



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

MARCOS PEREIRA CAETANO

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO ELETROQUÍMICO NA DEGRADAÇÃO DE
AMOXICILINA E DETERMINAÇÃO DE TOXICIDADE DOS
SUBPRODUTOS GERADOS**

**Goiânia
2019**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ Dissertação ☐ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

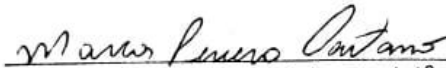
Nome completo do autor: MARCOS PEREIRA CAETANO

Título do trabalho: ANÁLISE DO PROCESSO ELETROQUÍMICO
NA DEGRADAÇÃO DE AMOXICILINA E DETERMINAÇÃO DE TOXICIDADE

3. Informações de acesso ao documento: DOSSUBPRODUTOS GERADOS

Concorda com a liberação total do documento ☐ SIM ☒ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 29/04/19

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o(a) autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do(a) autor(a): MARCOS PEREIRA CAETANO

Título do trabalho: AVALIAÇÃO DO PROCESSO ELETROQUÍMICO NA DEGRADAÇÃO DE AMOXICILINA E DETERMINAÇÃO DE TOXICIDADE DOS SUBPRODUTOS GERADOS

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Independente da concordância com a disponibilização eletrônica, é imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do(a) autor(a)²

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² As assinaturas devem ser originais sendo assinadas no próprio documento. Imagens coladas não serão aceitas.

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: _05_ / _07_ / 22__

MARCOS PEREIRA CAETANO

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO ELETROQUÍMICO NA DEGRADAÇÃO
DE AMOXICILINA E DETERMINAÇÃO DE TOXICIDADE DOS
SUBPRODUTOS GERADOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal de Goiás para obtenção do
Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador(a): ERIC DE SOUZA GIL

**Goiânia
2019**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Caetano, Marcos Pereira
AVALIAÇÃO DO PROCESSO ELETROQUÍMICO NA
DEGRADAÇÃO DE AMOXICILINA E DETERMINAÇÃO DE
TOXICIDADE DOS SUBPRODUTOS GERADOS [manuscrito] /
Marcos Pereira Caetano. - 2019.
13, 67 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Eric de Souza Gil .
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás,
Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Goiânia, 2019.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de figuras, lista
de tabelas.

1. Contaminantes emergentes. 2. remediação eletroquímica. 3.
antibióticos . 4. eletrodo modificado. I. Gil , Eric de Souza , orient. II.
Título.

CDU 615.1

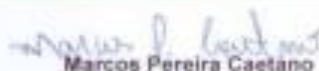


ATA DE SEÇÃO DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE Marcos Pereira Caetano. Na data de 22 de março de 2019, às 10:00 horas, na sala de aula do Programa/Anexo II da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, reuniram-se os membros da Banca Examinadora: Prof. Dr. Eric de Souza Gil (FF/UFG), Dra. Luane Ferreira Garcia (FF/UFG), Prof. Dr. Flávio Comalti Júnior (IQ/UFG) e Profa. Dra. Kátia Alcione Kopp (EECA/UFG) como suplente. Sob a Presidência do Orientador, em sessão pública, procedeu-se à avaliação da defesa da Dissertação intitulada: "Avaliação do processo eletroquímico na degradação de amoxicilina e determinação de toxicidade dos subprodutos gerados", de autoria de Marcos Pereira Caetano, discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFG, no nível de Mestrado. A sessão foi aberta pelo presidente da Banca, Prof. Dr. Eric de Souza Gil, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida ao pós-graduando que, em 35 minutos, apresentou o seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Mestrando, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Ao final, a banca reunida em separado procedeu à avaliação do trabalho. A Dissertação foi considerada APROVADA pela Banca Examinadora, completando integralmente este requisito para fins de obtenção do título de MESTRE em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Goiás, em conformidade com o estabelecido pela Resolução nº 1477/2017, do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura da UFG (CEPEC/UFG), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFG. Para fins de publicação eletrônica, o pós-graduando poderá efetuar as modificações eventualmente sugeridas pela Banca Examinadora e encaminhar à Secretaria do PPGCF, respeitando-se o prazo máximo de 30 dias após a data da Defesa. A conclusão do curso e a emissão do diploma dar-se-ão em conformidade com o estabelecido pela Resolução CEPEC nº 1477/2017. Cumpridas as formalidades de pauta, às 11 horas e 07 minutos, a presidência da banca encerrou esta sessão de defesa de Dissertação e, para constar eu, Fernanda Maura Ferreira Bellato, Secretária do PPGCF/UFG, lavrei a presente Ata que, depois de lida e aprovada, segue assinada pelos membros da Banca Examinadora, em duas vias de igual teor.

Parecer Detalhado da Banca Examinadora

Membro	Aprovado/Reprovado	Assinatura
Prof. Dr. Eric de Souza Gil (FF/UFG) - Presidente	APROVADO	VS
Dra. Luane Ferreira Garcia (FF/UFG)	Exproavado	Luane Ferreira Garcia
Prof. Dr. Flávio Comalti Júnior (IQ/UFG)	Aprovado	Flávio Comalti Jr
Prof. Dr. Kátia Alcione Kopp (EECA/UFG) - Suplente		
Parecer Final	Aprovado/Reprovado	APROVADO

Alteração do título:


Marcos Pereira Caetano



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Matheus Lavorenti Rocha

Goiânia-GO
2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

BANCA EXAMINADORA

Aluno(a): MARCOS PEREIRA CAETANO

Orientador(a): ERIC DE SOUZA GIL

Prof. Dr. Eric De Souza Gil / Presidente

Professor Titular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

Prof. Dr. Flavio Colmat Junior / Membro Titular

Professor Titular do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, IQ/UFG.

Dra. Luane Ferreira Garcia/ Membro Titular

Pós-Doutoranda no Programa Nacional de Pós-Doutorado (PNPD) FF/UFG.

Katia Alcione Kopp / Membro Suplente

Professora Adjunta da Escola de Engenharia Civil e Ambiental da Universidade Federal de Goiás, EECA/UFG.

Data: 22/03/2019

***Dedico este trabalho a Deus,
amigos e familiares.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meu orientador, professor doutor Eric de Souza Gil, os meus sinceros agradecimentos pelos ensinamentos, pela paciência, pela oportunidade concedida em fazer parte de seu grupo de pesquisa.

Agradeço aos meus colegas e amigos do LAFAM, principalmente á Luane, por tornar isto possível, pelas ajudas nas dificuldades e por sempre estarem disponíveis quando necessário.

Agradeço aos meus pais, Marlon Brando e Edna Pereira, pelo amor incondicional, por creditarem em mim e pelo apoio nessa jornada.

Agradeço aos meus irmãos por estarem sempre prontos para me ajudar, incentivar e aconselhar.

Agradeço a minha esposa Jocene, pela paciência, pelo amor, pelo carinho, e por tudo que fez, sempre pronta pra ajudar, aconselhar e me incentivar.

Agradeço a Deus e todos aqueles que acreditaram e torceram pelo meu sucesso.

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 MICROPOLUENTES EMERGENTES E RECURSOS HÍDRICOS.....	1
1.1.1 FÁRMACOS.....	2
1.1.1.1 ANTIBIÓTICOS.....	4
1.1.2.1 AMOXICILINA.....	5
1.2 TRATAMENTOS DE EFLUENTES.....	7
1.2.1 PROCESSOS ELETROQUÍMICOS DE OXIDAÇÃO AVANÇADA(PEOAS).....	9
1.2.3 TRATAMENTO ELETROQUÍMICO.....	9
1.2.3.1 ELETRO-OXIDAÇÃO.....	12
1.3 DEGRADAÇÃO DE AMOXICILINA.....	15
1.4 MONITORAMENTO QUÍMICO E ECOTOXICOLÓGICO.....	16
1.4.1 MONITORAMENTO QUÍMICO.....	17
1.4.2 MONITORAMENTO ECOTOXICOLÓGICO.....	18
1.4.2.1 ENSAIO DE TOXICIDADE COM LARVAS E EMBRIÕES DE ZEBRAFISH.....	19
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3 METODOLOGIA.....	23
3.1 FÁRMACO AMOXICILINA (AMX).....	23
3.2 ELETRO-OXIDAÇÃO (EO).....	23
3.3 TESTE DE TOXICIDADE ESTENDIDA.....	24
3.4 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA	26
3.5 ANÁLISE DEGRADAÇÃO DA AMOXICILINA.....	26
3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	27

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
4 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	28
5. CONCLUSÃO.....	53
6. REFERÊNCIAS.....	54
ANEXOS E APÊNDICES	61

	Figuras	Página
Figura 1.	Principais rotas de contaminação ambiental por fármacos	03
Figura 2.	Estrutura química dos principais grupos betalactâmicos.	05
Figura 3.	Classificação do tratamento de efluentes.	08
Figura 4.	Processo de eletrocoagulação.	11
Figura 5.	Oxidação direta e indireta.	13
Figura 6.	Oxidação eletroquímica de compostos orgânicos com eletrodos ativos e não ativos.	14
Figura 7.	Oxidação eletroquímica de amoxicilina.	16
Figura 8.	Ciclo de vida do <i>Danio rerio</i> (zebrafish).	20
Figura 9.	Esquema representativo da eletro-oxidação.	24
Figura 10.	Teste de toxicidade estendida de embriões de peixe.	25

	Tabelas	
Tabela 1.	Produtos farmacêuticos detectados em efluentes.	04
Tabela 2.	Formas de eliminação de alguns antibióticos.	06
Tabela 3.	Uso da eletroquímica na degradação de fármacos.	12
Tabela 4.	Diferentes tipos de ânodos.	14

Anexos

Anexo 1.	Normas para publicação do artigo 1.	66
Anexo 2.	Parecer do comitê de ética.	67

Apêndice

Artigo 1.	Electrochemical remediation of amoxicillin: detoxification and reduction of antimicrobial activity.	68
-----------	---	----

ARTIGO 1

	Figuras	Página
Figure 1.	(A) Survival rate of zebrafish life stages exposed to different AMX concentrations (mg/L) and analyzed at 96, 120, 144 and 168 h. (B) Effects of AMX on the body length of zebrafish larvae (μm) after 168 h of exposure. Bars represent mean $\pm$ SEM of three independent tests. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ statistically different from the negative control (NC; reconstituted water).	38
Figure 2.	Levels of (A) catalase (CAT), (B) glutathione S-transferase (GST) and (C) lactate dehydrogenase (LDH) activity in zebrafish larvae after 168 h of exposure to AMX expressed as mean values $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ and *** $p < 0.001$ statistically different from the negative control (NC; reconstituted water).	39
Figure 3.	Variation of pH, temperature and voltage during the EO of AMX in 0.1M of Na_2SO_4 with anodes of carbon cylinder (A), titanium wire (B) and $\text{TiO}_2@\text{C}$ (C).	41
Figure 4.	(A) EO of AMX in 0.1 M Na_2SO_4 with different anodes. (B) Percentage of AMX removal after 10 min EO treatment with anode $\text{TiO}_2@\text{C}$ using different supporting electrolysis.	42
Figure 5.	(A) Differential pulse voltammograms obtained with vitreous carbon electrode in relation to optimum pH (B) AMX before and after EO on Na_2SO_4 (C) or NaCl support electrolytes.	43
Figure 6.	Mass spectrometry Q-TOF ESI(+) obtained before (A) and after (B) treatment of AMX in Na_2SO_4 with $\text{TiO}_2@\text{C}$ anode after 10 minutes of EO.	44

Figure 7.	(A) Survival rate of zebrafish early-life stage exposed to EO of AMX using TiO ₂ @C electrode with different electrolytes (tap water; NaCl at 0.01M and 0.1M; Na ₂ SO ₄ at 0.1 M) for 24, 48, 72 and 96 h. (B) Effects of different electrolytes used in EO of AMX on the body length of zebrafish larvae (μm) after 96 h of exposure. Bars represent mean values ± SEM of three tests. *p < 0.05 and ***p < 0.0001 statistically different from the respective negative control.	45
-----------	--	----

Figure 8.	Representative photomicrographs of the main abnormalities in zebrafish early-lifestage induced by EO of AMX using TiO ₂ @C electrode with Na ₂ SO ₄ and NaCl at 0.1 M during 96 h. NC: embryo control; YE: yolk sac edema; BA: blood accumulation; YS: delayed yolk sac absorption, and PE: pericardial edema.	46
-----------	---	----

Tabelas

Table 1.	Variation of pH, temperature and current to AMX remediation after 10 minutes treatment with anode TiO ₂ @C using different electrolytes.	41
Table 2.	Malformations rate in zebrafish early-life stage induced by EO of AMX using TiO ₂ @C electrode with 0.1 M Na ₂ SO ₄ and 0.1 M NaCl after 48, 72, and 96 h of exposure expressed as mean values ± SEM of three independent tests. YE: yolk sac edema; BA: blood accumulation; PE: pericardial edema and YS: delayed yolk sac absorption.	46
Table 3.	Minimum inhibitory concentration of standard strains in contact with AMX before and after EO using TiO ₂ @C electrode with 0.01 M NaCl by 10 minutes.	47

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

Símbolo, sigla ou abreviatura

Significado

AMX	Amoxicilina
SUS	Sistema Único de Saúde
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
CTO	Carbono total orgânico
PEOAS	Processos eletroquímicos oxidativos avançados
POA	Processos oxidativos avançados
OH	Radical hidroxila
EO	Oxidação eletroquímica ou eletro-oxidação
RDO	Reação de desprendimento de oxigênio
Ti	Titânio
DDB	Diamante dopado com boro
C	Carbono
TiO ₂ @ C	Carbono modificado com óxido de titânio
CE50	Concentração efetiva
CIM	Concentração inibitória mínima
FEET	Teste de toxicidade estendida de embriões de peixe
DPF	Dias pós-fertilização
CN	Controle negativo
HPF	Horas pós-fertilização
FET	Teste de toxicidade aguda por embriões de peixe
CAT	Catalase
GST	Glutathione-S-transferase
LDH	Lactato desidrogenase
FPM	Fração sobrenadante pós-mitocondrial
VPD	Voltametria de pulso diferencial
CIM	Concentração inibitória mínima

AVALIAÇÃO DO PROCESSO ELETROQUÍMICO NA DEGRADAÇÃO DE AMOXICILINA E DETERMINAÇÃO DE TOXICIDADE DOS SUBPRODUTOS GERADOS

RESUMO

Introdução: A amoxicilina (AMX) é um dos antibióticos mais prescritos mundialmente para o tratamento e profilaxia de infecções bacterianas, tanto na medicina humana quanto na veterinária. A remoção incompleta desse fármaco, durante o tratamento de águas residuais tem atraído a atenção de vários pesquisadores, devido aos riscos de sua bioacumulação e consequente resistência bacteriana. A eletroremediação de fármacos é de grande valia no âmbito ambiental, visto que métodos eletroquímicos possuem diversas vantagens, quando comparados às ferramentas comumente empregadas no tratamento de efluentes farmacêuticos e urbanos. **Objetivo:** Avaliar a eficiência do processo eletroquímico na degradação de AMX, utilizando diferentes meios eletrolíticos e eletrodos, bem como investigar os efeitos adversos do antibiótico antes e após a remediação eletroquímica. **Metodologia:** Os ensaios eletroquímicos foram realizados em três meios eletrolíticos (água da torneira, soluções de Na_2SO_4 ou NaCl) e três ânodos (carbono [C], titânio [Ti] e carbono modificado com óxido de titânio [$\text{TiO}_2\text{@C}$]). As amostras analisadas antes e após a eletro-oxidação, foram monitoradas por UV-visível, espectrometria de massa e voltametria de pulso diferencial. Após o processo de eletro-oxidação, as soluções de AMX tratadas foram analisadas pelo teste de ecotoxicidade com *Danio rerio* (zebrafish; paulistinha) e calculado a concentração inibitória mínima para determinar o potencial antimicrobiano após o tratamento. **Resultados e discussões:** O ânodo de carbono modificado com óxido de titânio [$\text{TiO}_2\text{ @ C}$] apresentou alta eficiência, levando à remoção completa de amoxicilina em menos de 10 minutos, na ordem: [$\text{TiO}_2\text{ @ C}$] > [Ti] > [C]. A eficiência dos eletrólitos suporte ocorreu na seguinte ordem: NaCl 0,1 M > Na_2SO_4 > NaCl 0,01M > água da torneira. A amoxicilina não induziu mortalidade significativa do zebrafish durante a exposição a longo prazo. **Conclusões:** A eletrooxidação da amoxicilina usando eletrodo de $\text{TiO}_2\text{@C}$ em solução de NaCl 0,01 M foi capaz de diminuir a atividade antimicrobiana da amoxicilina. Em altas concentração de eletrólito suporte há um aumento na taxa de remoção fármaco, no entanto por não ser o habitat natural do zebrafish tornou-se tóxico. A técnica mostrou ser eficiente na degradação da amoxicilina e provavelmente pode ser aplicada a outros poluentes orgânicos.

Palavras-Chave: Contaminantes emergentes, remediação eletroquímica, antibióticos e eletrodo modificado.

Agradecimentos: NEPET, CEPB, CNPq e FAPEG.

EVALUATION OF THE ELECTROCHEMICAL PROCESS IN AMOXICILLIN DEGRADATION AND DETERMINATION OF TOXICITY OF GENERATED BY-PRODUCTS

ABSTRACT

Introduction: Amoxicillin (AMX) is one of the world's most widely prescribed antibiotics for the treatment and prophylaxis of bacterial infections, in both human and veterinary medicine. The incomplete removal of this drug during the treatment of wastewater has attracted the attention of several researchers due to the risks of its bioaccumulation and consequent bacterial resistance. The electroremediation of drugs is of great value in the environmental scope, since electrochemical methods have several advantages when compared to the tools commonly used in the treatment of pharmaceutical and urban effluents. **Objective:** To evaluate the efficiency of the electrochemical process in the degradation of AMX using different electrolytic media and electrodes, as well as to investigate the adverse effects of the antibiotic before and after the electrochemical remediation. **Methodology:** The electrochemical tests were performed in three electrolytic media (tap water, Na₂SO₄ or NaCl solutions) and three anodes (carbon [C], titanium [Ti] and carbon modified with titanium oxide [TiO₂ @ C]). The samples analyzed before and after the electro-oxidation were monitored by UV-visible, mass spectrometry and differential pulse voltammetry. After the electrooxidation process, the treated AMX solutions were analyzed by the ecotoxicity test with *Danio rerio* (zebrafish; paulistinha) and the minimum inhibitory concentration was calculated to determine the antimicrobial potential after treatment. **Results and discussion:** The titanium oxide modified carbon anode [TiO₂ - C]) showed high efficiency, leading to the complete removal of amoxicillin in less than 10 minutes, in the order: [TiO₂ @ C] > [Ti] > [C]. The dose of the electrolytes is supported in the following order: 0.1 M NaCl > Na₂SO₄ > 0.01 M NaCl > tap water. Amoxicillin does not pulse cardiac impressive of zebrafish during long term exposure. **Conclusions:** The electrooxidation of amoxicillin using TiO₂ electrode in 0.01 M NaCl solution was able to decrease the antimicrobial activity of amoxicillin. At a high concentration of electrolyte, there is an increase in the rate of drug removal, there is why it is not the habitat that the zebrafish has become a toxic environment. The technique has been serious in the degradation of amoxicillin and can be applied to other organic pollutants. **Keywords:** Emerging pollutants, electrochemical remediation, antibiotics and modified electrode.

1.1 MICROPOPUESTES EMERGENTES E RECURSOS HÍDRICOS

A contaminação ambiental é uma preocupação mundial que aumenta a cada ano, uma vez que há descarga de compostos químicos no ambiente aquático e no terrestre levando a uma grave destruição ecológica, afetando também a saúde humana. De forma que identificar e avaliar a toxicidade do poluente é importante para a proteção dos ecossistemas naturais. Muitos contaminantes emergentes (CE) tem sido encontrados nas águas superficiais, e isto representa um risco para os organismos aquáticos e o abastecimento humano. Notadamente, no Brasil que é um país rico em recursos hídricos, mas possui problemas relacionados ao tratamento de efluentes (LLORCA et al., 2016).

Contaminantes emergentes (CE) são compostos recém-descritos na literatura, que tem sido detectados em efluentes industriais, esgotos, águas brutas, superficiais e subterrâneas e em águas tratadas. São compostos químicos utilizados diariamente em diferentes segmentos industriais, tais como fármacos, hormônios, praguicidas, produtos de higiene pessoal e que podem causar diversos problemas para saúde humana e animal (STUART et al., 2012; SAUVÉ; DESROSIERS, 2014; TEIXEIRA et al., 2018).

No Brasil, a precariedade do saneamento básico, principalmente de coleta e tratamento de esgoto sanitário, é um grande desafio. Dados do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS 2016) revelam que apenas 44,92% dos esgotos do país são tratados, sendo que nas 100 maiores cidades brasileiras o tratamento dos esgotos representam apenas 50,26%. No estado de Goiás (Figura 1) o tratamento de esgoto representa apenas 49% do esgoto coletado (TRATABRASIL 2018). Diante desse cenário, a presença de CE se torna cada vez mais evidente, e o risco de contaminação ambiental cada vez maior em todos os níveis tróficos da cadeia alimentar (CRANE, WATTS, BOUCARD, 2006).

Estudos indicam que muitos CE são considerados cancerígenos e disruptores endócrinos, levando à alterações hormonais, comportamentais e bioquímicas de

organismos aquáticos, além de comprometer o crescimento de insetos e invertebrados (FLOATE et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2018).

1.1.1 Fármacos

Fármaco é uma estrutura química conhecida capaz de mudar uma função fisiológica já existente, cuja presença no ambiente aquático pode resultar em efeitos aditivos, potencializadores, sinérgicos ou antagônicos, afetando diferentes organismos e resultando no desequilíbrio de sua população (FENT, WESTON, CAMINADA, 2006). A presença de fármacos no ambiente aquático é um fato preocupante e desafiador, pois demonstra que as tecnologias convencionais de tratamento não têm apresentado a eficiência necessária para a remoção desses contaminantes (SONG et al., 2016).

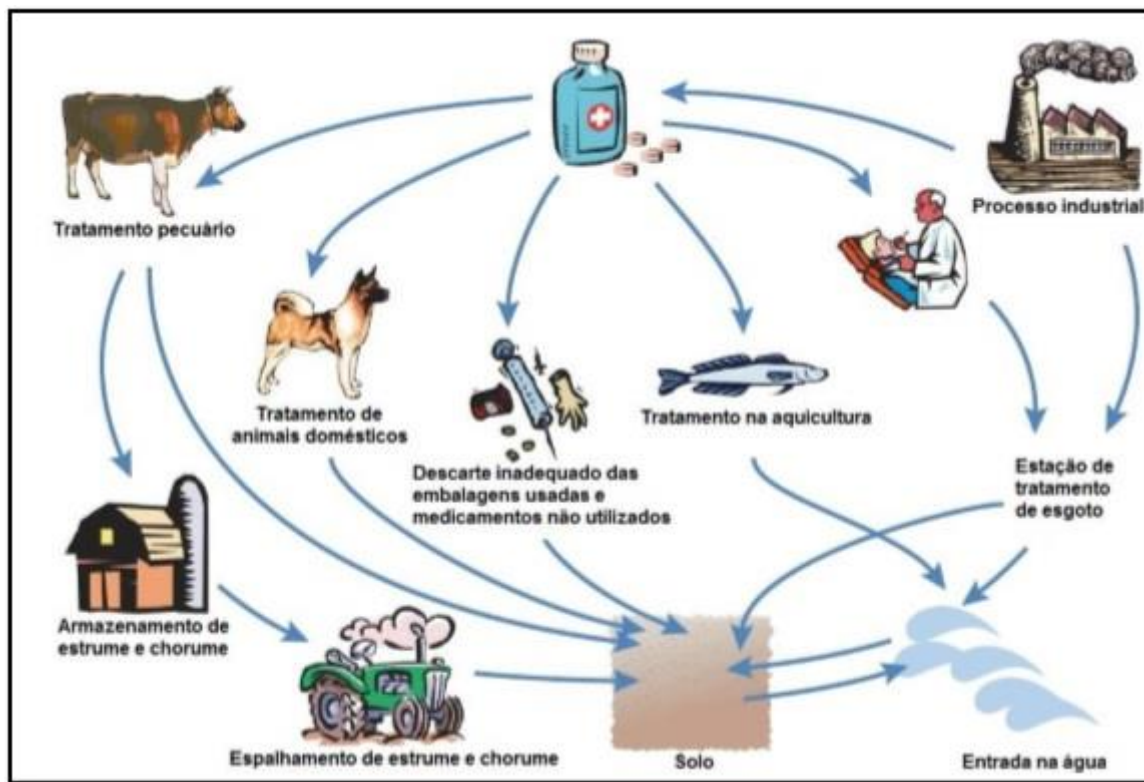
No mundo são produzidas toneladas de fármacos e insumos farmacêuticos para utilização na medicina humana e veterinária (GIRI, PAL, 2014; AGUNBIADE MOODLEY, 2014). Fármacos, em geral, são moléculas de baixa biodegradabilidade e alta resistência, características que favorecem seu transporte, bioacumulação e persistência em ambientes aquáticos. Em decorrência dos poucos estudos sobre os efeitos dessas substâncias no meio ambiente, principalmente na biota aquática, ainda não existem legislações para regulamentar seu lançamento nos corpos hídricos (CRANE, WATTS, BOUCARD, 2006).

A liberação contínua de fármacos como antibióticos e seus metabólitos no meio ambiente, principalmente nos recursos hídricos, ainda que em concentrações baixas ($\mu\text{g/L}$ - ng/L), oferece risco de bioacumulação e efeitos crônicos de resistência bacteriana a longo prazo (SONG et al., 2016; AMÉRICO et al., 2013; LLORCA et al., 2016). Nesse sentido, é imperativo que a presença de antibióticos como cefalexina, amoxicilina, ofloxacina e eritromicina em efluentes industriais e domésticos seja monitorada e alvo de atenção tanto do poder público, quanto dos pesquisadores (MINH et al., 2009).

As rotas de entrada dos fármacos no meio ambiente se dão de forma direta ou indireta (Figura 1), direta se dá através do descarte incorreto de medicamentos nas pias, lixo comum e vaso sanitário, forma indireta através de excretas humanas e de animais, bem como pelo lançamento de efluente industrial gerado pelas indústrias

farmacêuticas durante seus processos produtivos (SONG et al., 2016; DÍAZ-CRUZ; LOPEZ; BARCELO, 2003).

Figura 1 – Principais rotas de contaminação ambiental por fármacos.



Fonte: Adaptado de BOXALL, 2004.

O destino de fármacos ao atingir o ambiente aquático é: (I) o composto ser mineralizado a dióxido de carbono e água, (II) o composto não ser degradado, porque é lipofílico e ficar retido no lodo ativado através da sedimentação, (III) o composto ser metabolizado, a molécula adquire característica hidrofílica, atravessa a estação de tratamento e atinge corpos receptores (KLAVARIOTI; MANTZAVINOS; KASSINOS, 2009; JAMES et al., 2016).

Dentre os fármacos potencialmente impactantes monitorados estão os antibióticos (Tabela 1).

Tabela 1- Produtos farmacêuticos detectados em efluentes.

Classe	Substância	Concentração	Referência
Antibióticos	Ofloxacino	2340 ng/L	CHANG et al., 2010
	Ciprofloxacino	148 ng/L	ZUCCATO et al., 2010
	Vancomicina	29 ng/L	ZUCCATO et al., 2010
	Norfloxacino	140 ng/L	CHANG et al., 2010
	Eritromicina	172 ng/L	SIM et al., 2011
Analgésicos	Codeína	1.0 ng/L	SIM et al., 2011
Anti-inflamatórios	Cetoprofeno	25 ng/L	BOXALL, 2004
	Acido acetil salicílico	2260 ng/L	MIGOWSKA et al. 2012
	Nimesulida	12 ng/L	IDE, 2014
	Naproxeno	1550 ng/L	CALDAS et al., 2013
Anti-hipertensivos	Atenolol	1260 ng/L	BISOGNIN, WOLFF, CARISSIMI 2018
	Propanolol	0.51 ng/L	WILDE, KUMMERER, MARTINS, 2012
	Metoprolol	1270 ng/L	BISOGNIN, WOLFF, CARISSIMI 2018
			WILDE, KUMMERER, MARTINS, 2012
Estrogênios	Estrona	5062 ng/L	TEIXEIRA et al., 2018
	17 β estradiol	4191 ng/L	TEIXEIRA et al., 2018

1.1.1.1 Antibióticos

Os antibióticos são substâncias capazes de inibir o crescimento de bactérias. Aqueles que são capazes de causar a morte das bactérias são chamados de bactericidas enquanto aqueles que promovem a inibição do crescimento microbiano são conhecidos como bacteriostáticos (GUIMARAES, MOMESSO, PUPO, 2010). Podem ser classificados em diferentes grupos tais como: betalactâmicos, quinolonas, tetraciclinas, aminoglicosídeos, macrolídeos, sulfonaminas dentre outros (KÜMMERER, 2009).

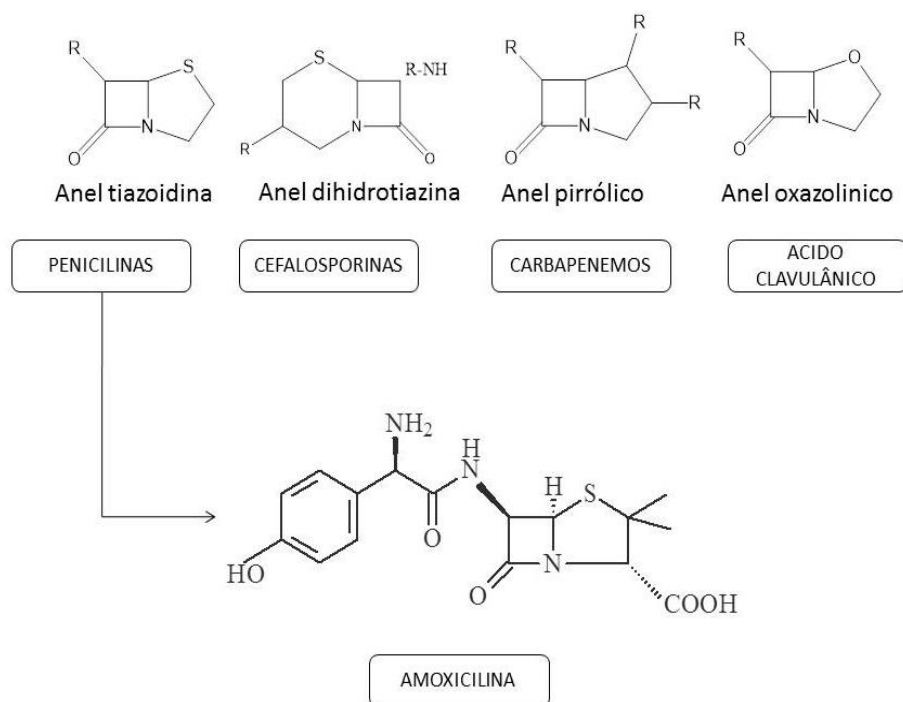
Os beta-lactâmicos são os mais prescritos na clínica médica, pois exibem amplo espectro de ação, segurança e eficácia clínica. Tais fármacos tem seu mecanismo de ação no bloqueio da síntese de peptídeoglicano, cuja função é preservar a integridade da parede celular, onde qualquer tipo de inibição, mutação ou degradação da biossíntese resultará em lise celular, exercendo assim ação bacteriolítica (FERNANDES, AMADOR, PRUDÊNCIO, 2013). O anel beta-lactâmico determina seu mecanismo de ação, pois inibem irreversivelmente a enzima transpeptidase responsável pela síntese do peptídeoglicano. Da mesma maneira, esse mecanismo é responsável pela baixa toxicidade direta, visto que estes fármacos atuam na parede celular de células bacterianas, e essas não estão presentes no homem (SUAREZ e GUDIOL, 2009).

No Brasil a venda de antibióticos foi cerca de seis bilhões de unidades entre 2007 e 2011. A amoxicilina (AMX) é o antibiótico mais prescrito pelo sistema único de saúde (SUS) bem como o privado. Os antibióticos representam 12% de todas as prescrições ambulatoriais (MAGALHÃES, BORSCHIVER, 2012). Nesse sentido, é possível afirmar que os antibióticos estão entre as classes terapêuticas mais vendidas mundialmente e uma fonte importante contaminante ambiental.

1.1.2.1 Amoxicilina

A amoxicilina ou quimicamente D-(-)-alfa-amino p-hidroxibenzil penicilina é uma aminopenicilina semissintética do grupo beta-lactâmico (Figura 2) de ação tanto em bactérias gram-positivas como em gram-negativas. A família dos beta-lactâmicos é formada por penicilinas, cefalosporinas e monobactams além dos inibidores das beta-lactamases (SUAREZ e GUDIOL, 2009). O anel beta-lactâmico pode estar ligado a outros grupos funcionais como o anel tiazolidina denominados de penicilinas, anel dihidrotiazina chamado de cefalosporinas ou anel pirrólico designado carbapenemos e os monobactams que não possuem anel fundido ao principal, como observado abaixo (WILKE et al, 2005).

Figura 2- Estrutura química dos principais grupos betalactâmicos.



Fonte: Próprio Autor.

Os fármacos uma vez administrados passam por quatro fases: absorção, distribuição, metabolização e excreção. A metabolização é o processo que busca inativar o medicamento, tendo como objetivo aumentar a solubilidade e com isso eliminá-lo mais facilmente. Este processo acontece em duas fases:

- Fase I – Presença de reações químicas como: oxidação, redução e hidrólise na presença de importantes enzimas como: citocromo p450 esterases e amidases.
- Fase II – Fase de conjugação com substâncias endógenas como: ácido glicurônico, sulfato, glutathione, aminoácidos ou acetatos endógenos (PÉREZ-PARADA et al., 2011).

O metabolismo dos betalactâmicos quase não ocorre (Tabela 2), estes se mantêm na forma ativa até sua eliminação, que em sua maioria é efetuada pela via renal (CARBALLEIRA et al., 2012). Assim devido a esta característica, frequentemente tem sido encontrado AMX em sistemas hídricos, o que pode provocar graves efeitos adversos na vida aquática e danos à saúde humana e animal (ONESIOS, YU, BOUWER, 2009; PÉREZ-PARADA et al., 2011).

Tabela 2- Formas de eliminação alguns antibióticos.

Beta-Lactâmico	Via de Administração	Eliminação Urinária (%)	Eliminação Biliar (%)
Penicilina G	IM; IV	60-85	0,12
Amoxicilina	Oral; IM; IV	80	5-10
Ampicilina	Oral; IM; IV	85	20
Cefalotina	IM	50-70	0

Fonte: CARBALLEIRA et al., 2012.

Nota: IM intramuscular; IV intravenoso.

Os antibióticos são uma importante classe de fármacos para o aumento da expectativa de vida dos seres humanos, bem como para o aumento da produção de alimentos. Por isso há uma grande preocupação com a presença deste fármaco nos recursos hídricos, decorrente de sua persistência química, resistência microbiana e efeitos sinérgicos, uma vez que 80% do fármaco é excretado em sua forma inalterada. O uso indiscriminado, o descarte inadequado e a ineficiência dos sistemas de tratamento de efluente podem provocar o aparecimento de bactérias resistentes inviabilizando o tratamento do paciente. Nesse sentido, doses sub-letais

em ambientes aquáticos podem exercer o mesmo impacto (PÉREZ-PARADA et al., 2011).

As informações disponíveis na literatura sobre os efeitos potenciais da AMX na vida aquática são escassos, uma vez que na maioria dos casos o antibiótico é associado a valores de $EC_{50} > 1000$ mg/L (Concentração Efetiva), o que indica baixa toxicidade. De fato a concentração máxima de AMX encontrada em sistemas aquáticos é de 6,94 µg/L, mas a principal preocupação é relacionada à exposição a longo prazo, devido à possibilidade de causar resistência bacteriana (MINH et al., 2009). Portanto, o tratamento de efluentes industriais e domésticos contendo estas substâncias requer uma atenção maior e um tratamento específico, com o objetivo de reduzir ao máximo a presença desta classe terapêutica no meio ambiente.

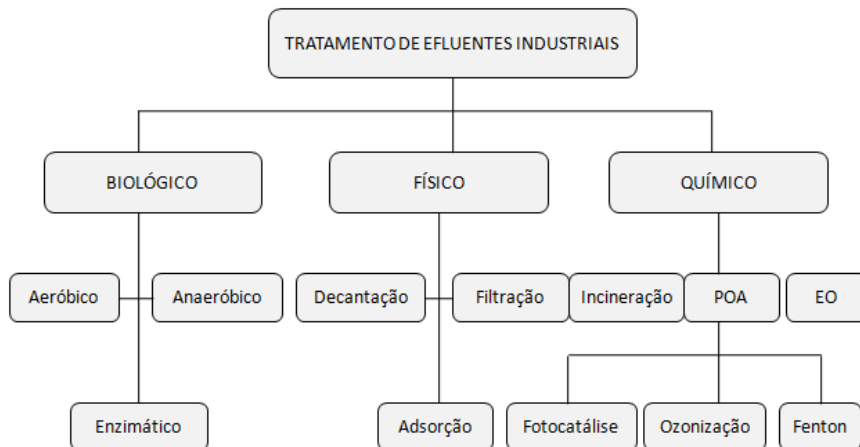
1.2 TRATAMENTOS DE EFLUENTES

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) e Unicef, 2015 estima-se que apenas 68% da população mundial têm acesso ao saneamento básico, ainda são 2,4 bilhões de pessoas vivendo sem saneamento, ou seja 7 pessoas em cada 10 vivendo sem saneamento adequado.

No Brasil a estimativa é que apenas 51% da população tem acesso a coleta de esgoto e desse total coletado, uma porcentagem ainda menor recebe algum tipo de tratamento antes de ser lançado nos recursos hídricos (TRATABRASIL 2018). Cenário este, que é agravado pela precária infraestrutura, falta de investimentos e fiscalização (TERNES; JOSS; SIEGRIST, 2004).

Um sistema de tratamento é constituído de diversas operações e processos, que são empregadas na remoção ou transformação de moléculas complexas em simples. Os processos de tratamento de efluentes podem ser classificados em biológicos, físicos ou químicos (Figura 3).

Figura 3. Classificação do tratamento de efluentes.



Fonte: Adaptado de Freire, 2000.

O tratamento biológico depende da ação de microorganismos anaeróbicos e aeróbicos. A principal aplicação deste processo está orientada na remoção da matéria orgânica presente em dejetos industriais, que pode ser medida na forma de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO) ou carbono orgânico total (COT) (FREIRE, 2000).

Processos físicos são caracterizados pela remoção de substâncias ou microorganismos por separação ou dispersão, por exemplo: a remoção de sólidos flutuantes, filtração dos efluentes, remoção de sólidos decantáveis, diluição e homogenização dos efluentes (PHILLIPI; ROMÉRIO; BRUNA, 2004). Os processos físicos, apenas removem o contaminante por separação ou o dispersam, sem destruí-los, de modo que os mesmos podem persistir e retornar ao ambiente (MASCOLO et al., 2010).

O processo químico é aquele onde se faz necessário o uso de um produto químico para aumentar a eficiência de remoção de uma determinada substância, modificar seu estado, estrutura ou característica química. Alguns métodos incluem coagulação, filtração, ozonificação, processos eletroquímicos, oxidação química, cloração, neutralização. O processo químico de oxidação é o mais usado na remoção de compostos orgânicos (PHILLIPI; ROMÉRIO; BRUNA, 2004; PÉREZ-PARADA et al., 2011).

Os tratamentos clássicos carecem de atualização e diversificação de técnicas, haja vista que os resíduos produzidos pelas indústrias atuais necessitam de um tratamento mais efetivo e específico. Como por exemplo, o tratamento de efluentes contendo compostos orgânicos persistentes, a oxidação biológica é certamente a mais barata, todavia a presença de moléculas tóxicas pode dificultar esse processo.

Efluentes industriais geralmente contêm compostos orgânicos não biodegradáveis como: pesticidas, solventes halogenados, hidrocarbonetos alifáticos clorados, fármacos dentre outros, o que requer tecnologias de tratamento adequadas, buscando minimizar os impactos ambientais, já que são compostos de difícil degradação (MORENO-CASILLAS et al., 2007; MINH et al., 2009).

Assim, no que tange às questões ambientais, é imprescindível o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis para o tratamento de efluentes industriais e domésticos, dentre as quais se destaca as técnicas emergentes ou inovadoras não convencionais (ARAUJO et al., 2016).

1.2.1 Processos Eletroquímicos de Oxidação Avançada (PEOAs)

Nos últimos anos, os PEOAs tem ganhado destaque no desenvolvimento de tecnologias para tratamento de águas residuais, são métodos eficientes e que reduzem os impactos ambientais. Neste contexto a oxidação eletroquímica é uma solução alternativa para muitos problemas ambientais, por ser versátil, econômica e substitui reagentes químicos por fluxo de elétrons, ditos reagentes limpos (PANIZZA, CERISOLA 2009). Portanto uma abordagem descentralizada que emprega uma combinação de unidades e técnicas de tratamento vem ganhando maior destaque. O tratamento descentralizado permite flexibilidade na gestão e uso de tecnologias simples ou avançadas.

1.2.3 Tratamento eletroquímico

A oxidação eletroquímica é um dos processos químicos que apresenta maior vantagem em relação a outros métodos, pois o tratamento é realizado unicamente pela transferência de elétrons sem reagentes químicos. O uso da eletricidade para o tratamento de água foi sugerido desde 1989 na Inglaterra (ROCHA et al., 2009).

Métodos não convencionais de tratamento de efluentes vêm desempenhando um papel importante por ser plurivalente, tanto no modo operacional quanto na eficiência da remoção de CE, com especial destaque para as técnicas eletroquímicas. Os métodos eletroquímicos para tratamento de efluentes podem ser divididos em:

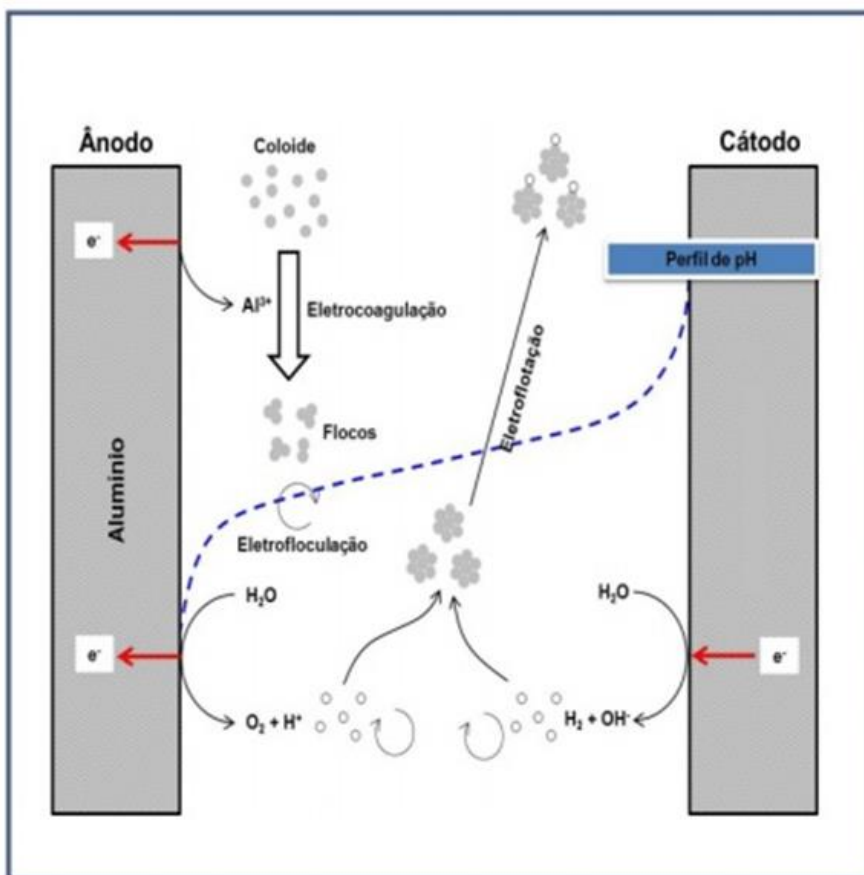
- (I) Métodos físico-químicos: eletrodialise, eletrocoagulação e eletroadSORÇÃO.
- (II) Métodos químicos: processos eletroquímicos de oxidação avançada (PEOAs) como: eletrooxidação, eletro-fenton, fotoeletro-fenton, sonoeletroquímico, sonoeletro-fenton e etc...
- (III) Métodos biológicos: remediação bio-eletroquímica

As técnicas mais empregadas para tal fim são: eletro-oxidação, eletrocoagulação e eletrofloculação (SIREs e BRILLAS, 2011; ARAUJO et al, 2016).

A eletrocoagulação (Figura 4) é uma técnica que se baseia na passagem de corrente pela água e envolve fenômenos físicos e químicos. Utilizam-se eletrodos para fornecer íons para a solução, que é capaz de remover partículas dissolvidas, sólidos suspensos e óleos da solução aquosa. O coagulante é gerado *“in situ”* pela oxidação do ânodo, que promove a remoção do poluente por adsorção, aprisionamento, neutralização de carga ou complexação (KOBAYASHI et al., 2006).

A corrente elétrica aplicada entre os eletrodos gera o agente coagulante no ânodo e bolhas de gás hidrogênio no cátodo, O_2 e H_2 são formados pela hidrólise da água, estes alcançam a superfície por arraste dos flocos formados pelas impurezas e promovem a clarificação do efluente (eletroflotação), o hidrogênio formado auxilia na flotação das partículas floculadas. O agente coagulante é formado pela dissolução elétrica de íons de alumínio ou ferro gerados pelos respectivos eletrodos, estes coagulam os contaminantes de forma similar à adição de coagulantes químicos tal como sulfato de alumínio e cloreto férrico (SENGIL e ÖZACAR, 2006).

Figura 4 - Processo de eletrocoagulação.



Fonte: Adaptado de Marcionilio, Barros & León 2015.

Este método apresenta algumas vantagens como: separação mais rápida e efetiva da matéria orgânica que na coagulação, o coagulante gerado é altamente puro e menos lodo produzido. No entanto apresenta desvantagens consideráveis no que tange a passivação do ânodo, em situações de deposição excessiva de lodo nos eletrodos inibindo o processo eletroquímico.

Por outro lado, os PEOAs apresentam-se promissores, por serem capazes de produzir o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) agente oxidante, com alto poder de redução ($E^\circ(\bullet\text{OH}/\text{H}_2\text{O}) = 2.8 \text{ V}$), sendo capaz de reagir com uma vasta gama de poluentes orgânicos persistentes e gerar derivados hidroxilados ou halogenados para conversão em CO_2 , promovendo a mineralização do poluente.

Uma das vantagens desta técnica é a possibilidade de aplicação em diversos tipos sistemas incluindo: meios concentrados ou diluídos, líquidos e sólidos. Em geral, apresentam boa eficiência energética, fácil automação e ótima relação custo/benefício (CHEN, 2004; ESPINOZA et al., 2014).

A oxidação eletroquímica ou oxidação ânodica (OE) tem sido empregada em vários estudos no tratamento de produtos farmacêuticos em efluentes como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3. Uso da eletroquímica na degradação de fármacos.

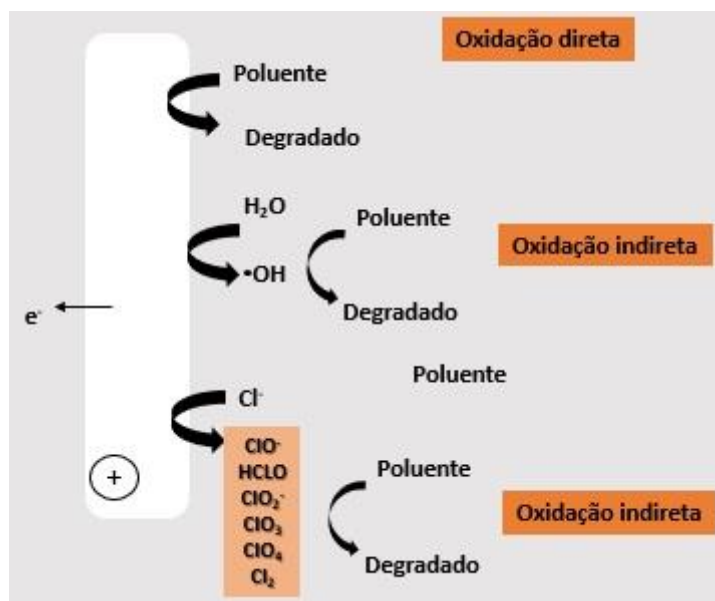
Classe terapêutica	Técnica	Referência
Anti-Hipertensivos	Eletro-oxidação	CONTRERAS et al., 2015.
Medicamentos Veterinários	Eletro-oxidação	ESPINOZA et al., 2014
Antibióticos	Eletro-oxidação	QUAND-MEME et al., 2015; PANIZZAET al., 2014; SOPAJ et al., 2015; SANTOS et al., 2013; PADILLA-ROBLES et al., 2015.
Anti-inflamatórios	Eletrocoagulação	CHOU et al., 2011.

1.2.3.1 Eletro-oxidação

A oxidação eletroquímica é um processo que acontece no ânodo onde há geração de oxigênio ativo fisicamente adsorvido (radicais hidroxila $\bullet\text{OH}$) ou quimicamente adsorvido (oxigênio em estrutura de óxido $\text{MO}_x + 1$ na superfície do eletrodo).

Dois mecanismos diferentes na EO são responsáveis pela remoção de poluentes (Figura 5): (i) eletrólise direta ou oxidação direta, onde há troca de elétrons diretamente com a superfície do ânodo sem envolvimento de outras substâncias e (ii) eletrólise indireta, que ocorre via mediadores produzidos na superfície do ânodo como: cloro, hipoclorito, radicais hidroxila, ozônio e peróxido de hidrogênio. Nesta situação os poluentes orgânicos não realizam troca de elétrons diretamente com a superfície do eletrodo, mas sim através da mediação das espécies eletroativas geradas no meio reacional, que atuam como intermediários para o transporte de elétrons entre o eletrodo e os compostos orgânicos (SIREs e BRILLAS, 2012).

Figura 5- Oxidação Direta e Indireta.



Fonte: Próprio autor.

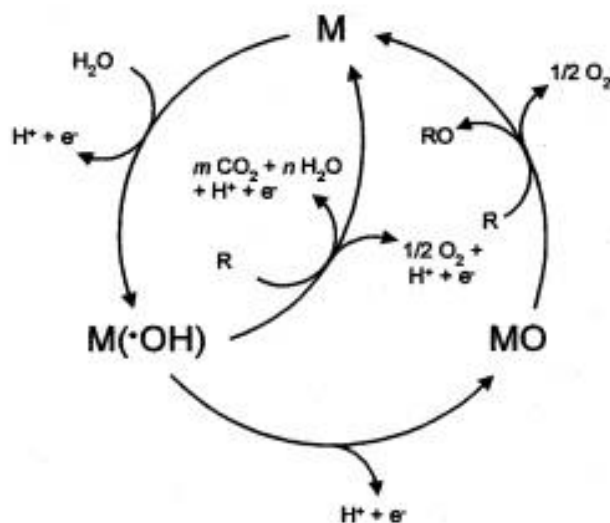
A existência da oxidação indireta permite duas abordagens para a redução de poluição das águas residuárias por EO:

(I) Conversão eletroquímica, na qual os compostos são transformados em compostos biodegradáveis como ácidos carboxílicos por quimissorção do oxigênio ativo.

(II) Combustão eletroquímica, onde os produtos são mineralizados por adsorção física do $\cdot OH$, isto ocorre quando os compostos orgânicos são oxidados a CO_2 e íons inorgânicos, com OH adsorvido fisicamente.

Assim, de acordo com o mecanismo de ação os ânodos se dividem em: ânodos ativos e não ativos (Figura 6). Em relação ao ânodo não ativo - o ânodo (M) oxida a água, que leva à formação do radical hidroxila adsorvido na superfície ($M(\cdot OH)$). O ($\cdot OH$) pode reagir com contaminantes não orgânicos (R), gerando radical orgânico ($R\cdot$), este na presença de oxigênio ou hidroxilas gera produtos oxidados. No caso de ânodos ativos esse radical interage fortemente com a superfície do ânodo que é transformada em oxigênio ativo, o ânodo MO leva a oxidação do poluente.

Figura 6 – Oxidação eletroquímica de compostos orgânicos com eletrodos ativos e não ativos.



Fonte: SIRES e BRILLAS, 2012.

Os ânodos ativos são: eletrodos constituídos de grafite, Pt, RuO_2 , IrO_2 , e ligas à base de Ti (titânio), ânodos não ativos podem ser: DDB (Diamante dopado com Boro) e PbO_2 . Apesar da alta eficiência de alguns eletrodos, o DDB e Ti / PbO_2 , têm seu custo e risco de contaminação por metais pesados devido à lixiviação química de metais do ânodo, os tornam inviáveis na aplicação prática. Assim, o uso de eletrodos modificados de óxido de carbono e titânio pode ser uma alternativa de redução de custos e aumento da segurança ambiental (GANIYU et al., 2016; PANIZZA, CERISOLA 2009).

Na Tabela 4 são descritos os tipos de ânodos, suas vantagens e desvantagens.

Tabela 4: Diferentes tipos de ânodos.

Ânodos	Vantagens	Desvantagens
Não ativos		
PbO_2	Boa eficiência de corrente, baixo custo.	Tóxico, pode sofrer corrosão.
DDB	Boa condutividade e estabilidade.	Muito caro.
Ativos		
Ti	Boa estabilidade	Muito caro.
Pt	Inerte	Muito caro.

Fonte: FRONTIS et al., 2016; SÄRKKÄ, H.; BHATNAGAR, A.; SILLANPÄÄ, 2015.

Alguns parâmetros operacionais são importantes para a otimização do método na EO como: o material do eletrodo, o eletrólito suporte, a corrente aplicada, pH inicial e matéria orgânica. Portanto os eletrodos devem apresentar resistência

física, resistência aos eletrólitos usados e a corrente elétrica, pois ele possui forte influência na eficiência do processo de conversão e combustão eletroquímica.

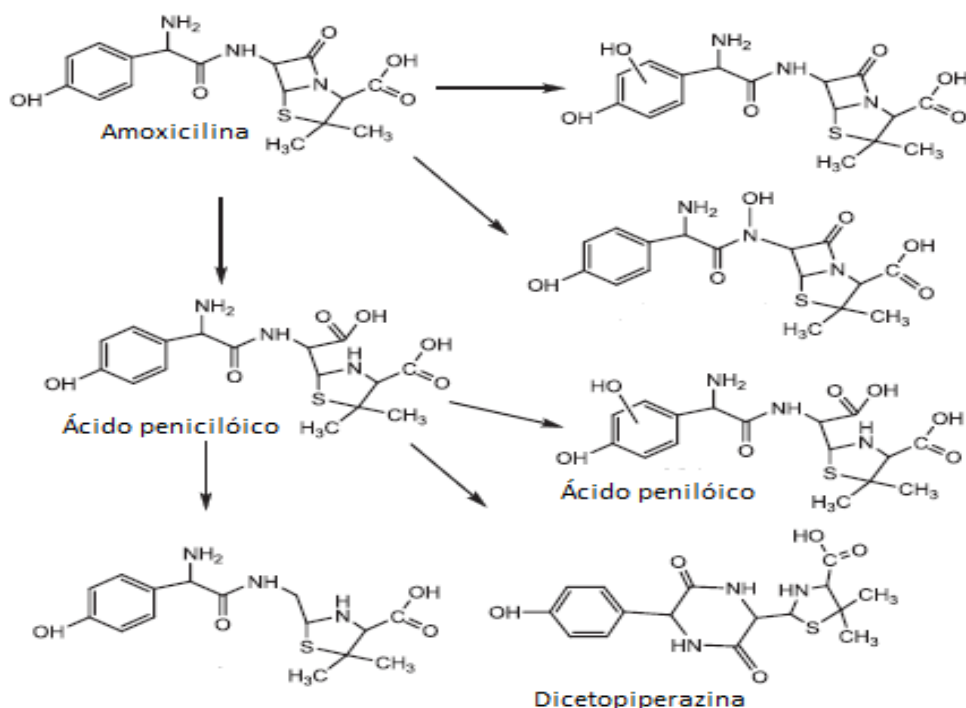
Neste sentido esforços consideráveis foram feitos neste trabalho, para desenvolver novas estratégias de remediação para AMX (com diferentes eletrodos carbono [C], titânio [Ti] e carbono modificado com óxido de titânio [TiO₂ @ C]).

1.3 DEGRADAÇÃO DA AMOXICILINA

Os antibióticos betalactâmicos, em questão a AMX, têm sido bastante estudados, em decorrência da alta taxa de vendas em todo mundo. Alguns estudos afirmam que estes antibióticos não são biodegradáveis, ou podem permanecer inalterados ao passarem pelas estações de tratamento de água e esgoto. A estrutura da AMX apresenta uma hidroxila ligada a um anel aromático, que concede uma estrutura de grande estabilidade e difícil oxidação, além de ter em sua composição grupos amida e tiazol, indicando a necessidade processos mais reativos para promover sua degradação, como o radical hidroxila, que tem alto poder oxidante e promove a degradação de compostos poluentes de forma rápida, levando a mineralização do contaminante químico (AY e KARGI, 2010).

A oxidação eletroquímica de uma amostra comercial de amoxicilina utilizando eletrodo DDB, durante 240 min, densidade de corrente de 40 mA/cm², com 4 g/L NaCl, pH 6,7 foi descrita por FRONTIS et al., (2016) e segue o mecanismo de oxidação apresentado na Figura 7.

Figura 7- Oxidação eletroquímica de amoxicilina.



Fonte: Adaptado de FRONTIS et al., 2016.

As etapas foram divididas em:

- I. Hidroxilação no anel benzóico.
- II. A abertura do anel betalactâmico seguido por descarboxilação, hidroxilação e reorganização;
- III. E clivagem da ligação entre os carbonos dos grupos amino e amida. Além disso, o processo é acompanhado pela liberação de vários íons isto é, nitrato, sulfato e amônio (FRONTIS et al., 2016).

Os produtos de degradação formados como: ácido penicílico, ácido penicílico e dicetopiperazina são produtos de hidrólise bem documentados e também já foram detectados em amostras ambientais (HIRTE et al., 2016; NAGELE e MORITZ, 2005). Muitos trabalhos abordam apenas a remoção do princípio ativo antibiótico e não consideram a biodegradação dos metabólitos e produtos intermediários (ONESIOS, YU, BOUWER, 2009).

1.4 MONITORAMENTO QUÍMICO E ECOTOXICOLÓGICO

Em prol da qualidade ambiental e de vida, monitorar substâncias recalcitrantes de origem antrópica tem se tornado cada mais mais necessário e importante. Parâmetros físico-químicos, biológico e testes complementares como os ecotoxicológicos via biomonitoramento tem sido desenvolvidos, aprimorados e aplicados para tal (BISOGNIN et al., 2018).

O biomonitoramento busca a realização de testes de toxicidade que avaliam o estresse sofrido pelos organismos, resultante da exposição aos contaminantes presentes no meio (ULUKAYA; ACILAN; YILMAZ, 2011). No Brasil esta abordagem vem sendo implantada por universidades, institutos de pesquisas, órgãos governamentais e indústrias. Sua metodologia inclui o uso de organismos aquáticos como: algas, plantas aquáticas, rotíferos, ciliados, microcrustáceos, bactérias e peixes, cujo testes de toxicidade, permitem avaliar os efeitos que as substâncias provocam na qualidade da água, sedimento e organismos vivos. Os testes de toxicidade são de caráter ecotóxicológico, pois permitem avaliar o potencial tóxico dos poluentes lançados e que os efeitos deletérios aos organismos aquáticos, possam ser conhecidos, além de avaliar a eficiência dos sistemas de tratamento (OLIVEIRA et al., 2013).

1.4.1 Monitoramento Químico

Métodos para avaliação de toxicidade de efluentes industriais são ferramentas importantes na prevenção, caracterização e controle de poluição. (NAGEL, 2002; SCHOLZ et al., 2013). Neste trabalho utilizamos alguns métodos para análise de degradação do fármaco sendo: espectrometria UV-visível, espectrometria de massa e voltametria de pulso diferencial (VPD), na qual foi possível avaliar a taxa de remoção do poluente no meio.

Métodos eletroanalíticos utilizam-se de propriedades elétricas dos analitos, como corrente, resistência, potencial, condutividade, presente na amostra, isto fornece dados qualitativos e quantitativos da amostra de interesse (GONÇALVES et al., 2011). A voltametria técnica eletroquímica, utiliza dos fenômenos que ocorrem entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina formada pela solução. Assim, as informações são obtidas por meio da medida da magnitude da corrente

que surge entre os eletrodos de trabalho e auxiliar, quando aplicado uma diferença de potencial entre os eletrodos de trabalho e referência, logo se a matriz contém compostos eletroativos, haverá transferência de elétrons sendo mensurado. Tais técnicas trazem vantagens como, sensibilidade, rapidez, pouca instrumentação, utilização de pequenos volumes de amostras, se mostrando melhores que ensaios espectrofotométricos (OLIVEIRA-NETO et al., 2016; GIL; MELO 2011). Dentre as técnicas mais utilizadas encontra-se a voltametria de pulso diferencial.

A espectrofotometria faz parte da classe dos métodos analíticos que baseiam-se na interação da matéria com a energia radiante. A espectroscopia no ultravioleta visível, utiliza-se da luz na faixa visível do ultravioleta, e do infravermelho (BORBA et al., 2013).

A maioria das moléculas orgânicas e grupos funcionais são transparentes nas regiões do espectro eletromagnético chamados de ultravioleta (UV) e visível (VIS), nessas faixas de energia as moléculas sofrem transições eletrônicas que resulta em absorção de radiação eletromagnética nessa região do espectro. Portanto para obter informação sobre a absorção de uma amostra, basta inseri-lá no caminho óptico do aparelho e a luz UV ou VIS é passada por ela, o espectrofotômetro mede a quantidade de luz absorvida. O espectro é apresentado em um gráfico (plotagem) da absorbância versus comprimento de onda na faixa UV ou VIS. Este método analítico apresenta boa sensibilidade e fácil operação (CALAÇA; STETS; NAGATA 2011).

Espectometria de massas é uma técnica analítica valiosa em que moléculas em uma amostra são convertidas em íons em fase gasosa, que são subsequentemente separados no espectrômetro de massa de acordo com sua razão massa (m) sobre a carga (z), m/z . O espectro de massa mostra a abundância (intensidade) relativa de cada íons que aparece como picos com m/z definidos (LANÇAS, 2009). Tanto a espectrometria UV-visível, espectrometria de massa e voltametria de pulso diferencial são métodos bastante utilizados na quantificação e detecção de substâncias (MORENO-CASILLAS et al., 2007).

1.4.2 Monitoramento Ecotoxicológico

Métodos para avaliação de toxicidade de efluentes industriais são ferramentas importantes na prevenção, caracterização e controle de poluição. Uma estratégia eficiente se dá no uso integrado de análises físicas, químicas e ecotoxicológicas. Com relação a estas medidas os ensaios de ecotoxicidade representam um avanço na proteção e recuperação de mananciais. A aplicação de testes de toxicidade na análise ambiental é bastante importante à medida que cresce a complexidade das transformações químicas no meio ambiente (NAGEL, 2002; SCHOLZ et al., 2013; MORENO-CASILLAS et al., 2007).

Se considerarmos a quantidade de substâncias lançadas no ambiente aquático, as análises físicas e químicas não são suficientes para determinar os efeitos tóxicos que estas substâncias podem causar a biota, desta forma o uso das análises ecotoxicológicas é uma importante ferramenta na avaliação da toxicidade frente a organismos aquáticos. A ecotoxicologia aquática estuda os efeitos adversos de elementos químicos a vida aquática (NAGEL, 2002; SCHOLZ et al., 2013).

1.4.2.1 Ensaio de toxicidade com larvas e embriões de zebrafish

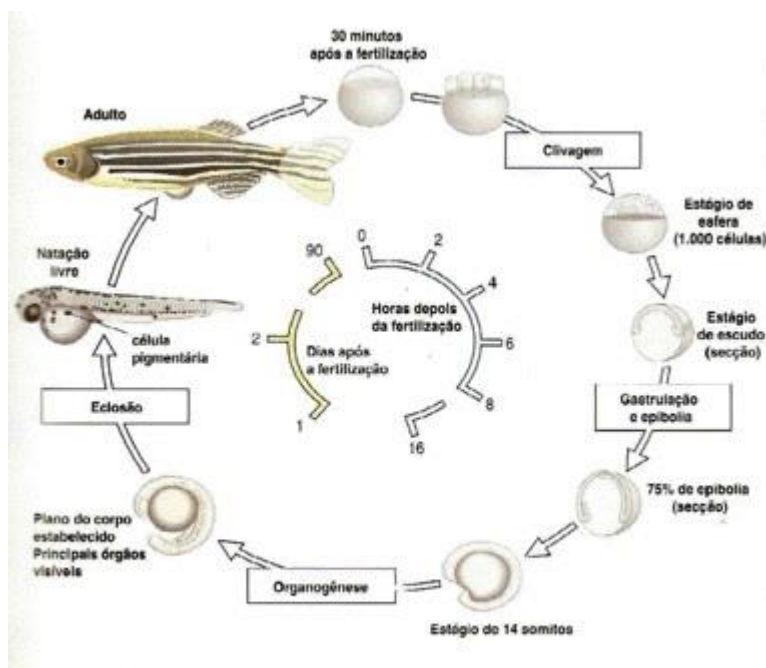
O uso de peixes tem se apresentado como um excelente modelo experimental na determinação de toxidade aguda ou crônica, isto porque eles respondem com maior sensibilidade do que os invertebrados, além de ser fonte de alimento para os seres humanos podendo interferir na saúde humana. A avaliação de riscos ambientais pode ser realizada através de testes com embriões de peixes uma vez que são extremamente sensíveis a agentes químicos (ULUKAYA; ACILAN; YILMAZ, 2011).

O *Danio rerio* comumente conhecido como zebrafish (Hamilton-Buchanan, 1822) é um peixe de água doce que pertence à classe dos teleósteos, apontado em vários estudos como organismo modelo em estudos de biologia, genética, fisiologia e estudos ecotoxicológicos, apresenta algumas vantagens como: rápida embriogênese, grande número de descendentes e genoma sequenciado. Logo é viável selecionar parâmetros e observar fatores que podem estar relacionados com a exposição tóxica (NAGEL, 2002; SCHOLZ et al., 2013).

Os embriões de zebrafish sobrevivem até sete dias pós-fertilização (dpf), sem ingestão de alimento, dependendo do saco vitelínico como fonte de nutriente, por isso, a exposição aguda é limitada há 96 horas onde ocorre a fase embrio-larval. O estagio larval inicia-se após a eclosão do ovo que ocorre de 2 a 3 dpf. Em aproximadamente cinco dias pós-fertilização a organogênese dos principais órgãos é concluída podendo viver até cinco anos (LAMMER et al., 2009).

O teste com embriões permite avaliar diversos parâmetros, letais e subletais relacionados à sobrevivência e o desenvolvimento do peixe, assim como parâmetros bioquímicos através da determinação de biomarcadores enzimáticos. Alguns parâmetros são úteis como preditores de toxicidade (Figura 8) e incluem: alterações na expressão gênica, alterações comportamentais, anomalias morfológicas e avaliação de órgãos alvos (DI PAOLO et al., 2015).

Figura 8- Ciclo de vida do *Danio rerio* (zebrafish).



Fonte: D'Costa e Shepherd (2009).

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficiência de remoção da AMX por eletro-oxidação com diferentes eletrólitos e eletrodos e determinar o potencial de ecotoxicidade dos produtos de degradação gerados.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o desempenho de eletrodos de carbono (C), titânio (Ti) e carbono modificado com óxido de titânio (TiO₂@C) no processo de eletro-oxidação da AMX;
- Avaliar variáveis como pH, temperatura e densidade de corrente durante os processos de eletro-oxidação da AMX;
- Avaliar a eficiência de remoção da AMX via eletro-oxidação utilizando água de torneira, NaCl ou Na₂SO₄ como eletrólitos de suporte;
- Realizar estudos da AMX por espectrometria UV-visível, espectrometria de massa e voltametria de pulso diferencial para as condições de eletro-oxidação que apresentarem melhor eficiência;
- Realizar teste de ecotoxicidade da AMX utilizando embriões de peixe *Danio rerio* (zebrafish) , antes a após a eletro-oxidação;
- Calcular a concentração inibitória mínima (CIM) para determinar o potencial antimicrobiano da AMX antes e após a eletro-oxidação.

3 MÉTODO(S)

3.1 FÁRMACO AMOXICILINA (AMX)

O fármaco utilizado foi a amoxicilina trihidratada (AMX; CAS: 61336-70-7; 98,7%) que foi adquirida na Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA).

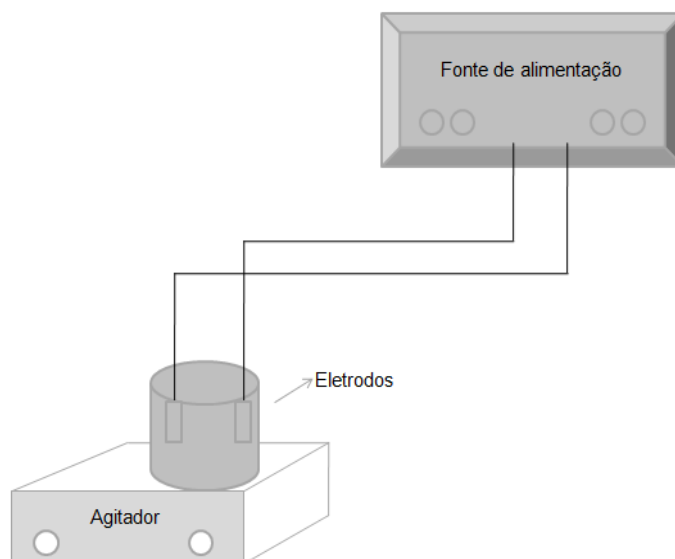
Para avaliar a eficiência da remediação eletroquímica, foi preparada uma solução de AMX a 12 mg/L com diferentes eletrólitos suporte: 0.1 M de Na₂SO₄, 0.01 e 0.1 M de NaCl ou água de torneira.

Para determinar a atividade antimicrobiana antes e após o processo EO, uma solução-mãe de AMX a 1200 mg/L foi preparada em água deionizada.

3.2 ELETRO-OXIDAÇÃO (EO)

Os ânodos utilizados para EO foram cilindro de carbono (C; 3.5 x 0.5, comprimento x diâmetro cm; área geométrica = 5.89 cm²), fio de titânio (TiO; 10.0 x 0.2, comprimento x diâmetro cm; área geométrica = 6.34 cm²) e C modificado (TiO₂@C; 3.0 x 0.5, comprimento x diâmetro cm; área geométrica = 5.10 cm²). O cátodo usado era fio de aço (10.0 x 0.3, comprimento x diâmetro cm; área geométrica = 9.56 cm²) em formato espiral. O espaço exato entre eletrodos, entre o ânodo e o cátodo, foi de 4 cm. A tensão aplicada foi controlada por um Tensiômetro, consistindo em uma Fonte de Alimentação DC ajustável (HF-30035, Hikari, São Paulo, SP, Brasil), usando constante 10 V e corrente ou 50 mA além de avaliar a tensão criada (Figura 9).

Figura 9 - Esquema representativo da eletro-oxidação.



Fonte: Próprio autor.

Os eletrodos C modificados ($\text{TiO}_2\text{@C}$) foram preparados com ânodos do cilindro de carbono (C) imersos em 1 ml de solução de isopropóxido de titânio (IV) e 3.5 mL de etanol. A deposição de microondas foi realizada em um modelo Cem-Discover, com controle de PC. As experiências foram conduzidas num recipiente fechado sob agitação contínua e sem arrefecimento. A temperatura foi o controle a 120 °C, o que limitou a reação de deposição. A irradiação de potência e a pressão foram estabelecidas a 220 W e 220 PSI respectivamente (CAMPELO et al., 2008).

A Eletro-oxidação de AMX foi realizada em béquer com tempos de 10, 20 e 40 minutos, com agitação constante e protegido da luz. No final de cada tempo de tratamento, o pH e a temperatura da solução foram determinados por medidor de pH (Quimis Scientific Apparatus, modelo Q488AS, Diadema, SP, Brasil). Os ensaios foram realizados em duplicata.

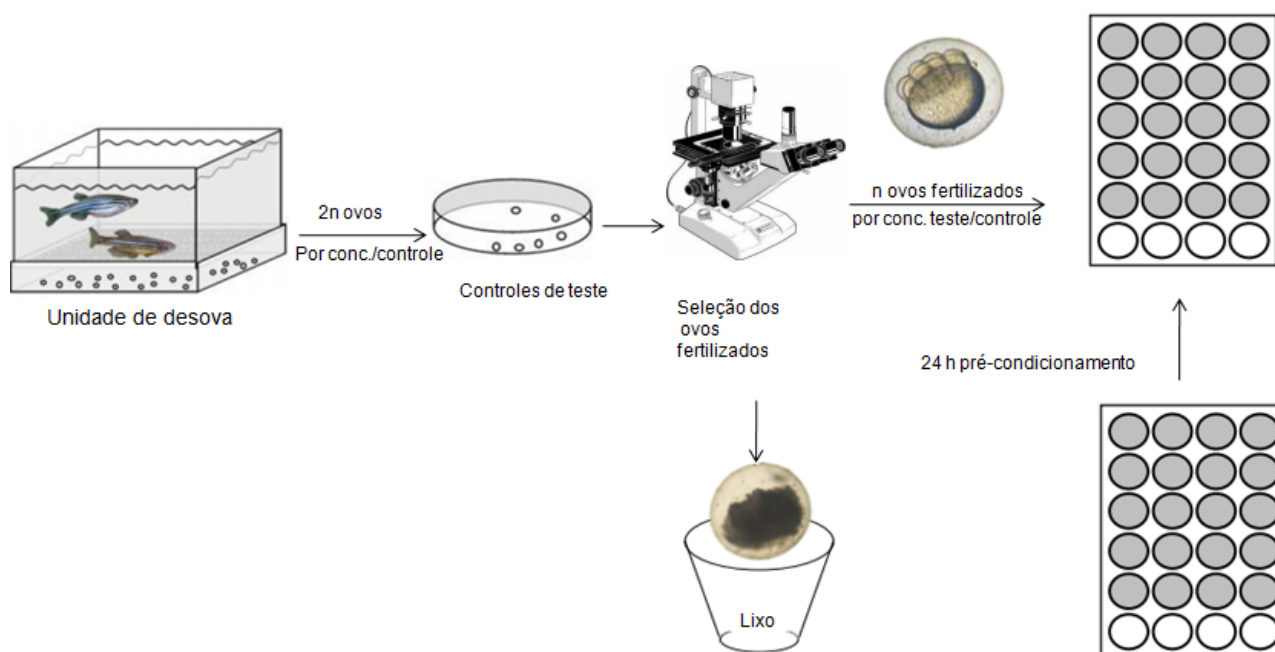
3.3 TESTE DE TOXICIDADE ESTENDIDA

O zebrafish adulto masculino e feminino (*D. rerio*) foi fornecido pelas instalações de zebrafish no Instituto de Biologia da Universidade de Brasília e mantido em tanques separados (aprovação ética UFG Nº 102/2014). Os peixes foram mantidos em um sistema de recirculação Rack Hydrus (Alesco), utilizando água filtrada por osmose reversa, esta é desinfetada por luz UV e ajustada automaticamente para pH e condutividade. A temperatura é mantida a $26.0 \pm 1^\circ\text{C}$, condutividade a $750 \pm 50 \mu\text{S}$, pH a 7.5 ± 0.5 e o

oxigênio dissolvido igual ou superior a 95% de saturação. Nitrato, nitrito e amônia são monitorados regularmente. Como mencionado acima, esta água foi utilizada na preparação das soluções de teste de todos os ensaios realizados. No teste, os ovos do zebrafish foram coletados cerca de 30 minutos após o acasalamento natural, enxaguados em água e examinados sob um estereomicroscópio (Bel Photonics STM PRO). Os ovos não fertilizados ou danificados foram descartados. O sucesso da fertilização foi verificado, e apenas foram utilizados lotes de ovos com uma taxa mínima de fertilização de 90%.

O teste de toxicidade do embrião de peixe com zebrafish (*D. rerio*) foi realizado de acordo com a diretriz da OCDE 236 (figura 10) com tempo de exposição prolongado durante 7 dias pós-fertilização (dpf) para avaliar os efeitos subcrônicos de AMX em estádios iniciais da zebrafish. Vinte ovos fertilizados por concentração foram selecionados aleatoriamente e cuidadosamente distribuídos para uma placa de 24 poços, preenchidos com 2 mL de diferentes concentrações de AMX (0.75, 1.5, 3.0, 6.25, 12, 25, 50 e 100 mg/L) ou negativo controle (CN, água de manutenção) e controle positivo (PC: 3.4-dicloroanilina a 4.0 mg/L). O teste foi realizado em triplicado em uma câmara climática a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e luz 12 h.

Figura 10- Teste de toxicidade estendida de embriões de peixe.



Fonte: Adaptado de OECD 236.

Nem a comida nem a ração foram fornecidas durante os ensaios. O desenvolvimento do embrião foi avaliado às 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas pós-fertilização (hpf) usando um estereomicroscópio. A distinção entre desenvolvimento

normal e anormal de embriões foi estabelecida de acordo com as descrições de desenvolvimento do zebrafish relatadas por Kimmel et al.,(1995). Os parâmetros letais (coagulação do ovo, formação sem somito, falta de separação da cauda do saco vitelino e sem batimento cardíaco) e subletais (efeitos na pigmentação do olho e do corpo, absorção do saco vitelino, taxa de incubação, inflação da bexiga natatória, otólito, presença de edemas e acumulação de sangue, deformidades da cauda e comprimento do corpo) foram observados e relatados.

3.4 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

O teste foi realizado de acordo com a diretriz da OCDE 236 com algumas modificações. Vinte ovos fertilizados por concentração foram selecionados aleatoriamente e cuidadosamente distribuídos para uma placa de 96 poços, preenchida com 200 µL de EO de diferentes AMX, com diferentes eletrólitos de suporte: 0.1 M de Na₂SO₄; 0.01, 0.1 M de NaCl, água da torneira ou controle negativo (CN, água de manutenção). Os testes foram realizados em triplicata em uma câmara climática a 26 ± 1 ° C e 12h de luz. O desenvolvimento de membrana foi avaliado a 24, 48, 72 e 96 h, utilizando um estereomicroscópio (BEL PHOTONICS STM 800).

3.5 ANÁLISE DEGRADAÇÃO DA AMOXICILINA

A degradação de AMX foi monitorada por espectrometria UV-Vis, voltametria de pulso diferencial (VPD) e espectrometria de massa. As medições espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro UV-visível (Quimis Scientific Apparatus, modelo Q798U2VS, Diadema, SP, Brasil) acoplado ao software de aplicação Unico (S2100 Series UV / Vis). Os espectros foram escaneados de 200 a 1000 nm. Para calcular a porcentagem de remoção de AMX (Equação 1), a área de pico obtida em 230 nm para AMX antes e depois dos tratamentos foi calculado no software Origin® 8.

$$\% \text{ de remoção de AMX} = [(A_{\text{pdrAMX}} - A_{\text{tratAMX}}) / A_{\text{pdrAMX}}] \times 100 \quad (1)$$

Onde A_{pdrAMX} é área de pico de AMX 12 mg / L e A_{tratAMX} é área de pico de AMX após EO.

As medidas de voltametria de pulso diferencial (VPD) foram realizadas com um potenciostato / galvanostato µ Autolab III® integrado com o software GPES 4.9® (Eco-Chemie, Utrecht, Holanda). Para análise foram utilizadas células eletroquímicas com 0,5

mL de tampão de fosfato de sódio 0.05 M (pH 8) e 0.5 mL de solução de AMX antes e após o tratamento e três sistemas de eletrodos: carbono vítreo (eletrodo de trabalho), fio de platina (contra eletrodo) e Ag / AgCl / KCl 3M (eletrodo de referência) (adquirido a soluções de laboratório, São Paulo, Brasil). As condições experimentais para VPD foram: amplitude de pulso 50 mV, largura de pulso 0.5 s e taxa de varredura de 10 mV s⁻¹, todas realizadas a temperatura ambiente.

A análise de espectrometria de massa foi realizada em um espectrômetro de massa microTOF III (Brucker Daltonics, Bremen, Alemanha), equipado com um ESI comercial (Brucker Daltonics, Bremen, Alemanha). As análises foram realizadas por infusão direta (3µL/min.) Após extração em metanol e ácido fórmico 1 mM. Todas as análises foram realizadas no modo positivo. As condições de origem ESI (+) foram as seguintes: gás nitrogênio nebulizador com temperatura de 200°C, pressão de 0,4 bar; gás de secagem de 4 L/min; tensão capilar de -4 kV; Transfira temperatura capilar de 180 °C; offset da placa final de -500 V; skimmer de 35 V e tensão de colisão de -1,5 V. Cada espectro foi adquirido usando 2 microscans e processado com software de análise de dados (Brucker Daltonics, Bremen, Alemanha).

3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de AMX, antes e depois do processo EO, foi realizada com a solução obtida da degradação de AMX por EO com o ânodo TiO₂@C com 0.01 M de NaCl por 10 minutos.

A Técnica de Microdiluição de Caldo, de acordo com o manual "Padrões de Desempenho para Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana", proposto pelo Laboratório Clínico e Instituto de Padrões, foi utilizada.

Os microorganismos utilizados foram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922.

As placas de microdiluição foram incubadas a 37°C por 18-24 h e os resultados foram observados com solução a 0.5% de cloreto trifeniltetrazólio.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o GraphPad Prism® (versão 5.0, GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) para a análise estatística de FEET, determinação de biomarcadores e teste FET. As comparações entre diferentes grupos de exposição experimental foram realizadas com

ANOVA unidirecional seguido dos múltiplos testes de comparação de Dunnett. Cada valor experimental foi comparado ao seu controle correspondente. O significado estatístico foi aceito quando a probabilidade de o resultado assumir a hipótese nula (p) foi inferior a 0,05.

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados referentes a esta dissertação estão na forma de artigo, e seguem nesta sessão, seguindo as normas da revista Journal of Chemico-Biological Interactions dispostas nos anexo.

Artigo 1: **Electrochemical remediation of amoxicillin: detoxification and reduction of antimicrobial activity.**

Autores: Lara Barroso Brito, Luane Ferreira Garcia, Marcos Pereira Caetano, Germán Sanz Lobón, Mayk Teles de Oliveira, Rhaul de Oliveira, Ieda Maria Sapateiro Torresa, Alfonso Yepez, Boniek Gontijo Vaz, Rafael Luque, Cesar Koppe Grisolia, Marize Campos Valadares, Eric de Souza Gil, Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira.

Situação: aceito, publicado.

Artigo 1

Electrochemical remediation of amoxicillin: detoxification and reduction of antimicrobial activity

Lara Barroso Brito^{a,1}, Luane Ferreira Garcia^{a,1}, Marcos Pereira Caetano^a, Germán Sanz Lobón^b,
Mayk Teles de Oliveira^a, Rhaul de Oliveira^c, Ieda Maria Sapateiro Torresa, Alfonso Yopez^d,
Boniek Gontijo Vaz^b, Rafael Luque^d, Cesar Koppe Grisolia^e, Marize Campos Valadares^a,
Eric de Souza Gil^a, Gisele Augusto Rodrigues de Oliveiraa,^{f,*}

a Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás (UFG), Goiânia, Goiás, Brazil

b Chemistry Institute, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

c Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, USP, São Paulo, SP, Brazil

d Department of Organic Chemistry, University of Córdoba, Córdoba, Andalusia, Spain

e Biological Sciences Institute, University of Brasília (UnB), Brasília, Distrito Federal, Brazil

f National Institute for Alternative Technologies of Detection, Toxicological Evaluation and Removal of Micropollutants and Radioactives (CNPq: INCT-DATREM), UNESP, Institute of Chemistry, Araraquara, SP, Brazil

Abstract

Amoxicillin (AMX) is one of the most commonly prescribed antibiotics around the world to treat and prevent several diseases in both human and veterinary medicine. Incomplete removal of AMX during wastewater treatment contributes to its presence in water bodies and drinking water. AMX is an emerging contaminant since its impact on the environment and human health remains uncertain. This contribution was aimed to evaluate the electrochemical oxidation (EO) of AMX using different anodes in tap water, NaCl or Na₂SO₄ solutions and to evaluate the potential toxicity of remaining AMX and its by-products on zebrafish early-life stages. Chemical intermediates generated after EO were determined by mass spectrometry and their resulting antimicrobial activity was evaluated. AMX did not induce significant mortality in zebrafish during extended exposure but affected zebrafish development (increased body length) from 6.25 mg/L to 25 mg/L and inhibited enzymatic biomarkers. Carbon modified with titanium oxide (TiO₂@C) anode achieved complete AMX removal in just a few minutes and efficiency of the supported electrolytes occurred in the following order: 0.1M NaCl > 0.1M Na₂SO₄ > 0.01M NaCl > tap water. The order of potential toxicity to zebrafish early life-stages related to lethal and sublethal effects was as follows: 0.1M Na₂SO₄>0.1M NaCl>0.01M NaCl=tap water.

Additionally, the EO of AMX using $\text{TiO}_2\text{@C}$ electrode with 0.01M NaCl was able to inhibit the antimicrobial activity of AMX, reducing the possibility of developing bacterial resistance.

Keywords: Antibiotic, Zebrafish, embryo Extended exposure, Electrochemical oxidation Bacterial resistance.

1. Introduction

Pharmaceutical drugs are a class of emerging contaminants that reach the environment through several anthropogenic sources [1]. The levels of such micropollutants found in hospital and domestic sewage systems range from ng.L^{-1} to $\mu\text{g.L}^{-1}$, being generally higher for pharmaceutical companies. Owing to the inherent biological activity, the increasing disposal of pharmaceuticals may represent a risk for the environment and human health. The concern about such class of micropollutants is due to the disposal and dangerousness scale [2, 3].

In this context, antibiotics have been detected in rivers, lakes, groundwater, drinking water, sea coastal water, urban effluents, and treatment plants [4–6]. They are widely used in human and veterinary medicines to treat and prevent bacterial infections, as well as in feed additives used in fish farms and livestock production as growth promoters or in modern agriculture to prevent bacterial crop damage [7–9].

Despite the low environmental levels due to their reasonable stability and continued release, antibiotics are classified as “pseudo persistent” contaminants [8, 10]. Amoxicillin (AMX) is the most commonly antibiotic prescribed in Brazil [11]. It is known that more than 80% of AMX is excreted unchanged in urine and faeces of humans and animals [12, 13] and conventional waste water treatment plants are relatively inefficient to achieve their complete removal [6, 8, 9].

The scientific literature data reporting potential effects of AMX on aquatic life are scarce, probably because in most cases these have been associated with EC_{50} values $> 1000 \text{ mg/L}$, thus indicating low acute toxicity [7, 13, 14]. In fact, the maximum concentration of AMX reported in aquatic systems is only of $6.94 \mu\text{g/L}$, but the major concern relates to the long-term exposure associated with the possibility of generating chronic effects and resistance genes [5, 6, 15–18].

Considerable efforts have been made to develop novel remediation strategies for this pharmaceutical class in order to overcome the antibiotic-resistant bacteria problem and potential toxicity to non-target organisms. Electrochemical remediation of pollutants

has several advantages including versatility to remove different contaminants, low cost, high energy efficiency, easy handling due to simple equipment and safety to operate in mild conditions [19]. Electrochemical oxidation (EO) is a promising technology already extensively applied to wastewater cleaning, in which electro-generated radicals lead to the complete mineralization of organic contaminants [19–24].

Despite high efficiency of some electrodes such as BDD and Ti/PbO₂, their cost and contamination risk by heavy metals due to chemical leaching from the anode, respectively, make them unfeasible in practical applications [23]. The use of carbon and titanium oxide electrodes could be an alternative of decreasing costs and increasing the environmental safety. Moreover, the efficiency of EO remediation is directly related to the electrode material, the electroactive surface area and the applied current density, whereas concerning to the medium, the pH has major influence accordingly to the contaminant type [25]. In turn, minimum system conductivity is required, thus suitable amounts of NaCl and Na₂SO₄ salts are commonly added into the medium [19, 21–23].

Based on ongoing research efforts from the group, the aim of this work was to evaluate the effects of AMX on the development and biochemical activity of zebrafish (*Danio rerio*) early-life stages after 7 days of exposure and to perform EO remediation of AMX with different anodes, carbon (C), titanium (Ti) and carbon modified with titanium oxide (TiO₂@C) in tap water, NaCl or Na₂SO₄ solutions. Generated byproducts in such media were monitored by mass spectrometry and potential toxicity was evaluated by zebrafish embryo tests. The antimicrobial activity of remaining AMX after EO remediation was monitored using a simple broth microdilution technique.

2. Material and methods

2.1. Test substances

Amoxicillin trihydrate (AMX; CAS: 61336-70-7; 98,7%) was purchased from Sigma–Aldrich (St Louis, MO, USA) and used in all assays as purchased. For Fish Embryo Extended Toxicity (FEET) Test and biochemical analyses, a stock solution was carefully prepared by dilution of AMX in deionized water, kept refrigerated and protected from light. Test solutions were prepared immediately before beginning the test by successive dilutions of the stock solution using maintenance water at 0.75, 1.5, 3.0, 6.25, 12, 25, 50 and 100 mg/L of AMX. To evaluate the EO efficiency, a stock solution of AMX at 12 mg/L was prepared with different electrolytes supported: 0.1M of Na₂SO₄, 0.01 and 0.1M of NaCl or tap water. To determine the antimicrobial activity before and after EO process, a stock solution of AMX at 1200 mg/L was prepared in deionized water.

2.2. Fish embryo extended toxicity (FEET) tests

Adult male and female zebrafish (*D. rerio*) were kindly provided by the zebrafish facility (ZebTec Tecniplast) at the Institute of Biology, University of Brasília and kept in separate tanks (ethical approval UFG N° 102/2014). Fish were maintained in a Rack Hydrus (Alesco) recirculating system using water filtered by reverse osmosis, where water passes through several levels of filtration (activated carbon filters and biological filters) and is then disinfected by UV light and automatically adjusted for pH and conductivity. The temperature is maintained at 26.0 ± 1 °C, conductivity at 750 ± 50 µS, pH at 7.5 ± 0.5 and dissolved oxygen equal to or above 95% saturation. Nitrate, nitrite and ammonia are regularly monitored. As previously mentioned, this water was used to prepare the test solutions of all assays performed. Adult organisms were fed with commercial dry flake food (TetraMin Tropical Flakes®) and live brine shrimp. On the day of the test, zebrafish eggs were collected about 30 min after natural mating, rinsed in water and examined under a stereomicroscope (Bel Photonics STM PRO). Unfertilized or damaged eggs were discarded. The fertilization success was checked, and only eggs batches with a minimum fertilization rate of 90% were used. The fish embryo toxicity test with zebrafish (*D. rerio*) was carried out according to OECD guideline 236 [26] with extended exposure time for 7 days post-fertilization (dpf) to evaluate the subchronic effects of AMX on zebrafish early-life stages. Twenty fertilized eggs per concentration were randomly selected and carefully distributed to a 24-well plate, filled with 2 mL of different concentrations of AMX (0.75, 1.5, 3.0, 6.25, 12, 25, 50 and 100 mg/L) or negative (CN; maintenance water) and positive controls (PC: 3,4-dichloroaniline at 4.0 mg/L). The test was performed in triplicate in a climate chamber at 26 ± 1 °C and 12-h light. Neither food nor aeration was provided during the assays. Embryo development was assessed at 24, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 h post-fertilization (hpf) using a stereomicroscope. The distinction between normal and abnormal embryonic development was established according to the zebrafish development descriptions reported by Kimmel et al. [27]. Lethal (egg coagulation, no somite formation, non-detachment of the tail from yolk sac and no heart beating) and sublethal (effects on the eye and body pigmentation, absorption of the yolk sac, hatching rate, swimming bladder inflation, otolith, presence of edemas and blood accumulation, tail deformities and body length) parameters were observed and reported.

2.2.1. Biochemical analyses

Catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and lactate dehydrogenase (LDH) activities were determined in zebrafish larvae exposed to 0.75, 1.5, 3.0, 6.25, 12, 25, 50 and 100 mg/L of AMX after 168 h of exposure. On the day of enzymatic analyses, a total of three samples per concentration (each sample composed of 7 larvae pool) were defrosted on ice, homogenized and centrifuged (4 °C, 10,000 g, 20 min) in order to isolate the post-mitochondrial supernatant (PMS) fraction posteriorly used as enzyme extract for activity determinations made by spectrophotometrically (Thermo Scientific Multiskan Spectrum, USA). Biomarker determinations were performed based on Oliveira et al. [7], in which CAT activity was measured at 240 nm by monitoring (for 3 min) the decrease of absorbance due to degradation of hydrogen peroxide (H₂O₂), as described by Clairborne [28]. GST activity was determined at 340 nm by monitoring the absorbance increase (for 5 min) following the methodology described by Habig and Jakoby [29] and Frasco and Guilhermino [30]. LDH activity was measured at 340 nm by monitoring (for 5 min) the absorbance decrease due to the oxidation of NADH, according to Vassault [31] and Diamantino et al. [32]. Enzymatic activities were determined in quadruplicate and expressed as nanomoles of hydrolyzed substrate per minute per mg of protein (nmol/min/mg of prot). Protein concentration in samples was determined in quadruplicate according to the Bradford method [33] at 595 nm, using γ -globulin as a standard.

2.3. Electrochemical oxidation (EO)

The anodes used for EO were Carbon cylinder (C; 3.5×0.5, length x diameter cm; geometric area=5.89 cm²), Titanium wire (TiO; 10.0×0.2, length x diameter cm; geometric area= 6.34 cm²) and C modified (TiO₂@C; 3.0×0.5, length x diameter cm; geometric area= 5.10 cm²). The cathode used was steel wire (10.0×0.3, length x diameter cm; geometric area= 9.56 cm²). The wire electrodes were used in a spiral format. The exact inter-electrode gap between anode and cathode was 4 cm. The applied voltage was controlled by a Tensiometer, consisting in an adjustable DC Power Supply (HF-30035, Hikari, São Paulo, SP, Brazil), using 10 V constantly and evaluated the current created or 50 mA constant and the voltage created. Electrodes C modified (TiO₂@C) were prepared from carbon cylinder (C) anodes immersed in 1 mL solution of titanium (IV) isopropoxide and 3.5 mL of ethanol. A microwave-assisted deposition of titanium was carried out in a CEM-Discover model with PC control. Experiments were conducted in a closed vessel under continuous stirring and without cooling. Temperature, power irradiation and pressure were limited at 120 °C, 220W and 220 PSI respectively [34–36].

AMX EO was conducted in a beaker at different times of reaction (typically 10, 20 and 40 min), with constant agitation and protected from light. At the end of each treatment time, the pH and temperature of the solution were determined by pHmeter (Quimis Scientific Apparatus, model Q488AS, Diadema, SP, Brazil). The assays were performed in duplicate.

2.3.1. Analysis AMX degradation

Degradation of AMX was monitored by UV-Vis spectrometry, differential pulse voltammetry (DPV) and mass spectrometry. The spectrophotometric measurements were conducted in UV-Visible Spectrophotometer (Quimis Scientific Apparatus, model Q798U2VS, Diadema, SP, Brazil) coupled to Unico Application Software (S2100 Series UV/Vis). Spectra were scanned from 200 to 1000 nm. To calculate the percentage of AMX removal (Equation (1)), the peak area obtained at 230 nm for AMX before and after treatments were calculated by the Origin® 8 software.

$$\% \text{ of AMX removal} = [(A_{\text{pdrAMX}} - A_{\text{treatmentAMX}}) / A_{\text{pdrAMX}}] \times 100 \quad (1)$$

Where

A_{pdrAMX} stands for the peak area of AMX 12 mg/L and $A_{\text{treatmentAMX}}$ stands for the peak area of AMX after EO.

DPV measurements were performed with a potentiostat/galvanostat μ Autolab III® integrated with GPES 4.9® software (Eco-Chemie, Utrecht, The Netherlands). For analysis were used electrochemical cell with 0.5 mL of sodium phosphate buffer 0.05M (pH 8) and 0.5 mL of AMX solution before and after treatment, and three electrode systems: glassy carbon (working electrode), platinum wire (counter electrode) and Ag/AgCl/KCl 3M (reference electrode) (purchased from Lab solutions, São Paulo, Brazil). The experimental conditions for DPV were: pulse amplitude 50 mV, pulse width 0.5 s and scan rate 10 mV s⁻¹, all performed at room temperature. Mass spectrometry analysis was carried out in a mass spectrometer microTOF III (Brucker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with a commercial ESI (Brucker Daltonics, Bremen, Germany). Analyses were performed by direct infusion (3 μ L/min) after extraction in metanol and formic acid 1 mM. All analyses were performed in the positive mode. ESI (+) source conditions were as follows: nebulizer nitrogen gas with 200 °C temperature, 0.4 bar pressure; drying gas of 4 L/min; capillary voltage of -4 kV; transfer capillary temperature of 180 °C; end plate offset of -500 V; skimmer of 35 V and collision voltage of -1.5 V. Each spectrum was acquired using 2

microscans and processed with Data Analysis software (Brucker Daltonics, Bremen, Germany).

2.3.2. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) tests

Fish Embryo Acute Toxicity (FET) test was carried out according to OECD guideline 236 [26] with some modifications. Twenty fertilized eggs per concentration were randomly selected and carefully distributed to a 96-well plate, filled with 200 μ L of different EO of AMX with different electrolytes supported: 0.1M of Na₂SO₄; 0.01, 0.1M of NaCl, tap water or negative control (CN; maintenance water). Tests were performed in triplicate in a climate chamber at 26 ± 1 °C and 12 h under light. Embryo development was assessed at 24, 48, 72 and 96 h, using a stereomicroscope (BEL PHOTONICS STM 800).

2.4. Evaluation of antimicrobial activity

Broth microdilution was conducted to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of AMX before and after EO using TiO₂@C electrode with 0.01M NaCl (10 min), according to the document "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing" proposed by the Clinical and Laboratory Standards Institute [37]. The microorganisms used were *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 25922. Microdilution plates were incubated at 37 °C for 18–24 h and the results were observed with 0.5% solution of triphenyltetrazolium chloride.

2.5. Statistical analysis

GraphPad Prism® (version 5.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used for the statistical analysis of FEET, biomarker determinations and FET test. Comparisons between different experimental exposure groups were performed with a one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison tests. Each experimental value was compared to its corresponding control. Statistical significance was accepted when the probability of the result assuming the null hypothesis (p) was less than 0.05.

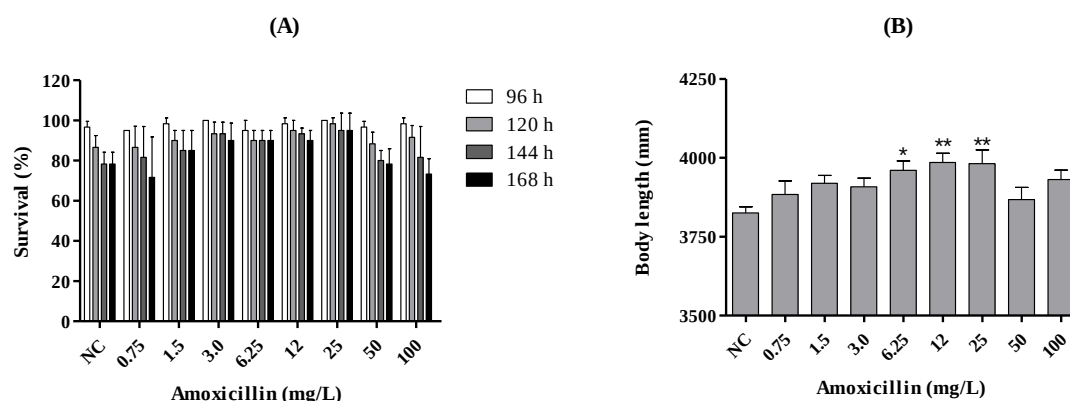
3. Results

3.1. Fish embryo extended toxicity (FEET) test

The subchronic effects of different concentrations of AMX in embryo-larval stages of zebrafish were investigated during 7 dpf (or 168 h) of exposure. No significant lethal effect was observed during 168 h of exposure to AMX, as shown in Fig. 1A (24, 48 and 72 h:

data not shown). Thus, it seems to have no embryotoxic potential in this tested condition; however, AMX significantly increased the body length of zebrafish larvae at 6.25, 12 and 25 mg/L (Fig. 1B).

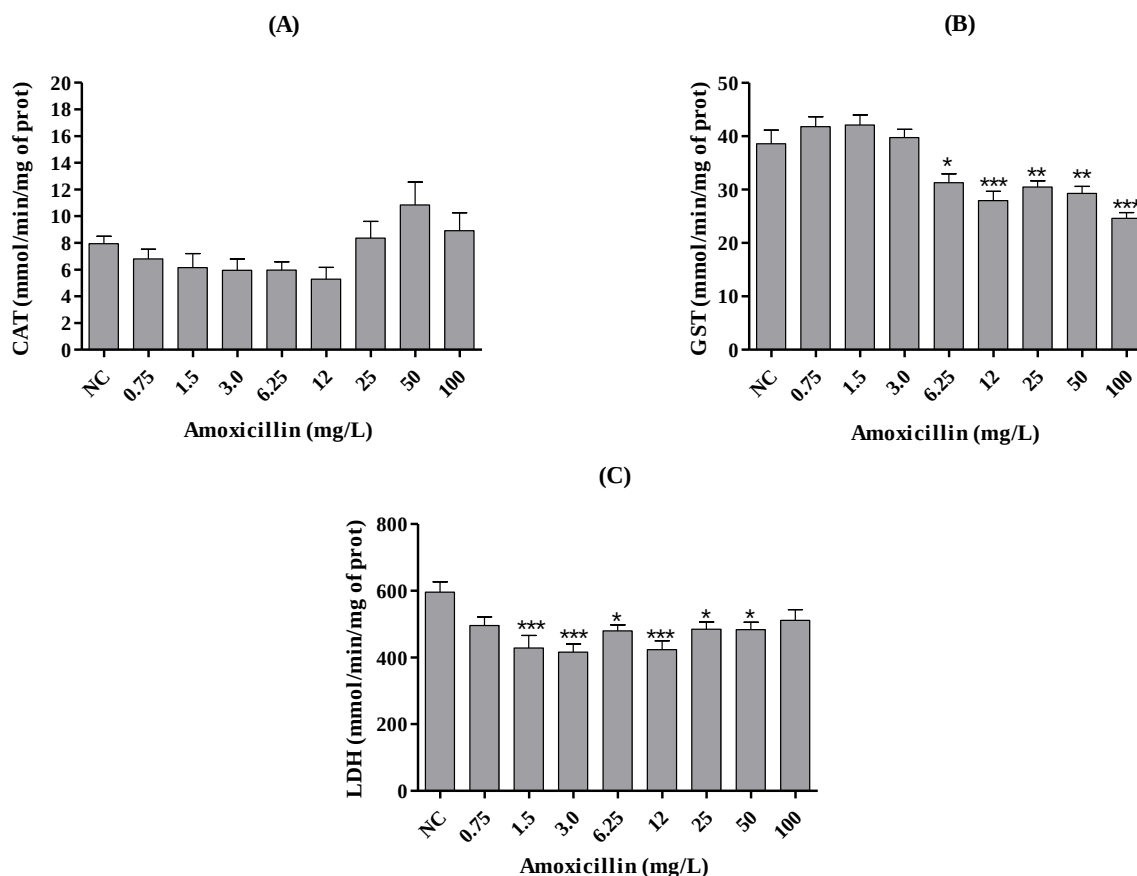
Figure 1. (A) Survival rate of zebrafish life stages exposed to different AMX concentrations (mg/L) and analyzed at 96, 120, 144 and 168 h. (B) Effects of AMX on the body length of zebrafish larvae (μm) after 168 h of exposure. Bars represent mean $\pm$ SEM of three independent tests. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ statistically different from the negative control (NC; reconstituted water).



3.1.2 Biochemical effects

The effects of AMX on the activities of biomarkers CAT, GST and LDH are presented in Figure 2. CAT activity was not significantly altered in zebrafish embryos exposed to AMX (Figure 2A). GST and LDH activity were significantly inhibited from 6.25 mg/L to 100 mg/L (Figure 2B) and from 1.5 mg/L to 50 mg/L of AMX compared to control, respectively (Figure 2C).

Figure 2. Levels of (A) catalase (CAT), (B) glutathione S-transferase (GST) and (C) lactate dehydrogenase (LDH) activity in zebrafish larvae after 168 h of exposure to AMX expressed as mean values $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ and *** $p < 0.001$ statistically different from the negative control (NC; reconstituted water).

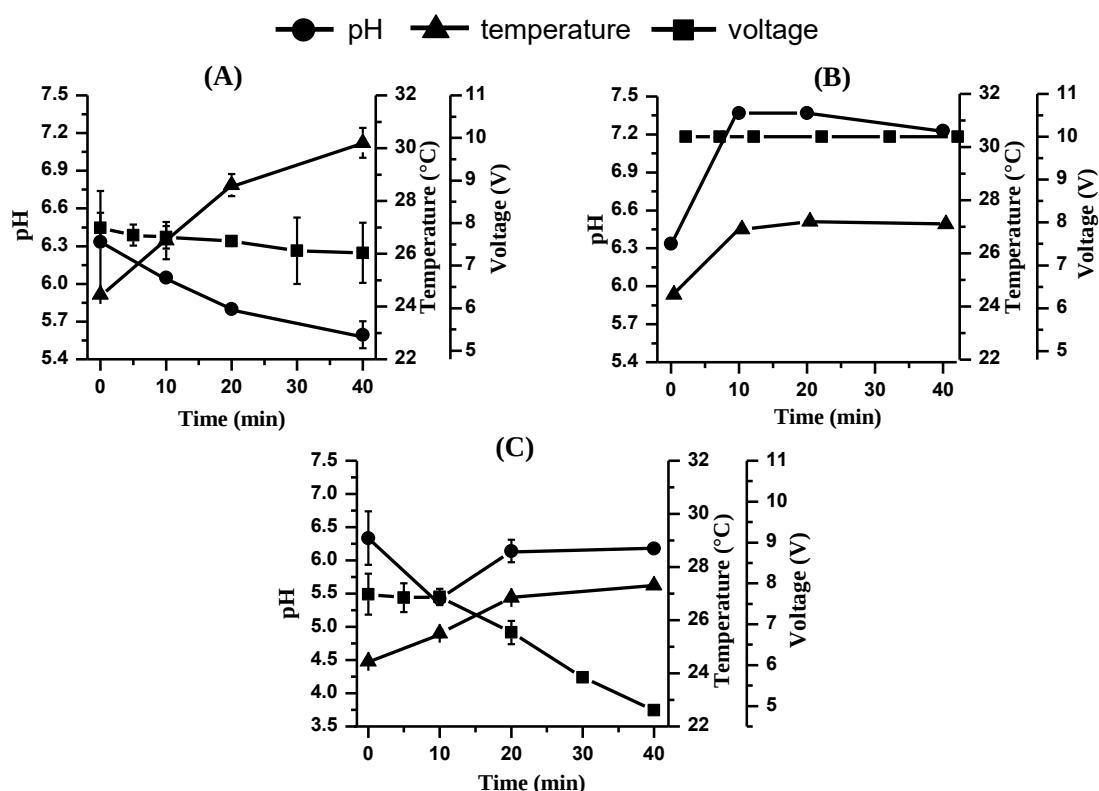


3.2 Electrochemical oxidation remediation of AMX

3.2.1. Effect of pH, temperature and voltage

The rate of chemical reactions is often and highly influenced by pH and temperature. In case of EO, the applied voltage has utmost importance, whereas pH and temperature can exert adverse effects over electrode polarization efficiency. The aforementioned parameters were verified in order to optimize the experimental conditions of anodic remediation and the achieved efficiency is presented in Fig. 3.

Figure 3. Variation of pH, temperature and voltage during the EO of AMX in 0.1M of Na₂SO₄ with anodes of carbon cylinder (A), titanium wire (B) and TiO₂@C (C).



Temperature, pH and current effects before and after 10 min of treatment were observed, without any obvious changes that could suggest improvements in the selected EO remediation under the investigated conditions (Table 1). The current flow increase as the electrolyte concentration increased was expected, as it was not possible to measure the current with the equipment used for the medium with distilled water, since the concentration of salts were low.

Table 1. Variation of pH, temperature and current to AMX remediation after 10 minutes treatment with anode $\text{TiO}_2\text{@C}$ using different electrolytes.

	pH		Temperature (°C)		Current (mA) ¹
	Initial	Final	Initial	Final	
Tap water	7.71	7.78 ± 0.057	27.60	27.90 ± 0.424	- ²
0.01 M NaCl	8.31	8.77 ± 0.042	25.90	27.35 ± 0.495	20
0.1 M NaCl	7.08	8.20 ± 0.417	21.20	23.15 ± 0.495	60

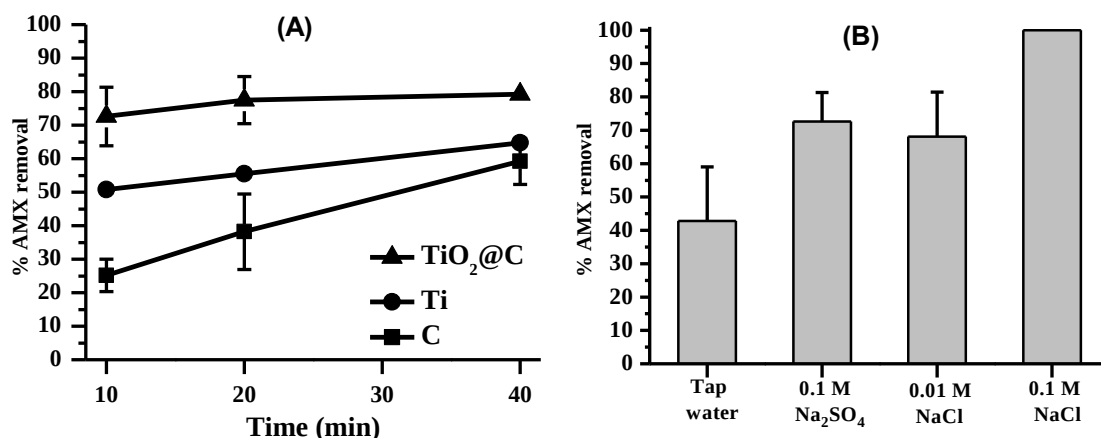
¹ Voltage = 10 V.

² Below the capacity of the measuring equipment.

AMX decay was monitored by means of UV-Visible Spectrophotometry. Initially ($t=0$), two maximum absorption bands at 230 and 273 nm could be observed. AMX

degradation after 40 min of EO in Na_2SO_4 was ca. 59% and 65% for C and TiO_2 electrodes, respectively. Remarkably, AMX removal over 72% could be achieved in only 10 min in 0.1M Na_2SO_4 using $\text{TiO}_2@\text{C}$ as anode (Fig. 4 A). To simulate real situations, another supporting electrolyte (NaCl) and tap water were subjected to EO treatment for 10 min (Fig. 4 B). The highest efficiency for AMX removal was obtained with NaCl 0.1M as supporting electrolyte. Remediation in tap water, despite not being most effective, could provide a maximum of 43% AMX removal in 10 min of reaction, which makes the study method potentially applicable for actual samples. In addition, a 68% removal was obtained after EO treatment in 0.01M NaCl electrolyte (10 min).

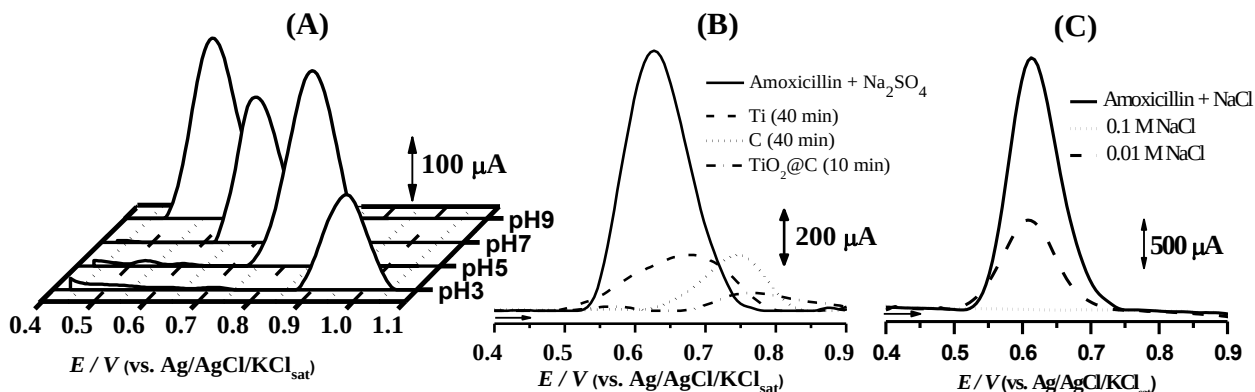
Figure 4. (A) EO of AMX in 0.1 M Na_2SO_4 with different anodes. (B) Percentage of AMX removal after 10 min EO treatment with anode $\text{TiO}_2@\text{C}$ using different supporting electrolysis.



3.2.2. Electrochemical behavior of AMX and remediated solutions

The effect of pH and ionic strength was also evaluated (Fig. 5A). A fresh AMX solution was compared to those subjected to EO for 40 min using C and Ti anodes, and 10 min using $\text{TiO}_2@\text{C}$ (Fig. 5B). Interestingly, AMX solutions exhibited some peak shifts after treatment as compared to untreated solutions (0.63 V), being 0.68 V for Ti electrode, 0.75 V for C electrode and 0.77 V for $\text{TiO}_2@\text{C}$ electrode (Fig. 5B). Results with $\text{TiO}_2@\text{C}$ electrode in NaCl are shown in Fig. 5C.

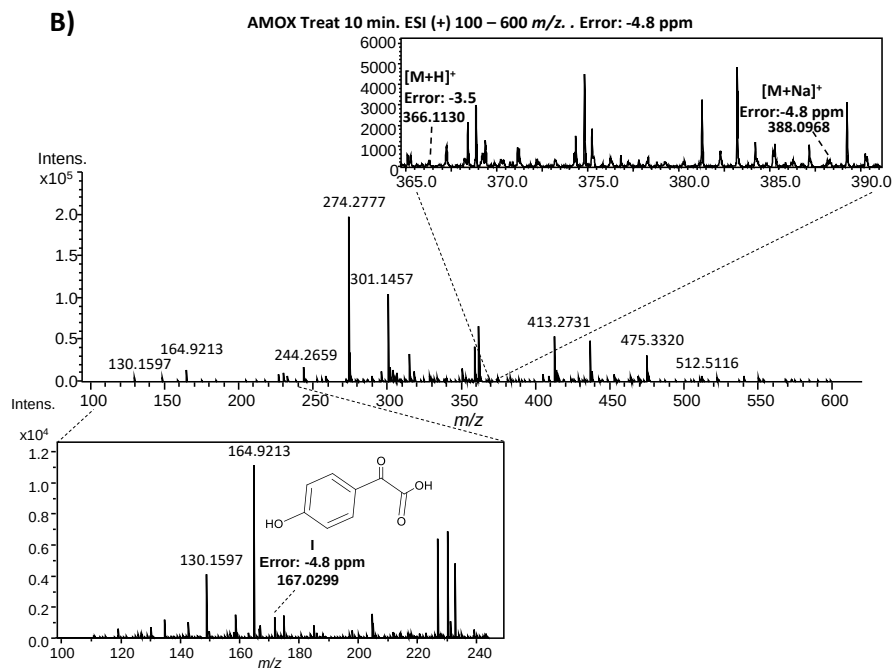
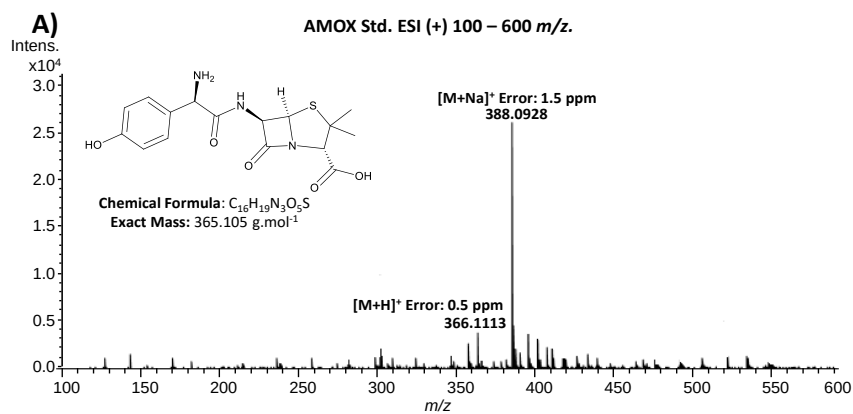
Figure 5. (A) Differential pulse voltammograms obtained with vitreous carbon electrode in relation to optimum pH (B) AMX before and after EO on Na_2SO_4 (C) or NaCl support electrolytes.



3.2.3. Mass spectrometry analyses

Mass spectrometry analyses were further conducted to confirm results as the most sensitive technique for this purpose. The most abundant peak in the AMX untreated standard spectrum presented m/z of 388.0920, that could be assigned to sodium adduct $[\text{M}+\text{Na}]^+$. A lower intensity peak with m/z of 366.113 corresponded to $[\text{M}+\text{H}]^+$.

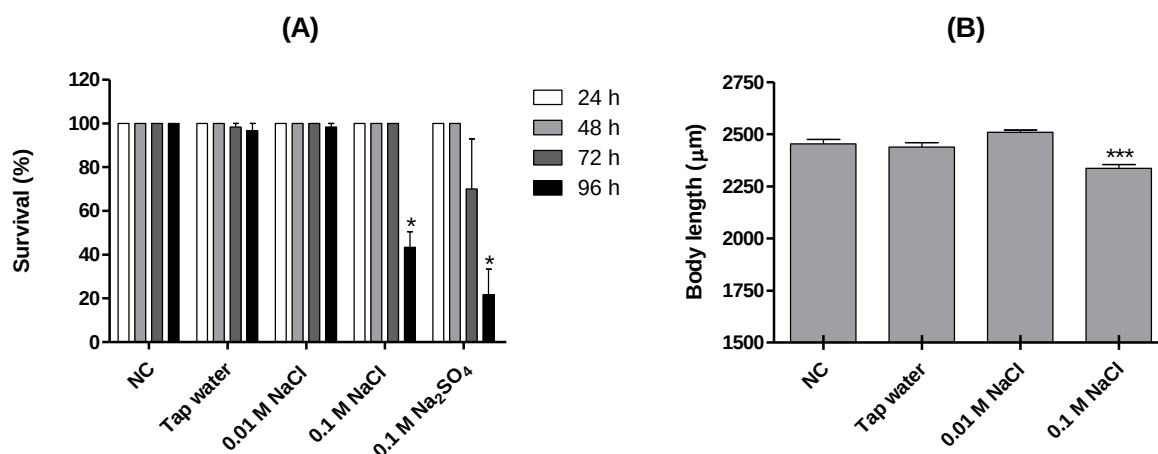
Figure 6. Mass spectrometry Q-TOF ESI(+) obtained before (A) and after (B) treatment of AMX in Na_2SO_4 with $\text{TiO}_2@\text{C}$ anode after 10 minutes of EO.



3.2.5 Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test

The acute effects of by-products generated by 10 min of EO of AMX using TiO₂@C electrode with different electrolytes (tap water; NaCl at 0.01M and 0.1M; Na₂SO₄ at 0.1 M) on zebrafish early-life stage were investigated during 96 h. No significant lethal effect was observed in treatment using electrolyte 0.01 M NaCl and tap water during 96 h, with survival rate $\geq 90\%$ in all exposure periods, as shown in Figure 7A. However, by-product generated by EO in 0.1 M NaCl and Na₂SO₄ induced significant mortality to zebrafish larvae after 96h of exposure (Figure 7A). Besides that, EO of AMX in 0.1 M NaCl significantly decreased the body length of zebrafish larvae after 96 h of exposure (Figure 7B). For treatment with 0.1 M Na₂SO₄ body length was no evaluated because high mortality until 96 h of exposure. In contrast, treatment using electrolyte 0.01 M NaCl and tap water did not alter the body length of the larvae after 96 h of exposure (Figure 7B).

Figure 7. (A) Survival rate of zebrafish early-life stage exposed to EO of AMX using TiO₂@C electrode with different electrolytes (tap water; NaCl at 0.01M and 0.1M; Na₂SO₄ at 0.1 M) for 24, 48, 72 and 96 h. (B) Effects of different electrolytes used in EO of AMX on the body length of zebrafish larvae (μm) after 96 h of exposure. Bars represent mean values $\pm$ SEM of three tests. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.0001$ statistically different from the respective negative control.

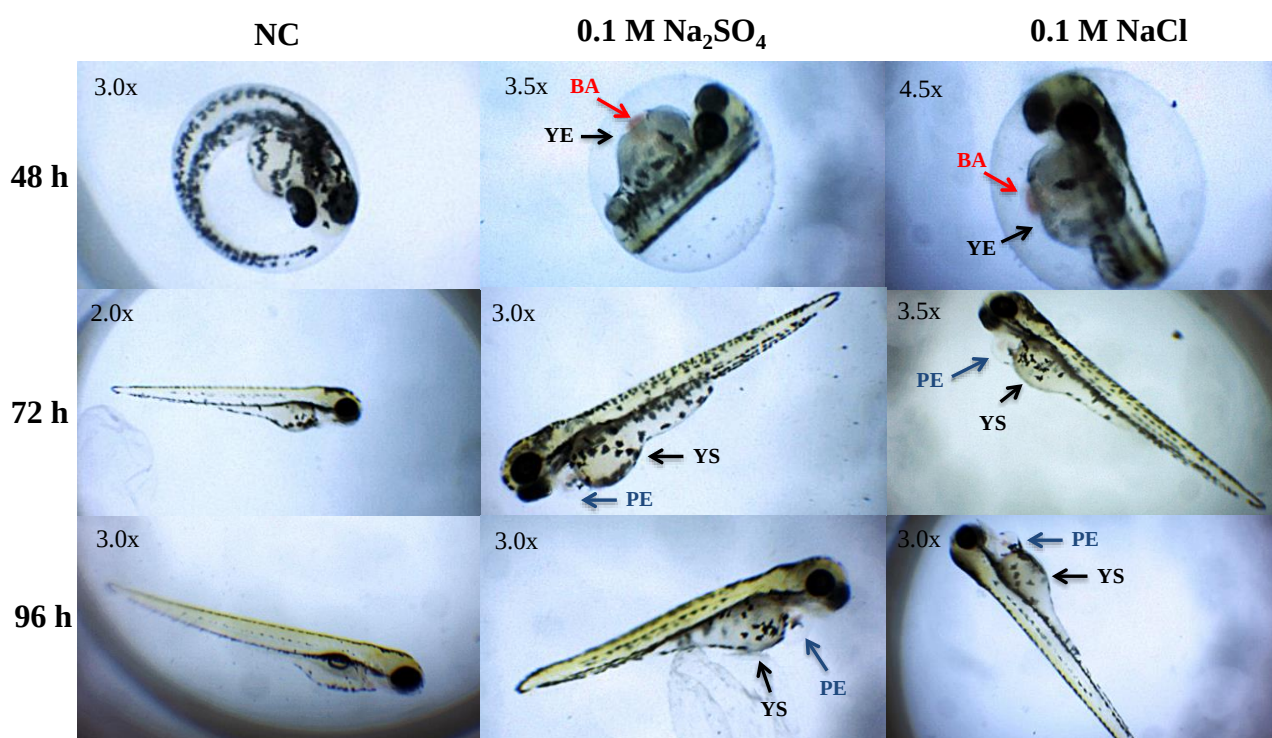


Furthermore, no significantly malformations were observed for treatment with 0.01 M NaCl and tap water (data not shown). In contrast, by-product generated by EO with 0.1 M NaCl and Na₂SO₄ induced significant malformations on zebrafish from 48 h of exposures such as yolk sac edema (YE), blood cells accumulation (BA), delayed yolk sac absorption (YS) and pericardial edema (PE) compared with the control, which presented a normal development (Table 2; Figure 8).

Table 2. Malformations rate in zebrafish early-life stage induced by EO of AMX using $\text{TiO}_2@\text{C}$ electrode with 0.1 M Na_2SO_4 and 0.1 M NaCl after 48, 72, and 96 h of exposure expressed as mean values $\pm$ SEM of three independent tests. YE: yolk sac edema; BA: blood accumulation; PE: pericardial edema and YS: delayed yolk sac absorption.

Electrolytes	48 h		72 h		96 h	
	YE (%)	BA (%)	YS (%)	PE (%)	YS (%)	PE (%)
0.1 M Na_2SO_4	55 $\pm$ 0.15	55 $\pm$ 0.15	100 $\pm$ 0.00	76 $\pm$ 0.17	100 $\pm$ 0.00	82 $\pm$ 0.18
0.1 M NaCl	42 $\pm$ 0.16	72 $\pm$ 0.08	67 $\pm$ 0.47	50 $\pm$ 0.36	83 $\pm$ 0.24	69 $\pm$ 0.03

Figure 8. Representative photomicrographs of the main abnormalities in zebrafish early-lifestage induced by EO of AMX using $\text{TiO}_2@\text{C}$ electrode with Na_2SO_4 and NaCl at 0.1 M during 96 h. NC: embryo control; YE: yolk sac edema; BA: blood accumulation; YS: delayed yolk sac absorption, and PE: pericardial edema.



3.2.6 Antimicrobial Activity

In the present study, it was observed that the EO using $\text{TiO}_2@\text{C}$ electrode with 0.01 M NaCl by 10 minutes (AMX- treated) affected the antibiotic activity of AMX.

Table 3. Minimum inhibitory concentration of standard strains in contact with AMX before and after EO using TiO₂@C electrode with 0.01 M NaCl by 10 minutes.

Strain	Minimum inhibitory concentration (MIC) µg/mL	
	AMX	AMX-treated
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	4.68	1200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>1200	>1200
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	18.75	600

In contact with *E. coli*, the concentration of AMX-treated capable of inhibiting microbial growth was about 250 times greater than it was required to AMX. The same fact occurred with *S. aureus*, since the EO using TiO₂@C electrode with 0.01 M NaCl reduced the antimicrobial activity of the AMX in about 30 times. In the test using the *P. aeruginosa* strain for both AMX and AMX-treated, the MICs were higher than 1200 µg/mL. For AMX before treatment this response was expected, since *P. aeruginosa* is intrinsically resistant to most β-lactams [38] and consequently, after an effective treatment in the removal of AMX, like EO using TiO₂@C electrode with 0.01 M NaCl, its inability to inhibit bacterial growth tends to be greater.

4. Discussion

In this study, lethal and sublethal effects of AMX before and after EO remediation using TiO₂@C electrode with different electrolytes (tap water; NaCl at 0.01M and 0.1 M; Na₂SO₄ at 0.1 M) were reported using zebrafish early-life stage as an organism model. AMX did not induce significant mortality to zebrafish at concentrations ≤100 mg/L during extended exposure (7 dpf or 168 h; Fig. 1A). Oliveira et al. [7] evaluated the acute toxicity of AMX on embryos and larvae of zebrafish, and reported that AMX at concentrations ≤1125 mg/L induced no significant mortality in zebrafish after short-term exposure (96 h). In another study, Park and Choi [14], observed a LC₅₀-96 h greater than 1000 mg/L for *Oryzias latipes* fish exposed to AMX. As previously mentioned, data on potential effects of AMX on aquatic life are scarce in scientific literature, probably because in most cases, it has been associated with EC₅₀ values > 1000 mg/L, indicating low toxicity [7,13,14].

In addition to low mortality, our study showed that AMX is able to increase body length of zebrafish larvae (6.25–25 mg/L) after 168 h of exposure (Fig. 1B). In fact, several

antibiotics are used to stimulate fish growth [13, 39, 40] and enhance livestock feed efficiency [40, 41], suggesting an improvement of nutrients absorption by weight gain. Until now, the mechanisms of growth promotion as a result of dietary antibiotic supplementation are still not exactly known [40]. Moreover, we evaluated biochemical responses of zebrafish larvae exposed to AMX through the analysis of biomarkers of oxidative stress (CAT and GST) and energetic metabolism (LDH). CAT activity was not significantly modified by AMX, while GST (6.25–100 mg/L) and LDH (1.5–50 mg/L) were inhibited (Fig. 2). Oliveira et al. [7] evaluated the effects of AMX (75, 128, 221 mg/L) on biomarkers activities in zebrafish larvae during 96 h and no changes in GST and LDH activities were detected.

Considering that GST is an enzyme that plays an important role in phase II of the detoxification process, responsible for the biotransformation of xenobiotic compounds and acts as a marker of antioxidant mechanisms [42–45], our results showed that AMX inhibited the detoxification process and the antioxidant activity in the embryonic stage of zebrafish. A similar fact occurred with LDH, a key enzyme in the anaerobic pathway of energy production. LDH acts as a cell injury marker at tissues, particularly when high levels of energy are required in a short period of time as in case of chemical stress conditions [42, 44–46]. In the present work, AMX significantly inhibited LDH, which may indicate a decreased glycolytic capacity in zebrafish larvae or suggest cellular necrosis leading to enzyme leakage and/or enzyme inhibition [45].

Considering these toxic effects and the problem of antibiotic-resistance, we performed EO remediation of AMX. The assay solutions for EO, akin to the expected for aquatic systems, were not buffered. The water electrolysis in EO processes leads to electro generation of hydroxyl radical ($\text{OH}\bullet$) and H^+ , hence, causing pH changes, which support the efficiency and stability of anodic materials. Thus, pH was determined during treatment time. The final medium pH after 40 min of EO at C, Ti and $\text{TiO}_2\text{@C}$ anodes were of 5.5, 7.3 and 6.2, respectively (Fig. 3).

Moreover, the exothermic behavior of water electrolysis was evidenced in all experimental conditions. The higher temperature increments observed for C anode can be attributed to ohmic resistance [47]. It was shown slightly variations of potential during the time of the treatment, however for the $\text{TiO}_2\text{@C}$ anode there was a drop up to 3 V, indicating that the electrode might show less energy consumption over the remediation process (Fig. 3A e 3C).

The higher electroactive area of the modified anode, as well as the recognized electrocatalytic performance of TiO_2 nanostructured systems, have been proven with EO

of AMX in this work. Supporting electrolytes, Na_2SO_4 and NaCl , were used to allow the flow of electric current and thus to promote AMX degradation. In addition, they also led to the formation of oxidants persulfate ($\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$) and hypochlorite (ClO^-) ions, respectively, contributing to the AMX oxidation and its oxidation intermediates; therefore, increasing mineralization efficiency of the process [21, 24, 48].

The highest efficiency for removal of AMX was obtained with NaCl as supporting electrolyte. According to literature, NaCl is also the most efficient electrolyte in EO when compared to Na_2SO_4 [49, 50]. While hydroxyl radicals are on the surface of the anode and have a very short lifetime, the active chlorine from NaCl may be present in the whole solution, since it does not necessarily remain on the surface of the anode and plays an important role as an organic oxidant [25].

AMX was also determined by means of DPV at different pH conditions. Fig. 5A shows a linear dependence between peak potential and pH, in agreement with the expected proton participation in the anodic reaction of AMX. The voltammetry analysis of selected assay solutions was performed in order to get new insights about the EO mechanism. Briefly, equal aliquots prior and after EO process were taken from assay solutions and determined by DPV at GCE. The peak potential, 1a, at $E_{pa}=0.63$ V, corresponds to the EO of fresh AMX (Fig. 5B). The peak current falls intensely for treated samples, whereas akin to the observation previously in spectrometric determinations, the highest decay is achieved at $\text{TiO}_2@\text{C}$ anode, even in a quarter of treatment time. Some peak shifts could be observed for AMX solutions after treatment (Fig. 5B). This is due to the final pH of treatments even using buffer to analyze solutions (it was not possible to maintain pH at 8 because the concentration of salts used as electrolytes was high enough to interfere in the buffering conditions).

Therefore, the difference of DPV and UV-visible in determination of AMX removal, which was 93% and 73%, respectively, for media containing 0.1M Na_2SO_4 and $\text{TiO}_2@\text{C}$ electrode can be explained by the final pH treatment. For electrolyte 0.01M NaCl , the potential was the same before treatment, then results in DPV and Uv-Vis were similar, 65% and 68%, respectively (Figs. 4 and 5C).

Mass spectrometry analyses confirmed the most abundant peak $[\text{M}+\text{Na}]^+$ and a lower intensity peak $[\text{M}+\text{H}]^+$ in the AMX standard spectrum, in agreement with reported results by Frontistis et al. [22] (Supplement material 1). In addition, a typical fragment of electrochemistry AMX degradation (identified as I; identification error: -4.8) could be visualized in detailed mass spectrometry range 100–240 m/z for AMX treated solutions.

Ganiyu et al. [23] reported the 167.02 m/z fragment among others after studying the kinetic mineralization and toxicity of amoxicillin.

As observed in other detection methods, UV-visible and DPV analyses, MS analysis proved that AMX removal was almost complete in only 10 min of treatment with TiO₂@C anode. So, we use this treatment with different electrolytes to evaluate the toxic potential for zebrafish early-life stages.

Considering AMX-treated, tap water removed 43% of AMX and it was non-toxic for zebrafish early-life stage. The highest efficiency for AMX removal (> 99%) occurred with 0.1M NaCl; however, in this condition, by-products generated induced lethal (~57% of mortality; Fig. 6A) and sublethal (malformations) effects (Table 2 and Supplement material 2) and affected the body length of zebrafish larvae (Fig. 6B), whereas 0.01M NaCl removed approximately 70% of AMX and caused no acute toxicity for zebrafish early-life stages (Fig. 6A).

The EO with 0.1M Na₂SO₄ was responsible for 75% of AMX removal, but it induced the highest toxicity for zebrafish (Fig. 6A and supplement material 2), which can be related to intrinsic effects of Na₂SO₄. Ganiyu et al. [23] evaluated the potential of the substoichiometric titanium oxide (Ti₄O₇) as ceramic electrode for degradation and mineralization of aqueous solutions of 0.1mM AMX containing 0.05M Na₂SO₄ as supporting electrolyte. The potential toxicity of AMX during electrooxidation treatment was investigated by the bioluminescence inhibition assay (Microtox method), which is based on metabolic activity of the bacterial population (*Vibrio fischeri*) and any inhibition of enzymatic activity causes a corresponding decrease in bioluminescence. The authors observed an increased *V. fischeri* bioluminescence inhibition at the early stages of electrolysis reaching 100% of inhibition, due to formation of aromatic/cyclic organics as the predominant oxidation intermediates, which are more toxic than parent AMX solution. However, after 360 min of electrolysis, the bioluminescence inhibition decreased, indicating the mineralization/degradation of both AMX and its oxidation reaction intermediates into less toxic and biodegradable compounds [23].

Therefore, considering that EO of AMX using TiO₂@C electrode with 0.01M NaCl was efficient in AMX removal and induced no toxic effect in zebrafish early-life stage, the antimicrobial potency of this antibiotic was evaluated through broth microdilution technique. Frontistis et al. [22] reported that AMX at 1455 µg/mL completely inhibited *Klebsiella pneumoniae* (NCTC 5056) and *Enterococcus faecalis* (ATCC14506), but after EO treatment, no concentration of AMX-treated was able to completely inhibit growth of these bacteria, reducing only a rate of 50–60% of the bacterial population. In the

present study, the antibiotic activity of AMX-treated was also observed at concentration ≥ 600 $\mu\text{g/mL}$ (Table 3). There have been reports that AMX transformation by-products exhibit a small antimicrobial activity against some strains such as *S. aureus*, *E. faecalis* and *E. coli* [22, 51, 52]. It is importante to report that, in this work, AMX and its by-products are in much higher concentrations than those found in effluents, surface waters and groundwater. Based on that, it can be suggested that these by-products do not present antimicrobial activity in levels found in the environment.

5. Conclusion

In summary, our findings demonstrated that AMX induced no mortality but affected the zebrafish development (increased body length) and the activity of enzymatic biomarkers such as GST and LDH during extended exposure. The EO remediation was efficient in the AMX degradation and can be applied for other organic pollutants.

$\text{TiO}_2\text{@C}$ anode achieved a complete AMX removal in just a few minutes and the efficiency of the supported electrolytes occurred in the following order: $0.1\text{M NaCl} > \text{Na}_2\text{SO}_4 > 0.01\text{M NaCl} > \text{tap water}$. The potential toxicity order to zebrafish early life-stage considering the lethal and sublethal effects was as follows: $\text{Na}_2\text{SO}_4 > 0.1\text{M NaCl} > 0.01\text{M NaCl} = \text{tap water}$. Additionally, EO of AMX using $\text{TiO}_2\text{@C}$ electrode with 0.01M NaCl was able to inhibit the antimicrobial activity of AMX, reducing the possibility of developing bacterial resistance. Therefore, EO using $\text{TiO}_2\text{@C}$ electrode could be an interesting alternative for drinking water and wastewater treatment plants, considering its low cost and environmental safety.

Conflicts of interest

The authors declare there were no conflicting interests.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Goiás Research Foundation (FAPEG), Funding Authority for Studies and Projects (FINEP - Process No. 01.14.0140.00) and to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq: INCT/DATREM - Process No. 465571/2014-0), for their financial support and scholarships. The authors would like also to thank the Faculty of Pharmacy – Federal University of Goiás and Biological Sciences Institute - University of Brasília for their help in carrying out this research.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2018.06.017>.

References

- [1] M. Llorca, M. Farré, E. Eljarrat, S. Díaz-Cruz, S. Rodríguez-Mozaz, D. Wunderlin, D. Barcelo, Review of emerging contaminants in aquatic biota from Latin America: 2002-2016, *Environ. Toxicol. Chem.* 36 (2016) 1716–1727, <http://dx.doi.org/10.1002/etc.3626>.
- [2] I. Xagorarakis, D. Kuo, Water pollution: emerging contaminants associated with drinking water, *Int. J. Environ. Res. Publ. Health* 6 (2008) 539–550, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-012373960-5.00292-6>.
- [3] F.O. Agunbiade, B. Moodley, Pharmaceutical as emerging organic contaminants in Umgeni River water system, KwaZulu-Natal, South Africa, *Environ. Monit. Assess.* 186 (2014) 7273–7291, <http://dx.doi.org/10.1007/s10661-014-3926-z>.
- [4] A.B.A. Boxall, L.A. Fogg, P. Kay, P.A. Blackwell, E.J. Pemberton, A. Croxford, Prioritisation of veterinary medicines in the UK environment, *Toxicol. Lett.* 142 (2003) 207–218, [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00067-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00067-5).
- [5] P. Bottoni, S. Caroli, A.B. Caracciolo, Pharmaceuticals as priority water contaminants, *Toxicol. Environ. Chem.* 92 (2010) 549–565, <http://dx.doi.org/10.1080/02772241003614320>.
- [6] C. Song, C. Zhang, L. Fan, L. Qiu, W. Wu, S. Meng, G. Hu, B. Kamira, J. Chen, Occurrence of antibiotics and their impacts to primary productivity in fishponds around Tai Lake, China, *Chemosphere* 161 (2016) 127–135, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.009>.
- [7] R. Oliveira, S. McDonough, J.C.L. Ladewig, A.M.V.M. Soares, A.J.A. Nogueira, I. Domingues, Effects of oxytetracycline and amoxicillin on development and biomarkers activities of zebrafish (*Danio rerio*), *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36 (2013) 903–912, <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2013.07.019>.
- [8] M. González-Pleiter, S. Gonzalo, I. Rodea-Palomares, F. Leganés, R. Rosal, K. Boltes, E. Marco, F. Fernández-Piñas, Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: implications for environmental risk assessment, *Water Res.* 47 (2013) 2050–2064.
- [9] Y. Zhong, Z.F. Chen, X. Dai, S.S. Liu, G. Zheng, X. Zhu, S. Liu, Y. Yin, G. Liu, Z. Cai, Investigation of the interaction between the fate of antibiotics in aquafarms and their level in the environment, *J. Environ. Manag.* 207 (2018) 219–229.
- [10] M. Pan, L.M. Chu, Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in soils from wastewater irrigation areas in the Pearl River Delta region, southern China, *Sci. Total Environ.* 624 (2018) 145–152, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.008>.
- [11] J.L. Magalhães, S. Borschiver, Amoxicillin and Ampicillin: import trends and increasing use in Brazil, *Chim. Oggi-Chem. Today* 30 (2012) 91–93.
- [12] A. Pérez-Parada, A. Agüera, M.M. Gómez-Ramos, J.F. García-Reyes, H. Heinzen, A.R. Fernández-Alba, Behavior of amoxicillin in wastewater and river water: identification of its main transformation products by liquid chromatography/electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass*

- Spectrom. 25 (2011) 731–742, <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.4902>.
- [13] C. Carballeira, M.R. Orte, I.G. Viana, T.A. DelValls, A. Carballeira, Assessing the toxicity of chemical compounds associated with land-based marine fish farms: the sea urchin embryo bioassay with *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula*, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 63 (2012) 249–261.
- [14] S. Park, K. Choi, Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems, Ecotoxicology 17 (2008) 526–538, <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-008-0209-x>.
- [15] T.B. Minh, H.W. Leung, I.H. Loi, W.H. Chan, M.K. So, J.Q. Mao, D. Choi, J.C.W. Lam, G. Zheng, M. Martin, J.H.W. Lee, P.K.S. Lam, B.J. Richardson, Antibiotics in the Hong Kong metropolitan area: ubiquitous distribution and fate in victoria harbour, marine poll, Bulletin 58 (2009) 1052–1062, <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.02.004>.
- [16] A.J. Watkinson, E.J. Murby, D.W. Kolpin, S.D. Costanzo, The occurrence of antibiotics in an urban watershed: from wastewater to drinking water, Sci. Total Environ. 407 (2009) 2711–2723, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.059>.
- [17] J. Yin, Z. Meng, M. Du, C. Liu, M. Song, H. Wang, Pseudo-template molecularly imprinted polymer for selective screening of trace β -lactam antibiotics in river and tap water, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 5420–5426, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.06.044>.
- [18] M.A.F. Locatelli, F.F. Sodr , W.F. Jardim, Determination of antibiotics in brazilian surface waters using liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 60 (2011) 385–393, <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-010-9550-1>.
- [19] I. Sir s, E. Brillas, Remediation of water pollution caused by pharmaceutical residues based on electrochemical separation and degradation technologies: a review, Environ. Int. 40 (2012) 212–229, <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2011.07.012>.
- [20] B.G. Padilla-Robles, A. Alonso, S.A. Martínez-Delgadillo, M. González-Brambila, U.J. Ja regui-Haza, J. Ramírez-Muñoz, Electrochemical degradation of amoxicillin in aqueous media, Chem. Eng. Process 94 (2015) 93–98, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cep.2014.12.007>.
- [21] F. Sopaj, M.A. Rodrigo, N. Oturan, F.I. Podvorica, J. Pinson, M.A. Oturan, Influence of the anode materials on the electrochemical oxidation efficiency. Application to oxidative degradation of the pharmaceutical amoxicillin, Chem. Eng. J. 262 (2015) 286–294, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2014.09.100>.
- [22] Z. Frontistis, M. Antonopoulou, D. Venieri, I. Konstantinou, D. Mantzavinos, Borondoped diamond oxidation of amoxicillin pharmaceutical formulation: statistical evaluation of operating parameters, reaction pathways and antibacterial activity, J. Environ. Manag. (2016) 1–10, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.04.035>.
- [23] S.O. Ganiyu, N. Oturan, S. Raffy, M. Cretin, R. Esmilaire, E. van Hullebusch, G. Esposito, M.A. Oturan, Sub-stoichiometric titanium oxide (Ti4O7) as a suitable ceramic anode for electrooxidation of organic pollutants: a case study of kinetics, mineralization and toxicity assessment of amoxicillin, Water Res. 106 (2016) 171–182, <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2016.09.056>.
- [24] F.C. Moreira, R.A.R. Boaventura, E. Brillas, V.J.P. Vilar, Electrochemical advanced oxidation processes: a review on their application to synthetic and real wastewaters, Appl. Catal. B Environ. 202 (2017) 217–261, <http://dx.doi.org/10.1016/j.apcatb.2016.08.037>.
- [25] Y. Juang, E. Nurhayati, C. Huang, J.R. Pan, S. Huang, A hybrid electrochemical advanced oxidation/microfiltration system using BDD/Ti anode for acid yellow 36 dye wastewater treatment, Separ. Purif. Technol. 120 (2013) 289–295, <http://dx.doi.org/10.1016/j.sepr.2013.05.002>.

doi.org/10.1016/j.seppur.2013.09.042.

[26] OECD, Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Publishing, 2013.

[27] C.B. Kimmel, W.W. Ballard, S.R. Kimmel, B. Ullman, T.F. Schilling, Stages of embryonic development of the zebrafish, *Dev. Dynam.* 203 (1995) 253–310.

[28] A. Clairborne, Catalase activity, in: G. RA (Ed.), *CRC Handbook of Methods in Oxygen Radical Research*, CRC Press, 1985, pp. 283–284.

[29] W.H. Habig, W.B. Jakoby, Assays for differentiation of glutathione S-transferases, *Meth. Enzymol.* 77 (1981) 398–405.

[30] M.F. Frasco, L. Guilhermino, Effects of dimethoate and beta-naphthoflavone on selected biomarkers of *Poecilia reticulata*, *Fish Physiol. Biochem.* 26 (2002) 149–156.

[31] A. Vassault, Lactate Dehydrogenase. *Methods of Enzymatic Analysis*, Enzymes: Oxireductases, Transferase, Academic Press, 1983, pp. 118–126.

[32] T.C. Diamantino, E. Almeida, A.M.V.M. Soares, L. Guilhermino, Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* straus, *Chemosphere* 45 (2001) 553–560.

[33] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.

[34] J.M. Campelo, T.D. Conesa, M.J. Gracia, M.J. Jurado, R. Luque, J.M. Marinas, A.A. Romero, Microwave facile preparation of highly active and dispersed SBA-12 supported metal nanoparticles, *Green Chem.* 10 (2008) 853–858, <http://dx.doi.org/10.1039/B801754A>.

[35] A.M. Balu, D. Dallinger, D. Obermayer, J.M. Campelo, A.A. Romero, D. Carmona, F. Balas, K. Yohida, P.L. Gai, C. Vargas, C.O. Kappe, R. Luque, Insights into the microwave-assisted preparation of supported iron oxide nanoparticles on silica-type mesoporous materials, *Green Chem.* 14 (2012) 393–402, <http://dx.doi.org/10.1039/c1gc16119a>.

[36] G.S. Lobón, A. Yepez, L.F. Garcia, R.L. Morais, B.G. Vaz, V.V. Carvalho, G.A.R. Oliveira, R. Luque, E.S. Gil, Efficient electrochemical remediation of microcystin-LR in tap water using designer TiO₂@carbon electrodes, *Sci. Rep.* 7 (2017) 41326, <http://dx.doi.org/10.1038/srep41326>.

[37] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-s27 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, (2017).

[38] Y. Morita, J. Tomida, Y. Kawamura, Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials, *Front. Microbiol.* 4 (2014) 422, <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2013.00422>.

[39] R. Andreozzi, V. Caprio, C. Ciniglia, M. Champdoré, R. Giudice, R. Marotta, E. Zuccato, Antibiotics in the environment: occurrence in Italian STPs, fate, and preliminary assessment on algal toxicity of amoxicillin, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 6832–6838, <http://dx.doi.org/10.1021/es049509a>.

[40] R.M. Reda, R.E. Ibrahim, E.N.G. Ahmed, Z.M. El-Bouhy, Effect of oxytetracycline and florfenicol as growth promoters on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*, *Egypt. J. Aquat. Res.* 39 (2013) 241–248, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejar.2013.12.001>.

[41] H.Y. Done, A.K. Venkatesan, R.U. Halden, Does the recent growth of aquaculture create antibiotic resistance threats different from those associated with land animal production in agriculture? *AAPS J.* 17 (2015) 513–524, [http://dx.doi.org/10.1208/L.B. Brito et al. *Chemico-Biological Interactions* 291 \(2018\) 162–170](http://dx.doi.org/10.1208/L.B. Brito et al. <i>Chemico-Biological Interactions</i> 291 (2018) 162–170)
169s 12248-015-9722-z.

- [42] T.S. Andrade, J.F. Henriques, A.R. Almeida, A.L. Machado, O. Koba, P.T. Giang, A.M.V.M. Soares, I. Domingues, Carbendazim exposure induces developmental, biochemical and behavioural disturbance in zebrafish embryos, *Aquat. Toxicol.* 170 (2016) 390–399, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.017>.
- [43] F.R. Abe, C. Gravato, A.M.V.M. Soares, D.P. Oliveira, Biochemical approaches to assess oxidative stress induced by exposure to natural and synthetic dyes in early life stages in zebrafish, *J. Toxicol. Environ. Health* 80 (2017) 1259–1268.
- [44] C.L.G. Rivero-Wendt, R. Oliveira, M.S. Monteiro, I. Domingues, A.M.V.M. Soares, C.K. Grisolia, Steroid androgen 17 α -methyltestosterone induces malformations and biochemical alterations in zebrafish embryos, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 44 (2016) 107–113, <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2016.04.014>.
- [45] C. Quintaneiro, D. Patrício, S.C. Novais, A.M.V.M. Soares, M.S. Monteiro, Endocrine and physiological effects of linuron and S-metolachlor in zebrafish developing embryos, *Sci. Total Environ.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.153>.
- [46] S. Coelho, R. Oliveira, S. Pereira, C. Musso, I. Domingues, R.C. Bhujel, A.M.V.M. Soares, A.J.A. Nogueira, Assessing lethal and sub-lethal effects of trichlorfon on different trophic level, *Aquat. Toxicol.* 103 (2011) 191–198, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.03.003>.
- [47] R.A. Baricatti, C. Silva, M.L. Souza, C.A. Lindino, M.F. Rosa, Degradação hidrolítica e fotoquímica da amoxicilina na presença de β -ciclodextrina, *Ecl. Quimera* 33 (2008) 79–84, <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-46702008000400010>.
- [48] A. Thiam, M. Zhou, E. Brillas, I. Sirés, Two-step mineralization of Tartrazine solutions: study of parameters and by-products during the coupling of electrocoagulation with electrochemical advanced oxidation processes, *Appl. Catal. B Environ.* 150 (2014) 116–125, <http://dx.doi.org/10.1016/j.apcatb.2013.12.011>.
- [49] C. Carvalho, A. Fernandes, A. Lopes, H. Pinheiro, I. Gonçalves, Electrochemical degradation applied to the metabolites of Acid Orange 7 anaerobic biotreatment, *Chemosphere* 67 (2007) 1316–1324.
- [50] P.K. Brahman, R.A. Dar, K.S. Pitre, Conducting polymer film based electrochemical sensor for the determination of amoxicillin in micellar media, *Sensor. Actuator. B.* 176 (2013) 307–314, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2012.09.007>.
- [51] D. Dimitrakopoulou, I. Rethemiotaki, Z. Frontistis, N.P. Xekoukoulotakis, D. Venieri, D. Mantzavinos, Degradation, mineralization and antibiotic inactivation of amoxicillin by UV-A/TiO₂ photocatalysis, *J. Environ. Manag.* 98 (2012) 168–174, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.01.010>.
- [52] Y.J. Jung, W.G. Kim, Y. Yoon, J.W. Kang, Y.M. Hong, H.W. Kim, Removal of amoxicillin by UV and UV/H₂O₂ processes, *Sci. Total Environ.* 420 (2012) 160–167, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.12.011>.
- L.B. B

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a técnica empregada é eficiente na remoção de AMX além de fornecer informações sobre os possíveis efeitos tóxicos quando expostos a organismos aquáticos.

O eletrodo carbono modificado com óxido de titânio [TiO₂ @ C]) apresentou alta eficiência, levando à remoção completa de amoxicilina em menos de 10 minutos, a maior eficiência de remoção de AMX foi obtida com o eletrólito NaCl.

Nossas descobertas revelaram que, o tratamento de AMX com água de torneira removeu 42,8% do fármaco e não era tóxico para o peixe. Houve 99% de remoção de AMOX com 0,1 M NaCl, no entanto os subprodutos produziram efeitos letais e subletais no zebrafish. Enquanto o tratamento com 0,01 M NaCl removeu 70% do fármaco e não causou toxicidade no zebrafish. No entanto a EO com o eletrólito Na₂SO₄ removeu 75% mas induziu toxicidade.

O tratamento eletroquímico de AMOX possui poucos efeitos agudos na populações de peixes selvagens, mas efeitos a longo prazo precisam ser investigados, haja vista que, o fármaco afetou o desenvolvimento do zebrafish e a atividade enzimática de biomarcadores.

Considerando esses efeitos tóxicos e o problema dos antibióticos resistentes, realizamos a EO da AMX, e a atividade antimicrobiana da AMOX foi reduzida após o tratamento eletroquímico, tanto que nas cepas utilizadas, foi necessária uma concentração 250 vezes maior para produzir efeito antibacteriano na *Escherichia coli* após o tratamento. A técnica mostrou ser eficiente na degradação da amoxicilina.

8 REFERÊNCIAS

- AGUNBIADE, F. O.; MOODLEY, B. Pharmaceutical as emerging organic contaminants in Umgeni River water system, KwaZulu-Natal, South Africa. **Environ Monit Assess**, v. 186 p. 7273-7291, 2014.
- ARAÚJO, S. K.; ANTONELLI, R.; GAYDECZKA, B.; GRANATO, A. C.; POINTER, M. G. R. Processos oxidativos avançados: uma revisão de fundamentos e aplicações no tratamento de águas residuais urbanas e efluentes industriais. **Rev. Ambient. Água**, Taubaté , v. 11, n. 2, p. 387-401, June 2016 .
- AY, F.; KARGI, F.; Advanced oxidation of amoxicillin by Fenton's reagent treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 179, p. 622-627, 2010.
- BISOGNIN, R. P.; WOLFF, D. B.; CARISSIMI, E. Revisão sobre fármacos no ambiente. **Revista DAE**, n. 210, v. 67, p. 78-97, 2018.
- BORBA, et al. Desenvolvimento e validação de um método analítico por espectrofotometria UV para quantificação de carvedilol. **Química Nova**, v. 36, n. 4, p. 582-586, 2013.
- BOXALL, A. B. A. The environmental side effects of medication. **European Mol. Biol. Org**, v. 5, p. 1110 – 1116, 2004.
- BRASIL. “Dados regionais”, TrataBrasil. Disponível em <<http://www.tratabrasil.org.br/saneamento/principais-estatisticas/no-brasil/dados-regionais>>. Acesso em 20 de fevereiro de 2019.
- CALAÇA, G.N.; STETS, S.; NAGATA, N. Determinação simultânea de ácido kójico e hidroquinona por espectrofotometria visível e calibração multivariada. **Quim. Nova** 2011, 34, 630–635.
- CALDAS, S. S.; BOLZAN, C. M.; GUILHERME, J.R.; SILVEIRA, M. A. K.; ESCARRONE, A. L. V. & PRIMEL, E. G. “Determination of pharmaceuticals, personal care products and pesticides in surface and treated waters: method development and survey”. **Environ. Sci. Pollut**, v. 20, p. 58-55, 2013.

CAMPELO, J. M.; CONESA, T.D.; GRACIA, M.J.; JURADO, M.J.; LUQUE, R.; MARINAS, J.M.; ROMERO, A.A. Microwave facile preparation of highly active and dispersed SBA-12 supported metal nanoparticles, **Green Chem.** v. 10, 2008.

CARBALLEIRA, C.; ORTE, M. R.; VIANA, I. G.; DELVALLS, T. A.; CARBALLEIRA, A. Assessing the toxicity of chemical compounds associated with land-based marine fish farms: the sea. **Arch Environ Contam Toxicol** v. 63, p. 249–261, 2012.

CARLSSON, G.; ORN, S.; LARSSON, D.G.J. Effluent from bulk drug production is toxic to aquatic vertebrates. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 12, p. 2656–2662, 2009.

CHANG, X.; MEYER, M.T.; LIU, X.; ZHAO, Q.; CHEN, H.; CHEN, J.; QIU, Z.; YANG, L.; CAO, J.; SHU, W. Determination of antibiotics in sewage from hospitals, nursery and slaughter house, wastewater treatment plant and source water in Chongqing region of Three Gorge Reservoir in China. **Environ. Pollut**, v. 158, p. 1444-1450, 2010.

CHEN, X. Electrochemical Technologies in wastewater treatment. **Separatio and Purification Technology**. V. 38, p. 11-41, 2004.

CLAIRBORNE, A. Catalase activity, in: G. RA (Ed.), CRC Handbook of Methods in Oxygen Radical Research, CRC Press, 1985, pp. 283–284.

Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-s27 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, (2017).

CONTRERAS, N.; VIDAL, J.; BERRIOS, C.; VILLEGAS, L.; SALAZAR, R. Degradation of antihypertensive hydrochlorothiazide in water from pharmaceutical formulations by electro-oxidation using a BDD anode. **Int. J. Electrochem.** v. 10, p. 9269- 9285, 2015.

CRANE, M.; WATTS, C.; BOUCARD, T. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. **Sci Total Environ**, v.367, n.1, p.23-41, 2006.

DBSKA, J., KOT-WASIK, A. e NAMIENIK, J. Fate and Analysis of Pharmaceutical Residues in the Aquatic Environment, **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 34, p. 51 – 67, 2004.

D'COSTA, A.; SHEPHERD, I.T. Zebrafish development and genetics: introducing undergraduates to developmental biology and genetics in a large introductory laboratory class. **Zebrafish**. n.2, v.6, p.169-77, Jun. 2009.

Di Paolo, C.; Groh, K. J.; Zennegg, M.; Vermeirssen, E. L.; Murk, A. J.; Eggen, R. I.; Hollert, H.; Werner, I.; Schirmer, k. Early life exposure to PCB126 results in delayed mortality and growth impairment in the zebrafish larvae. **Aquatic Toxicology**, v.169, p. 168–178, 2015.

DIAMANTINO, T.C.; ALMEIDA, E.; SOARES, A.M.V.M.; GUILHERMINO, L. Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* traus, **Chemosphere**. v. 45, p. 553–560, 2001.

DÍAZ-CRUZ, M.S.; LOPEZ, M.J.A.; BARCELO D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. **Trends in Analytical chemistry**, v.22, n. 6, p. 340-351, 2003.

Environment. **American Journal of Drug Discover**, v.1, p. 10-24, 2014.

ESPINOZA, C.; CONTRERAS, N.; BERRIOS, C.; SALAZAR, R. Degradation of a veterinary pharmaceutical product in water by electro-oxidation using a BDD anode. **J. Chil. Chem. Soc.** V. 59, p. 2507-2511, 2014.

FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquat Toxicol**, v.76, n.2, p.122-59, 2006.

FERNANDES, R.; AMADOR, P. E PRUDÊNCIO, C. β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. **Reviews in Medical Microbiology**, 24, p. 7-17, 2013.

FLOATE, K. D.; WARDHAUGH, K. G.; BOXALL, A. B. A.; SHERRATT, T. N. Faecal residues of veterinary parasiticides: non-target effects in the pasture environment. **Annu. Rev. Entomol**, v.50, p.153-179, 2005.

FRASCO, M. F.; GUILHERMINO, F. Effects of dimethoate and beta-naphthoflavone on selected biomarkers of *Poecilia reticulata*, Fish. **Physiol. Biochem**, v. 26, p. 149- 156, 2002.

FREIRE, R. S. PELEGRINI, R.; KUBOTA, L. T.; DURÁN, N.; PERALTA-ZAMORA, P. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. **Química Nova**. V 4, p. 504-511. 2000.

FRONTISTIS, Z.; ANTONOPOULOU, M.; VENIERI, D.; KONSTANTINOU, I.; MANTZAVINOS, D. Borondoped diamond oxidation of amoxicillin pharmaceutical formulation: statistical evaluation of operating parameters, reaction pathways and antibacterial activity, **J. Environ. Manag**, v. 195, p. 100-109, 2016.

GANIYU, S.; OTURAN, N.; RAFFY, S.; CRETIN, M.; ESMILAIRE, R.; VAN, H. E.; ESPOSITO, G.; OTURAN, M. A. Sub-stoichiometric titanium oxide (Ti₄O₇) as a suitable ceramic anode for electrooxidation of organic pollutants: A case study of kinetics, mineralization and toxicity assessment of amoxicillin. **Water Res**, v. 106, p. 171-182, 2016.

GIL, E. S.; MELO, G. R. Electrochemical biosensors in pharmaceutical analysis. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46 (3), 375-391, 2010.

GIRI, P.; PAL, C. Ecotoxicological aspects of pharmaceuticals on aquatic **Chemosphere**, v.75, p.417– 434, 2009.

GUIMARAES, D. O.; MOMESSO, L.; PUPO, M.T .. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quím. Nova**. São Paulo, v. 33, n. 3, 2010.

GONÇALVES, D. et al. Voltametria De Pulso Diferencial (VPD) em Estado Sólido de Manchas de Cromatografia de Camada Delgada (CCD): Um Novo Método De Análise Para Fitoativos Antioxidantes. *Química Nova*, 34, 2, 330-334, 2011.

HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Method. Enzymol.* v. 77, p. 398- 405, 1981.

IDE, A. H. Produtos Farmacêuticos e de Higiene Pessoal no Rio Iguaçu e seus Afluentes. Curitiba, 119 p., 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

JAMES, C. A.; MILLER-SCHULZE, J. P.; ULTICAN, S.; JIPE, A. D.; BAKER, J. E Evaluating Contaminants of Emerging Concern as tracers of wastewater from septic systems. **Water Research.** v.101, p. 241-251, 2016

KIMMEL, C. B.; BALLARD, W.W.; KIMMEL, S.R.; ULLMAN, B.; SCHILLING, T.F. Stages of embryonic development of the zebrafish, **Dev. Dynam**, v. 203, p. 253- 310, 1995.

KLAVARIOTI, M.; MANTZAVINOS, D.; KASSINOS, D. Review article. Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. **Environment International**, v. 35, p. 402–417. 2009.

KOBYA, M.; Hiz, H.; SENTURK, E.; AYDINER, C.; DEMIRBAS, E. Treatment of potato chips manufacturing wastewater by electrocoagulation. **Desalination.** v. 190, p. 201–211. 2006.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. LAMMER, E.; CARR, G. J.; WENDLER, K.; RAWLINGS, J. M.; BELANGER, S. E.; BRAUNBECK, T. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, n.2, v.149, p. 196–209, 2009.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LLORCA, M.; FARRÉ, M. ELIARRAT, E. DÍAS-CRUZ, S. RODRÍGUEZ-MOZAZ, S. WUNDERLIN, D. BARCELO, D. Review of emerging contaminants in aquatic biota from Latin America: 2002-2016. **Environ Toxicol Chem**, 2016.

MAGALHÃES J. L.; BORSCHIVER S. Amoxicillin and Ampicillin: Import trends and increasing use in Brazil. **Chemistry Today**, v. 30, p. 91–93, 2012.

MASCOLO, G. BALEST, L., CASSANO, D., LAERA, G., LOPEZ, A., POLLICE, A., SALERMO, C., Biodegradability of pharmaceutical industrial wastewater and formation of recalcitrant organic compounds during aerobic biological treatment. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2585-2591, 2010.

MARCIONILIO, S. M. L. O.; BARROS, V. S; LÉON, J. J. L. Avaliação da coagulação química e eletrocoagulação no tratamento de efluente de polo farmacêutico. *RQI- Revista Química Industrial*, n. 749, p. 22-31, 2015.

MATSUMURA, E. M.; MIERZWA, J. C. Water conservation and reuse in poultry processing plant - A case study. Review article. **Resources, Conservation and Recycling**, Volume 52, Issue 6, April 2008, Pages 835-842

MIGOWSKA, N.; CABAN, M.; STEPNOVSKI, P.; KUMIRSKA, J. Simultaneous analysis of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and estrogenic hormones in water and wastewater samples using gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography with electron capture detection. **Science of the Total Environment**, v. 441, p. 77-88, 2012.

MINH, T. B.; LEUNG, H. W.; LOI, I. H.; CHAN, W. H.; SO, M. K.; MAOB, J. Q.; CHOI, D.; LAM, J. C. W.; ZHENG, G.; MARTIN, M.; LEE, J. H. W.; LAM, P. K. S.; RICHARDSON, B. J. Antibiotics in the Hong Kong metropolitan area: Ubiquitous distribution and fate in Victoria Harbour. **Marine Poll. Bulletin**, v. 58 p. 1052–1062, 2009.

MORENO-CASILLAS, H. A., COCKE, D. L., GOMES, J. A. G., MORKOVSK, P., PARGA, J. R., PETERSON, E. Electrocoagulation mechanism for COD removal. **Separation and Purification Technology** v. 56, p. 204-211, 2007.

NAGEL, R. Dart: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* — a general model in ecotoxicology and toxicology. **ALTEX**. n.1, p. 38-48, 2002.

OECD, Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Publishing,

OLIVEIRA, R.; MCDONOUGH, S.; LADEWIG, J. C. L.; SOARES, A. M. V. M.; NOGUEIRA, A. J. A.; DOMINGUES, I. Effects of oxytetracycline and amoxicillin on development and biomarkers activities of zebrafish (*Daniorerio*). **Environ Toxicol Phar** v. 3, p. 903–912, 2013.

OLIVEIRA-NETO, J. R.; REZENDE, S. R.; REIS, C. F.; BENJAMIN, S. R.; ROCHA, M. L.; GIL, E. S. Electrochemical behavior and determination of major phenolic antioxidants in selected coffee samples. *Food Chemistry*, 190, 506-512, 2011.

ONESIOS, K. M., YU, J. T., BOUWER, E. J., Biodegradation and removal of pharmaceuticals and personal care products in treatment systems: a review. **Biodegradation**, v. 20, p. 441-466, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE / UNICEF. Progress on Sanitation and Drinking-Water, 2015.

PADILLA-ROBLES, B.G.; ALONSO, A.; MARTINEZ-DELGADILLO, S. A.; GONZALEZ-BRAMBILA, M.; JAUREGUI-HAZA, U. J.; RAMIREZ-MUNOZ, J.; Electrochemical degradation of amoxicillin in aqueous media. **Chem. Eng. Process**, v. 94, p. 93- 98, 2015.

PANIZZA, M.; CERISOLA, G. Direct And Mediated Anodic Oxidation of Organic Pollutants. **Chemical Reviews**. v. 109, p. 6541-6549. 2009.

PÉREZ-PARADA, A.; AGÜERA, A.; GÓMEZ-RAMOS, M. D. E. L. M.; GARCÍA-REYES. J. F.; HEINZEN, H.; FERNÁNDEZ, A. A. R. Behavior of amoxicillin in wastewater and river water: identification of its main transformation products by liquid chromatography/ electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Sp**, v. 25, p. 731-742, 2011.

PHILLIPI JR. A., ROMÉRIO, M. A., BRUNA, G. C., (Eds). **Curso de Gestão Ambiental**. Barueri – SP, Editora Manole. 1ª ed., v. 01, p. 1045 , 2004. Cap. 3 – Controle Ambiental da Água p. 70-78.

QUAND-MEME, G.C.; AUGUSTE, A.F.T.; HELENE, L.E.M.; IBRAHIMA, S. LASSINE, O. Electrochemical oxidation of amoxicillin in its pharmaceutical formulation at boron doped diamond (BDD) electrode. **J. Electrochem. Sci. Eng.** v. 5, p. 129-143. 2015.

SANTOS, D.; PACHECO, M.J.; GOMES, A.; LOPES, A.; CIRIACO, L. Preparation of Ti/Pt/SnO₂eSb₂O₄ electrodes for anodic oxidation of pharmaceutical drugs. **J. Appl. Electrochem**, v. 43, p. 407-416, 2013.

SÄRKKÄ, H.; BHATNAGAR, A.; SILLANPÄÄ, M. Recent developments of electro-oxidation in water treatment –A Review. **Journal of electroanalytical chemistry**, v. 754, p. 46-56, 2015.

SAUVÉ, S.; DESROSIERS, M. A review of what is an emerging contaminant. **Chemistry Central Journal**, n.8, v.15, 2014.

SCHOLZ, S.; SELA, E.; BLAHA, G.; BRAUNBECK, T et al., A European perspective on alternatives to animal testing for environmental hazard identification and risk assessment. **Regul. Toxicol. Pharm.** n.3, v.67, p.506-30, 2013.

SENGIL, I.; ÖZACAR, A. M. Treatment of dairy wastewaters by electrocoagulation using mild steel electrodes. **Journal of Hazardous Materials** v. 137, p. 1197–1205, 2006.

SIM, W. J.; LEE, J. W.; LEE, E. S.; SHIN, S. K.; HWANG, S. R.; OH, J. E. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. **Chemosphere**, v. 82, p. 179-186, 2011.

SIRES, I., BRILLAS, E. Remediation of water pollution caused by pharmaceutical residues based on electrochemical separation and degradation technologies: A review. **Environment International**, p. 18, 2011.

SIRES, I.; BRILLAS, E. Remediation of water pollution caused by pharmaceutical residues based on electrochemical separation and degradation technologies: A review. **Environment international**, v. 40, P. 212–229, 2012.

SONG, C.; ZHANG, C.; FAN, L.; QIU, L.; WU, W.; MENG, S.; HU, G.; KAMIRA, B.; CHEN, J. Occurrence of antibiotics and their impacts to primary productivity in fishponds around Tai Lake, China, **Chemosphere**, v. 161 p. 127-35, 2016.

SOPAJ, F.; RODRIGO, M.A.; OTURAN, N.; PODVORICA, F.I.; PINSON, J.; OTURAN, M. A. Influence of the anode materials on the electrochemical oxidation efficiency. Application to oxidative degradation of the pharmaceutical amoxicillin. **Chem. Eng. J.** v. 262, p. 286-294, 2015.

STUART, M.; LAPWORTH, D.; CRANE, E.; HART, A. Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. **Sci. Total Environ**, n.1-21, v. 416, 2012.

SUAREZ, C.; E GUDIOL, F. Beta-lactam antibiotics. *Enfermedades Infecciosas. Microbiologia Clinica*, 27, pp. 116-129, 2009.

TEIXEIRA, R. B.; MARQUES, C. A.; CARVALHO, N. R.; GOMES, L. E.; THANS, S. F. T. P.; TERESA, C. B. Determinação de hormônios estrogênicos em esgoto bruto e efluente de uma estação descentralizada de tratamento por lodos ativados. **Revista Ambiente & Água**, v. 13 n. 2, p. 20-59, 2018.

TERNES, T. A.; JOSS, A.; SIEGRIST, H. Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. **Environmental Science and Technology**, v. 38 n. 20, p 392A–399A, 2004.

ULUKAYA, E.; ACILAN, C.; YILMAZ, Y. Apoptosis: why and how does it occur in biology. **Cell Biochem. Funct.** n.6, v.29, p. 468-480, 2011.

ULUKAYA, E.; ACILAN, C.; YILMAZ, Y. Apoptosis: why and how does it occur in biology. **Cell Biochem. Funct.** n.6, v.29, p. 468-480, 2011.

VASSAULT, A. Lactate dehydrogenase. Methods of enzymatic analysis, enzymes: oxireductases, transferase, **Academic Press**, p. 118- 126, 1983.

WENZEL, R. P.; EDMOND, M. B. Managing antibiotic resistance. **N Engl J Med**, v. 343, p.1961-1963, 2000.

WILDE, M. L.; KUMMERER, K.; MARTINS, A. F. “Multivariate optimization of analytical methodology and a first attempt to an environmental risk assessment of β -blockers in hospital wastewater”. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 23, p. 1732, 2012.

WILKE, M. S.; LOVERING, A. L.; STRYNADKA, N. C. J. Beta-Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 525-533, 2005.

ZUCCATO, E.; CASTIGLIONI, S.; BAGNATI, R.; MELIS, M.; FANELLI, R. Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment. **J. Hazard. Mater.** v. 179, p. 1042-1048, 2010.

Anexo 1 – Normas para publicação – Artigo 1



CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS

A journal of molecular, cellular and biochemical toxicology

AUTHOR INFORMATION PACK

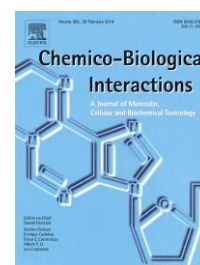
TABLE OF CONTENTS

- Description p.1
- Audience p.1
- Impact Factor p.2
- Abstracting and Indexing p.2
- Editorial Board p.2
- Guide for Authors p.4

ISSN: 0009-2797

Disponível online em:

<https://www.elsevier.com/journals/chemico-biological-interactions/00092797/guide-for-authors>



Anexo 2 – Parecer do Comitê de Ética (Caro o projeto tenha sido submetido a algum Comitê de Ética em Pesquisa).



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 08 de Dezembro de 2014.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO PROTOCOLO N. 102/14.

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Iniciação Científica (IC) e Dissertação de mestrado.

II - Identificação:

- ☐ **Título do projeto:** Avaliação ecotoxicológica e toxicogenética de contaminantes emergentes presentes em sistemas hídricos.
- ☐ **Pesquisador Responsável/ Unidade:** Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira.
- ☐ **Pesquisadores Participantes:** Aline Rangel Silva Araújo (IC) e Lara Barroso Brito (Dissertação).
- ☐ **Unidade onde será realizado:** Faculdade de Farmácia/UFG.
- ☐ **Data de apresentação a CEUA:** 06/11/2014.

III - Objetivos e justificativa do projeto: Esse trabalho propõe avaliar os impactos ambientais e para saúde humana, provocados pela presença de contaminantes emergentes (fármacos, praguicidas e corantes têxteis) em sistemas hídricos, empregando ensaios ecotoxicológicos e toxicogenéticos com células HepG2 (células derivadas de um hepatoblastoma) e embriões/larvas de zebrafish (*Danio rerio*).

IV - Sumário do projeto:

- ☐ **Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:** A avaliação da toxicidade de contaminantes emergentes pode ser realizada com culturas celulares e bactérias como método alternativo à experimentação animal. Células HepG2, provenientes de hepatoblastoma humano serão utilizadas nesse projeto para avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade desses contaminantes, entretanto os testes *in vitro* são limitados pelo tempo de exposição (máximo de 72 horas). Esse projeto também propõe o ensaio de mutagenicidade com *Salmonella*/microsoma, que se limita a avaliação de apenas um endpoint de toxicidade, que é a mutagenicidade em bactéria *Salmonella typhimurium*. Assim, para ampliar os endpoints avaliados, ou seja, analisar os efeitos letais (mortalidade), subletais (malformações) e genotóxicos (danos ao DNA), assim como aumentar o tempo de exposição aos contaminantes simulando uma exposição subcrônica, esse projeto pretende utilizar embriões e larvas de zebrafish. O ensaio de toxicidade com embriões de zebrafish é uma metodologia que permite a redução ou substituição do uso de animais adultos na avaliação da ecotoxicidade.
- ☐ **Descrição do animal utilizado (número, espécie, linhagem, sexo, peso, etc):** Serão utilizados 60 animais adultos de zebrafish (*Danio rerio*), com idade entre 3 e 6 meses, que serão mantidos em 4 tanques de 15 litros com cerca de 15 peixes cada, os quais serão monitorados e mantidos em quarentena. Os peixes serão cedidos pelo Instituto de Ciências Biológicas da UnB.
- ☐ **Espécie e número total de animais utilizados:** 60 Peixes *Danio rerio* (40 machos e 20 fêmeas)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



❑ Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação: Os peixes adultos serão alocados em 4 aquários de 15L em uma sala de manutenção e reprodução, protegida de luminosidade, correntes de ar e ruídos, vibração externa, com fotoperíodo e temperatura controlada. Os parâmetros da água como temperatura, pH, condutividade, dureza, oxigênio dissolvido e dosagem de amônia e nitrito serão monitorados periodicamente. Os peixes serão alimentados 2 vezes ao dia com ração comercial para a espécie *Danio rerio*. Na semana anterior à reprodução, os peixes receberão alimento vivo (*Artemia salina*) a fim de aumentar a viabilidade dos ovos e como forma de recompensa ao acasalamento. Para aquisição dos ovos, no dia anterior à desova, peixes na proporção de 2 machos para 1 fêmea serão colocados para acasalar na presença de plantas artificiais e bolas de vidro. Esses peixes serão distribuídos em 3 tanques de 10 litros, com 6 peixes machos e 3 fêmeas, por tanque, totalizando 9 peixes em cada aquário, com o intuito de obter pelo menos 200 ovos por reprodução. Cerca de 30 minutos após a desova os ovos serão coletados e analisados para o descarte dos ovos não fertilizados e seleção daqueles que alcançaram o estágio de blástula. Os ensaios para avaliação dos endpoints letais, subletais e genotóxicos serão realizados em triplicata para cada substância-teste (um antibiótico, um herbicida a base de glifosato e um azo corante), sendo necessários grupos de peixes distintos para cada reprodução e fêmeas com pelo menos uma semana de intervalo entre as reproduções. De acordo com a OECD, por réplica, serão expostos 168 ovos de zebrafish distribuídos em placas de 24 poços, sendo testadas cinco concentrações de cada contaminante emergente, um controle negativo, um controle interno das placas e um controle positivo, sendo necessário ao todo cerca de 2000 ovos gerados em cerca de 10 acasalamentos distintos. As placas com os ovos serão colocadas em incubadora BOD e o desenvolvimento embrionário-larval será analisado com 4, 24, 48, 72 e 96 horas de pós-fertilização, podendo se estender até 30 dias. Após finalizar a avaliação dos endpoints de subletalidade, embriões e larvas de zebrafish serão sacrificados por criomortestesia, ou seja, a anestesia por resfriamento intenso, aceita como um dos métodos para a eutanásia de zebrafish, de acordo com Guideline for Use of Zebrafish in the NIH (2009). Os ensaios toxicogenéticos *in vitro* serão realizados com células provenientes de um hepatoblastoma primário (HepG2).

❑ Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos: Não se aplica a utilização de agente infeccioso. Os riscos do referido trabalho se referem a falhas na manipulação dos equipamentos durante o período experimental. No entanto, os pesquisadores que atuarão na criação, manutenção, reprodução e análise dos embriões serão devidamente treinados para exercerem suas atividades.

❑ Adequação da metodologia e considerações sobre o sofrimento imposto aos animais: A metodologia está bem clara e devidamente detalhada, sendo tomadas todas as medidas mitigadoras para minimizar o sofrimento dos animais.

❑ Método de eutanásia: Não se aplica.

❑ Destino do animal: Não é descrito o destino dos animais adultos utilizados como reprodutores.

IV – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

❑ Quanto a documentos: Foram apresentados todos os documentos solicitados pela CEUA.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



- ☐ **Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores:** Os procedimentos de criação, manutenção e cuidados com os animais mimetizam o ambiente natural da espécie e garantem seu bem-estar. Os riscos desta pesquisa estão relacionados a falhas na manipulação de equipamentos, sendo minimizados com treinamento apropriado de toda a equipe.

V - Parecer da CEUA:

Informamos que a *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas **APROVOU** o pedido de emenda de prorrogação do prazo do projeto acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes. O pesquisador responsável deverá encaminhar à CEUA/UFG, relatórios da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões) de acordo com as recomendações da Resolução n. 01, da Lei 11.794/08.

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPPG-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para conclusão em 30/03/2018.

VI - Data da reunião: 08/12/2014


Dra. Marina Pacheco Miguel
Vice-coordenadora da CEUA-PRPPG-UFG

Apêndice 1

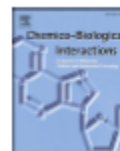
Chemico-Biological Interactions 291 (2018) 162–170



Contents lists available at ScienceDirect

Chemico-Biological Interactions

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chembioint



Electrochemical remediation of amoxicillin: detoxification and reduction of antimicrobial activity



Lara Barroso Brito^{a,1}, Luane Ferreira Garcia^{a,1}, Marcos Pereira Caetano^a, Germán Sanz Lobón^b, Mayk Teles de Oliveira^a, Rhaul de Oliveira^c, Ieda Maria Sapateiro Torres^a, Alfonso Yezpez^d, Boniek Gontijo Vaz^b, Rafael Luque^d, Cesar Koppe Grisolia^e, Marize Campos Valadares^a, Eric de Souza Gil^a, Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira^{a,f,*}

^a Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás (UFG), Goiânia, Goiás, Brazil

^b Chemistry Institute, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

^c Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, USP, São Paulo, SP, Brazil

^d Department of Organic Chemistry, University of Córdoba, Córdoba, Andalusia, Spain

^e Biological Sciences Institute, University of Brasília (UnB), Brasília, Distrito Federal, Brazil

^f National Institute for Alternative Technology of Detection, Toxicological Evaluation and Removal of Micropollutants and Radionuclides (INCT-DATREM), UNESP, Institute of Chemistry, Araraquara, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Antibiotic
Zebrafish embryo
Extended exposure
Electrochemical oxidation
Bacterial resistance

ABSTRACT

Amoxicillin (AMX) is one of the most commonly prescribed antibiotics around the world to treat and prevent several diseases in both human and veterinary medicine. Incomplete removal of AMX during wastewater treatment contributes to its presence in water bodies and drinking water. AMX is an emerging contaminant since its impact on the environment and human health remains uncertain. This contribution was aimed to evaluate the electrochemical oxidation (EO) of AMX using different anodes in tap water, NaCl or Na₂SO₄ solutions and to evaluate the potential toxicity of remaining AMX and its by-products on zebrafish early-life stages. Chemical intermediates generated after EO were determined by mass spectrometry and their resulting antimicrobial activity was evaluated. AMX did not induce significant mortality in zebrafish during extended exposure but affected zebrafish development (increased body length) from 6.25 mg/L to 25 mg/L and inhibited enzymatic biomarkers. Carbon modified with titanium oxide (TiO₂@C) anode achieved complete AMX removal in just a few minutes and efficiency of the supported electrolytes occurred in the following order: 0.1 M NaCl > 0.1 M Na₂SO₄ > 0.01 M NaCl > tap water. The order of potential toxicity to zebrafish early life-stages related to lethal and sublethal effects was as follows: 0.1 M Na₂SO₄ > 0.1 M NaCl > 0.01 M NaCl = tap water. Additionally, the EO of AMX using TiO₂@C electrode with 0.01 M NaCl was able to inhibit the antimicrobial activity of AMX, reducing the possibility of developing bacterial resistance.

