Sistema de Recirculação.

Fonte: Autoria própria.

A estratégia adotada para a avaliação da pré-concentração dos intermediários formados durante a fotólise dos antimicrobianos seguiu as seguintes etapas (Figura 3-2):

1. Avaliação dos fotoprodutos formados durante a fotólise dos antimicrobianos na concentração de 25 mg L⁻¹ para SMZ e 10 mg L⁻¹ para os demais;
2. Triagem para a escolha da melhor combinação de fase extratora e solvente utilizados na pré-concentração e eluição dos intermediários gerados em baixa concentração;
3. Diluição da amostra coletada durante o processo realizado na etapa 1, aplicando um fator de diluição de 1:100 e posterior pré-concentração na fase

extratora selecionada na etapa 2. Esta etapa foi realizada tanto em água Milli-Q quanto em esgoto sintético;

4. Avaliação dos intermediários formados durante a fotólise dos antimicrobianos na concentração de $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ para SMZ e $0,10 \text{ mg L}^{-1}$ para os demais antimicrobianos, utilizando a fase extratora selecionada na etapa 2. Esta etapa foi realizada tanto em água Milli-Q quanto em esgoto sintético;

Descrições do método aplicado em cada etapa:

Etapla 1:

Realizou-se a degradação dos antimicrobianos em concentração de 25 mg L^{-1} para SMZ e 10 mg L^{-1} para os demais antimicrobianos para a avaliação dos intermediários formados durante a fotólise. As degradações foram realizadas até ser observado o decaimento da área do pico cromatográfico relativo ao fármaco e o aparecimento dos intermediários formados.

Etapla 2:

Após a determinação do tempo de degradação na qual havia a formação e presença do maior número de intermediários, procedeu-se a avaliação da pré-concentração utilizando cartuchos preenchidos com 100 mg das seguintes fases extratoras: Strata X, Strata XA, Chromabond HR-X, Chromabond HR-XA e o Oasis HLB¹ (Tabela 3-2). Para eluição foram avaliados os seguintes solventes: ACN; ACN 5% H_3PO_4 ; ACN 5% NH_4OH ; MeOH; MeOH 5% H_3PO_4 e MeOH 5% NH_4OH . As fases extratoras e os solventes avaliados foram combinados conforme representado na Tabela 3-3. A pré-concentração foi realizada conforme o esquema representado na Figura 3-3. Utilizou-se uma amostra única de 1 litro degradada no tempo de degradação de maior formação de intermediários, a partir de onde alíquotas de 25 mL foram retiradas e pré-concentradas em cada fase extratoras. Quando necessário, para obter uma amostra com a maior diversidade de produtos de transformação possível, mais de um tempo de degradação foi escolhido. Nesta situação, as amostras foram degradadas e depois unidas para formar uma amostra única que continha todos os intermediários previamente identificados na etapa 1.

¹ Esses cartuchos foram pré-selecionados com base na experiência do próprio laboratório no desenvolvimento de métodos para a análise de antibióticos em geral, onde diversos cartuchos sugeridos ou mencionados na literatura foram avaliados.

Figura 3-2- Esquema representativo de cada etapa realizada (Continua)**ETAPA 1:**

FOTÓLISE (UV-C DE 9W)
- ANTIMICROBIANO EM ÁGUA Milli-Q

OBS: ETAPA REALIZADA EM TRIPLICATA

ETAPA 2

FOTÓLISE (UV-C DE 9W)
-ANTIMICROBIANO
EM ÁGUA Milli-Q

ELUIÇÃO:

ACN
ACN 5% H ₃ PO ₄
ACN 5% NH ₄ OH
MeOH
MeOH 5% H ₃ PO ₄
MeOH 5% NH ₄ OH

1. SECAGEM
2. RESSUSPENSÃO
3. FILTRADA (0,22 µm)

LC MS/MS

Figura 3-2- Esquema representativo de cada etapa realizada (Conclusão).

Fonte: Autoria própria.

Etapa 3:

Para a avaliação dos intermediários em baixas concentrações aplicou-se um fator de diluição de 1:100 partindo de amostras coletadas na degradação em concentração elevada (Etapa1) e realizou a pré-concentração conforme descrito na etapa 2 utilizando a fase extratora e o solvente selecionados; e tendo-se a amostra não diluída como referência para uma eficiência de 100%. Esta etapa foi realizada tanto em água ultrapura quanto em esgoto sintético. As amostras de esgoto sintético foram previamente filtradas em membranas hidrofílica de 3,0 μm (Millipore) e então submetidas à pré-concentração.

Etapa 4:

Procedeu-se a degradação dos antimicrobianos em concentração de 0,25 mg L^{-1} para SMZ e 0,10 mg L^{-1} para os demais antimicrobianos. Amostras de 100 mL foram coletadas nos tempos 0, 5, 15, 30 min, e 1 h e pré-concentradas conforme descrito na etapa 2 utilizando a fase extratora e o solvente selecionados. Esta etapa foi realizada tanto em água ultrapura quanto em esgoto sintético. As amostras de esgoto sintético foram previamente filtradas em membrana hidrofílica de 3,0 μm (Millipore) e então submetidas à pré-concentração.

Tabela 3-2- Fases extratoras utilizadas (continua)

Fase extratora	Estrutura	Tamanho da partícula (μm)	Características
Waters Oasis HLB		60	-Fase polimérica universal de fase reversa. -Alvo: Analitos ácidos, básicos e neutros.
Macherey-Nagel Chromabond HR-X		45 – 85	-Copolímero hidrofóbico de poliestireno-divinilbenzeno -Área Superficial (1000 m^2/g) -Estável - pH 1-14 -Alvo: Analitos neutros, ácidos e básicos.

Tabela 3-2- Fases extradoras utilizadas (conclusão).

Macherey-Nagel Chromabond HR-XA		45 – 85	-Copolímero hidrofóbico de poliestireno-divinilbenzeno funcionalizado com amônio quaternário de troca aniônica - pKa ~ 18 -Área Superficial (850 m ² /g) -Alvo: ácidos fenólicos, herbicidas ácidos e ácidos fracos / médio com pKa 2-8
Phenomenex Strata-X		~ 33	- Fase polimérica. -Área Superficial (800 m ² /g) - pKa N/A -Alvo: Analitos neutros e aromáticos.
Phenomenex Strata-XA		~ 33	-Fase polimérica funcionalizada de troca aniônica. -Área Superficial (800 m ² /g) - pKa ~14 -Alvo: Analitos ácidos fracos

Fonte: Dados coletados dos fabricantes das fases extradoras, Waters, Macherey-Nagel e Phenomenex.

Tabela 3-3- Combinações de fases extradoras e eluentes.

Fase extradora Eluente		A	B	C	D	E
		Oasis HLB	Strata-X	Strata-XA	Chromabond HR-X	Chromabond HR-XA
1	ACN	A1	B1	C1	D1	E1
2	ACN 5% H ₃ PO ₄	A2	B2	C2	D2	E2
3	ACN 5% NH ₄ OH	A3	B3	C3	D3	E3
4	MeOH	A4	B4	C4	D4	E4
5	MeOH 5% H ₃ PO ₄	A5	B5	C5	D5	E5
6	MeOH 5% NH ₄ OH	A6	B6	C6	D6	E6

Fonte: Autoria própria

Figura 3-3- Protocolo utilizado na pré-concentração.

Fonte: Autoria própria.

4 Degradação biológica

Com o objetivo de avaliar os produtos de degradação formados pelo reator anaeróbio durante a biodegradação do antimicrobiano sulfametazina (SMZ) foram realizadas análises utilizando a fase extratora e os solventes selecionados no item 3 Etapa 2 (descritos acima) no preparo das amostras. Este experimento foi importante para avaliar a aplicabilidade da estratégia desenvolvida para análises de intermediários em amostras complexas.

Os ensaios de biodegradação de sulfametazina foram realizados em reatores de

polietileno de 500 mL operados em batelada, contendo 400 mL de volume reacional. Os reatores foram inoculados com lodo anaeróbio granular proveniente de um reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo - UASB (*upflow anaerobic sludge blanket*) empregado no tratamento de água residuária de um abatedouro de aves. O inóculo foi adicionado para uma concentração final de biomassa de 5 g STV L^{-1} , mantida constante em todos os experimentos.

Os reatores foram alimentados com água residuária sintética complexa simulando efluente de suinocultura (apresentando uma demanda química de oxigênio (DQO) dissolvida de 1500 mg L^{-1}), fortificada com concentrações iniciais de sulfametazina de 5 mg L^{-1} e 1 mg L^{-1} . Após 48 horas de reação, sacarose em estado sólido foi adicionada aos reatores em concentração correspondente a uma DQO de 1000 mg L^{-1} , com o objetivo de promover a manutenção da atividade microbiana, visto que após esse tempo reacional a maioria dos constituintes orgânicos presentes inicialmente já haviam sido degradados (monitoramento feito por análises de DQO, conforme abaixo).

Os reatores foram mantidos em mesa de agitação orbital a 145 rpm e temperatura constante de 30°C por meio de câmara de controle de temperatura. Os ensaios de biodegradação duraram 72 horas. Alíquotas do meio reacional foram retiradas em intervalos de tempo relevantes para obtenção do perfil temporal de remoção de DQO. As amostras foram filtradas em membrana de fibra de vidro de $1,2 \mu\text{m}$ e analisadas segundo o Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005).

Um experimento controle, em que não foi adicionado o fármaco, foi realizado nas mesmas condições. Essa parte do experimento foi realizada no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) do Departamento de Hidráulica e Saneamento (SHS) da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) em parceria com o aluno de doutorado Guilherme Henrique Duarte de Oliveira, orientado pelo Prof. Dr. Marcelo Zaiat.

As amostras foram analisadas seguindo a seguinte estratégia:

- 1- Análises da água residuária sem preparo de amostras, apenas uma filtração a vácuo;
- 2- Pré-concentração da água residuária por SPE, seguindo protocolo desenvolvido para análises dos produtos da fotólise da sulfametazina (item 3 Etapa 2). Para as amostras degradadas na concentração inicial de 5 mg L^{-1} , o volume de amostra utilizado nesta etapa foi de 100 mL, já para a concentração de 1 mg L^{-1} utilizou-se um volume de 200 mL. Nesta última, os cartuchos foram preenchidos com 200 mg de fase extratora.
- 3- Extração do lodo e subsequente pré-concentração por SPE. Cinco gramas de massa fresca do lodo foi triturada e extraída com 8 mL de acetronitrila. O extrato foi mantido

na ausência de luz e permaneceu sob agitação por 24 horas em uma mesa agitadora. Logo após, a amostra foi centrifugada e tomou-se o sobrenadante. Uma segunda extração do lodo foi realizada com metanol, usando-se o mesmo protocolo. Juntaram-se os sobrenadantes e reduziu-se o volume em 50% por secagem com N₂ para que o volume final de solvente orgânico não ultrapassasse 5% do volume total. Ao extrato foi adicionada água ultrapura até um volume final de 100 mL e filtrado em membrana de 3µm. Essa amostra foi submetida ao procedimento descrito na etapa 2 (logo acima).

- 4- Análises dos possíveis produtos de degradação por LC-MS. Os dados foram analisados no modo “*full MS*” (QToF) e através do software *MZmine*, de maneira a encontrar as diferenças presentes na amostra, em relação ao controle.

5 Softwares

Para auxiliar nas análises dos resultados obtidos foram utilizados softwares que além de promover a deconvolução das bandas cromatográficas auxiliaram na seleção dos compostos de interesses e na sua identificação. Foram utilizados: o *MZmine* que é um software que possui código aberto para processamento, visualização e análise de dados de LC-MS; *Data Analysis da Bruker*, utilizando ferramentas como *Smart Formula 3D* e *Compound Dissect* e o *Mass Frontier 7.0* da *Thermo Scientific* que é um software auxiliar à interpretação de espectros de massa.

6 HPLC-MS/MS

6.2 Análise em LC-ESI-QqToF/MS

Nas análises por HPLC acoplado à espectrometria de massas foi utilizado um sistema LC-ESI-QqToF/MS compreendido por um HPLC Shimadzu série 20A Prominence e espectrômetro de massas Bruker Daltonics modelo micrOTOF-Q II, equipado com coluna Kinetex XB-C18 (100 mm x 2,1 mm; 2,6 µm) da Phenomenex; como fase móvel utilizou-se água ultrapura 0,1% ácido fórmico (A)/acetonitrila com 0,1% ácido fórmico (B) utilizando a seguinte programação: 0-3 min, 5% de B; 3-12 min, 5-60% de B; 12-14 min, 60-95% de B; 14-20 min, 95% de B; 20-22 min, 95-5% de B; 22-26 min, 5% de B. A vazão utilizada foi de 0,25 mL min⁻¹ e temperatura do forno de 40°C. Os compostos foram analisados por *electrospray* operando no modo positivo, com os seguintes parâmetros: voltagem do capilar a

4,5 kV, temperatura de dessolvatação a 200°C, vazão do gás de secagem a 8 L min⁻¹ e pressão do nebulizador a 4 bar, intervalo de m/z monitorado de 50 a 3000 u, taxa de aquisição de espectros a 2 Hz no modo *full MS*. Para melhor identificação de alguns produtos formados, alguns experimentos de MS/MS foram realizados.

6.3 Análise em LC-Orbitrap/MS

O sistema LC-Orbitrap/MS é constituído de um espectrômetro de massas de Thermo Scientific modelo LTQ Velos (LIT-Orbitrap) e de um cromatógrafo Accela do mesmo fabricante. As condições do cromatógrafo foram as mesmas descritas no item anterior.

As análises foram realizadas utilizando uma interface *heated electrospray* (HESI), aquecida a 350°C no modo positivo nas seguintes condições: gás cortina e auxiliar em 35 e 10 unidades arbitrárias, respectivamente; temperatura do capilar a 350°C, voltagem do capilar (*electrospray*) a 3,7 kV. A faixa monitorada de m/z foi de 95 a 600, com taxa de aquisição de espectros de 2 Hz no modo *full MS* e um poder de resolução de massa (FWHM) nominal de 60.000.

Referências

- 1 TORRES, P. Desempenho de um reator anaeróbico de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgoto sanitário sob diferentes condições de operação. **Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos**, 1992.
- 2 TRIBURTIUS, E.R.L.; PERALTA-ZAMORA, P. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 441–446, 2004.

Capítulo 4

Sulfametazina

Sulfametazina (SMZ) é uma das sulfonamidas mais comumente usadas para tratar infecções bacterianas em bovinos, e tem sido frequentemente detectada em águas superficiais (1) e subterrâneas (2) em concentrações de até 2482 ng L⁻¹ e 220 ng L⁻¹, respectivamente. O presente capítulo apresenta os resultados obtidos durante os experimentos realizados para avaliar a pré-concentração e a identificação dos produtos de degradação formados durante a fotólise e a biodegradação em reatores anaeróbios da sulfametazina.

Resultados e discussão

1 Avaliação dos intermediários formados durante a fotólise da sulfametazina

As alíquotas coletadas durante o ensaio fotoquímico da sulfametazina na concentração inicial de 25 mg L⁻¹ durante seis horas foram analisadas por LC-ESI-QqToF/MS, possibilitando a identificação e a descrição dos produtos de degradação formados. Foram identificados sete intermediários de m/z 124,0865; 140,0810; 231,1236; 293,0696; 295,0858 e 215,1285 (este último apresentando dois picos cromatográficos diferentes corresponderam ao mesmo espectro de massas) (Figura 4-1). Os isômeros apareceram no cromatograma com a mesma m/z 215,1285 e composição elementar C₁₂H₁₅N₄ apresentando os seguintes tempos de retenção: A-2,5 e B-4,3 min. Os intermediários de m/z nominal 124 e 140 não foram retidos eficientemente na coluna cromatográfica, além de coeluírem quase completamente. No cromatograma total de íons (TIC – *Total Ion Chromatogram*) da solução degradada até 1 hora, representado na Figura 4-1, estão indicados os picos dos sete intermediários e da SMZ.

2 Fotólise da sulfametazina em alta concentração

Para visualização do perfil de degradação da SMZ e de formação dos intermediários, foram traçadas curvas das áreas normalizadas dos analitos em função do tempo de fotólise. As áreas normalizadas representam a razão entre as áreas do pico cromatográfico dos analitos e da SMZ no tempo zero de reação, isto é, da resposta da concentração inicial do fármaco. As curvas de degradação da SMZ e de formação dos produtos estão ilustradas na Figura 4-2.

Figura 4-1-Cromatograma total de íons (TIC) da solução da sulfametazina degradada por 1 hora (em chaves, zoom do cromatograma do íon extraído ($m/z \pm 0,005$ u) de alguns intermediários), indicando os picos correspondentes com base na m/z nominal de cada íon de interesse.

Fonte: Autoria própria.

Figura 4-2- Fotodegradação da sulfametazina (25 mg L^{-1}) e os produtos de degradação formados ao decorrer de 6 horas. (a) SMZ e intermediários; (b) Apenas SMZ; (c) Apenas intermediários.

Fonte: Autoria própria.

A sulfametazina é fotodegradada após três horas de reação (Figura 4-2b). Ao observar a Figura 4-2, é possível notar que os intermediários aparentemente são formados em concentrações menores do que a da molécula inicial (intensidade máxima de 52% da resposta inicial da SMZ). Mesmo após seis horas de exposição à radiação ultravioleta, os intermediários não foram totalmente degradados, persistindo no meio. Embora a concentração do fármaco se reduza, a toxicidade pode perdurar se os intermediários também apresentarem atividade.

Um recente trabalho publicado por Stahl, J. et al. (3) avaliou a citotoxicidade dos produtos da fotodegradação sob luz UV para oito sulfonamidas, dentre elas a sulfametazina. Os resultados mostraram que todas as sulfonamidas estudadas sofreram fotodegradação quando expostas à luz UV a um maior ou menor grau. Os produtos de degradação não apresentaram potencial citotóxico, exceto a sulfanilamida que possui um pequeno impacto sobre a proliferação celular. Além disso, nenhum produto de degradação apresentou atividade antibacteriana. Assim, a exposição aos raios UV parece representar um método adequado para inativar a atividade antimicrobiana das sulfonamidas. Embora os subprodutos da fotólise das sulfonamidas se mostraram inofensivos para as células de mamíferos estudadas, os efeitos sobre organismos aquáticos precisam ser avaliados, visto que estes são mais sensíveis e sofrem contaminações recorrentes.

A maior intensidade dos intermediários foi observada após uma hora de fotólise, onde o composto de m/z 215A obteve intensidade de 52% da resposta inicial da SMZ, seguido pelo m/z 231 com intensidade máxima observada de 10,6%. Os demais produtos de degradação tiveram intensidade máxima inferior a 2,3% da resposta inicial da SMZ (Figura 4-2).

A baixa resposta dos produtos formados justifica o uso de concentração elevada (25 mg L^{-1}) da molécula precursora, para que se possa identificá-los. Kümmerer et al.(4) mostraram que uma das questões mais importantes nos estudos de fotólises ou degradações de fármacos por processos oxidativos avançados publicados atualmente é justamente a concentração inicial utilizada. Muitos grupos de pesquisa apontam que o uso de concentrações superiores às encontradas no ambiente é necessário no momento devido às capacidades analíticas atualmente disponíveis. Justificativa que pode ser comprovada pelos resultados apresentados na Figura 4-2a. Entretanto, este fato dificulta a compreensão da real situação que ocorre na natureza, onde os fármacos são encontrados em concentrações menores. Por isso, o presente trabalho busca avaliar

a degradação da sulfametazina em concentrações menores, por meio da pré-concentração dos intermediários.

Vários trabalhos na literatura tem abordado a degradação da SMZ (5–9). Contudo, poucos utilizam espectrômetros de massa de média-alta resolução, o que dificulta a identificação dos produtos de degradação.

No trabalho de García-Galán et al. (5), a SMZ é degradada em uma concentração inicial de 40 mg L⁻¹ em um simulador de luz natural equipado com uma lâmpada de xenônio (simulador de luz UV - comprimentos de onda emitidos variando de 200 a 800 nm). As análises foram realizadas em um UPLC-QqToF-MS. A amostra ficou em exposição por 100 horas. A identificação dos compostos foi feita analisando a alíquota de 30 horas. A desulfonização da SMZ foi relatada como a principal origem dos produtos de degradação e eles também observaram bandas cromatográficas diferentes que corresponderam ao mesmo espectro de massas para m/z 215,1297 e composição elementar C₁₂H₁₅N₄. O composto com m/z 215 também foi o que apresentou maior intensidade. Os produtos de transformação descritos pelos autores são similares aos encontrados na presente tese, exceto quanto aos produtos com m/z nominal 200; 204 e 264 que não foram encontrados no nosso trabalho. Entretanto, o intermediário de m/z nominal 140 observado nessa tese não foi relatado no referido artigo. Como a concentração inicial da SMZ utilizada pelos autores foi cerca de 40% superior à utilizada neste trabalho, é provável que esta variável seja uma das causas da formação de produtos diferentes em níveis detectáveis, além das configurações do fotoreator e do tempo de exposição.

3 Triagem para a escolha da melhor combinação de sorvente-eluyente

O preparo de amostras utilizando SPE tornou-se durante os últimos anos uma técnica poderosa para limpeza e pré-concentração das amostras antes da análise cromatográfica. Os fármacos são constantemente detectados em baixas concentrações com o auxílio desta técnica. Porém a pré-concentração de intermediários formados a partir da degradação dos fármacos não tem sido abordada na literatura científica, em parte pela ausência de padrões analíticos para o desenvolvimento do método de extração.

A fim de se efetuar a pré-concentração dos intermediários e da SMZ em amostras em baixas concentrações degradadas, foi necessária a determinação do melhor sorvente e eluente para extração desses analitos.

A determinação do tempo de fotólise da amostra a ser submetida à SPE foi baseada na Figura 4-2a. A amostra para a triagem da SPE consistiu de uma fração degradada por uma hora a fim de que todos os intermediários estivessem presentes na amostra. A partir desta amostra única, alíquotas de 25 mL foram submetidas à triagem.

Na Tabela 4-1 está presente o desempenho relativo de cada combinação sorvente-eluyente para cada analito. Para cada composto admitiu-se o maior valor de área obtida para o pico cromatográfico do íon extraído como 100% e as outras áreas foram normalizadas proporcionalmente a esta. Os valores de porcentagem acima de 80,0% e valores nulos estão em azul e vermelho respectivamente.

Nota-se uma grande dispersão dos valores do desempenho da combinação sorvente-eluyente para os analitos, mostrando que os compostos apresentam diferentes características físico-químicas.

Durante esta etapa de triagem, devido à pré-concentração, foi possível detectar um intermediário com tempo de retenção de 7,5 min com m/z 229,1090 e composição elementar $C_{12}H_{13}N_4O$ que não havia sido detectado nos experimentos anteriores e não foi relatado na literatura. O espectro de MS de alta resolução obtidos no QqToF e o de MS/MS obtido no LIT-Orbitrap se encontram no Anexo 1.

O intermediário com m/z 140 foi o que apresentou menores porcentagens de recuperação, sendo apenas detectado ao se utilizar as fases extratoras Oasis-HLB e Strata-X. Este produto de degradação é o que apresenta maior polaridade, fato que pode ser observado na Figura 4-1 onde ele foi o composto menos retido na coluna cromatográfica de fase C_{18} . Esta característica pode dificultar a pré-concentração de analitos em fase aquosa.

Para a SMZ, obteve-se recuperação superior a 78% em todos os sorventes utilizados. A inferência de escolha de uma fase extratora, meramente com base na resposta ao fármaco inalterado não deve ser adotada sem critérios que garantam perfeita analogia, pois as respostas dos produtos podem variar bastante em relação ao fármaco original, como pode ser observado na Tabela 4-1.

Tabela 4- 1- Área normalizada em porcentagem (%) da sulfametazina e dos seus intermediários para cada combinação de sorvente-eluente.

Combinação		279 (SMZ)	124	140	229	215 A	215 B	231	293	295
<i>m/z</i>										
Oasis HLB	A1-ACN	27,18	0,00	0,00	16,52	19,21	13,87	60,12	0,00	31,13
	A2-ACN 5% H ₃ PO ₄	57,06	68,13	0,00	15,42	31,07	12,08	51,99	0,00	28,73
	A3-ACN 5% NH ₄ OH	46,42	0,00	0,00	0,00	16,74	8,11	8,24	13,89	15,39
	A4-MeOH	98,38	88,92	100	97,09	100,00	34,07	100,00	100,00	93,39
	A5-MeOH 5% H ₃ PO ₄	50,70	70,35	0,00	22,15	23,08	16,54	10,97	0,00	29,66
	A6-MeOH 5% NH ₄ OH	42,57	0,00	22,11	0,00	33,89	100,00	17,87	23,54	20,22
Strata-X	B1-ACN	33,60	25,88	0,00	52,24	20,34	11,19	10,74	8,79	38,46
	B2-ACN 5% H ₃ PO ₄	44,31	82,21	0,00	29,46	42,90	17,14	20,98	0,00	35,36
	B3-ACN 5% NH ₄ OH	51,76	27,18	0,00	14,20	33,22	11,14	16,84	29,16	28,54
	B4-MeOH	49,84	0,00	63,84	25,59	48,97	19,91	26,18	34,32	31,02
	B5-MeOH 5% H ₃ PO ₄	34,15	67,98	0,00	31,81	34,53	11,77	19,32	2,98	36,02
	B6-MeOH 5% NH ₄ OH	78,85	77,10	0,00	25,80	56,09	96,34	32,88	53,51	100,00
Strata-X A	C1-ACN	40,16	42,72	0,00	0,00	11,79	15,71	4,15	0,00	0,00
	C2-ACN 5% H ₃ PO ₄	65,57	42,55	0,00	0,00	7,74	14,23	4,78	20,96	41,62
	C3-ACN 5% NH ₄ OH	3,09	63,22	0,00	7,89	9,78	21,87	7,45	0,00	0,00
	C4-MeOH	16,65	10,93	0,00	14,38	4,10	6,74	3,01	0,00	0,00
	C5-MeOH 5% H ₃ PO ₄	100,00	74,95	0,00	100,00	10,62	33,84	5,81	45,74	70,51
	C6-MeOH 5% NH ₄ OH	29,98	22,80	0,00	9,95	1,28	7,08	2,02	0,00	0,00
Chromabond HR-X	D1-ACN	41,65	41,58	0,00	17,99	28,74	5,23	12,39	17,83	15,88
	D2-ACN 5% H ₃ PO ₄	37,21	55,32	0,00	20,31	30,94	11,60	11,72	0,00	17,48
	D3-ACN 5% NH ₄ OH	83,99	45,75	0,00	0,00	67,42	33,67	44,13	65,46	75,55
	D4-MeOH	26,52	11,81	0,00	0,00	13,22	3,15	6,73	12,33	6,39
	D5-MeOH 5% H ₃ PO ₄	32,32	69,21	0,00	19,94	37,79	12,32	17,27	0,00	34,17
	D6-MeOH 5% NH ₄ OH	29,51	18,60	0,00	0,00	12,49	68,56	8,77	11,55	18,86
Chromabond HR-XA	E1-ACN	15,96	27,64	0,00	0,00	4,99	2,44	1,69	3,77	0,00
	E2-ACN 5% H ₃ PO ₄	38,66	40,85	0,00	0,00	1,10	5,27	4,76	15,66	13,43
	E3-ACN 5% NH ₄ OH	27,73	100,00	0,00	0,00	17,31	23,73	8,01	0,00	24,62
	E4-MeOH	78,17	84,83	0,00	22,03	16,09	21,37	9,90	26,64	43,09
	E5-MeOH 5% H ₃ PO ₄	70,49	93,32	0,00	52,23	34,06	30,19	15,68	0,00	26,62
	E6-MeOH 5% NH ₄ OH	27,91	40,57	0,00	0,00	0,65	7,90	3,20	9,62	0,00

Fonte: Autoria própria.

O Oasis-HLB apresentou recuperações acima de 88% para todos os analitos avaliados, sendo o sorvente escolhido, visto que possui uma boa capacidade de pré-concentração para os produtos de degradação da SMZ e para o fármaco inalterado.

As combinações A4 e A6 obtiveram recuperações consideráveis. A fim de obter uma melhor recuperação para todos os analitos, efetuaram-se extrações associando-se as combinações A4 e A6. Para isso foi realizada uma eluição sequencial. Utilizou-se o Oasis-HLB como fase extratora e os solventes MeOH e MeOH 5% NH_4OH em uma eluição sequencial (solvente neutro seguido do solvente modificado com a base)

4 Fotólise da sulfametazina em baixa concentração

A fim de avaliar o real potencial da fotólise, efetuaram-se degradações de SMZ em baixa concentração em água ultrapura e em esgoto sintético, simulando as condições reais. Antes da análise por LC-ESI-QToF/MS, as amostras foram submetidas às extrações empregando-se Oasis HLB como sorvente e eluição sequencial de metanol puro e metanol modificado com base.

Primeiramente, avaliou-se o efeito do volume da amostra na etapa de extração, degradando-se a amostra na concentração de 25 mg L⁻¹ durante uma hora (amostra referência) e posteriormente diluindo-a em 100 vezes para então ser submetida à extração. Os valores da recuperação de cada analito, apresentados na Tabela 4-2, correspondem à razão das áreas dos picos cromatográficos da amostra referência e da amostra diluída (1:100) e pré-concentrada utilizando o método descrito acima. Nesta etapa, o volume de amostra a ser pré-concentrada foi de 100 mL. A amostra foi diluída em água ultrapura e em esgoto sintético.

Analisando os resultados apresentados na Tabela 4-2 é possível observar que para a amostra diluída em água ultrapura, com exceção do intermediário *m/z* 140, todos os outros detectados foram pré-concentrados. O *m/z* 124 foi o que apresentou menor pré-concentração, seguido do *m/z* 295 e do *m/z* 293. Recuperações superiores a 90% foram observadas para os demais, inclusive para a SMZ. Entretanto, quando a amostra foi diluída em esgoto sintético, simulando uma matriz de maior complexidade, os intermediários de *m/z* 140, 124 e 215 B não foram detectados após a pré-concentração. O *m/z* 231 teve sua recuperação prejudicada pelos componentes do esgoto sintético, em contrapartida a *m/z* 295, que apresentou uma melhora significativa no fator de pré-concentração. Não foi possível avaliar o fator de recuperação para o *m/z* 229, visto que este composto não foi detectado na amostra referência nas condições analíticas utilizadas.

Tabela 4- 2- Recuperação relativa da sulfametazina e intermediários em água ultrapura e esgoto sintético.

	Analitos (<i>m/z</i>)	215 A	215 B	124	140	231	293	295	279
Água ultrapura	%								
	Recuperação	102,7	101,6	61,1	0,0	103,8	73,3	67,94	99,7
	DPR (%)	13,3	12,2	8,2	-	12,8	9,2	7,8	11,4
Esgoto Sintético	%								
	Recuperação	98,3	0,0	0,0	0,0	50,3	63,1	105,3	89,6
	DPR (%)	12,4	-	-	-	6,7	7,3	11,7	9,2

Fonte: Autoria própria.

A baixa recuperação dos intermediários na amostra diluída no esgoto sintético pode ser causada pela competição pelos sítios ativos da fase extratora durante a extração ou até mesmo pela supressão da ionização causada pelos demais compostos presentes no esgoto sintético e consequente não detecção no espectrômetro de massas. No caso de compostos com uma maior polaridade, como o m/z 140 e 124, um maior volume da amostra aquosa utilizada (100 mL) pode carrear o analito, dificultando sua pré-concentração. Os ensaios anteriores feitos para triagem utilizaram um volume menor, de apenas 25 mL.

Os perfis de degradação da SMZ e de formação dos intermediários em água e em esgoto sintético estão representados nas Figuras 4-3 e 4-4 respectivamente. As curvas foram traçadas considerando-se a área relativa, ou seja, a razão da área do pico cromatográfico do analito pela área do pico da SMZ em tempo zero de reação.

As curvas de formação dos intermediários nas Figuras 4-3.c e 4-4 apresentam diferenças evidentes. Na água, todos os intermediários são detectados, exceto o m/z 140 que não foi recuperado e consequentemente não pode ser avaliado. A SMZ não foi detectada após 40 minutos de reação. Como na fotólise da SMZ na concentração 25 mg L^{-1} , o m/z 215A também foi o intermediário de maior intensidade (intensidade máxima de 9,5% da resposta inicial da SMZ). A desulfonização da SMZ também foi a principal origem dos produtos de degradação.

A degradação realizada no esgoto sintético apresentou diferenças significativas, como pode ser observado na Figura 4-4. O meio favoreceu a fotólise da SMZ e esta não foi mais detectada após 20 minutos de reação, ou seja, metade do tempo observado na degradação em água. Apenas o intermediário de m/z 215A foi detectado. A intensidade máxima foi superior a 60% da resposta inicial da SMZ. Esta diferença pode ter sido consequência da influência do esgoto sintético na fotólise, na extração, na ionização em MS, ou uma associação destas. Tanto na degradação realizada em água, quanto na realizada em esgoto sintético mesmo após uma hora de exposição à radiação ultravioleta, os intermediários não foram totalmente degradados, persistindo no meio.

Esses resultados mostram que a formação dos produtos de degradação pode ser influenciada pelo meio em que ela ocorre, além da concentração inicial do fármaco. Por isso, fazem-se necessários estudos em matrizes reais para que se possam avaliar os produtos de transformação formados no meio ambiente.

Figura 4-3- Fotodegradação da sulfametazina ($0,25 \text{ mg L}^{-1}$) em água e os produtos de degradação formados ao decorrer de 1 hora. (a) SMZ e intermediários; (b) Apenas SMZ; (c) Apenas intermediários.

Fonte: Autoria própria.

Figura 4-4- Fotodegradação da sulfametazina ($0,25 \text{ mg L}^{-1}$) em esgoto sintético e os produtos de degradação formados ao decorrer de 1 hora.

Fonte: Autoria própria.

5 Rota de degradação

As estruturas químicas dos intermediários foram interpretadas a partir dos resultados da espectrometria de massas e do que já havia sido proposto na literatura. Todos os íons isolados e monitorados durante os experimentos tiveram a sua identidade correlata à molécula inicial confirmada em espectros de massa de alta resolução e eventualmente MS/MS de alta resolução. O Anexo 1 apresenta os espectros de MS/MS obtidos em análises no LIT-Orbitrap para todos os produtos de degradação encontrados, exceto para os de m/z 124 e 140 que não foram detectados pelo equipamento durante os experimentos de MS/MS. Para estes, são apresentados os espectros de MS de alta resolução obtidos no QqToF. Suas estruturas foram propostas a partir das fórmulas moleculares obtidas com o auxílio da ferramenta *Smart Formula* presente no software *Data Analysis* da *Bruker*.

Não foi possível através do espectro de MS/MS identificar a diferença entre os isômeros de m/z 215, visto que eles não apresentam diferenças nos espectros de MS/MS (Anexo 1).

Na Figura 4-5 está representada a proposta para a rota de degradação da fotólise da SMZ. Estão representados todos os intermediários encontrados e também os propostos por García-Galán et al. (5), mas não detectados no presente estudo.

Figura 4-5- Rota de degradação proposta para a fotólise da Sulfametazina: * não detectados no presente estudo, mas propostos por García-Galán et al..(5) ★ Novos intermediários.

Fonte: Autoria própria.

A Tabela 4-3 apresenta os produtos de fotodegradação da SMZ e as diferenças relativas à molécula intacta. A desulfonização da SMZ foi a principal origem dos produtos de degradação. Apenas os de m/z 293 e 295 permaneceram com o grupo sulfônico. As reações de oxidação originaram aminas (m/z 124 e 215), amidas (m/z 229 e 293) e hidroxiaminas (m/z 140, 231 e 295).

Tabela 4- 3- Produtos de fotodegradação da sulfametazina e diferenças relativas à molécula intacta.

Formula Molecular	ESI positivo [M+H] ⁺	Diferença com a SMZ (C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S)	Estruturas químicas propostas para os produtos da fotodegradação
C ₆ H ₉ N ₃	124	-C ₆ H ₅ NO ₂ S
C ₆ H ₉ N ₃ O	140	-C ₆ H ₅ NO ₂ S
C ₁₂ H ₁₄ N ₄	215 A (TR: 2,5 min)	-SO ₂
	215 B (TR: 4,3 min)		
C ₁₂ H ₁₂ N ₄ O	229	-SO ₂ + O
C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O	231	-SO ₂ + O
C ₁₂ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	293	+ O - H ₂
C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₃ S	295	+ O

6 Avaliação dos intermediários formados durante biodegradação da sulfametazina em reator anaeróbio

Com o objetivo de avaliar os produtos de degradação formados pelo reator anaeróbio durante a biodegradação do antimicrobiano sulfametazina (SMZ), o método de pré-concentração desenvolvido para os produtos da fotólise foi aplicado. Os reatores foram alimentados com esgoto sintético que possui a mesma composição do utilizado nos ensaios de fotólise. Essa parte do trabalho foi realizada em parceria com o aluno de doutorado da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), Guilherme Henrique Duarte de Oliveira que é orientado pelo Prof. Dr. Marcelo Zaiat. O referido aluno trabalha com remoção de sulfametazina em reatores anaeróbios tratando água residuária de suinocultura. As amostras foram analisadas após 72 horas de tratamento no reator anaeróbio.

A degradação biológica é fruto de metabolismo e por isso torna-se uma amostra de matriz de elevada complexidade. Este experimento foi importante para avaliar a aplicabilidade da estratégia desenvolvida para análises de intermediários em amostras complexas. Para auxiliar nas análises dos resultados obtidos, tornou-se relevante o uso de softwares que além de promover a deconvolução das bandas cromatográficas auxiliaram na seleção dos compostos de interesse e na identificação dos mesmos. Inicialmente realizou-se a avaliação dos intermediários na concentração inicial da SMZ de 5 mg L⁻¹ para facilitar a detecção e identificação dos possíveis intermediários formados.

Após a deconvolução dos picos cromatográficos e subsequente alinhamento dos picos presentes na amostra e no controle utilizando o software MZmine, foram selecionados três íons presentes apenas na amostra (Figura 4-6). Foram eles o OH-SMZ m/z 295,0860 que apresenta um tempo de retenção (TR) 8,1 minutos e fórmula molecular C₁₂H₁₅N₄O₃S que corresponde ao metabólito hidroxilado da SMZ (OH-SMZ); m/z 307,0864 (TR- 8,9 min) com fórmula molecular C₁₃H₁₅N₄O₃S correspondente à adição do grupo formil a SMZ (formil-SMZ) e m/z 227,1429 (TR- 9,5 min) com fórmula molecular C₁₈H₂₅N₅O₇S que pode corresponder à adição de glicose a SMZ (G-SMZ). O íon m/z 454,1429 também foi encontrado na amostra do lodo. As Figuras 4-7 e 4-8 apresentam os espectros de MS/MS de alta resolução obtidos para a confirmação das estruturas propostas.

Figura 4-6- Cromatogramas (íons extraídos) dos intermediários encontrados durante a biodegradação da sulfametazina e suas estruturas propostas obtidas a partir de análises realizadas por LC-QqToF (ESI (+) MS) após 72 horas de exposição ao reator anaeróbico. 1) Metabólito hidroxilado da SMZ; 2) formil-SMZ e 3) conjugação com glicose.

Além do íon m/z 454, relativo à G-SMZ, no espectro 3 da Figura 4-6 observa-se como íon mais abundante aquele com m/z 227, relativo à mesma molécula G-SMZ contendo duas cargas relacionadas à protonação simultânea de dois grupos distintos $(M+2H)^{2+}$.

Figura 4- 7- Espectro de massas obtido a partir de análises realizadas por LC-QqToF (ESI (+) MS/MS) após 72 horas de exposição ao reator anaeróbio para identificação da estrutura do intermediário de m/z 227.

Figura 4- 8-Espectros de massas obtidos a partir de análises realizadas por LC-QqToF (ESI (+) MS/MS) após 72 horas de exposição ao reator anaeróbio para identificação da estrutura do intermediário de m/z 307 (1) e m/z 295 (2).

Na Figura 4-9 é possível observar a importância do preparo de amostra na detecção de produtos de degradação. Estes são formados em concentrações menores que a molécula precursora o que dificulta sua detecção e identificação. Com a aplicação do método adequado de preparo de amostras é possível contornar esta limitação.

Figura 4- 9- Comparação dos cromatogramas (íons extraídos) dos intermediários encontrados. Os picos 4,13 e 19 correspondem à água residuária sem pré-concentração por SPE e os picos 20,32 e 39 da amostra pré-concentrada por SPE.

Após a caracterização dos produtos da biodegradação da SMZ no reator anaeróbio, foram realizados experimentos em uma concentração inicial da SMZ de 1 mg L⁻¹ para avaliar a aplicabilidade do método em concentrações menores. As análises foram realizadas tanto na água residuária, amostras com 6, 12, 36 e 72 horas de tratamento no reator anaeróbio, quanto no lodo (12 e 72 horas).

O gráfico abaixo (Figura 4-10) apresenta os resultados obtidos. Nas amostras do lodo, só foi possível detectar o intermediário G-SMZ de m/z 227, como ocorreu na análise realizada nos experimentos na concentração inicial de 5 mg L⁻¹, indicando que dentre os intermediários estudados apenas ele é adsorvido ao lodo. Já na água residuária, todos os supracitados produtos da biodegradação da SMZ foram detectados. O formil-SMZ de m/z 307 só foi observado na amostra de 12 horas de tratamento. O G-SMZ de m/z 227 foi o que apresentou maior intensidade, tendo seu ápice após 36 horas de tratamento no reator anaeróbio.

Figura 4-10- Perfil de formação dos produtos oriundos da biodegradação anaeróbia da sulfametazina.

Fonte: Autoria própria.

Os trabalhos de García-Galán et al. (5,10) já descreveram a presença do composto OH-SMZ m/z 295 como produto da degradação da SMZ, tanto através da fotólise em simulador de luz UV equipado com lâmpada de Xenônio (comprimentos de onda variando de 200-800 nm e concentração inicial de 40 mg L⁻¹ da SMZ) como produto da biodegradação realizada por culturas do fungo *Trametes versicolor* (concentração inicial de 9 mg L⁻¹ da SMZ). Os resultados da fotólise da sulfametazina realizada no presente trabalho, descritos nas sessões anteriores, também detectaram o intermediário OH-SMZ m/z 295. O composto formil-SMZ m/z 307 também foi observado como produto da biodegradação da SMZ em culturas de fungo. (10) Entretanto, o composto G-SMZ m/z 227 ainda não foi descrito na literatura, bem como produtos vindos de degradações da SMZ em reatores anaeróbios. Além disso, a concentração inicial do fármaco estudado no presente experimento foi no mínimo 44% menor que os já publicados devido à utilização de técnicas de preparo de amostras. Detectar intermediários em concentrações mais próximas às encontradas na natureza é hoje um desafio à Química Analítica Ambiental.

Conclusão

- Foram identificados oito produtos de transformação da sulfametazina durante a fotólise, destes dois ainda não relatados na literatura (m/z 140 e 229).
- A desulfonização foi a principal origem dos produtos de transformação da fotólise da SMZ.
- A fotólise da SMZ foi favorecida quando realizada no esgoto sintético.
- Os intermediários se mostraram resistentes a fotodegradação, sendo detectados após 6 horas de exposição a luz UV.
- Variações tão grandes na recuperação e eluição de diferentes compostos sugerem a possibilidade da combinação de diferentes fases extratoras, ou ainda a avaliação de novos materiais preparados ou selecionados com ênfase nessas moléculas.
- As análises da biodegradação da SMZ em reator anaeróbio permitiram a identificação de três produtos de transformação. O m/z 295 foi comum aos dois processos, fotólise e biodegradação. O m/z 227 foi descrito pela primeira vez como produto de biodegradação anaeróbia da SMZ.

Referência

- 1 GARCÍA-GALÁN, M.J.; VILLAGRASA, M.; DÍAZ-CRUZ, M.S.; BARCELÓ, D. LC-QqLIT MS analysis of nine sulfonamides and one of their acetylated metabolites in the Llobregat River basin. Quantitative determination and qualitative evaluation by IDA experiments. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 397, n. 3, p. 1325–34, 2010.
- 2 GARCÍA-GALÁN, M.J.; GARRIDO, T.; FRAILE, J.; GINEBREDÀ, A.; DÍAZ-CRUZ, M.S.; BARCELÓ, D. Application of fully automated online solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry for the determination of sulfonamides and their acetylated metabolites in groundwater. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 399, n. 2, p. 795–806, 2011.
- 3 ZESSEL, K.; MOHRING, S.; HAMSCHER, G.; KIETZMANN, M.; STAHL, J. Biocompatibility and antibacterial activity of photolytic products of sulfonamides. **Chemosphere**, v. 100, p. 167–74, 2014.
- 4 FATTA-KASSINOS, D.; VASQUEZ, M.I.; KÜMMERER, K. Transformation products of pharmaceuticals in surface waters and wastewater formed during photolysis and advanced oxidation processes - degradation, elucidation of byproducts and assessment of their biological potency. **Chemosphere**, v. 85, n. 5, p. 693–709, 2011.
- 5 GARCÍA-GALÁN, M.J.; DÍAZ-CRUZ, M.S.; BARCELÓ, D. Kinetic studies and characterization of photolytic products of sulfamethazine, sulfapyridine and their acetylated metabolites in water under simulated solar irradiation. **Water research**, v. 46, n. 3, p. 711–22, 2012.
- 6 LIU, Y.; WANG, J. Degradation of sulfamethazine by gamma irradiation in the presence of hydrogen peroxide. **Journal of hazardous materials**, v. 250-251, p. 99–105, 2013.
- 7 EL-GHENYMY, A.; RODRÍGUEZ, R.M.; ARIAS, C.; CENTELLAS, F.; GARRIDO, J.A.; CABOT, P.L.; BRILLAS, E. Electro-Fenton and photoelectro-Fenton degradation of the antimicrobial sulfamethazine using a boron-doped diamond anode and an air-diffusion cathode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 701, p. 7–13, 2013.
- 8 GAO, Y.-Q.; GAO, N.-Y.; DENG, Y.; GU, J.-S.; GU, Y.-L.; ZHANG, D. Factors affecting sonolytic degradation of sulfamethazine in water. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 20, n. 6, p. 1401–7, 2013.
- 9 GUO, C.; XU, J.; WANG, S.; ZHANG, Y.; HE, Y.; LI, X. Photodegradation of sulfamethazine in an aqueous solution by a bismuth molybdate photocatalyst. **Catalysis Science & Technology**, v. 3, n. 6, p. 1603, 2013.
- 10 GARCÍA-GALÁN, M.J.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C.E.; VICENT, T.; CAMINAL, G.; DÍAZ-CRUZ, M.S.; BARCELÓ, D. Biodegradation of sulfamethazine by *Trametes versicolor*: Removal from sewage sludge and identification of intermediate products by UPLC-QqTOF-MS. **The Science of the total environment**, v. 409, n. 24, p. 5505–12, 2011.

Capítulo 5

Fluoroquinolona

As fluoroquinolonas são uma importante classe de antibióticos derivados do ácido nalidíxico e são usadas em todo o mundo em tratamentos em seres humanos e com fins veterinários. Estudos têm relatado a presença ambiental das fluoroquinolonas (1–3). Há uma crescente preocupação com os efeitos causados pela entrada destes compostos no meio ambiente. O comportamento e os produtos de degradação destes compostos ainda são pouco conhecidos, potenciais efeitos crônicos de longo prazo devido à exposição ambiental em baixos níveis, como o desenvolvimento de respostas alérgicas, podem ocorrer. (3) Além disso, a presença de antibióticos de largo espectro como estes em ambientes aquáticos, embora em baixas concentrações, podem representar sérias ameaças ao ecossistema e à saúde humana através da indução e proliferação de resistência bacteriana a drogas. (4)

O presente capítulo apresenta os resultados obtidos durante os experimentos realizados para avaliar a pré-concentração e a identificação dos produtos de degradação formados durante a fotólise de duas fluoroquinolonas (FQs), ciprofloxacino (CIP) e enrofloxacino (ENR), cujas estruturas estão representadas na Figura 5-1.

Figura 5-1- Estruturas químicas de ciprofloxacino e enrofloxacino.

Resultados e discussão

1 Ciprofloxacino

1.1 Avaliação dos intermediários formados durante a fotólise do ciprofloxacino

A fim de identificar os produtos de degradação, as alíquotas coletadas ao longo da fotólise foram analisadas por LC-ESI-QqToF/MS. Foram identificados 10 intermediários, sendo que nove deles foram detectados nas análises iniciais do desempenho da fotólise. No cromatograma total de íons (TIC) da amostra degradada até 20 min, Figura 5-2, notam-se sete picos principais, o próprio ciprofloxacino e seis intermediários de m/z 330,1478; 288,1340; 346,1411; 344,1255; 316,1292; 330,1471, além de três com menor intensidade: m/z 306,1273; 348,1377; e 362,1385.

Os intermediários de m/z 330 são isômeros, já que apresentam a mesma fórmula molecular $C_{17}H_{19}N_3O_4$ e diferentes estruturas químicas, evidenciado pelos diferentes tempos de retenção. O 330 A foi atribuído ao composto de menor tempo de retenção enquanto que o 330 B ao de maior tempo de retenção.

O cromatograma não ilustra o intermediário de m/z 263,0852; pois este estava em níveis não quantificáveis. A presença desse intermediário foi notada somente durante a avaliação das extrações, o que confirma que este estágio é de extrema importância para se avaliar os produtos da fotodegradação.

1.2 Fotólise do ciprofloxacino em alta concentração

A fim de verificar o avanço da formação dos intermediários e da degradação do fármaco, plotou-se uma curva das áreas dos picos normalizadas em porcentagem contra o tempo de fotólise. As áreas dos picos normalizadas foram calculadas dividindo-se a área dos picos de concentração dos intermediários pela área inicial da concentração do fármaco.

A Figura 5-3.a ilustra as concentrações do fármaco e dos seus intermediários ao longo das seis horas de reação. As concentrações máximas dos produtos de degradação são significativamente menores que a concentração inicial do CIP (intensidade máxima de 25% da resposta inicial do CIP), comprovando a necessidade do pré-tratamento dessas amostras para a identificação dos intermediários. A curva representada na Figura 5-3.b mostra a eficácia da fotólise na degradação da CIP. Em uma hora, a concentração do CIP foi reduzida em 93,5%.

Pelas curvas da Figura 5-3.c, nota-se que no tempo de fotólise de 20 min a maioria das concentrações dos analitos de interesse encontrava-se em seus ápices. Como a presença dos intermediários de m/z 263 não foi detectada antes da pré-concentração, a Figura 5-3 não ilustra a curva de degradação deste.

Figura 5-2-Cromatograma total de íons (TIC) da solução do ciprofloxacino degradada por 20 min (em chaves, zoom do cromatograma do íon extraído ($m/z \pm 0,005$ u) de alguns intermediários), indicando os picos correspondentes com base na m/z nominal de cada íon de interesse.

Fonte: Autoria própria.

Figura 5-3- Fotodegradação do ciprofloxacino (10 mg L^{-1}) e os produtos de degradação formados ao decorrer de 6 horas. (a) CIP e intermediários; (b) Apenas CIP; (c) Apenas intermediários.

Fonte: Autoria própria.

A maior intensidade dos intermediários foi observada após 15 minutos de fotólise, em que o de m/z 330A obteve intensidade de 25,2% da resposta inicial do CIP e em seguida, após 20 minutos de fotólise, o m/z 346 apresenta intensidade de 25%. Os demais produtos de degradação tiveram intensidade máxima inferior a 8,5% da resposta inicial do CIP (Figura 5-3.c).

Mesmo após seis horas de exposição à radiação ultravioleta, os intermediários de m/z 316 e 346 não foram totalmente degradados, persistindo no meio. Embora a concentração do fármaco se reduza, a toxicidade pode perdurar se os intermediários também apresentarem atividade.

Ao avaliar a toxicidade dos subprodutos formados quando águas residuárias contendo CIP foram tratadas com processos oxidativos avançados (O_3 e UV/ H_2O_2), Tuerk, J., et.al. (5) não observaram produtos tóxicos. Entretanto, quando o CIP em água pura foi submetido ao tratamento com UV/ H_2O_2 observou-se ação citotóxica dos subprodutos gerados. Esses resultados indicam uma influência do tipo de matriz (água residuária ou água pura) na formação de produtos citotóxicos. (5)

Nos trabalhos de Li, Y. et al. e Vasconcelos, T. G. et al., a avaliação da atividade biológica dos produtos de fotólise do CIP baseou-se na inibição de bioluminescência em *V. fischeri*. No primeiro, os intermediários apresentaram maior toxicidade que o fármaco, enquanto que no segundo, a toxicidade dos produtos obtidos era inferior. Essa divergência deve-se a diferentes condições experimentais aplicadas a cada trabalho, o que dificulta tomar conclusões decisivas a respeito. No entanto, nota-se que a redução da concentração do fármaco em uma amostra não garante a eliminação da atividade biológica. (6,7)

Embora a fotólise mostrou-se efetiva na degradação do CIP, não se conhece seu desempenho em casos em que o CIP encontra-se em baixas concentrações, o que ocorre em uma situação real. A avaliação da fotólise do CIP em alta concentração (10 mg L^{-1}) permitiu, no entanto, identificar os produtos formados, o que não seria possível se a degradação fosse efetuada em concentrações menores de CIP. Essa dificuldade de análise em baixas concentrações deve-se à falta de sensibilidade dos métodos analíticos, como foi possível observar para o intermediário que foi apenas detectado após a pré-concentração da amostra. Para se conhecer o real potencial desse método como alternativa à degradação de fármacos, foi efetuada adiante a fotólise do CIP em baixas concentrações e a pré-concentração dessas amostras.

1.3 Triagem para a escolha da melhor combinação de sorvente-eluyente

A amostra contendo os analitos de interesse foi submetida a diferentes combinações de fase extratora e eluente e o desempenho de cada uma foi avaliado por LC-ESI-QqToF/MS. A melhor combinação foi testada adiante a fim de recuperar os analitos formados na degradação em baixa concentração.

Durante esta etapa de triagem, devido à pré-concentração, foi possível detectar um intermediário com tempo de retenção de 10,9 min com m/z 263,0852 e composição elementar $C_{13}H_{12}N_2O_3F$ que não havia sido detectado nos experimentos anteriores. O espectro de MS de alta resolução obtidos no QqToF e o de MS/MS obtido no LIT-Orbitrap se encontram no Anexo 2.

Na Tabela 5-1, está representado o desempenho relativo de cada combinação sorvente-eluyente para todos os intermediários identificados, além do CIP. Para cada analito, considerou-se como 100% a maior área obtida no TIC e as outras áreas proporcionais a essa. Os valores observados acima de 80% estão em azul, enquanto que os valores nulos estão em vermelho.

As combinações de fase extratora e eluente que não foram capazes de recuperar algum analito, isto é, apresentaram recuperação nula, foram eliminadas como candidatos a testes posteriores, como foi o caso do cartucho Strata-X (série B), no qual não se observou a recuperação do intermediário de m/z 362 para nenhum eluyente.

O cartucho Oasis HLB foi eficaz na recuperação da maioria dos analitos, tendo recuperações nulas quando combinadas com solventes neutros, ACN (A1) e MeOH (A4). Quando utilizada ACN com modificadores ácidos ou básicos, os analitos apresentaram uma melhor eluição. Para alguns, foi mais eficiente a condição ácida, A2, e para outros a condição básica, A3, cujas recuperações estão em destaque na Tabela 5-1. Portanto, a eluição sequencial com condições ácidas e básicas dos eluentes pode levar a maior recuperação de todos os analitos.

Foi proposta, então, a eluição sequencial de ACN modificada com ácido ou base, visto que alguns analitos eram mais bem extraídos em condição ácida e outros, em condição básica. No entanto, experimentalmente foi verificado que o sal $(NH_4)_3PO_4$, resultado da reação ácido-base entre H_3PO_4 e NH_4OH , é pouco solúvel em ACN, já que ocasionou uma precipitação.

Deste modo, acrescentou-se a eluição com ACN neutra após a eluição com ACN modificada com base para eliminar possíveis traços básicos na fase extratora, impedindo que houvesse a precipitação do sal no solvente. E para não ocorrer a adsorção dos analitos no sal, coletou-se a fração ácida em frasco diferente da fração básica, a fim de impedir a precipitação.

Após secagem, a ressuspensão das frações foi feita em conjunto, em meio aquoso com 5% de ACN.

Tabela 5-1- Área normalizada em porcentagem (%) do ciprofloxacino e dos seus intermediários para as combinações de fase extratora e solvente.

m/z		332 (CIP)	263	288	306	316	330 A	330 B	344	346	348	362
Combinação												
Oasis HLB	A1-ACN	71,5	87,7	0,9	7,5	88,9	31,5	39,3	5,0	36,8	50,8	0,0
	A2-ACN 5% H ₃ PO ₄	99,7	85,5	78,6	17,8	88,7	49,4	40,0	14,7	76,3	51,2	81,0
	A3-ACN 5% NH ₄ OH	94,9	96,5	57,9	100,0	93,1	37,4	45,9	15,7	17,7	94,2	20,0
	A4-MeOH	96,8	100,0	71,4	10,7	90,3	33,5	43,4	17,3	26,6	49,4	0,0
	A5-MeOH 5% H ₃ PO ₄	73,8	49,3	25,1	6,1	62,4	15,4	25,7	16,6	17,9	35,0	58,0
	A6-MeOH 5% NH ₄ OH	88,9	96,9	92,7	22,2	92,2	38,4	44,0	15,5	18,9	52,4	13,0
Strata-X	B1-ACN	81,3	74,2	73,2	10,6	92,2	39,2	40,3	15,9	32,5	52,6	0,0
	B2-ACN 5% H ₃ PO ₄	98,3	67,3	87,4	17,6	85,1	49,6	41,3	12,9	100,0	54,0	0,0
	B3-ACN 5% NH ₄ OH	85,1	77,6	86,5	14,2	100,0	27,2	46,7	16,6	19,3	75,6	0,0
	B4-MeOH	71,0	59,4	76,9	8,3	65,1	53,0	33,8	11,8	46,3	33,9	0,0
	B5-MeOH 5% H ₃ PO ₄	94,1	64,6	100,0	13,9	83,0	46,9	39,3	15,8	92,4	55,9	0,0
	B6-MeOH 5% NH ₄ OH	77,4	79,5	78,7	25,9	91,3	18,7	41,2	16,2	11,4	46,5	0,0
Strata-X A	C1-ACN	51,1	33,8	14,7	7,6	29,7	18,3	25,8	0,3	6,5	8,0	100,0
	C2-ACN 5% H ₃ PO ₄	87,2	72,9	50,0	10,7	92,5	24,6	41,6	16,1	87,9	47,3	1,0
	C3-ACN 5% NH ₄ OH	9,0	0,0	7,8	0,0	4,6	0,0	2,6	0,0	0,0	0,0	0,0
	C4-MeOH	67,8	81,4	27,3	8,7	81,9	15,5	39,8	0,5	34,9	24,9	0,0
	C5-MeOH 5% H ₃ PO ₄	85,6	72,0	38,1	9,3	69,4	21,6	34,8	2,9	65,8	42,7	13,0
	C6-MeOH 5% NH ₄ OH	23,7	7,2	12,6	11,4	7,1%	0,3	1,3	2,8	2,3	3,4	0,0
Chromabond HR-X	D1-ACN	87,0	68,8	66,1	9,2	40,4	45,6	93,5	100,0	9,7	54,4	0,0
	D2-ACN 5% H ₃ PO ₄	99,9	79,3	79,8	14,8	36,3	98,3	100,0	76,7	9,3	58,0	0,0
	D3-ACN 5% NH ₄ OH	92,3	76,2	83,3	14,5	39,9	8,6%	59,6	82,7	8,9	100,0	28,0
	D4-MeOH	87,1	71,7	54,1	9,9	36,4	86,3	92,9	84,1	9,1	49,8	0,0
	D5-MeOH 5% H ₃ PO ₄	100,0	92,2	71,4	14,1	40,3	100,0	95,1	75,9	9,3	51,4	0,0
	D6-MeOH 5% NH ₄ OH	96,5	86,0	94,0	19,4	38,4	22,9	67,2	89,3	8,8	48,1	0,0
Chromabond HR-XA	E1-ACN	51,6	26,5	20,5	3,6	19,5	39,1	28,0	44,0	1,0	14,4	49,0
	E2-ACN 5% H ₃ PO ₄	49,2	73,6	22,9	6,0	36,8	30,2	26,8	83,7	9,2	48,0	34,0
	E3-ACN 5% NH ₄ OH	13,2	25,0	13,7	6,2	14,6	0,3	2,4	37,5	0,6	5,8	0,0
	E4-MeOH	52,0	72,7	24,7	4,7	42,2	56,5	31,1	79,1	5,2	47,3	7,0
	E5-MeOH 5% H ₃ PO ₄	50,6	87,4	20,9	4,5	38,5	52,6	28,7	82,9	7,3	47,3	10,0
	E6-MeOH 5% NH ₄ OH	27,8	24,4	12,9	3,3	4,1	3,7	0,9	29,5	3,4	12,4	0,0

Fonte: Autoria própria.

1.4 Fotólise do ciprofloxacino em baixa concentração

Para assegurar o potencial da fotólise como processo de degradação do CIP e observar a influência de uma matriz complexa na extração por SPE, realizou-se a sua degradação em baixa concentração em água e também em esgoto sintético, buscando reproduzir as condições reais de um efluente. A análise por LC-ESI-QToF/MS dos processos foi precedida pela etapa de pré-concentração, devido às justificativas que foram discutidas anteriormente. As amostras foram submetidas às extrações empregando-se Oasis HLB como sorvente e eluição sequencial de ACN “básica”, ACN pura e ACN “ácida”.

Primeiramente, avaliou-se o efeito do volume da amostra na etapa de extração, degradando-se a amostra em alta concentração e posteriormente diluindo-a 100 vezes em água ultrapura e em esgoto sintético para então ser submetida à extração. Os valores da recuperação de cada analito, apresentados na Tabela 5-2, correspondem à razão das áreas dos picos cromatográficos da amostra degradada e da amostra não degradada.

O protocolo apresentou uma boa recuperação geral dos analitos da amostra diluída em água, apresentando uma menor eficiência na extração dos intermediários de m/z 330 A, 344 e 346. O esgoto sintético não alterou significativamente a eluição dos intermediários m/z 263, 330 A, 344 e do CIP. Entretanto, as recuperações dos intermediários m/z 288, 330 B e 346 foram favorecidas e dos m/z 306, 316, 348 e 362 foram prejudicadas pelo esgoto sintético.

Os perfis de degradação do CIP e de formação dos intermediários em água e em esgoto sintético estão representados nas Figuras 5-4 e 5-5 respectivamente. As curvas foram traçadas considerando-se a área relativa, ou seja, a razão da área do pico cromatográfico do analito pela área do pico do CIP em tempo zero de reação.

Tabela 5 - 2- Recuperação relativa do ciprofloxacino e intermediários em água e esgoto sintético.

	Analitos (m/z)	CIP	263	288	306	316	330 A	330 B	344	346	348	362
Água ultrapura	Recuperação (%)	94,6	94,7	75,9	98,0	74,1	49,6	78,7	59,8	19,6	89,9	79,1
	DPR (%)	3,0	4,3	4,7	5,1	4,8	3,2	4,4	6,3	2,3	6,2	5,1
Esgoto sintético	Recuperação (%)	90,7	93,7	96,6	18,5	50,7	55,8	89,6	50,0	31,0	57,1	12,0
	DPR (%)	4,2	6,2	9,9	2,8	6,7	4,2	4,0	6,9	3,9	3,6	1,4

Fonte: Autoria própria.

As curvas de formação dos intermediários nas Figuras 5-4.b e 5-5.b apresentam diferenças evidentes. Na água, o intermediário, cuja concentração em que se forma é a mais elevada, é de m/z 316 e, no esgoto sintético, o intermediário de m/z 346. No entanto, pela Tabela 5-2, observa-se que o intermediário m/z 316 é mais bem recuperado em água e o m/z 346, em esgoto sintético. Logo, a diferença das curvas pode ter sido consequência da influência do meio na fotólise, na extração, na ionização em MS, ou na associação destas.

Em um recente trabalho publicado por Gardinali, P.R., et. al., (8) a fotodegradação do ciprofloxacino em água ultrapura também foi avaliada utilizando um fotoreator de lâmpada de mercúrio (UV 254). Os ensaios foram realizados em uma concentração inicial de 1 mg L^{-1} e as amostras foram analisadas por LC-ESI-IT/MS sem pré-concentração. Os autores relataram que o intermediário de m/z 316 foi observado em maior intensidade (65%) seguido pelo m/z 330 (48%).

Apesar dos perfis das curvas dos intermediários terem sido diferentes, os perfis da degradação do CIP assemelharam-se bastante. Como as recuperações do fármaco em água e em esgoto sintético apresentaram valores aproximados, deduz-se que a fotólise no segundo meio foi tão eficaz quanto em água. Em ambas as condições, a concentração do fármaco atingiu valores próximos de zero em 20 minutos de reação, mostrando a eficiência do processo em concentrações baixas do fármaco e em esgoto sintético.

1.5 Rota de degradação

As estruturas dos intermediários foram sugeridas essencialmente com base na espectrometria de massas e no que já foi proposto na literatura. Todos os íons isolados e monitorados durante os experimentos tiveram a sua identidade correlata à molécula inicial confirmada em espectros de massa de alta resolução e eventualmente MS/MS de alta resolução. O Anexo 2 apresenta os espectros de MS/MS obtidos em análises no LIT-Orbitrap e/ou QToF para todos os produtos de degradação encontrados. Suas estruturas foram propostas a partir das fórmulas moleculares obtidas com o auxílio da ferramenta *Smart Formula* presente no software *Data Analysis* da Bruker.

A Figura 5-6 apresenta os espectros de MS/MS dos intermediários de m/z 330. Ao observar o perfil de fragmentação foi possível propor as diferentes estruturas químicas para os dois isômeros que apresentavam a mesma fórmula molecular e diferentes tempos de retenção.

Figura 5- 4- Fotodegradação do ciprofloxacino ($0,10 \text{ mg L}^{-1}$) em água e os produtos de degradação formados ao decorrer de uma hora. (a) CIP e intermediários; (b) Apenas CIP; (c) Apenas intermediários.

Fonte: Autoria própria.

Figura 5- 5-Fotodegradação do ciprofloxacino (0,10 mg L⁻¹) em esgoto sintético e os produtos de degradação formados ao decorrer de uma hora. (a) CIP e intermediários; (b) Apenas CIP; (c) Apenas intermediários.

Fonte: Autoria própria.

Figura 5- 6- Espectro de massas obtido a partir de análises realizadas por LC–QqToF (ESI (+) MS/MS) para identificação das estruturas dos intermediários de m/z 330. **1:** m/z 330 A (8eV) ; **2:** m/z 330 B (35,5 eV).

Tabela 5- 3- Produtos de fotodegradação do ciprofloxacino e diferenças relativas à molécula intacta

<i>m/z</i>	Fórmula molecular	Diferença com o CIP (C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃)	Estruturas químicas propostas para os produtos da fotodegradação
263	C ₁₃ H ₁₁ N ₂ O ₃ F	-C ₄ H ₇ N	
288	C ₁₅ H ₁₇ N ₃ O ₃	-C ₂ H ₁ , -F	
306	C ₁₅ H ₁₆ FN ₃ O ₃	-C ₂ H ₂	
316	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₄	-CH, -F, +O	
330 A 330 B	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₄	-F, +O, +H	
344	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₅	-H, -F, +2O	
346	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₅	-F, +H, +2O	
348	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₄	+OH	
362	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₆	+ H, -F, + 3O	

Fonte: Autoria própria.

Figura 5- 7- Rota de degradação proposta para a fotólise do ciprofloxacino.

Fonte: Autoria própria.

As estruturas dos intermediários, bem como a rota de degradação estão ilustradas na Tabela 5-3 e Figura 5-7, respectivamente.

Pelos intermediários, pode-se deduzir que a oxidação do CIP baseou-se em: (i) eliminação do átomo de flúor (m/z 288, 316, 330 A e B, 344 e 346); (ii) reação no anel piperazinílico, formando aminas (m/z 263, 288, 330 B e 306), álcoois (m/z 346 e 348), cetonas (m/z 316 e 344) e amida (m/z 330); e (iii) abertura do anel do substituinte ciclopropílico (m/z 316).

Como não houve alteração do anel da quinolona (Figura 5- 8) em nenhum produto de degradação, espera-se que a atividade antimicrobiana ainda persista no meio onde se encontram presentes os intermediários e a CIP. No entanto, a perda do átomo de F, o que se observou para diversos produtos de degradação, sugere perda parcial da atividade.

Figura 5- 8- Estrutura da quinolona.

Fonte: Autoria própria.

Diversos trabalhos na literatura relataram produtos de degradação do ciprofloxacino (8–13). O intermediário de m/z 288 está relatado na literatura como produto da fotólise do CIP usando luz UV, correspondendo à fórmula molecular $C_{16}H_{19}FN_3O^+$ e a uma massa exata de 288,1507 (12). No presente estudo, o espectro de massa mostrou m/z 288,1331, que apresentaria um erro de 61,07 ppm em relação à estrutura sugerida na literatura. Ante esse fato, a estrutura proposta neste trabalho foi baseada na fórmula molecular $C_{15}H_{18}N_3O_3^+$. O espectro de MS/MS apresentado no Anexo 2 confirma a estrutura proposta. Apesar de a literatura já descrever estes produtos de degradação do ciprofloxacino que foram também encontrados no presente trabalho, as concentrações iniciais do fármaco avaliado foram significativamente maiores. A menor concentração inicial relatada na literatura foi de 1 mg L^{-1} e os intermediários foram avaliados apenas em água ultrapura. (8) O presente trabalho detectou e identificou intermediários da fotólise do CIP partindo de uma concentração inicial de $0,10 \text{ mg L}^{-1}$, ou seja, no mínimo 10 vezes menor que os trabalhos já publicados, além de avaliar a formação destes compostos em esgoto sintético.

2 Enrofloxacin

2.1 Avaliação dos intermediários formados durante a fotólise do enrofloxacin

As alíquotas coletadas ao longo da fotólise do ENR na concentração inicial de 10 mg L^{-1} foram analisadas por LC-ESI-QqToF/MS, possibilitando identificar os produtos de degradação, bem como descrever o perfil de formação e degradação dos produtos e do fármaco respectivamente. Foram identificados 10 intermediários de m/z 316,1664; 332,1419; 334,1584; 344,1621; 346,1401; 358,1701; 372,1576; 374,1748; 390,1470; e 390,1676. No cromatograma total de íons (TIC) da solução degradada até 15 min, representada na Figura 5-9, estão indicados os picos dos 10 intermediários e do ENR.

Os intermediários de m/z 390 não são isômeros, por distinguirem-se pela massa exata. O m/z 390,1735 apresenta menor tempo de retenção e foi designado como m/z 390 A, enquanto que o m/z 390,1446 de maior tempo de retenção como m/z 390 B.

Figura 5- 9- Cromatograma total de íons (TIC) da solução do enrofloxacin degradada por 15 min (em chaves, zoom do cromatograma do íon extraído ($m/z \pm 0,005 \text{ u}$) de alguns intermediários), indicando os picos correspondentes com base na m/z nominal de cada íon de interesse.

Fonte: Autoria própria.

2.2 Fotólise do enrofloxacino em alta concentração

Para visualização do perfil de degradação do ENR e de formação dos intermediários, foram traçadas curvas das áreas normalizadas dos analitos em função do tempo de fotólise. As áreas normalizadas representam a razão entre as áreas do pico cromatográfico dos analitos e do ENR no tempo zero de reação, isto é, da concentração inicial do fármaco. As curvas de degradação do ENR e de formação dos produtos estão ilustradas na Figura 5-10.

Mesmo após seis horas de exposição à radiação ultravioleta, os intermediários de m/z 374 e m/z 344 não foram totalmente degradados, persistindo no meio. Embora a concentração do fármaco se reduza, a toxicidade pode perdurar se os intermediários também apresentarem atividade.

Wammer et. al. (14) avaliaram a atividade toxicológica dos produtos da fotodegradação do ENR pela inibição do crescimento de *E. coli* e observaram o aumento da atividade ao longo do tempo de reação. Sem os padrões, não foi possível determinar individualmente a toxicidade dos intermediários de forma quantitativa. No entanto, os produtos principais foram isolados por HPLC preparativa e caracterizados qualitativamente como ativo ou inativo. O intermediário de m/z 374, que também foi constatado neste trabalho, apresentou atividade inibitória no crescimento de *E. coli*. (14) O ciprofloxacino (m/z 332) é constatado como um subproduto da fotólise do ENR, entretanto apenas parte da atividade antimicrobiana da solução fotodegradada pode ser relacionada à presença deste composto, visto que ele é um subproduto minoritário como pode ser observado na Figura 5-10c.

A fotólise mostrou-se eficaz na degradação do fármaco, visto que em uma hora de reação, a sua concentração decaiu a 3,18% e, em três horas, já não se encontrava presente no meio. Apesar de a atividade antimicrobiana poder persistir nos intermediários, esses compostos podem ser mais suscetíveis à degradação biológica e a fotodegradação pode anteceder o tratamento convencional de efluente. Mesmo na degradação do ENR em alta concentração, os intermediários são formados em concentrações muito baixas, o que pode ser verificado na Figura 5-10a. Para o intermediário m/z 374, que apresentou maior concentração, o máximo da área normalizada foi de 24,6% da área inicial do fármaco (A_0). Fica evidente, portanto, que para análises da degradação em menores concentrações serão necessárias as pré-concentrações da amostra.

Figura 5- 10- Fotodegradação do enrofloxacin (10 mg L⁻¹) e os produtos de degradação formados ao decorrer de 6 horas. (a)ENR e intermediários; (b) Apenas ENR; (c) Apenas intermediários.

Fonte: Autoria própria.

2.3 Triagem para a escolha da melhor combinação de sorvente-eluente

A fim de se efetuar a pré-concentração dos intermediários e do ENR em amostras com baixas concentrações, após o processo de degradação, foi necessária a determinação do melhor sorvente e eluente para extração desses analitos.

A determinação do tempo de fotólise da amostra a ser submetida à SPE foi dificultada pela gama dos produtos de degração e dispersão das concentrações em que se formaram. A amostra para a triagem da SPE consistiu de uma fração degradada por 10 min e outra por 30 min, a fim de que todos os intermediários estivessem presentes na amostra. As frações degradadas foram unidas formando uma amostra da qual tomou-se 25 mL para cada teste de triagem.

Na Tabela 5-4 está presente o desempenho relativo de cada combinação sorvente-eluente para cada analito. Admitiu-se o maior valor da área extraída do cromatograma total de íons como 100% e as outras áreas proporcionais a esta. Os valores de porcentagem acima de 80,0% e valores nulos estão em azul e vermelho respectivamente. Nota-se uma grande dispersão dos valores do desempenho da combinação sorvente-eluente para os analitos, mostrando que os compostos apresentam diferentes características físico-químicas. Não foi possível encontrar uma condição que obtivesse recuperações elevadas para uma mesma fase extratora.

As combinações A1 e B4 apresentaram recuperações consideráveis. A fim de obter uma melhor recuperação para todos os analitos, foram efetuadas extrações associando-se as combinações A1 e B4, como representado na Figura 5-11. Um primeiro teste foi feito misturando-se as fases Oasis HLB e Strata-X em um mesmo cartucho e um segundo teste colocando as fases em cartuchos acoplados em sequência, e a eluição sequencial consistiu de ACN e de MeOH.

Figura 5- 11- Esquema representativo do protocolo avaliado para pré-concentração

Para os testes com os cartuchos em sequência, a ordem dos mesmos também foi avaliada.

Tabela 5- 4– Área normalizada em porcentagem (%) do enrofloxacino e seus intermediários de cada combinação de sorvente-eluyente.

m/z Combinação		360 (ENR)	374	390 A	390 B	346	358	332	316	344	372	334
Oasis HLB	A1-ACN	92,3	79,2	0,0	100,0	45,0	89,0	100,0	23,5	5,5	69,7	50,3
	A2-ACN 5% H ₃ PO ₄	52,8	11,2	0,0	40,1	0,0	54,2	6,7	65,7	15,0	0,0	52,1
	A3-ACN 5% NH ₄ OH	94,6	19,6	1,2	0,0	0,0	58,1	9,7	29,5	58,3	79,1	100,0
	A4-MeOH	79,9	20,2	0,0	0,0	0,0	99,7	15,8	52,2	56,4	48,9	84,5
	A5-MeOH 5% H ₃ PO ₄	69,8	37,9	0,0	0,0	32,3	86,0	9,1	100,0	4,8	0,0	78,5
	A6-MeOH 5% NH ₄ OH	57,4	26,1	9,2	0,0	0,0	17,9	7,2	17,4	17,9	31,0	52,6
Strata-X	B1-ACN	68,7	50,6	100,0	0,0	82,8	81,7	4,8	23,3	48,6	40,6	0,0
	B2-ACN 5% H ₃ PO ₄	47,0	0,0	0,0	0,0	0,0	53,8	5,7	68,1	11,3	0,0	50,0
	B3-ACN 5% NH ₄ OH	90,6	29,1	0,0	0,0	0,0	77,5	9,6	32,2	83,5	60,1	0,0
	B4-MeOH	59,2	76,7	33,7	75,1	92,3	57,1	3,0	18,1	51,6	38,5	33,0
	B5-MeOH 5% H ₃ PO ₄	70,0	36,6	0,0	0,0	0,0	85,4	10,7	75,9	14,2	15,5	54,4
	B6-MeOH 5% NH ₄ OH	77,0	42,6	5,4	0,0	0,0	62,6	13,3	32,6	88,1	64,8	87,5
Strata-X A	C1-ACN	86,6	21,3	2,3	0,0	60,9	100,0	9,2	29,1	47,1	34,0	49,8
	C2-ACN 5% H ₃ PO ₄	48,6	0,0	0,0	0,0	0,0	51,7	4,8	37,5	32,5	0,0	32,0
	C3-ACN 5% NH ₄ OH	62,0	17,9	8,0	0,0	0,0	36,0	7,7	16,1	51,0	12,5	0,0
	C4-MeOH	67,1	44,5	20,5	0,0	37,9	93,3	8,9	20,0	93,4	52,5	49,2
	C5-MeOH 5% H ₃ PO ₄	77,8	50,4	0,0	0,0	32,7	71,9	0,0	90,2	4,7	0,0	0,0
	C6-MeOH 5% NH ₄ OH	3,9	0,0	0,0	0,0	0,0	14,6	3,4	8,7	10,0	13,7	15,2
Chromabond HR-X	D1-ACN	100,0	100,0	8,6	54,4	37,3	82,1	2,9	21,8	86,9	51,0	31,8
	D2-ACN 5% H ₃ PO ₄	55,4	18,1	0,0	0,0	0,0	49,0	7,4	1,2	12,8	0,0	57,4
	D3-ACN 5% NH ₄ OH	76,0	48,9	0,0	0,0	0,0	71,3	12,6	32,5	35,3	56,5	0,0
	D4-MeOH	70,9	78,5	10,2	73,4	43,2	90,3	0,0	24,7	45,0	55,3	38,6
	D5-MeOH 5% H ₃ PO ₄	66,5	63,4	0,0	0,0	100,0	94,1	0,0	10,9	39,1	14,4	53,1
	D6-MeOH 5% NH ₄ OH	78,4	31,0	10,5	0,0	0,0	59,7	8,8	26,6	60,9	61,3	56,9
Chromabond HR-XA	E1-ACN	97,2	57,1	3,3	0,0	31,4	63,9	3,2	15,9	84,9	42,4	35,5
	E2-ACN 5% H ₃ PO ₄	54,3	14,8	0,0	18,6	0,0	38,5	3,8	57,9	6,6	0,0	45,2
	E3-ACN 5% NH ₄ OH	58,8	17,3	7,5	0,0	0,0	20,6	3,7	9,3	100,0	20,3	0,0
	E4-MeOH	84,5	73,0	32,9	0,0	24,5	80,3	3,2	12,3	85,5	100,0	35,3
	E5-MeOH 5% H ₃ PO ₄	61,8	75,1	0,0	0,0	0,0	46,3	0,0	48,1	21,5	0,0	59,2
	E6-MeOH 5% NH ₄ OH	23,7	10,1	5,3	0,0	0,0	3,4	3,4	6,6	16,8	15,8	0,0

Fonte: Autoria própria

Figura 5- 12- Cromatogramas totais de íons (TIC). 1: Branco- solução degradada do enrofloxacinó sem pré-concentração. 2: Amostra pré-concentrada com cartuchos em sequência- Oasis-HLB (A) seguida da Strata-X (B). 3: Amostra pré-concentrada com cartuchos em sequência- Strata-X (B) seguida da Oasis-HLB (A). 4: Amostra pré-concentrada com cartucho preenchido com Oasis HLB (A) + Strata-X (B).

Fonte: Autoria própria.

A Figura 5-12 apresenta os cromatogramas totais de íons (TIC) obtidos após a avaliação do protocolo descrito anteriormente. É possível observar que os cromatogramas ilustrados nas Figuras 5-12 (2), 5-12-(3) e 5-12(4) apresentam o mesmo perfil, exceto no que diz respeito ao intermediário de m/z 390A que só foi pré-concentrado quando utilizou-se a fase extratora Strata-X acoplada em sequência com um cartucho contendo a fase extratora Oasis HLB (Figura 5-12 (2)). Uma hipótese para explicar a diferença entre os testes visualizados nas Figuras 5-12 (2), 5-12-(3) e 5-12(4) seria uma competição entre os analitos pelos sítios de extração da fase empregada no cartucho. A depender da ordem usada na disposição das fases extratoras, pode-se supor que alguns analitos eventualmente competidores do intermediário m/z 390A fiquem retidos na primeira camada, permitindo que então o intermediário m/z 390A encontre sítios de extração disponíveis na segunda camada. Enquanto que em outras combinações esses sítios poderiam ser competitivamente ocupados por outros compostos, impedindo a eficiente extração do intermediário m/z 390A.

2.4 Fotólise do enrofloxacino em baixa concentração

Com base nos resultados apresentados logo acima, as análises por LC-ESI-QqToF/MS das amostras degradadas na concentração inicial de $0,10 \text{ mg L}^{-1}$ de ENR, tanto em água quanto em esgoto sintético, foram precedidas de pré-concentração utilizando cartuchos acoplados preenchidos com as fases Strata-X seguida de Oasis HLB e eluição sequencial de ACN e MeOH.

Para avaliar o volume da amostra na etapa de extração, uma solução degradada na concentração de 10 mg L^{-1} (como a utilizada na etapa de triagem) foi utilizada como referência e posteriormente diluída em 100 vezes para então ser submetida à extração. Para a diluição foi utilizada água ultrapura e esgoto sintético. O valor da recuperação para cada analito está apresentado na Tabela 5-5.

Todos os analitos foram recuperados quando a amostra foi diluída em água ultrapura, exceto o m/z 390 B. Os de m/z 374, 346, 358, 334 e 332 obtiveram recuperações inferiores a 60%. Para os demais, as recuperações foram superiores a 70%. Já nas amostras diluídas em esgoto sintético não foi possível pré-concentrar os intermediários de m/z 346, 390 A e 390 B. Além disso, o de m/z 374 apresentou recuperação de apenas 15,7% e o m/z 334 de 47,2%. Para os outros analitos, as recuperações foram superiores a 60%.

Tabela 5- 5- Recuperação relativa do enrofloxacino e intermediários em água e esgoto sintético.

	Analitos (<i>m/z</i>)	ENR	374	390A	390B	346	358	332	316	344	372	334
Água ultrapura	Recuperação (%)	93,7	42,3	112,2	0	59,2	47,1	47,4	70,1	81,9	89,9	55,1
	DPR (%)	5,4	3,7	7,8	-	3,2	3,2	2,9	5,0	7,3	8,4	4,2
Esgoto sintético	Recuperação (%)	76,4	15,7	0	0	0	62,6	77,1	60,3	63,1	80,9	47,2
	DPR (%)	6,1	2,2	-	-	-	4,5	5,2	5,9	6,2	7,7	3,9

Fonte: Autoria própria.

As Figuras 5-13 e 5-14 ilustram as curvas de degradação do ENR e de formação dos intermediários em água e em esgoto sintético, respectivamente. Para traçar as curvas foi considerada a área relativa, ou seja, a razão da área do pico cromatográfico do analito pela área do pico do ENR em tempo zero de reação.

A degradação do ENR realizada na água ultrapura (Figura 5-13) teve o intermediário de *m/z* 374 com maior intensidade relativa (17,7%), seguido do *m/z* 390 A (12,5%), 358 (8,4%) e 344 (7,6%), os demais apresentaram intensidade máxima inferior a 5%. Este perfil se assemelha ao encontrado na degradação na concentração de 10 mg L⁻¹, onde ao *m/z* 374 também foi o intermediário de maior intensidade, seguido do *m/z* 358 e 344. O *m/z* 390 A teve uma recuperação significativamente maior que o *m/z* 358 (Tabela 5-5), fato que pode justificar sua maior intensidade na degradação realizada na concentração de 0,10 mg L⁻¹. Na amostra de 20 minutos o ENR não foi mais detectado. Quando a degradação foi realizada em esgoto sintético, o ENR não foi detectado após 10 minutos de fotólise. Entretanto, como sua recuperação foi menor em esgoto sintético não é possível afirmar que houve uma degradação mais rápida neste meio. O intermediário de *m/z* 374 não foi detectado, provavelmente devido a sua baixa recuperação (Tabela 5-5). O CIP (*m/z* 332) foi o que apresentou maior intensidade relativa (8%) seguido pelo *m/z* 372 (4%). A diferença das curvas pode ter sido consequência da influência do meio na fotólise, na extração, na ionização em MS, ou na associação destas.

Estes resultados evidenciam a dificuldade de análises de intermediários formados em degradações quando baixas concentrações iniciais dos fármacos e matrizes complexas são utilizadas. Como a resposta nas análises de ESI-MS é dependente da estrutura química da substância analisada, da composição de matriz e dos solventes utilizados durante a ionização,

nenhuma conclusão sobre as concentrações absolutas pode ser feita, visto a dificuldade encontrada em estabelecer protocolos validados de análises devido à ausência de padrões analíticos dos subprodutos. Mesmo quando é avaliada a degradação do fármaco em diferentes matrizes, quando os trabalhos já publicados abordam os produtos de degradação eles realizam os experimentos em água ultrapura. (6,14,15) Como exemplo, o trabalho de Skoríc, I., et.al. (15) estudou a degradação do norfloxacin, ciprofloxacin e do enrofloxacin na concentração inicial de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ utilizando simulador de irradiação solar em diferentes matrizes: água ultrapura, água do rio e águas residuais que simulavam a composição proveniente de uma indústria farmacêutica. Entretanto, a avaliação dos intermediários foi feita apenas em água ultrapura e a concentração inicial dos fármacos foi de 10 mg L^{-1} . Visto isso, apesar da dificuldade em comparar a degradação feita em água ultrapura com a realizada em esgoto sintético devido à diferença de recuperação dos analitos, pode-se considerar que os resultados encontrados foram relevantes quando comparados com os já publicados na literatura.

2.5 Rota de degradação

As estruturas dos intermediários foram sugeridas essencialmente com base na espectrometria de massas e no que já foi proposto na literatura. Todos os íons isolados e monitorados durante os experimentos tiveram a sua identidade correlata à molécula inicial confirmada em espectros de massa de alta resolução e eventualmente MS/MS de alta resolução. O Anexo 2 apresenta os espectros de MS/MS obtidos em análises no LIT-Orbitrap e/ou QToF para todos os produtos de degradação encontrados. Suas estruturas foram propostas a partir das fórmulas moleculares obtidas com o auxílio da ferramenta *Smart Formula* presente no software *Data Analysis* da Bruker.

A Figura 5-15 apresenta os espectros de MS/MS dos intermediários de m/z 390. Ao observar o perfil de fragmentação foi possível propor as diferentes estruturas químicas. As estruturas dos intermediários, bem como a rota de degradação estão ilustradas na Tabela 5- 6 e Figura 5-16, respectivamente.

Figura 5- 13-Fotodegradação do enrofloxacin (0,10 mg L⁻¹) em água e os produtos de degradação formados ao decorrer de uma hora. (a) ENR e intermediários; (b) Apenas ENR; (c) Apenas intermediários.

Fonte: Autoria própria.

Figura 5- 14- Fotodegradação do enrofloxacin (0,10 mg L⁻¹) em esgoto sintético e os produtos de degradação formados ao decorrer de uma hora. (a) ENR e intermediários; (b) Apenas ENR; (c) Apenas intermediários.

Fonte: Autoria própria.

Algumas reações de oxidação do CIP puderam ser observadas na oxidação do ENR, como a eliminação do átomo de flúor (m/z 316, 344, 346, 358, 372, 374 e 390 A), a abertura do anel piperazinílico (m/z 316, 334, 390 A e B) e reações no anel piperazinílico, formando amidas (m/z 344 e 372) e álcoois (m/z 346). Especialmente para o ENR, a oxidação baseou-se também nas reações do grupo etila ligado ao anel piperazinílico. A adição de uma hidroxila a esse grupo levou à formação do produto m/z 374 e a remoção da alquila levou ao CIP (m/z 332).

Apesar da similaridade entre os dois fármacos, apenas um produto de degradação foi comum aos dois, o m/z 346, além do próprio CIP. Semelhantemente à fotólise do CIP, não houve alterações no anel da quinolona, principal responsável pela atividade antimicrobiana. Logo, a fotólise pode não ser eficiente na supressão da atividade antimicrobiana. No entanto, a perda do átomo de flúor pode levar à diminuição da toxicidade. De qualquer maneira, a fotodegradação pode ser uma etapa complementar à degradação biológica.

Figura 5- 15- Espectro de massas obtido para identificação das estruturas dos intermediários de m/z 390. 1: m/z 390 A (20 eV) - LC-QqToF (ESI (+) MS/MS); 2: m/z 390 B (35% CE) – LIT-Orbitrap (HESI (+) MS/MS).

T: FTMS + p ESI Full ms2 390.15@cid35.00 [105.00-600.00]

Tabela 5- 6- Produtos de fotodegradação do enrofloxacin e diferenças relativas à molécula intacta

<i>m/z</i>	Fórmula molecular	Diferença com o ENR (C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃)	Estruturas químicas propostas para os produtos da fotodegradação
316	C ₁₇ H ₂₁ N ₃ O ₃	-C ₂ H; -F	
332	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	-C ₂ H ₄	
334	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ O ₃	-C ₂ H ₂	
344	C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₄	-C ₁ H; -F; +O	
346	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₅	-C ₂ H ₃ ; -F; +2O	
358	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₄	-F; +O; +H	
372	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O ₅	-H; -F; +2O	
374	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₅	-F; +H; +2O	
390	A= C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₆ B= C ₁₉ H ₂₀ FN ₃ O ₅	A= + 1H; -F; + 3O B= - 2H ;+ 2O	

Fonte: Autoria própria.

Figura 5- 16- Rota de degradação proposta para a fotólise do enrofloxacino.

Fonte: Autoria própria.

Conclusão

- Em uma hora, a concentração do CIP foi reduzida em 93,5%, na degradação realizada em concentração elevada.
- Foi possível identificar, na fotólise do CIP em alta concentração, dez produtos de degradação de m/z 330,1478; 288,1340; 346,1411; 344,1255; 316,1292; 330,1471; 306,1273; 348,1377; 362,1385 e 263,0852. As estruturas químicas dos compostos foram confirmadas por LC-LIT-Orbitrap/MS/MS.
- Mesmo após seis horas de exposição à radiação ultravioleta, os intermediários de m/z 316 e 346 não foram totalmente degradados, persistindo no meio.
- Apesar dos perfis das curvas dos intermediários terem sido diferentes, os perfis da degradação do CIP assemelharam-se bastante. Como as recuperações do fármaco em água e em esgoto sintético apresentaram valores aproximados, deduz-se que a fotólise no segundo meio foi tão eficaz quanto em água. Em ambas as condições, a concentração do fármaco atingiu valores próximos de zero em 20 minutos de reação, mostrando a eficiência do processo em concentrações baixas do fármaco e em esgoto sintético.
- O presente trabalho detectou e identificou intermediários da fotólise do CIP partindo de uma concentração inicial de $0,10 \text{ mg L}^{-1}$, ou seja, no mínimo 10 vezes menor que os trabalhos já publicados, além de avaliar a formação destes compostos em esgoto sintético.
- Foi possível identificar, na fotólise do ENR em alta concentração, dez produtos de degradação de m/z 316, 332, 334, 344, 346, 358, 372, 374, 390 A e 390 B, sendo o de m/z 332 o próprio CIP. As estruturas químicas dos compostos foram confirmadas por LC-LIT-Orbitrap/MS/MS.
- A fotólise mostrou-se eficaz na degradação do ENR, visto que em uma hora de reação, a sua concentração decaiu a 3,18% e, em três horas, já não se encontrava presente no meio.
- Mesmo após seis horas de exposição à radiação ultravioleta, os intermediários de m/z 374 e m/z 344 não foram totalmente degradados, persistindo no meio.
- As recuperações obtidas por cada fase extratora foram bem heterogêneas, impossibilitando visualizar uma estratégia unitária para extrair satisfatoriamente todos os analitos.

- O acoplamento dos cartuchos com fases extratoras diferentes se mostrou eficiente na pré-concentração dos intermediários do ENR.
- Apesar da similaridade entre os dois fármacos, apenas um produto de degradação foi comum aos dois, o m/z 346, além do próprio CIP.
- Na fotólise do CIP e do ENR, não houve alterações no anel da quinolona, principal responsável pela atividade antimicrobiana. Logo, a fotólise pode não ser eficiente na supressão da atividade antimicrobiana. No entanto, a perda do átomo de flúor, observada nos produtos da degradação do ENR e do CIP, pode levar à diminuição da toxicidade.

Referências

- 1 TURIÉL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A.; TADEO, J.L. Multiresidue analysis of quinolones and fluoroquinolones in soil by ultrasonic-assisted extraction in small columns and HPLC-UV. **Analytica Chimica Acta**, v. 562, n. 1, p. 30–35, 2006.
- 2 USLU, M.Ö.; YEDILER, A.; BALCIOĞLU, I.A.; SCHULTE-HOSTEDE, S. Analysis and Sorption Behavior of Fluoroquinolones in Solid Matrices. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 190, n. 1-4, p. 55–63, 2007.
- 3 SPELTINI, A.; STURINI, M.; MARASCHI, F.; PROFUMO, A. Fluoroquinolone antibiotics in environmental waters: sample preparation and determination. **Journal of separation science**, v. 33, n. 8, p. 1115–31, 2010.
- 4 KÜMMERER, K. Resistance in the environment. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 311–20, 2004.
- 5 RICHARD, J.; BOERGERS, A.; BESTER, K.; TUEK, J. Toxicity of the micropollutants Bisphenol A , Ciprofloxacin , Metoprolol and Sulfamethoxazole in water samples before and after the oxidative treatment. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 217, p. 506–514, 2014.
- 6 LI, Y.; NIU, J.; WANG, W. Photolysis of Enrofloxacin in aqueous systems under simulated sunlight irradiation: Kinetics, mechanism and toxicity of photolysis products. **Chemosphere**, v. 85, n. 5, p. 892–7, 2011.
- 7 VASCONCELOS, T.G.; HENRIQUES, D.M.; KÖNIG, A.; MARTINS, A.F.; KÜMMERER, K. Chemosphere Photo-degradation of the antimicrobial ciprofloxacin at high pH : Identification and biodegradability assessment of the primary by-products. **Chemosphere**, v. 76, n. 4, p. 487–493, 2009.
- 8 RANI, S.; PANDITI, V.R.; SHEA, K.E.O.; GARDINALI, P.R. Photodegradation of antibiotics under simulated solar radiation : Implications for their environmental fate. **Science of the Total Environment**, v. 471, p. 299–310, 2014.
- 9 VASCONCELOS, T.G.; HENRIQUES, D.M.; KÖNIG, A.; MARTINS, A.F.; KÜMMERER, K. Photo-degradation of the antimicrobial ciprofloxacin at high pH: identification and biodegradability assessment of the primary by-products. **Chemosphere**, v. 76, n. 4, p. 487–93, 2009.
- 10 HUBICKA, U.; ZMUDZKI, P.; TALIK, P.; ZUROMSKA-WITEK, B.; KRZEK, J. Photodegradation assessment of ciprofloxacin, moxifloxacin, norfloxacin and ofloxacin in the presence of excipients from tablets by UPLC-MS/MS and DSC. **Chemistry Central journal**, v. 7, p. 133, 2013.
- 11 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. 3-4, p. 288–294, 2010.

- 12 GUO, H.-G.; GAO, N.-Y.; CHU, W.-H.; LI, L.; ZHANG, Y.-J.; GU, J.-S.; GU, Y.-L. Photochemical degradation of ciprofloxacin in UV and UV/H₂O₂ process: kinetics, parameters, and products. **Environmental science and pollution research international**, v. 20, n. 5, p. 3202–13, 2013.
- 13 PAUL, T.; DODD, M.C.; STRATHMANN, T.J. Photolytic and photocatalytic decomposition of aqueous ciprofloxacin: transformation products and residual antibacterial activity. **Water research**, v. 44, n. 10, p. 3121–32, 2010.
- 14 WAMMER, K.H.; KORTE, A.R.; LUNDEEN, R. A; SUNDBERG, J.E.; MCNEILL, K.; ARNOLD, W. A Direct photochemistry of three fluoroquinolone antibacterials: norfloxacin, ofloxacin, and enrofloxacin. **Water research**, v. 47, n. 1, p. 439–48, 2013.
- 15 PERIŠA, M.; ŠKORIC, I.; BABIC, S. Photolytic degradation of norfloxacin , enrofloxacin and ciprofloxacin in various aqueous media. **Chemosphere**, v. 91, p. 1635–1642, 2013.

Capítulo 6

Conclusão geral e perspectivas

Conclusão geral

A pré-concentração de intermediários formados durante a fotodegradação dos antimicrobianos permitiu a avaliação da degradação destes em concentrações menores do que aquela empregada nos trabalhos já publicados que abordaram rotas de degradação. O perfil de degradação em diferentes concentrações apresenta indícios de ser diferente, tanto em perfil quanto na composição proporcional entre os produtos formados.

A avaliação de diferentes fases extratoras ante os diferentes compostos de interesse precisa ser cuidadosa. A inferência de escolha de um cartucho, meramente com base na resposta ao fármaco inalterado não deve ser adotada sem critérios que garantam perfeita analogia, pois as respostas dos produtos podem variar bastante em relação ao fármaco original.

Variações tão grandes na recuperação e eluição de diferentes compostos sugerem a possibilidade da combinação de diferentes fases extratoras, ou ainda a avaliação de novos materiais preparados ou selecionados com ênfase nessas moléculas.

A fotodegradação como recurso de remoção dos fármacos em efluentes se mostrou eficaz para os três antimicrobianos avaliados, tanto na água quanto no esgoto sintético. Os perfis de formação dos intermediários diferiram-se bastante no meio aquoso e no esgoto sintético, indicando que o meio pode influenciar tanto na degradação quanto na etapa de extração.

Foram identificados oito produtos de transformação da sulfametazina durante a fotólise, destes dois ainda não relatados na literatura (m/z 140 e 229). As análises da biodegradação da SMZ em reator anaeróbio permitiu a identificação de três produtos de transformação. O m/z 295 foi comum aos dois processos, fotólise e biodegradação. O m/z 227 foi descrito pela primeira vez como produto de biodegradação anaeróbia da SMZ.

Tanto para o CIP quanto para o ENR foram identificados 10 intermediários, apesar da similaridade entre os dois fármacos, apenas um produto de degradação foi comum aos dois, o m/z 346, além do próprio CIP que é intermediário do ENR.

Dentre as fases extratoras avaliadas, a Oasis HLB se mostrou mais eficiente na recuperação dos intermediários.

Esses resultados são promissores, visto que permitem uma aproximação às concentrações ambientalmente relevantes.

Perspectivas

- Aplicar o método de extração desenvolvido em estudos de biodegradação do ciprofloxacino e do enrofloxacino em reatores anaeróbios.
- Avaliar a toxicidade dos intermediários identificados no presente trabalho.
- Sintetizar ou purificar por HPLC preparativa os intermediários identificados, para quantificação absoluta desses compostos nos processos de degradação e no ambiente.

Anexo 1

Espectros de MS e/ou MS/MS da sulfametazina e dos intermediários

Lista de Espectros

Espectro 1 - Espectro de MS obtido em análises no LC–QqToF (ESI (+) MS) para o m/z 124	118
Espectro 2 - Espectro de MS obtido em análises no LC–QqToF (ESI (+) MS) para o m/z 140	118
Espectro 3 - Espectro de MS obtido em análises no LC–QqToF (ESI (+) MS) para o m/z 229	119
Espectro 4 - Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 215 A- Tempo de retenção 2,5 minutos	120
Espectro 5 - Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 215 B- Tempo de retenção 4,3 minutos	120
Espectro 6 - Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 231	122
Espectro 7 - Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 229	123
Espectro 8 - Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 293	123
Espectro 9 - Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 295	124
Espectro 10 - Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 279 (Sulfametazina)	126

Espectros de MS e/ou MS/MS da SMZ e dos intermediários

Espectro 1 - Espectro de MS obtido em análises no LC-QqToF (ESI (+) MS) para o m/z 124

Espectro 2- Espectro de MS obtido em análises no LC-QqToF (ESI (+) MS) para o m/z 140

Espectro 3- Espectro de MS obtido em análises no LC-QqToF (ESI (+) MS) para o m/z 229

Espectro 4- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 215 A- Tempo de retenção 2,5 minutos

Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectros 4 (m/z 215 A)

m/z (calculado)	m/z (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
215,1291	215,1285	$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_4^+$	-2,8
198,1026	198,1020	$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_3^+$	-3,0
174,1026	174,1020	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_3^+$	-3,4
158,0713	158,0707	$\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_3^+$	-3,8
134,0713	134,0708	$\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_3^+$	-3,7

Espectro 5- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 215 B- Tempo de retenção 4,3 minutos

Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectros 5 (m/z 215 B)

m/z (calculado)	m/z (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
215,1291	215,1285	$C_{12}H_{15}N_4^+$	-2,8
198,1026	198,1020	$C_{12}H_{12}N_3^+$	-3,0
174,1026	174,1020	$C_{10}H_{12}N_3^+$	-3,4
158,0713	158,0707	$C_9H_8N_3^+$	-3,8
134,0713	134,0708	$C_7H_8N_3^+$	-3,7

Espectro 6- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT- Orbitrap para o m/z 231

T: FTMS + p ESI Full ms2 231.12@cid35.00 [60.00-400.00]

Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 6 (m/z 231)

m/z (calculado)	m/z (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
231,1240	231,1236	$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}^+$	-1,7
214,0975	214,0970	$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}^+$	-2,3
124,0869	124,0866	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}_3^+$	-2,4
108,0444	108,0441	$\text{C}_6\text{H}_6\text{NO}^+$	-2,77

Espectro 7- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 229

T: FTMS + p ESI Full ms2 229.10@cid35.00 [60.00-400.00]

Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 7 (m/z 229)

m/z (calculado)	m/z (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
229,1084	229,1077	$C_{12}H_{13}N_4O^+$	-3,1
212,0818	212,0812	$C_{12}H_{10}N_3O^+$	-2,8

Espectro 8 - Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 293

T: FTMS + p ESI Full ms2 293.07@cid35.00 [80.00-400.00]

Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 8 (m/z 293)

m/z (calculado)	m/z (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
293,0703	293,0696	$C_{12}H_{13}N_4O_3S^+$	-2,4
229,1084	229,1078	$C_{12}H_{13}N_3O^+$	-2,6

Espectro 9- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 295

T: FTMS + p ESI Full ms2 295.08@cid35.00 [80.00-400.00]

Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 9 (m/z 295)

m/z (calculado)	m/z (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
295,0859	295,0859	$C_{12}H_{15}N_4O_3S^+$	-0,33
204,0437	204,0434	$C_6H_{10}N_3O_3S^+$	-1,5
172,0063	172,0059	$C_6H_6NO_3S^+$	-2,3
186,0332	186,0328	$C_6H_8N_3O_2S^+$	-2,2
124,0869	124,0867	$C_6H_{10}N_3^+$	-1,6
108,0444	108,0441	$C_6H_6NO^+$	-2,8

Espectro 10- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 279 (Sulfametazina)

T: FTMS + p ESI Full ms2 279.09@cid35.00 [75.00-400.00]

Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 10 (m/z 279)

m/z (calculado)	m/z (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
279,0910	279,0903	$C_{12}H_{15}N_4O_2S^+$	-2,5
204,0437	204,0432	$C_6H_{10}N_3O_3S^+$	-2,5
186,0332	186,0327	$C_6H_8N_3O_2S^+$	-2,7
156,0114	156,0109	$C_6H_6NO_2S^+$	-3,2
124,0869	124,0866	$C_6H_{10}N_3^+$	-2,4
108,0444	108,04410	$C_6H_6NO^+$	-3,7
92,0495	92,0491	$C_6H_6N^+$	-4,3

Anexo 2

**Espectros de MS e/ou MS/MS do ciprofloxacino, do
enrofloxacinó e dos intermediários**

Lista de Espectros

Ciprofloxacino

Espectro 1- Espectro de MS obtido em análises no LC–QqToF (ESI (+) MS) para o m/z 263	129
Espectro 2- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 332 (Ciprofloxacino)	130
Espectro 3- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT- Orbitrap para o m/z 263	130
Espectro 4- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 288	132
Espectro 5- Espectro de MS/MS obtido em análises no Orbitrap para o m/z 306.....	132
Espectro 6- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 316	134
Espectro 7- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 344	134
Espectro 8- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 346	135
Espectro 9- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 348	136
Espectro 10- Espectro de MS/MS obtido em análises no QqTOF para o m/z 362.....	138
Espectro 11- Espectro de MS obtido em análises no LC–QqToF (ESI (+) MS) para o m/z 362	138
Espectro 12- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 316	139
Espectro 13- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT- Orbitrap para o m/z 332 (CIP)	139
Espectro 14- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT- Orbitrap para o m/z 334	141
Espectro 15- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 344	141
Espectro 16- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 346	143
Espectro 17- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 358	143
Espectro 18- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 372	145
Espectro 19- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 374	145
Espectro 20- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 360 (Enrofloxacino)	147

Espectros de MS e/ou MS/MS do ciprofloxacino e dos intermediários.

Espectro 1- Espectro de MS obtido em análises no LC-QqToF (ESI (+) MS) para o m/z 263

Espectro 2- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 332 (Ciprofloxacino)

Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 2 (m/z 332)

m/z (calculado)	m/z (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
332,1405	332,1396	$C_{17}H_{19}FN_3O_3^+$	-2,7
314,1299	314,1291	$C_{17}H_{17}FN_3O_2^+$	-2,5
288,1507	288,1500	$C_{16}H_{19}FN_3O^+$	-2,4

Espectro 3-Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT- Orbitrap para o m/z 263

T: FTMS + p ESI Full ms2 263.08@cid35.00 [70.00-600.00]

Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 3 (m/z 263)

m/z (calculado)	m/z (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
263,0826	263,0817	$C_{13}H_{12}FN_2O_3^+$	-3,4
245,0721	245,0712	$C_{13}H_{10}FN_2O_2^+$	-3,7

Espectro 4-Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 288

Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 4 (m/z 288)

m/z (calculado)	m/z (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
288,1343	288,1331	$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_3^+$	-4,2
270,1237	270,1226	$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_2^+$	-4,1

Espectro 5- Espectro de MS/MS obtido em análises no Orbitrap para o m/z 306

T: FTMS + p ESI Full ms2 306.12@cid35.00 [80.00-600.00]

Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 5 (m/z 306)

m/z (calculado)	m/z (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
306,1248	306,1239	$C_{15}H_{17}FN_3O_3^+$	-2,9
288,1143	288,1134	$C_{15}H_{15}FN_3O_2^+$	-3,1
263,0826	263,0819	$C_{13}H_{12}FN_2O_3^+$	-2,7
245,0721	245,0714	$C_{13}H_{10}FN_2O_2^+$	-2,9

T: FTMS + p ESI Full ms2 316.12@cid35.00 [85.00-600.00]

<i>m/z</i> (calculado)	<i>m/z</i> (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
316,1292	316,1282	C ₁₆ H ₁₈ N ₃ O ₄ ⁺	-3,2
298,1186	298,1178	C ₁₆ H ₁₆ N ₃ O ₃ ⁺	-2,6

Espectro 7- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 344

T: FTMS + p ESI Full ms2 344.12@cid35.00 [90.00-600.00]

 Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 7 (m/z 344)

m/z (calculado)	m/z (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
344,1241	344,1233	$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_5^+$	-2,3
326,1135	326,1128	$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_4^+$	-2,1

Espectro 8- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 346

T: FTMS + p ESI Full ms2 346.13@cid35.00 [95.00-600.00]

 Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 8 (m/z 346)

m/z (calculado)	m/z (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
346,1397	346,1385	$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_5^+$	-3,5
328,1292	328,1281	$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_4^+$	-3,4

Espectro 9- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 348

T: FTMS + p ESI Full ms2 348.13@cid35.00 [95.00-600.00]

Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 9 (m/z 348)

m/z (calculado)	m/z (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
348,1354	348,1342	$\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{FN}_3\text{O}_4^+$	-3,4
330,1248	330,1238	$\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{FN}_3\text{O}_3^+$	-3,0
272,0830	272,0823	$\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{FN}_3\text{O}_2^+$	-2,6

Espectro 10- Espectro de MS/MS obtido em análises no QqTOF para o m/z 362

Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 10 (m/z 362)

m/z (calculado)	m/z (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
362,1347	362,1385	$C_{17}H_{20}N_3O_6^+$	10,5
344,1241	344,1254	$C_{17}H_{18}N_3O_5^+$	3,8
316,1292	316,1295	$C_{16}H_{18}N_3O_4^+$	0,95
276,0503	276,0510	$C_{13}H_{10}NO_6^+$	2,5

Espectro 11- Espectro de MS obtido em análises no LC-QqToF (ESI (+) MS) para o m/z 362

Espectros de MS e/ou MS/MS do enrofloxacinó e dos intermediários.

Espectro 12- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 316

T: FTMS + p ESI Full ms2 316.13@cid35.00 [85.00-600.00]

Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 12 (m/z 316)

m/z (calculado)	m/z (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
316,1656	316,1645	$C_{17}H_{22}N_3O_3^+$	-3,5
298,1550	298,1540	$C_{17}H_{20}N_3O_2^+$	-3,4
245,0921	245,0913	$C_{13}H_{13}N_2O_3^+$	-3,3

Espectro 13- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT- Orbitrap para o m/z 332 (CIP)

T: FTMS + p ESI Full ms2 332.14@cid35.00 [90.00-600.00]

Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 13 (m/z 332)

m/z (calculado)	m/z (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
332,1405	332,1395	$C_{17}H_{19}FN_3O_3^+$	-3,0
314,1299	314,1290	$C_{17}H_{17}FN_3O_2^+$	-2,8
288,1507	288,1498	$C_{16}H_{19}FN_3O^+$	-3,1

Espectro 14- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT- Orbitrap para o m/z 334

T: FTMS + p ESI Full ms2 334.17@cid35.00 [90.00-600.00]

Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 14 (m/z 334)

m/z (calculado)	m/z (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
334,1561	334,1549	$C_{17}H_{21}FN_3O_3^+$	-3,6
316,1456	316,1445	$C_{17}H_{19}FN_3O_2^+$	-3,5
263,0826	263,0817	$C_{13}H_{12}FN_2O_3^+$	-3,4

Espectro 15- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 344

T: FTMS + p ESI Full ms2 344.16@cid35.00 [90.00-600.00]

Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 15 (m/z 344)

m/z (calculado)	m/z (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
344,1605	344,1594	$C_{18}H_{22}N_3O_4^+$	-3,2
326,1499	326,1489	$C_{18}H_{20}N_3O_3^+$	-3,1

Espectro 16- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 346

T: FTMS + p ESI Full ms2 346.14@cid35.00 [95.00-600.00]

Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 16 (m/z 346)

m/z (calculado)	m/z (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
346,1397	346,1386	$C_{17}H_{20}N_3O_5^+$	-3,2
328,1292	328,1282	$C_{17}H_{18}N_3O_4^+$	-3,0

Espectro 17- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 358

T: FTMS + p ESI Full ms2 358.18@cid35.00 [95.00-600.00]

Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 17 (m/z 358)

m/z (calculado)	m/z (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
358,1761	358,1752	$\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_4^+$	-2,5
340,1656	340,1646	$\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_3^+$	-2,9

Espectro 18- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 372

T: FTMS + p ESI Full ms2 372.16@cid35.00 [100.00-600.00]

Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 18 (m/z 372)

m/z (calculado)	m/z (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
372,1554	372,1545	$C_{19}H_{22}N_3O_5^+$	-2,4
354,1448	354,1440	$C_{19}H_{20}N_3O_4^+$	-2,3

Espectro 19- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 374

T: FTMS + p ESI Full ms2 374.17@cid35.00 [100.00-600.00]

Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 19 (m/z 374)

m/z (calculado)	m/z (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
374,1710	374,1704	$C_{19}H_{24}N_3O_5^+$	-1,6
356,1605	356,1599	$C_{19}H_{22}N_3O_4^+$	-1,7

Espectro 20- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o m/z 360 (Enrofloxacino)

T: FTMS + p ESI Full ms2 360.17@cid35.00 [95.00-600.00]

Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 20 (m/z 360)

m/z (calculado)	m/z (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
360,1718	360,1709	$C_{19}H_{23}FN_3O_3^+$	-2,5
342,1612	342,1603	$C_{19}H_{21}FN_3O_2^+$	-2,6
316,1820	316,1811	$C_{18}H_{23}FN_3O^+$	-2,8