



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências

Estudo da degradação eletroquímica de tetraciclinas

Nuno Filipe Afonso Monteiro

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Química Industrial

(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof. Doutora Maria de Lurdes Franco Ciríaco

Covilhã, junho de 2014

Agradecimentos

Antes de mais, quero agradecer à Universidade da Beira Interior, instituição que me acolheu nestes últimos anos e que contribuiu imenso para a minha educação e formação. À Fundação para a Ciência e Tecnologia, FCT; pelo financiamento dos projetos PEst-OE/CTM/UI0195/2011, e PEst-OE/CTM/UI0195/2014 da Unidade de I&D Materiais Têxteis e Papeleiros, que permitiu a aquisição do equipamento usado.

Agradeço à minha orientadora Professora Doutora Maria de Lurdes Franco Ciríaco, por todos os conhecimentos transmitidos, pela disponibilidade e por todo o apoio prestado que foram fundamentais para a realização deste trabalho. Não posso deixar também de agradecer à Professora Doutora Ana Maria Carreira Lopes, à Professora Doutora Maria José Alvelos Pacheco e ao Professor Doutor Rogério Manuel dos Santos Simões que estiveram sempre disponíveis para transmitir novos conhecimentos.

Agradeço à minha mãe que se sacrificou para que eu pudesse ter uma educação melhor, ao meu pai que não estando presente sempre foi um exemplo a seguir e sei que estaria muito orgulhoso por ter chegado até aqui, agradeço a toda a minha família pelos conselhos e pelo apoio que me transmitiram ao longo da minha vida.

A todos os meus colegas de curso pelo apoio e disponibilidade prestada em todos os momentos deste percurso académico, sem o os quais era impossível atingir esta meta.

A todos os colegas de laboratório por toda ajuda e auxílio prestado durante a elaboração deste trabalho.

A todos os meus grandes amigos, que apesar de não nomear aqui o seu nome, eles sabem quem são e que agradeço todos os conselhos e força dados ao longo da minha vida.

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

A todos,

Muito Obrigado!

Resumo

Ao longo dos últimos anos, os compostos farmacêuticos têm sido considerados como poluentes emergentes devido à sua persistência nos ecossistemas, mesmo em baixas concentrações. As tetraciclinas pertencem a um grupo de antibióticos amplamente utilizados na medicina humana e veterinária. No entanto, estes antibióticos não são completamente metabolizados pelos seres vivos, sendo introduzidos no meio ambiente por excreção e, conseqüentemente, conduzindo à contaminação da água.

Neste contexto, surgem os processos avançados de oxidação como alternativas viáveis devido à sua eficiência na degradação de diferentes classes de contaminantes orgânicos. O método utilizado neste trabalho para a degradação destes efluentes será a oxidação anódica, usando como elétrodos o Ti/PbO₂ e o Ti/Pt/PbO₂. O principal objetivo deste trabalho foi estudar a eficiência de degradação eletroquímica da tetraciclina e da oxitetraciclina utilizando diferentes elétrodos e diferentes intensidades de corrente aplicada.

A célula eletroquímica utilizada para a realização dos ensaios da degradação da tetraciclina e da oxitetraciclina opera em modo “batch” e contém como ânodo um eletrodo de Ti/PbO₂ ou Ti/Pt/PbO₂ e como cátodo uma placa de aço inoxidável, usando o sulfato de potássio como eletrólito suporte. Os ensaios foram monitorizados pelas determinações da carência química de oxigênio, carbono total orgânico, azoto total, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia líquida-espetrometria de massa.

Os resultados mostraram que, na oxidação eletroquímica, a oxitetraciclina tem mais facilidade em sofrer combustão no ânodo platinizado, Ti/Pt/PbO₂, face à tetraciclina; no ânodo Ti/PbO₂ os decaimentos iniciais de CQO e TOC são superiores. Utilizando o Ti/Pt/PbO₂ como ânodo há um aumento da eficiência na degradação tanto na tetraciclina como na oxitetraciclina, quando a intensidade de corrente passa de 10 para 20 mA cm⁻², este comportamento sugere que com o ânodo platinizado se formam intermediários difíceis de oxidar, por outro lado, o aumento da intensidade de corrente com o ânodo de Ti/PbO₂ não traz qualquer benefício o que sugere que há um desperdício de energia em reações paralelas.

Palavras-chave

Degradação Eletroquímica; Oxidação Anódica; Ti/PbO₂; Ti/Pt/PbO₂; Fármacos; Tetraciclina; Oxitetraciclina

Abstract

Over the past few years, pharmaceuticals compounds have been considered emerging pollutants due to their continuous input and persistence in the ecosystem, even at low concentrations. The tetracyclines antibiotic is widely used in human and veterinary medicine, although antibiotics, are not completely metabolized by living organisms, being introduced by excretion (urine and faeces) to the environment and thus, leading to contamination with water.

In this context, the advanced oxidation processes (AOP) appear as viable alternatives due to their efficiency on the degradation of different classes of organic contaminants. The method used in this work for the degradation of these effluents will be the anodic oxidation, using as anode the Ti/PbO₂ and Ti/Pt/PbO₂. The main objective of this work was to study the efficiency of electrochemical degradation of tetracycline and oxytetracycline using different current intensity applied.

The electrochemical cell used for the tests of degradation of tetracycline and oxytetracycline operates in “batch” mode and contains an anode of Ti/PbO₂ and Ti/Pt/PbO₂, a stainless steel as a cathode, adding as support electrolyte potassium sulfate. The tests were monitored by chemical oxygen demand and total organic carbon determinations, nitrogen total, high performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry.

The results showed that during anodic oxidation, the oxitetracycline can suffer more easily combustion in platinized anode face of tetracycline, using Ti/PbO₂ anode the initial COD and TOC decay are superior. Using Ti/Pt/PbO₂ as anode there is an increase in the degradation efficiency in both the tetracycline and oxitetracycline, when the current intensity increases from 10 to 20 mA cm⁻², this behavior indicates that with the platinized anode intermediate metabolites, resistant to oxidation, were formed; on the other hand the increase of the current intensity with the anode Ti/PbO₂ do not present benefit suggesting that there was a waste of energy in parallel reactions.

Keywords

Electrochemical degradation; Anodic oxidation; Ti/PbO₂; Ti/Pt/PbO₂; Pharmaceuticals; Tetracycline; Oxitetracycline

Índice

Lista de Acrónimos	xii
Capítulo 1 - Introdução	1
Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica	3
2.1 - Compostos Farmacêuticos	4
2.2 - Fármacos e seus Metabolitos	5
2.3 - Impacto Ambiental dos Compostos Farmacêuticos.....	6
2.4 Antibióticos Tetraciclínicos	7
2.5 - Uso Mundial de Antibióticos Tetraciclínicos	8
2.6 - Fontes e Ocorrência de Antibióticos Tetraciclínicos no Meio Ambiente.....	9
2.7 - Tetraciclinas	10
2.8 - Toxicidade.....	13
2.8.1 - Efeitos dos antibióticos tetraciclínicos nas espécies aquáticas	14
2.8.2 - Efeitos dos antibióticos tetraciclínicos nos organismos terrestres	14
2.9 - Tratamentos e Remoção dos Antibióticos tetraciclínicos das Águas Residuais.....	14
2.10 - Processos de Oxidação Avançados	15
2.10.1 - Oxidação Eletroquímica	16
2.10.2 - Oxidação Anódica (Direta e Indireta)	17
2.11 - Influência das condições operacionais	18
2.11.1 - Intensidade de Corrente Aplicada	19
2.11.2 - Natureza do material do ânodo.....	19
Capítulo 3 - Materiais e Métodos	22
3.1 - Reagentes	22
3.2 - Equipamento	24
3.3 - Ensaio de Degradação Eletroquímica	26
3.4 - Monitorização dos Ensaio da Degradação Eletroquímica.....	27
3.4.1 - Carência Química de Oxigênio.....	27
3.4.2 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	27
3.4.3 - Cromatografia Líquida acoplado a Espectrometria de Massa.....	28
3.4.4 - Carbono Orgânico Total.....	29
3.4.5 - Azoto Total.....	30
Capítulo 4 - Resultados e Discussão	31
4.1 - Análise dos resultados obtidos de CQO e de TOC	31
4.2 - Análise dos resultados obtidos do Azoto Total	33
4.3 - Influência da densidade de corrente aplicada	34
4.4 - Análise dos produtos de degradação por LC-MS	37
Capítulo 5 - Conclusões e Perspetivas de Trabalho Futuro	48

Referências.....	50
Anexos.....	55

Lista de Acrónimos

ABS - Absorvância

CQO - Carência química de oxigénio

CTC - Clorotetraciclina

EAOP-*Electrochemical advanced oxidation process* - Processos avançados de oxidação eletroquímica

ETA's- Estações de Tratamentos de Águas

ETAR's- Estações de Tratamento de Águas Residuais

FE- Fase Estacionária

FM- Fase Móvel

HPLC - *High-performance liquid chromatography* - Cromatografia líquida de alta eficiência

LC-MS- *Liquid chromatography-mass spectrometry* - Cromatografia líquida-espetrometria de massa

OA - Oxidação anódica

OTC- Oxitetraciclina

POA - Processo de Oxidação Avançado

POP - Poluente orgânico persistente

TC- Tetraciclina

TC's- Tetraciclinas

Ti/PbO₂- Dióxido de chumbo em substrato de titânio

Ti/Pt/PbO₂- Dióxido de chumbo em substrato de titânio platinizado

TN- *Total Nitrogen*- Azoto Total

TOC - *Total Organic Carbon*- Carbono orgânico total

Capítulo 1

Introdução

Ao longo dos últimos anos, o uso excessivo de compostos farmacêuticos na medicina humana e veterinária resultou na sua acumulação indesejável no meio ambiente. Um número significativo destes produtos tem sido frequentemente detetado em diferentes tipos de águas, residuais, superficiais, potáveis e subterrâneas, e em solos, no lodo e em sedimentos (Daghrir *et al.*, 2013).

Alguns resíduos farmacêuticos têm recebido uma atenção crescente, uma vez que são considerados contaminantes emergentes no meio ambiente e, a longo prazo, podem levar a impactos adversos nos organismos alvo, incluindo a desregulação endócrina, toxicidade crónica e resistência a antibióticos (Zhang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2012; Daghrir *et al.*, 2013).

De entre os vários compostos farmacêuticos, os antibióticos são alvo de especial atenção devido à sua ampla utilização, tanto na medicina humana como na veterinária, uma vez que podem potenciar o crescimento de bactérias resistentes e apresentar efeitos adversos para a saúde dos seres humanos (Zhang *et al.*, 2009).

O consumo anual de antibióticos tem sido estimado entre as 100000 e 200000 toneladas globalmente (Jeong *et al.*, 2010). Os antibióticos pertencem a uma classe de medicamentos que são amplamente utilizados para prevenir e tratar doenças, tanto na medicina humana como na animal, bem como para aumentar a eficiência alimentar e melhorar a taxa de crescimento do gado e de aves, melhorando a produção animal (Daghrir *et al.*, 2013; Oturan *et al.*, 2013).

As tetraciclinas são um dos grupos de antibióticos mais prescritos na medicina humana e veterinária. Os antibióticos desta família são usados para o tratamento de infeções bacterianas, como aditivo na alimentação dos animais (aves, gado bovino e suíno), em aquacultura e para inibir o crescimento de fungos nas árvores de fruto (Zhang *et al.*, 2009). Devido à sua natureza antibacteriana, os métodos biológicos tradicionais para o tratamento de efluentes não conseguem destruir as tetraciclinas eficazmente. Os métodos físicos ou físico-químicos convencionais podem controlar a mobilidade e propagação das tetraciclinas, mas também exigem tratamentos posteriores para garantir a sua completa eliminação (Wu *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, os processos eletroquímicos demonstraram ser uma tecnologia eficaz no tratamento de águas residuais contendo poluentes orgânicos e tóxicos (Wu *et al.*, 2012). Para evitar a entrada das tetraciclinas em estações de tratamento de águas, pode ser sugerida a utilização da oxidação eletroquímica. Este método é amplamente utilizado para a eliminação das substâncias orgânicas tóxicas nas águas naturais e resíduos poluentes (Vedenyapina *et al.*, 2008).

A oxidação anódica é um dos processos eletroquímicos mais utilizados para remover poluentes orgânicos persistentes das águas residuais. Neste processo, dependendo dos materiais de ânodo e das condições experimentais, são gerados oxidantes fortes, tais como os radicais hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), que são extremamente reativos (Wu *et al.*, 2012).

Neste projeto pretende-se estudar a oxidação anódica de dois antibióticos da família das tetraciclinas, a tetraciclina (TC) e a oxitetraciclina (OTC), com os ânodos de PbO_2 , preparados laboratorialmente. Estes ânodos são bastante estáveis, mesmo quando submetidos a condições extremas, apresentando uma elevada condutividade elétrica e sendo relativamente baratos.

Este trabalho está organizado por capítulos, sendo que o capítulo dois pretende fazer uma breve revisão bibliográfica onde se abordam alguns conceitos sobre a degradação eletroquímica de fármacos através da oxidação eletroquímica. Vamos dar especial atenção à tetraciclina e à oxitetraciclina porque vão ser os fármacos que iremos estudar aprofundadamente. Neste capítulo vamos ainda fazer uma abordagem ao impacto dos compostos farmacêuticos no meio ambiente bem como o efeito que estes poluentes podem trazer à saúde humana.

No capítulo três, descrevem-se os métodos e os materiais utilizados nos ensaios de degradação dos compostos farmacêuticos, bem como as técnicas utilizadas para a monitorização da degradação (CQO, TOC, TN, HPLC e LC-MS).

No capítulo quatro serão apresentados e discutidos os resultados obtidos da electrodegradação destes compostos.

Por último, no capítulo cinco serão apresentadas as principais conclusões deste trabalho e perspectivas de trabalho futuro.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

Ao longo dos últimos quinze anos, os compostos farmacêuticos têm vindo a receber uma crescente atenção como substâncias químicas bioativas no ambiente (Kümmerer, 2009).

Em 2011, a Organização Mundial de Saúde (OMS), publicou um relatório sobre os produtos farmacêuticos na água potável, que analisou os riscos para a saúde humana associados à exposição de fármacos na água potável, aumentando o temor de que a entrada contínua de produtos farmacêuticos possam representar um risco potencial para os organismos que vivem em ambiente terrestre e aquático (Feng *et al.*, 2013).

Os fármacos que não são removidos nas ETARs, acabam então por ser descarregados juntamente com os efluentes tratados, contaminando rios, estuários, lagos e também águas subterrâneas e águas para consumo. Ao serem removidos nas ETAR, estes compostos podem ser transferidos para as lamas que são aplicadas na agricultura, podendo contaminar o solo, escoar os seus lixiviados para as águas superficiais, pondo em risco a qualidade das águas subterrâneas. Da mesma forma, os fármacos utilizados na medicina veterinária podem entrar no meio hídrico através da aplicação de estrume em campos agrícolas, sendo outra via de contaminação, a utilização direta de fármacos na aquacultura (Feng *et al.*, 2013). A Figura 2.1 mostra todas as relações existentes com a presença destes compostos nos vários tipos de águas, bem como origem e destinos.

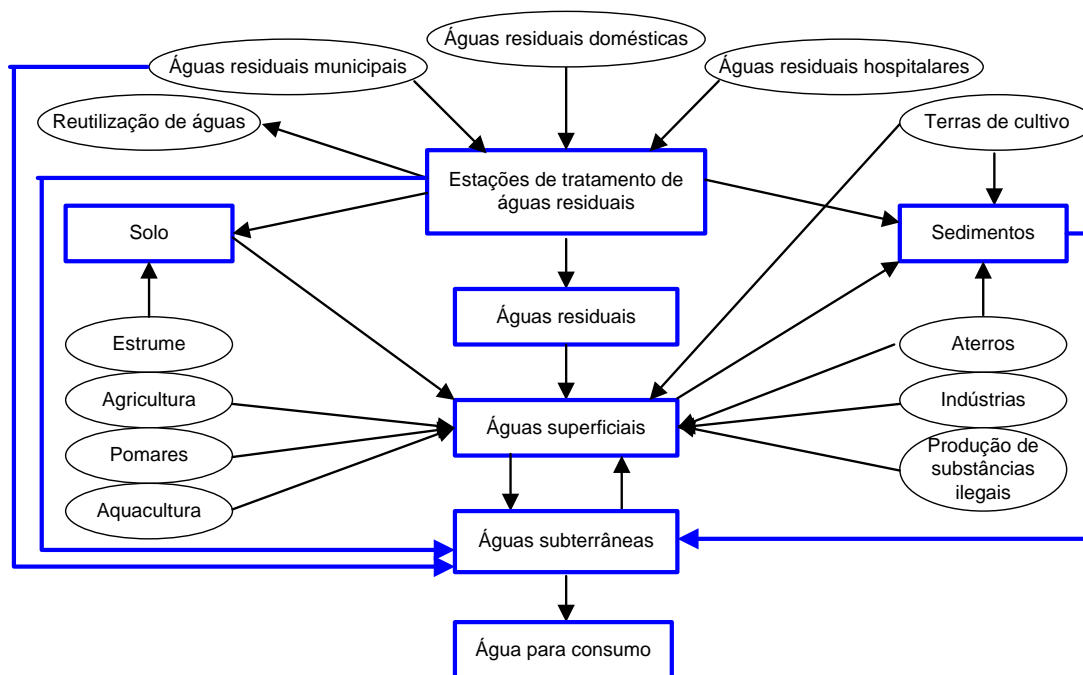


Figura 2.1 - Ocorrência e dispersão de compostos farmacêuticos no meio ambiente (Adaptado de Daghrir *et al.*, 2013).

Na verdade, é muito provável que a maioria das águas residuais urbanas esteja contaminada com compostos farmacêuticos (Jones *et al.*, 2005), o que afeta a qualidade da água e pode constituir um enorme risco para os ecossistemas e o bem-estar humano e animal a longo prazo (Klavarioti *et al.*, 2009).

Neste capítulo serão introduzidos alguns conceitos relacionados com o impacto ambiental e na saúde destes poluentes, dando especial atenção aos antibióticos tetraciclínicos (TC e OTC) e aos mecanismos da sua degradação por processos de oxidação eletroquímica.

2.1-Compostos Farmacêuticos

Os compostos farmacêuticos constituem um vasto grupo de compostos medicinais utilizados na medicina humana (lar de idosos, indústria, hospitais e outros serviços) e veterinária (aquacultura, pecuária e animais de estimação), constituindo uma classe de contaminantes ambientais de crescente preocupação. Podem ser de origem natural ou sintética, sendo produzidos para desempenharem uma função específica. Estes compostos são projetados especialmente para resistir à degradação biológica. Isto significa que eles podem conservar a sua estrutura química, o tempo suficiente para permanecer no corpo humano, sendo libertados para o ambiente na sua forma original. Sabe-se que os produtos farmacêuticos têm efeitos nas vias metabólicas específicas dos seres humanos e dos animais, mas também têm efeitos em organismos não alvos, mesmo em concentrações muito baixas (Feng *et al.*, 2013).

Os produtos farmacêuticos quando libertados no meio ambiente podem ser tóxicos em qualquer nível da hierarquia biológica, apesar dos seus efeitos sobre os seres, ainda não estarem bem documentados (Kümmerer, 2009). Por exemplo, é geralmente aceite que alguns fármacos, mesmo em baixas concentrações, podem causar mudanças irreversíveis no genoma de certos microrganismos, o que conseqüentemente aumenta a sua resistência a estes compostos (Klavarioti *et al.*, 2009). Por outro lado, alguns produtos farmacêuticos também foram classificados como compostos de desregulação endócrina, uma vez que causam efeitos nocivos sobre o sistema endócrino humano (Klavarioti *et al.*, 2009). Estes factos refletem a necessidade da remoção dos produtos farmacêuticos e dos seus metabolitos do sistema aquático para evitar a sua toxicidade e outros possíveis efeitos perigosos para a saúde (Jones *et al.*, 2005).

O uso excessivo de fármacos, como é o caso dos antibióticos, agrava o seu impacto ambiental, o que leva a que esta classe de agentes terapêuticos mereça uma especial atenção. Dentro desta classe de fármacos, os antibióticos são amplamente utilizados na medicina, e tal como foi mencionada anteriormente, não são completamente metabolizados pelos seres vivos, sendo introduzidos por excreção (urina e fezes) no meio ambiente e, conseqüentemente, conduzindo à contaminação de água (Mboula *et al.*, 2012).

2.2-Fármacos e seus Metabolitos

Os produtos farmacêuticos são um grupo de substâncias químicas que possuem propriedades medicinais. Estas substâncias incluem tanto compostos orgânicos como inorgânicos, embora a maior parte dos fármacos modernos sejam pequenos compostos orgânicos com um peso molecular inferior a 500 Daltons. Estes compostos químicos são moderadamente solúveis em água e em meios lipofílicos para serem biologicamente ativos.

Os fármacos são administrados por via tópica (inalação ou aplicação na pele), internamente (administração oral) ou parenteral (injeções ou infusões). Após a administração, as moléculas da droga são absorvidas, metabolizadas e finalmente expelidas do corpo. Para ser utilizado de forma segura a maioria dos fármacos modernos são concebidos de maneira a sofrer metabolismo em órgãos tais como o fígado e o rim, após terem alcançado o desejado efeito farmacológico.

Para remover as moléculas de droga em excesso bem como outros xenobióticos tóxicos são utilizadas uma série de biotransformações para transformar estas drogas em excesso em compostos mais polares e hidrofílicos.

O metabolismo das drogas começa com varias reações bioquímicas, tais como, a hidroxilação, epoxidação, redução e hidrólise, em que os grupos funcionais são introduzidos ou desmascarados (transformação de fase I). Depois disso, as moléculas endógenas altamente

polares, tais como o ácido glucurônico, o sulfato e os aminoácidos são ligados a drogas e metabólitos de transformação de fase I para gerar conjugados (transformação de fase II), que são solúveis em água e podem ser facilmente excretados pela urina. Há determinados fármacos, agentes médicos não terapêuticos e xenobióticos que não são metabolizáveis porque são substratos pobres para metabolizar enzimas, estes compostos podem ser eliminados lentamente do corpo sem biotransformação (Ikehata *et al.*, 2006).

2.3-Impacto Ambiental dos Compostos Farmacêuticos

Hoje em dia, a presença de poluentes farmacêuticos no meio ambiente é considerado um problema sério e relevante (Khetan e Collins., 2007). Considerando a grande variedade e a grande aplicabilidade dos fármacos, e o crescente aumento do seu consumo, não é surpresa que estes compostos estejam entre os contaminantes mais presentes no ambiente aquático e que representem impactos negativos sobre os organismos aquáticos, incluindo microrganismos, fitoplâncton, plantas, crustáceos, peixes e insetos, bem como sobre os organismos terrestres e seres humanos (Ikehata *et al.*, 2006). Estas classes farmacêuticas incluem:

- Drogas citostáticas, imunossupressores e alguns antibióticos genotóxicos, que são frequentemente utilizados em quimioterapias, têm o potencial de agir quer como poluentes agudos quer como poluentes crônicos, sendo considerados carcinogênicos, mutagênicos e/ou embriotóxicos.
- Antibióticos humanos e veterinários devido à sua toxicidade microbiana e ao desenvolvimento da resistência a antibióticos em bactérias ambientais incluindo patogênicos humanos.
- Hormonas naturais e sintéticas, que devido à sua alta eficiência, têm um potencial efeito de desregulação endócrina.
- Compostos halogenados, tais como os contrastantes utilizados na revelação de imagens de raio-X, devido à sua resistência, à biodegradação e persistência no ambiente e na cadeia alimentar são facilmente encontrados em aquíferos aquáticos.
- Metais pesados constituintes dos medicamentos e de agentes médicos de diagnóstico, por causa da toxicidade dos metais, em certos estados de oxidação.

O aparecimento destes compostos no ambiente aquático tem levado a uma crescente preocupação sobre os potenciais riscos ambientais, bem como sobre a sua permanência e propagação da resistência antibacteriana entre os microrganismos (Adams *et al.*, 2002).

A principal fonte de compostos farmacêuticos no meio ambiente é a excreção de fármacos incompletamente metabolizadas por seres humanos e animais, a rejeição de fármacos e de

embalagens, mas também a indústria farmacêutica e os hospitais têm lançado para o ambiente aquático resíduos de fármacos. Na Alemanha e segundo Feng *et al.* (2013), todos os anos são utilizadas 16 mil toneladas de produtos farmacêuticos em cuidados de saúde, e desses, cerca de 60-80% entram na rede de águas municipais ou são enviados com o lixo doméstico normal para aterros sanitários.

Estudos recentes têm confirmado a presença, embora em teores baixos, de fármacos em águas de estuários, rios, riachos e águas subterrâneas. Os efeitos ecológicos destes contaminantes em águas costeiras ainda são desconhecidos. No entanto, há uma crescente evidência de que estes poluentes podem ter efeitos negativos na reprodução de espécies aquáticas. A maioria dos fármacos são projetados para atingir vias metabólicas específicas em humanos e animais, mas a sua ação sobre outros organismos pode ser prejudicial, mesmo em concentrações muito baixas (Ziylan e Nilsun, 2011).

Os antibióticos que são usados na medicina humana, veterinária e como promotores de crescimento na criação de gado contribuem imenso para o aumento de consumo de compostos farmacêuticos por todo o mundo (Feng *et al.*, 2013). Na Europa, em 1999, cerca de 8500 e 4700 toneladas de antibióticos foram usados como medicamentos na medicina humana e veterinária, respetivamente, sendo que a tetraciclina foi o segundo antibiótico mais produzido e usado nesse ano a nível mundial (Hammad *et al.*, 2010).

A acumulação de antibióticos mesmo em baixos níveis de concentração (ng/L e mg/L) (Hammad *et al.*, 2010) pode produzir efeitos prejudiciais, quer nos ecossistemas terrestres quer nos aquáticos. Está provada que a utilização indiscriminada destes compostos na medicina humana e veterinária é responsável pela produção de microrganismos resistentes que promovem a seleção de variantes genéticas, aumentando a ocorrência de agentes patogénicos resistentes a antibióticos (Jeong *et al.*, 2010) e causando problemas graves na saúde pública (Homem *et al.*, 2011).

2.4-Antibióticos Tetraciclínicos

Os antibióticos tetraciclínicos pertencem a um grupo de antibióticos, utilizados principalmente para terapia humana, para fins veterinários e como aditivo alimentar no setor agropecuário (Figura 2.2). Devido ao seu baixo custo e à sua atividade antimicrobiana, estes antibióticos são amplamente utilizados na medicina veterinária, uma vez que permitem o tratamento de várias doenças infecciosas nos animais, tendo vindo a ser também utilizados como aditivos alimentares para promoverem o rápido crescimento dos animais nas explorações pecuárias embora certos países já tenham proibido o seu uso para esses fins (Daghrir *et al.*, 2013).

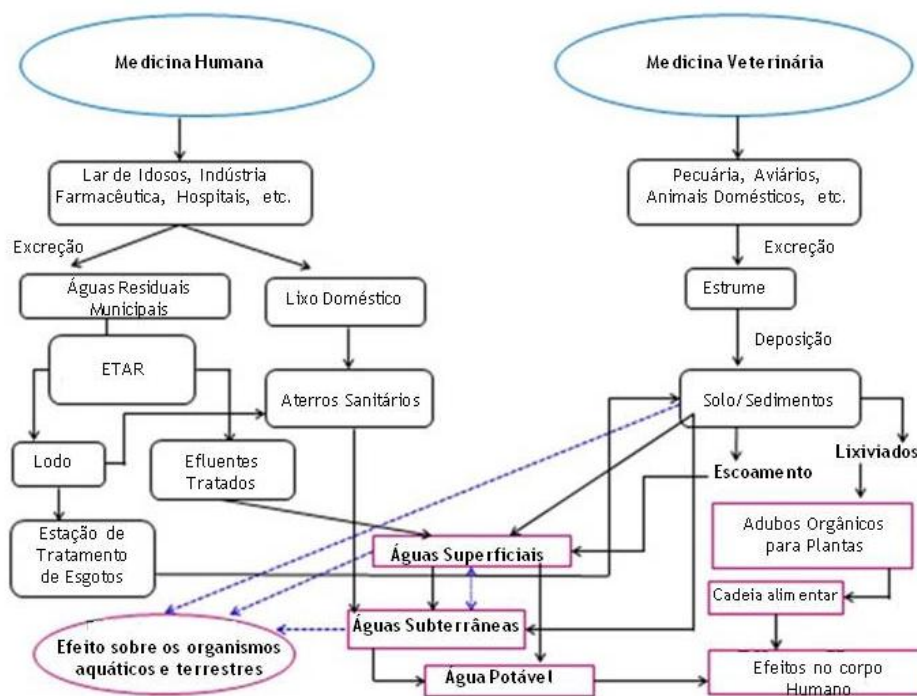


Figura 2.2- Possíveis fontes e vias para a ocorrência de antibióticos tetraciclínicos no meio ambiente (adaptado de Ikehata *et al.*, 2006 e Daghrrir *et al.*, 2013)

Os antibióticos tetraciclínicos são um grupo de produtos naturais e semi-sintéticos que são agentes bacteriostáticos, com atividade contra uma ampla variedade de organismos (Brinzila *et al.*, 2012; Brinzila *et al.*, 2014), exibindo atividade contra infecções causadas por bactérias Gram (+) e Gram (-) (Daghrrir *et al.*, 2013).

Na literatura encontram-se alguns estudos da degradação eletroquímica de efluentes contendo tetraciclina. Estudos efetuados por Vedenyapina *et al.*, (2008) concluíram que a oxidação anódica na degradação eletroquímica da tetraciclina, usando como ânodo o eletrodo de Pt, é um excelente tratamento, já que promove a clivagem de alguns anéis aromáticos, o que pode diminuir a sua atividade biológica. Zhang *et al.*, (2009) concluíram que na oxidação anódica, usando como ânodo o eletrodo de Ti/RuO₂-IrO₂, a taxa de degradação aumentava com a densidade da corrente utilizada e diminuía com o aumento da concentração inicial da tetraciclina.

2.5- Uso Mundial de Antibióticos Tetraciclínicos

Os antibióticos tetraciclínicos foram descobertos na década de 40 e a sua utilização na terapia humana começou na década de 50, estimando-se que a produção mundial ande à volta dos milhares de toneladas anuais (Tabela 2.1) (Daghrrir *et al.*, 2013).

O uso de antibióticos tetraciclínicos tornou-se parte integrante da indústria de produção de gado e no setor agrícola como aditivos e também como promotores de crescimento na América do Norte desde da década de 50. Estes fármacos são amplamente utilizados em muitos países na medicina veterinária para prevenção e tratamento de doenças (Wang *et al.*, 2012) tais como doenças respiratórias, gastrointestinais, infecções bacterianas, doenças infecciosas de órgãos de locomoção, bem como infecções sistêmicas e promoção de crescimento em animais tais como, bovinos, suínos, ovinos, aves de capoeira, entre outros. A utilização destes antibióticos na indústria da pecuária, como promotores de crescimento é uma prática recorrente em países como os Estados Unidos da América (USA), Coreia e nos países mais desenvolvidos da Europa (Suécia, França, Dinamarca, entre outros) devido às intensivas explorações pecuárias (Daghrir *et al.*, 2013).

Tabela 2.1 - Consumo mundial de antibióticos tetraciclínicos para fins veterinários (Ikehata *et al.*, 2006)

País/Continente	Consumo de antibióticos tetraciclínicos na medicina veterinária (toneladas/ano)
Europa	2575
USA	3200
Coreia	723
França	117
Grã-Bretanha	228

Na medicina humana, os antibióticos tetraciclínicos são usados no tratamento de diferentes tipos de infecções, especialmente infecções respiratórias (pneumonia) devido à *Mycoplasma pneumonia*, *Chlamydia pneumonia*, e *Chlamydia psittaci*. Na última década os antibióticos tetraciclínicos, têm sido o fármaco de eleição utilizado no combate a doenças como a malária e infecções, devido às suas características anti-inflamatórias, de cicatrizações de feridas, e aos seus efeitos antibacterianos (Daghrir *et al.*, 2013).

2.6-Fontes e Ocorrência de Antibióticos Tetraciclínicos no meio Ambiente

Nos últimos anos, o uso abusivo de antibióticos tetraciclínicos foi generalizado, e, conseqüentemente, a possibilidade de contaminação no meio ambiente com tais compostos aumentaram (Figura 2.3) (Daghrir *et al.*, 2013).

A ocorrência destes fármacos no meio aquático tem recebido uma especial atenção, devido à sua contribuição para o aumento da resistência antibacteriana entre os microrganismos (Adams *et al.*, 2002). Depois do uso de tais compostos, uma fração destes antibióticos é

metabolizada em compostos inativos, outra parte é excretada como metabolitos ativos, a maior parte destes fármacos são libertados, através da urina e fezes de seres humanos e animais após a medicação (Daghrir *et al.*, 2013).

Quando os antibióticos tetraciclínicos são administrados aos animais cerca de 70 a 90% é excretado e lançado na forma ativa para o meio ambiente através da urina e fezes contaminando o solo, e conseqüentemente as águas superficiais e subterrâneas por lixiviação ou escoamento. Da mesma forma, os antibióticos tetraciclínicos administrados em humanos são introduzidos no ambiente através da excreção, entrando na rede de esgotos e atingindo as estações de tratamento de águas residuais (Daghrir *et al.*, 2013).

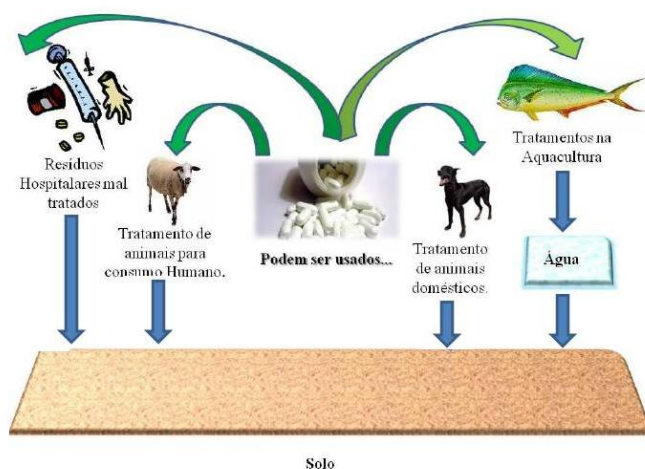


Figura 2.3 - Aplicação e destino de fármacos no meio ambiente (adaptado de Blackwell *et al.*, 2007)

2.7-Tetraciclínas

A clorotetraciclina (CTC), a oxitetraciclina e a tetraciclina são os antibióticos tetraciclínicos mais utilizados em todo o mundo. As tetraciclínas são agentes de largo espectro, apresentando atividade contra uma ampla gama de bactérias gram-positivas e gram-negativas (Chopra *et al.*, 2001).

As propriedades antimicrobianas destes agentes e a ausência de grandes efeitos colaterais adversos levaram à sua ampla utilização na terapia de infecções em seres humanos e animais e em alguns países são ainda utilizados na alimentação dos animais como promotores de crescimento (principalmente a clorotetraciclina e a oxitetraciclina), esta prática levanta questões quanto ao aumento da resistência microbiana em humanos.

As tetraciclínas são formadas por um núcleo tetracíclico linear, aos quais uma variedade de grupos funcionais está ligada. A tetraciclina mais “simples” que exibe atividade

antibacteriana detetável é a 6-deoxi-6-desmetiltetraciclina (Figura 2.4) e por isso esta estrutura pode ser considerada como farmacóforo mínimo (Chopra *et al.*, 2001).

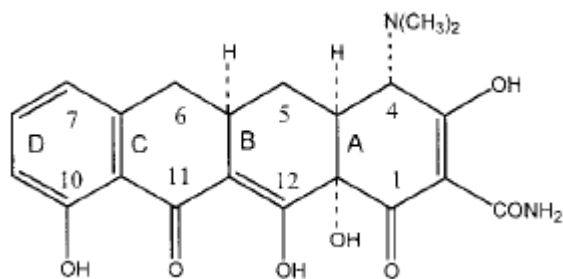


Figura 2.4 - Estrutura química da 6-deoxi-6-desmetiltetraciclina.

As tetraciclinas são conhecidas por se degradarem através de fatores abióticos, como o pH, propriedades redox, e condições de luz, e os seus produtos de degradação podem ser formados através da epimerização, desidratação e vias de transferência de prótons (Figura 2.5) (Jia *et al.*, 2009).

As 4-Epi-TC's, como a 4-epitetraciclina da tetraciclina e a 4-epioxitetraciclina da oxitetraciclina e a 4-epi-clorotetraciclina da clorotetraciclina podem ser formadas em meio aquoso e ligeiramente ácido (pH 2-6), e podem ser revertidas 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 anidrotetraciclina e a anidroclorotetraciclina, são as mais formadas. Enquanto as anidro-TC's são estáveis, a anidro-OTC é instável e forma rapidamente compostos α - e β -apo-OTC. A clorotetraciclina é particularmente vulnerável à decomposição alcalina e forma iso-CTC sob condições alcalinas (Chopra *et al.*, 2001).

Muitos destes produtos de degradação são tão ou mais problemáticos para o meio ambiente, que os seus compostos precursores (Barbosa *et al.*, 2000).

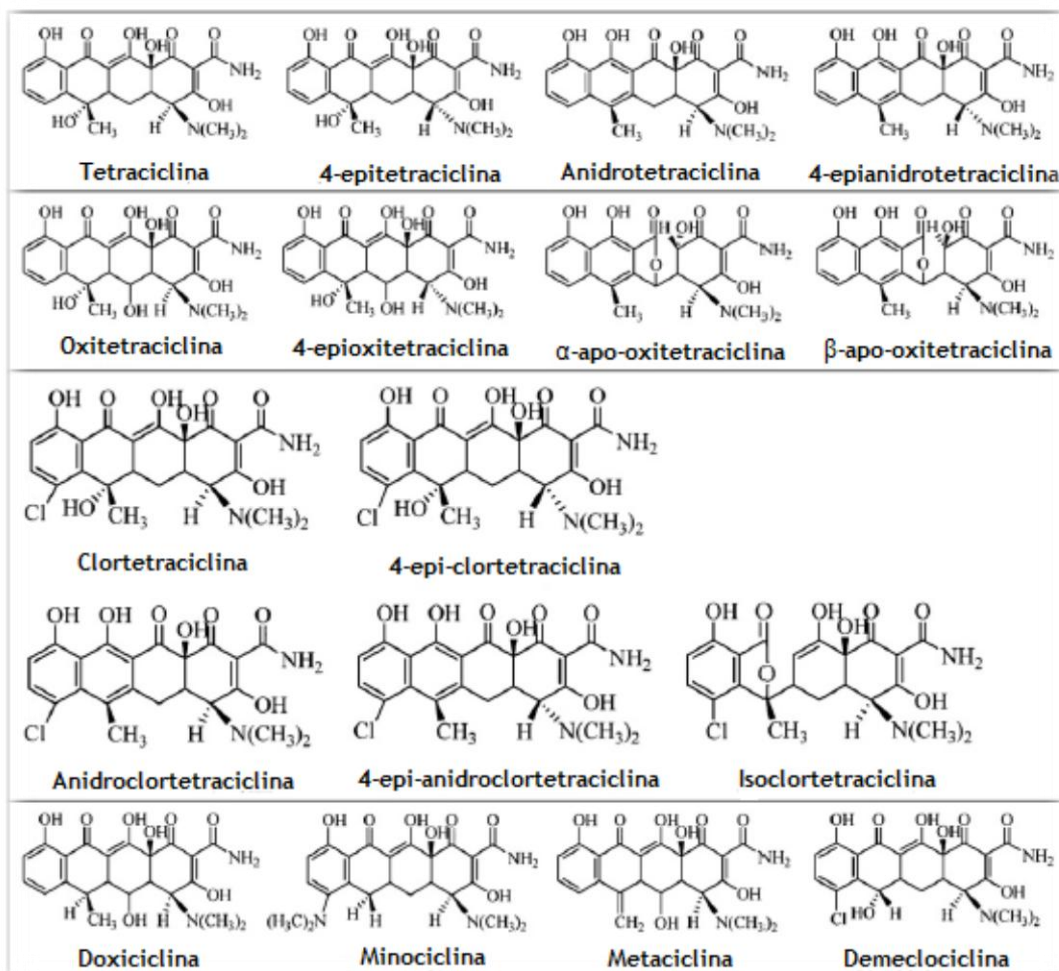


Figura 2.5 - Estruturas químicas das tetraciclina e seus produtos de degradação (Jia *et al.*, 2009)

Neste trabalho vamos dar especial atenção à tetraciclina e à oxitetraciclina, dois dos antibióticos mais prescritos e utilizados em todo o mundo. A tetraciclina é o antibiótico mais utilizado na medicina veterinária e na aquicultura, por outro lado a oxitetraciclina é bastante utilizada como suplemento alimentar e promotora de crescimento (Chen *et al.*, 2011). Na tabela 2.2 podemos observar os estados de protonação da tetraciclina e da oxitetraciclina respectivamente.

Estes fármacos têm um 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).

As tetraciclina são obtidas através de fermentação natural de fungos ou por processos semi-sintéticos, são frequentemente utilizados de forma indiscriminada sendo a absorção dos organismos irregular, variando de 60 a 80%, o restante é eliminado por excreção acabando por contaminar o meio ambiente (Bautitz *et al.*, 2007).

Tabela 2.2- Estrutura e respetivos pK_a da tetraciclina e oxitetraciclina (adaptado de Chen *et al.*, 2011).

Composto	R ₁	R ₂	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}
Tetraciclina	H	H	3,30	7,68	9,69
Oxitetraciclina	HO	H	3,27	7,32	9,11

A Figura 2.6 mostra uma compilação dos estados de protonação das tetraciclina (TC e OTC).

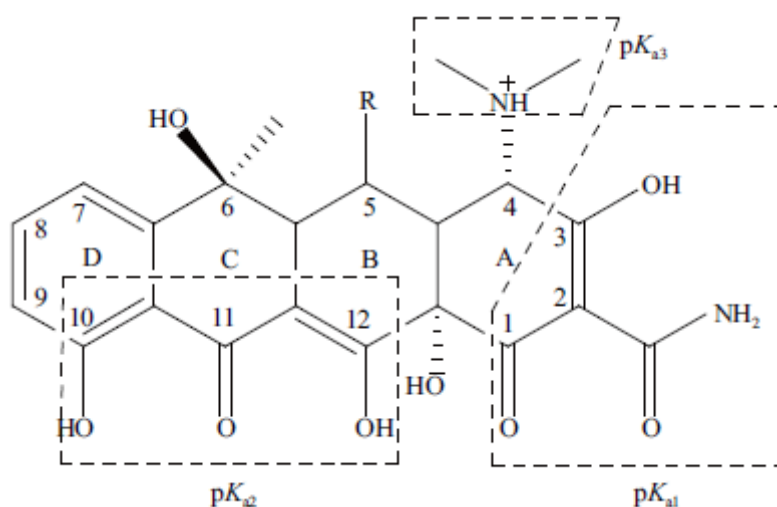


Figura 2.6 - Estrutura molecular da tetraciclina (R=H) e oxitetraciclina (R=OH) e seus estados de protonação (adaptado de Chen *et al.*, 2011)

2.8-Toxicidade

Nos últimos anos, tem-se dado especial atenção aos riscos ecológicos e potenciais efeitos tóxicos dos resíduos de antibióticos tetraciclínicos no ambiente (Kümmerer, 2009; Klavarioti *et al.*, 2009). Estes resíduos promovem a evolução e o desenvolvimento de microrganismos resistentes aos antibióticos, o que pode induzir efeitos adversos para a saúde humana, quando presentes na água potável ou na água de irrigação, utilizada no cultivo de frutas ou vegetais (Daghri *et al.*, 2013).

Estes agentes antimicrobianos podem perturbar a microflora intestinal e aumentar o risco de infeções. Devido a todos estes factos, não é de surpreender as imensas pesquisas tentando determinar e estimar a toxicidade dos antibióticos tetraciclínicos nas espécies aquáticas e terrestres, e até mesmo os seus efeitos estrogénicos (Daghri *et al.*, 2013).

2.8.1-Efeitos dos antibióticos tetraciclínicos nas espécies aquáticas

Os efeitos tóxicos e crônicos destes antibióticos sobre as diversas espécies aquáticas têm sido amplamente estudados e debatidos. Estes compostos são principalmente bacteriostáticos e têm um largo espectro de atividade antimicrobiana. Estes produtos farmacêuticos têm como princípio terapêutico impedir a proliferação dos microrganismos, limitam o crescimento de bactérias por interferirem com a replicação do ADN, ligando-se aos ribossomas, inibindo a síntese proteica, e consequentemente impedem o crescimento celular.

Vários estudos mostram que as microalgas, que são responsáveis pela produção de grande parte do oxigênio da atmosfera terrestre e que têm um papel importante na estrutura e funcionamento de todo o ecossistema aquático, são mais sensíveis que os crustáceos e os peixes a agentes antibacterianos, tais como os antibióticos tetraciclínicos.

2.8.2-Efeitos dos antibióticos tetraciclínicos nos organismos terrestres

O estudo sobre os efeitos tóxicos dos antibióticos tetraciclínicos em organismos terrestres incluindo as culturas ainda é escasso. Os primeiros relatórios sobre os efeitos foto tóxicos dos antibióticos tetraciclínicos em culturas agrícolas mostram que a sua presença tem uma influência negativa no crescimento das culturas de feijão (Daghrir *et al.*, 2013). Outros trabalhos mostram que em concentrações mais elevadas os antibióticos tetraciclínicos inibem a percentagem de germinação do trigo, e o comprimento da sua raiz.

2.9-Tratamento e Remoção dos Antibióticos Tetraciclínicos das Águas Residuais

Quando estes compostos entram na rede de águas residuais municipais podem suprimir toda a atividade vital ao crescimento das colônias de microrganismos utilizados nos tratamentos de esgotos municipais. Como consequência, há um aumento da poluição ambiental das águas residuais. Os processos biológicos e os processos físico-químicos (filtração, e coagulação/floculação/sedimentação) são os processos convencionais mais utilizados nas estações de tratamento de águas residuais (Homem *et al.*, 2011).

Nos sistemas biológicos é utilizada a tecnologia de lamas ativadas. O método consiste na degradação de compostos orgânicos em tanques de lamas ativadas, com sistemas de bactérias aeróbias e anaeróbias, monitorizando a temperatura e a carência química de oxigênio (CQO). No entanto, a elevada toxicidade destes contaminantes pode impedir a aplicação deste processo em efluentes com elevadas concentrações de poluentes, uma vez que são recalcitrantes e tóxicos para os microrganismos (Britto *et al.*, 2008).

A filtração é a remoção dos sólidos, especialmente da matéria suspensa, por passagem das águas residuais através de um meio granular (carvão, areia, etc...). Porém as partículas menores devem ser transportadas para a superfície dos meios onde um mecanismo de fixação tal como atração eletrostática, ligações químicas ou a adsorção retém as partículas. Este método tem a desvantagem de não degradar os contaminantes, mas sim concentrá-los numa fase sólida, gerando um novo desperdício (Homem *et al.*, 2011).

A Coagulação/Floculação utiliza produtos químicos para precipitar os poluentes, formando colóides e, conseqüentemente aumentar a velocidade de sedimentação. Os produtos químicos mais utilizados são os sais de ferro. Estes métodos requerem um tratamento posterior para remover os poluentes que sofrem coagulação. Estes métodos mencionados anteriormente têm uma eficiência de degradação muito baixa, cerca de 20%. Como consequência, na última década, vários estudos foram feitos com o objetivo de encontrar e desenvolver novos métodos que permitam uma eliminação e uma degradação mais eficiente destes poluentes para reduzir a quantidade destes antibióticos nas águas residuais (Adams *et al.*, 2002).

A natureza recalcitrante dos efluentes contendo resíduos de antibióticos interfere na eliminação destes compostos pelos tratamentos biológicos tradicionais, sendo por isso necessário encontrar métodos alternativos mais eficientes na degradação destes poluentes. Assim, os Processos de Oxidação Avançados (POA) são tecnologias amigas do ambiente que, recentemente têm vindo a receber uma especial atenção. Estes processos são métodos oxidativos com base na geração eletroquímica de radicais hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) intermediários, que são extremamente reativos e menos seletivos, quando comparados com outros oxidantes. O seu potencial padrão de oxidação ($E^\circ = 2,8 \text{ V}$) é maior que o da maioria dos oxidantes convencionais, tornando-se extremamente eficaz na oxidação de uma grande variedade de compostos orgânicos, podendo conduzir à sua completa mineralização (Isarain-Chavez *et al.*, 2010).

2.10- Processos de Oxidação Avançados

Como foi mencionado anteriormente os processos de tratamento de águas convencionais não foram concebidos para remover quantidades vestigiais de produtos químicos, tais como os antibióticos, e dado o crescente número de relatórios da sua presença no meio ambiente, é essencial que as tecnologias alternativas desenvolvidas consigam de alguma forma, degradar ou eliminar estes compostos (Jeong *et al.*, 2010).

Os POAs são particularmente eficazes na remoção e destruição de moléculas orgânicas tóxicas ou não degradáveis, como pesticidas, compostos aromáticos, corantes e compostos orgânicos voláteis e mineraliza estes produtos orgânicos em produtos minerais como o CO_2 e H_2O , tornando esta tecnologia superior aos processos convencionais, correspondendo a processos

promissores na eliminação de fármacos e seus metabolitos das águas residuais (Feng *et al.*, 2013).

A reação de destruição destes fármacos das águas residuais envolve diferentes espécies oxidantes, tais como, radicais hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), e outras espécies ($\text{O}_2\cdot$, $\text{HO}_2\cdot$ e $\text{ROO}\cdot$) que são produzidos no meio reacional. O radical hidróxilo têm um potencial padrão elevado ($E_{(\cdot\text{OH}/\text{H}_2\text{O})} = 2,8 \text{ V}$), sendo conhecido como o segundo agente oxidante depois do flúor, podendo reagir com uma grande variedade de compostos orgânicos, independentemente da sua concentração (Feng *et al.*, 2013).

2.10.1- Oxidação Eletroquímica

Os tratamentos por oxidação eletroquímica foram amplamente estudados durante a última década em escala laboratorial e vários trabalhos interessantes foram publicados com a perspectiva de extrapolação para planta piloto num futuro próximo. Na oxidação eletroquímica os radicais hidroxilo são gerados de forma direta (oxidação anódica) ou de forma indireta através da geração do reagente de Fenton. No caso da oxidação anódica os radicais são formados de forma heterogénea por descarga no ânodo diretamente na água, enquanto os radicais são formados de forma homogénea na reação de Fenton, ambos os casos são amplamente utilizados com grande eficiência de mineralização no tratamento de águas residuais, podendo ser aplicados a uma enorme variedade de meios e poluentes orgânicos (Feng *et al.*, 2013).

A oxidação eletroquímica é uma tecnologia relativamente recente, utilizada especialmente para a desinfecção e tratamento de águas residuais, podendo permitir o aumento da biodegradabilidade dos poluentes ou mesmo conduzir à sua mineralização (Panizza *et al.*, 2008).

A oxidação eletroquímica é uma técnica muito promissora para a descontaminação das águas residuais devido ao relativo baixo custo, à sua alta eficiência, a não ser necessário a adição de reagentes químicos tóxicos e perigosos, que evitam a produção de mais resíduos tóxicos. A oxidação anódica permite a destruição de poluentes através do uso de uma célula eletrolítica, sob a ação de radicais hidroxilo formados como intermediários na superfície do ânodo a partir da oxidação de água (Equação 1), onde $\text{M}(\cdot\text{OH})$ denota o radical hidroxilo adsorvido no ânodo M (González *et al.*, 2011).



O carácter não seletivo dos radicais hidroxilo pode minimizar resíduos e produção de subprodutos indesejáveis tornando esta tecnologia promissora no tratamento de compostos bio-refratários em águas residuais (Feng *et al.*, 2013).

2.10.2-Oxidação Anódica (Direta e Indireta)

A oxidação anódica pode ser definida como uma tecnologia eletroquímica que é capaz de oxidar e mineralizar poluentes orgânicos presentes nas águas residuais, por processos oxidativos que ocorrem maioritariamente na superfície do ânodo de uma célula eletroquímica. A oxidação anódica com ânodos de grafite, Pt, TiO₂, IrO₂, PbO₂ e o diamante dopado com boro (BDD) na presença de um eletrólito suporte apropriado, tem sido utilizada para a descontaminação dos efluentes, e mais recentemente na eliminação de fármacos (Ciríaco *et al.*, 2009; González *et al.*, 2011).

A oxidação anódica da matéria orgânica pode ocorrer por dois mecanismos diferentes, oxidação anódica direta ou indireta (Panizza e Cerisola, 2009).

A oxidação anódica direta ocorre por troca direta de elétrons entre os compostos orgânicos e a superfície do eletrodo Figura 2.7. Na oxidação anódica direta, os poluentes (P) são oxidados após adsorção na superfície do ânodo, sem o envolvimento de outras espécies, exceto o elétron, que é um “reagente limpo” (Equação 2).



A oxidação anódica direta é teoricamente possível a potenciais mais baixos, antes da evolução do oxigénio, mas a reação tem geralmente velocidade baixa, que depende da atividade eletrocatalítica do ânodo. Altas taxas de degradação eletroquímica foram observadas utilizando metais nobres como Pt e Pd, bem como ânodos de óxidos de metais, como o dióxido de irídio, ruténio-dióxido de titânio, e dióxido de chumbo (Isarain-Chavez *et al.*, 2010). No entanto, o principal problema da oxidação anódica a um potencial fixo antes da evolução do oxigénio é a diminuição da atividade catalítica que pode levar ao envenenamento do eletrodo, devido à formação de uma camada polimérica na sua superfície. Esta desativação depende das propriedades de adsorção da superfície do ânodo, da concentração e da natureza dos compostos orgânicos que se pretende degradar. A diminuição da atividade eletrocatalítica é menos pronunciada com ânodos com propriedades de fraca adsorção e superfície inerte, como o BDD (Panizza e Cerisola, 2009).

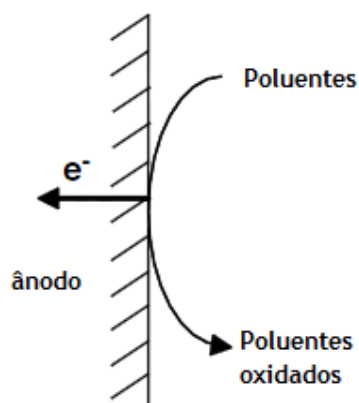


Figura 2.7- Esquema da oxidação Anódica Direta (adaptado de Carrijo e Romero, 2000)

As oxidações indiretas são aquelas onde a troca de elétrões se dá entre o substrato e o mediador e entre este e o elétrodo. Como o agente redox (mediador) é continuamente produzido no elétrodo e usado na reação química com o substrato, o processo torna-se cíclico e mais conhecido como eletrocatalise. Como demonstrado na Figura 2.8, a eletrólise indireta combina uma etapa heterogênea, que é a formação e regeneração do catalisador redox na sua forma ativa na superfície do elétrodo, com uma reação redox homogênea do substrato com o mediador ativo.

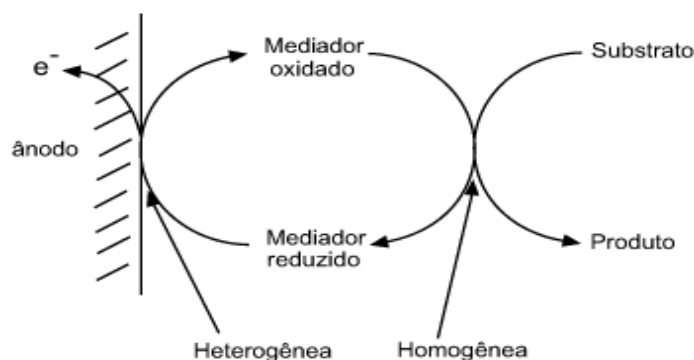


Figura 2.8 - Esquema da Oxidação Anódica Indireta (adaptado de Carrijo e Romero, 2000)

Segundo (Panizza e Cerisola, 2009) os principais requisitos para obtenção de altas percentagens de degradação nos processos de oxidação anódica indireta são:

- Elevada taxa de geração de intermediários
- A adsorção de poluentes deve ser minimizada
- O potencial da espécie intermediária produzida não deve estar perto do potencial de evolução do oxigênio

2.11-Influência das condições operacionais

A degradação eletroquímica de poluentes orgânicos depende de inúmeras variáveis, tal como a natureza do material do ânodo, da composição do eletrólito suporte e das condições experimentais que influenciam a eficiência da degradação, tais como a concentração inicial do poluente, o pH e a intensidade da corrente.

2.11.1-Intensidade de Corrente Aplicada

A intensidade de corrente aplicada é um parâmetro experimental muito importante que pode afetar a capacidade de oxidação dos compostos farmacêuticos utilizados. Estudos levados a cabo por Yahiaoui *et al.* (2013), mostram que a taxa de degradação da tetraciclina aumenta com o aumento da corrente aplicada. A eficiência de remoção aumentou de 33,5% para 77,7% quando a densidade de corrente passou de 2,5 para 25 mA cm⁻², ao fim de 60 minutos de ensaio e com uma concentração inicial de 100 mg L⁻¹. Este aumento da degradação deve estar relacionado com o aumento de produção de radicais hidroxilo, formados na superfície do ânodo a partir da oxidação de água (Equação 3) devido ao aumento da intensidade de corrente aplicada.



Porém, um aumento de intensidade de corrente aplicada pode desencadear reações paralelas no meio da solução, o que conduz à diminuição da eficiência do processo de oxidação de compostos orgânicos, sendo que todo o processo é controlado pela transferência de poluente para o ânodo. O excesso de carga será consumido em reações dos radicais hidroxilo que envolvem, principalmente, a oxidação do radical a O₂.

2.11.2-Natureza do material do ânodo

Segundo (Feng *et al.*, 2013), as variáveis que têm mais influência na oxidação anódica são o tipo de célula eletroquímica utilizada e claro o tipo de material que é usado como ânodo. Escolher o material que vai ser utilizado como ânodo é extremamente importante, uma vez que, este pode ter significativa influência nas propriedades catalíticas ligadas à adsorção, ou aos processos diretos de transferência eletrônica e sobre a produção de oxidantes que vão permitir a oxidação de um determinado poluente.

A escolha do material do ânodo é mesmo o ponto-chave na oxidação anódica, na literatura são descritos dois comportamentos bem distintos para a oxidação de poluentes orgânicos. Alguns elétrodos conduzem a uma oxidação eficaz dos produtos orgânicos, com formação de poucos intermediários durante a oxidação e uma elevada taxa de mineralização no final do ensaio tendo como principal produto final o dióxido de carbono, enquanto outros ânodos de

diferentes materiais, levam a uma oxidação muito mais suave e ineficaz. A interação dos radicais hidroxilo formados durante o processo eletroquímico com a superfície do eletrodo pode ser responsável pela diferença de comportamento dos diferentes materiais usados como ânodo.

Neste trabalho em específico, vamos utilizar dois ânodos de diferentes materiais o Ti/PbO₂ e o Ti/Pt/PbO₂ e tentar perceber o mecanismo da oxidação eletroquímica usando estes eletrodos na degradação dos fármacos a degradar.

Na degradação de fármacos os eletrodos à base de grafite com uma distribuição eletrônica sp², outros de metais (Pt, Ti/Pt), alguns de óxidos metálicos (IrO₂, RuO₂), e óxidos metálicos mistos (contendo diferentes metais como Ir, Ru, e óxidos de Mo), têm uma baixa eficiência na oxidação de compostos orgânicos. Estes ânodos promovem uma suave oxidação de compostos orgânicos, formando uma grande quantidade de intermediários, a maior parte são compostos aromáticos, que são lentamente degradados em ácidos carboxílicos que são pouco oxidáveis, com baixas taxas de mineralização. A baixa eficiência é ainda mais significativa com a utilização dos materiais à base de grafite, uma vez que durante os processos eletroquímicos também podem ser eletroquimicamente incinerados (transformados em CO₂) quando são utilizadas elevadas densidade de corrente. Num ânodo com baixa eficiência de oxidação (M) (Equação 4), indicando a não existência de radicais hidroxilo livres perto da superfície do ânodo, significa que a oxidação é realizada por meio de um estado de oxidação mais elevado da superfície do eletrodo causada indiretamente pelos radicais hidroxilo (Feng *et al.*, 2013).



Outros eletrodos de óxidos metálicos e óxidos metálicos mistos (aqueles contendo PbO₂ e/ou SnO₂) e os eletrodos de diamante (BDD) são considerados como eletrodos de alta eficiência na oxidação de compostos orgânicos. Estes eletrodos promovem a mineralização dos produtos orgânicos sem formação de muitos produtos intermediários, este processo apenas é limitado pelo controle de transporte de massa.

Os eletrodos de óxidos metálicos não são estáveis durante a inversão de polaridade pelo que só devem ser usados como ânodo. No entanto, para correntes anódicas elevadas onde a libertação de oxigênio à superfície do eletrodo pode ser violenta originando a desagregação de grãos do filme de PbO₂, os quais podem chegar ao cátodo e ser reduzidos a Pb²⁺ contaminando a solução ou até reduzir-se a Pb e depositar-se no cátodo. O uso destes eletrodos pode ter a desvantagem para aplicação deste tratamento eletroquímico em águas residuais, uma vez que pode haver libertação de chumbo (Feng *et al.*, 2013).

Capítulo 3

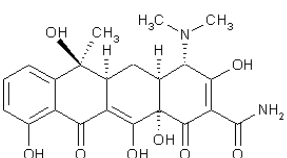
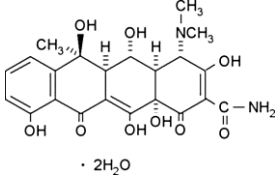
Materiais e Métodos

Neste capítulo apresentar-se-á uma breve descrição dos compostos farmacêuticos estudados, a tetraciclina e a oxitetraciclina, sendo também referidos todos os equipamentos laboratoriais utilizados na realização deste trabalho. Será feita ainda uma breve descrição sobre a montagem e o funcionamento da célula eletrolítica utilizada nos ensaios de electrodegradação dos compostos farmacêuticos estudados, bem como as condições experimentais testadas. Por último, é apresentada uma breve descrição dos métodos utilizados na monitorização dos ensaios de electrodegradação, nomeadamente, a Carência Química de Oxigénio (CQO), o Carbono Orgânico Total (TOC), o Azoto Total (TN), a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC- High Pressure Liquid Chromatography) e a Cromatografia Líquida-Espetrometria de Massa (LC-MS).

3.1-Reagentes

Os fármacos estudados neste trabalho foram a tetraciclina (TC) e a oxitetraciclina (OTC), ambos da Sigma-Aldrich. Estes fármacos apresentam-se sobre a forma de pó. Na tabela 3.1 podemos ver algumas das suas propriedades.

Tabela 3.1- Propriedades dos compostos farmacêuticos utilizados no estudo.

Nome	Tetraciclina	Oxitetraciclina dihidratada
Estrutura Química		
Fórmula Molecular	$C_{22}H_{24}N_2O_8$	$C_{22}H_{24}N_2O_9 \cdot 2H_2O$
Massa molar	444,43 g/mol	496,46 g/mol
Grau de Pureza	$\geq 98,0\%$	$\geq 99,0\%$

Na Tabela 3.2, apresentam-se as características do eletrólito suporte utilizado na realização dos ensaios da degradação eletroquímica.

Tabela 3.2- Características do eletrólito suporte.

Reagente	Fórmula Química	Grau de pureza (%)	Massa molecular/g.mol ⁻¹	Marca
Sulfato de potássio	K ₂ SO ₄	99	174,259	Scharlau

Na tabela 3.3 encontram-se as características dos reagentes usados na realização dos vários métodos de análise.

Tabela 3.3- Reagentes utilizados nos vários métodos de análise.

Método analítico	Reagentes	Grau de pureza (%)	Marca
CQO	K ₂ Cr ₂ O ₇	99	Panreac
	H ₂ SO ₄	95-97	Sigma-Aldrich
	Ag ₂ SO ₄	98,5	Carlo Erba
	HgSO ₄	99	Fluka
	FeH ₂₀ N ₂ O ₁₄ S ₂	99	Panreac
TOC/TN	HCl	37	VWR
	H ₃ PO ₄	85	Fluka
HPLC / LC-MS	CH ₃ CN	99	Merck
	EDTA	--	Sigma-Aldrich
	H ₂ C ₂ O ₄	--	Fluka
	CH ₃ OH	99,9	Carlo Erba

3.2-Equipamento

No teste da Carência Química de Oxigênio, o ácido sulfúrico/sulfato de prata foi medido através de um doseador de ácido Socorex calibre 520 (Figura 3.1-A). Para homogeneizar as amostras foi utilizado um vórtex VWR VV3 (Figura 3.1-B). O digestor usado neste teste foi da Merck Spectroquant TR 420 (Figura 3.1-C), e a titulação foi efetuada utilizando um titulador automático Metrohm 876 Dosimat Plus (Figura 3.1-D).



A B C D
Figura 3.1 - Material utilizado na realização do teste de CQO (A) Socorex calibre 520, (B) VWR VV3, (C) Merck Spectroquant TR 420, (D) Metrohm 876 Dosimat Plus

Os teores de Carbono Orgânico Total (TOC) e Azoto Total (TN) foram determinados recorrendo-se a um analisador TOC da Shimadzu, modelo TOC-V_{CSH}, acoplado a uma unidade de medida de TN, modelo TNM-1 (Figura 3.2).



Figura 3.2 - Analisador TOC e TN da Shimadzu, modelo TOC-V_{CSH}

A análise cromatográfica foi efectuada utilizando-se um sistema de HPLC da Shimadzu, que possui as seguintes componentes: uma unidade de desgaseificação dos eluentes, modelo DGU-

As prominece, bomba quartenária, modelo LC-20 AD, um forno para colunas, modelo CTO-20Ac e um detector espectrofotométrico de fotodíodos, modelo SSPD-M20A (Figura 3.3).



Figura 3.3 - Cromatógrafo de HPLC (Shimadzu)

Os espectros de massa foram obtidos com o auxílio de um sistema LC-MS da Thermo Fisher Scientific LCQ Fleet LC-MS (Figura 3.4).



Figura 3.4 - LC-MS da Thermo Fisher Scientific

3.3-Ensaio de Degradação Eletroquímica

Os ensaios de degradação da tetraciclina e da oxitetraciclina foram realizados num sistema que opera em modo “batch” com agitação (100 rpm), utilizando uma placa de agitação e um agitador magnético. A montagem utilizada para a realização destes ensaios encontra-se esquematizada na Figura 3.4, sendo composta por uma fonte de alimentação e por uma célula eletroquímica que contém como ânodo um eletrodo de Ti/Pt/PbO₂ ou de Ti/PbO₂, com uma área de 10 cm², e como cátodo uma placa de aço inoxidável, com a mesma área, sendo que a distância entre os eletrodos é de 2 cm.



Figura 3.4 - Montagem experimental usada nos ensaios de degradação eletroquímica.

Os ensaios de degradação eletroquímica foram realizados com uma concentração inicial de 100 ppm do composto a degradar, tendo-se utilizado como eletrólito suporte K₂SO₄, com uma concentração de 2,5 g L⁻¹.

Para cada ensaio utilizou-se um volume inicial de solução de 210 mL. Antes do início do ensaio, isto é antes de ligar a fonte de alimentação, retirou-se 10 mL de solução que corresponde à amostra das 0 h. Os ensaios tiveram a duração de 6 horas, com recolha de amostra de 10 mL, em intervalos de 60 minutos.

No decurso deste trabalho laboratorial, foram estudadas diferentes condições experimentais, com diferentes eletrodos (Ti/Pt/PbO₂ ou Ti/PbO₂), diferentes compostos farmacêuticos (tetraciclina ou oxitetraciclina) e diferentes densidades de corrente (10 e 20 mA cm⁻²), a fim de estudar qual o comportamento destes fármacos durante a degradação eletroquímica. Na tabela 3.4 encontra-se uma compilação das condições experimentais utilizadas.

Tabela 3.4 - Condições experimentais utilizadas nos ensaios de degradação de fármacos.

Densidade de corrente aplicada (mA cm ⁻²)	Ânodo	Fármaco a degradar
10	Ti/Pt/PbO ₂	Tetraciclina
		Oxitetraciclina
	Ti/PbO ₂	Tetraciclina
		Oxitetraciclina
20	Ti/Pt/PbO ₂	Tetraciclina
		Oxitetraciclina
	Ti/PbO ₂	Tetraciclina
		Oxitetraciclina

3.4-Monitorização dos Ensaios da Degradação Eletroquímica

A eficiência da electrodegradação foi monitorizada por determinações de Carência química de oxigénio, Carbono orgânico total, Azoto total e análise por Cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção espectrofotométrica e Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a Espectrometria de massa.

3.4.1-Carência Química de Oxigénio

A Carência Química de Oxigénio (CQO) é usada para medição do oxigénio equivalente da matéria orgânica contida numa amostra, que seja suscetível de ser oxidada por um oxidante forte. A sua determinação foi efetuada segundo métodos padrão da Standard Methods (Eaton *et al.*, 2005) e a técnica experimental usada está descrita no Anexo 1.

3.4.2-Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Na técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) usada a coluna é fechada, e pode ser utilizada inúmeras vezes; as colunas utilizadas são bastante eficientes, mas oferecem resistência à passagem da fase móvel, necessitando de sistemas de bombas de alta pressão, que fazem com que a velocidade da eluição aumente. As análises são mais precisas, pois a passagem da fase móvel é facilmente controlada. A injeção é feita com microseringas ou através de válvulas de injeção. Este método tem alta resolução, sensibilidade e reprodutibilidade, embora os equipamentos sejam caros, tal como a manutenção e a operação.

Para que um solvente possa ser utilizado como fase móvel (FM) no HPLC deve apresentar alto grau de pureza, sem decompor os seus componentes, para que estes sejam transportados pela coluna sem que haja modificação, e não deve dissolver a fase estacionária, deve ser compatível com o detetor, não ser tóxico e ter baixa viscosidade, pois isso irá interferir diretamente na eficiência da separação, pois os solventes viscosos além de dificultarem a transferência de massa entre a fase móvel e a fase estacionária, também influenciam a velocidade da passagem da fase móvel.

Uma fase móvel adequada é essencial para o bom funcionamento da técnica de HPLC. Por isso, é necessário examinar todos os fatores que determinam sua escolha, como a sua polaridade, que determina o seu poder de eluição, juntamente com a polaridade da fase estacionária e com a natureza dos componentes da amostra. Se a separação for com fase normal, o poder de eluição aumenta com o aumento da polaridade; se a separação for em fase reversa, o poder de eluição diminui com o aumento da polaridade. Outros fatores que também devem ser considerados são o ponto de ebulição, a viscosidade, e a compatibilidade com o detetor.

As fases estacionárias (FE) que são utilizadas no HPLC devem ter uma alta resolução entre os componentes da amostra, ser de fácil introdução na coluna, ter um diâmetro uniforme, partículas porosas ou peliculares e serem sólidas.

A técnica de HPLC foi utilizada para a avaliação quantitativa da TC e da OTC durante os vários ensaios de oxidação anódica. A análise cromatográfica foi efetuada recorrendo-se ao sistema de HPLC com detetor de fotodiodos, mencionado anteriormente, utilizando-se uma coluna analítica de fase reversa RP-18 Purospher® STAR (Merk) (250 mm x 4 mm, 5 µm). Foi usado um modo de eluição isocrática, com um fluxo da fase móvel igual a 1 mL min⁻¹, utilizando-se como fase móvel uma mistura de 30% de acetonitrilo e 70% de uma solução de ácido oxálico (10 mM), temperatura de 30 °C e comprimento de onda de detecção de 374 nm. Todas as soluções feitas na preparação da fase móvel foram efetuadas com água Millipor.

Em todas as análises cromatográficas, as amostras, bem como o eluente, foram filtrados usando filtros de seringa com uma membrana de polipropileno de 0,45 µm (VWR), e filtros de polipropileno hidrofílico (PAL), de 0,45 µm, respectivamente. Todas as soluções aquosas foram preparadas usando água desionizada tipo Mili-Q.

3.4.3-Cromatografia Líquida acoplado a Espetrometria de Massa

O LC-MS é uma técnica analítica que combina a capacidade de separação da cromatografia líquida (HPLC), com a análise de espectrometria de massa (LC-MS). É uma técnica com elevada sensibilidade e seletividade, sendo bastante utilizada na separação e detecção de produtos químicos de massas específicas na presença de outros produtos químicos (misturas

complexas), como por exemplo substâncias puras a partir de misturas dos seus intermediários químicos.

A espectrometria de massa mede a razão massa/carga (m/z) de partículas carregadas, é usada para determinar as massas de iões, a composição elementar de uma amostra e/ou para elucidação da estrutura química de moléculas, tais como péptidos ou outros compostos químicos.

Os componentes da amostra são ionizados para gerar “moléculas carregadas” ou fragmentos de moléculas e medir a razão de m/z , para isso a amostra sofre uma vaporização no aparelho de MS, os componentes da amostra são depois ionizados através do impacto de um feixe de elétrões, o que resulta na formação de partículas com carga (iões). Os iões são depois separados de acordo com a relação m/z por um analisador de campos magnéticos sendo depois quantificados e o sinal transformado em espectro de massa.

O aparelho de MS é dividido em três módulos, uma fonte de iões que converte as moléculas da amostra em fase gasosa em iões, um analisador de massa, que ordena os iões pelas suas massa através da aplicação de campos eletromagnéticos e por último um detetor que mede o valor da quantidade de cada um dos iões presentes e assim fornece dados para calcular a abundância de cada ião presente.

Na análise LC-MS usou-se um aparelho da Thermo Scientific equipado com uma coluna C18 da Thermo Fisher Scientific (150 mm x 4.6 mm, 5 μm). O volume de injeção foi de 10 μL (full loop), com um regime de eluição isocrático e com um fluxo da fase móvel igual a 0,1 mL min^{-1} , utilizou-se como eluente uma mistura de 40% de Acetonitrilo e 60% Ácido Oxálico (10 mM). A coluna opera a uma temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$. No analisador de massa usamos um detetor Triplo Quadrupolo, detetor equipado com ionização por electrospray. O analisador operou em modo de ionização positivo, com uma corrente de 37,50 μA e uma tensão de 4,96 kV, no capilar utilizamos uma temperatura de 275,00 $^{\circ}\text{C}$ e uma tensão de 15,30 V. Como as tetraciclinas têm tendência a formar compostos quelantes foi adicionado EDTA (5 g L^{-1}) e depois foram acidificadas todas as soluções a pH 2 com HCl. Todas as soluções feitas na preparação do eluente foram efetuadas com água desionizada tipo Mili-Q.

As amostras, bem como o eluente, foram filtrados usando filtros de membrana celulósica (VWR) de 0,45 μm , e filtros de polipropileno hidrofílico (PAL), de 0,45 μm , respectivamente, antes de entrarem no sistema cromatográfico.

3.4.4-Carbono Orgânico Total

No presente trabalho, para monitorizar a potencial mineralização da tetraciclina e da oxitetraciclina durante os ensaios de oxidação anódica, determinou-se o carbono orgânico

total. Como as amostras não apresentavam carbono inorgânico, considerou-se que o valor de carbono orgânico total era igual ao carbono total (CT). O CT foi determinado usando-se o método de combustão a alta temperatura. Este método baseia-se na oxidação completa da amostra, num fluxo de ar puro, na presença de um catalisador de Pt suportado em esferas de alumina, num forno tubular de quartzo. Após a vaporização da amostra, o carbono é oxidado a CO_2 e H_2O . O CO_2 resultante da oxidação do carbono orgânico e do inorgânico, depois de passar por um desumidificador, é transportado pelo gás de arraste e é medido por meio de um detetor de gás de infravermelho não dispersivo.

As amostras recolhidas ao longo dos ensaios de oxidação anódicas foram diluídas cinco vezes, e acidificadas usando uma solução de ácido sulfúrico 0,01 M.

A determinação das concentrações de carbono total foi efetuada por intermédio de uma curva de calibração, traçada a partir de soluções de padrão de hidrogenoftalato de potássio.

3.4.5-Azoto Total

Para monitorizar o decaimento do Azoto Total (TN) das amostras de tetraciclina e oxitetraciclina durante os ensaios utilizou-se o módulo no Azoto Total acoplado ao analisador de TOC da Shimadzu.

Este módulo analisa o azoto total sem precisar de adicionar quaisquer produtos químicos e não produz nenhum resíduo. As amostras que contêm azoto são introduzidas num tubo de combustão rico em oxigénio com um catalisador de platina a uma temperatura de 720°C . O azoto é então convertido em monóxido de azoto (NO), oxidado a dióxido de azoto (NO_2) na presença de ozono, sendo posteriormente analisado por um detetor de quimioluminescência. Todos os gases derivados do azoto são filtrados e em seguida libertados para a atmosfera.

Todas as amostras recolhidas ao longo do tempo foram diluídas duas vezes antes de serem analisadas. A determinação das concentrações de azoto total foi efetuada por intermédio de uma curva de calibração, traçada a partir de soluções de padrão de nitrato de potássio.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

Neste trabalho foi realizado o estudo da eletrodegradação de vários fármacos com diferentes elétrodos e diferentes intensidades de corrente aplicada, apresentando-se, neste capítulo, os resultados obtidos. A eficiência da eletrodegradação foi monitorizada por determinações de CQO, TOC, TN, HPLC e LC-MS. Em todos os ensaios realizados a concentração inicial de composto a degradar foi de 100 ppm, tendo-se usado como eletrólito suporte 2,5 g L⁻¹ de K₂SO₄.

4.1- Análise dos resultados de CQO e de TOC

Na degradação eletroquímica da tetraciclina e da oxitetraciclina foram efetuados ensaios usando como elétrodos o Ti/Pt/PbO₂ e o Ti/PbO₂. Nas figuras 4.1 e 4.2 apresentam-se os resultados obtidos para as relações TOC/TOC₀ e CQO/CQO₀ das amostras recolhidas ao longo do tempo.

Como se pode observar pela Figura 4.1-A, o decaimento do TOC no ensaio realizado com a tetraciclina é mais rápido quando se utiliza o Ti/PbO₂, embora este efeito só seja visível após as duas primeiras horas de ensaio. Contudo, com o Ti/Pt/PbO₂ no fim do ensaio verifica-se um decaimento global similar.

No ensaio realizado com a oxitetraciclina (Figura 4.1-B) utilizando o Ti/PbO₂ como eletrodo há um decaimento do TOC mais acentuado nas duas primeiras horas de ensaio, mantendo-se depois praticamente constante ao longo do ensaio. Por outro lado, utilizando como eletrodo o Ti/Pt/PbO₂ observamos um decaimento gradual ao longo do ensaio, obtendo-se no final das seis horas de ensaio uma maior eficiência de degradação da oxitetraciclina.

A influência do material de eletrodo na degradação dos diferentes fármacos estudados pode ser visualizada na Figura 4.1, C e D. Podemos observar que utilizando o Ti/Pt/PbO₂ se obteve um decaimento muito mais acentuado do TOC no caso da oxitetraciclina quando comparado com os resultados obtidos para a tetraciclina. Por outro lado, quando utilizamos o Ti/PbO₂ há um maior decaimento do TOC nos ensaios realizados com a tetraciclina a partir da segunda hora de ensaio, embora ao fim das seis horas os resultados sejam muito idênticos para os dois poluentes.

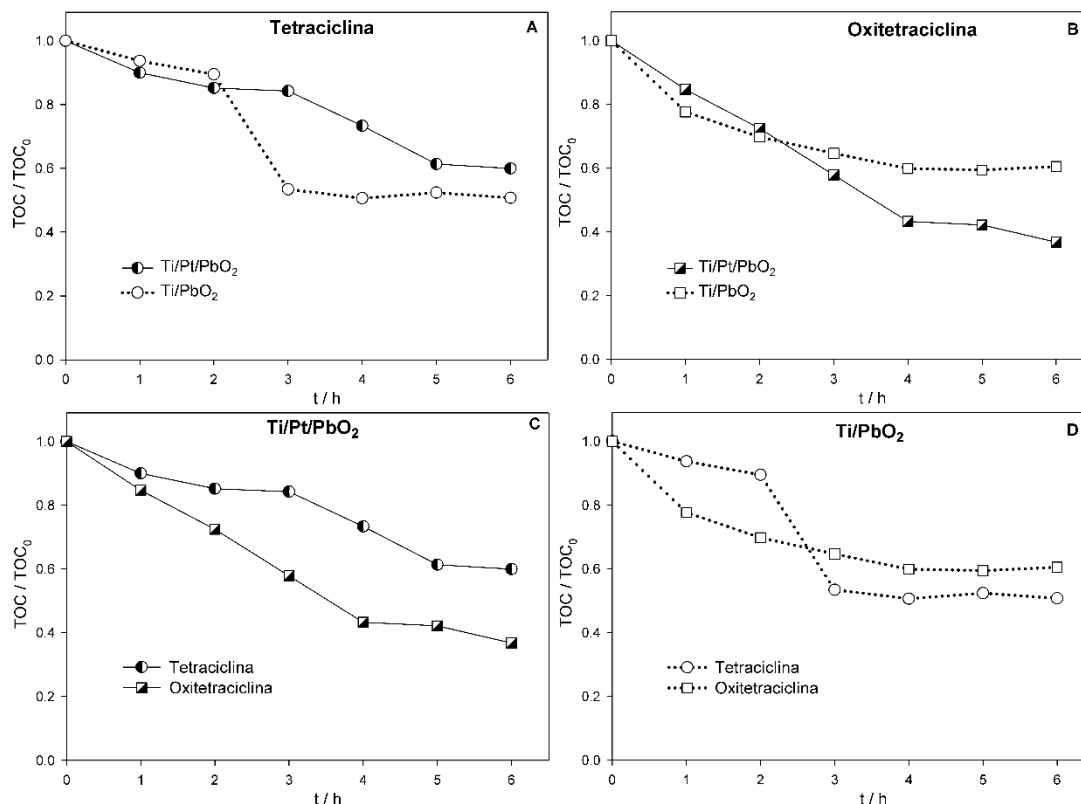


Figura 4.1- Evolução da razão TOC/TOC_0 ao longo do tempo na oxidação anódica da Tetraciclina e da Oxitetraciclina com os eletrodos $Ti/Pt/PbO_2$ ou Ti/PbO_2 , usando como eletrólito suporte $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de K_2SO_4 e uma densidade de corrente aplicada de 10 mA cm^{-2} .

O decaimento de CQO da tetraciclina é muito mais acentuado no início do ensaio de eletrodegradação quando se utiliza como eletrodo o Ti/PbO_2 , como podemos observar pela Figura 4.2-A. Esta diferença inicial vai-se reduzindo ao longo do ensaio, sendo, no final, os resultados praticamente independentes do material de eletrodo. Em relação à oxitetraciclina (Figura 4.2-B) observa-se uma situação muito semelhante.

Quando se compara o comportamento dos dois fármacos face ao mesmo material de eletrodo (Figura 4.2: C - $Ti/Pt/PbO_2$; D - Ti/PbO_2), verifica-se que o decaimento da CQO é semelhante, qualquer que seja o material de ânodo.

Uma análise conjunta de todos os resultados apresentados nas figuras 4.1 e 4.2 permite concluir que:

- A oxitetraciclina tem mais facilidade em sofrer combustão no material de ânodo $Ti/Pt/PbO_2$ face à tetraciclina, pois neste material os decaimentos da CQO são maiores para a tetraciclina e os do TOC são maiores para a oxitetraciclina.
- No material de ânodo Ti/PbO_2 os decaimentos iniciais de CQO e de TOC são maiores, sendo seguidos de uma espécie de “patamar”. Este comportamento parece indicar a

possível formação de intermediários mais resistentes à oxidação do que os compostos de partida.

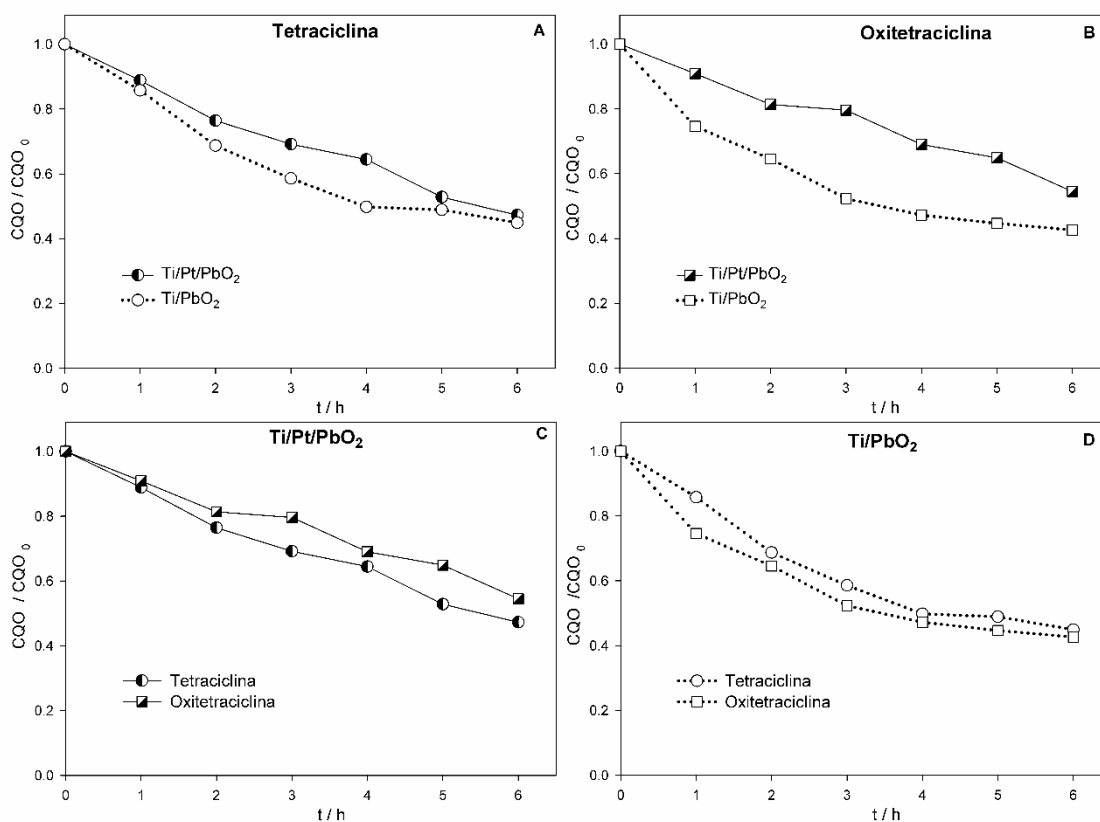


Figura 4.2- Evolução da razão CQO/CQO_0 ao longo do tempo na oxidação anódica da Tetraciclina (A) e da Oxitetraciclina (B) com os elétrodos $Ti/Pt/PbO_2$ (C) ou Ti/PbO_2 (D), usando como eletrólito suporte $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de K_2SO_4 e uma densidade de corrente aplicada de 10 mA cm^{-2} .

4.2-Análise dos resultados obtidos do Azoto Total

A fim de determinar o decaimento do azoto total durante a eletrodegradação dos fármacos procedeu-se à sua determinação. Como podemos observar pela Figura 4.3-A, a taxa de remoção do azoto na degradação da tetraciclina é muito baixa, em qualquer dos materiais de ânodo, indicando a formação de algum composto azotado muito resistente à oxidação. Em relação à oxitetraciclina (Figura 4.3-B), o comportamento é muito distinto nos dois ânodos estudados, verificando-se uma remoção de azoto bastante superior no caso dos ensaios realizados com o Ti/PbO_2 .

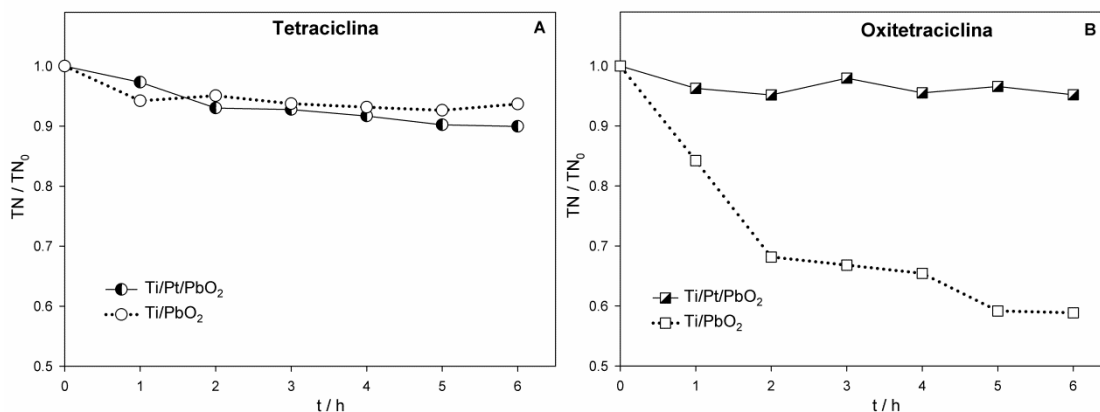


Figura 4.3- Evolução da razão TN/TN_0 ao longo do tempo na oxidação anódica da Tetraciclina (A) e da Oxitetraciclina (B) a uma densidade de corrente aplicada de 10 mA cm^{-2} , usando como eletrólito suporte $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de K_2SO_4 , e diferentes elétrodos, o Ti/Pt/PbO_2 e o Ti/PbO_2 .

4.3- Influência da densidade de corrente aplicada

Determinou-se a concentração da tetraciclina e da oxitetraciclina por HPLC nas amostras recolhidas ao longo do tempo, nos ensaios realizados com diferentes materiais de elétrodo e a diferentes densidades de corrente aplicada. Os resultados obtidos encontram-se apresentados nas Figuras 4.4 e 4.5.

Pela análise dos dados da figura 4.4, que diz respeito à degradação eletroquímica com uma intensidade de corrente de 10 mA cm^{-2} , podemos observar que o elétrodo não platinizado promove uma eliminação mais rápida das duas tetraciclinas, promovendo, conseqüentemente, a sua conversão noutras espécies orgânicas, pois as diferenças de comportamento dos materiais de elétrodo face aos decaimentos da CQO e do TOC não são tão díspares como o do decaimento da concentração. Esta diferença de comportamento dos elétrodos na eficiência da degradação eletroquímica pode ser devida à presença da Pt no elétrodo, pois este metal apresenta uma baixa eficiência na oxidação de compostos orgânicos. Na realidade, estes ânodos promovem uma suave oxidação dos compostos orgânicos, formando uma grande quantidade de intermediários, com baixas taxas de mineralização. Embora a platina esteja revestida com o PbO_2 , existe alguma porosidade nos filmes, que pode permitir à platina evidenciar as suas características adsorptivas elevadas.

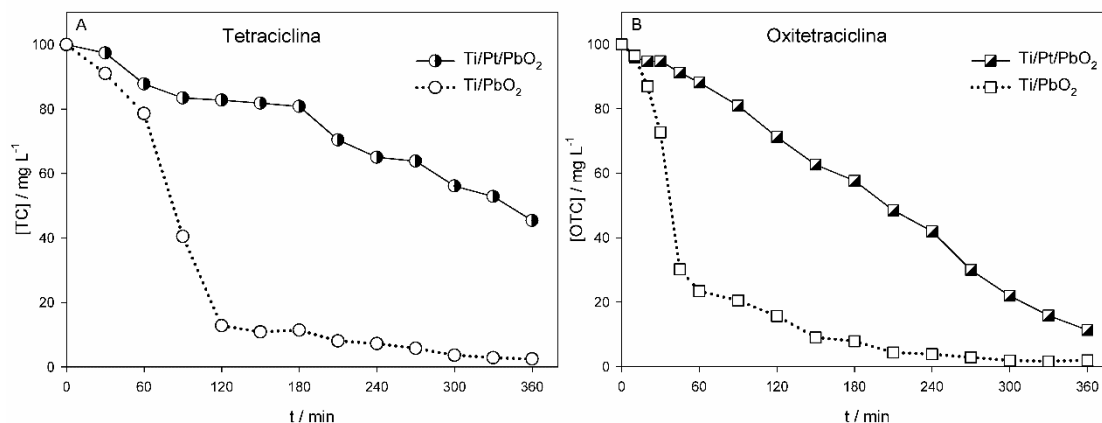


Figura 4.4- Evolução da concentração da Tetraciclina (A), e da Oxitetraciclina (B), determinada por HPLC, ao longo do tempo para os ensaios realizados com diferentes materiais de eléctrodo a uma densidade de corrente 10 mA cm⁻².

Pela análise da Figura 4.5 podemos observar um comportamento similar utilizando uma densidade de corrente de 20 mA cm⁻², pois com o eléctrodo não platinizado obteve-se uma maior eficiência na degradação da tetraciclina e da oxitetraciclina, confirmando, assim, as conclusões anteriores.

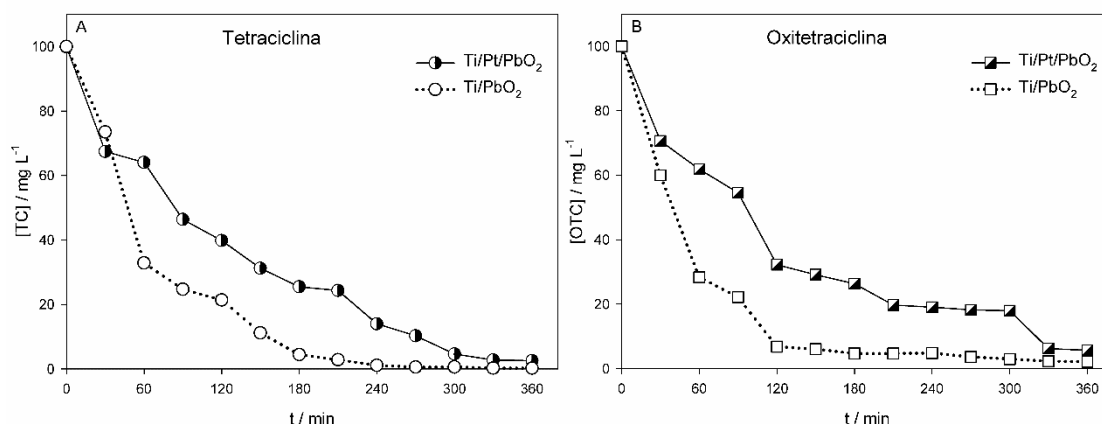


Figura 4.5- Evolução da concentração da Tetraciclina (A) e da Oxitetraciclina (B), determinada por HPLC, ao longo do tempo para os ensaios realizados com diferentes materiais de eléctrodo a uma densidade de corrente de 20 mA cm⁻².

Nas Figuras 4.6 e 4.7 apresentam-se os resultados das Figuras 4.4 e 4.5 representados por material de eléctrodo, a fim de estudar o efeito da densidade de corrente aplicada no decaimento da concentração das tetraciclina.

Pela análise da Figura 4.6 podemos afirmar que, quando se utiliza o Ti/Pt/PbO₂ como ânodo um aumento da densidade de corrente é sinónimo de uma maior eficiência na degradação das tetraciclina.

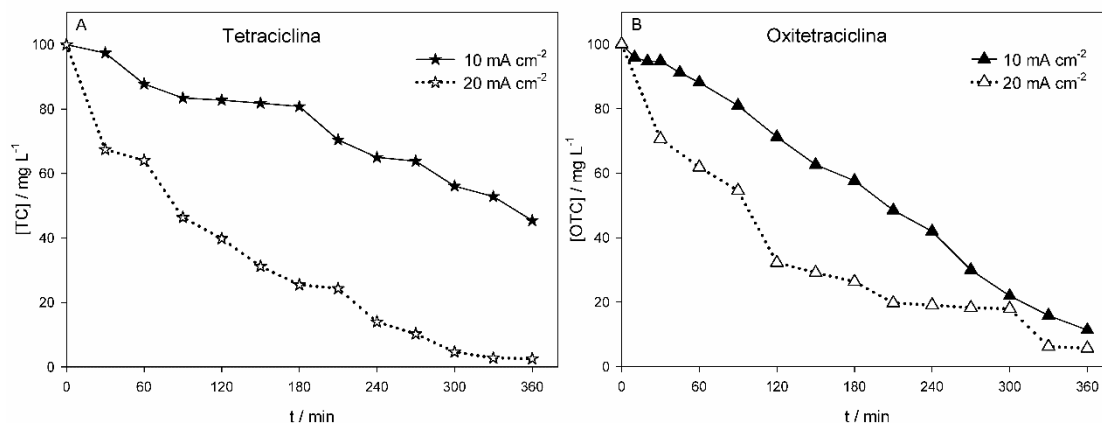


Figura 4.6- Evolução da concentração da Tetraciclina (A), e da Oxitetraciclina (B), determinada por HPLC, ao longo do tempo para os ensaios realizados com o eletrodo de Ti/Pt/PbO₂ a densidades de corrente de 10 mA cm⁻² e de 20 mA cm⁻².

Comparando o decaimento da concentração das tetraciclina quando utilizamos Ti/PbO₂ como ânodo (Figura 4.7) podemos concluir que não há uma diferença muito significativa na eficiência de degradação. Este comportamento indica que o aumento da intensidade de corrente aplicada com este ânodo pode desencadear reações paralelas no meio da solução, que conduzem à diminuição da eficiência do processo de oxidação destes compostos, sendo que todo o processo é controlado pela transferência do poluente para o ânodo. O excesso de carga será consumido em reações dos radicais hidroxilo que envolvem, principalmente, a oxidação do radical a O₂.

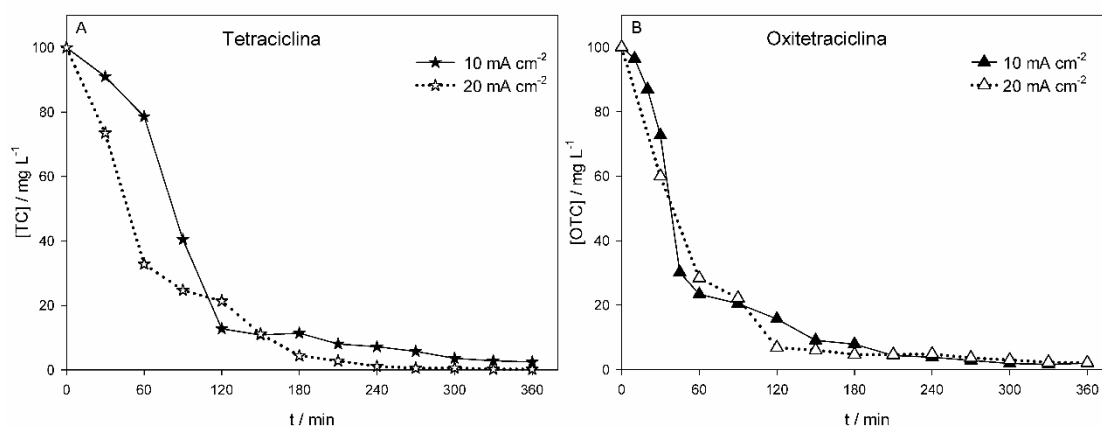


Figura 4.7- Evolução da concentração da Tetraciclina (A), e da Oxitetraciclina (B), determinada por HPLC, ao longo do tempo para os ensaios realizados com o eletrodo Ti/PbO₂ a densidades de corrente de 10 mA cm⁻² e de 20 mA cm⁻².

Na tabela 4.1 apresentam-se as percentagens de remoção dos poluentes em estudo, calculadas a partir das concentrações determinadas por HPLC, ao fim de 120 minutos, para os ensaios realizados com diferentes fármacos, usando diferentes eletrodos e diferentes

densidades de corrente aplicada. Através da análise dos valores obtidos podemos concluir que:

- Utilizando o Ti/Pt/PbO₂ como ânodo há um aumento significativo da eficiência na degradação tanto na tetraciclina como na oxitetraciclina, quando a intensidade de corrente passa de 10 para 20 mA cm⁻². Este comportamento indica que com o ânodo platinizado se formam intermediários difíceis de oxidar, que levam à passivação do ânodo para densidades de corrente inferiores. Esta dificuldade é, contudo, ultrapassada pelo aumento da densidade de corrente, que deve conduzir a um mecanismo onde a influência dos processos indiretos aumenta.
- O aumento da intensidade de corrente aplicada quando se utiliza como ânodo o Ti/PbO₂ não traz benefícios à degradação eletroquímica uma vez que a remoção dos fármacos analisados foi similar. Este ânodo, sem a platinização, deve ser menos sensível à polarização, sendo os processos de oxidação indireta importantes mesmo a densidades de corrente inferiores.

Tabela 4.1- Remoção na concentração dos antibióticos, determinada por HPLC, ao fim de 120 minutos de ensaio.

Corrente Aplicada / mA cm ⁻²	% Remoção do fármaco			
	Tetraciclina		Oxitetraciclina	
	Ti/Pt/PbO ₂	Ti/PbO ₂	Ti/Pt/PbO ₂	Ti/PbO ₂
10	18	90	29	85
20	55	79	68	95

4.4- Análise dos produtos de degradação por LC-MS

A espectrometria de massa permite o estudo de uma amostra através da análise e caracterização do espectro de massa dos iões formados em fase gasosa, de acordo com a sua massa, carga e estrutura. No espectro da MS podemos observar a razão entre a massa e o número de carga (m/z) de cada ião em função da sua intensidade ou abundância relativa.

Na Figura 4.8 e 4.9 podemos observar, respetivamente, os espectros de massa da tetraciclina e da oxitetraciclina, em soluções com uma concentração de 100 ppm e sem eletrólito suporte adicionado. Como podemos observar, a tetraciclina tem uma razão m/z de 445,15 uma vez que estamos a usar uma molécula protonada ($[M+H]^+$), ou seja, a ionização está a operar em modo positivo. Em relação à oxitetraciclina, observa-se uma razão m/z de 461,22, também

para a molécula protonada $[M+H]^+$, i.e., a ionização uma vez mais está a operar em modo positivo.

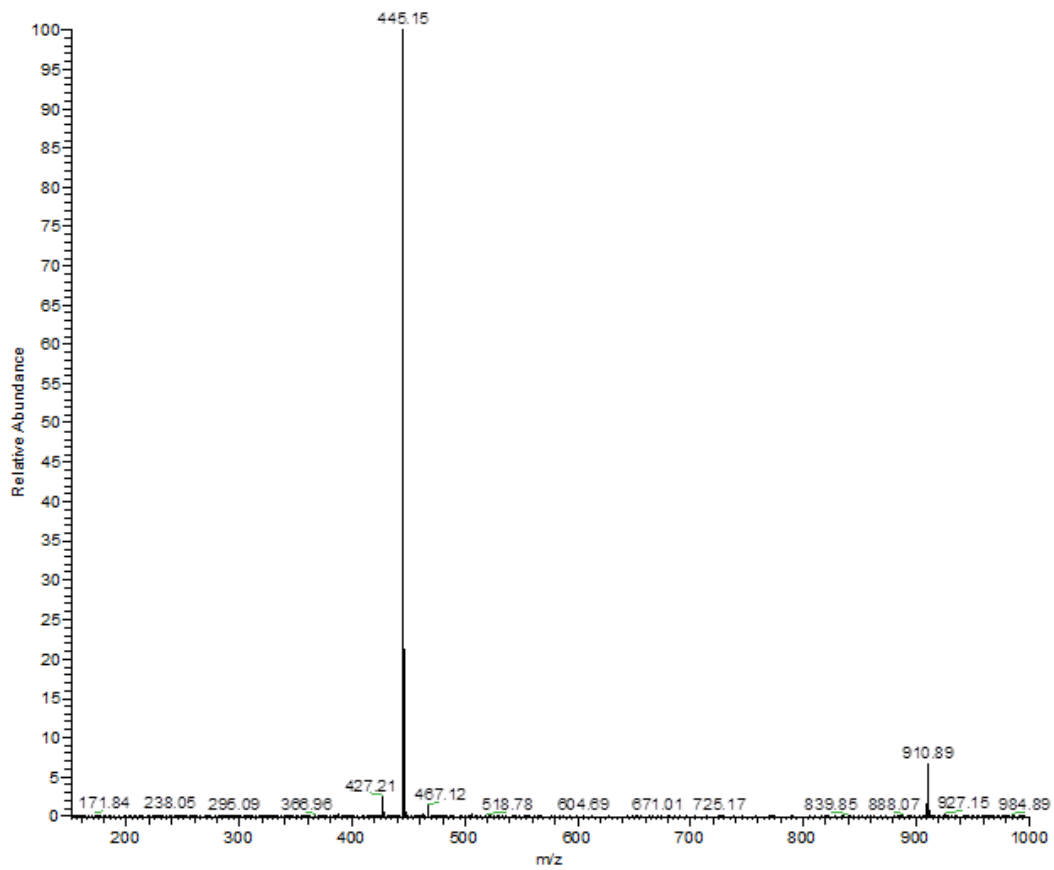


Figura 4.8 - Espectro de massa da tetraciclina

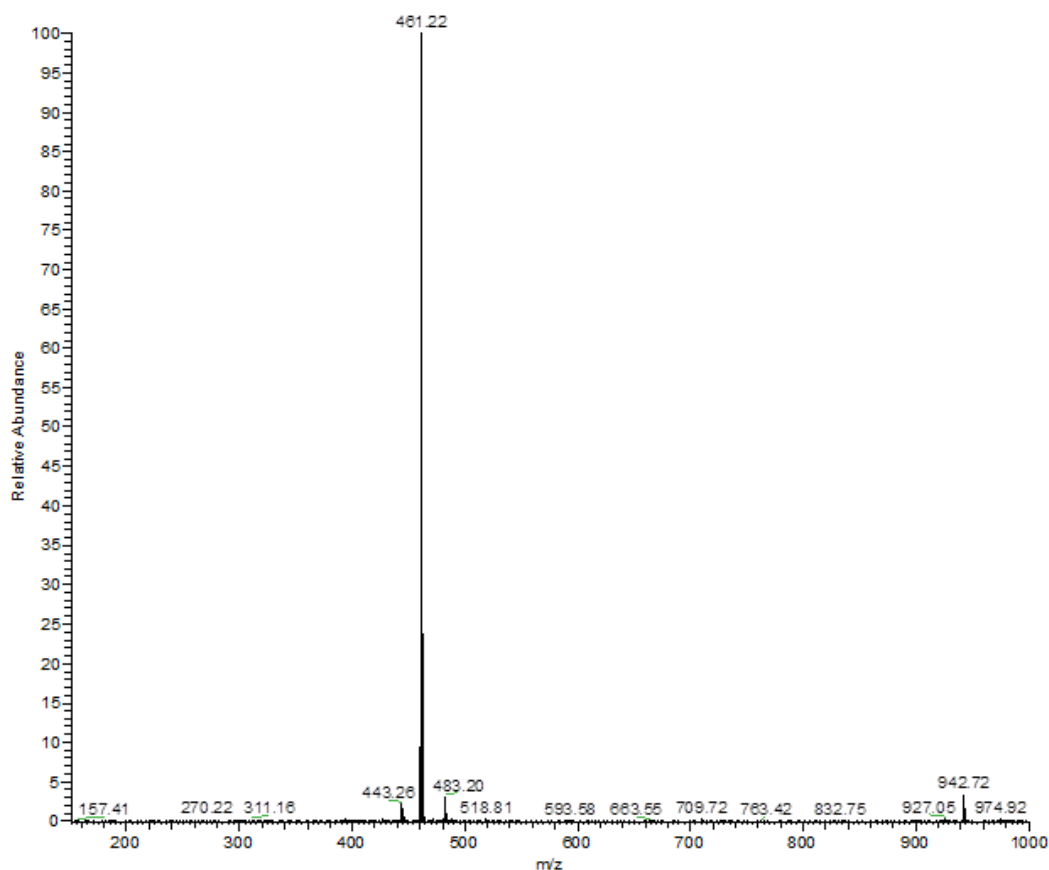


Figura 4.9 - Espetro de massa da oxitetraciclina

Para saber mais informações estruturais sobre as amostras fomos sujeitá-las a uma energia de fragmentação, que se dá por meio de colisões da amostra com um gás neutro (N_2), em condições controladas dentro do próprio analisador de MS.

Na tabela 4.2 podemos observar a razão m/z resultante quando aplicamos diferentes energias de fragmentação. A tetraciclina tem uma perda de 18 na razão m/z , o que corresponde à perda de H_2O $[M+H-H_2O]^+$, gerando depois $[M+H-H_2O-NH_3]^+$, que corresponde à saída de NH_3 e perda total da razão m/z de 35. O caso da oxitetraciclina, é um pouco diferente, pois a perda da razão m/z de 17 corresponde à perda do NH_3 $[M+H-NH_3]^+$, com perda posterior da H_2O $[M+H-NH_3-H_2O]^+$, que corresponde à perda global da razão m/z de 35, como podemos observar na Tabela 4.2. Estes resultados estão concordantes com a bibliografia consultada. (Zhu *et al.*, 2001; Jia *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2010)

Tabela 4.2- Energia de fragmentação aplicada e fragmentos derivados das amostras de composto.

Composto	lão Precursor	Energia de fragmentação (eV)	Produto
Tetraciclina	445	20	427
		30	410
Oxitetraciclina	461	20	444
		30	426

A Figura 4.10 pretende resumir o que acontece quando se aplica uma determinada energia de fragmentação nas nossas amostras. Em ambos os casos, tanto na tetraciclina como na oxitetraciclina, podemos observar a saída da H₂O e NH₃ (Zhu *et al.*, 2001; Borghi *et al.*, 2014).

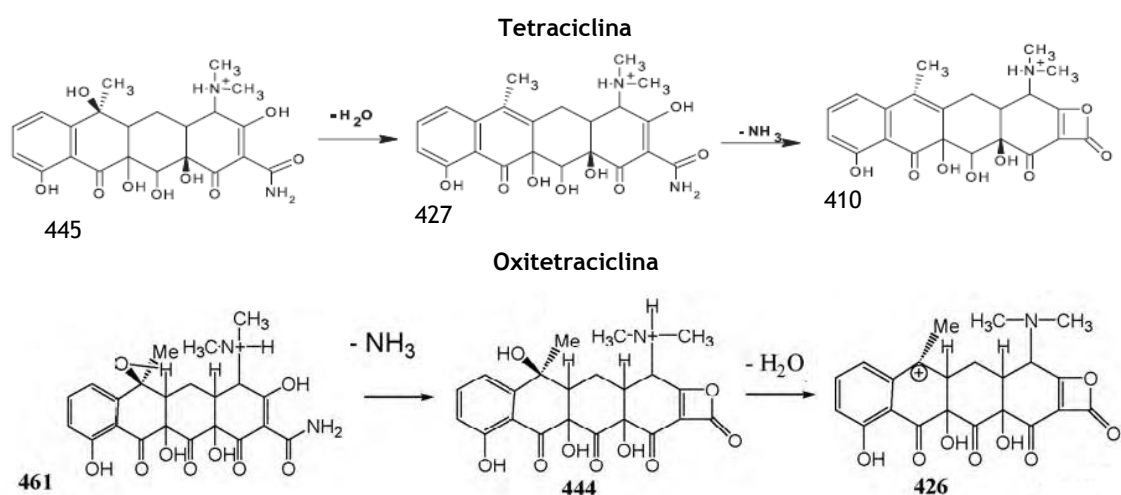


Figura 4.10- Produtos de fragmentação das tetraciclínas (adaptado de Zhu *et al.*, 2001; Borghi *et al.*, 2014)

Os espetros da Figura 4.11 permitem perceber melhor a que corresponde cada pico da razão m/z e, partindo da massa do composto inicial, fazer a correspondência aos fragmentos responsáveis pelos novos valores da razão m/z.

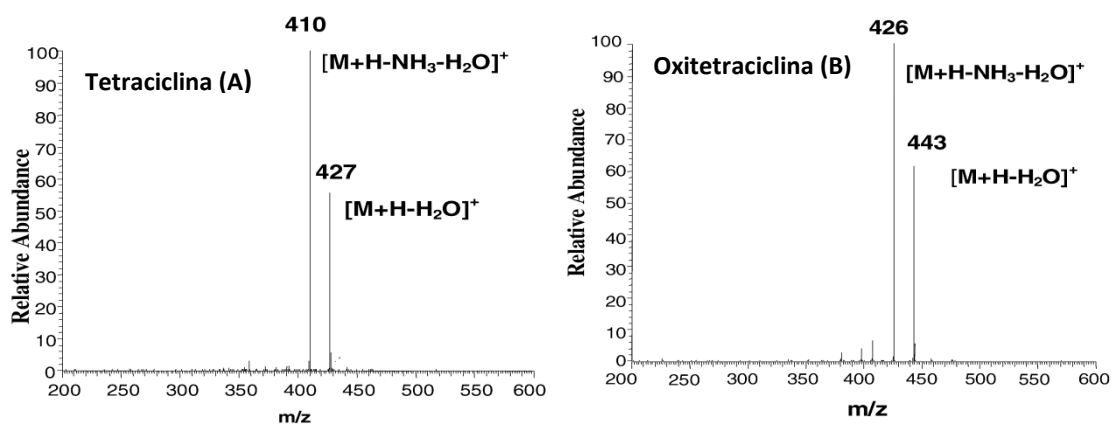


Figura 4.11- Espectros dos produtos de fragmentação das tetraciclina (A) Tetraciclina (B) Oxitetraciclina (adaptado de Zhu *et al.*, 2001).

De forma a estudar os produtos formados durante a degradação eletroquímica resultantes da mineralização das tetraciclina foram feitas análises LC-MS às amostras recolhidas ao longo da sua degradação eletroquímica, o que permite obter a razão m/z e a abundância relativa dos produtos que se vão formando. Na figura 4.12 podemos observar o cromatograma da degradação eletroquímica da tetraciclina obtido ao longo do tempo, utilizando o Ti/PbO₂ como elétrodo. A amostra foi diluída de 1:2 com EDTA 5 g L⁻¹ e acidificada a pH 2 com HCl. Podemos ver pela Figura 4.12 o decaimento do nosso produto inicial (tempo de retenção ±19,55 min) e a formação de produtos de degradação (tempo de retenção ± 15,0 min).

Este facto permite-nos concluir que há formação de intermediários durante a degradação eletroquímica da tetraciclina e que são detetados na separação.

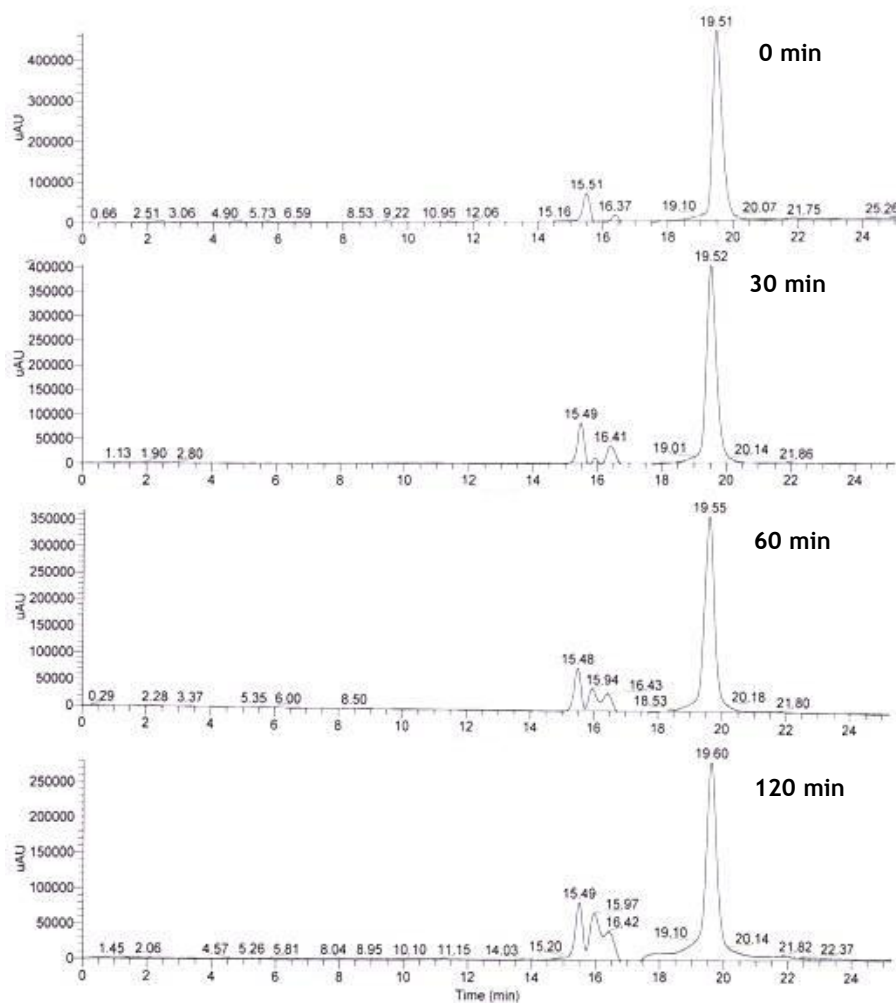


Figura 4.12- Cromatogramas de LC da tetraciclina, longo do tempo de ensaio de degradação (0, 30, 60 e 120 min), usando Ti/PbO₂ como elétrodo.

O espectro de massa da Figura 4.13 mostra a razão m/z e a abundância relativa dos produtos formados durante a degradação eletroquímica da tetraciclina ao fim de 120 min de ensaio. Podemos verificar que se formam inúmeros produtos de degradação durante o ensaio, o que dificulta a sua identificação. Verifica-se a formação de compostos com massa superior ao composto inicial, que pode dever-se à formação de dímeros ou polímeros da tetraciclina durante a sua degradação, tendência já mencionada por alguns autores que referem a formação de quelatos (Jia *et al.*, 2009). Esta tendência, aliada ao facto da coluna utilizada na separação dos intermediários da degradação formados, durante o ensaio da oxidação anódica, não ser a mais indicada para este tipo de compostos, vai dificultar a interpretação dos resultados.

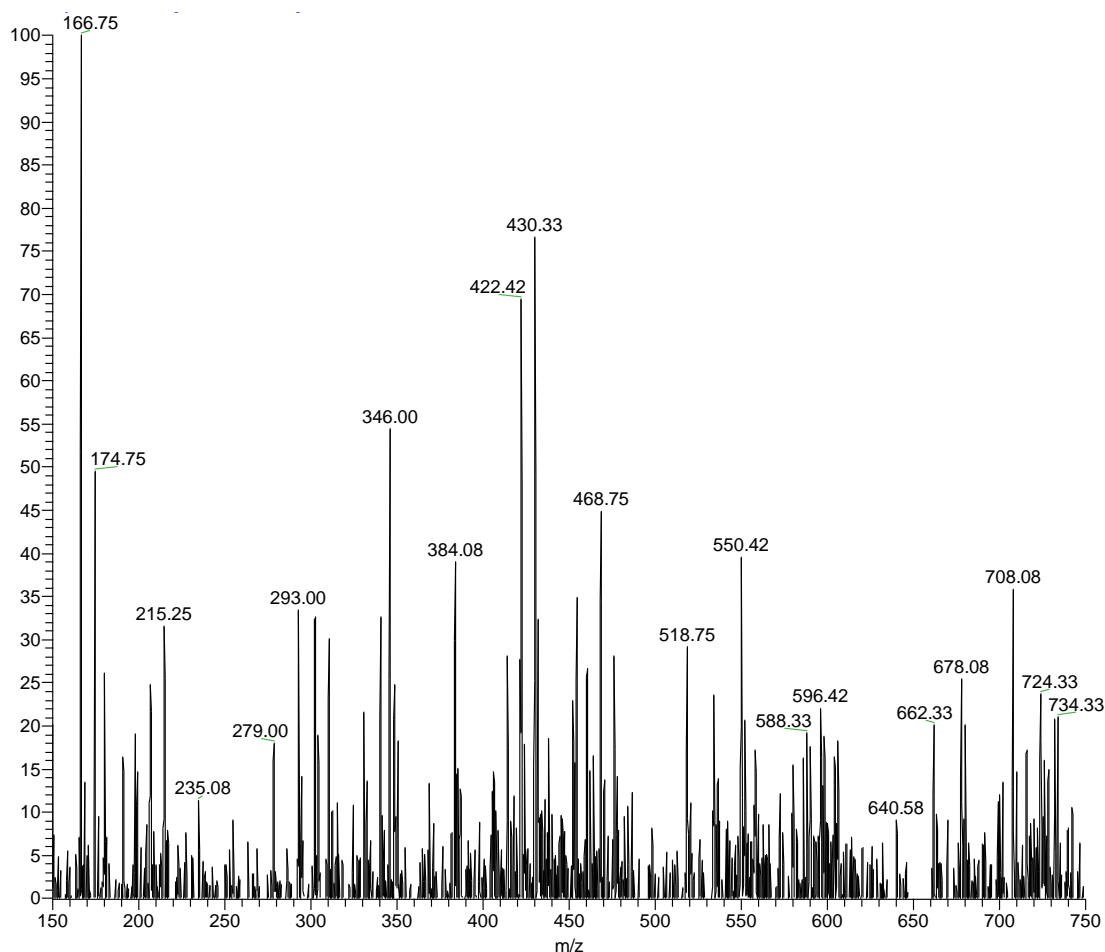


Figura 4.13- Espectro de massa da tetraciclina, em EDTA 5 g L⁻¹ e a pH 2, com 120 min de ensaio usando Ti/PbO₂ como elétrodo.

Pela análise do espectro da fig 4.13 e usando dados da bibliografia consultada, podemos identificar os valores m/z de alguns fragmentos iônicos com alguns intermediários referidos em mecanismos da degradação eletroquímica da tetraciclina propostos por alguns autores e apresentados na fig 4.14. No espectro de massa obtido experimentalmente para a tetraciclina consegue-se identificar o fragmento iônico com m/z=279, que apresenta uma intensidade significativa e que, de acordo com o mecanismo de degradação proposto, poderá identificar um dos intermediários formados após a saída do grupo amida. Os restantes intermediários propostos no mecanismo de degradação poderão também ser identificados com alguns fragmentos que aparecem no espectro, por vezes, com baixa intensidade dos respetivos picos. Além de fragmentos de massa inferior à do composto inicial, aparecem no espectro de massa valores de m/z superiores ao do composto inicial, que corresponderão a degradações de polímeros formados durante a parte inicial dos ensaios de eletroquímicos. Contudo, devido

em parte ao facto da coluna utilizada na separação destes compostos não ser a mais indicada para a separação deste tipo de compostos, a identificação de algumas destas espécies só pôde ser feita com base na pesquisa bibliográfica efetuada.

Na Figura 4.14 podemos observar um dos possíveis mecanismos de degradação da tetraciclina e os produtos formados durante a oxidação anódica (Zhu *et al.*, 2001; Borghi *et al.*, 2014). Como podemos ver, o composto inicial, neste caso a tetraciclina ($m/z=445$), é “atacado” pelos radicais hidroxilo (OH^\bullet), atacando a amida ($m/z=447$) e consequentemente permitindo a abertura do anel ($m/z=279$). Outra possibilidade é a saída de um grupo metano (CH_4), permitindo posteriormente a abertura do anel ($m/z=277$).

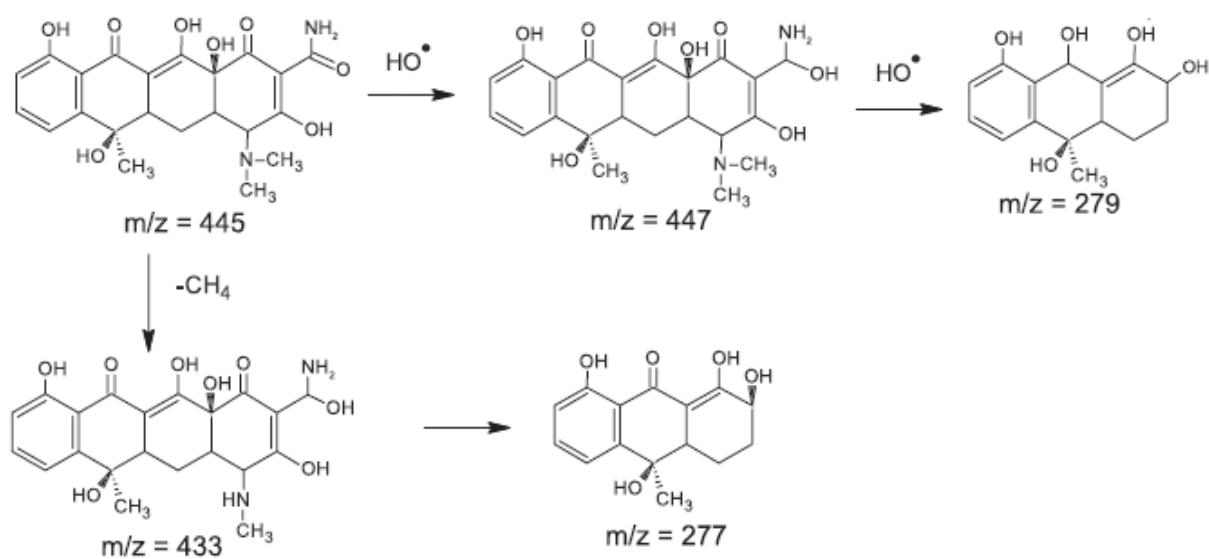


Figura 4.14- Produtos de degradação da tetraciclina (adaptado de Borghi *et al.*, 2014)

Na Figura 4.15 podemos observar os cromatogramas obtidos ao longo do tempo da degradação eletroquímica da oxitetraciclina. Uma vez mais os resultados vão de acordo com os anteriormente obtidos na degradação eletroquímica da tetraciclina, visto que os produtos estão a ser detetados na cromatografia líquida. Como podemos constatar, há um aumento significativo ao longo do tempo do pico com um tempo de retenção à volta dos 15,50 min, que corresponderá à formação de intermediários na degradação deste composto.

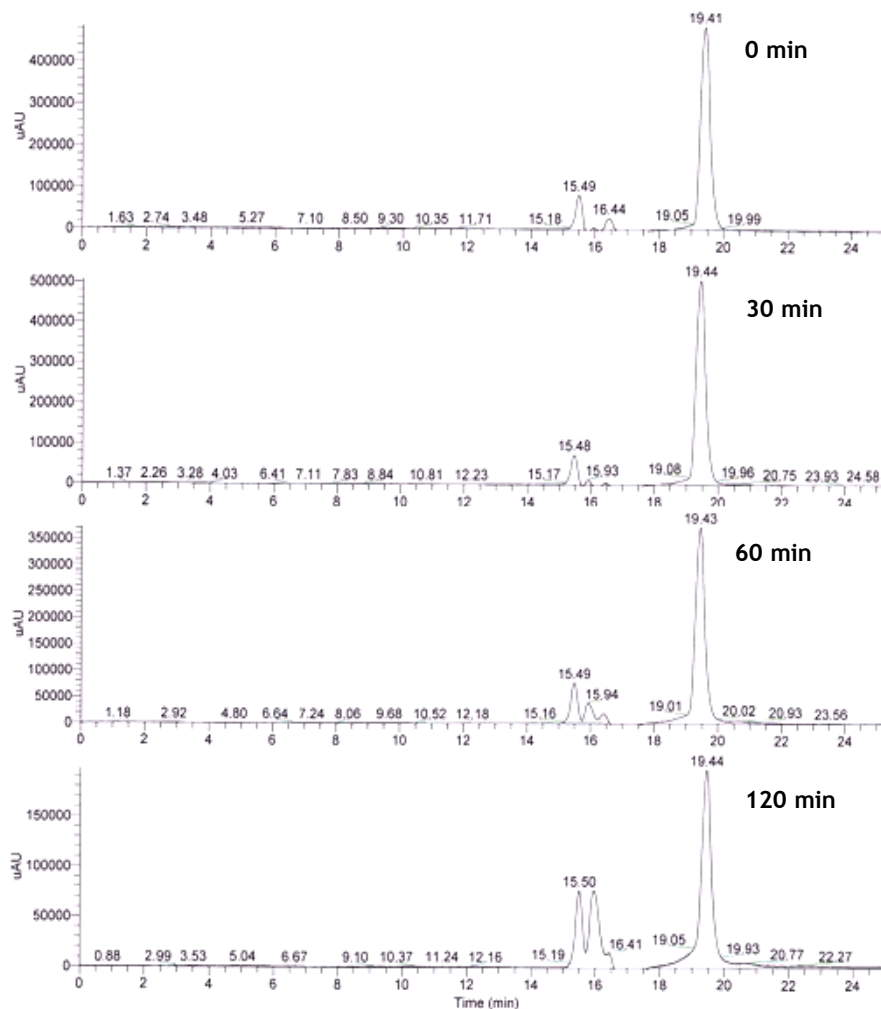


Figura 4.15- Cromatograma de LC da oxitetraciclina, em EDTA 5 g L⁻¹ e a pH 2, ao longo do tempo de ensaio de degradação (0, 30, 60 e 120 min), usando Ti/PbO₂ como eletrodo.

O espectro de massa da Figura 4.16 mostra a razão m/z e a abundância relativa dos produtos formados durante a degradação eletroquímica da oxitetraciclina, ao fim de 120 min de ensaio. Uma vez mais, podemos afirmar que se formam inúmeros produtos de degradação durante o ensaio decorrido, que vão dificultar a sua identificação. Também aqui não foi utilizada a coluna adequada para a separação dos intermediários da oxitetraciclina, formados durante a oxidação anódica.

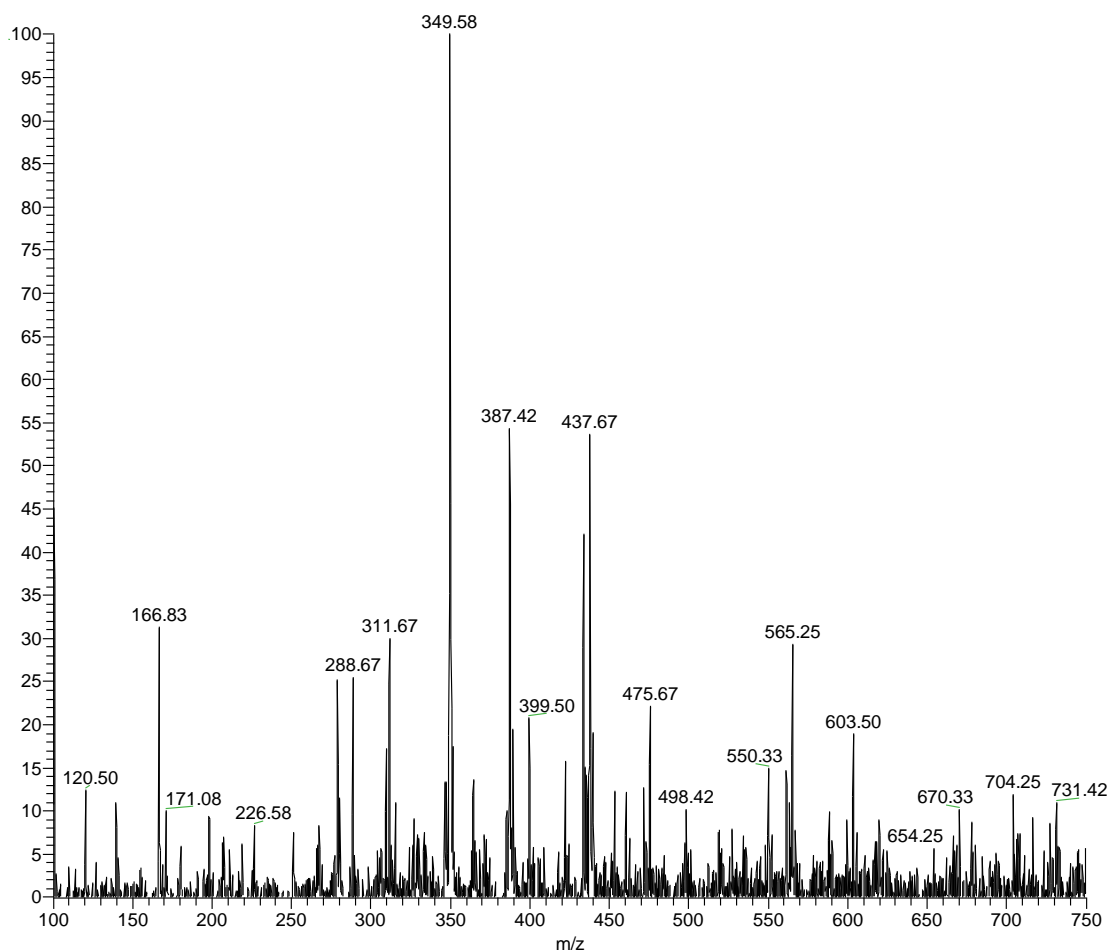


Figura 4.16- Espectro de massa da oxitetraciclina, em EDTA 5 g L⁻¹ e a pH 2, com 120 min de ensaio usando Ti/PbO₂ como elétrodo.

A Figura 4.17 mostra alguns dos possíveis produtos da degradação eletroquímica da oxitetraciclina. Uma vez mais, recorreremos à bibliografia para interpretar os espectros de massa obtidos e tentar perceber as estruturas moleculares dos produtos de degradação obtidos (Jeong *et al.*, 2010). Também aqui é apresentada a possibilidade da saída do grupo amida como um dos primeiros grupos a abandonar a molécula de oxitetraciclina durante a oxidação anódica.

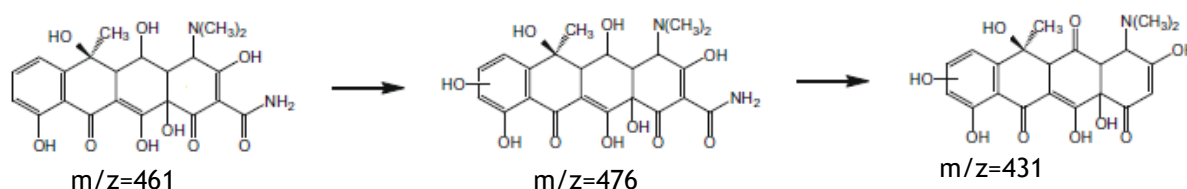


Figura 4.17- Produtos de degradação da oxitetraciclina (adaptado de Jeong *et al.*, 2010)

Apesar de a coluna utilizada na separação não ser a mais indicada na separação deste tipo de compostos e conseqüentemente dificultar a interpretação dos resultados obtidos, ainda assim

foi possível identificar o pico $m/z=476$, que corresponderá ao ataque do grupo hidroxilo à oxitetraciclina, de acordo com a bibliografia (Jeong *et al.*, 2010).

Embora na bibliografia seja referido que durante a degradação eletroquímica tanto da tetraciclina como da oxitetraciclina um dos primeiros grupos a abandonar a estrutura molecular do composto inicial seja o grupo amida, nestes estudos tal facto foi mais evidente no caso da tetraciclina.

Capítulo 5

Conclusões e Perspetivas de Trabalho Futuro

No presente trabalho, estudou-se a degradação da tetraciclina da oxitetraciclina por oxidação anódica, utilizando como ânodo elétrodos de Ti/Pt/PbO₂ e de Ti/PbO₂, de modo a verificar a influência dos diferentes materiais de eletrodo na extensão da degradação.

Os resultados obtidos neste estudo permitem retirar as seguintes conclusões:

- Utilizando o eletrodo Ti/Pt/PbO₂, obteve-se um decaimento muito mais acentuado do TOC no caso do estudo realizado com a oxitetraciclina do que com a tetraciclina. Por outro lado, quando utilizamos o eletrodo Ti/PbO₂ há um maior decaimento do TOC nos ensaios realizados com a tetraciclina a partir da segunda hora de ensaio, embora ao fim das seis horas os resultados sejam muito idênticos para os dois poluentes.
- O decaimento da CQO é semelhante para os dois fármacos, qualquer que seja o ânodo utilizado (Ti/Pt/PbO₂ ou Ti/PbO₂).
- A taxa de remoção do azoto na degradação da tetraciclina é muito baixa, em qualquer dos materiais de ânodo, indicando a formação de algum composto azotado muito resistente à oxidação. No caso da oxitetraciclina, o comportamento é muito distinto nos dois ânodos estudados, verificando-se uma remoção de azoto superior no caso dos ensaios realizados com o Ti/PbO₂.

Foi também analisada a influência da densidade de corrente aplicada no decaimento da concentração das duas tetraciclinas, determinada por HPLC. Neste estudo, observou-se que:

- A degradação eletroquímica com o eletrodo de Ti/PbO₂ conduz a maiores eficiências na eliminação dos dois fármacos estudados.
- Utilizando o Ti/Pt/PbO₂ como ânodo, há um aumento significativo da eficiência na degradação, tanto na tetraciclina como na oxitetraciclina, quando a intensidade de corrente passa de 10 para 20 mA cm⁻². Este comportamento indica que o ânodo platinizado tem tendência para formar à sua superfície filmes passivantes para densidades de corrente inferiores.
- Utilizando o Ti/PbO₂ como ânodo e aumentando a densidade de corrente aplicada de 10 para 20 mA cm⁻² não se observa uma grande vantagem na remoção, pois a eficiência de remoção dos compostos em estudo praticamente não se altera, sendo o excesso de carga consumido em reações paralelas.

Os resultados obtidos por LC-MS permitem concluir que, no caso da tetraciclina, o grupo amida é um dos primeiros grupos a abandonar o composto. No caso da oxitetraciclina este passo é menos evidente.

Para finalizar, e na sequência do trabalho desenvolvido, sugerem-se as seguintes propostas de trabalhos futuros:

- Utilizar uma coluna mais apropriada para a separação de fármacos e dos intermediários formados durante a degradação eletroquímica.
- Identificar os intermediários formados com menos tempo de intervalo e durante um tempo de ensaio superior.
- Repetir os ensaios de LC-MS utilizando o Ti/Pt/PbO₂ como elétrodo e perceber se há diferença nos intermediários formados ou longo do tempo.
- Identificar mais intermediários resultantes da oxidação anódica para perceber a influência das condições experimentais no mecanismo de degradação das tetraciclinas.

Referências

- C. Adams, M. Asce, Y. Wang, K. Loftin, M. Meyer, "Removal of antibiotics from surface and distilled water in conventional water treatment processes". *Journal of Environmental Engineering* 128 (2002) 253 -260
- T. M. Barbosa, S. B. Levy, "The impact of antibiotic use on resistance development and persistence". *Drug Resistance Updates* 3 (2000) 303-311
- I. R. Bautitz, R. F. P. Nogueira, "Degradation of tetracycline by photo-Fenton process-Solar irradiation and matrix effects". *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 187 (2007) 33-39
- P. A. Blackwell, P. Kay, A. B. A. Boxall, "The dissipation and transport of veterinary antibiotics in a sandy loam soil". *Chemosphere* 67 (2007) 292-299
- E. Brillas, B. Boye, I. Sirés, J. A. Garrido, R. M. Rodríguez, C. Arias, P. L. Cabot, C. Comninellis, "Electrochemical destruction of chlorophenoxy herbicides by anodic oxidation and electro-Fenton using a boron-doped diamond electrode". *Electrochimica Acta* 49 (2004) 4487-4496
- E. Brillas, I. Sirés, C. Arias, P. L. Cabot, F. Centellas, R. M. Rodríguez, J. A. Garrido, "Mineralization of paracetamol in aqueous medium by anodic oxidation with a boron-doped diamond electrode". *Chemosphere* 58 (2005) 399-406
- C. I. Brinzila, M. J. Pacheco, L. Ciriaco, R. C. Ciobanu, A. Lopes, " Electrodegradation of tetracycline on BDD anode". *Chemical Engineering Journal* 209 (2012) 54-61
- C. I. Brinzila, N. Monteiro, M. J. Pacheco, L. Ciriaco, I. Siminiceanu, A. Lopes, "Degradation of tetracycline at a boron-doped diamond anode: influence of initial pH, applied current intensity and electrolyte". *Environmental Science and Pollution Research* (2014) (DOI 10.1007/s 11.356-014-2778-y)
- J. M. Britto, M. C. Rangel, "Processos avançados de oxidação de compostos fenólicos em efluentes industriais". *Química Nova* 31 (2008) 114-122
- A. A. Borghi, M. S. A. Palma, "Tetracycline: production, waste treatment and environmental impact assesment". *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 50 (2014) 25-40

R. M. C. Carrijo, J. R. Romero, "Catalytic and electrocatalytic oxidation of organic substrates". *Química Nova* 23 (2000) 400-405

Y. Chen, H. Li, Z. Wang, T. Tao C. Hu, "Photoproducts of tetracycline and oxytetracycline involving self-sensitized oxidation in aqueous solutions: Effects of Ca^{2+} and Mg^{2+} ". *Journal of Environmental Sciences* 23 (2011) 1634-1639

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

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

R. Daghrir, P. Drogui, "Tetracycline antibiotics in the environment: a review". *Environmental Chemistry Letters* 11 (2013) 209-227

A. Eaton, L. Clesceri, A. Greenberg, "Standard Methods for Examination of water and wastewater". American Public Health Association, Estados Unidos 2005

L. Feng, E. D. van Hullebusch, M. A. Rodrigo, G. Esposito, M. A. Oturan, "Removal of residual anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals from aqueous systems by electrochemical advanced oxidation processes". *Chemical Engineering Journal* 228 (2013) 944-964

T. González, J. R. Domínguez, P. Palo, J. Sánchez-Martín, E. M. Cuerda-Correa, "Development and optimization of the BDD-electrochemical oxidation of the antibiotic trimethoprim in aqueous solution". *Desalination* 280 (2011) 197-202

M. H. Khan, H. Bae, J.Y. Jung, "Tetracycline degradation by ozonation in the aqueous phase: Proposed degradation intermediates and pathway". *Journal of Hazardous Materials* 181 (2010) 659-665

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

K. Ikehata, N. J. Naghashkar, M. G. El-Din, "Degradation of aqueous pharmaceuticals by ozonation and advanced oxidation processes: A review". *Ozone: Science and Engineering* 28 (2006) 353-414

E. Isarain-Chavez, R. M. Rodriguez, J. A. Garrido, C. Arias, F. Centellas, P. L. Cabot, E. Brillas, "Degradation of the beta-blocker propranolol by electrochemical advanced oxidation processes

based on Fenton's reaction chemistry using a boron-doped diamond anode". *Electrochimica Acta* 56 (2010) 215-221

A. Jia, Y. Xiao, J. Hu, M. A., S. Kunikane, "Simultaneous determination of tetracyclines and their degradation products in environmental waters by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 4655-4663

J. Jeong, W. Song, W. J. Cooper, J. Jung, J. Greaves, "Degradation of tetracycline antibiotics: Mechanisms and kinetics studies for advanced oxidation/reduction processes". *Chemosphere* 78 (2010) 533-540

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

S. Jiao, S. Zheng, D. Yin, L. Wang, L. Chen, "Aqueous oxytetracycline degradation and the toxicity change of degradation compounds in photoirradiation process". *Journal of Environmental Sciences* 20 (2008) 806-813

O. A. H. Jones, N. Voulvoulis, J. N. Lester, "Human pharmaceuticals in wastewater treatment processes". *Environmental Science and Technology* 35 (2005) 401-427

K. C. Jones, P. Voogt, "Persistent organic pollutants (POP's): state of the science". *Environmental Pollution* 100 (1999) 209-221

M. Klavarioti, D. Mantzavinos, D. Kassinos, "Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes". *Environment International* 35 (2009) 402-417

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

D. F. Laine, I. F. Cheng, "The destruction of organic pollutants under mild reaction conditions: A review". *Microchemical Journal* 85 (2007) 183-193

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

V. M. Mboula, V. Héquet, Y. Gru, R. Colin, Y. Andrès, "Assessment of the efficiency of photocatalysis on tetracycline biodegradation". *Journal of Hazardous Materials* 209 (2012) 355-364

D. Montanarro, E. Petrucci, "Electrochemical treatment of Remazol Brilliant Blue on a boron-doped diamond electrode". *Chemical Engineering Journal* 153 (2009) 138-144

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

M. J. Pacheco, "Óxidos Metálicos Mistos: Síntese caracterização e aplicação na degradação electroquímica de Poluentes orgânicos". Tese de Doutoramento, Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2006

M. Panizza and G. Cerisola, "Electrochemical Degradation of Methyl Red Using BDD and PbO₂ Anodes". *Chemosphere* 47 (2008) 6816-6820

M. Panizza and G. Cerisola, "Direct and mediated anodic oxidation of organic pollutants". *Chemistry Research* 109 (2009) 6541-6569

I. Sirés, P. L. Cabot, F. Centellas, J. A. Garrido, R. M. Rodríguez, C. Arias, E. Brillas, "Electrochemical degradation of clofibric acid in water by anodic oxidation: comparative study with platinum and boron-doped diamond electrodes". *Electrochimica Acta* 52 (2006) 75-85

M. O. Scmitt, S. Scheider "Spectroscopic Investigation of complexation between various Tetracyclines and Mg²⁺ or Ca²⁺". *Physical Chemistry* 3 (2000) 42-55

M. D. Vedenyapina, Yu. N. Eremicheva, V. A. Pavlov, A. A. Vedenyapin, "Electrochemical Degradation of Tetracycline". *Russian Journal of Applied Chemistry* 81 (2008) 800-802

Y. Wang, H. Zhang, L. Chen S. Wang, D. Zhang, "Ozonation combined with ultrasound for the degradation of tetracycline in a rectangular air-lift reactor". *Separation and Purification Technology* 84 (2012) 138-146

J. Wu, H. Zhang, N. Oturan, L. Chen, M. A. Oturan, "Application of response surface methodology to the removal of the antibiotic tetracycline by electrochemical process using carbon-felt cathode and DSA (Ti/RuO₂-IrO₂) anode". *Chemosphere* 87 (2012) 614-620

I. Yahiaoui, F. Aissani-Benissad, F. Fourcade, A. Amrane, "Removal of tetracycline hydrochloride from water based on direct anodic oxidation (Pb/PbO₂ electrode) coupled to activated sludge culture". *Chemical Engineering Journal* 221 (2013) 418-425

H. Zhang, F. Liu, X. G. Wu, J. H. Zhang, D. B. Zhang, "Degradation of tetracycline in aqueous medium by electrochemical method". *Asian-Pacific Journal of Chemical Engineering* 4 (2009) 568-573

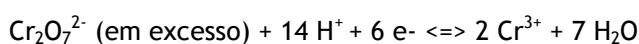
J. Zhu, D. D. Snow, D. A. Cassada, S. J. Monson, R. F. Spalding, "Analysis of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in water using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A* 928 (2001) 177-186

A. Ziylan, N. H. Ince, "The occurrence and fate of anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in sewage and fresh water: Treatability by conventional and non-conventional processes". *Journal of Hazardous Materials* 187 (2011) 24-36

Anexos

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

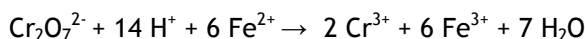
O método utilizado para a determinação da CQO envolveu a oxidação da amostra, em refluxo fechado, por um excesso conhecido de dicromato de potássio, em ácido sulfúrico a 50%, durante duas horas, à temperatura de 148°C (temperatura de refluxo do ácido). Nestas condições, a matéria orgânica suscetível 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):



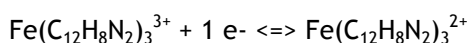
(amarelo)

(verde)

Depois da oxidação, o dicromato em excesso foi titulado utilizando o sulfato ferroso amoniacal (SFA), como titulante, que fornece Fe (II) à solução:



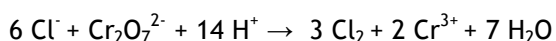
Normalmente, a solução de SFA altera-se com o tempo devido à oxidação pelo oxigênio do ar. É então necessário, uma padronização periódica e uma correção matemática do cálculo da CQO para cada análise. O indicador utilizado, foi uma solução aquosa de ferroína (1,10 - fenantrolina monohidratada e sulfato de ferro heptahidratado). A cor vermelha acastanhada do ponto de equivalência final é devida 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):



(Azul pálido)

(Vermelho acastanhado)

Por vezes existem cloretos nas amostras, e estes interferem na análise sendo também oxidados:



Esta interferência é ultrapassada pela adição de sulfato de mercúrio, que leva a uma complexação do cloreto. A presença de sulfato de prata como catalisador é necessária para a oxidação de álcoois e ácidos de cadeia longa. Se é utilizada uma quantidade insuficiente de sulfato de mercúrio, o excesso de cloreto em solução precipita o catalisador sob a forma de

AgCl levando a valores mais baixos de CQO. A adição de sulfato de prata e de mercúrio à solução de dicromato, aumenta a confiança do método, mas causa outros problemas devido à sua toxicidade.

Normalmente, para avaliar o rigor do método, analisam-se padrões de CQO preparados com hidrogenofalato 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.

Para a determinação experimental da CQO utilizando o método mencionado, em cada tubo de digestão coloca-se 1 cm³ de solução de digestão de dicromato, 1,5 cm³ de amostra e 2 cm³ de solução de ácido sulfúrico / sulfato de prata (6,6 g de Ag₂SO₄ / 1 dm³ de H₂SO₄). Rolham-se bem os tubos e agita-se de modo a homogeneizar a mistura reacional e coloca-se num bloco de digestão a 148°C, deixando-se refluxar durante 2 horas.