



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências

Estudo da degradação eletroquímica da oxitetraciclina

Catarina Isabel Silva Oliveira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof^a. Doutora Ana Maria Carreira Lopes
Co-orientadora: Prof^a. Doutora Maria José Alveolos Pacheco

Covilhã, Junho de 2013

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço à Universidade da Beira Interior, instituição que me acolheu e disponibilizou o espaço e meios para a concretização deste trabalho. À Fundação para a Ciência e a Tecnologia, FCT, pelo financiamento dos projetos PEst-OE/CTM/UI0195/2011, da Unidade de Materiais Têxteis e Papeleiros, e PTDC/AAC-AMB/103112/2008, que permitiu a aquisição do equipamento usado.

Agradeço à minha orientadora Professora Doutora Ana Maria Carreira Lopes, pelos conselhos e conhecimentos transmitidos para a realização deste trabalho e alargar os meus conhecimentos no ramo da Química, especificamente, na Eletroquímica. Muito obrigado pela competência com que orientou esta dissertação e pela disponibilidade e tempo que gentilmente me dedicou. Não quero deixar também de agradecer à Professora Doutora Maria José Alveolos Pacheco pela disponibilidade, colaboração e qualidade dos ensinamentos transmitidos ao longo de todo o ano, nomeadamente sobre a técnica de HPLC, que me permitiu aprender mais aprofundadamente, quer na teoria quer na prática, todos os conhecimentos essenciais para a realização deste trabalho.

Agradeço ao meu pai pelos conselhos sábios, apoio, incentivo, carinho, confiança e amizade; agradeço à minha mãe que embora já não esteja presente nesta fase da minha vida, me educou e ensinou a ser a pessoa que sou hoje e sei que estaria muito orgulhosa por ter chegado até aqui; agradeço a toda a minha família por tudo o que me ensinaram e apoiaram em toda a minha vida.

A todos os meus colegas de curso pelo apoio e disponibilidade prestada em todos os momentos deste percurso académico.

Ao Sílvio pelo apoio, incentivo, amizade e companheirismo demonstrado ao longo destes anos de vida universitária.

Por último, quero agradecer a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta etapa.

A todos,

Muito Obrigada!

Resumo

A acumulação de poluentes orgânicos persistentes no meio aquático tem sido uma preocupação mundial emergente. Este tipo de poluentes inclui compostos como corantes, fármacos e aminas aromáticas, entre outros. Embora os métodos de tratamento de águas residuais economicamente mais vantajosos sejam, sem dúvida, os biológicos, o facto de muitos destes poluentes apresentarem resistência à degradação bioquímica leva à procura de técnicas alternativas. Neste contexto, os tratamentos eletroquímicos, em particular a oxidação anódica, podem ser uma alternativa bastante promissora para a eliminação de poluentes persistentes.

O presente trabalho teve como principal objetivo o estudo da conversão e/ou mineralização de um fármaco da família das tetraciclina, a oxitetraciclina, por oxidação anódica, utilizando como ânodo o elétrodo de BDD, tendo-se efetuado o estudo da influência da densidade de corrente aplicada. Os ensaios de degradação eletroquímica da oxitetraciclina foram realizados num sistema que opera em modo “batch” com agitação, numa célula eletroquímica que contém um elétrodo de BDD, como ânodo, e como cátodo uma placa de aço inoxidável, usando sulfato de sódio como eletrólito suporte. Nas amostras recolhidas ao longo dos ensaios foram efetuadas análises de Carência Química de Oxigénio (CQO), de Carbono Orgânico Total (COT), de espectrofotometria de absorção do Ultravioleta-Visível e de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

Os resultados obtidos permitiram concluir que, nos ensaios de eletrodegradação da oxitetraciclina a remoção de COT aumenta com a intensidade de corrente, não se observando um comportamento tão linear para a CQO. Isto demonstra que o índice de mineralização da OTC varia com a intensidade de corrente. Este acontecimento pode ser devido à formação de metabolitos resistentes à degradação. Por análise de HPLC verifica-se que a taxa de remoção de oxitetraciclina é muito superior à observada para a remoção de CQO ou de COT. Isto permite deduzir que existe facilidade em destruir a estrutura da OTC por oxidação anódica com um elétrodo de BDD. No entanto, a posterior oxidação dos metabolitos é mais lenta, embora com um grau de mineralização elevado.

Com o intuito de identificar metabolitos da degradação da OTC formados durante os ensaios de oxidação anódica, foram analisadas amostras recolhidas ao longo do ensaio por HPLC, tendo-se verificada a existência de ácido oxâmico nos produtos de degradação. Para além do pico do ácido oxâmico, foram detetados novos picos que indicam a existência de outros metabolitos formados.

Palavras-chave

Degradação eletroquímica, fármacos, oxitetraciclina, BDD, ácido oxâmico, HPLC.

Abstract

Nowadays, the occurrence of undesired accumulation of persistent organic pollutants, such as, dyes, pharmaceuticals and aromatic amines in the aquatic environment has been an emerging global concern. Although biological wastewater treatments are the most economical and advantageous processes, many of these pollutants are resistant to biodegradation. In this context, electrochemical treatments, especially the anodic oxidation, may be a promising alternative.

The main objectives of this work are the study of the conversion and/or mineralization of an antibiotic, oxytetracycline, by anodic oxidation, using as anode the BDD electrode and applying different current intensities. The electrochemical degradation assays of the oxytetracycline were performed in a batch system, with stirring, in an electrochemical cell containing a BDD electrode as anode and a stainless steel plate as cathode, using sodium sulfate as supporting electrolyte. The samples collected throughout the assays were analyzed for Chemical Oxygen Demand (COD) and Total Organic Carbon (TOC) contents and Ultraviolet-Visible Absorption spectra and HPLC chromatograms were also performed.

The results showed that in the electrodegradation assays of oxytetracycline the TOC removal increases with current intensity. COD variation with current intensity presented a similar behavior but not so regular. These facts demonstrate that, in general, the rate of mineralization of OTC varies with current intensity. This may be due to the formation of intermediates/metabolites more resistant to electrodegradation. By HPLC analysis it was found that oxytetracycline removal is higher than COD or TOC removals. This fact shows that it is easy to destroy the structure of OTC by anodic oxidation with a BDD electrode. However, the subsequent oxidation of the formed metabolites is slower, although with a high degree of mineralization.

In order to identify the metabolites formed during OTC anodic oxidation, it was investigated, by HPLC, the existence of oxamic acid in the degradation products. In addition to the oxamic acid peak, new peaks were detected, indicating the presence of other metabolites, resulting from the electrodegradation process.

Keywords

Electrochemical degradation, pharmaceuticals compounds, oxytetracycline, BDD, oxamic acid, HPLC.

Índice

Capítulo 1 - Introdução e objectivos	1
Capítulo 2 - Revisão bibliográfica	3
2.1 - Os fármacos como contaminantes emergentes	3
2.2 - Contaminações das águas por fármacos e metabolitos	4
2.2.1 - Fontes de contaminação ambiental	5
2.2.2 - Efeitos e destino no meio ambiente	6
2.2.3 - Riscos globais dos fármacos	8
2.3 - Antibióticos no meio ambiente	10
2.3.1 - Fontes e ocorrência de antibióticos no meio ambiente	11
2.4 - Antibióticos tetraciclínicos	13
2.4.1 - Tetraciclina e produtos de degradação	14
2.4.2 - Oxitetraciclina	15
2.5 - Processos de tratamento de efluentes contendo fármacos	16
2.5.1 - Ozonação	18
2.5.2 - Fenton e foto-Fenton	19
2.5.3 - Fotólise	19
2.5.4 - Fotocatálise semi-condutora	20
2.5.5. - Processos eletroquímicos	21
2.5.5.1 - Oxidação anódica	21
2.6 - Formas de detecção de compostos farmacêuticos	28
2.6.1 - Cromatografia líquida de alta eficiência	28
Capítulo 3 - Materiais e métodos	31
3.1 - Reagentes	31
3.2 - Equipamento	32
3.3 - Ensaio de eletrodegradação da oxitetraciclina	34
3.4 - Métodos de análise	36
3.4.1 - Determinação da Carência Química de Oxigénio	36
3.4.2 - Determinação do Carbono Orgânico Total	37
3.4.3 - Análise espectrofotométrica na zona UV-Visível	37
3.4.4 - Análise por cromatografia de alta eficiência	37
Capítulo 4 - Resultados e discussão	39
4.1 - Estudos do efeito da densidade de corrente	39
4.1.1 - Estudo da degradação da oxitetraciclina	39
4.1.2 - Estudo da degradação da oxitetraciclina por análise de HPLC	43
4.1.3 - Identificação do metabolito ácido oxâmico por análise de HPLC	47
Capítulo 5 - Conclusões e perspectivas futuras	51
Bibliografia	53
Anexos	67

Lista de acrónimos

ACTC	Anidroclortetraciclina
ATC	Anidrotetraciclina
BDD	Diamante Dopado com Boro
CQO	Carência Química de Oxigénio
COT	Carbono Orgânico Total
ECTC	Epiclortetraciclina
CTC	Clortetraciclina
ETA's	Estações de Tratamento de Águas
ETAR's	Estações de Tratamento de Águas Residuais
EOTC	Epioxitetraciclina
ETC	Epitetraciclina
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
OTC	Oxitetraciclina
PDA	<i>Photodiode array</i>
POA's	Processos Oxidativos Avançados
ppb	Partes por bilião
ppt	Partes por trilião
RNA	Ácido ribonucleico
Ti/IrO ₂	Titânio dopado com dióxido de irídio
Ti/RuO ₂ -IrO ₂	Titânio dopado com dióxido de rutílio e dióxido de irídio
Ti/SnO ₂	Titânio dopado com dióxido de estanho
TC's	Tetraciclina
tRNA	Ácido ribonucleico de transferência
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

Capítulo 1 - Introdução e objectivos

O uso crescente de fármacos tornou-se num novo problema ambiental, que tem despertado grande preocupação nos últimos anos. Apesar de serem encontrados em concentrações muito baixas no meio ambiente, ainda existe uma falta de conhecimento sobre os riscos a longo prazo que a presença de uma grande variedade de fármacos pode constituir para os ecossistemas e para a saúde humana. Estes fármacos são continuamente introduzidos no meio ambiente, devido à sua utilização doméstica, veterinária e hospitalar, e a sua presença tem sido detetada nas águas residuais (Bendz *et al.*, 2005; Roberts e Thomas, 2006; Kim *et al.*, 2007; Ternes *et al.*, 2007; Deblonde *et al.*, 2011). A sua possível atividade biológica, associada à fraca eliminação durante os processos convencionais de tratamento de águas residuais, pode levar a efeitos adversos a nível ambiental, nomeadamente da contaminação dos solos e dos recursos hídricos (Calderón-Preciado *et al.*, 2011; Lapworth *et al.*, 2012). Perante estes factos, existe uma necessidade crescente de desenvolver métodos alternativos para o tratamento das águas residuais, que permita uma eficiente remoção destes contaminantes, evitando a sua acumulação no ecossistema aquático. Recentemente, têm sido desenvolvidas novas tecnologias baseadas na aplicação de processos oxidativos avançados (POA's), nomeadamente a oxidação anódica com elétrodos de boro dopado com diamante (BDD), que se tem mostrado eficiente para compostos recalcitrantes (Brinzila *et al.*, 2012; El-Ghenymy *et al.*, 2012; Oturan *et al.*, 2013).

O objetivo deste trabalho consistiu em estudar a degradação eletroquímica de um fármaco com propriedades antibióticas, da família das tetraciclina, a oxitetraciclina. O processo eletroquímico aplicado foi a oxidação anódica com BDD, tendo-se testado diferentes condições experimentais.

O trabalho realizado, aqui descrito, encontra-se organizado em quatro partes distintas.

No Capítulo 2 faz-se uma introdução sobre os fármacos e o seu impacto no meio ambiente e nos recursos aquíferos, apresentando-se o estado da arte dos principais processos usados no tratamento de águas residuais para a remoção destes poluentes pseudo-persistentes, dando-se especial ênfase ao processo de oxidação anódica. Também é descrita informação sobre a técnica analítica de cromatografia líquida de alta eficiência, usada para analisar os produtos resultantes da degradação eletroquímica.

No Capítulo 3, listam-se os reagentes e descrevem-se as principais técnicas de análise usadas para o controlo dos ensaios de oxidação anódica, encontrando-se a descrição detalhada das técnicas usadas em Anexos. Neste capítulo apresentam-se também descrições dos ensaios de oxidação anódica.

No Capítulo 4 apresentam-se os resultados experimentais para os ensaios realizados, que são também aqui comentados, tirando-se algumas conclusões. Contudo, as principais conclusões estão no Capítulo 5, onde também se fazem algumas conjeturas sobre trabalho futuro.

Capítulo 2 - Revisão bibliográfica

As pesquisas ambientais estão a tomar um novo rumo de investigação, para além da gestão de resíduos sólidos e controlo da poluição de águas residuais municipais. Nos últimos anos, bastantes estudos têm demonstrado que muitos constituintes químicos e microbianos, que tradicionalmente não eram considerados contaminantes, estão presentes no meio ambiente à escala global. De entre os contaminantes emergentes destacam-se, por exemplo, fármacos, produtos químicos domésticos e pesticidas, que são normalmente introduzidos no ambiente através de diversas vias como águas residuais municipais, agrícolas e hospitalares, estrume animal e escoamento agrícola. A principal preocupação centra-se no facto destes contaminantes estarem a ser continuamente introduzidos em águas como poluentes, e provocarem efeitos ecotoxicológicos e afetarem o consumo de água potável. Estes contaminantes são assim considerados pseudo-persistentes, e a sua remoção é ineficaz por processos convencionais de tratamento de águas residuais. Perante este problema, existe a necessidade de desenvolver métodos alternativos para a sua degradação e eliminação.

Neste capítulo serão introduzidos alguns conceitos relacionados com o impacto ambiental e na saúde destes poluentes emergentes, dando-se especial ênfase aos fármacos e aos mecanismos da sua degradação por processos de oxidação avançada, particularizando para os processos eletroquímicos. Também serão referidas técnicas analíticas utilizadas na deteção e análise destes poluentes orgânicos, especialmente técnicas cromatográficas como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - *High performance liquid chromatography*).

2.1 - Os fármacos como contaminantes emergentes

A indústria, a agropecuária e a população em geral contribuem para o aparecimento de uma miríade de compostos químicos nas águas residuais, provocando uma preocupação mundial relacionada com o eventual impacto destes compostos na vida selvagem e na saúde humana (Deblonde *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, têm sido relatadas evidências da presença de novos compostos, designados por "poluentes emergentes", nas águas residuais, nas águas subterrâneas e nas águas superficiais (Daughton *et al.*, 1999; Heberer *et al.*, 2002; Barceló, 2003; Daughton, 2004; Petrovic *et al.*, 2009). Os poluentes emergentes são produtos novos ou produtos químicos sem estatuto regulamentar e cujos efeitos sobre o meio ambiente e a saúde humana são desconhecidos, mas que podem ser candidatos a regulamentação futura, dependendo da pesquisa sobre os seus potenciais efeitos para a saúde e os resultados da monitorização da sua ocorrência. Os contaminantes emergentes incluem surfactantes, fármacos e produtos de higiene pessoal, desreguladores endócrinos, drogas ilícitas, aditivos de gasolina e muitos outros grupos de compostos. A sua principal característica é a de não precisarem de persistir

no ambiente para causar efeitos negativos, uma vez que a sua introdução contínua no meio ambiente compensa mesmo taxas elevadas de transformação/remoção (Barceló, 2003).

A diretiva-quadro da União Europeia 2000/06/CE que estabelece um quadro de acção comunitária no domínio da política da água, apresenta no anexo X uma lista de 33 substâncias prioritárias ou grupos de substâncias que incluem metais, pesticidas, ftalatos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e desreguladores endócrinos. Refere também que estas substâncias devem ser removidas dentro de um objectivo de qualidade e preservação do bom estado ecológico da água até 2015. Além disso, foi criado em 2007, na Europa, o regulamento REACH, que visa identificar produtos químicos perigosos e substitutos menos perigosos. A aplicação deste regulamento exige a remoção de, por exemplo, três ftalatos classificados como cancerígenos, tóxicos para a reprodução ou persistentes no meio ambiente (Deblonde *et al.*, 2011).

Os efeitos da presença de metais, hidrocarbonetos, bactérias ou iões como nitratos (NO_3^-) e amónia (NH_4^+) na água têm sido descritos há várias décadas e o seu impacto na saúde humana e no ambiente são conhecidos. Estes contaminantes estão sujeitos a regulamentação e controlo. Contudo, a ocorrência e os efeitos dos ftalatos, fármacos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, bifenilpoliclorados e o bisfenol A ainda não são muito claros (Deblonde *et al.*, 2011).

2.2 - Contaminações das águas por fármacos e metabolitos

A maioria dos fármacos são substâncias químicas produzidas pelo Homem, e que não se encontram presentes na natureza. Os fármacos, em geral, são agrupados em diferentes classes: hormonais, anti-epilépticos, anti-inflamatórios, estatinas, antidepressivos, beta-bloqueadores, antibióticos, agentes de diagnóstico, e outros (Miège *et al.*, 2009). Estas moléculas têm utilização doméstica, veterinária e hospitalar. Após administração, os fármacos humanos são excretados, em grande parte inalterados ou metabolizados e assim, podem entrar no ciclo da água (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Fent *et al.*, 2006). Numerosos estudos têm demonstrado a presença destes contaminantes em águas residuais domésticas e hospitalares e em águas superficiais (Heberer, 2002; Roberts e Thomas, 2006; Kim *et al.*, 2007). Também têm sido detetados nas águas subterrâneas e, até mesmo, em águas potáveis (Watkinson *et al.*, 2009; Lapworth *et al.*, 2012). Podem ainda atingir o solo, devido ao uso de águas residuais para irrigação e, a uma escala muito menor, devido a derrames ocorridos durante a sua produção (Zuccato *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2004; Ternes *et al.*, 2007).

A Figura 2.1 apresenta todas as relações existentes associadas à presença de fármacos em vários tipos de águas, bem como as suas origens e destinos.

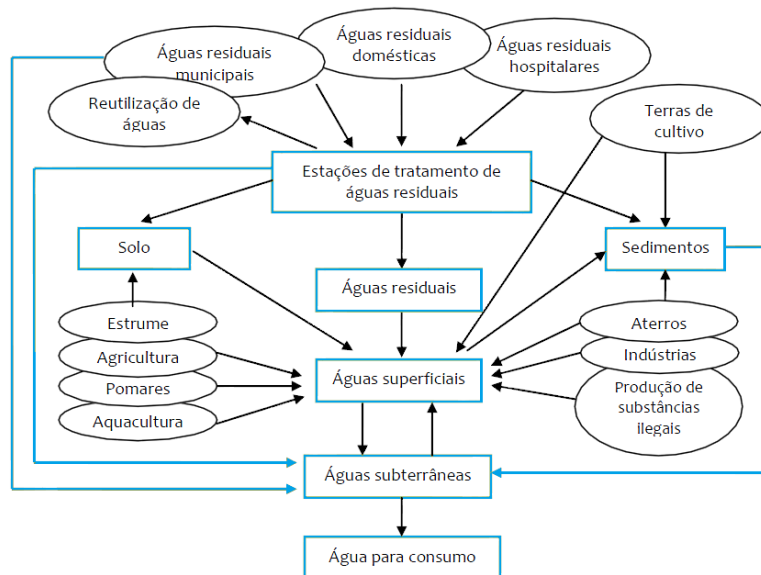


Figura 2.1 - Ocorrência e dispersão de fármacos no ambiente (Adaptado de Dsbka *et al.*, 2004).

2.2.1 - Fontes de contaminação ambiental

O caminho mais óbvio para a contaminação ambiental por fármacos é a via de excreção inalterada na urina e nas fezes, embora outros mecanismos antropogênicos devessem ser considerados, nomeadamente:

- a) O metabolismo pós-consumo, uma vez que muitos fármacos são metabolizados pelo organismo e convertidos em compostos hidrofóbicos, para mais facilmente serem excretados como resíduos polares (Timbrell, 2002).
- b) Os compostos de diagnóstico, tais como meios de contraste de raios-X que são descarregados diretamente nas suas formas nativas (Kummerer, 2001).
- c) Eliminação doméstica; tanto formulações tópicas ou fármacos não utilizados (fora de validade ou indesejados) que são descartados através de vias sanitárias ou através de recolha de resíduos (Braund *et al.*, 2009; Glassmayer *et al.*, 2009), antes de serem levados para aterros sanitários, onde aparecem como contaminantes dos ecossistemas terrestres. Em alternativa, podem também afetar os meios aquáticos (Heberer *et al.*, 2002).
- d) Os impactos devido às atividades antropogênicas como, por exemplo, as lamas produzidas nas estações de tratamento de águas residuais (ETAR's), cujas águas podem conter fármacos não suspeitos, que são aplicadas na agricultura como fertilizante, e os medicamentos veterinários que também são excretados pela urina e fezes de animais, sendo espalhados na terra como fertilizante. Isto leva à potencial contaminação direta do solo, em que existe o risco de escoamento com chuva forte, contaminando tanto águas superficiais como subterrâneas (Kay *et al.*, 2005; Kemper, 2008; Topp *et al.*, 2008). Outro exemplo de uma atividade antrópica é aquacultura, cujos fármacos empregues, bem como os seus metabolitos e produtos de degradação, são diretamente descarregados nas águas superficiais (Lalumera *et al.*, 2004). Outra importante fonte de contaminação ambiental por fármacos são os efluentes de instalações de produção de fármacos (Larsson *et al.*, 2007).

2.2.2 - Efeitos e destino no meio ambiente

A preocupação ambiental não passa necessariamente pela quantidade elevada de um determinado fármaco, mas sim pela sua persistência no ambiente e pela sua atividade biológica crítica, resultante da elevada toxicidade e do potencial para gerar efeitos nos processos biológicos chave, como é o caso da reprodução. Para além da persistência dos fármacos no ambiente, outro problema resulta de terem sido produzidos para desencadear efeitos fisiológicos específicos, tornando a biota mais susceptível a impactos advindos da presença destes compostos no meio hídrico. Embora a concentração de alguns fármacos seja baixa, a sua combinação poderá ter efeitos pronunciados devido ao mecanismo de ação (Filho, 2007). Estes compostos são maioritariamente detetados na gama dos nanogramas e microgramas por litro podendo, no entanto, ser suficientes para induzir efeitos tóxicos (Fent *et al.*, 2006).

Anualmente, são produzidas toneladas de fármacos em todo o mundo, que são consumidos por humanos e animais (Fent *et al.*, 2006; Glassmeyer *et al.*, 2009). Eles são concebidos principalmente para ter determinados modos fisiológicos de ação e frequentemente para resistir à inativação antes de exercer o seu efeito terapêutico. Contudo, estas mesmas propriedades são paradoxalmente responsáveis por efeitos de bioacumulação e de toxicidade em ecossistemas aquáticos e terrestres (Fent *et al.*, 2006; Huerta *et al.*, 2012). De uma forma diferente de alguns poluentes convencionais (tais como os pesticidas, os detergentes, os combustíveis, entre outros), os fármacos são distribuídos de forma contínua em baixos níveis o que pode dar origem a toxicidade, mesmo sem altas taxas de persistência (Dorne *et al.*, 2007; Glassmeyer *et al.*, 2008).

A possibilidade de efeitos adversos que possam surgir a partir da presença de fármacos não afeta só a saúde humana, mas também os organismos aquáticos. Têm ocorrido efeitos pouco significativos pela exposição contínua durante o ciclo de vida aquático dos vertebrados e invertebrados a concentrações de fármacos sub-terapêuticas. Estes efeitos surgem pela acumulação lenta que se manifesta numa condição final irreversível, que é frequentemente notada só em gerações posteriores, afetando a sustentabilidade das populações de organismos aquáticos (Kidd *et al.*, 2007; Pery *et al.*, 2008). Atualmente, a legislação da UE e dos EUA em vigor obriga os novos fármacos a submeterem-se a uma avaliação de impacto ambiental e, que leva à implementação de novos métodos de avaliação dos efeitos agudos e crónicos. No entanto, persiste uma significativa falta de conhecimento, nomeadamente em matéria de dados toxicológicos pelas interações sinérgicas de fármacos (Santos *et al.*, 2010).

O destino e o comportamento dos fármacos no meio ambiente ainda não são muito claros. Como foi referido anteriormente, os fármacos (usados em medicina humana e/ou veterinária) e os seus metabolitos chegam ao meio ambiente através de várias vias. Alguns deles alcançam as águas superficiais (rios, lagos e estuários) e eventualmente, as águas subterrâneas, depois de resistirem à desejada degradação biológica (Heberer, 2002; Lapworth *et al.*, 2012).

No caso de fármacos que têm baixa volatilidade e alta polaridade, a distribuição é feita principalmente por transporte aquoso ou até mesmo através da dispersão cadeia alimentar (Crane *et al.*, 2006). Normalmente, os efluentes são conduzidos para ETAR's, que desempenham um papel fundamental na entrada dos fármacos no meio ambiente. No entanto, em algumas regiões ou mesmo países esses tipos de instalações podem não existir e o problema ambiental é ainda pior.

Em águas de superfície, os fármacos podem ser degradados através de diferentes processos. Dependendo da tecnologia particularmente selecionada e das propriedades da substância ativa, estes podem sofrer:

- ✓ Partição - os fármacos, quando descarregados nas águas superficiais, podem fixar-se à fase sólida como sólidos suspensos ou sedimentos, reduzindo as suas concentrações na fase aquosa. Em particular, os que são suficientemente hidrofóbicos ligar-se-ão aos sedimentos (Jones *et al.*, 2004).
- ✓ Degradação - segundo Richardson e Bowron (1985), citado por Santos *et al.* (2007), os compostos admitidos no sistema de tratamento instalado numa ETAR podem ser classificados em três grupos: ser biodegradável, ou seja, mineralizado a dióxido de carbono e água; passar por algum processo metabólico ou ser degradado parcialmente; ser persistente. A biodegradação é provavelmente a maior via de degradação de muitos compostos medicinais. Compostos simples como a aspirina são facilmente degradados, mas moléculas mais complexas e de maiores dimensões, são mais estáveis e resistentes, sendo por isso a sua degradação mais difícil (Jones *et al.*, 2004).
- ✓ Bioacumulação, bioamplificação e biotransformação - por vezes, não ocorre a degradação total e o processo pára, mesmo antes da mineralização estar concluída. Estes compostos intermediários, ou seja, os produtos estáveis da biotransformação podem ser ainda mais estáveis, mais tóxicos e com um potencial de acumulação superior aos compostos originais (Kummerer, 2009). Os fármacos são frequentemente resistentes à biodegradação, uma vez que é necessário tempo para que a sua ação farmacológica produza resultados. Esta resistência à degradação poderá conduzir à sua acumulação nos tecidos animais. Entende-se por bioconcentração o processo que provoca o aumento da concentração de um poluente num organismo aquático, através da sua incorporação por absorção, pelo contacto com a água poluída. A bioamplificação é a acumulação de uma substância na biota em toda a extensão da cadeia alimentar, através da alimentação. Estes dois conceitos - bioconcentração e bioamplificação - são factores determinantes na extensão da bioacumulação destes compostos (Jones *et al.*, 2004).

Tendo em conta estes aspectos, os efluentes requerem diferentes tratamentos consoante a sua origem. Por exemplo, o uso específico de antibióticos, antineoplásicos ou agentes de diagnóstico em hospitais requer subsequentemente um processo de tratamento de efluentes

mais abrangente e direcionado para este tipo de fármacos que são apenas usados no meio hospitalar (Kummerer, 2001), e que deve ser diferente do procedimento mais específico adotado em ETAR's que recebem descargas industriais provenientes da produção de fármacos (Larsson *et al.*, 2007). Para além disso, a forma e extensão do risco de contaminação final também dependerá da localização geográfica da instalação da ETAR. Um coeficiente de adsorção baixo permite que as substâncias ativas permaneçam na fase aquosa, favorecendo a sua mobilidade através das ETAR's e em águas superficiais próximas. A adsorção a sólidos em suspensão depende das interações hidrofóbicas e eletrostáticas que sofrem, originando diferentes destinos (Xia *et al.*, 2005). Por outro lado, os metabolitos hidrofóbicos presentes nas lamas resultantes das ETAR's levam à contaminação terrestre, afetando microrganismos e invertebrados. A bioconversão aeróbia/anaeróbia ocorre tanto durante a digestão da lama de esgoto como durante o tratamento de lamas ativadas, que parece ser o processo mais eficiente para eliminar contaminantes químicos de ambiente aquático. Normalmente, o melhor resultado de biodegradação é obtido quando se aumenta o tempo de retenção hidráulico do tratamento de lamas activadas (Fent *et al.*, 2006). No entanto, se um fármaco específico não for detetado no efluente de uma ETAR, não implica que tenha sido completamente removido. Em alguns casos, ele pode ter sido degradado e dar origem a metabolitos que posteriormente podem contaminar águas superficiais (Zwiener *et al.*, 2001; Heberer, 2002).

2.2.3 - Riscos globais dos fármacos

A deteção de fármacos nas águas residuais, nas águas de superfície e nas águas para consumo, é indicadora da sua solubilidade e estabilidade no ambiente. Contudo, a exposição indireta a estes compostos das águas para consumo é limitada em termos absolutos, uma vez que relativamente poucos compostos têm sido detetados em águas para consumo humano, como resultado do seu factor de diluição ou da aparente eficácia dos sistemas de tratamento. Mesmo assim, têm sido detetados alguns fármacos (ou os seus metabolitos e/ou produtos da degradação) nas águas para consumo, aumentando as preocupações acerca da possibilidade de efeitos adversos nos humanos, advindos da exposição indireta a estes compostos (Pena *et al.*, 2010). A presença frequente de fármacos em córregos, muitas vezes utilizados como fonte de água para abastecimento público, também tem contribuído para o aumento das preocupações relativas à sua presença na água potável e, conseqüentemente aos efeitos na saúde humana despoletados pela exposição crónica a estes compostos (Stackelberg *et al.*, 2004).

Áreas com elevada densidade populacional e/ou com presença significativa de animais de criação constituem também situações muito preocupantes a nível ambiental, não se conhecendo valores-limite para as concentrações de fármacos descarregados no ambiente a partir de ETAR's ou de fontes agrícolas (Jones *et al.*, 2004). Áreas com população urbana crescente têm tendência a tomar medidas de conservação e reutilização das águas. Estas medidas incluem a utilização de águas residuais tratadas, de modo a aumentar as reservas

para abastecimento, processo este designado por reutilização indireta de água potável. No entanto, a presença de fármacos nos efluentes de águas residuais é um dos aspectos mais desafiadores da reutilização indireta de água potável, devido ao grande número de fármacos que podem estar presentes, à impossibilidade de determinar todos esses compostos, bem como à falta de informação relativa à sua toxicidade e inexistência de valores-limite para muitos deles (Stackelberg *et al.*, 2004).

As regiões urbanas são as principais fontes de contaminação, devido à proximidade de hospitais e ETAR's. No entanto, as regiões rurais onde se pratica agricultura, pecuária e aquicultura representam também grandes fontes de contaminação ambiental.

Mesmo no caso de países que têm feito enormes progressos no setor farmacêutico, a maioria continua a fazer descargas industriais de águas residuais na rede de esgotos doméstica sem qualquer tratamento. O uso de águas residuais não eficientemente tratadas (industrial e doméstica) e de biosólido (lama de esgoto e estrume) na agricultura causa a contaminação de solos, águas superficiais, águas subterrâneas e de toda a cadeia alimentar com compostos farmacêuticos, bem como com os seus metabolitos e os produtos da sua degradação. Esta contaminação farmacêutica pode ainda apresentar riscos globais, através das exportações dos produtos e das viagens internacionais (Figura 2.2) (Rehman *et al.*, 2013).

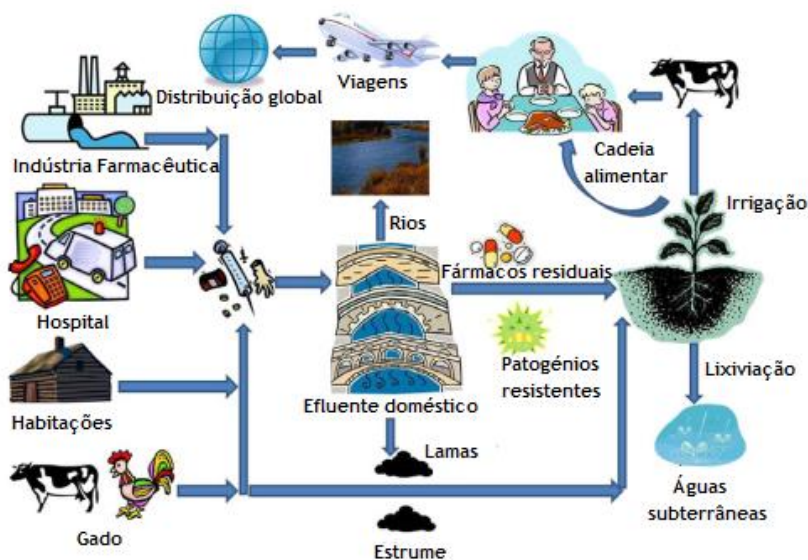


Figura 2.2 - Possíveis fontes e vias de transporte de compostos farmacêuticos, de produtos da sua degradação e de espécies resistentes no ambiente global (adaptado de Rehman *et al.*, 2013).

Têm sido realizadas várias pesquisas com o intuito de desenvolver novos métodos analíticos para monitorar fármacos, produtos da sua degradação, metabolitos e estirpes microbianas altamente resistentes e a toxicidade da mistura, como consequência da contaminação farmacêutica por estes contaminantes farmacêuticos emergentes (Rehman *et al.*, 2013).

A forma mais abrangente para avaliar os efeitos tóxicos sobre organismos que não são o alvo principal inclui o desenvolvimento de testes específicos para avaliar os efeitos agudos e crónicos. Neste último caso, os efeitos são medidos através de parâmetros específicos, tais

como o índice da taxa de crescimento ou reprodução (Crane *et al.*, 2006). Existem poucos estudos para avaliar os efeitos crônicos e a bioacumulação; quanto aos efeitos agudos, só são importantes quando ocorre a descarga de fármacos, uma vez que as concentrações ambientais referidas para este tipo de compostos são baixas.

O desenvolvimento recente de métodos sensíveis para a identificação e quantificação de fármacos permite conceber padrões de distribuição em várias amostras ambientais, com destaque para as classes terapêuticas mais relevantes em termos de contaminação ambiental. Estes dados são úteis para definir as substâncias ativas mais adequadas a serem utilizadas em testes de ecotoxicidade (Santos *et al.*, 2010).

Num futuro próximo, a avaliação dos efeitos de toxicidade crônica deve ser definida como uma prioridade, no sentido de investigar a exposição e efeitos dos fármacos, metabolitos e produtos de transformação das várias classes terapêuticas e da possível repercussão a nível transgeracional. É importante avaliar a presença de fármacos e/ou os seus metabolitos e produtos de transformação em vários compartimentos ambientais de diferentes países, com vista a obter um conhecimento confiável sobre os níveis de contaminação. Com esses novos estudos e evidências, será mais fácil melhorar a legislação existente, a fim de proteger os seres humanos, animais e ecossistemas da ameaça pela presença deste tipo de compostos no ambiente.

2.3 - Antibióticos no meio ambiente

Os antibióticos são um dos grupos mais importantes de fármacos utilizados. Um antibiótico em sentido mais amplo é um agente quimioterapêutico que inibe ou suprime o crescimento de microrganismos, tais como bactérias, fungos ou protozoários. O termo “antibiótico” originalmente referia-se a qualquer agente com atividade biológica contra os organismos vivos. Contudo, atualmente, o termo “antibiótico” refere-se a substâncias com atividade antibacteriana, antifúngica ou antiparasitária (Kummerer, 2009).

Os primeiros antibióticos eram de origem natural, como as penicilinas, produzidas por fungos do género *Penicillium*, ou a estreptomicina, produzida a partir de bactérias do género *Streptomyces*. Atualmente, os antibióticos são obtidos por síntese química, como as sulfonamidas, ou por modificação química de compostos de origem natural. Muitos antibióticos são moléculas relativamente pequenas, com um peso molecular inferior a 1000 Da. A definição clássica de um antibiótico é um composto produzido por um microrganismo que inibe o crescimento de outro. Ao longo dos anos, esta definição foi expandida para incluir produtos sintéticos e semissintéticos (Kummerer, 2009).

Os antibióticos que não são suficientemente tóxicos para o hospedeiro são utilizados como agentes quimioterapêuticos no tratamento de doenças infecciosas em doenças dos seres humanos, animais e plantas (Kummerer, 2009). São usados extensivamente na medicina humana, na medicina veterinária e na aquacultura com a finalidade de prevenir ou tratar infeções microbianas, enquanto que na criação de gado podem ainda ser utilizados para

promover o crescimento dos animais. Alguns antibióticos são usados também na fruticultura e na apicultura (Kummerer, 2008).

Os antibióticos podem ser agrupados pela sua estrutura química ou mecanismo de ação. Eles são um grupo diverso de produtos químicos que pode ser dividido em subgrupos diferentes, tais como beta-lactamas, quinolonas, tetraciclina, macrolídeos, sulfonamidas e outros. Muitas vezes são moléculas complexas que podem possuir diferentes funcionalidades. Assim, sob diferentes condições de pH, os antibióticos podem ser neutros, catiónicos, aniônicos ou zwitteriônicos. Devido a diferentes funcionalidades dentro de uma única molécula, as suas propriedades físico-químicas e biológicas, tais como o coeficiente de partição, a solubilidade, a hidrofobicidade e a hidrofiliabilidade, o comportamento de sorção, a foto-reatividade, a atividade antibiótica e a toxicidade podem sofrer alterações com o pH (Kummerer, 2008).

2.3.1 - Fontes e ocorrência de antibióticos no meio ambiente

Nestes últimos anos tem aumentado o uso de antibióticos na medicina veterinária e humana (consumo anual de 100000 a 200000 toneladas) e, conseqüentemente, aumenta a possibilidade de contaminação de águas estes compostos (Xu *et al.*, 2007).

Como já foi referido, os antibióticos humanos e veterinários têm sido detetados em diferentes matrizes ambientais. Estes poluentes são continuamente descarregados no ambiente na sua formulação inicial ou como produtos da sua degradação ou de ambas as formas por uma diversidade de fontes de entrada, como se mostra na Figura 2.3.

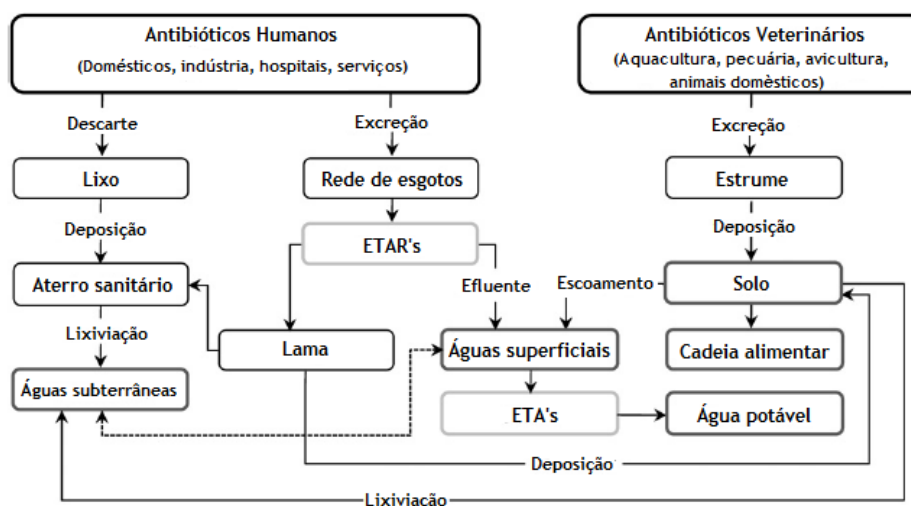


Figura 2.3 - Origem e principais vias de contaminação de antibióticos humanos e veterinários (adaptado de Homem *et al.*, 2011).

O problema reside no facto de que as ETAR's não são projetadas para remover micropoluentes altamente polares como os antibióticos (Xu *et al.*, 2007), que podem assim ser transportados para águas superficiais e subterrâneas depois da lixiviação. Em última análise, as águas superficiais contaminadas podem entrar nas estações de tratamento de água (ETA's), que

também não estão preparadas para remover estes compostos, atingindo os sistemas de distribuição de água.

Nos últimos anos, a presença de antibióticos em matrizes ambientais tem sido investigada. Têm sido relatados vários estudos sobre a ocorrência de resíduos de antibióticos em ecossistemas aquáticos, em águas superficiais, águas subterrâneas, águas marítimas, águas potável e efluentes (Kummerer, 2001; Brown *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007; Watkinson *et al.*, 2009; Pena *et al.*, 2010). Os antibióticos também têm sido detetados em matrizes terrestres e em biossólido (Kinney *et al.*, 2006; Jones-Lepp e Stevens, 2007). Geralmente, os antibióticos são detetados em efluentes hospitalares, águas residuais municipais, águas superficiais, águas do mar e águas subterrâneas numa gama compreendida entre $\mu\text{g/L}$ e ng/L . Além disso, tem-se verificado que os sedimentos dos rios junto a zonas agrícolas têm mostrado maiores concentrações de antibióticos do que a água adjacente ou outros sedimentos de rios localizados longe das áreas agrícolas. Isto indica a possibilidade de contaminação de terras por escoamento (Kummerer, 2009).

Análises de solos revelaram também a presença de resíduos de antibióticos atribuídos à aplicação de lamas como adubo ou fertilizantes (Kumar *et al.*, 2005). Além de que, já foi detetada a presença deste tipo de resíduos em legumes (Shenker *et al.*, 2011).

A persistência e a acumulação de antibióticos no meio ambiente podem produzir efeitos nocivos, tanto no ecossistema aquático como terrestre, mesmo a baixos níveis de concentração. A extensa e indiscriminada utilização destes compostos em medicina humana e veterinária e sua introdução contínua nas matrizes ambientais podem explicar tal bioacumulação e pseudo-persistência. A elevada polaridade e natureza não volátil da maior parte dos antibióticos impedem a sua saída destas matrizes (Hernando *et al.*, 2006).

As propriedades físico-químicas de cada antibiótico, como a estrutura molecular, a forma e o tamanho, a solubilidade e a hidrofobicidade, vão definir a sua distribuição nas matrizes ambientais sólida ou líquida (Kemper, 2008). Além desses factos, os antibióticos são suspeitos de serem responsáveis pela produção dos microrganismos resistentes, causando sérios problemas de saúde pública, ou seja, dificuldades no tratamento de patologias e desequilíbrio dos ecossistemas microbianos (Bailón-Pérez *et al.*, 2008).

Até o momento, foram estabelecidos limites legais de antibióticos nos alimentos (4-1500 mg/kg para o leite e 25-6000 mg/kg para os outros produtos alimentares de origem animal - União Europeia, 1990), mas não existe uma legislação aplicada a matrizes ambientais.

Assim, em contraste com as propriedades e efeitos terapêuticos desejados a partir das aplicações de antibióticos, essas mesmas propriedades são muitas vezes desvantajosas para os organismos no ambiente (Kummerer, 2008).

A fim de avaliar os impactos ambientais, têm sido feitos cada vez mais estudos no sentido de conhecer e compreender as fontes, ocorrência e destino destes compostos no ambiente. Além disso, tem sido estudado vários processos que visam remover/degradar os antibióticos do meio ambiente.

2.4 - Antibióticos tetraciclínicos

As tetraciclinas (TC's) são um grupo de produtos naturais e semi-sintéticos que são agentes bacteriostáticos e com atividade contra uma ampla variedade de organismos. Em meados do século vinte, foram desenvolvidas pela primeira vez a partir de microrganismos presentes em amostras de solo, as *Streptomyces*, recolhidos em todo o mundo, devido à necessidade de antibióticos mais potentes (Rodríguez *et al.*, 1998).

As tetraciclinas são caracterizadas por uma estrutura de quatro anéis, com um grupo funcional carboxilamida e vários outros grupos funcionais ionizáveis, tricarbonil metano, dicetona fenólica e dimetil amônio, bem como as cadeias laterais, que são responsáveis pelo seu pKa e pela carga aniônica, catiônica ou zwitteriônica (Figura 2.4) (Sassman *et al.*, 2005).

As TC's podem entrar no ambiente aquático através do lançamento de efluentes de ETAR's, escoamento agrícola, ou pela eliminação de fármacos não utilizados (Khetan *et al.*, 2007), e a potencial seleção de resistência de patógenos a esses antibióticos (Chopra *et al.*, 2001).

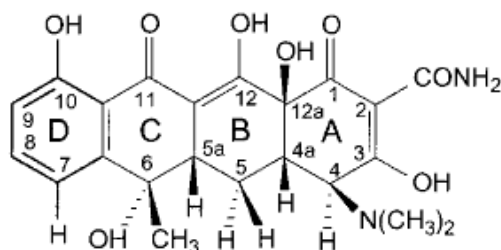


Figura 2.4 - Estrutura química da tetraciclina (Halling-Sorensen *et al.*, 2002).

As tetraciclinas agem inibindo a síntese proteica dos microrganismos sensíveis, ligando-se aos ribossomas. Estes fármacos impedem que o RNA de transferência (tRNA) se fixe ao ribossoma sendo, deste modo, impedida a síntese proteica. São considerados antibióticos bacteriostáticos, pois detêm o crescimento das bactérias.

Para além das propriedades antibióticas, as tetraciclinas possuem diversas propriedades não antibióticas. A Figura 2.5 apresenta uma síntese do uso e propriedades das tetraciclinas.

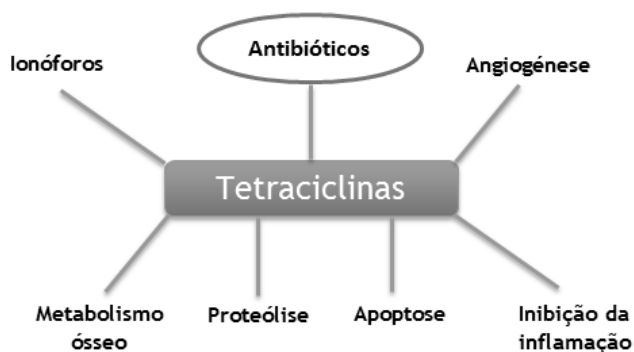


Figura 2.5 - Uso e propriedades das tetraciclinas.

2.4.1 - Tetraciclina e produtos de degradação

As tetraciclina são conhecidas por se degradarem através de fatores abióticos, dependendo do pH, propriedades redox e condições de luz, e os produtos de degradação podem ser formados através da epimerização, desidratação e vias de transferência de próton (Figura 2.6) (Halling Sorensen et al., 2003).

As 4-Epi-TC's, como a 4-epitetracycline (ETC) da tetraciclina (TC), a 4-epioxitetraciclina (EOTC) da oxitetraciclina (OTC), e a 4-epiclortetraciclina (ECTC) de clortetraciclina (CTC), podem ser formadas em condições aquosas em meio ligeiramente ácido (pH 2-6), e podem ser revertidas de volta à sua forma ativa sob condições alcalinas específicas, na presença de um metal de complexação. Sob condições fortemente ácidas (pH<2), as anidro-TC's, como a anidrotetraciclina (ATC) e a anidroclortetraciclina (ACTC), são as mais formadas. Enquanto, que as anidro-TC's são estáveis, a anidro-OTC é instável e forma rapidamente compostos α - e β -apo-OTC. A CTC é particularmente vulnerável à decomposição alcalina e forma iso-CTC sob condições alcalinas. Os referidos produtos também podem sofrer epimerização (Anderson *et al.*, 2005). Vários destes produtos de degradação têm potência antibiótica, ao mesmo nível de concentração que os seus compostos precursores (Figura 2.6) (Halling-Sorensen *et al.*, 2002).

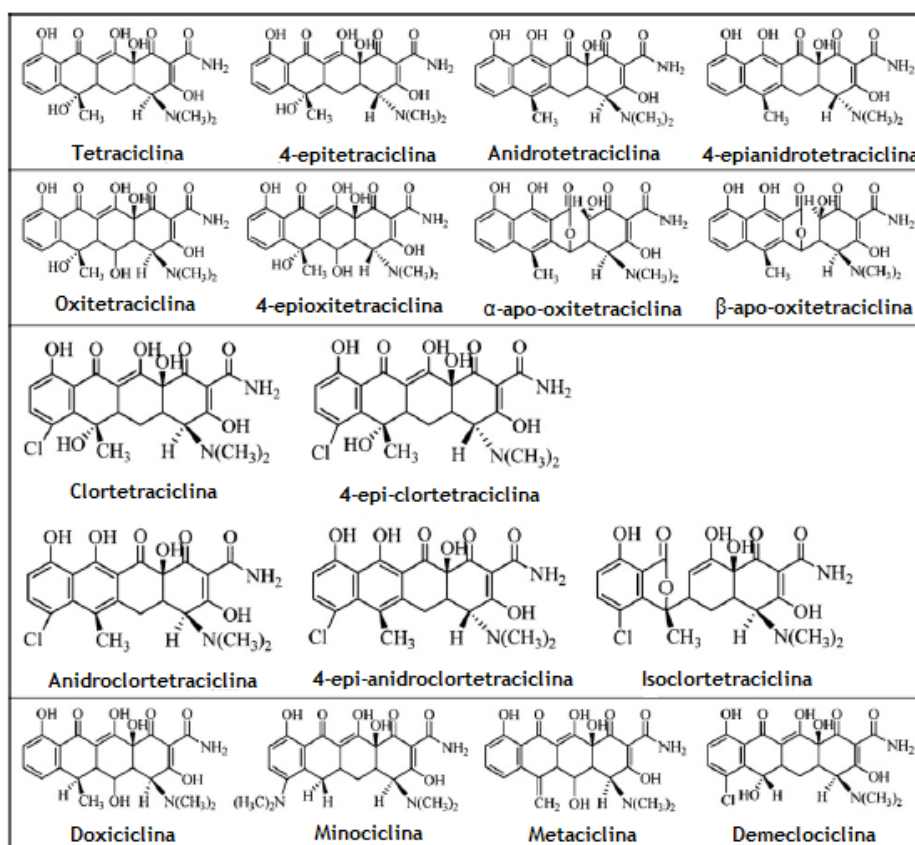


Figura 2.6 - Estruturas químicas das tetraciclina e os seus produtos de degradação (Jia *et al.*, 2009).

2.4.2- Oxitetraciclina

A oxitetraciclina é um fármaco antimicrobiano amplamente utilizado em agricultura intensiva para tratar doenças entéricas e respiratórias (Chiayvareesajja *et al.*, 2006). Devido à administração por via oral e à sua farmacocinética, a dosagem da OTC está presente na alimentação na gama de g kg^{-1} e é encontrada nos resíduos animais na ordem das mg kg^{-1} (Brambilla *et al.*, 2007). Como consequência da eliminação de resíduos, o fármaco entra nos compartimentos ambientais (água, sedimentos, solo) e pode contaminar as redes tróficas (Nepejchalova *et al.*, 2008), podendo transitar para os alimentos e causar efeitos negativos sobre os recursos naturais (Yang *et al.*, 2009; Migliore *et al.*, 2010), incluindo os efeitos sobre a estrutura da comunidade microbiana e de estirpes com seleção de resistência a antibióticos (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2007).

A OTC é amplamente usada na medicina veterinária em países em desenvolvimento, para o tratamento e prevenção de uma variedade de infecções bacterianas em animais produtores de alimentos. É um antibiótico eficaz de largo espectro contra bactérias gram-negativas e gram-positivas e também contra muitos organismos patogênicos que são resistentes aos agentes inibidores da parede celular antimicrobiana (Chopra *et al.*, 2001).

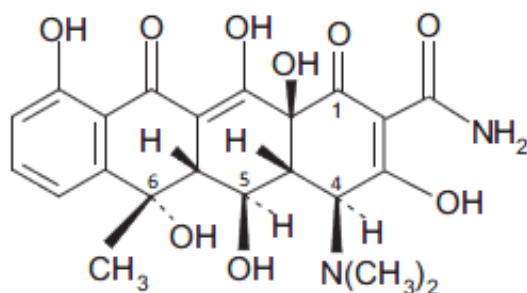


Figura 2.7 - Estrutura química da oxitetraciclina (Kahsay *et al.*, 2013).

A OTC tem três equilíbrios de ionização com valores de pKa de 3.57, 7.49 e 9.88 (Figuerola *et al.*, 2004), e os quatro estados de protonação podem ser representados por H_3OTC^+ , H_2OTC^+ , H_2OTC^- e OTC^{2-} . A Figura 2.8 mostra a compilação dos quatro estados da OTC e os equilíbrios de ionização.

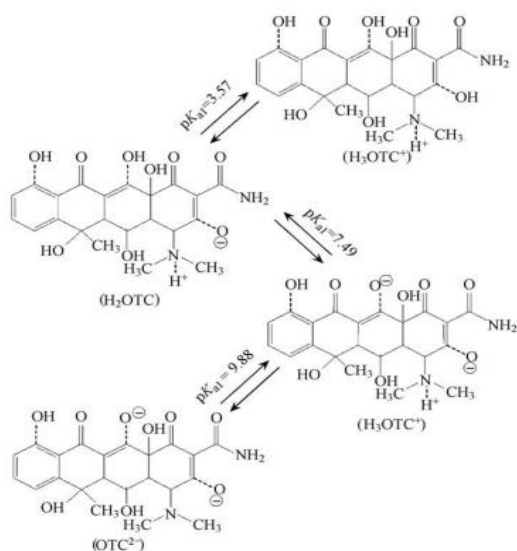


Figura 2.8 - Estrutura e estados de ionização da oxitetraciclina (Shaojun *et al.*, 2008).

2.5 - Processos de tratamento de efluentes contendo fármacos

Nos últimos anos, a presença de antibióticos em matrizes ambientais tem sido investigada. Nomeadamente, no que diz respeito aos antibióticos tetraciclínicos têm sido relatadas evidências da existência deste tipo de antibióticos em várias matrizes ambientais (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Quadro resumo sobre relatos de existência de antibióticos tetraciclínicos em várias matrizes ambientais.

Antibiótico	Matriz	Local	Referência
Oxitetraciclina Tetraciclina Clortetraciclina	Águas subterrâneas	Nebraska, USA	Zhu, et al. (2001)
Tetraciclina Clortetraciclina Oxitetraciclina Doxitetraciclina	Solos	Valencia, Espanha	Andreu et al. (2009)
Tetraciclina Clortetraciclina Oxitetraciclina	Águas residuais, subterrâneas e superficiais	Motril, Espanha	López-Peñalver et al. (2010)
Oxitetraciclina Clortetraciclina Tetraciclina	Solos agrícolas Vegetais	Beijing, China	Zhao et al. (2010)
Oxitetraciclina Tetraciclina Doxiciclina Clortetraciclina	Efluentes provenientes de explorações pecuárias	Tocachi, Japão	Miyata et al. (2011)
Oxitetraciclina Clortetraciclina	Águas provenientes de explorações pecuárias	Yanji, China	Kim et al. (2013)

Embora a quantidade de resíduos de fármacos antibióticos no ambiente aquático seja baixa, a acumulação de resíduos farmacêuticos constitui um risco potencial para os organismos aquáticos e terrestres a longo prazo (Klavarioti *et al.*, 2009; Sirés e Brillas, 2012). A remoção de antibióticos é difícil e o processo é dispendioso. Nos últimos anos, tem havido um crescente interesse para o tratamento da poluição gerada por resíduos farmacêuticos, incluindo antibióticos (Esmollaa e Chaudhuri, 2010; Daghira *et al.*, 2012; Hou *et al.*, 2012).

Os processos biológicos, o mais rentável para o tratamento de águas residuais, são métodos destrutivos e têm sido extensivamente estudados (Oller *et al.*, 2011), mas nem sempre parecem relevantes para a remoção de compostos recalcitrantes, devido à sua fraca biodegradabilidade. Algumas técnicas físicas e físico-químicas têm provado a sua eficiência para o efeito. Entre as técnicas físicas, a adsorção, a floculação, a eletro-floculação, a osmose inversa, a ultrafiltração e a coagulação têm sido aplicadas para remover poluentes recalcitrantes. Estes métodos mais convencionais são não-destrutivos e simplesmente transferem os poluentes de uma fase para outra, o que resulta em poluição secundária (Alonso-Salles *et al.*, 2010).

Os processos físico-químicos são destrutivos e são também amplamente usados para remover os compostos recalcitrantes. Entre eles, os processos de oxidação avançada constituem o grupo de processos mais amplamente estudados (Lee *et al.*, 2011; Gómez-Pacheco *et al.*, 2012) e podem ser divididos em três categorias: processos fotoquímicos, ozonização combinada com radiação UV e/ou peróxido de hidrogénio (H₂O₂), e produção *in situ* de radicais livres •OH por outras tecnologias (Yahiaoui *et al.*, 2013).

Os POA's são métodos oxidativos baseados na geração de radicais hidroxilo (OH•) que são extremamente reativos e menos seletivos do que outros oxidantes (como, por exemplo, cloro, ozono molecular). O seu potencial padrão de oxidação ($E^0 = 2,8 \text{ V}$) é maior do que o dos oxidantes convencionais, tornando-o extremamente eficaz na oxidação de uma grande variedade de compostos orgânicos (Hernandez *et al.*, 2002; Bautitz e Nogueira, 2007). Estes radicais são produzidos a partir de agentes oxidantes tais como o ozono (O₃) ou o peróxido de hidrogénio (H₂O₂), muitas vezes combinados com catalisadores metálicos ou semicondutores e/ou radiação UV. Nestes processos, é de esperar que os compostos orgânicos sejam oxidados a espécies intermediárias menos refractárias (menos tóxicas e mais biodegradáveis) ou mesmo mineralizadas a CO₂ e H₂O e sais inorgânicos. Contudo, algumas vezes, os metabolitos produzidos são potencialmente mais perigosos do que o composto original (Dantas *et al.*, 2008).

Para a degradação de compostos orgânicos persistentes contidos em águas residuais, vários estudos recomendam processos integrados, mais particularmente, o acoplamento de processos físico-químicos com tratamento biológico (Farré *et al.*, 2007; Basha *et al.*, 2009; Yahiat *et al.*, 2011).

A Tabela 2.2 apresenta uma síntese da aplicação de POA's em várias matrizes ao longo destes últimos anos.

Tabela 2.2 - Aplicação de POA's em várias matrizes contendo tetraciclina.

Antibiótico	Amostra	Tratamento	Referência
Oxitetraciclina	Efluentes de ETAR's	Foto-Fenton	Bautitz e Nogueira (2007)
Oxitetraciclina	Efluentes provenientes de explorações pecuárias	Ozonação	Uslu e Balcioglu (2009)
Tetraciclina Clortetraciclina Oxitetraciclina	Efluentes de ETAR's e águas de ETA's	Fotólise UV/H ₂ O ₂	López-Peñalver et al. (2010)
Oxitetraciclina Tetraciclina Doxiciclina Clortetraciclina	Efluentes provenientes de explorações pecuárias	Oxidação eletroquímica	Miyata et al. (2011)
Clortetraciclina	Efluentes provenientes de explorações pecuárias	Ozonação	Lee et al. (2011)
Tetraciclina Clortetraciclina Oxitetraciclina	Águas residuais, subterrâneas e superficiais	Fotólise directa por radiação UV	Gómez-Pacheco et al. (2012)

De seguida, descrevem-se alguns casos de sucesso da aplicação de POA's a estes compostos recalcitrantes, os antibióticos tetraciclínicos.

2.5.1 - Ozonação

O ozono é um oxidante forte, que se decompõe em água, quer para formar radicais hidroxilo que são agentes oxidantes mais fortes do que o próprio ozono, induzindo assim a oxidação indireta, ou atacando seletivamente, como eletrófilo certos grupos funcionais de moléculas orgânicas (Dantas *et al.*, 2007). Dependendo do tipo de substrato e das condições de funcionamento em questão, a oxidação por ozono normalmente é favorecida pelo aumento do pH. Além disso, o desempenho do tratamento é melhorado combinando o ozono com radiação luminosa (Irmak *et al.*, 2005), com peróxido de hidrogénio (Balcioglu e Otker, 2003; Arslan-Alaton e Dogruel, 2004; Arslan-Alaton e Caglayan, 2006) ou com complexos de ferro ou de cobre, que atuam como catalisadores (Skoumal *et al.*, 2006).

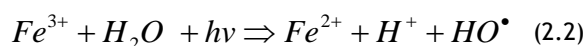
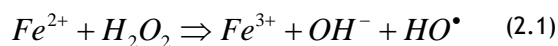
A ozonização tem sido tradicionalmente utilizada no tratamento de água potável para controlo de odor, sabor e de desinfeção, bem como para desinfeção de águas residuais.

O efeito sobre a degradação por ozonização de oxitetraciclina em solução aquosa, a diferentes valores de pH, foi investigado por Li et al. (2008). Os resultados demonstram que a ozonização, como um passo parcial num conceito de tratamento combinado, é uma técnica

potencial para a degradação dos efluentes de indústrias farmacêuticas que contêm altas concentrações de oxitetraciclina. Tem sido provado que as taxas de remoção aumentam como consequência das melhores taxas de decomposição obtidas, favorecidas pelo aumento do pH. Contudo, os resultados de bioluminescência iniciais indicam que os subprodutos após ozonização parcial de oxitetraciclina apresentam maior toxicidade do que o composto original.

2.5.2 - Fenton e foto-Fenton

O processo de foto-Fenton é considerado adequado para o tratamento de uma variedade de águas residuais, devido à sua alta eficiência, simplicidade de operação e baixo custo. A geração de radicais hidroxilo ocorre durante a decomposição de H_2O_2 na presença de íons ferrosos. Sob radiação UV-Vis, a eficiência total do processo aumenta devido principalmente à regeneração de íons ferrosos e formação de $\bullet OH$ adicionais (Equações (2.1) e (2.2)) (Pignatello, 1992; Pera-Titus *et al.*, 2004):



Bautitz e Nogueira (2007) avaliaram a eficiência de degradação mediada pelo processo foto-Fenton em meios complexos e reais, como efluentes de ETAR's e águas superficiais. Foi obtida uma eficiência muito elevada por radiação solar e pela utilização de ferrioxalato, conseguindo-se uma degradação total de TC após 1 minuto de radiação. Os resultados mostrados neste trabalho indicam que, o processo de foto-Fenton sob radiação solar pode ser aplicado na degradação de tetraciclina presente em águas de superfície ou mesmo amostras mais complexas, tais como efluentes de ETAR's. A rápida degradação de tetraciclina pelo processo foto-Fenton é um tratamento muito promissor. Uma vez que os produtos farmacêuticos são muitas vezes encontrados em efluentes de ETAR's, este procedimento oferece uma boa alternativa para o tratamento de tais amostras, uma vez que permite o tratamento de grandes volumes de efluentes, utilizando baixas concentrações de reagentes e de luz solar, evitando a contaminação de ambientes aquáticos. Contudo, os processos que envolvem fotólise só devem ser aplicados a efluentes descolorados, uma vez que a coloração impede a propagação eficiente da radiação.

2.5.3 - Fotólise

A fotólise é a decomposição ou dissociação de compostos químicos causados pela luz natural ou artificial. Dois processos foto-induzidos são comumente aplicados: fotólise direta e fotólise indireta. No primeiro caso, os compostos orgânicos absorvem luz UV e podem reagir com os componentes da matriz aquosa ou sofrerem auto-decomposição (Shaojun *et al.*, 2008;

Jiao *et al.*, 2008; Trovo *et al.*, 2009). A fotólise indireta envolve a foto-degradação por fotossensibilizadores como o oxigênio e radicais hidroxilo ou peróxido (Arslan- Alaton e Dogruel, 2004; Giokas e Vlessidis, 2007). Estes oxidantes devem ser produzidos por fotólise de substâncias húmicas e inorgânicas, presentes nas matrizes aquosas ou por adição externa de peróxido de hidrogênio (clivagem homolítica do peróxido de hidrogênio, produzindo radicais hidroxilo), ou mesmo ozono (Giokas e Vlessidis, 2007).

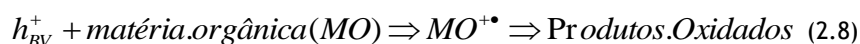
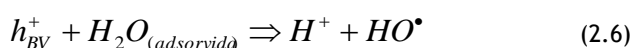
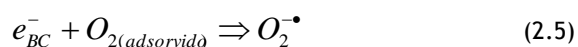
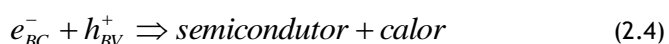
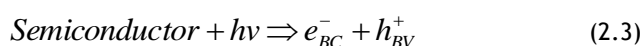
Shaojun *et al.* (2008) e Jiao *et al.* (2008) estudaram a degradação das tetraciclina, antibióticos muito sensíveis à luz. Obtiveram altas remoções de CQO (cerca de 80%), mas muito baixa remoção de COT (14%), o que prova a produção de compostos intermediários. No seu estudo, verificou-se também que a toxicidade do efluente tratado foi maior do que o original.

Pelas pesquisas e estudos efetuados, foi observado que este processo é extremamente dependente da estrutura do composto, e que apenas os compostos fotossensíveis são facilmente degradados. Esta técnica tem provado ser menos eficaz que outras, em que a radiação é combinada com peróxido de hidrogênio, ozono ou catalisadores. A fotólise sob radiação solar tem sido considerado um método promissor para degradar antibióticos no ambiente natural aquático (Jiao *et al.*, 2008). Esta tecnologia é aplicável somente para águas residuais contendo compostos foto-sensíveis e águas com baixas concentrações de CQO, como rios e água potável (Homem e Santos, 2011).

2.5.4 - Fotocatálise semi-condutora

Na fotocatálise semicondutora, as reações de degradação oxidativa requerem a presença de três componentes básicos: uma superfície catalítica fotossensível (geralmente um semicondutor inorgânico, como o dióxido de titânio), uma fonte de energia de fótons e um agente oxidante adequado (Reyes *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2007; Palominos *et al.*, 2008). O princípio desta metodologia envolve a ativação de um semicondutor (geralmente de elevada estabilidade, bom desempenho e de baixo custo) por luz artificial ou solar.

O processo fotocatalítico é iniciado quando o semicondutor absorve fótons com uma energia capaz de promover os elétrons do nível de energia da banda de valência para a banda de condução. As equações (2.3)-(2.8) demonstram o que acontece neste processo:



(onde e^-_{BC} - elétrons na banda de condução; e^-_{BV} - elétrons na banda de valência; h^+_{BV} - lacunas na banda de valência). Estudos recentes mostraram que o mecanismo de degradação não ocorre exclusivamente por meio de radicais hidroxilo, mas também por meio de outras espécies de radicais livres derivados de oxigênio. A eficiência do processo é afetada pela concentração de catalisador, comprimento de onda, intensidade da radiação, pH e pela matriz aquosa. Este método tem a vantagem de poder ser aplicado em condições ambientais normais, com um ganho de energia quando a luz solar é utilizada como fonte de radiação.

Este método foi aplicado a antibióticos tetraciclínicos e concluiu-se que a fotocatalise semicondutora foi muito eficiente, atingindo elevadas taxas de degradação (>98%) e de mineralização (>50%) (Addamo *et al.*, 2005; Reyes *et al.*, 2006;; Palominos *et al.*, 2008).

Reyes *et al.* (2006), estudaram a degradação da tetraciclina usando o processo fotocatalítico, tendo atingido 100% de degradação após 120 min e elevados níveis de mineralização ($\approx 90\%$), utilizando 0,5 g/L de TiO_2 e radiação UV. Estes resultados foram consistentes com os obtidos por Palominos *et al.* (2009), que estudaram a degradação da tetraciclina utilizando também o processo fotocatalítico. As taxas de degradação da tetraciclina observadas foram altas usando TiO_2 ou ZnO ($\approx 100\%$), bem como a mineralização ($\approx 50\%$ usando TiO_2 e $\approx 100\%$ utilizando ZnO). Um estudo recente de Bu e Zhuang (2013), utilizando um processo de fotocatalise (0,4 g de Cu/TiO_2 como fotocatalisador e sob radiação UV) mostrou ser eficaz para remover mais de 80% de clortetraciclina. Em termos de eficiência de remoção, este método parece ser promissor para o tratamento de efluentes com baixas cargas de matéria orgânica, como rios, águas subterrâneas e água potável.

2.5.5 - Processos eletroquímicos

Nos últimos anos, os processos eletroquímicos têm demonstrado ser eficazes para o tratamento de efluentes contendo poluentes orgânicos refratários e tóxicos (Martínez-Huitle e Brillas, 2009; Panizza e Cerisola, 2009).

Os tratamentos eletroquímicos são processos que permitem remover compostos tóxicos orgânicos, aplicando uma tecnologia eficaz, versátil, rentável, fácil e limpa (Jara *et al.*, 2007; Panizza e Cerisola, 2009). Nos processos eletroquímicos, a oxidação ocorre no ânodo (que pode ser de grafite, TiO_2 , ligas à base de Ti, óxidos de Ir, Ru, Pb, Sn, Sb, BDD, etc), na presença de um eletrólito (Panizza e Cerisola, 2009).

2.5.5.1- Oxidação anódica

A oxidação eletroquímica oferece diversas vantagens para a prevenção e solução dos problemas ambientais. Trata-se de um processo limpo que pode funcionar a baixas temperaturas e, na maioria dos casos, sem adição de qualquer reagente nem formação de

lamas, utilizando equipamento simples e de fácil operação (Comninellis, 1994; Santos *et al.*, 2008; Anglada *et al.*, 2009).

A Figura 2.9 mostra um diagrama conceptual de um reator eletroquímico de eletro-oxidação de águas residuais, que inclui uma fonte de alimentação, um cátodo e um ânodo (Cañizares *et al.*, 2006).

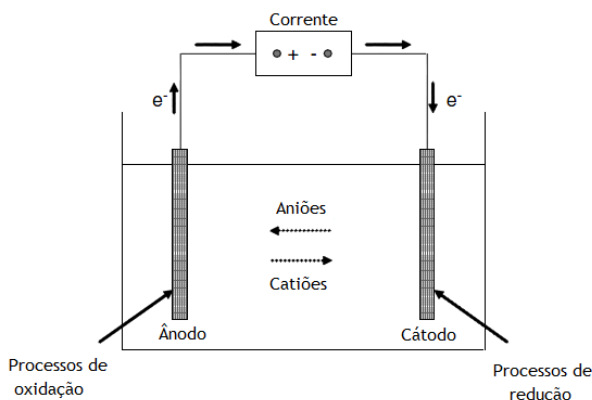
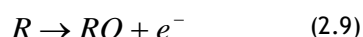


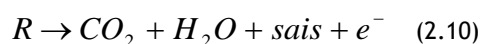
Figura 2.9 - Diagrama conceptual de um reactor eletroquímico (adaptado de Anglada *et al.*, 2009).

Durante a oxidação anódica de poluentes orgânicos, podem ser seguidas duas vias diferentes (Drogui *et al.*, 2007):

- conversão eletroquímica - os compostos orgânicos são apenas parcialmente oxidados (equação (2.9)), podendo ser necessário um tratamento subsequente.



- combustão eletroquímica - os compostos orgânicos são transformados em água, dióxido de carbono e outros componentes inorgânicos (equação (2.10)):



A oxidação eletroquímica (conversão e/ou combustão) dos compostos orgânicos é teoricamente possível antes da evolução do oxigénio mas, na prática, por limitações de ordem cinética e não termodinâmica, a reação de oxidação é demasiado lenta. Em estudos efetuados por Comninellis *et al.* (Comninellis e Plattner, 1988; Comninellis e Pulgarin, 1991), foi possível verificar que a oxidação de certos compostos orgânicos em meio aquoso, ocorre, sem perda da actividade dos eléctrodos apenas a potenciais elevados, na zona de evolução de oxigénio. De facto, durante a oxidação de compostos orgânicos a um potencial anódico fixo, inferior ao de evolução de oxigénio, ocorre uma diminuição da actividade da superfície do ânodo como consequência da sua passivação pela deposição de matéria oxidada que, em alguns casos, tende a polimerizar na sua superfície. As espécies responsáveis por esta passivação da superfície podem ser oxidadas pelos radicais $\cdot OH$ formados a potenciais elevados, na região de decomposição da água com evolução de oxigénio simultânea, sendo

assim possível a regeneração da superfície anódica durante a oxidação (Brillas *et al.*, 2006). Existem vários estudos publicados sobre a oxidação eletroquímica de poluentes orgânicos, utilizando como modelo o fenol, em condições de evolução simultânea de oxigênio e usando diferentes tipos de materiais de eléctrodo (Comninellis e Pulgarin, 1991). Segundo estes autores, pela análise dos intermediários e da eficiência da corrente foi demonstrado que os materiais de ânodo “tradicionais”, como a Pt, o Ti/IrO₂ e o Ti/RuO₂, favorecem a conversão eletroquímica (obtendo-se ácidos carboxílicos como produtos finais), mas com baixas eficiências de corrente. Pelo contrário, a utilização de ânodos de Ti/SnO₂, PbO₂ ou BDD, que apresentam sobrepotenciais para evolução do oxigênio maiores, permite a obtenção de eficiências de corrente mais elevadas, favorecendo a combustão.

Para melhor compreensão destas diferenças, convém referir que, os compostos orgânicos, em meio aquoso, podem ser oxidados num ânodo por oxidação direta ou indireta.

✓ Oxidação direta

Se o ânodo possui uma alta atividade eletrocatalítica e a electrólise ocorre a potenciais na zona de estabilidade do electrólito, a oxidação pode ocorrer diretamente na superfície do eléctrodo, designando-se por oxidação anódica direta (Mohan *et al.*, 2007). Ocorre em duas etapas: (1) difusão de poluentes a partir do seio da solução para a superfície do ânodo e (2) a oxidação dos poluentes na superfície do ânodo. Consequentemente, a eficácia do processo eletroquímico dependerá da relação entre a transferência de massa do substrato e a transferência de electrões na superfície do eléctrodo. A taxa de transferência de electrões é determinada pela atividade do eléctrodo e pela densidade de corrente (Figura 2.10 (a)).

A oxidação direta é teoricamente possível para baixos potenciais, antes da evolução do oxigênio. No entanto, como já foi referido, o principal problema é a atividade catalítica diminuir, efeito comumente chamado de envenenamento, devido à formação de um filme polimérico na superfície do ânodo. Esta diminuição depende da adsorção de poluentes na superfície do ânodo, da concentração de poluente e da natureza dos compostos orgânicos (Panizza e Cerisola, 2009).

✓ Oxidação indireta

No processo de oxidação anódica indireta, agentes oxidantes fortes são electrogerados na superfície do ânodo, destruindo, posteriormente, os poluentes no seio da solução (Anglada *et al.*, 2009). Assim, a electrólise indireta evita a formação de filmes passivantes na superfície do eléctrodo, evitando a troca direta de electrões entre produtos orgânicos e a superfície do ânodo, sendo os poluentes, na electrólise indireta, oxidados através da mediação de reagentes redox gerados eletroquimicamente.

Estes reagentes redox agem como um intermediário, “viajando” entre o eléctrodo e os poluentes orgânicos, podendo esta reação ocorrer na mediação da superfície do ânodo, como

é o caso do radical hidroxilo, ou no seio da solução, como é o caso do cloro, do ozono e do peróxido de hidrogénio (Figura 2.10 (b)) (Mohan *et al.*, 2007; Panizza e Cerisola, 2009).

Os principais requisitos para a obtenção de altas eficiências no processo de oxidação anódica indireta são: o potencial ao qual a espécie intermediária é produzida não deve estar perto do potencial de evolução do oxigénio, a taxa de geração de intermediários deve ser elevada, a taxa de reação da espécie intermediária com os poluentes deve ser maior que a taxa de qualquer reação concorrente e a adsorção de poluentes deve ser minimizada (Panizza e Cerisola, 2009).

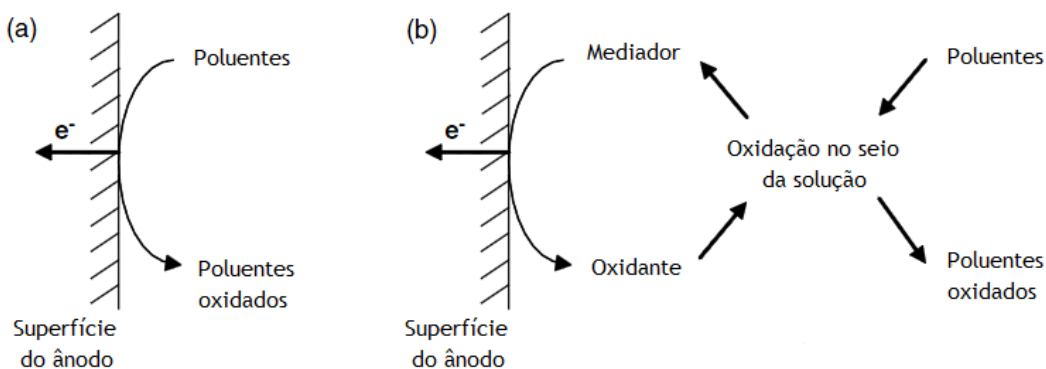
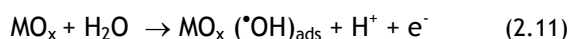


Figura 2.10 - Esquemas de tratamento eletroquímico de poluentes por oxidação (a) direta e (b) indireta (adaptado de Anglada *et al.*, 2009).

Para melhor perceber o modo como a natureza do material de eléctrodo influencia fortemente a eficiência e a selectividade do processo, foi proposto um modelo para a oxidação anódica de compostos orgânicos (R), conversão ou combustão, em competição com a reação de evolução de oxigénio (Comninellis, 1994). O modelo permite ilustrar a diferença entre dois casos limites: ânodos “ativos” e “não ativos”. No mecanismo geral proposto, a combustão (oxidação completa) dos compostos orgânicos a CO_2 é alcançada em eléctrodos não-activos, eléctrodos que não participam na oxidação, como por exemplo, ânodos de PbO_2 , SnO_2 e BDD, devido à formação de radicais hidroxilo. A conversão, ou oxidação selectiva, ocorre em eléctrodos activos, eléctrodos que participam na oxidação, como por exemplo, o IrO_2 , devido à formação de um óxido superior. A Figura 2.11 ilustra esquematicamente as reações em meio ácido. Em ambos os casos, o primeiro passo é a decomposição da água com a formação de radicais hidroxilo (equação (2.11)):



Os radicais ($\cdot\text{OH}$) podem ficar fracamente adsorvidos na superfície do eléctrodo ou, se existir uma forte interacção entre o eléctrodo (M) e o radical hidroxilo, este pode interatuar com o oxigénio presente no ânodo, com a possível transição do oxigénio do radical hidroxilo adsorvido para a rede do material do ânodo, formando o chamado óxido superior (equação (2.12)):

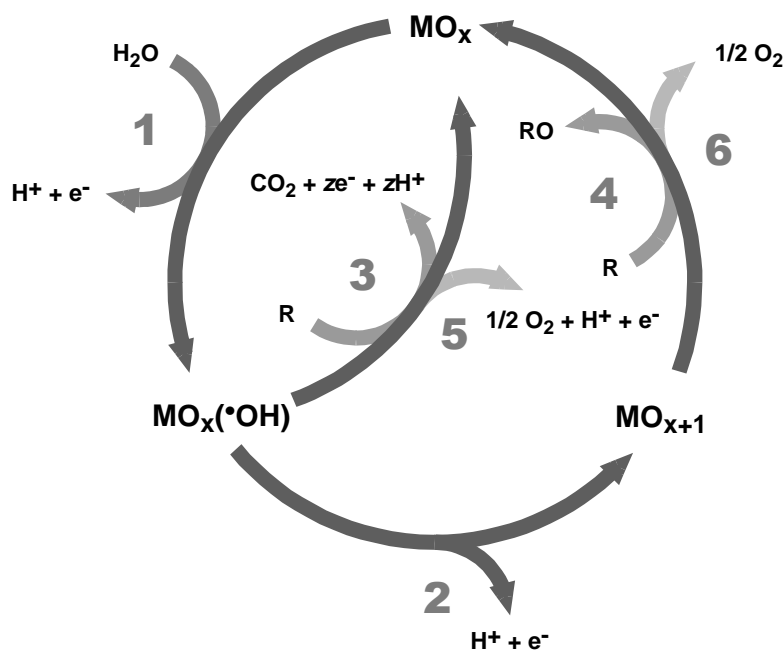
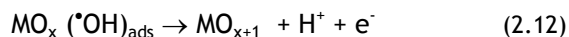
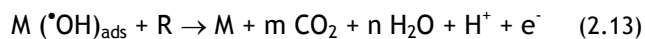


Figura 2.11 - Esquema geral da conversão/combustão eletroquímica de compostos orgânicos com evolução de oxigênio simultânea em ânodos de óxidos metálicos (MO_x). (1) decomposição da água, com formação de radicais hidroxilo; (2) incorporação do oxigênio na estrutura do óxido; (3) combustão do composto orgânico R, por reação com o radical hidroxilo; (4) oxidação (selectiva) parcial do composto orgânico, por reação com MO_{x+1} ; evolução do oxigênio por (5) oxidação eletroquímica de radicais hidroxilo ou (6) decomposição do MO_{x+1} (Comninellis, 1994).

Quando está presente na solução um composto orgânico R:

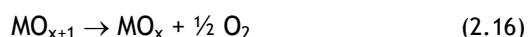
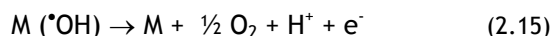
- No caso $\text{M}(\text{*OH})_{\text{ads}}$, a oxidação dos compostos orgânicos é mediada pelos radicais hidroxilo, ocorrendo predominantemente a oxidação completa com formação de CO_2 .



- No caso MO_{x+1} , o par redox da superfície $\text{MO}_{x+1}/\text{MO}_x$ participa na oxidação parcial (selectiva) de compostos orgânicos.



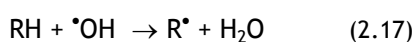
Em ambos os casos, a reação de evolução de oxigênio compete com as reações anteriores e é responsável pelo decréscimo da eficiência de corrente do sistema:



Em suma, a atividade eletroquímica dos radicais $\cdot\text{OH}$ (sobrepotencial de evolução de oxigénio) e a sua reatividade química (velocidade de oxidação do composto orgânico com os radicais eletrogerados) estão fortemente ligadas à força de interação $\text{MO}\cdot\text{OH}$. Como regra geral, quanto mais fraca for a interação, mais baixa é a actividade do ânodo em relação à reação de evolução de oxigénio (ânodos com sobrepotencial mais elevado) e maior a reatividade em relação à oxidação dos compostos orgânicos, sendo favorecida a reação de combustão. Os óxidos em que o estado de oxidação do metal é o mais elevado possível e/ou que contêm um excesso de oxigénio na rede cristalina são os mais adequados para este fim, como é o caso, por exemplo, dos ânodos de PbO_2 , de SnO_2 ou BDD. Por outro lado, a forte interação que existe entre o óxido metálico e os radicais hidroxilo facilita o processo inicial de decomposição da água, conduzindo assim a um valor de sobrepotencial de evolução de oxigénio mais baixo. No entanto, a ligação química formada entre o radical e os sítios ativos torna estes intermediários, MO_{x+1} , menos reativos em relação ao composto orgânico. Assim, numa gama de potenciais próximos do sobrepotencial de evolução de oxigénio, a oxidação eletroquímica dos compostos orgânicos prossegue com uma eficiência de corrente relativamente baixa, e o processo que ocorre preferencialmente é a oxidação parcial do composto orgânico em vez da sua completa mineralização a CO_2 e H_2O (Simond *et al.*, 1997).

O modelo anteriormente descrito considera dois casos limites. No entanto, na prática, é provável que os óxidos, nomeadamente os que possuem uma estrutura do tipo perovesquite, apresentem um comportamento misto. Mesmo que maioritariamente o estado de oxidação do metal seja o mais elevado (ânodo não-ativo), podem existir sítios não completamente oxidados, levando à formação do intermediário MO_{x+1} . De igual modo, em ânodos ativos não se pode excluir a reação de evolução de oxigénio a partir de radicais $\cdot\text{OH}$ adsorvidos fisicamente. Por outro lado, é também provável que o oxigénio molecular participe na oxidação dos compostos, de acordo com as reações abaixo esquematizadas (Brillas *et al.*, 2006):

- formação de radicais orgânicos por um mecanismo de perda de um hidrogénio:



- reação do radical orgânico com o oxigénio formando-se um radical $\text{ROO}\cdot$ muito reativo:



- posterior formação de um hidroperóxido orgânico (ROOH) e outro radical orgânico:



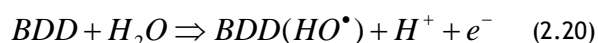
Uma vez que estes hidroperóxidos são relativamente instáveis, a sua decomposição conduz à quebra molecular e formação de intermediários com baixo número de carbonos. Esta reação de cisão pode continuar até à formação de dióxido de carbono e água.

No que diz respeito ao processo de oxidação anódica na degradação de tetraciclinas, vários estudos têm sido efetuados nos últimos anos (Rossi *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Miyata *et al.*, 2011).

Esta tecnologia tem sido amplamente aplicada para remover tetraciclinas sob diferentes condições experimentais. Mais de 90% da degradação de tetraciclina foi atingida por Zhang *et al.* (2009), utilizando Ti/RuO₂-IrO₂ como ânodo, depois de 60 min de eletrólise, a valores de pH de 3,9 e utilizando de 0,1 mol/L de Na₂SO₄ como eletrólito.

Por comparação, a oxidação eletroquímica promove a degradação de tetraciclinas (clorotetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina e doxiciclina) a partir de 100 mg/L a 0,6 mg/L em solução aquosa (remoção de 99%) a 1,5 A de intensidade de corrente, depois de 6 h de tempo de electrólise e utilizando Ti/IrO₂ como ânodo (Miyata *et al.*, 2011). O mesmo processo eletroquímico aplicado por Miyata *et al.* (2011) favoreceu a redução de oxitetraciclina, em efluentes de criação de gado a 100-0,7 mg/L, após 6 h de tratamento. Estudos microbiológicos com *Staphylococcus aureus* demonstraram que a oxitetraciclina terá perdido a atividade antibacteriana após 120 min de eletrólise a 50 mA/cm² (Rossi *et al.*, 2009). De acordo com Homem e Santos (2011), os processos eletroquímicos parecem ser adequados para o tratamento de efluentes industriais contendo altas concentrações de antibióticos. Apesar desta alta eficiência de degradação de antibióticos tetraciclínicos usando a tecnologia eletroquímica, a aplicabilidade deste processo para larga escala continua limitada. O alto custo operacional devido ao elevado consumo de energia ainda é o principal problema que limita a aplicação do processo eletroquímico (Anglada *et al.*, 2009; Brinzila *et al.*, 2012).

No entanto, na maioria dos estudos referidos anteriormente não foram atingidos níveis significativos de mineralização com a utilização de ânodos ativos. Na última década, o eléctrodo de BDD, um ânodo não-ativo, está sendo amplamente utilizado. Este material de eléctrodo apresenta muitas vantagens, ou seja, boa estabilidade química e eletroquímica, vida útil prolongada e um potencial elevado para a decomposição da água, sendo conhecido pela sua capacidade de promover a completa mineralização de uma vasta gama de poluentes orgânicos (Morão *et al.*, 2004; Pannizza e Cerisola, 2005; Pacheco *et al.*, 2007; Ciriaco *et al.*, 2009; Pannizza e Cerisola, 2009; Sirés e Brillas, 2012), devido aos radicais hidroxilo formados a partir de água sobre a superfície do eléctrodo (equação (2.20)), que são a principal espécie responsável pela oxidação dos poluentes.



Na verdade, esses radicais hidroxilo são a espécie mais oxidante depois do flúor e são capazes de promover a mineralização de diferentes classes de compostos orgânicos. No entanto, sabe-se que outras espécies oxidantes fortes podem ser eletrogeradas na superfície do BDD, tais como os peroxoderivados provenientes da oxidação do anião do eletrólito suporte. Por exemplo, o peroxodissulfato (S₂O₈²⁻), que resulta da oxidação de sulfato (Pannizza e Cerisola, 2009; Sirés e Brillas, 2012).

2.6 - Formas de detecção de compostos farmacêuticos

Segundo Dbska *et al.* (2004), os métodos analíticos mais modernos permitem a determinação de substâncias complexas a níveis de concentração muito baixos (na ordem dos ppb e ppt). Contudo, continuam a ser desenvolvidas novas técnicas para melhorar os processos já existentes, bem como se tem procurado desenvolver novos métodos, de maneira a que seja possível a obtenção de melhor informação acerca da poluição da água.

2.6.1 - Cromatografia líquida de alta-eficiência

A determinação dos compostos farmacêuticos e dos seus metabolitos no ambiente requerem técnicas de análise bastante sensíveis e selectivas. Atualmente, técnicas cromatográficas, tal como a cromatografia líquida de alta-eficiência que tem sido amplamente utilizada na detecção deste tipo de compostos numa variedade de amostras. A Tabela 2.3 apresenta o uso da técnica de HPLC na análise de compostos da família das tetraciclinas de uma ampla variedade de amostras.

Tabela 2.3 - Uso da técnica de HPLC na análise de diferentes amostras contendo antibióticos tetraciclínicos.

Antibiótico	Técnica	Amostra	Referência
Oxitetraciclina	HPLC-UV/Vis	Efluentes de ETAR's	Bautitz e Nogueira (2007)
Oxitetraciclina 4-epiclortetraciclina	HPLC-UV/PDA	Solos agrícolas	Brambilla et al. (2007)
Oxitetraciclina Tetraciclina 4-epiclortetraciclina	HPLC-UV	Leite	Fritz e Zuo (2007)
Tetraciclina Clortetraciclina Oxitetraciclina	HPLC-UV	Águas residuais, subterrâneas e superficiais	López-Peñalver et al. (2010)
Oxitetraciclina Tetraciclina Doxiciclina Clortetraciclina	HPLC-UV	Efluentes provenientes da criação de gado	Miyata et al. (2011)
Tetraciclina Clortetraciclina Oxitetraciclina	HPLC-UV	Águas residuais, subterrâneas e superficiais	Gómez-Pacheco et al. (2012)

Recentemente, têm sido aplicadas novas estratégias de HPLC que podem ser acopladas a outras técnicas para a realização de análises a antibióticos tetraciclínicos. Num estudo efetuado em Portugal, Pena *et al.* (2010) estudaram a determinação de tetraciclinas com

base num sistema simples, de baixo custo sensível, que consiste no acoplamento de um sistema de HPLC a um foto-reator ligado a uma pós-coluna derivatizada de foto-fragmentos com íons magnésio. As amostras analisadas eram provenientes efluentes hospitalares e influentes e efluentes de ETAR's de Coimbra. A partir dos resultados obtidos, verificou-se a presença clara de minociclina, clortetraciclina e epitetraciclina. Os níveis encontrados variaram entre 6 a 531,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ em efluentes hospitalares, enquanto que a sua concentração nas ETAR's variou entre 95,8 a 915,3 mg L^{-1} . Estes resultados mostram que os efluentes hospitalares têm uma importante contribuição de TC em ETAR's. Além disso, foram obtidos dados sobre a eficiência de remoção, que variou entre 89,5% e 100%.

Zhang *et al.* (2009) utilizaram um sistema de HPLC-PDA equipado com uma coluna C-18 após o tratamento eletroquímico para avaliar a concentração residual de tetraciclina. Foi utilizada uma fase móvel de solução aquosa di-hidrogenofosfato de potássio (20 mmol L^{-1}):acetonitrilo, 65:35 (v/v) como eluente. Observou-se que a intensidade do pico da tetraciclina diminuiu como a progressão do processo eletroquímico. Foi detetado um novo pico com tempo de retenção mais curto que o da tetraciclina, que indica que o produto de degradação tem maior polaridade do que a tetraciclina.

Carvalho *et al.* (2013) usaram um sistema de HPLC-PDA para a deteção de tetraciclina com o fim de estudar a capacidade das *wet-lands* para remover compostos farmacêuticos veterinários, de águas residuais. Foram observadas eficiências de remoção de 94% ao fim de 12 semanas.

No que diz respeito ao trabalho laboratorial descrito nesta dissertação é usada a técnica de HPLC de fase reversa (HPLC-RP) para a análise do antibiótico oxitetraciclina, pelo que, em seguida, se descreve esta técnica com maior detalhe.

As separações em cromatografia de fase reversa baseiam-se em interações hidrofóbicas entre solutos não polares e grupos funcionais não polares ligados, normalmente, a um suporte de sílica (fase estacionária). A diminuição da polaridade da fase móvel por adição de um solvente orgânico vai reduzir a interação hidrofóbica entre o soluto e a fase estacionária, resultando na dessorção do soluto.

As colunas analíticas tipicamente usadas na separação de tetraciclina são as de fase reversa C18 ou C8, sendo mais comuns as de empacotamentos esféricos e irregulares, geralmente com *end-capping*. As colunas de fase reversa com *end-capping* são utilizadas preferencialmente pela sua habilidade intrínseca de reduzir interações de silanóis residuais. As tetraciclina, devida a suas duplas ligações e substituintes como o oxigénio e o azoto, reagem com silanóis e metais presentes no material de empacotamento de sílica e podem produzir picos com cauda (Anderson, 2005).

A coluna utilizada neste trabalho foi uma coluna Purospher® STAR RP-18 *encapped* que é adequada para separação de compostos ácidos, básicos e quelantes com sensibilidade de deteção elevada. A alta estabilidade do pH até 10,5 permite a separação de compostos bastante básicos com eluentes alcalinos. Por outro lado, esta fase estacionária permite a utilização de fases móveis 100% aquosas. Possui uma alta pureza de 99,9999% e, segundo o

fabricante, a sua superfície assegura picos simétricos de ácidos, bases e ainda para compostos quelantes¹.

O detetor usado foi um detetor constituído por fotodiodos (PDA), que deteta simultaneamente todos os comprimentos de onda num determinado intervalo do UV-Vis. Detetores UV-Vis mostram o resultado obtido em duas dimensões (intensidade da luz e tempo), acrescentando o PDA uma terceira dimensão (comprimento de onda). Isto é indispensável para determinar o comprimento de onda mais adequado sem repetir a análise².

Capítulo 3 - Materiais e métodos

Neste capítulo é feita uma descrição sumária das características do antibiótico oxitetraciclina e são referidos todos os reagentes e equipamentos utilizados para a realização deste trabalho experimental.

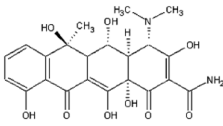
Ainda neste capítulo, é apresentada uma descrição dos ensaios eletroquímicos, bem como da célula eletrolítica e da montagem utilizada para os ensaios de eletrodegradação da oxitetraciclina, descrevendo as condições experimentais estudadas.

Por último, é apresentada uma descrição dos métodos usados para a monitorização dos ensaios de eletrodegradação. Nos ensaios realizados por oxidação anódica foram recolhidas amostras às quais foram efetuadas análises de Carência Química de Oxigénio (CQO), Carbono Orgânico Total (COT), Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta-Vísivel (UV-Vis) e de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* - HPLC).

3.1 - Reagentes

Na Tabela 3.1 encontram-se descritas as características do antibiótico utilizado para a realização dos ensaios de eletrodegradação, a oxitetraciclina.

Tabela 3.1 - Características do antibiótico oxitetraciclina.

Designação	OTC
Nome	Oxitetraciclina
Fórmula molecular	$C_{22}H_{24}N_2O_9 \cdot 2H_2O$
Massa molar/ $g \cdot mol^{-1}$	496,47
Estrutura molecular	
Pureza	$\geq 99\%$
Estado físico	Sólido
Coloração	Amarelo pálido
Odor	Inodoro
Marca	Sigma-Aldrich

Na Tabela 3.2, apresentam-se as características do eletrólito utilizado, o sulfato de sódio.

Tabela 3.2 - Características do eletrólito sulfato de sódio.

<i>Reagente</i>	<i>Fórmula química</i>	<i>Grau de pureza / %</i>	<i>Massa molecular / g.mol⁻¹</i>	<i>Marca</i>
Sulfato de sódio anidro	Na ₂ SO ₄	99	142.04	Merck

Na Tabela 3.3, encontram-se listados os reagentes usados para a realização dos vários métodos de análise, bem como o seu grau de pureza e marca.

Tabela 3.3 - Reagentes utilizados nos vários métodos de análise.

	<i>Reagentes</i>	<i>Marca</i>
CQO	K ₂ Cr ₂ O ₇ (pureza: 99%)	Panreac
	H ₂ SO ₄ (pureza: 95-97%)	Sigma-Aldrich
	Ag ₂ SO ₄ (pureza: 98,5%)	Carlo Erba
	HgSO ₄ (pureza: 99%)	Fluka
	FeH ₂₀ N ₂ O ₁₄ S ₂ (pureza: 99%)	Panreac
COT	C ₈ H ₅ KO ₄ (pureza: 99,5%)	Sigma-Aldrich
HPLC	CH ₃ CN (pureza: 99%)	Merck
	Solução de ácido oxálico (concentração: 0,01M)	Fluka
	Solução de ácido fosfórico (concentração: 85-90%)	Fluka
	CH ₃ OH (pureza: 99,8%)	Fluka

3.2 - Equipamento

Para as determinações de CQO utilizou-se ácido sulfúrico/sulfato de prata, que foi medido com um doseador de ácido *Socorex calibrex 520* (Figura 3.1 (a)). As amostras foram homogeneizadas num vórtex *VWR VV3* (Figura 3.1 (b)). O digestor usado neste teste era da *Merck Spectroquant TR 420* (Figura 3. (c)) e a titulação foi efetuada com um titulador automático *Metrohm 876 Dosimat Plus* (Figura 3.1 (d)).

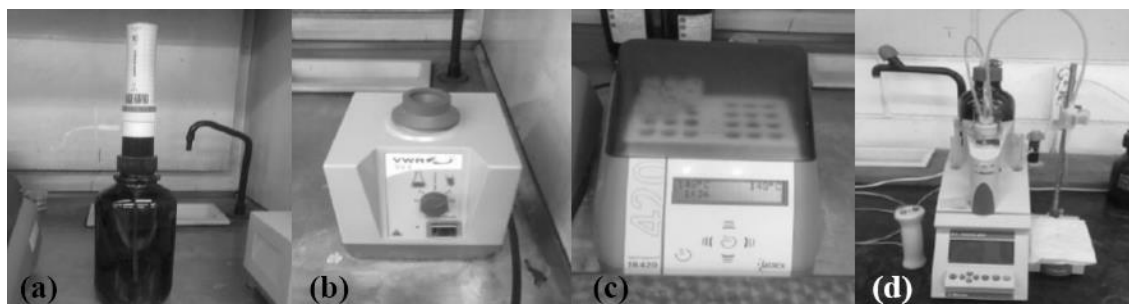


Figura 3.1 - Material utilizado na realização do teste de CQO: (a) *Socorex calibrex 520*, (b) *VWR VV3*, (c) *Merck Spectroquant TR 420*, (d) *Metrohm 876 Dosimat Plus*.

Os teores de COT foram determinados recorrendo-se a um analisador TOC da *Shimadzu*, modelo *TOC-V CPH*, acoplado a um amostrador automático, modelo *ASI-V*. (Figura 3.2).



Figura 3.2: Analisador TOC da *Shimadzu*, modelo *TOC-V CPH*.

Para traçar espectros, utilizou-se o espectrofotómetro UV-Vísivel de feixe duplo da *Shimadzu*, modelo *UV-1800* (Figura 3.3).



Figura 3.3 - Espectrofotómetro *Shimadzu*, modelo *UV-1800*.

A identificação e quantificação da OTC e do ácido oxâmico foram realizados num sistema de HPLC *Shimadzu 20A Prominence*, com um detetor de fotodiodos *SPD-M20A*, utilizando uma

coluna de fase reversa *Purospher® STAR RP-18, endcapped (5 µm), LiChroCART® 250-4 HX944315*, e uma pré-coluna com o mesmo enchimento, *LiChroCART® 4-4 HX121024*.



Figura 3.4 - Sistema HPLC Shimadzu 20A Prominence HPLC SPD-M20A.

3.3 - Ensaios de eletrodegradação da oxitetraciclina

Os ensaios de degradação eletroquímica da oxitetraciclina foram realizados num sistema que opera em modo “batch” com agitação (100 rpm), utilizando-se uma placa de agitação E 649 e um agitador com 2,5 cm de comprimento e 0,5 cm de diâmetro. A montagem utilizada para a realização destes ensaios encontra-se esquematizada na Figura 3.5, sendo composta por uma fonte de alimentação GW-lab DC, modelo GPS-3030D, e por uma célula eletroquímica que contém um eléctrodo de BDD como ânodo, com uma área de 10 cm², e como cátodo uma placa de aço inoxidável, com a mesma área, estando os eléctrodos distanciados entre si de 1 cm.

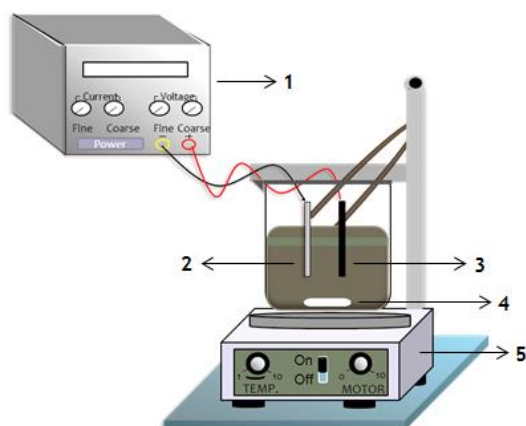


Figura 3.5 - Montagem experimental dos ensaios de eletrodegradação da oxitetraciclina.

Legenda: 1 - Fonte de alimentação; 2 - Eléctrodo de aço inoxidável; 3 - Eléctrodo de BDD; 4 - Agitador magnético; 5 - Placa de agitação.

Os ensaios de oxidação anódica foram realizados usando soluções de OTC de 100 ppm, utilizando Na₂SO₄ (5 g/L) como eletrólito suporte, sendo este adicionado à solução de OTC no início de cada ensaio. No decorrer do trabalho laboratorial, foi estudado o efeito da variação da intensidade de corrente na degradação da oxitetraciclina por oxidação anódica. Os ensaios foram realizados com intensidades de corrente que variaram entre os 0,025 a 0,1A, sendo o volume de solução de oxitetraciclina tratada de 200 mL.

Os ensaios de eletrodegradação foram repetidos várias vezes, pois: i) era necessário um volume de amostra elevado para efetuar análises de CQO, COT e HPLC e espectros de absorção; ii) uma recolha exagerada de amostra ao longo de um ensaio iria afetar os resultados experimentais, uma vez que se estaria a variar a carga elétrica específica que se estava a fornecer à solução; iii) para se obterem dados para calcular as médias e os desvios padrão em relação aos resultados de CQO e de COT. Para além disso, convinha estender o estudo da variação da CQO e do COT no tempo, para garantir que por oxidação anódica é possível degradar completamente o poluente em estudo. Assim, os ensaios experimentais em que se pretendia estudar o andamento de CQO e de COT e efetuar a análise de espectrofotometria de absorção UV-Vis tiveram a duração de 6 h, tendo as amostras sido recolhidas a cada hora. Para análise de HPLC, os ensaios tiveram a duração de 2 h, tendo as amostras sido recolhidas a espaços menores. Para estas amostras, foram efetuadas determinações de espectrofotometria de absorção UV-Vis. A Tabela 3.4 apresenta um resumo do esquema de duração dos ensaios e do tempo de recolha das amostras.

Tabela 3.4 - Duração do ensaio e tempo de recolha de amostras para cada técnica analítica.

<i>Duração do ensaio</i>	<i>Tempos de amostragem</i>	<i>Técnica analítica</i>
6 h	1 h	CQO
6 h	1 h	COT
6 h 2 h	30 min 5,10,15,30,60 e 120 min	Espectrofotometria de absorção UV-Vis
2 h	5,10,15,30,60 e 120 min	HPLC

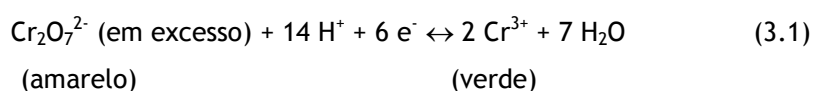
É importante referir que, entre a realização dos ensaios foi feita uma limpeza do eléctrodo com uma solução de Na₂SO₄ (5 g/L), durante 30 minutos, a uma intensidade de corrente de 300 mA.

3.4.- Métodos de análise

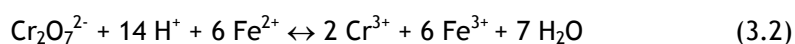
Os métodos de análise utilizados para avaliar a eficácia da eletrodegradação do antibiótico foram: determinações de CQO e de COT, medidas espectrofotométricas na zona do UV-visível e HPLC.

3.4.1 - Determinação da Carência Química de Oxigênio

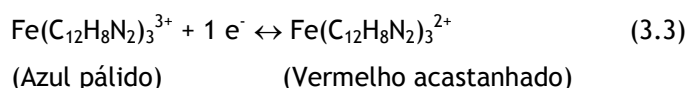
O parâmetro usado para quantificar a matéria orgânica presente nas amostras foi a CQO, expressa em quantidade de oxigênio equivalente necessário para oxidar completamente a matéria orgânica contida na solução, que seja susceptível de ser oxidada por um oxidante forte. Neste trabalho utilizou-se o método titrimétrico com refluxo fechado, tendo-se utilizado uma adaptação do procedimento descrito no *Standard Methods* (Eaton et al., 2005). O método utilizado para a determinação de CQO envolveu uma oxidação da amostra em refluxo fechado, por um excesso conhecido de dicromato de potássio, em ácido sulfúrico e na presença de um catalisador (sulfato de prata), à temperatura de 148°C (temperatura de refluxo do ácido), durante duas horas. Nestas condições, a matéria orgânica susceptível de oxidação foi oxidada a CO₂ e H₂O, com a redução de uma quantidade equivalente de dicromato hexavalente (cor amarela) a crômio trivalente (cor verde):



Depois da oxidação, o dicromato em excesso foi quantificado por titulação, utilizando-se o sulfato ferroso amoniacal (SFA) como titulante, na presença de um indicador redox, a ferroína:



A cor vermelha acastanhada do ponto de equivalência é devido à formação de um complexo do ião ferroso com a fenantrolina, que tem lugar quando o dicromato é reduzido a Cr (III) e, portanto, um excesso de sulfato ferroso amoniacal resulta num excesso de Fe (II):



Para avaliar o rigor do método, foram analisados padrões de CQO preparados com hidrogenoftalato de potássio, usado como matéria orgânica oxidável, escolhido como padrão devido à sua estabilidade em solução e à sua completa oxidação nas condições da análise.

O procedimento experimental detalhado encontra-se descrito no anexo I.

3.4.2 - Determinação do Carbono Orgânico Total

O método utilizado no presente trabalho para a determinação de COT foi baseado no procedimento descrito no *Standard Methods* (Eaton et al., 2005).

A análise de COT dá-nos uma medida da quantidade de carbono orgânico total existente na solução, independentemente do seu estado de oxidação.

No presente estudo, a determinação deste parâmetro nas amostras recolhidas ao longo do ensaio permite avaliar a mineralização, isto é, a oxidação completa da matéria orgânica que leva à formação de CO₂, H₂O e iões inorgânicos.

A amostra é injetada num ambiente de oxidação química, no interior de uma câmara de combustão contendo um catalisador de partículas de Pt adsorvidos em Al₂O₃, a 680 °C, onde a matéria orgânica é oxidada a CO₂ e H₂O. O CO₂ produzido é quantificado num analisador de infravermelho não dispersivo. Trata-se de um método rápido e de elevada sensibilidade.

No presente trabalho, as retas de calibração utilizadas para a determinação da concentração do COT foram efetuadas a partir de soluções padrão de hidrogenoftalato de potássio.

Para as determinações de COT, as amostras foram diluídas numa proporção de 2:3.

3.4.3 - Análise espectrofotométrica na zona UV-Visível

Neste trabalho, foram traçados espectros na zona de UV-Visível, assim quando a radiação incide sobre a substância, uma parte é absorvida seletivamente pela substância conforme a sua estrutura molecular e atômica. Todas as substâncias possuem níveis de energia que são uma característica específica das moléculas que a constituem. Quando a radiação correspondente à energia igual à diferença entre a energia do estado fundamental e a energia do estado excitado incide sobre uma substância, os eletrões no estado fundamental são transferidos para o estado excitado e a parte da energia da radiação correspondente aquele comprimento de onda é absorvida. A absorção de radiação eletromagnética na região do UV-Visível por parte de compostos orgânicos tem por base, sobretudo, transições eletrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$.

Na monitorização dos ensaios de eletrodegradação por espectrofotometria de absorção UV-visível, os espectros foram traçados num intervalo de varrimento entre 200 a 500 nm e foram utilizadas células de quartzo (semi-micro) com percurso óptico de 1,00 cm. As soluções analisadas foram diluídas numa proporção de 1:2.

3.4.4 - Análise por cromatografia líquida de alta eficiência

A técnica de HPLC é um método de separação e identificação largamente usada na química analítica. A avaliação quantitativa da degradação do antibiótico oxitetraciclina e dos seus metabolitos foi realizada por HPLC.

Para a determinação da oxitetraciclina foi usada como fase móvel uma mistura de uma solução de ácido oxálico (0,01 M):acetonitrilo, 70:30 (v/v), usando eluição isocrática. Foi

utilizado um fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e 30°C . Nestas condições, o tempo de retenção observado foi de 2,8 min.

Para a determinação do metabolito formado, o ácido oxâmico, foi usada como fase móvel uma mistura de uma solução tampão fosfato pH=3 (10 mM):metanol, 90:10 (v/v)), usando eluição isocrática. Foi utilizado um fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ e 30°C . O tempo de retenção observado foi de 4,5 min.

O volume de injeção foi de $20 \mu\text{L}$ e as amostras, tal como os eluentes, foram previamente filtradas, usando filtros para seringa de polipropileno $0,45 \mu\text{m}$ da VWR para as amostras e filtros *hidrophilic polypropylene* (PALL) para os eluentes. O detetor usado foi de fotodiodos, operando aos comprimentos de onda de 354 nm para a oxitetraciclina e 210 nm para o ácido oxâmico.

A identificação da oxitetraciclina e do ácido oxâmico foi feita pelos picos correspondentes ao tempo de retenção dos compostos e comparação da área/altura dos picos obtidos em cada ensaio com a área/altura dos picos das soluções padrão. É através destas soluções padrão que são traçadas curvas de calibração para cada um dos compostos a identificar e, é através destas que é possível identificar a concentração destes compostos presentes nas amostras dos ensaios de eletrodegradação da OTC realizados. As equações das curvas de calibração para a oxitetraciclina e para ácido oxâmico apresentam-se a seguir:

$$\text{Oxitetraciclina: } y = 2,697\text{E}+06 \ln(x) - 4,900\text{E}+06 \quad R^2 = 9,955\text{E}-01$$

$$\text{Ácido oxâmico: } y = 38371x + 4278,3 \quad R^2 = 0,9985$$

Capítulo 4 - Resultados e discussão

Neste trabalho foi realizado o estudo da eletrodegradação do antibiótico oxitetraciclina a diferentes intensidades de corrente aplicada, apresentando-se, neste capítulo, os resultados obtidos.

O estudo da eficiência da degradação do antibiótico foi comprovado através de testes de CQO, de COT, de espectrofotometria de absorção de UV-Visível e de HPLC.

4.1 - Estudo do efeito da densidade de corrente

As intensidades de corrente aplicadas nos ensaios de oxidação anódica foram de 25, 50, 75 e 100 mA, que correspondem a densidades de corrente compreendidas entre 2,5 e 10 mA cm⁻². Os resultados obtidos para a variação de CQO e de COT, bem como os espectros de absorção UV-Vis e HPLC, ao longo dos ensaios de degradação eletroquímica da oxitetraciclina realizados a diferentes intensidades de corrente aplicada são apresentados a seguir.

4.1.1 - Estudo da degradação da oxitetraciclina

Nos gráficos da variação da absorvência ao longo do tempo (Figura 4.1) pode observar-se uma diminuição gradual da intensidade de absorção das bandas características da OTC, sem o aparecimento de novas bandas até às 4,5 h de ensaio. Contudo, para a intensidade de corrente de 25 mA observa-se, a partir das 4,5 h, o aparecimento de uma nova banda com um máximo de absorção aos 370 nm e um “ombro” aos 400 nm. Também para o ensaio efetuado a 50 mA se observa o mesmo “ombro” aos 400 nm, sem, no entanto, se verificar o aparecimento da banda aos 370 nm. Para as intensidades de corrente superiores apenas se observa a formação de um ligeiro “ombro” aos 400 nm, mas para tempos de reação inferiores. Estas observações devem estar relacionadas com a formação de intermediário(s), cuja velocidade de degradação é acelerada pela aplicação de intensidades de corrente superiores e que, portanto, se tornam menos perceptíveis nos ensaios realizados a 75 e a 100 mA. Também para a zona de comprimentos de onda inferiores a 270 nm se observam alterações após as 4,5 h de ensaios para o ensaio realizado a 25 mA.

Para melhor compreensão da influência da densidade de corrente no decaimento da absorvência, foram traçadas as variações da absorvência relativa (Abs/Abs_0) com o tempo para os comprimentos de onda dos máximos das bandas características da OTC, 276 e 355 nm, para os ensaios realizados às várias intensidades de corrente (Figura 4.2). É evidente a alteração do andamento dessas curvas para tempos superiores a 4,5 h nos ensaios realizados a 25 e 50 mA. Contudo, esta alteração deixa de ser perceptível para as intensidades de 75 e de 100 mA, sendo a degradação desse(s) intermediário(s) acelerada pela maior intensidade de corrente.

Estudo da degradação eletroquímica da oxitetraciclina

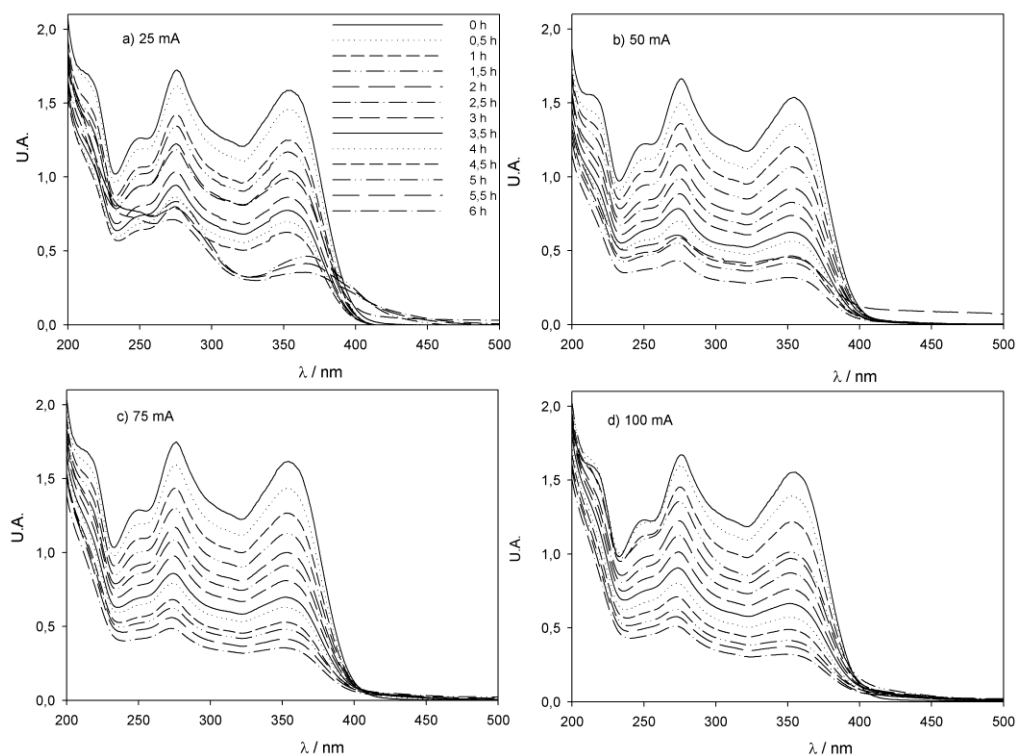


Figura 4.1 - Espectros UV-Visível para as amostras recolhidas durante as 6 h do estudo da eletrodegradação da oxitetraciclina para as diferentes intensidades de corrente aplicadas.

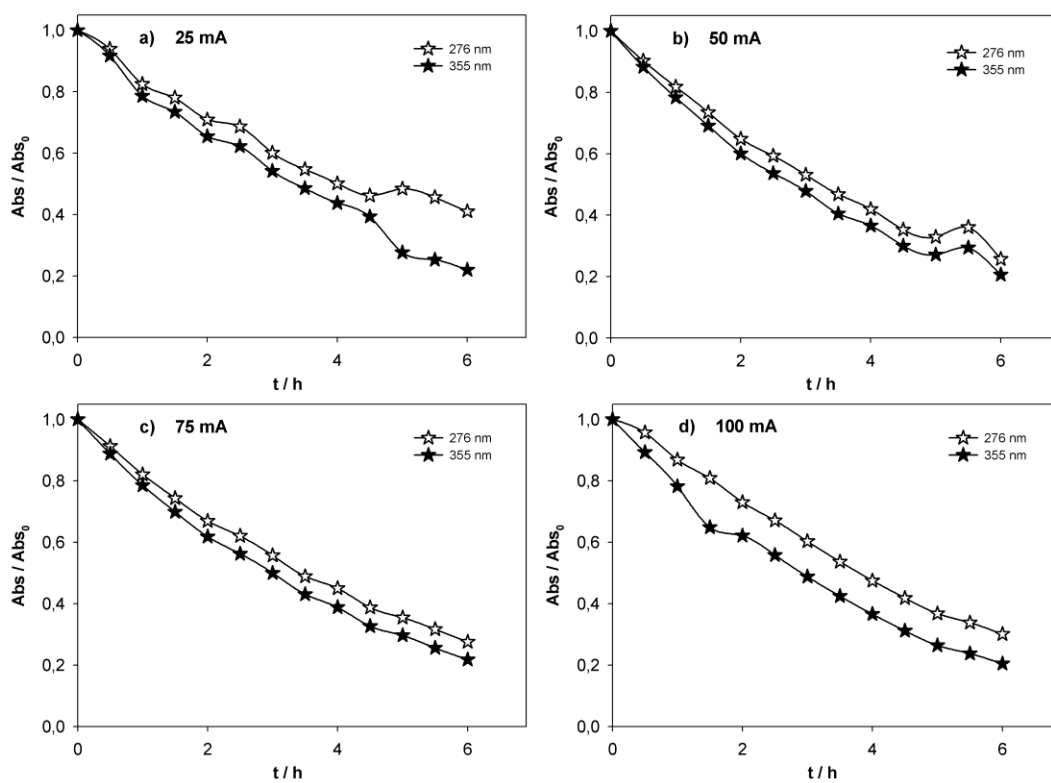


Figura 4.2 - Evolução da absorvência relativa (Abs/Abs_0) com o tempo das bandas características da OTC para as intensidades de corrente de 25, 50, 75 e 100 mA.

Um outro facto que se pode observar na Figura 4.2 é que o decaimento a 355 nm é sempre superior ao verificado a 276 nm, em particular para 100 mA, onde há um maior afastamento nas curvas de decaimento da absorvência aos dois comprimentos de onda. De acordo com a literatura (Wang et al., 2011) nas tetraciclina, a banda a 276 nm está associada à estrutura aromática do anel A (Figura 2.6), enquanto que a banda a 355 nm está relacionada com a estrutura composta pelos outros 3 anéis B, C e D. Deste modo, a diferença de comportamento observada aos dois comprimentos de onda deverá estar relacionada com uma degradação mais rápida da estrutura formada pelos 3 anéis ou devido à formação de produtos de degradação que absorvem na região dos 276 nm, contribuindo assim para um decaimento mais lento da absorvência a este comprimento de onda.

As variações de CQO e de COT ao longo dos ensaios realizados estão representadas na Figura 4.3. Verificam-se decaimentos regulares na variação destes dois parâmetros com o tempo, mostrando que a oxidação da OTC, tal como a sua mineralização, são possíveis nas condições experimentais testadas. Verifica-se ainda uma boa reprodutibilidade dos dados obtidos ao longo de diferentes ensaios, porque na maior parte dos casos os desvios são pequenos, em particular para as determinações de COT.

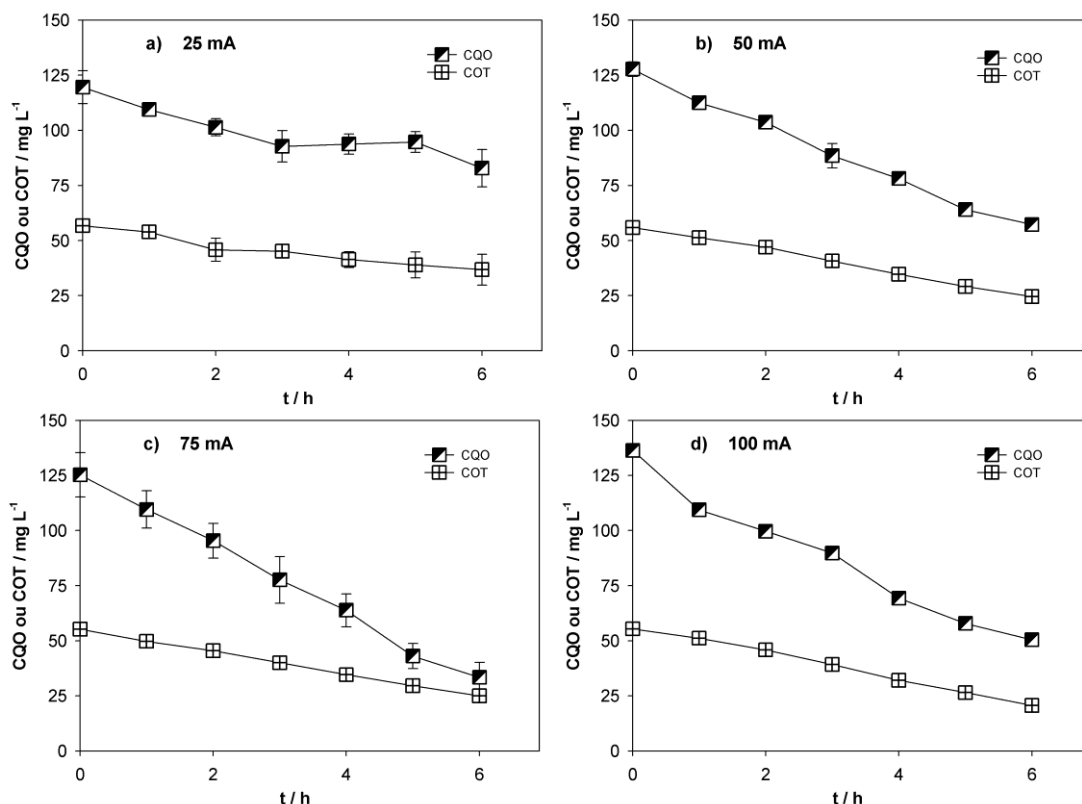


Figura 4.3 - Evolução da CQO, COT e da absorvência relativa (Abs/Abs_0) com o tempo das bandas características da OTC para as densidades de corrente de 25, 50, 75 e 100 mA.

Quando se comparam os resultados obtidos para as amostras recolhidas ao longo do tempo, para os ensaios realizados às várias densidades de corrente estudadas (Tabela 4.1 e Figura 4.4) verifica-se que:

- As remoções de absorvência a 355 nm são praticamente constantes, enquanto que a 276 nm há uma grande variação entre os valores observados para 25 e para 50 mA, mantendo-se o valor aproximadamente constante para as intensidades de corrente superiores.
- A variação da CQO no ensaio realizado a 25 mA apresenta um patamar entre as 3 e as 5 h, provavelmente devido à formação de intermediários mais resistentes à oxidação, ou mesmo produtos da oxidação da OTC que polimerizam à superfície do eletrodo, desativando-a. Esta observação é parcialmente corroborada com um ligeiro patamar também observado no decaimento do COT.
- A remoção do COT aumenta com a intensidade de corrente, não se verificando igual tendência para o decaimento da CQO. Isto significa, em geral, que o índice de mineralização da OTC varia com a intensidade de corrente. Esta situação pode ser provocada pela formação de diferentes metabolitos para as várias intensidades de corrente aplicadas, que resistem de modo diverso à posterior degradação.

Tabela 4.1. - Remoções de CQO, de COT e de absorvência a 276 e 355 nm ao fim de 6 h de ensaio para a eletrodegradação da OTC.

Parâmetro	Intensidade de corrente aplicada / mA				
	25	50	75	100	
Remoção / %	Abs (276 nm)	59	74	72	70
	Abs (355 nm)	78	79	78	80
	CQO	31	55	73	63
	COT	35	56	55	63

Estudo da degradação eletroquímica da oxitetraciclina

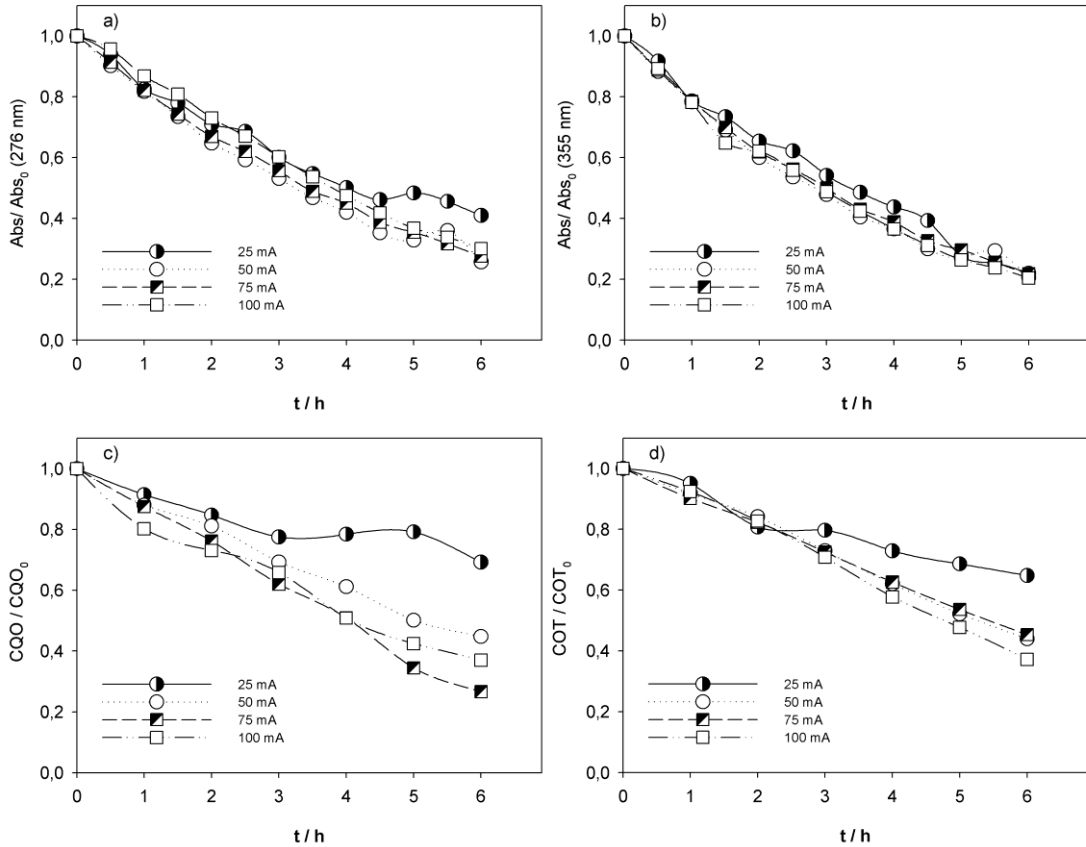


Figura 4.4 - Evolução temporal das razões (Abs/Abs_0) a 276 (a) e a 355 nm (b), de CQO/CQO_0 (c) e de COT/COT_0 (d) para as amostras recolhidas ao longo do tempo, nos ensaios realizados às várias densidades de corrente estudadas.

4.1.2 - Estudo da degradação da oxitetraciclina por análise de HPLC.

Nas Figuras 4.5 a 4.8 apresentam-se os cromatogramas referentes aos ensaios de degradação da OTC às diferentes intensidades de corrente testadas. Existe um decréscimo na intensidade do pico relativo àquele antibiótico (tempo de retenção 2,8 min), que é tanto mais notório quanto maior é a intensidade de corrente aplicada, como se pode ver na Figura 4.9, onde se encontram os dados referentes à variação relativa da concentração de OTC determinada a partir dos cromatogramas.

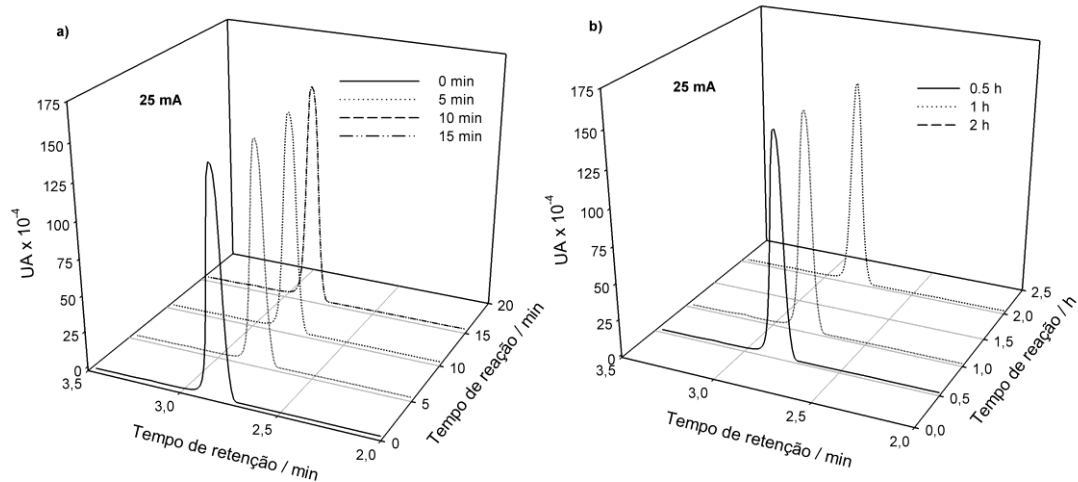


Figura 4.5 - Cromatogramas obtidos para a OTC durante a realização do ensaio de eletrodegradação da OTC a 25 mA.

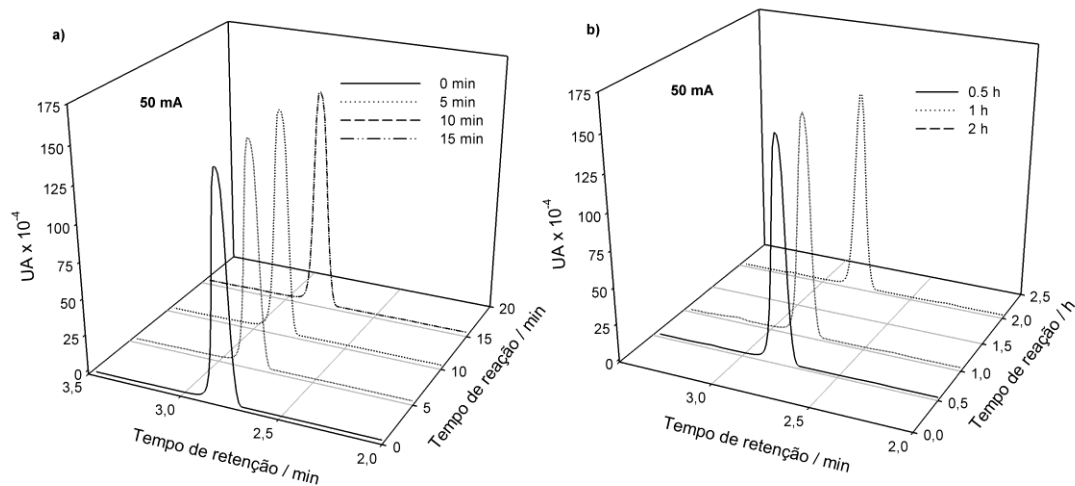


Figura 4.6 - Cromatogramas obtidos para a OTC durante a realização do ensaio de eletrodegradação da OTC a 50 mA.

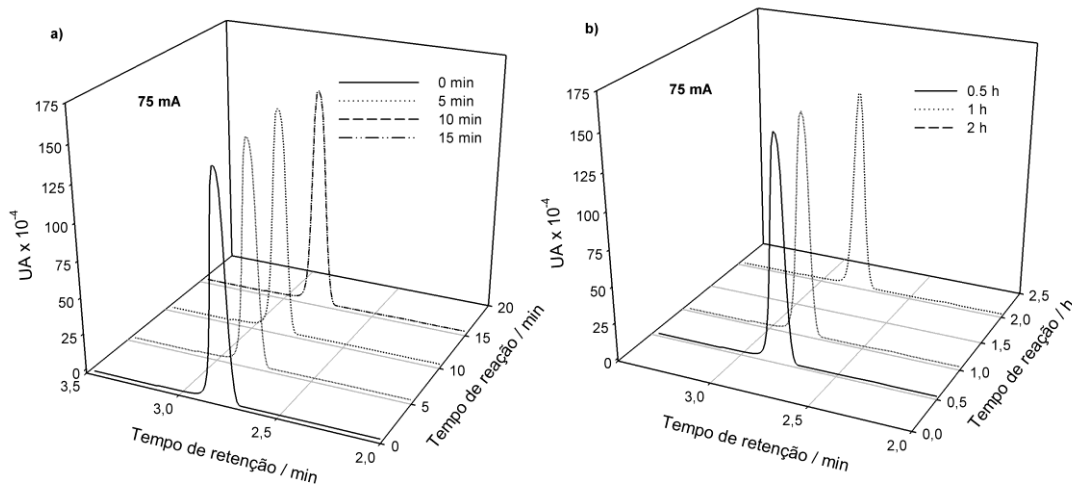


Figura 4.7 - Cromatogramas obtidos para a OTC durante a realização do ensaio de eletrodegradação da OTC a 75 mA.

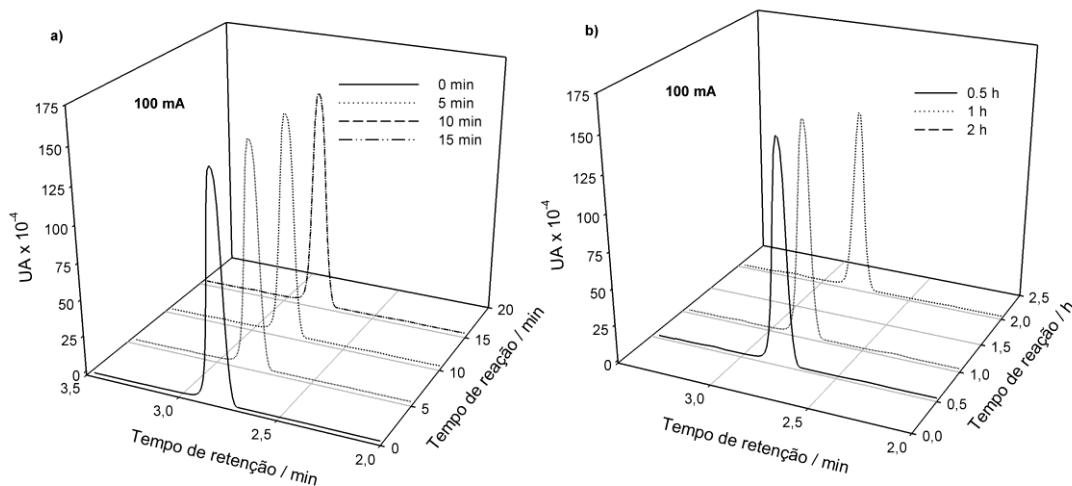


Figura 4.8 - Cromatogramas obtidos para a OTC durante a realização do ensaio de eletrodegradação da OTC a 100 mA.

Estas remoções de OTC são muito superiores às observadas para as remoções de CQO ou de COT ao fim de 2 h de ensaio, significando que a estrutura da OTC é destruída com relativa facilidade por oxidação anódica com um eletrodo de BDD, sendo a posterior oxidação dos metabolitos mais lenta, embora com um grau de mineralização elevado, pois as diferenças entre as remoções de CQO e de COT são menos significativas.

Com base nas concentrações de OTC determinadas por HPLC ao longo dos ensaios, foram ajustadas curvas exponenciais aos dados experimentais (Figura 4.10), representativas de um

mecanismo de pseudo primeira ordem, com as constantes cinéticas obtidas indicadas na Tabela 4.2.

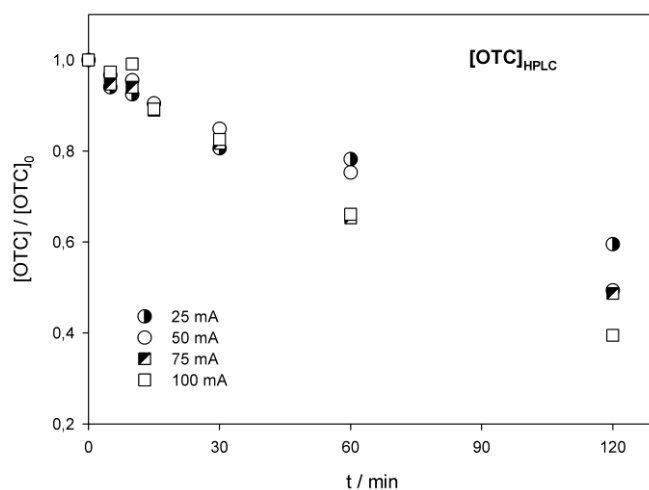


Figura 4.9 - Concentrações de OTC em função do tempo obtidas pela realização do ensaio de eletrodegradação da OTC às várias intensidades de corrente.

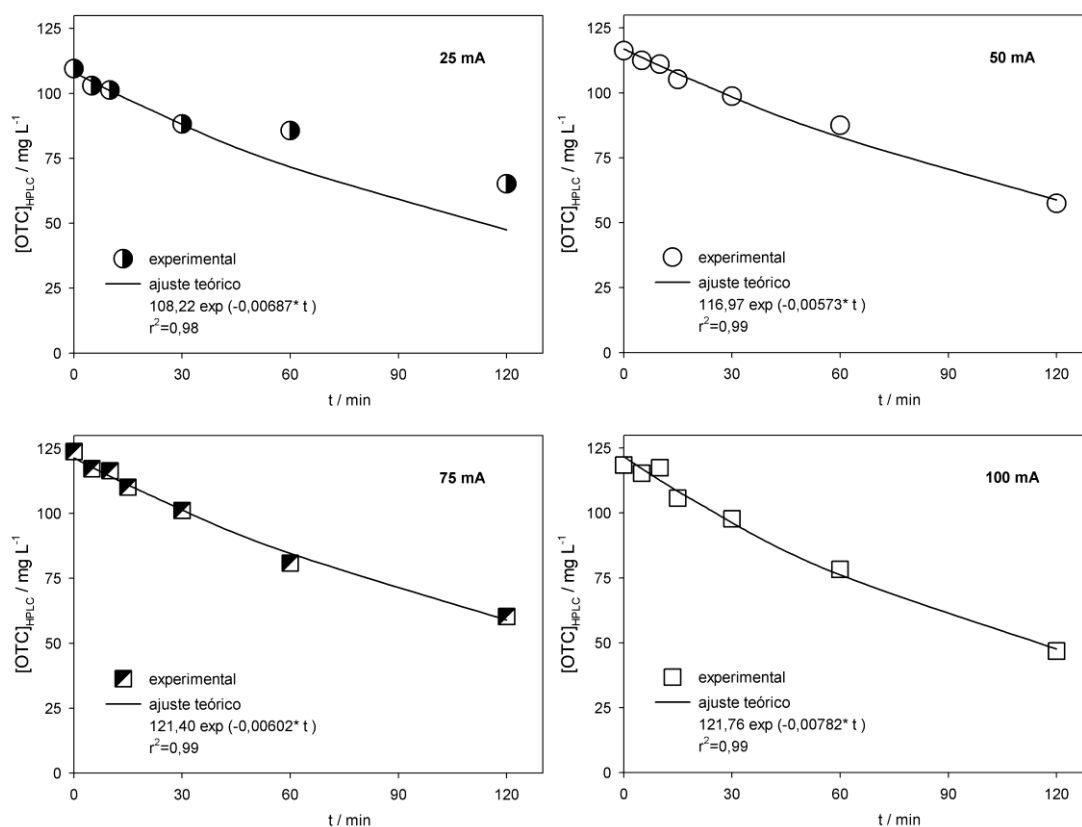


Figura 4.10 - Cinéticas de 1ª ordem dos ensaios de eletrodegradação da OTC às várias intensidades de corrente estudadas.

Tabela 4.2 - Constante cinética para as reações de degradação da OTC às diferentes intensidades de corrente aplicadas.

	Intensidade de corrente aplicada / mA			
	25	50	75	100
$k_{obs} / 10^{-5} s^{-1}$	11,5	9,6	10,0	13,0

4.1.3 - Identificação do metabolito ácido oxâmico por análise de HPLC

Com vista a identificar os metabolitos da degradação da OTC formados durante os ensaios de oxidação anódica, e tendo em vista os resultados obtidos por Brinzila et al. (2012) na degradação da tetraciclina, em que havia evidências de um composto orgânico contendo azoto, num estado de oxidação potencialmente elevado, foi decidido pesquisar a existência de ácido oxâmico nos produtos de degradação da OTC. Os resultados obtidos mostraram que, efetivamente, este composto é formado durante a oxidação anódica da OTC. Nas Figuras 4.11 a 4.14 encontram-se os cromatogramas onde se evidencia a existência de ácido oxâmico ao longo dos ensaios de degradação.

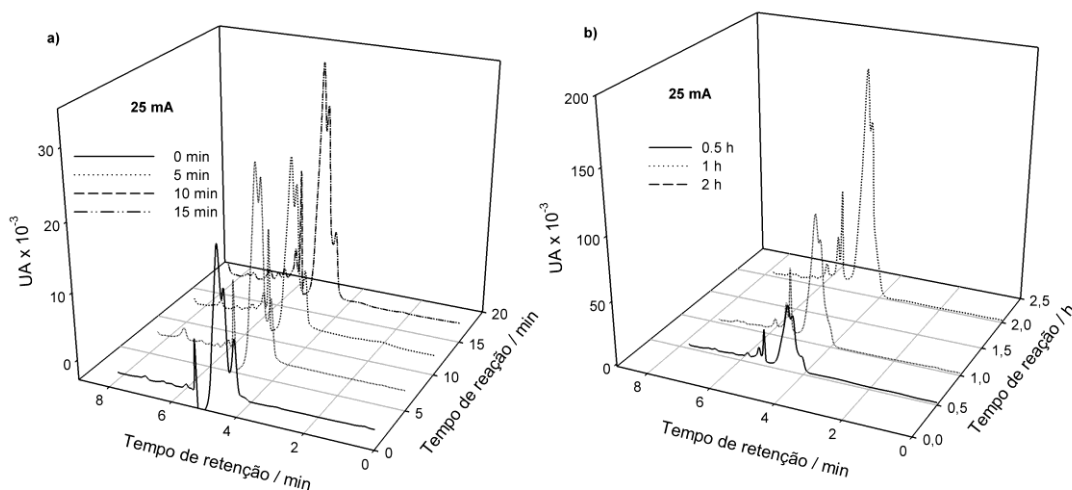


Figura 4.11 - Cromatogramas do metabolito ácido oxâmico obtidos pela realização do ensaio de eletrodegradação da OTC a 25 mA.

Estudo da degradação eletroquímica da oxitetraciclina

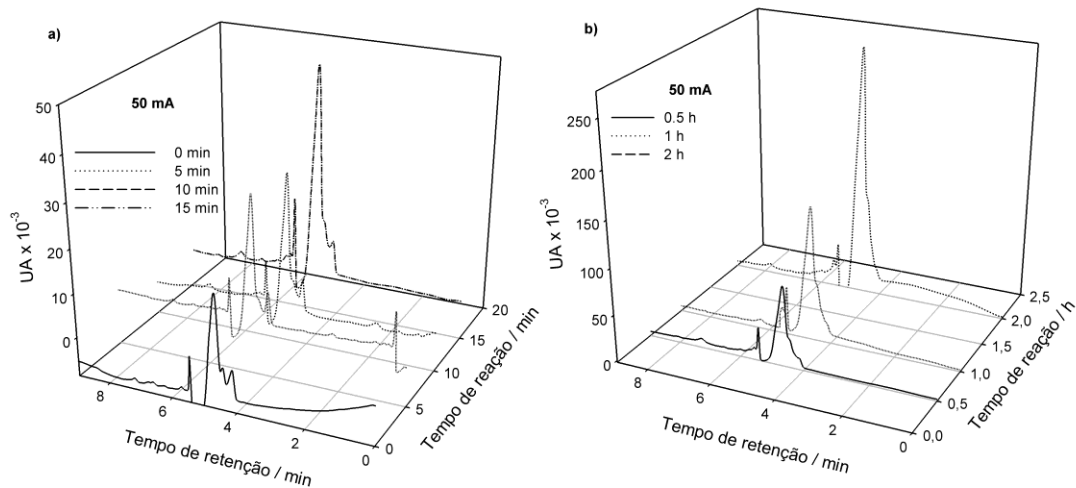


Figura 4.12 - Cromatogramas do metabolito ácido oxâmico obtidos pela realização do ensaio de eletrodegradação da OTC a 50 mA.

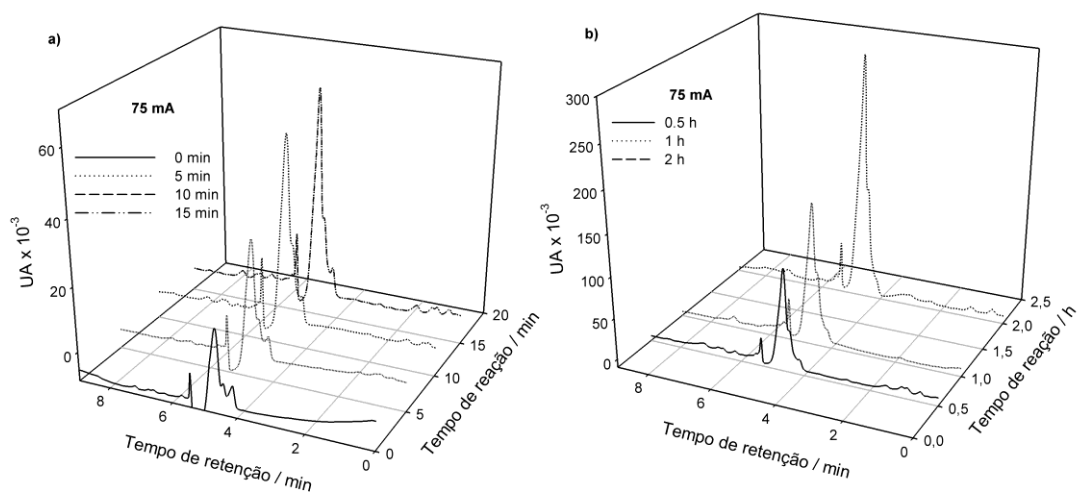


Figura 4.13 - Cromatogramas do metabolito ácido oxâmico obtidos pela realização do ensaio de eletrodegradação da OTC a 75 mA.

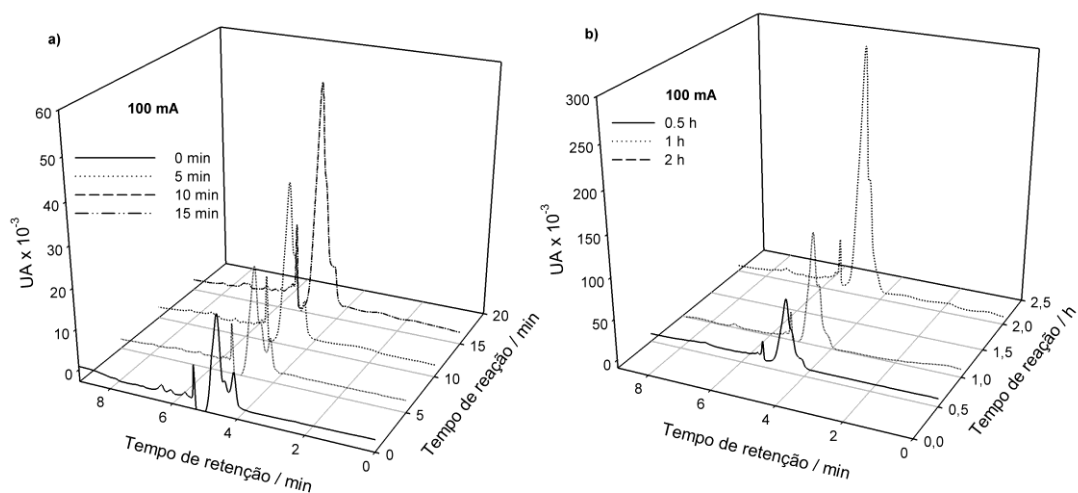


Figura 4.14 - Cromatogramas do metabolito ácido oxâmico obtidos pela realização do ensaio de eletrodegradação da OTC a 100 mA.

Para além do pico relativo ao ácido oxâmico (tempo de retenção 4,5 min), foram detetados novos picos a um tempo de retenção menor, indicando que existem ainda outros metabolitos a serem formados e que são mais polares do que o composto de origem. Num tempo de retenção superior, também são detetados novos picos, mas que diminuem ao longo do tempo. Isto pode provar a presença de produtos intermédios que também podem ser degradados na superfície do BDD.

A variação da concentração de ácido oxâmico ao longo dos ensaios de degradação da OTC, realizados a diferentes intensidades de corrente, está representada na Figura 4.15. Observa-se que a concentração de ácido oxâmico aumenta ao longo do tempo, sendo esse aumento maior para as intensidades de corrente aplicadas superiores.

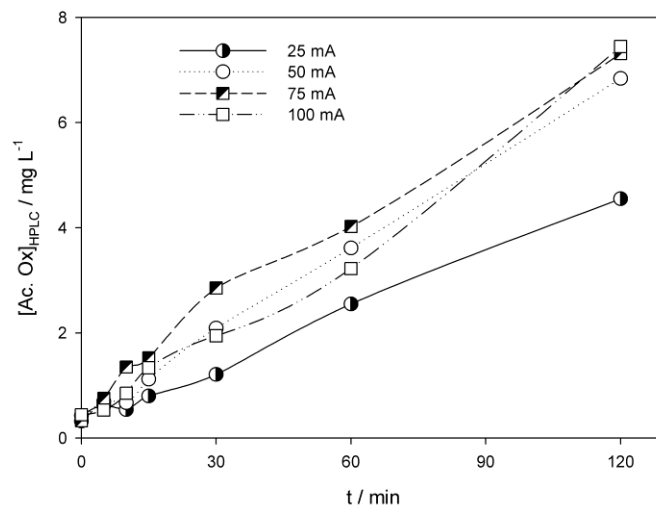


Figura 4.15 - Concentração do metabolito ácido oxâmico em função do tempo obtida durante a realização dos ensaios de eletrodegradação da OTC às várias intensidades de corrente.

Capítulo 5 - Conclusões e perspectivas futuras

Neste trabalho estudou-se a degradação da oxitetraciclina por oxidação anódica, usando como ânodo um eletrodo de BDD, tendo os ensaios sido efetuados num sistema que opera em modo “batch” com agitação.

No decorrer do trabalho laboratorial, foi estudado o efeito da variação da intensidade de corrente na velocidade de degradação eletroquímica da oxitetraciclina. Os ensaios foram realizados com intensidades de corrente que variaram entre os 25 mA e os 100 mA. Nas amostras recolhidas ao longo dos ensaios foram efetuadas análises de CQO, de COT, de espectrofotometria de absorção do UV-Visível e de HPLC.

Do estudo da degradação eletroquímica da oxitetraciclina com o eletrodo de BDD, usando sulfato de sódio como eletrólito, destacam-se as seguintes conclusões:

- ✓ Nos ensaios de eletrodegradação da OTC verificam-se decaimentos regulares na variação da CQO e COT ao longo do tempo nos ensaios de eletrodegradação, mostrando que a oxidação da OTC, tal como a sua mineralização, são possíveis nas condições experimentais testadas.
- ✓ A remoção de COT aumenta para com a intensidade de corrente, não se verificando semelhante comportamento para o decaimento da CQO, o que significa que o índice de mineralização da OTC varia com a intensidade de corrente. Este facto pode ser devido à formação de diferentes metabolitos, que resistem de modos diferentes à posterior degradação.
- ✓ Na análise das amostras recolhidas ao longo do tempo de ensaio verificou-se que o decaimento da concentração de OTC, determinada por HPLC, era muito superior aos decaimentos de CQO ou COT observados. Esta observação corrobora a afirmação de que há formação de intermediários no processo de oxidação anódica da OTC.
- ✓ Ainda por HPLC, foi possível identificar um dos produtos da degradação da OTC como sendo o ácido oxâmico. Verificou-se também que a sua concentração aumenta à medida que a reação de oxidação da OTC prossegue, sendo tanto maior quanto maior é a intensidade de corrente aplicada. Para além do pico correspondente ao ácido oxâmico, observaram-se também outros picos, que mostram que há formação de outros metabolitos.

Ficaram ainda por explorar muitos aspetos relativos à degradação da OTC, pelo que, como perspectivas de trabalho futuro se apontam as seguintes:

- ✓ Tentar identificar outros intermediários da reação de oxidação anódica da OTC, nomeadamente ácidos carboxílicos de cadeia curta, que se sabem estarem presentes na parte final das degradações eletroquímicas de compostos orgânicos.

- ✓ Seguir os estudos de degradação eletroquímica por ensaios de biodegradabilidade e de toxicidade, para avaliar o impacto ambiental relacionado com a aplicação de processos eletroquímicos, a possibilidade de dirigir para processos biológicos misturas submetidas a oxidação anódica parcial, de modo a reduzir os custos dos processos eletroquímicos.

Bibliografia

Addamo, M.; Augugliaro, V.; Di Paola, A.; Gracia-López, E.; Loddo, V.; Marci, G.; Palmisano, L.; *Removal of drugs in aqueous systems by photoassisted degradation*; Journal of Applied Electrochemistry; **35** 765-774, 2005.

Alonso-Salles, N.A.; Fourcade, F.; Geneste, F.; Floner, D.; Amrane, A.; *Relevance of an electrochemical process prior to a biological treatment for the removal of an organophosphorous pesticide, phosmet*; Journal of Hazardous Materials; **181** 617-623, 2010.

Anderson, C.R.; Rupp, H.S.; Wu, W.H.; *Complexities in tetracycline analysis - chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography*; Journal of Chromatography A; **1075** 23-32, 2005.

Andreu, V.; Vasquez-Roig, P.; Blasco, C.; Picó, Y.; *Determination of tetracycline residues in soil by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry*; Analytical and Bioanalytical Chemistry; **394** 1329-1339, 2009.

Anglada, A.; Urtiaga, A.; Ortiz, I.; *Contributions of electrochemical oxidation to waste-water treatment: fundamentals and review of applications*; Journal of Chemical Technology and Biotechnology; **84** 1747-1755, 2009.

Arslan-Alaton, I.; Caglayan, A.E.; *Toxicity and biodegradability assessment of raw and ozonated procaine penicillin G formulation effluent*; Ecotoxicology and Environmental Safety; **63** 131-140, 2006.

Arslan-Alaton, I.; Dogruel, S.; *Pre-treatment of penicillin formulation effluent by advanced oxidation processes*; Journal of Hazardous Materials; **112** 105-113, 2004.

Bailón-Pérez, M.I.; Garcia-Campaña, A.M.; Cruces-Blanco, C.; Iruela, M.O.; *Trace determination of b-lactam antibiotics in environmental aqueous samples using off-line and on-line preconcentration in capillary electrophoresis*; Journal of Chromatography A; **1185** 273-280, 2008.

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

Barceló, D.; *Emerging pollutants in water analysis*; Trends in Analytical Chemistry; **22** 14-16, 2003.

Basha, C.A.; Chithra, E.; Sripriyalakshmi, N.K.; *Electro-degradation and biological oxidation of non-biodegradable organic contaminants*; Chemical Engineering Journal; **149** 25-34, 2009.

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

Bendz, D.; Paxeus, N.A.; Ginn, T.R.; Loge, F.J.; *Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden*; Journal of Hazardous Materials; **122** 195-204, 2005.

Brambilla, G.; Patrizii, M. ; De Filippis, S.P. ; Bonazzi, G. ; Mantovi, P. ; Barchi, D. ; Migliore, L. ; *Oxytetracycline as environmental contaminant in arable lands* ; Analytica Chimica Acta; **586** 326-329, 2007.

Braund, R.; Peake, B.M.; Schieffelbien, L.; *Disposal practises for unused medications in New Zeland*; Environment Internacional; **35** 952-955, 2009.

Brillas, E.; Arias, C.; Cabot, P. L.; Centellas, F.; Garrido, J. A.; Rodríguez, R. M.; *Degradation of organic contaminants by advanced electrochemical oxidation methods*; Portugaliae Electrochimica Acta; **24** 159-189, 2006.

Brinzila, C.I.; Pacheco, M.J.; Ciriaco, L.; Ciobanu, R.C.; Lopes, A.; *Electrodegradation of tetracycline on BDD anode*; Chemical Engineering Journal; **209** 54-61, 2012.

Brown, K.D.; Kulis, J.; Thomson, B.; Chapman, T.H.; Mawhinney, D.B.; *Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico*; Science of The Total Environmental; **366** 772-783, 2006.

Bu, Dan; Zhuang, H.; *Biotemplated synthesis of high specific surface area copper-doped hollow spherical titania and its photocatalytic research for degradating chlorotetracycline*; Applied Surface Science; **265** 677-685, 2013.

Calderón-Preciado, D.; Matamoros, V.; Bayona, J. M.; *Occurence and potencial crop uptake of emerging contaminants and related compounds in an agricultural irrigation network*; Science of the Total Environment; **412-413** 14-19, 2011.

Cañizares, P.; Garcia-Gómez, J.; Fernández de Marcos, I.; Rodrigo, M.A.; Lobato, J.; *Measurement of mass-transfer coefficients by an electrochemical technique*; Journal of Chemical Education; **83** 1204-1207, 2006.

Carvalho, P.N.; Araújo, J.L.; Mucha, A.P.; Clara, M.; Basto, P.; Marisa, C.; Almeida, R.; *Potential of constructed wetlands microcosms for the removal of veterinary pharmaceuticals from livestock wastewater*; Bioresource Technology; **134** 412-416, 2013.

Chiayvareesajja, S.; Chandumpai, A.; Theapparat, Y.; Faroongsarng, D.; *The complete analysis of oxytetracycline pharmacokinetics in farmed pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei)*; Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics; **29** 409-414, 2006.

Chopra, I.; Roberts, M.; *Tetracycline antibiotics : Mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance*; Microbiology and Molecular Biology Reviews; **65** 232-260, 2001.

Círiaco, L.; Anjo, C.; Correia, J.; Pacheco, M. J.; Lopes, A.; *Electrochemical degradation of Ibuprofen on Ti/Pt/PbO₂ and Si/BDD electrodes*; Electrochimica Acta; **54** 1464-1472, 2009.

Comninellis, C.; *Electrocatalysis in the electrochemical conversion/combustion of organic pollutants for waste water treatment*; Electrochimica Acta; **39** 1857-1862, 1994.

Comninellis, C.; Pulgarin, C.; *Anodic oxidation of phenol for wastewater treatment*; Journal of Applied Electrochemistry; **21** 703-708, 1991.

Comninellis, C.; Plattner, E.; Hynden, J.; Vercesi, G.P.; *Caractérisation des électrodes de type DSA pour le dégagement de O₂—I. L'électrode Ti/IrO₂Ta₂O₅*; Electrochimica Acta; **33** 573-580, 1998.

Crane M; Watts, C.; Boucard, T.; *Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals*; Science of The Total Environment **367** 23-41, 2006.

Daghkira, R.; Droguia, P.; Kab, I.; El Khakanib, M.A.; *Photoelectrocatalytic degradation of chlortetracycline using Ti/TiO₂ nanostructured electrodes deposited by means of a pulsed laser deposition process*; Journal of Hazardous Materials; **199-200** 15-24, 2012.

Dantas, R.F.; Contreras, S.; Sans, C.; Esplungas, S.; *Sulfamethoxazole abatement by means of ozonation*; Journal of Hazardous Materials; **150** 790-794, 2008.

Daughton, C.G.; *Non-regulated water contaminants: emerging research*; Environmental Impact Assessment Review; **24** 711-732, 2004.

Daughton, C.G.; Ternes, T.A.; *Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents or subtle change?*; Environmental Health Perspectives; **107** 907-938, 1999.

Dbska, J.; Kot-Wasik, A.; Namienik, J.; *Fate and Analysis of Pharmaceutical Residues in the Aquatic Environment*; Critical Reviews in Analytical Chemistry; **34** 51-67, 2004.

Deblonde, T.; Cossu-Leguilleb, C.; Hartemanna, P.; *Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature*; International Journal of Hygiene and Environmental Health; **214** 442- 448, 2011.

Dorne, J.L.C.M.; Ragas, A.M.J.; Frampton, G.K.; Spurgeon, D.S.; Lewis, D.F.; *Trends in human risk assessment of pharmaceuticals*; Analytical and Bioanalytical Chemistry; **387** 1167-1172, 2007.

Drogui, P.; Blais, J.F.; Mercier, G.; *Review of electrochemical technologies for environmental applications*; Recent Patents on Engineering; **1** 257-272, 2007.

Eaton, A.; Clesceri, L., Greenberg, A.; *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*; American Public Health Association; Washington, Estados Unidos 2005.

El-Ghenmy, A; Arias, C.; Cabot, P.L.; Centellas, F.; Garrido, J.A.; Brillas, E.; *Electrochemical incineration of sulfanilic acid at a boron-doped diamond anode*; Chemosphere; **87** 1126-1133, 2012.

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

Farré, M.J.; Brosillon, S.; Domènech, X.; Peral, J.; *Evaluation of the intermediates generated during the degradation of Diuron and Linuron herbicides by the photo-Fenton reaction*; Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry; **189** 364-373, 2007.

Fent, K.; Weston, A.; Caminada, D.; *Ecotoxicology of human pharmaceuticals*; Aquatic Toxicology; **76** 122-159, 2006.

Figuerola, R.A.; Leonard, A.; Mackay, A.A.; *Modeling tetracycline antibiotic sorption to clays* Environmental Science & Technology; **38** 476-483, 2004.

Filho, R.; Barreiro, J.; Vieira, E.; Cass, B.; *Fármacos, ETE's e corpos hídricos*; Ambiente & Água; **2** 54-61, 2007.

Fritz, J.W.; Zuo, Y.; *Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline, and 4-epitetracycline in milk by high-performance liquid chromatography*; Food Chemistry; **105** 1297-1301, 2007.

Giokas, D.L.; Vlessidis, A.G.; *Application of a novel chemometric approach to the determination of aqueous photolysis rates of organic compounds in natural waters*; Talanta; **71** 288-295, 2007.

Glassmeyer, S.T.; Hinchey, E.H.; Boehme, S.E.; Daughton, C.G.; Ruhoy, I.S.; Conerly, O.; Daniels, R.L.; Lauer, L.; McCarthy M.; Nettesheim, T.G.; Sykes, K.; Thompson, V.G.; *Disposal practises for unwanted residential medications in the United States*; Environmental Internacional; **35** 566-572, 2009.

Glassmeyer, S.T.; Kolpin, D.W.; Furlong, E.T.; Focazio M.J.; *Environmental presence and persistence of pharmaceuticals: an overview*, em: Aga, D.S.: *Fate of Pharmaceuticals in the Environment and in Water Treatment Systems*; CRC Press, Taylor and Francis; **1** 3-52, 2008.

Gómez-Pacheco, C.V.; Sánchez-Polo, M.; Rivera-Utrilla, J.; López-Peñalver, J.J.; *Tetracycline degradation in aqueous phase by ultraviolet radiation*; Chemical Engineering Journal; **187** 89-95, 2012.

Halling-Sorensen, B.; Lykkeberg, A.; Ingerslev, F.; Blackwell, P.; Tjornelund, J.; *Characterisation of the abiotic degradation pathways of oxytetracyclines in soil interstitial water using LC-MS-MS*; Chemosphere; **50** 1331-42, 2003.

Halling-Sorensen, B.; Nielsen, S.N.; Lanzky, P.F.; Ingerslev, F.; Lutzhoft, H.C.H.; Jorgensen, S.E.; *Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - a review*; Chemosphere; **36** 357-394, 1998.

Halling-Sorensen, B., Sengelov G.; Tjornelund, J.; *Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria*; Archives of Environmental Contamination and Toxicology; **42** 263-271, 2002.

Heberer, T.; *Occurrence, fate and removal of pharmaceuticals residues in the aquatic environment: a review of recent data*; Toxicology Letters; **131** 5-17, 2002.

Hernandez, R.; Zappi, M.; Colucci, J.; Jones, R.; *Comparing the performance of various advanced oxidation processes for treatment of acetone contaminated water*; Journal of Hazardous Materials; **92** 33-50, 2002.

Hernando, M.D.; Mezcuca, M.; Fernández-Alba, A.R.; Barceló, D.; *Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments*; Talanta; **69** 334-342, 2006.

Homem, V; Santos, L.; *Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices - a review*; Journal of Environmental Management; **92** 2304-2347, 2011.

Hou, L.; Zhang, H.; Xue, X.; *Ultrasound enhanced heterogeneous activation of peroxydisulfate by magnetite catalyst for the degradation of tetracycline in water*; Separation and Purification Technology; **84** 147-152, 2012.

Hu, L.; Flanders, P.M.; Miller, P.L.; Strathmann, T.J.; *Oxidation of sulfamethoxazole and related antimicrobial agents by TiO₂ photocatalysis*; Water Research; **41** 2612-2626, 2007.

Huerta, B.; Rodriguez-Mozaz; Barceló, D.; *Pharmaceuticals in biota in the aquatic environment: analytical methods and environmental implications*; Analytical and Bioanalytical Chemistry **404** 2611-2624, 2012.

Irmak, S.; Erbatur, O.; Akgerman, A.; *Degradation of 17 β -estradiol and bisphenol A in aqueous medium by using ozone and ozone/UV techniques*; Journal of Hazardous Materials; **126** 54-62, 2005.

Jara, C.C.; Fino, D.; Specchia, V.; Saracco, G.; Spinelli, P.; *Electrochemical removal of antibiotics from wastewater*; Applied Catalysis B; **70** 479-487, 2007.

Jiao, S.; Zheng, S.; Yin, D.; Wang, L.; Chen, L.; *Aqueous photolysis of tetracycline and toxicity of photocatalytic products to luminescent bacteria*; Chemosphere; **73** 377-382, 2008.

Jones, O.; Voulvoulis, N.; Lester, J.; *Potential Ecological and Human Health Risks Associated with the Presence of Pharmaceutically Active Compounds in the Aquatic Environment*; Critical Reviews in Toxicology; **34** 335 - 350, 2004.

Jones-Lepp, T.; Stevens, R.; *Pharmaceuticals and personal care products in biosolids/sewage sludge e the interface between analytical chemistry and regulation*; Analytical and Bioanalytical Chemistry; **387** 1173-1183, 2007.

Kay, P.; Blackwell, P.A.; Boxall, A.B.A.; *Transport of veterinary antibiotics in overland flow following the application of slurry to arable land*; Chemosphere; **59** 951-959, 2005.

Kemper, N.; *Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment*; Ecological indicators; **8** 1-13, 2008.

Kidd, K.A.; Blanchfield, P.J.; Mills, K.H.; Palace, V.P.; Evans, R.E.; Lazorchak, J.M.; Flick, R.W.; *Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen*; Proceedings of the National Academy of Sciences USA; **104** 8897-890, 2007.-

Kim, H; Hong, Y.; Park, J.; Sharma, V.K. Cho, S.; *Sulfonamides and tetracyclines in livestock wastewater*; Chemosphere; **91** 888-894, 2013.

Kim, S.; Jensen, J.N.; Aga, D.S.; Weber, A.S.; *Tetracycline as a selector for bacteria in activated sludge*; Chemosphere; **66** 1643-1651, 2007.

Kim, S.D.; Cho, J.; Kim, I.S.; Vanderford, B.J.; Snyder, S.A; *Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking and waste waters*; Water Research; **41** 1013-1021, 2007.

Kinney, C.; Furlong, E.; Zaugg, S.; Burkhardt, M.; Werner, S.; Cahill, J.; Jorgensen, G.; *Survey of organic wastewater contaminants in biosolids destined for land application*; Environmental Science & Technology; **40** 7207-7215, 2006.

Kumar, K.; Gupta, S.C.; Baidoo, S.K.; Chander, Y.; Rosen, C.J.; *Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure*; Jornal of Environmental Quality; **34** 2082-2085, 2005.

Kummerer, K.; *Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - a review*; Chemosphere; **45** 957-969, 2001.

Kummerer, K.; *Antibiotics in the aquatic environment - a review - part I*; Chemosphere; **75** 417-434, 2009.

Kummerer, K.; *Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - a review*; Chemosphere; **45** 957-969, 2001.

Kummerer, K.; *Pharmaceuticals in the Environment*; Springer; Freiburg, Alemanha, 2008.

Kummerer, K.; *The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use - present knowledge and future challenges*; Journal of Environmental Management; **90** 2354-2366, 2009.

Lalumera, G.M.; Calamari, D.; Galli, P.; Castiglioni, S.; Crosa, G.; Fanelli, R.; *Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy*; Chemosphere; **54** 661-668, 2004.

Lapworth, D.J.; Baran, N.; Stuart, M.E.; Ward, R.S.; *Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence*; Environmental Pollution; **163** 287-303, 2012.

Larsson, D.G.J.; Pedro, C.; Paxeus, N.; *Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals*; Journal of Hazardous Materials; **148** 751-755, 2007.

Lee, H.; Lee, E.; Lee, C.H.; Lee, K.; *Degradation of chlortetracycline and bacterial disinfection in livestock wastewater by ozonebased advanced oxidation*; Journal of Industrial and Engineering Chemistry; **17** 468-473, 2011.

Li, K.; Yediler, A.; Yang, M.; Schulte-Hostede, S.; Wong, M.H.; ; *Ozonation of oxytetracycline and toxicological assessment of its oxidation by-products*; Chemosphere; **72** 473-478, 2008.

Lienert, J.; Bürki, T.; Escher, B.I.; *Reducing micropollutants with source control: substance flow analysis of 212 pharmaceuticals in faeces and urine*; Water Science and Technology; **55** 87-96, 2007.

Lopez-Peñalver, J.J.; Sánchez-Polo, M.; Gómez-Pacheco, C.V.; Rivera-Utrilla; *Photodegradation of tetracyclines in aqueous solution by using UV and UV/H₂O₂ oxidation processes*; Journal of Chemical Technology and Biotechnology; **85** 1325-1333, 2010.

Martínez-Huitle, C. A.; Brillas, E.; *Decontamination of wastewaters containing synthetic organic dyes by electrochemical methods: a general review*; Applied Catalysis; **87** 105-145, 2009.

Migliore, L. ; Godeas, F. ; De Filippis, S.P. ; Mantovi, P. ; Barchi, D. ; Testa, C. ; Rubattu, N.; Brambilla, G. ; *Hormetic effect(s) of tetracyclines as environmental contaminant on Zea mays* ; Environmental Pollution; **158** 129-134, 2010.

Miyata, M; Ihara, I.; Yoshid, G.; Toyod, K.; Umetsu, K.; *Electrochemical oxidation of tetracycline antibiotics using a Ti/IrO₂ anode for wastewater treatment of animal husbandry*; Water Science & Technology; **63** 456-461, 2011.

Mohan, N.; Balasubramanian, N.; Basha, C. A.; *Electrochemical oxidation of textile wastewater and its reuse*; Journal of Hazardous Materials; **147** 644-651, 2007.

Morão, A.; Lopes, A.; Pessoa de Amorim, M.T.; Gonçalves, I.C.; *Degradation of mixtures of phenols using boron doped diamond electrodes for wastewater treatment*; Electrochimica Acta; **49** 1587-1595, 2004.

Nepejchalova, L.; Svobodova, Z.; Kolairova, J.; Fragolva, K.; Valova, J.; Nemethova, D.; *Oxytetracycline assay in pond sediment*; Acta Veterinaria Brno; **77** 461-466, 2008.

Oller, I.; Malato, S.; Sánchez-Pérez, J.A.; *Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination—A review*; Science of the Total Environment; **409** 4141-4166, 2011.

Oturan, N.; Wu, J.; Zhang, H.; Sharma, V.K.; , Oturan, M.A.; *Electrocatalytic destruction of the antibiotic tetracycline in aqueous medium by electrochemical advanced oxidation processes: Effect of electrode materials*; Applied Catalysis B: Environmental; **140-141** 92- 97, 2013.

Pacheco, M.J.; Morão, A.; Lopes, A.; Ciríaco, L.; Gonçalves, I.; *Degradation of phenols using boron-doped diamond electrodes: A method for quantifying the extent of combustion*; Electrochimica Acta; **53** 629-636, 2007.

Palominos, R.; Freer, J.; Mondaca, M.A.; Mansilla, H.D.; *Evidence for hole participation during photocatalytic oxidation of the antibiotic flumequine*; Journal of Photochemistry and Photobiology A; **193** 139-145, 2008.

Palominos, R.A.; Mondaca, M.A.; Giraldo, Ana; Peñuela, G.; Pérez-Moya, M.; Mansilla, H.D.; *Photocatalytic oxidation of the antibiotic tetracycline on TiO₂ and ZnO Suspensions*; Catalysis Today; **144** 100-105, 2009.

Panizza, M.; Cerisola, G.; *Application of diamond electrodes to electrochemical processes*; Electrochimica Acta; **51** 191-199, 2005.

Panizza, M.; Cerisola, G.; *Direct and mediated anodic oxidation of organic pollutants*; Chemical Reviews; **109** 6541-6569, 2009.

Pena, A., Paulo, M.; Silva, L.J.G.; Seifrtová, M.; Lino, C.M.; Solic, P.; *Tetracycline antibiotics in hospital and municipal wastewaters: a pilot study in Portugal*; Analytical and Bioanalytical Chemistry; **396** 2929-2936, 2010.

Pera-Titus, M; Garcia-Molina, V; Banos, MA; Gimenez, J; Esplugas, S.; *Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation processes: a general review*; Applied Catalysis B: Environmental; **47** 219-256, 2004.

Pery, A.R.R.; Gust, M.; Vollat, B.; Mons, R.; Ramil, M.; Fink, G.; Ternes, T.; Garric, J.; *Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates*; Chemosphere; **73** 300-304, 2008.

Petrovic, M.; De Alda, M.J.L.; Diaz-Cruz, S.; Postigo, C.; Radjenovic, J.; Gros, M.; Barceló, D.; *Fate and removal of pharmaceuticals and illicit drugs in conventional and membrane bioreactor wastewater treatment plants and by riverbank filtration*; Philosophical Transactions of the Royal Society A: Physical, Mathematical and Engineering Sciences **367** 3979-4003, 2009.

Pignatello, J.J.; *Dark and photoassisted Fe³⁺ catalyzed degradation of chlorophenoxy herbicides by hydrogen peroxide*; Environmental Science & Technology; **26** 944-951, 1992.

Rehman, M. S. U.; Rashid, N.; Muhammad, A.; Saif, A.; Ahmad, N.; *Global risk of pharmaceutical contamination from highly populated developing countries*; Chemosphere; <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.02.036>, 2013.

Reyes, C.; Fernández, J.; Freer, J.; Mondaca, M.A.; Zaror, C.; Malato, S.; Mansilla, H.D.; *Degradation and inactivation of tetracycline by TiO₂ photocatalyst*; Journal of Photochemistry and Photobiology A; **184** 141-146, 2006.

Roberts, P.H.; Thomas, K.V.; *The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment*, Science of the Total Environment; **356** 143-153, 2006.

Rodriguez, M.A.; González-Piñera, J.G.; Penié, J.B.; Alonso, N.L.; Areu, A., Nuñez, A.P; *Tetraciclinas*; Acta Medica; **8** 75-90, 1998.

Rossi, A.; Alves, V.A.; Da Silva, L.A.; Oliveira, M.A.; Assis, D.O.S.; Santos, F.A.; De Miranda, R.R.S.; *Electrooxidation and inhibition of the antibacterial activity of oxytetracycline hydrochloride using RuO₂ electrode*; Journal of Applied Electrochemistry; **39** 329-337, 2009.

Santos, J.; Pizzolato, T.; Cunha, A.; *Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação de fármacos em meio aquático por extracção em fase sólida e HPLC*; Revista de Ciências Ambientais; **1** 19-34, 2007.

Santos, L.; Araujo, A.N.; Fachinia, A.; Penab A.; Delerue-Matos, C.; , Montenegro, M.; *Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment*; Journal of Hazardous Materials; **175** 45-95, 2010.

Santos, V.; Morão, A.; Pacheco, M. J.; Ciriaco, L.; Lopes, A.; *Electrochemical degradation of azo dyes on BDD: Effect of chemical structure and operating condition on the combustion efficiency*; Journal of Environmental Management; **18** 193-204, 2008.

Sassman, S; Lee, L.S.; *Sorption of three tetracyclines by several soils: Assessing the role of pH and cation exchange*; Environmental Science & Technology; **39** 7452-7459, 2004.

Shaojun, J.; Shourong, Z.; Daqiang, Y.; Lianhong, W.; Liangyan, C.; *Aqueous oxytetracycline degradation and the toxicity change of degradation compounds in photoirradiation process*; Journal of Environmental Sciences; **20** 806-813, 2008.

Shenker, M.; Harush, D.; Ben-Ari, J.; Chefetz, B.; *Uptake of carbamazepine by cucumber plants e a case study related to irrigation with reclaimed wastewater*; Chemosphere; **82** 905-910, 2011.

Simond, O.; Schaller, V.; Comninellis, C.; *Theoretical model for the anodic oxidation of organics on metal oxide electrodes*; Electrochimica Acta; **42** 2009-2012, 1997.

Sires, I.; Brillas, E.; *Remediation of water pollution caused by pharmaceutical residues based on electrochemical separation and degradation technologies: a review*; Environment International; **40** 212-229, 2012.

Skoumal, M.; Cabot, P.; Centellas, F.; Arias, C., Rodríguez, R.M.; Garrido, J.A.; Brillas, E.; *Mineralization of paracetamol by ozonation catalyzed with Fe²⁺, Cu²⁺ and UVA light*; Applied Catalysis B: Environmental; **66** 228-240, 2006.

Stackelberg P.; Furlong, E.; Meyer, M.; Zaugg, S.; Henderson, A.; Reissman, D.; *Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant*; Science of the Total Environment; **329** 99-113, 2004.

Stumpf, M.; Ternes, T.A.; Wilken, R.D.; Rodrigues, S.V.; Baumann, W.; *Polar drug residue in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil*; Science of the Total Environment; **225** 135-141, 1999.

Ternes, T.; Bonerz, M.; Herrmann, N.; Teiser, B.; Andersen, H.R.; *Irrigation of treated wastewater in Braunschweig, Germany: an option to remove pharmaceuticals and musk fragrances*; Chemosphere; **66** 894-904, 2007.

Thiele-Bruhn, S.; Beck, I.C.; *Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass*; Chemosphere; **59** 457-465, 2005.

Timbrell, J.A.; *Principles of Biochemical Toxicology*; Taylor & Francis; Inglaterra, London, 2002.

Topp, E.; Monteiro, S.C.; Beck, A.; Coelho, B.B.; Boxall, A.B.A.; Duenk, P.W.; Kleywegt, S.; Lapen, D.R.; Payne, M.; Sabourin, L.; Li, H.; Metcalfe, C.D.; *Runoff of pharmaceuticals and personal care products following application of biosolids to an agricultural field*; Science of the Total Environment; **396** 52-59, 2008.

Trovó, A.G.; Nogueira, R.F.P.; Agüera, A.; Sirtori C.; Fernández-Alba, A.R.; *Photodegradation of sulfamethoxazole in various aqueous media: persistence, toxicity and photoproducts assessment*; Chemosphere; **77** 1292-1298, 2009.

Uslu, M.O.; Balcioglu, I.A.; *Comparison of the ozonation and Fenton process performances for the treatment of antibiotic containing manure*; Science of The Total Environment; **407** 3450-3458, 2009.

Wang, Y.; Zhang, H.; Zhang, J.; Lu, C.; Huang, Q.; Wu, J.; Liu, F.; *Degradation of tetracycline in aqueous media by ozonation in an internal loop-lift reactor*; Journal of Hazardous Materials; **192** 35-43, 2011.

Watkinson, A.J.; Murby, E.J.; Kolpin, D.W.; Constanzo, S.D.; *The occurrence of antibiotics in an urban watershed: from wastewater to drinking water*; Science of the Total Environment; **407**, 2711-2723, 2009.

Xia, K.; Bhandari, A. Das, K; Pillar, G.; *Occurrence and fate of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in biosolids*; Journal Environmental Quality; **34** 91-104, 2005.

Xu, W.H.; Zhang, G.; Zou, S.C.; Li, X.D.; Liu, Y.C.; *Determination of selected antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China using highperformance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry*; Environmental Pollution; **145** 672-679, 2007.

Yahiaoui, I.; Aissani-Benissad, F.; Fourcade, F.; Amrane, A.; *Removal of tetracycline hydrochloride from water based on direct anodic oxidation (Pb/PbO₂ electrode) coupled to activated sludge culture*; Chemical Engineering Journal; **221** 418-42, 2013.

Yahiat, S; Fourcade, F.; Brosillon, S.; Amnare, A.; Removal of antibiotics by an integrated process coupling photocatalys and biological treatment - Case of tetracycline and tylosin; *International Biodeterioration & Biodegradation*; **65** 997-1003, 2011.

Yang, Q.; Zhang, J.; Zhu, K.; Zhang, H.; *Influence of oxytetracycline on the structure and activity of microbial community in wheat rhizosphere soil*; Journal of Environmental Sciences; **21** 954-959, 2009.

Zhang, H.; Liu, F.; Xiaogang, W.; Zhang, J.; Zhang, D.; *Degradation of tetracycline in aqueous medium by electrochemical method*; Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering; **4** 568-573, 2009.

Zhao, L.; Dong, Y.H.; Wang, H.; *Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China*; Science of The Total Environment; **408** 1069-1075, 2010.

Zhu, J.; Snow, D.D.; Cassada, D.A.; Monson, S.J.; Spalding, R.F.; *Analysis of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in water using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*; Journal of Chromatography A; **928** 177-186, 2001.

Zuccato, E.; Calamari, D.; Natangelo, M.; Fanelli, R.; *Presence of therapeutic drugs in the environment*; Lancet; **355** 1789-1790, 2000.

Zwiener, C.; Frimmel, F.H.; *Oxidative treatment of pharmaceuticals in water*; *Water Research*; **34** 1881-185, 2000.

Estudo da degradação eletroquímica da oxitetraciclina

Zwiener, C.; Gremm, T.J.; Frimmel, F.H.; *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*; Springer; Berlin, Alemanha, 2001.

Anexos

Anexo 1 - Procedimento da CQO pelo método titrimétrico em refluxo fechado.

Conservação da amostra: Analisar imediatamente; quando tal não for possível, acidificar amostra a $\text{pH} \leq 2,0$ com ácido sulfúrico.

Interferências: Concentrações elevadas de cloretos.

Reagentes:

Solução Padrão de Dicromato de Potássio 0,0417 M (0,25 N) - Dissolver, em 1 L de água, 12,259 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ de elevado grau de pureza, previamente seco a 103°C durante 2 horas.

Solução de Ácido Sulfúrico / Sulfato de Prata - Adicionar Ag_2SO_4 em cristais ou pó a uma solução de H_2SO_4 concentrada, na razão de 6,6 g de $\text{Ag}_2\text{SO}_4/1$ L de H_2SO_4 . Agitar até à dissolução completa durante cerca de 1 dia.

Solução de Digestão de Dicromato - Dissolver 20 g de HgSO_4 em 175 mL de solução de ácido sulfúrico e adicionar 500 mL de solução padrão de dicromato 0,0417 M e deixar arrefecer até à temperatura ambiente.

Solução de Sulfato Ferroso Amoniacal (SFA) 0,05 M - Dissolver 20 g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em água destilada, adicionar 20 mL de ácido sulfúrico concentrado, arrefecer e diluir para 1 L.

Padronizar esta solução com a solução padrão de dicromato, como se segue:

- 1 - Despejar a bureta do titulador automático que contém a solução SFA antiga.
- 2 - Depois de a bureta encher com a solução SFA nova, voltar a despejar.
- 3 - Num erlenmeyer, diluir 5 mL (pipeta) da solução padrão de dicromato para 50 mL (pipeta) de água destilada. Adicionar 15 mL (pipeta) de ácido sulfúrico concentrado e arrefecer. Preparar 3 erlenmeyers.
- 4 - Titular com a solução de sulfato ferroso amoniacal, usando 6-8 gotas da solução indicadora de ferroína.
- 5 - Registrar o volume de titulante gasto para cada erlenmeyer e calcular o volume médio.
- 6 - Calcular o valor de f de acordo com a expressão:

$$f = \frac{\frac{m_{\text{dicromato usada na preparação da solução padrão de dicromato}}}{MM_{\text{dicromato}} (=294.19)} \times 5 \times 6 \times 8000}{V_{\text{médio}} 1,5}$$

Solução Indicadora de Ferroína - Dissolver 1,485 g de 1,10-fenantrolina monohidratada e 695 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e diluir para 100 mL.

Solução Padrão de Hidrogenoftalato de Potássio (HPK) - Secar o hidrogenoftalato de potássio ($\text{HOOC}_6\text{H}_4\text{COOK}$) cerca de 2 horas a 120 °C. Dissolver 425 mg em água destilada e diluir para 1 L. O hidrogenoftalato de potássio tem um valor de CQO teórico de 1,176 mg O_2/mg e a solução tem uma CQO teórica de 500 mg O_2/L . Esta solução é estável, quando conservada no frigorífico, durante cerca de 3 meses.

Procedimento experimental:

1 - Colocar em cada tubo de digestão:

- 1 mL de solução de digestão de dicromato
- 1,5 mL de amostra
- 2 mL de solução de ácido sulfúrico / sulfato de prata

➤ Preparar 2 tubos para cada amostra + 3 tubos de branco (coloca-se 1,5 mL de água em vez de amostra)

2 - Rolhar bem os tubos e agitar de modo a homogeneizar a mistura reacional e colocar no digestor, pré-aquecido a 150°C, durante 2 horas. Depois da digestão, retirar os tubos do digestor e deixar arrefecer até à temperatura ambiente.

3 - Transferir o conteúdo dos tubos para erlenmeyers, lavando-os muito bem com água (que se adiciona à solução do erlenmeyer), incluindo a tampa, de forma a transferir todo o conteúdo dos tubos. Ter em atenção que os erlenmeyers devem ficar todos com o mesmo volume.

4 - Adicionar a cada erlenmeyer 4 gotas do indicador de ferroína e uma barra magnética para agitação.

5 - Titular o conteúdo de cada erlenmeyer com a solução SFA e registar o volume gasto até ao ponto de viragem. Registar o valor de “f” da solução SFA.

6 - Lavar os tubos de digestão e as respetivas tampas com água e depois com H_2SO_4 a 20%, para evitar contaminações orgânicas.

Estudo da degradação eletroquímica da oxitetraciclina

7 - Com os valores registados, calcular o valor da CQO da amostra, tendo em conta a diluição da amostra inicial utilizada.

$$\text{Cálculos: } \text{mg O}_2/\text{L} = (V_{\text{médio branco}} - V_{\text{médio amostra}}) \times f \times \text{factor diluição}$$