



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DO MEIO AMBIENTE

LAURIVÊ ANTÔNIO DOS SANTOS JÚNIOR

**DEGRADAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS DE USO VETERINÁRIO EM REATOR
DE CARBONIZAÇÃO HIDROTÉRMICA**

GOIÂNIA – GO
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DO MEIO AMBIENTE

LAURIVÊ ANTÔNIO DOS SANTOS JÚNIOR

**DEGRADAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS DE USO VETERINÁRIO EM REATOR
DE CARBONIZAÇÃO HIDROTÉRMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Scripto Sensu em Engenharia do Meio Ambiente da Escola
de Engenharia Civil e Ambiental da Universidade Federal
de Goiás, como requisito para obtenção do título de
Mestre em Engenharia do Meio Ambiente.

Área de Concentração: Recursos Hídricos e Saneamento
Ambiental

Orientadora: Prof. Dra. Mariângela Fontes Santiago

Co-orientador: Prof. Dr. Joachim Werner Zang

GOIÂNIA – GO
2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

dos Santos Júnior, Laurivê Antônio

Degradação de antibióticos de uso veterinário em reator de
carbonização hidrotermal [manuscrito] / Laurivê Antônio dos Santos
Júnior. - 2015.
CXVIII, 118 f.

Orientador: Profa. Dra. Mariângela Fontes Santiago; co-orientador Dr.
Joachim Werner Zang.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de
Engenharia Civil (EEC), Programa de Pós-Graduação em Engenharia
do Meio Ambiente, Goiânia, 2015.

Bibliografia.

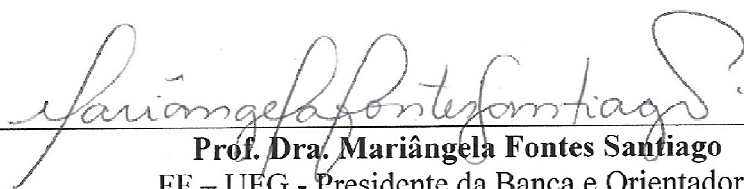
Inclui siglas, abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. antibióticos veterinários. 2. decomposição. 3. carbonização
hidrotermal. I. Fontes Santiago, Mariângela, orient. II. Werner Zang,
Joachim, co-orient. III. Título.

LAURIVÊ ANTÔNIO DOS SANTOS JÚNIOR

**DEGRADAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS DE USO VETERINÁRIO EM REATOR
DE CARBONIZAÇÃO HIDROTHERMAL**

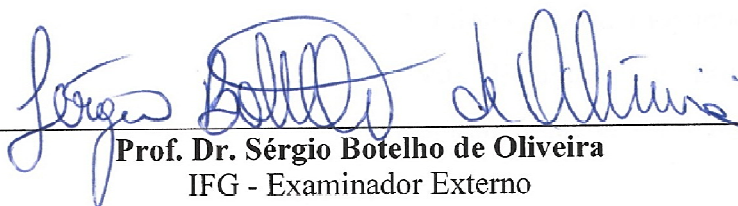
Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Meio Ambiente no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia do Meio Ambiente da Escola de Engenharia Civil e Ambiental da Universidade Federal de Goiás, como pré-requisito para a obtenção de título de Mestre em Engenharia do Meio Ambiente, aprovada em 28 de setembro de 2015, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dra. Mariângela Fontes Santiago
FF – UFG - Presidente da Banca e Orientadora



Prof. Dr. Eduardo Queija de Siqueira
EEC – UFG – Examinador Interno



Prof. Dr. Sérgio Botelho de Oliveira
IFG - Examinador Externo

À Deus, que me sustentou durante toda esta longa caminhada.

À minha esposa Lidyanne e às minhas filhas Emanuelle e Isabelle que me inspiram a querer ser mais do que fui até hoje.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Mariângela Fontes Santiago pela orientação, pelo apoio e pela oportunidade concedida.

Ao Professor Dr. Joachim Werner Zang pela co-orientação, pelos ensinamentos e pelo entusiasmo.

Aos Professores Doutores Maria Teresa Freitas Bara, José Realino de Paula e Edemilson Cardoso da Conceição por propiciarem a utilização do LPPN para a realização dos antibiogramas.

Aos Professores Dr. Alexandre Nunes Ponezi e Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder pela gentileza que possibilitou a utilização do HPLC-DAD nas dependências do CPQBA-Unicamp.

Ao Dr. Adilson Sartoratto por todo o apoio, ajuda e auxílio na realização das análises dos antibióticos utilizando o HPLC-DAD no CPQBA da Unicamp. Meu sincero agradecimento pela disponibilidade e orientação na realização das análises.

Quero agradecer a todos do CPQBA pela hospitalidade e por terem me recebido tão bem.

Ao MSc. Stone de Sá por ter me ensinado a técnica do antibiograma, pela assistência e pela vontade de ajudar sempre.

A todos os meus colegas de mestrado, em especial a Monike Fabiane Alves Ribeiro Lacerda pela amizade, apoio e colaboração em todos os momentos deste trabalho.

A todos que contribuíram de alguma forma para que esse trabalho fosse concluído.

Ao CNPq pelo auxílio concedido, que foi de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho

DOS SANTOS JÚNIOR, L. A. **Degradação de antibióticos de uso veterinário em reator de carbonização hidrotermal.** Dissertação de Mestrado. Engenharia de Meio Ambiente – Escola de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015. 118p.

RESUMO

Antibióticos são largamente utilizados na medicina humana e veterinária. Após o consumo, grande parte dos fármacos é excretada inalterada ou sob forma de metabólitos, e por intermédio dos lançamentos de estações de tratamento de esgotos, resíduos agrícolas e lixiviação, alcançam os ecossistemas naturais. A ocorrência de antibióticos nos ambientes aquáticos tem se tornado uma preocupação crescente em todo o mundo especialmente devido ao aparecimento de genes de resistência em bactérias patogênicas. O uso indiscriminado e a utilização de doses subterapêuticas de antibióticos provocam o surgimento de resistência. Em Goiás, uma pesquisa recente demonstrou a presença de bactérias resistentes a vários antibióticos em efluentes hospitalares e na estação de tratamento de esgotos de Goiânia. Os processos de tratamento de efluentes baseados na degradação biológica apresentam baixa eficiência de remoção de fármacos residuais devido à estrutura recalcitrante e ao potencial biocida dos antibióticos. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a eficiência da decomposição hidrotermal dos antibióticos ampicilina, enrofloxacina, oxitetraciclina, sulfaquinoxalina e tilosina. Com este intuito, soluções dos antibióticos foram preparadas com concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e com correção de pH para a faixa 3-7, com solução de ácido fosfórico, para o tratamento com carbonização hidrotermal. O tratamento pelo processo de carbonização hidrotermal da oxitetraciclina com correção de pH feita com ácido fosfórico, pH 3, temperatura de 170°C e tempo de reação de 90 minutos apresentou como resultado a decomposição total deste antibiótico (100%). A maior taxa de decomposição (98,37%) para a enrofloxacina foi observada quando foram utilizados tempo reacional de 120 minutos, pH 3, temperatura de 200°C e ácido fosfórico como catalisador. A maior taxa de decomposição da ampicilina (94,86%) foi observada quando se utilizou tempo de reação de 120 minutos, pH 4, temperatura de 200°C e ácido fosfórico como catalisador. As condições mais adequadas para a decomposição da sulfaquinoxalina, observando a maior taxa de redução (95,71%), foi observada quando foram utilizados tempo reacional de 120 minutos, pH 5, temperatura de 180°C e ácido fosfórico como catalisador. Todas as condições, exceto o pH 7, levaram a decomposição total da tilosina (100%) das amostras. A melhor condição para a decomposição da tilosina, observando menor gasto energético, tempo reacional e gasto de catalisador, foi aquela onde se utilizou tempo de reação de 90 minutos, pH 4, temperatura de 180°C e ácido fosfórico como catalisador. No teste de germinação com *Allium cepa*, as soluções tratadas, exceto a ampicilina, apresentaram taxas similares de germinação as encontradas no Grupo Controle. As soluções dos antibióticos sem tratamento apresentaram taxas superiores de crescimentos dos brotos quando comparadas ao Grupo Controle. Esses resultados mostram que o processo de carbonização hidrotermal apresenta potencial para futuras aplicações de decomposição de antibióticos em águas e efluentes contaminados.

Palavras-chave: Antibióticos Veterinários, Decomposição, Carbonização Hidrotermal.

DOS SANTOS JÚNIOR, L. A. **Degradation of veterinary antibiotics in hydrothermal carbonization reactor.** Masters dissertation. Environmental Engineering - School of Civil and Environmental Engineering, Federal University of Goiás, Goiânia, 2015. 118p.

ABSTRACT

Antibiotics are widely used in human and veterinary medicine. After consumption, much of the drug is excreted unchanged or in the form of metabolites, and through the release of sewage treatment plants, agricultural waste and leaching, reach natural ecosystems. The occurrence of antibiotics in aquatic environments has become a growing concern worldwide mainly due to the emergence of resistance genes in pathogenic bacteria. The indiscriminate use and the use of subtherapeutic doses of antibiotics cause the emergence of resistance. In Goiás, a recent survey showed the presence of bacteria resistant to multiple antibiotics in hospital wastewater and Goiania sewage treatment plant. The wastewater treatment processes based on biological degradation have low efficiency of removal of residual drugs due to recalcitrant structure and biocide effect of antibiotics. The objective of this research was to evaluate the efficiency of hydrothermal decomposition of the antibiotic ampicillin, enrofloxacin, oxytetracycline, and tylosin sulphaquinoxaline. For this purpose, the antibiotic solutions were prepared at a concentration of $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and pH correction to the range 3-7, with phosphoric acid solution for the hydrothermal carbonization treatment. Treatment by the hydrothermal carbonization process of oxytetracycline with pH adjustment made with phosphoric acid, pH 3, 170°C temperature and 90 minutes reaction time showed total decomposition as a result of this antibiotic (100%). The highest decomposition rate (98.37%) for enrofloxacin was observed when they were used the reaction time of 120 minutes, pH 3, 200°C temperature and phosphoric acid as a catalyst. The highest decomposition rate of ampicillin (94.86%) was observed when using time of 120 minutes reaction, pH 4, 200°C temperature and phosphoric acid as a catalyst. The most suitable conditions for the decomposition of sulphaquinoxaline, observing the greatest reduction rate (95.71%) was observed when they were used the reaction time of 120 minutes, pH 5, temperature 180°C and phosphoric acid as a catalyst. All conditions, except for the pH 7, led to complete decomposition of tylosin (100%) of the samples. The best condition for the decomposition of tylosin, observing a lower energy expenditure, and reaction time spent catalyst was one which was used 90 minutes reaction time, pH 4, 180°C temperature and phosphoric acid as a catalyst. In the germination test with *Allium cepa*, the solutions treated, except ampicillin, had similar germination rates found in the control group. The solutions of antibiotics with no treatment showed higher rates of growth of buds when compared to the control group. These results show that the hydrothermal carbonization process has potential for future applications decomposition of antibiotics in contaminated water and effluent.

Keywords: Veterinary Antibiotics, Decomposition, Hydrothermal Carbonization.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 01: | Modo e sítios de ação dos antibacterianos..... | 23 |
| Figura 02: | Estrutura química básica das tetraciclina..... | 24 |
| Figura 03: | Mecanismo de ação das tetraciclina..... | 25 |
| Figura 04: | Oxitetraciclina totalmente protonada..... | 26 |
| Figura 05: | Estrutura química básica das quinolonas..... | 29 |
| Figura 06: | Mecanismo de ação das quinolonas..... | 32 |
| Figura 07: | Bioconversão da enrofloxacina para ciprofloxacina..... | 32 |
| Figura 08: | Relação estrutura-atividade dos diferentes substituintes no fármacofooro da Quinolona..... | 33 |
| Figura 09: | Estruturas e equilíbrio de ionização da enrofloxacina..... | 34 |
| Figura 10: | Semelhanças entre as estruturas dos antimicrobianos enrofloxacina (10a), ciprofloxacina (10b) e ácido nalidíxico (10c)..... | 34 |
| Figura 11: | Espectro de absorção no UV da enrofloxacina em quatro diferentes valores de pH..... | 35 |
| Figura 12: | Distribuição das quatro possíveis espécies da enrofloxacina: cátion ácido (C), espécie neutra não-ionizada (N), intermediário <i>zwitterion</i> (Z) e íon básico..... | 35 |
| Figura 13: | Perfil de solubilidade x pH da concentração de enrofloxacina..... | 36 |
| Figura 14: | Estruturas de algumas sulfonamidas e do ácido p-aminobenzóico..... | 37 |
| Figura 15: | Mecanismo de ação das sulfonamidas e da trimetoprima..... | 38 |
| Figura 16: | Fórmulas estruturais da sulfanilamida (precursora das sulfas) e do ácido p-aminobenzóico..... | 40 |
| Figura 17: | Equilíbrio de dissociação das sulfonamidas em sua forma catiônica (A), neutra (B) e aniônica (C)..... | 40 |
| Figura 18: | Estrutura química básica das penicilinas..... | 43 |
| Figura 19: | Mecanismo de ação dos antibióticos β-lactâmicos..... | 45 |
| Figura 20: | Estrutura das penicilinas..... | 47 |
| Figura 21: | Tensão na molécula dos compostos β-lactâmicos..... | 48 |
| Figura 22: | Reatividade das penicilinas em meio ácido..... | 48 |
| Figura 23: | Mecanismo do aumento da reatividade do grupo carbonila da lactama por um grupo vizinho..... | 49 |
| Figura 24: | (a) A remoção de elétrons do grupo R diminui a capacidade dos elétrons do grupo carbonila da ligação amida de influenciar o grupo carbonila do anel β-lactâmico. (b) Exemplos de penicilinas de uso clínico com a retirada de elétrons do grupo R..... | 49 |
| Figura 25: | Estrutura química dos macrolídeos eritromicina e claritromicina..... | 52 |
| Figura 26: | Inibição da síntese protéica bacteriana pelos macrolídeos..... | 53 |
| Figura 27: | Estrutura química da tilosina..... | 54 |
| Figura 28: | Principais vias de exposição ambiental aos fármacos de uso veterinário..... | 59 |
| Figura 29: | Unidade de produção de biochar: Pyro-6F..... | 67 |
| Figura 30: | Reator de Carbonização Hidrotermal em Valência, Espanha..... | 68 |
| Figura 31: | Antibiograma de <i>Escherichia coli</i> em base ágar..... | 72 |
| Figura 32: | Correção do pH da solução de antibiótico..... | 77 |
| Figura 33: | Sistema de CHT em funcionamento..... | 78 |
| Figura 34: | Reator de Carbonização Hidrotermal..... | 78 |

| | | |
|------------|--|-----|
| Figura 35: | Placa de <i>Petri</i> contendo 10 sementes de <i>Allium cepa</i> para o ensaio de toxicidade | 83 |
| Figura 36: | Placa utilizada no teste de difusão em poço após incubação Oxitetraciclina antes do tratamento (EP) e após tratamento em reator de CHT (ET) frente ao micro-organismo <i>E.coli</i> | 87 |
| Figura 37: | Aspecto da solução depois e antes do tratamento de carbonização hidrotermal | 88 |
| Figura 38: | Aspecto das soluções dos Experimentos 2 e 3 antes e depois do tratamento de carbonização hidrotermal | 90 |
| Figura 39: | Aspecto das soluções dos Experimentos 4 e 5 antes e depois do tratamento de carbonização hidrotermal | 90 |
| Figura 40: | Aspecto das soluções do Experimentos 6 antes e depois do tratamento de carbonização hidrotermal | 91 |
| Figura 41: | Placa utilizada no teste de difusão em poço após incubação. Tilosina antes do tratamento (à esquerda) e após tratamento com CHT (à direita). Cepas testadas: <i>S.epidermidis</i> (SE), <i>Serratia Marcenses</i> (SM), <i>Salmonella spp.</i> (SS) e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA) | 101 |
| Figura 42: | Curva analítica das soluções-padrão de oxitetraciclina..... | 102 |
| Figura 43: | Cromatograma da solução padrão de 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de oxitetraciclina..... | 103 |
| Figura 44: | Cromatograma da solução de oxitetraciclina após tratamento com CHT utilizada no experimento 10 – amostra 02 | 103 |
| Figura 45: | Condições dos experimentos com CHT e taxa de conversão da oxitetraciclina. | 104 |
| Figura 46: | Curva analítica das soluções-padrão de enrofloxacina..... | 105 |
| Figura 47: | Cromatograma da solução padrão de 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de enrofloxacina..... | 106 |
| Figura 48: | Cromatograma da solução de enrofloxacina após tratamento com CHT utilizada no experimento 15 – amostra 03 | 107 |
| Figura 49: | Condições dos experimentos com CHT e taxa de conversão da enrofloxacina. | 108 |
| Figura 50: | Curva analítica das soluções-padrão de ampicilina | 109 |
| Figura 51: | Cromatograma da solução padrão de 29,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina..... | 111 |
| Figura 52: | Cromatograma da solução de ampicilina após tratamento com CHT utilizada no experimento 21 – amostra 02 | 111 |
| Figura 53: | Condições dos experimentos com CHT e taxa de conversão da ampicilina. | 112 |
| Figura 54: | Curva analítica das soluções-padrão de sulfaquinoxalina | 113 |
| Figura 55: | Cromatograma da solução padrão de 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfaquinoxalina | 114 |
| Figura 56: | Cromatograma da solução de sulfaquinoxalina após tratamento com CHT utilizada no experimento 28 – amostra 02..... | 114 |
| Figura 57: | Condições dos experimentos com CHT e taxa de conversão da sulfaquinoxalina..... | 116 |
| Figura 58: | Curva analítica das soluções-padrão de tilosina | 117 |
| Figura 59: | Cromatograma da solução padrão de 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de tilosina | 118 |
| Figura 60: | Cromatograma da solução de tilosina após tratamento com CHT utilizada no experimento 31 – amostra 03 | 119 |
| Figura 61: | Condições dos experimentos com CHT e taxa de conversão da tilosina..... | 120 |
| Figura 62: | Hidrólise da tilosina em meio ácido e a consequente formação da desmicosina. | 120 |

| | | |
|------------|---|-----|
| Figura 63: | Germinação das sementes de <i>Allium cepa</i> em amostras de ampicilina antes e depois do tratamento. | 121 |
| Figura 64: | Germinação das semente <i>Allium cepa</i> em amostras de enrofloxacina antes e depois do tratamento. | 121 |
| Figura 65: | Germinação das sementes de <i>Allium cepa</i> em amostras de oxitetraciclina antes e depois do tratamento. | 122 |
| Figura 66: | Germinação das sementes de <i>Allium cepa</i> em amostras de sulfaquinoxalina antes e depois do tratamento. | 123 |
| Figura 67: | Germinação das sementes de <i>Allium cepa</i> em amostras de Tilosina antes e depois do tratamento. | 123 |
| Figura 68: | Crescimento médios dos brotos a partir de sementes de <i>Allium cepa</i> | 124 |
| Figura 69: | Placas de Petri contendo as sementes de <i>Allium cepa</i> após germinação com a solução de Enrofloxacino antes e depois do tratamento com CHT (Grupo antes do tratamento à esquerda e Grupo após tratamento à direita). | 124 |

LISTA DE QUADROS

| | | |
|------------|--|----|
| Quadro 01: | Classificação dos antibióticos quanto ao mecanismo de atuação..... | 22 |
| Quadro 02: | Grupos funcionais na estrutura química das tetraciclina..... | 24 |
| Quadro 03: | Solubilidade dos sais da tetraciclina..... | 27 |
| Quadro 04: | Características físico-químicas da oxitetraciclina..... | 28 |
| Quadro 05: | Propriedades físico-químicas das tetraciclina a 25°C..... | 28 |
| Quadro 06: | Grupos funcionais na estrutura das quinolonas..... | 30 |
| Quadro 07: | Características físico-químicas da sulfaquinoxalina..... | 41 |
| Quadro 08: | Propriedades físico-químicas das sulfonamidas a 25°C..... | 42 |
| Quadro 09: | Cadeias laterais de algumas penicilinas..... | 44 |
| Quadro 10: | Propriedades físico-químicas das penicilinas a 25°C..... | 50 |
| Quadro 11: | Características físico-químicas da ampicilina..... | 50 |
| Quadro 12: | Características físico-químicas da tilosina..... | 55 |
| Quadro 13: | Propriedades físico-químicas dos macrolídeos a 25°C..... | 66 |
| Quadro 14: | Presença de antibióticos de uso veterinário na água..... | 60 |
| Quadro 15: | Concentrações de antibióticos nos rios Po e Arno e em quatro estações de tratamento de efluentes..... | 61 |
| Quadro 16: | Ocorrência de antibióticos de uso veterinário no solo..... | 61 |
| Quadro 17: | Ocorrência de antibióticos de uso veterinário em amostras de esterco..... | 62 |
| Quadro 18: | Planejamento fatorial 3^{3-1} dos experimentos com reator de CHT..... | 80 |
| Quadro 19: | Condições do experimento realizado para avaliação do potencial do reator de carbonização hidrotermal na decomposição da oxitetraciclina..... | 81 |
| Quadro 20: | Condições dos experimentos realizados para avaliação do potencial do reator de carbonização hidrotermal na decomposição de antibióticos ampicilina, enrofloxacina, oxitetraciclina..... | 88 |
| Quadro 21: | Condições dos experimentos realizados para avaliação do potencial do reator de carbonização hidrotermal na decomposição de antibióticos ampicilina, enrofloxacina, oxitetraciclina, sulfaquinoxalina e tilosina..... | 89 |
| Quadro 22: | Condições do ensaio realizado com o reator de CHT para decomposição do antibiótico oxitetraciclina..... | 91 |
| Quadro 23: | Condições dos ensaios realizados com o reator de CHT para decomposição do antibiótico oxitetraciclina..... | 92 |
| Quadro 24: | Condições dos ensaios realizados com o reator de CHT para decomposição do antibiótico enrofloxacina..... | 93 |
| Quadro 25: | Condições dos ensaios realizados com o reator de CHT para decomposição do antibiótico enrofloxacina..... | 94 |
| Quadro 26: | Condições dos ensaios realizados com o reator de CHT para decomposição do antibiótico ampicilina..... | 94 |
| Quadro 27: | Condições dos ensaios realizados com o reator de CHT para decomposição do antibiótico ampicilina..... | 95 |
| Quadro 28: | Condições dos ensaios realizados com o reator de CHT para decomposição do antibiótico sulfaquinoxalina..... | 95 |
| Quadro 29: | Condições dos ensaios realizados com o reator de CHT para decomposição do antibiótico sulfaquinoxalina..... | 96 |
| Quadro 30: | Condições do ensaio realizado com o reator de CHT para decomposição do antibiótico tilosina..... | 96 |
| Quadro 31: | Condições do ensaio realizado com o reator de CHT para decomposição do antibiótico tilosina..... | 97 |

| | | |
|------------|--|-----|
| Quadro 32: | Condições dos ensaio realizado com o reator de CHT para decomposição do antibiótico tilosina..... | 98 |
| Quadro 33: | Teste de microdiluição em caldo após o experimento 1 realizado com o intuito de verificar o potencial de decomposição de antibióticos pelo sistema de CHT | 98 |
| Quadro 34: | Teste de microdiluição em caldo dos antibióticos frente aos micro-organismos <i>S.aureus</i> e <i>E.coli</i> | 99 |
| Quadro 35: | Teste de microdiluição em caldo dos antibióticos frente aos micro-organismos <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA), <i>Salmonella spp.</i> (SS), <i>Serratia Marcenses</i> (SM) e <i>Staphylococcus epidermidis</i> (SE)..... | 99 |
| Quadro 36: | Teste de microdiluição em caldo dos antibióticos frente aos micro-organismos <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA), <i>Salmonella spp.</i> (SS), <i>Serratia Marcenses</i> (SM) e <i>Staphylococcus epidermidis</i> (SE)..... | 99 |
| Quadro 37: | Resultados dos cromatogramas da solução padrão e dos experimentos 10, 11 e 12 | 102 |
| Quadro 38: | Resultados dos cromatogramas da solução padrão e dos experimentos 13 e 14..... | 102 |
| Quadro 39: | Resultados dos cromatogramas da solução padrão e dos experimentos 15, 16 e 17 | 105 |
| Quadro 40: | Resultados dos cromatogramas da solução padrão e dos experimentos 18, 19 e 20..... | 106 |
| Quadro 41: | Resultados dos cromatogramas da solução padrão de ampicilina e dos experimentos 21, 22 e 23 | 110 |
| Quadro 42: | Resultados dos cromatogramas da solução padrão de ampicilina e dos experimentos 24 e 25 | 110 |
| Quadro 43: | Resultados dos cromatogramas da solução padrão de sulfaquinoxalina e dos experimentos 26, 27 e 28 | 113 |
| Quadro 44: | Resultados dos cromatogramas da solução padrão de sulfaquinoxalina e do experimento 29 | 114 |
| Quadro 45: | Resultados dos cromatogramas da solução padrão de tilosina e dos experimentos 30, 32 e 32 | 117 |
| Quadro 46: | Resultados dos cromatogramas da solução padrão de tilosina e dos experimentos 33, 34 e 35 | 118 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------|--|
| AMP | Ampicilina |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| CG | Cromatografia Gasosa |
| CHT | Carbonização Hidrotermal |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| CIP | Ciprofloxacino |
| CLSI | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> |
| CBM | Concentração Bactericida Mínima |
| CONAMA | Conselho Nacional do Meio Ambiente |
| COT | Carbono Orgânico Total |
| CPC | Cefalosporina C |
| DAD | Detector de Arranjo de Diodos |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico |
| DTC | Doxiciclina |
| ENR | Enrofloxacina |
| EP | Efluente Puro |
| ESI | Ionização por electrospray |
| ET | Efluente Tratado |
| ETE | Estação de Tratamento de Esgotos |
| HPLC | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| IT | Detector íon-trap |
| LOQ | Limite de Quantificação |
| MS | Detector de Espectrometria de Massas |
| OTC | Oxitetraciclina |
| PABA | Ácido p-aminobenzóico |
| PBP | Proteínas de Ligação da Penicilina |
| QqToF | Detector do Tipo Quadrupolo Tempo-De-Voo |
| RNA | Ácido Ribonucléico |
| SQX | Sulfaquinoxalina |
| TIL | Tilosina |
| TSA | Teste de Sensibilidade Antimicrobiana |
| UV | Ultravioleta |

SUMÁRIO

| | | |
|---------|--|-----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 18 |
| 3 | OBJETIVOS | 19 |
| 3.1 | OBJETIVOS GERAL | 20 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 20 |
| 4 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 20 |
| 4.1 | DEFINIÇÃO DE ANTIBIÓTICOS..... | 20 |
| 4.2 | CLASSIFICAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS | 20 |
| 4.3 | TETRACICLINAS..... | 23 |
| 4.3.1 | Características Físico-Químicas das Tetraciclinas | 26 |
| 4.4 | QUINOLONAS..... | 29 |
| 4.4.1 | Características Físico-Químicas das Quinolonas | 33 |
| 4.5 | SULFONAMIDAS..... | 36 |
| 4.5.1 | Características Físico-Químicas das Sulfonamidas..... | 39 |
| 4.6 | COMPOSTOS BETALACTÂMICOS..... | 42 |
| 4.6.1 | Características Físico-Químicas das Penicilinas | 47 |
| 4.7 | MACROLÍDEOS..... | 51 |
| 4.7.1 | Características Físico-Químicas dos Macrolídeos..... | 54 |
| 4.8 | USO DE ANTIBIÓTICOS NA PRODUÇÃO ANIMAL E VETERINÁRIA | 56 |
| 4.9 | OCORRÊNCIA DE ANTIBIÓTICOS NO MEIO AMBIENTE | 57 |
| 4.10 | RESISTÊNCIA MICROBIANA..... | 59 |
| 4.11 | CARBONIZAÇÃO HIDROTERMAL..... | 62 |
| 4.12 | ANÁLISE DE ANTIBIÓTICOS POR HPLC..... | 64 |
| 4.13 | TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE À ANTIMICROBIANOS | 69 |
| 4.14 | ENSAIO DE TOXICIDADE COM <i>ALLIUM CEPA</i> | 71 |
| 5 | MATERIAL E MÉTODOS | 72 |
| 5.1 | ANTIBIÓTICOS | 75 |
| 5.2 | TRATAMENTO POR CARBONIZAÇÃO HIDROTERMAL | 76 |
| 5.2.1 | O Reator de Carbonização Hidrotermal | 77 |
| 5.2.1.1 | Ensaios com o Reator de Carbonização Hidrotermal..... | 78 |
| 5.3 | ANTIBIOGRAMA..... | 79 |
| 5.3.1 | Microdiluição em Caldo | 81 |
| 5.4 | ENSAIO DE TOXICIDADE COM <i>ALLIUM CEPA</i> | 81 |
| 5.5 | ANÁLISE DOS ANTIBIÓTICOS COM HPLC..... | 83 |
| 6 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 86 |
| 6.1 | ENSAIOS COM O REATOR DE CARBONIZAÇÃO HIDROTERMAL..... | 87 |
| 6.2 | TESTE DE SUSCETIBILIDADE À ANTIMICROBIANOS | 98 |
| 6.3 | ANÁLISE DOS ANTIBIÓTICOS APÓS O TRATAMENTO COM CHT..... | 101 |
| 6.3.1 | Oxitetraciclina..... | 101 |
| 6.3.2 | Enrofloxacina..... | 104 |
| 6.3.3 | Ampicilina | 109 |
| 6.3.4 | Sulfaquinoxalina | 113 |
| 6.3.5 | Tilosina | 116 |
| 6.4 | ENSAIO DE TOXICIDADE COM <i>ALLIUM CEPA</i> | 121 |
| 6.4.1 | <i>Allium cepa</i> | 121 |
| 7 | CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES | 125 |
| 8 | REFERÊNCIAS | 127 |

1 INTRODUÇÃO

No século XX houve um aumento na expectativa de vida de homens e mulheres em todo o mundo, muito devido ao início da era dos antibióticos. A introdução de agentes antimicrobianos em meados de 1930 (sulfonamidas) e em 1940 (penicilina) revolucionou a medicina humana por reduzir de maneira substancial as taxas de mortalidade e morbidade por doenças bacterianas. Desde então surgiram numerosos antimicrobianos de estruturas químicas diferentes que possibilitaram um tratamento médico eficaz para enfermidades infecciosas antes vistas como problemas de saúde pública como tuberculose, febre tifóide, hanseníase, meningite, pneumonia e muitas outras que passaram a ser controladas dentro de alguns anos. Isso explica a importância terapêutica dessa classe de fármacos e a posição atual entre os medicamentos mais vendidos mundialmente (AUTO; CONSTANT, 2008; BARREIRO; FRAGA, 2008; GUARDABASSI; KRUSE, 2010).

Antibióticos são largamente utilizados na medicina humana, veterinária (BEOVIĆ, 2006) e agricultura para prevenir e tratar infecções de animais e plantas, bem como promotores de crescimento na criação de animais (MARTINEZ, 2009). Após serem consumidos, cerca de 50 a 90 % dos fármacos é excretada inalterada (MULROY, 2001) ou sob a forma de metabólitos na urina, fezes ou esterco animal e por intermédio de descarga de esgotos domésticos e industriais *in natura* ou lançamentos de estações de tratamento de efluente após tratamento, resíduos agrícolas e lixiviação, alcançam os ecossistemas naturais (BELISÁRIO et al., 2010; MELO et al., 2009; FEITOSA; SODRÉ; MALDANER, 2013; ZHANG; ZHANG; FANG, 2009). A ocorrência de antibióticos nos ambientes aquáticos tem se tornado uma preocupação constante devido ao potencial de causar alterações nos ecossistemas, impactando negativamente organismos aquáticos e terrestres, além de exercer provável influência no aumento da resistência microbiana a antibióticos (MELO et al., 2009; REGITANO; LEAL, 2010).

Centenas de genes de resistência a uma vasta gama de antibióticos têm sido encontradas em microrganismos distribuídos em efluentes hospitalares, resíduos de criação de animais, esgoto, estações de tratamento de efluentes, águas superficiais, subterrâneas e até mesmo na água de abastecimento (ZHANG; ZHANG; FANG, 2009; ROSENBLATT-FARRELL, 2009). O uso indiscriminado dos antibióticos em grandes populações ou em doses sub-terapêuticas em animais de criação são fatores decisivos

para a rápida formação de resistência (HERSHBERGER et al., 2005), porque mesmo traços de antibióticos são capazes de provocar o aparecimento de resistência em uma bactéria presente em um rio (BOWER; DAESCHEL, 1999). Além disto são desconhecidos os efeitos associados à ingestão prolongada de uma variedade de fármacos presentes em pequenas quantidades na água de abastecimento (STACKELBERG et al., 2004).

O tratamento de efluentes em nível preliminar apenas remove sólidos grosseiros, enquanto no nível primário são removidos os sólidos sedimentáveis e uma parte da matéria orgânica. No tratamento secundário são empregados processos biológicos (lagoas de estabilização, lodos ativados, sistemas aeróbios com biofilme, sistemas anaeróbios e disposição no solo) que ocasionalmente removem nutrientes como: nitrogênio e fósforo (VON SPERLING, 1998), e proporcionam uma redução significativa na matéria orgânica (BRASIL, 2009). No tratamento terciário são removidos poluentes específicos, ou ainda, de forma complementar os poluentes não eliminados pelo tratamento secundário são removidos (BRASIL, 2009).

De modo geral, a maioria das estações de tratamento de esgotos no Brasil alcança somente o nível de tratamento secundário (BRASIL, 2009). Os processos de tratamento de efluentes que se baseiam na degradação biológica apresentam baixa eficiência de remoção de fármacos residuais devido à estrutura recalcitrante e ao potencial biocida dos antibióticos, o que acarreta a contaminação de águas superficiais e subterrâneas e caracteriza um problema ambiental. (BELISÁRIO et al., 2010; MELO et al., 2009; DA CRUZ et al., 2010).

Em virtude desse cenário ambiental, faz-se necessária a introdução de tecnologias de tratamento adicionais que promovam a mineralização desses poluentes ou que resultem em compostos menos nocivos ao meio ambiente (BELISÁRIO et al., 2010; MELO et al., 2009; DA CRUZ et al., 2010). Nesse sentido, nos últimos anos, têm sido propostas várias tecnologias de tratamento de efluentes com este propósito, como biorreatores à membrana (MBR) (GEBHARDT; SCHRÖDER, 2007; KIMURA; HARA; WATANABE, 2005), processos oxidativos avançados (ANDREOZZI et al., 2005; ZHANG et al., 2008), adsorção em carvão ativado e outros adsorventes (MINE KURTBAY et al., 2008; ÖNAL; AKMIL-BAŞAR; SARICI-ÖZDEMİR, 2007). Diante do exposto, tecnologias inovadoras como a carbonização hidrotermal necessitam ser melhor estudadas, em virtude de apresentarem grande potencial no tratamento de resíduos de micropoluentes como os antibióticos.

2 JUSTIFICATIVA

Os antibióticos, presentes em mananciais e efluentes de estações de tratamento de esgoto, são capazes de provocar o aparecimento de genes de resistência em bactérias patogênicas mesmo em concentrações baixas na ordem $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ou $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. A alteração do padrão de resistência é irreversível e a seletividade natural favorece os microrganismos com código genético resistente a antibióticos (KÜMMERER; HENNINGER, 2003). Isso tem sido um problema, uma vez que a transferência desta resistência entre cepas resistentes e sensíveis é de propagação rápida e provoca a ineficácia de um antibiótico na terapia medicamentosa, surgindo necessidade constante da descoberta de novos antibacterianos (MACLEAN et al.; 2010). A presença de vestígios de fármacos e outros xenobióticos na água de abastecimento causa preocupação, uma vez que são desconhecidos os potenciais efeitos crônicos associados à ingestão em longo prazo destes compostos, mesmo em quantidades pequenas (STACKELBERG et al., 2004).

Conforme as Resoluções CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005), CONAMA 430/2011 (BRASIL, 2011a) e a Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011b), a legislação brasileira ainda não contempla padrões de lançamento destes compostos nos corpos receptores ou concentrações de antibióticos em corpos hídricos, necessitando de pesquisas acerca deste tema sobre os efeitos deletérios causados no meio ambiente (BRASIL, 2005, 2011a, 2011b). Os tratamentos de efluentes baseados na degradação biológica como os lodos ativados e as lagoas de estabilização são ineficazes na remoção segura destes compostos (LONGHIN, 2008), uma vez que os fármacos possuem baixa biodegradabilidade, são recalcitrantes e persistentes no meio ambiente (KUMMERER, 2008), causando o aparecimento de genes de resistência nos microrganismos, deste modo surge a necessidade de tratamentos adicionais capazes de eliminar ou inativar esses compostos (LONGHIN, 2008). Diante do exposto, a pesquisa de novas tecnologias capazes de efetivamente tratar estes compostos é imprescindível. Esta pesquisa se justifica por não existirem atualmente estudos com uso do reator de carbonização hidrotermal na decomposição de antibióticos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficiência da reação de decomposição hidrotermal dos antibióticos ampicilina, enrofloxacina, oxitetraciclina, sulfaquinoxalina e tilosina para uma futura aplicação em tratamento de água e efluentes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as condições mais favoráveis de temperatura, pressão, catalisador e tempo reacional de um sistema de carbonização hidrotermal no abatimento dos antibióticos ampicilina, enrofloxacina, oxitetraciclina, sulfaquinoxalina e tilosina;
- Adaptar métodos analíticos para quantificação dos antibióticos ampicilina, enrofloxacina, oxitetraciclina, sulfaquinoxalina e tilosina em fase líquida;
- Avaliar a decomposição hidrotermal dos antibióticos ampicilina, enrofloxacina, oxitetraciclina, sulfaquinoxalina e tilosina mediante a realização de antibiogramas;
- Avaliar a fitotoxicidade por meio do teste de germinação de sementes de cebola (*Allium cepa*) exposta aos produtos gerados após tratamento dos antibióticos ampicilina, enrofloxacina, oxitetraciclina, sulfaquinoxalina e tilosina com o reator de carbonização hidrotermal.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 DEFINIÇÃO DE ANTIBIÓTICOS

Antibióticos são compostos químicos capazes de matar ou suprimir o crescimento de outros microrganismos. Eles são naturalmente produzidos por microrganismos como fungos (por exemplo: penicilina) e bactérias (por exemplo: tetraciclina e eritromicina), ou podem ser produzidos de forma sintética (por exemplo: sulfonamidas e fluoroquinolonas) ou semi-sintética (por exemplo: amoxicilina, claritromicina e doxiciclina). Os antimicrobianos diferem-se bastante quanto as suas propriedades físico-químicas, farmacológicas, espectro bacteriano e mecanismo de ação (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; GUARDABASSI; KRUSE, 2010).

4.2 CLASSIFICAÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS

Em níveis terapêuticos, os antibacterianos podem ser classificados em bactericidas ou bacteriostáticos. Os agentes bacteriostáticos inibem o crescimento do microrganismo, permitindo que o sistema imunológico do hospedeiro elimine a infecção. Se esse tipo de agente terapêutico não é mantido em concentração efetiva nos tecidos, pode ocorrer a dissociação do complexo droga-estrutura celular, o que permite a sobrevivência da bactéria. Os agentes bactericidas causam lesão irreparável e a morte do microrganismo ao se ligar irreversivelmente as estruturas alvo. Em altas concentrações, os agentes bacteriostáticos podem se tornar bactericidas. Os antibacterianos podem inibir a síntese da parede celular ou de ácidos nucleicos (QUINN et al., 2005). As principais classes de antibacterianos e seus mecanismos de ação encontram-se no Quadro 01.

Quadro 01: Classificação dos antibióticos quanto ao mecanismo de atuação.

| Antimicrobiano | Mecanismo de Ação | Efeito |
|---|---|--------------------------------|
| Beta-lactâmicos: Amoxicilina Ampicilina | Inibem a síntese da parede celular. | Bactericida |
| Polipeptídeos: Colistina Polimixina | Inibem a função da membrana celular. | Bactericida |
| Nitrofuranos: Nitrofurantoína | Inibem a síntese protéica. | Bactericida |
| Aminoglicosídeos: Estreptomina Gentamicina | Inibem a síntese protéica. Bloqueia a atividade ribossomal 30S. | Bactericida |
| Tetraciclina: Doxiciclina Oxitetraciclina | Inibem a síntese protéica. Bloqueia a atividade ribossomal 30S. | Bacteriostático |
| Fenicóis: Cloranfenicol Florfenicol | Inibem a síntese protéica. Bloqueia a atividade ribossomal 50S. | Bacteriostático |
| Lincosamidas: Clindamicina Lincomicina | Inibem a síntese protéica. Bloqueia a atividade ribossomal 50S. | Bactericida ou Bacteriostático |
| Macrolídeos: Tilosina Eritromicina | Inibem a síntese protéica. Bloqueia a atividade ribossomal 50S. | Bacteriostático |
| Quinolonas: Ciprofloxacina Enrofloxacina | Inibem a síntese do ácido nucléico pelo bloqueio da DNA-girase. | Bactericida |
| Novobiocina: | Inibem a síntese do ácido nucléico pelo bloqueio da DNA-girase. | Bactericida ou Bacteriostático |
| Rifampicina: | Inibem a síntese do ácido nucléico pelo bloqueio da DNA-polimerase DNA-dirigida. | Bacteriostático |
| Sulfonamidas: Sulfametoxazol Sulfaquinoxalina | Inibem a síntese do ácido nucléico por bloqueio competitivo da incorporação do ácido para-aminobenzóico (PABA) no ácido fólico. | Bacteriostático |
| Trimetoprima: | Inibem a síntese do ácido nucléico por combinação com a enzima diidrofolato redutase. | Bacteriostático |
| Nitroimidazóis: Metronidazol | Causam o rompimento da estrutura do DNA e inibem o reparo de DNA. | Bactericida |

Fonte: Adaptado de Quinn et al. (2005).

Os antibióticos de origem natural e seus derivados semi-sintéticos de interesse clínico também podem ser classificados em: β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, oxapeninas e monobactamas), tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídicos cíclicos (glicopeptídeos, lipopeptídeos), estreptograminas, entre outros (lincosamidas, cloranfenicol, rifamicinas, etc). Os antibióticos de origem sintética são classificados em sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Os modos e sítios de ação dos antibacterianos estão indicados na Figura 01.

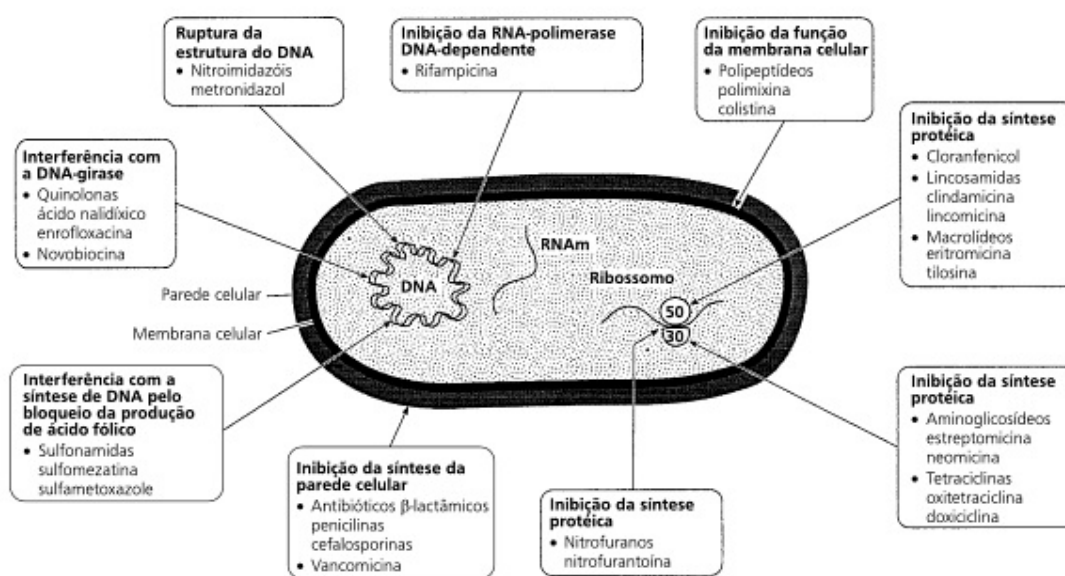


Figura 01: Modos e sítios de ação dos antibacterianos.
Fonte: Quinn et al. (2005).

4.3 TETRACICLINAS

As tetraciclina representam uma família de substâncias que possuem em comum um esqueleto carbônico composto por quatro anéis de seis membros linearmente fundidos, denominados de A até D, formando o núcleo naftacênico. A Figura 02 mostra a estrutura química básica das tetraciclina, enquanto o Quadro 02 indica os grupos funcionais que variam conforme a estrutura química. A clortetraciclina e a oxitetraciclina são produzidas pelo *Streptomyces aureofaciens* e *Streptomyces rimosus*, respectivamente. A tetraciclina pode ser obtida a partir do *Streptomyces texasi* ou por hidrogenação catalítica da clortetraciclina. A demeclociclina é sintetizada a partir de uma cepa de *Spretomyces aureofaciens* que sofreu mutação, enquanto a doxiciclina, a

minociclina e a metaciclina são derivados semi-sintéticos (AUTO; CONSTANT, 2008; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

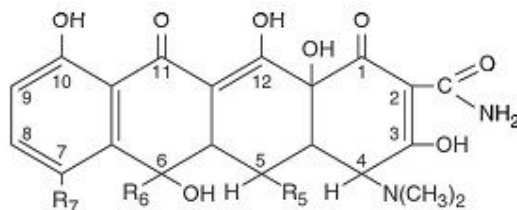


Figura 02: Estrutura química básica das tetraciclina.
Fonte: Katzung, Masters e Trevor (2014).

Quadro 02: Grupos funcionais na estrutura química das tetraciclina.

| Antimicrobiano | R7 | R6 | R5 |
|------------------|-----------------------------------|--------------------|-----|
| Clortetraciclina | -Cl | -CH ₃ | -H |
| Oxitetraciclina | -Hr | -CH ₃ | -OH |
| Tetraciclina | -H | -CH ₃ | -H |
| Demeclociclina | -Cl | -H | -H |
| Metaciclina | -H | =CH ₂ * | -OH |
| Doxiciclina | -H | -CH ₃ * | -OH |
| Minociclina | -N(CH ₃) ₂ | -H | -H |

* Não há -OH na posição 6 na metaciclina e na doxiciclina.

Fonte: Adaptado de Katzung, Masters e Trevor (2014).

As tetraciclina apresentam um amplo espectro de atividade antibacteriana: atuam contra uma grande variedade de bactérias gram-negativas e gram-positivas aeróbias e anaeróbias, mostrando-se eficazes contra alguns microrganismos resistentes aos antibióticos que inibem a síntese da parede celular como *Rickettsia*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia spp.*, *Plasmodium spp.* e espiroquetas (*Treponema pallidums*, *Treponema pertenuae*, *Borrelia recurrentis*, *Borrelia burgdorferi*), porém não são ativas contra fungos. A resistência de uma cepa bacteriana a um dos membros da classe resulta em resistência cruzada às todas as outras tetraciclina (AUTO; CONSTANT, 2008; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

Segundo Auto e Constant (2008), atualmente as tetraciclina são indicadas no tratamento das seguintes infecções: cólera, sífilis, uretrite por *Chlamydia*, cancro-mole, brucelose, acne e profilaxia do tétano, entre outras. Constituem a classe de antimicrobianos quantitativamente mais usados em animais, seguida por macrolídeos,

pleuromutilins lincosamidas, penicilinas, sulfonamidas, aminoglicosídeos, fluoroquinonas, cefalosporinas e fenicóis (GUARDABASSI; KRUSE, 2010).

As tetraciclina são antibióticos bacteriostáticos, por isso inibem a síntese protéica nas bactérias ao se unirem ao ribossomo 30S bacteriano, impedindo o acesso do aminoacil-tRNA ao local acceptor (A) no complexo mRNA-ribossoma. As tetraciclina penetram nas células das bactérias gram-negativas por difusão passiva, por meio dos canais hidrofílicos formadas pelas proteínas porinas da membrana celular externa, e por transporte ativo através de um sistema dependente de energia que bombeia as tetraciclina para toda a membrana citoplasmática (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). O mecanismo de ação das tetraciclina está ilustrado na Figura 03.

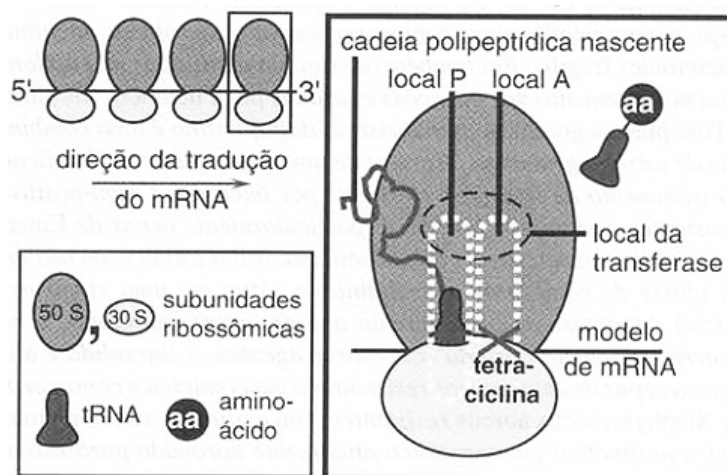


Figura 03: Mecanismo de ação das tetraciclina.

Fonte: Brunton, Chabner e Knollman (2012).

O RNA - mensageiro (mRNA) se liga a subunidade 30S do RNA ribossômico da bactéria. O local P (peptidil) da subunidade 50S do RNA ribossômico contém a cadeia polipeptídica nascente; normalmente, o tRNA aminoacil o qual transporta o aminoácido (aa) ao ser adicionado a cadeia migra para o local A (aceptor), com emparelhamento da base complementar entre a seqüência de anticódons do tRNA e a seqüência de códons do mRNA. As tetraciclina inibem a síntese protéica da bactéria ao se ligarem a subunidade 30S, bloqueando a ligação do tRNA ao local A (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

4.3.1 Características Físico-Químicas das Tetraciclinas

As tetraciclinas são compostos anfóteros com valores característicos de pK_a e formam hidratos cristalinos e sais com ácidos e bases. Os espectros destes antibióticos na região do UV mostram fortes absorções em torno de 270 a 360 nm em soluções neutras e ácidas, respectivamente, produzindo fluorescência com íons metálicos ou sob condições básicas. As tetraciclinas são solúveis em ácidos, bases, álcoois e solventes orgânicos apolares, possuem baixa estabilidade sob condições fortemente alcalinas ou ácidas, formando epímeros reversíveis (MAIA; RATH; REYES, 2009).

As tetraciclinas possuem uma estrutura química muito peculiar (Figura 04) que possibilita a formação de quelatos em várias posições da molécula devido à existência de vários grupos doadores (N, O). Os sítios de coordenação incluem os oxigênios em C10-C12, o oxigênio enólico em C3 e os nitrogênios em C4 e no grupo amida do anel A. A oxitetraciclina possui três prótons dissociáveis, um no grupo enol em C3, outro no sistema ceto-fenólico em C10-C12 e outro no grupo dimetilamônio em C4, com valores de pK_a 3,22, 7,46 e 8,94, respectivamente (CHARTONE-SOUZA et al., 2005, DUARTE et al., 1999; PEREIRA-MAIA et al., 2010).

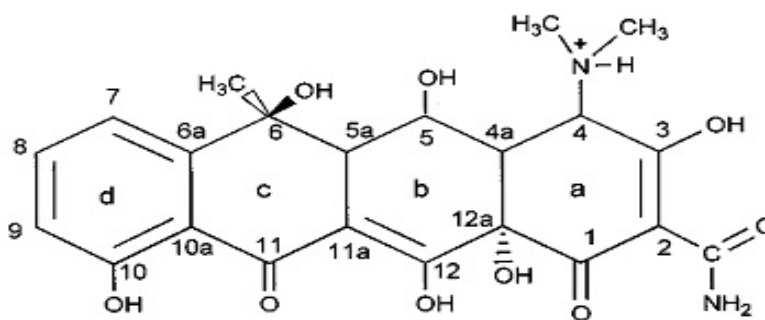


Figura 04: Oxitetraciclina totalmente protonada.

Fonte: Adaptado de Duarte et al., 1999.

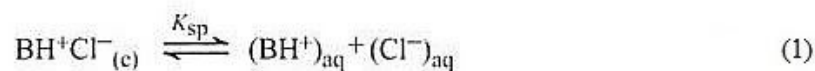
As tetraciclinas formam complexos quelatos com cátions metálicos produzindo complexos insolúveis e a incompatibilidade tem sido relatada com soluções contendo sais metálicos (MAIA; RATH; REYES, 2009; MARTINDALE, 2009). Todas as tetraciclinas formam quelatos estáveis com íons metálicos divalentes como Ca^{2+} e Mg^{2+} porém, têm maior afinidade com cátions trivalentes como Al^{3+} com os quais formam quelatos droga-metal, 3:1 (ATTWOOD; FLORENCE; ROTHSCCHILD, 2003).

Há uma variação na solubilidade dos sais e derivados de fármacos. O aumento da solubilidade na formação do cloreto é explicado pela diminuição do pH da solução provocada pelo íon cloreto (Quadro 03). O efeito íon comum, porém, pode produzir uma diminuição da solubilidade em soluções com altas concentrações de ácido clorídrico devido ao deslocamento do equilíbrio da reação para a esquerda (Equação 1). Em ácido clorídrico diluído, com pH 1,2, a tetraciclina livre se dissolve mais do que o seu cloreto devido a diferenças de cristalinidade. A quantidade de base decresce com o tempo, enquanto a tetraciclina é convertida em seu cloreto. Em pH 1,6, a velocidade de dissolução das duas formas é idêntica, e com pH 2,1 o cloreto é mais solúvel devido ao seu efeito no pH em áreas ao redor das partículas em dissolução (ATTWOOD; FLORENCE; ROTHSCHILD, 2003).

Quadro 03: Solubilidade dos sais da tetraciclina.

| Compostos | Solubilidade em água (g L ⁻¹) |
|-------------------------|---|
| Tetraciclina | 1,7 |
| Cloreto de tetraciclina | 10,9 |
| Fosfato de tetraciclina | 15,9 |

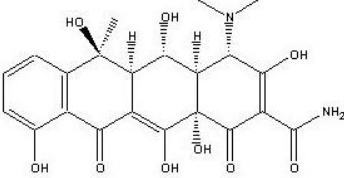
Fonte: Adaptado de Attwood, Florence e Rothschild (2003).



Fonte: Attwood, Florence e Rothschild (2003).

A oxitetraciclina apresenta alta solubilidade em água, dissolve-se em ácidos diluídos e soluções alcalinas. Uma suspensão a 1% (p/v) de oxitetraciclina em água tem um pH de 4,5 a 7,5. A oxitetraciclina decompõe-se a temperaturas superiores a 180°C e quando exposta à luz solar intensa ou temperaturas superiores a 90°C, na presença de umidade, pode escurecer. Esse antibiótico tem sua potência diminuída em soluções com pH inferior a 2, sendo rapidamente destruído pelas soluções de hidróxidos de metais alcalinos (MARTINDALE, 2009). As principais características físico-químicas das tetraciclina e do antimicrobiano oxitetraciclina podem ser observadas nos Quadros 04 e 05, respectivamente.

Quadro 04: Características físico-químicas da oxitetraciclina.

| Características | Oxitetraciclina |
|--|--|
| Estrutura Molecular |  |
| Fórmula Molecular | $C_{22}H_{24}N_2O_9$ |
| Nome IUPAC | (4S,4aR,5S,5aR,6S,12aS)-4-(Dimethylamino)-3,5,6,10,12,12a-hexahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydro-2-tetracenecarboxamide |
| Massa Molar | 359,3947 g·mol ⁻¹ |
| Densidade | 1.645 g·cm ⁻³ |
| Ponto de Ebulição | 817.08°C a 1 bar. |
| Ponto de Fusão | 183°C |
| Solubilidade (Estimada pelo Log K_{ow}) | 1,4 g·L ⁻¹ |
| Número CAS | 79-57-2 |
| Número ChemSpider | 10482174 |
| Solubilidade | Alta solubilidade em água, solúvel em propilenoglicol. Moderadamente solúvel em álcool etílico e metílico. Praticamente insolúvel em éter e clorofórmio. |
| Aparência | Pó cristalino amarelo. |

Fonte: Adaptado de Chemical Abstracts Service (2014) e Chemspider (2014).

Quadro 05: Propriedades físico-químicas das tetraciclina a 25°C.

| Antibiótico | pK _a | Log K _{ow} | Solubilidade em água (g·L ⁻¹) | Pressão de Vapor (Pa) | Massa Molar (g·mol ⁻¹) |
|-------------------------|------------------|---------------------|---|------------------------|------------------------------------|
| Clortetraciclina | 3,33; 7,55; 9,33 | -0,41 | 0,6 | 2,09x10 ⁻²⁶ | 478,9 |
| Oxitetraciclina | 3,22; 7,46; 8,94 | -1,22 | 1,0 | 8,36x10 ⁻²⁸ | 460,4 |
| Tetraciclina | 3,32; 7,78; 9,58 | -1,19 | 1,7 | 7,76x10 ⁻²⁵ | 444,4 |

Fonte: Adaptado de Sarmah, Meyer e Boxall (2006) e O'Connor e Aga (2007).

4.4 QUINOLONAS

As quinolonas são um grupo de agentes antibacterianos sintéticos estruturalmente análogos ao ácido nalidíxico (ácido 1-etil-1,4-dihidro-7-metil-4-oxo-1,8-naftiridina-3-carboxílico) e compreendem os ácidos quinolino-carboxílicos, carboxiquinolonas e 4-quinolonas. As 4-quinolonas, as quais possuem um ácido carboxílico na posição 3 da estrutura do anel primário, correspondem a compostos com um esqueleto comum formado por 4-oxo-1,4-dihidroquinolina. As fluoroquinolonas mais recentes contém flúor na posição 6 e muitos ainda possuem uma piperazina na posição 7. A Figura 05 demonstra a estrutura química básica das quinolonas, enquanto o Quadro 06 indica os grupos funcionais que variam conforme a estrutura química (BRUNTON et al., 2008; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; MARTINDALE, 2009).

Modificações na estrutura do ácido nalidíxico produziram, por exemplo, o ácido oxolínico, cinoxacina e rosoxacina, os quais apresentam maior atividade *in vitro* contra bactérias gram-negativas e gram-positivas. Porém, as adições do radical piperazinil na posição 7 e um átomo de flúor na posição 6 produziram um grupo de fluoroquinolonas com um espectro de atividade mais amplo com relação ao ácido nalidíxico e propriedades farmacocinéticas mais adequadas ao tratamento de infecções sistêmicas (AUTO; CONSTANT, 2008; MARTINDALE, 2009).

As quinolonas podem ser classificadas conforme a atividade microbiológica e as propriedades farmacocinéticas em primeira, segunda, terceira, quarta ou quinta geração. Na primeira geração estão incluídas as quinolonas não-fluoradas como a cinoxacina e os ácidos nalidíxico, pipemídico e oxolínico. As concentrações inibitórias para estes antibióticos só podem ser alcançadas na urina e nas fezes, devido a isso são utilizadas para tratamento de infecções urinárias e intestinais (como a shigelose). As quinolonas apresentam atividade bactericida contra organismos gram-negativos, porém são pouco eficazes contra *Pseudomonas*, estafilococos e bactérias gram-positivas (MACHADO; BARROS, 2008; MARTINDALE, 2009).

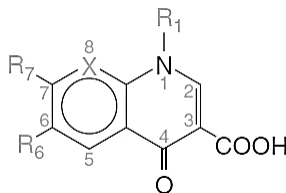



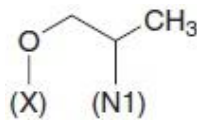
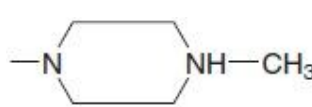

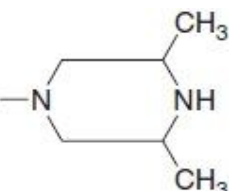
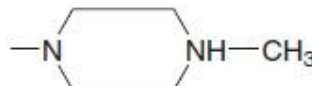
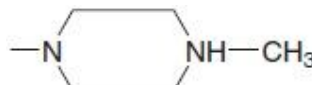
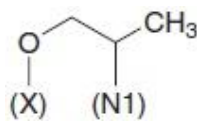
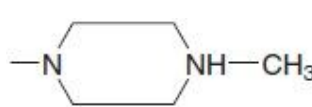
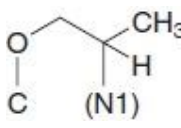

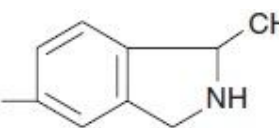

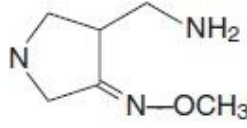


Figura 05: Estrutura química básica da quinolonas.
Fonte: Brunton et al. (2008).

Quadro 06: Grupos funcionais na estrutura das quinolonas.

| Antimicrobiano | R1 | R6 | R7 | X |
|------------------|---|-------------|--|---|
| Ácido nalidíxico | $-\text{C}_2\text{H}_5$ | $-\text{H}$ | $-\text{CH}_3$ | $-\text{N}-$ |
| Norfloxacin | $-\text{C}_2\text{H}_5$ | $-\text{F}$ |  | $-\text{CH}-$ |
| Ciprofloxacino |  | $-\text{F}$ |  | $-\text{CH}-$ |
| Ofloxacin |  (X) (N1) | $-\text{F}$ |  | $-\text{CH}-$ |
| Esparfloxacin |  | $-\text{F}$ |  | $\begin{matrix} \text{F} \\ \\ -\text{C}- \end{matrix}$ |
| Fleroxacin | $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{F}$ | $-\text{F}$ |  | $\begin{matrix} \text{F} \\ \\ -\text{C}- \end{matrix}$ |
| Pefloxacin | $-\text{C}_2\text{H}_5$ | $-\text{F}$ |  | $-\text{CH}-$ |
| Levofloxacin |  (X) (N1) | $-\text{F}$ |  |  C (N1) |
| Garenoxacin |  | $-\text{H}$ |  | $\begin{matrix} \text{OCHF}_2 \\ \\ -\text{C}- \end{matrix}$ |
| Gemifloxacin |  | $-\text{F}$ |  | $-\text{N}-$ |

Fonte: Adaptado de Brunton et al. (2008).

A segunda geração das quinolonas abrange apenas a norfloxacina. Neste antibiótico, a presença de um átomo de flúor acentua a ação bactericida contra organismos gram-negativos, incluindo *P. aeruginosa*, e cocos gram-positivos. A terceira geração é composta por ciprofloxacina, pefloxacina, ofloxacina e lomefloxacina. Esses compostos atingem concentrações elevadas intra e extracelulares na maioria dos tecidos, possuindo maior espectro de ação ao agir contra gram-negativos e gram-positivos não alcançados pela norfloxacina. A quarta geração das quinolonas abrange a levofloxacina

(isômero da ofloxacina) e a gatifloxacina. A levofloxacina e a ofloxacina têm maior espectro de ação quando comparadas com as quinolonas das gerações anteriores, sendo muito ativas contra estreptococos, pneumococos, *Mycoplasma*, *Chlamydia* e *Ureaplasma*. Na quinta geração das quinolonas estão incluídas a moxifloxacina e a gemifloxacina. Esses antibióticos caracterizam-se pela ação potente contra bactérias anaeróbias e espectro bactericida mais amplo em relação à quarta geração das quinolonas. A moxifloxacina tem baixa atividade contra *P. aeruginosa*, mas é bastante ativa contra cocos gram-positivos. A gemifloxacina apresenta boa atividade contra *P. aeruginosa*, cocos gram-positivos e bactérias anaeróbias (MACHADO; BARROS, 2008).

As quinolonas são potentes bactericidas contra uma ampla variedade de micro-organismos gram-negativos e gram-positivos, como *Escherichia coli*, várias espécies de *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Campylobacter* e *Neisseria*. As concentrações inibitórias mínimas das fluoroquinolonas para 90% dessas cepas (CIM₉₀) são inferiores a 0,2 µg·mL⁻¹. O ciprofloxacino apresenta uma maior atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* em relação ao norfloxacino, tendo os valores de CIM₉₀ para estes antibióticos variando entre 0,5 e 6,0 µg·mL⁻¹. As fluoroquinolonas ainda apresentam boa atividade contra *Staphylococcus*, porém não são efetivas contra cepas resistentes à metilina (CIM₉₀ = 0,1 – 2,0 µg·mL⁻¹). A atividade contra estreptococos se limita a um grupo de quinolonas, incluindo levofloxacina, gatifloxacina e moxifloxacina. Várias bactérias intracelulares são inibidas por fluoroquinolonas, sendo elas: *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Legionella*, *Brucella* e *Mycobacterium* (incluindo *Mycobacterium tuberculosis*). A ciprofloxacino, ofloxacino, pefloxacino e esparfloxacino apresentam valores de CIM₉₀ variando entre 0,5-3,0 µg·mL⁻¹ para *Mycobacterium fortuitum*, *M. kansasii* e *M. tuberculosis* (BRUNTON et al., 2008; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

As quinolonas bloqueiam a síntese do DNA bacteriano pela inibição de duas enzimas: DNA girase (topoisomerase II) e topoisomerase IV. A inibição da ação das subunidades A da DNA girase, enzima responsável pela divisão da dupla cadeia do DNA cromossômico e pelo espiralamento da nova cadeia formada, impede o relaxamento da DNA super enrolado de forma positiva e a introdução contínua de super-espirais negativas no DNA, atividades essenciais à transcrição e replicação normais, induzindo a síntese descontrolada de RNA mensageiro, o que resulta na degradação cromossômica e na conseqüente morte celular. A inibição da topoisomerase

IV interfere na separação das moléculas-filhas de DNA interligadas (encadeadas), que são o produto de replicação do DNA, durante a divisão celular. O mecanismo de ação das quinolonas está demonstrado na Figura 06 (BRUNTON et al., 2008; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

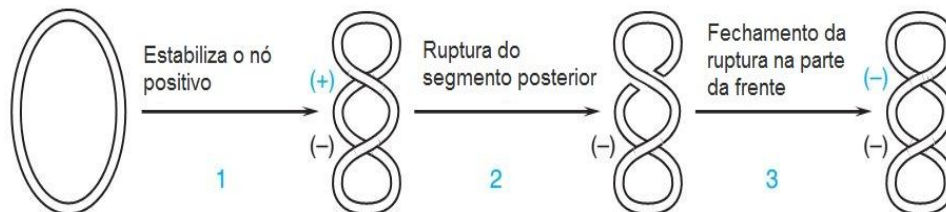


Figura 06: Mecanismo de ação das quinolonas.

Fonte: Adaptado de Brunton et al. (2008) e Brunton, Chabner e Knollman (2012).

A enzima liga-se a dois segmentos de DNA (1), criando um nó de super-hélice positiva (+). Em seguida, a enzima introduz uma ruptura de duplo filamento no DNA e passa em frente do segmento por meio da ruptura (2). Posteriormente, a ruptura é selada (3), criando uma super-espiral negativa (-) (BRUNTON et al., 2008; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

As fluoroquinolonas são metabolizadas no fígado, onde o nível de biotransformação depende do composto e da espécie química. Em geral, ocorrem reações de hidroxilação e oxidação, transformando-as em oxo-quinolonas, as quais são posteriormente submetidas a reações de fase 2, que consistem em conjugação com ácido glucurônico. Os glucurono-conjugados sintetizados são excretados na urina e bile, sendo que algumas fluoroquinolonas passam pela circulação entero-hepática, após a conjugação de beta-glucoronidase nos conjugados. Alguns metabolitos têm atividade antimicrobiana, assim a enrofloxacin torna-se a ciprofloxacina (Figura 07), a qual é utilizada tanto na medicina humana quanto na veterinária. A conversão de enrofloxacin para a ciprofloxacina ocorre nos organismos de cães e raramente em cavalos e aves (LÓPEZ, 2007).

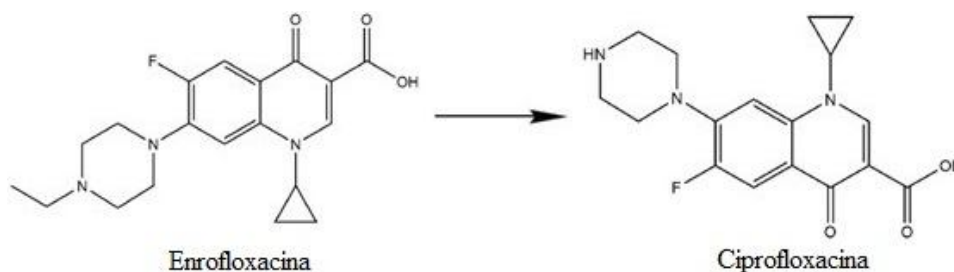


Figura 07: Bioconversão da enrofloxacin para ciprofloxacina.

Fonte: López (2007).

de $6,0 \pm 0,3$ sendo relativamente independente da substituição na posição 7 (LIZONDO et al., 1997). O equilíbrio de ionização da enrofloxacinina está representado na Figura 09 e é apropriado para outras fluoroquinolonas com piperazinila em sua estrutura.

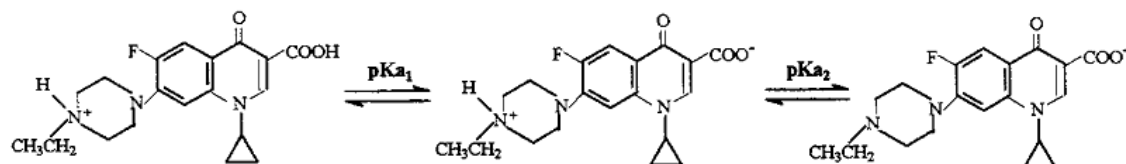


Figura 09: Estruturas e equilíbrio de ionização da enrofloxacinina.
Fonte: Turiel et al. (2003).

A enrofloxacinina (1-ciclopropil-7-(4-etil-1-piperazinil)-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-3-ácido quinolínico carboxílico) é uma 6-fluoroquinolona sintética (Figura 10a). A enrofloxacinina difere da ciprofloxacina apenas (Figura 10b) pela presença de um grupo etil em vez de um átomo de hidrogênio na posição para no anel piperazínico. A estrutura do núcleo é idêntica ao ácido nalidíxico (Figura 10c). Devido às mudanças graduais na estrutura básica da molécula da enrofloxacinina, as propriedades farmacocinéticas e antimicrobianas foram melhoradas (VALGAS, 2005).

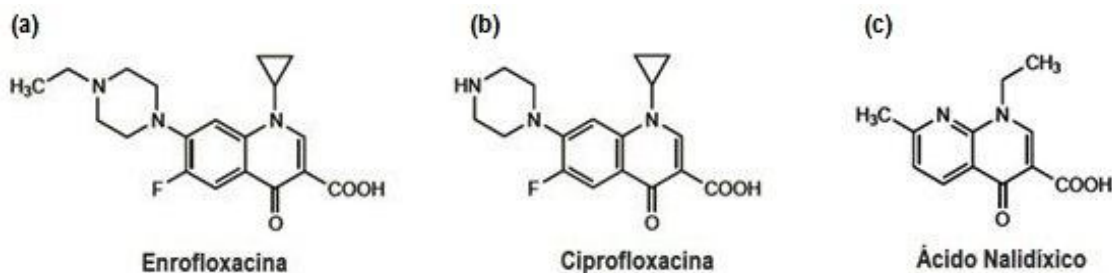


Figura 10: Semelhança entre as estruturas dos antimicrobianos enrofloxacinina (10a), ciprofloxacina (10b) e ácido nalidíxico (10c).
Fonte: Adaptado de Martindale (2009).

A enrofloxacinina é um ácido carboxílico quinoleínico, cuja massa molar é $359,40 \text{ g mol}^{-1}$, com fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{FN}_3\text{O}_3$, que apresenta cor amarela cristalina pálida com um grau elevado de pureza. Em solução aquosa com pH 7, a enrofloxacinina é ligeiramente solúvel. Entretanto, por conter grupos ácidos e básicos, este antibiótico pode ser identificado na solução quando os valores de pH são alcalinos ou ácidos. Deste modo a absorção máxima no espectro UV-Vis desta molécula em pH neutro é de 276 a 318 nm, com absortividades molares de 58.500 e 17500,

respectivamente (LIZONDO et al., 1997). A Figura 11 mostra o espectro de absorção no UV da enrofloxacinina em quatro diferentes valores de pH.

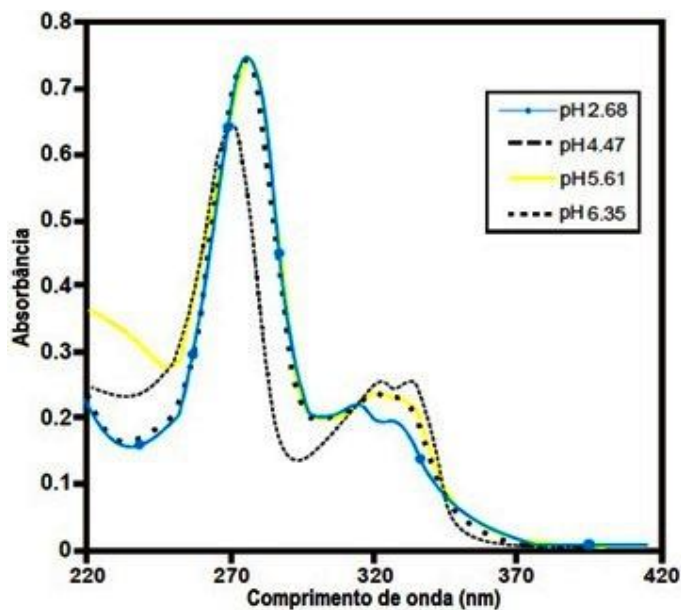


Figura 11: Espectro de absorção no UV da enrofloxacinina em quatro diferentes valores de pH.

Fonte: LIZONDO et al. (1997).

A enrofloxacinina pode ser encontrada em quatro formas dependentes do pH, como cátion ácido (C); espécie neutra não-ionizada (N); um intermediário zwitteriônico (Z) e como um íon básico (A). Isso pode ser observado na Figura 12 (VALGAS, 2005).

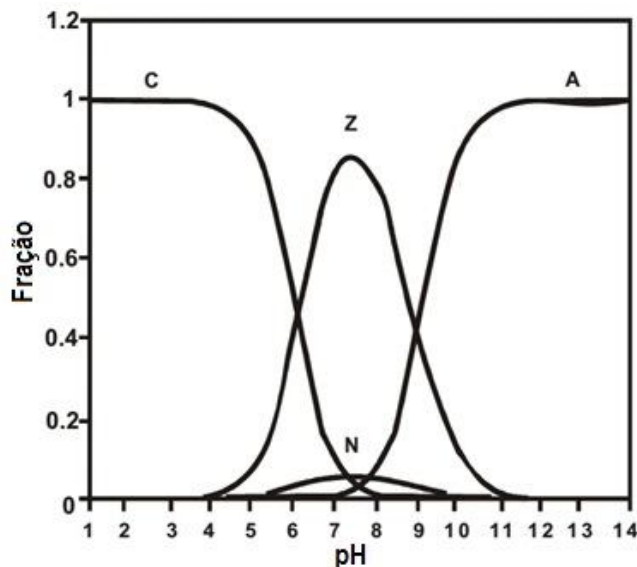


Figura 12: Distribuição das quatro possíveis espécies da enrofloxacinina: cátion ácido (C); espécie neutra não-ionizada (N); intermediário zwitterion (Z) e íon básico (A).

Fonte: LIZONDO et al. (1997).

As frações das quatro possíveis formas da enrofloxacinina podem variar em função do pH. Na solução, as espécies catiônica e aniônica se aproximam da concentração total da enrofloxacinina em valores de pH elevados e baixos, respectivamente, e a espécie neutra alcança uma concentração máxima no pH isoelétrico. A constante de dissociação para o ácido carboxílico é maior do que para a amina, a forma neutra é principalmente o *zwitterion*. As espécies neutras sem cargas estão em proporções extremamente baixas (VALGAS, 2005). A solubilidade também foi determinada por Lizondo et al. (1997) em amostras à 25°C por 48 horas, e variou de pH 5,05 a 8,83. A Figura 13 mostra o perfil pH-solubilidade da enrofloxacinina, onde existe uma zona de baixa solubilidade na proximidade do ponto isoelétrico. A solubilidade máxima foi encontrada em pH 5,02 (LIZONDO et al., 1997).

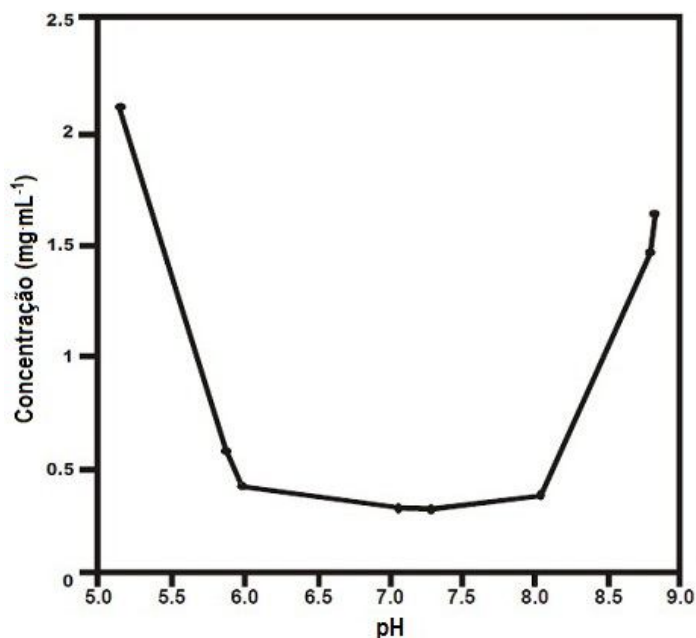


Figura 13: Perfil de solubilidade x pH da concentração de enrofloxacinina.
Fonte: Lizondo et al. (1997).

4.5 SULFONAMIDAS

As sulfonamidas são um grupo de antibióticos sintéticos e análogos estruturais do ácido *p*-aminobenzoico (PABA). A maioria destes compostos é insolúvel em água, porém os sais de sódio das sulfonamidas são bem solúveis em água. A ação bactericida se deve ao grupo sulfanilamida, tendo uma importante característica de o enxofre estar ligado diretamente ao anel benzeno. (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

Compostos com diferentes características farmacológicas e propriedades antibacterianas são produzidos quando diferentes substituintes são ligados ao grupo amido (-SO₂-NH-R) ou amino (-NH₂). A Figura 14 demonstra as fórmulas básicas das sulfonamidas (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

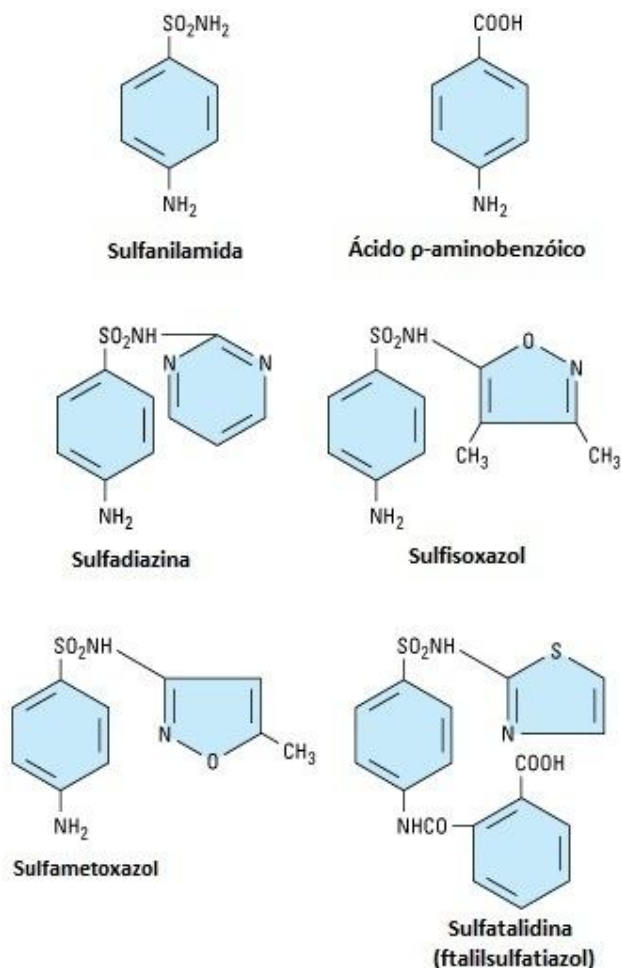


Figura 14: Estrutura de algumas sulfonamidas e do ácido p-aminobenzóico.
Fonte: Adaptado de KATZUNG, Masters e Trevor (2014).

As sulfonamidas inibem a di-hidropteroato sintetase e a produção do folato. As sulfonamidas atuam contra bactérias gram-positivas e gram-negativas como: *Chlamydia trachomatis*, *Nocardia* sp., algumas entéricas (*Salmonella*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* sp.) e alguns protozoários. No entanto, as riquetsias não são inibidas, porém têm seu crescimento estimulado (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014). De acordo com Tavares (2009), os micro-organismos *Paracoccidioides brasiliensi*, *Toxoplasma gondii* e *Isospora belli* são sensíveis às

sulfonamidas. A Figura 15 representa o mecanismo de ação das sulfonamidas e da trimetoprima.

As sulfonamidas tem pouco efeito sobre bactérias aeróbias. *Pseudomonas aeruginosa* apresenta resistência intrínseca às sulfonamidas (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014). O uso clínico dessa classe de antimicrobianos tem diminuído devido ao surgimento crescente de cepas resistentes. (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; MARTINDALE, 2007). Muitas espécies, antes sensíveis como meningococos, estreptococos, pneumococos, estafilococos e gonococos, se tornaram resistentes às sulfonamidas. Devido a isso, as sulfonamidas são pouco utilizadas como agentes isolados (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

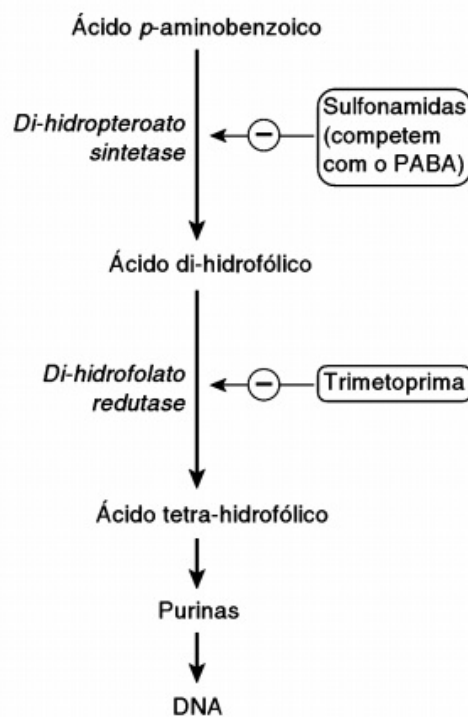


Figura 15: Mecanismo de ação das sulfonamidas e da trimetoprima.
Fonte: KATZUNG, Masters e Trevor (2014).

O uso concomitante de uma sulfonamida com um inibidor da di-hidrofolato redutase (trimetoprima ou pirimetamina) resulta em um efeito sinérgico, potencializando a ação devido a inibição sequencial da síntese do folato (Figura 15) (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014). A associação sulfametoxazol-trimetoprima, denominada cotrimoxazol, é indicada no tratamento de infecções como pneumonia por *Pneumocystis jiroveci*, toxoplasmose, nocardiose e outras infecções bacterianas. A sulfassalazina, a qual é

pouco absorvida pelo trato gastrointestinal, é indicada para tratamento da colite ulcerativa, doença de Crohn (RANG et al., 2012), enterite e outras doenças inflamatórias intestinais. A sulfadiazina combinada com pirimetamina constitui a primeira escolha no tratamento da toxoplasmose. A combinação sulfadoxina-pirimetamina é indicada como medicamento de segunda escolha no tratamento de malária nos Estados Unidos. O sulfisoxazol e o sulfametoxazol são ainda empregados no tratamento de infecções urinárias (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

A resistência às sulfonamidas é originada por mutação e seleção aleatória ou por transferência do plasmídeo de resistência. Porém, a resistência a essa classe de antimicrobianos não resulta em resistência cruzada a outras classes de antimicrobianos (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

As sulfonamidas são o tratamento de eleição da coccidiose em pequenos animais, sendo também muito indicadas no tratamento da coccidiose em grandes animais. As sulfonamidas são bem eficientes com os estados esquizontes dos coccídios, porém um tratamento prolongado se faz necessário para que o medicamento bloqueie eficazmente o ciclo de vida. As sulfas têm desempenho aceitável em três categorias: a solubilidade é adequada, são administradas uma ou duas vezes por dia na ração ou na água e apresentam espectro de ação amplo (BOWMAN, 2010).

A sulfaquinoxalina tem seu uso aprovado para controle e tratamento de coccídios em aves (perus, frangos) e na pecuária (ovinos, bovinos) (BOWMAN, 2010). Esse antibiótico também é indicado no tratamento e prevenção da coccidiose, tifo e cólera aguda em pássaros (ANDRADE, 2004). A sulfaquinoxalina, bem como a sulfametazina e a sulfadimetoxina, são utilizadas no tratamento da coccidiose clínica em bezerros, causada por *Eimeria bovis* e por *Eimeria zuernii*. A sulfametazina é administrada oralmente em uma dosagem de 140 mg/kg/dia durante 3 dias e a sulfaquinoxalina em uma dose de 13,2 mg/kg/dia por 3 a 5 dias. A sulfaquinoxalina, no controle da coccidiose em ovinos, deve ser administrada na água dos animais ((BOWMAN, 2010).

4.5.1 Característica Físico-químicas das Sulfonamidas

As sulfonamidas são derivados do ácido *p*-aminobenzóico (Figura 16) e consistem de um anel benzeno, um radical amina (-NH₂) e um grupo sulfonamida (-SO₂NH-).

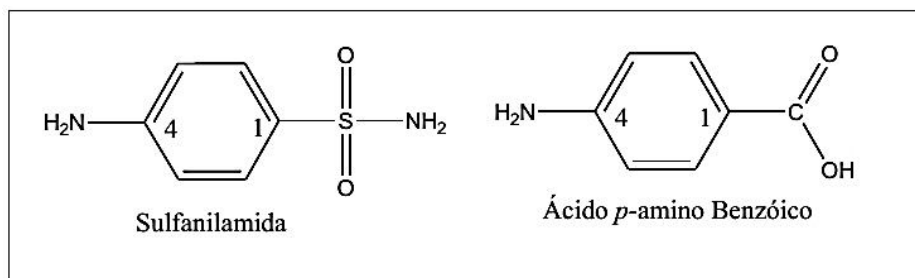


Figura 16: Fórmulas estruturais da sulfanilamida (precursora das sulfas) e do ácido *p*-aminobenzóico.

Fonte: Ruy (2010).

As sulfonamidas se apresentam como pós inodoros de coloração branca ou fracamente coloridos, relativamente insolúveis em água e anfotéricas com grupos funcionais aceptores e doadores de elétrons. Se caracterizam por apresentarem dois valores de pK_a , indicando a protonação do grupo amina em valores de pH de 2 a 3 e desprotonação do grupo $RISO_2NHR_2$ em valores de pH de 5 a 11. (INGERSLEV; HALLING- SØRENSEN, 2000; THIELE-BRUHN, 2003). Devido a isso, muitas sulfonamidas têm ponto isoelétrico próximo do pH 4 (MARTÍNEZ; GÓMEZ, 2001; ORLANDO, 2011). Em geral, as sulfonamidas anfotéricas atuam como ácidos fracos e formam sais na presença de ácidos ou bases fortes (Figura 17). (INGERSLEV; HALLING- SØRENSEN, 2000; THIELE-BRUHN, 2003).

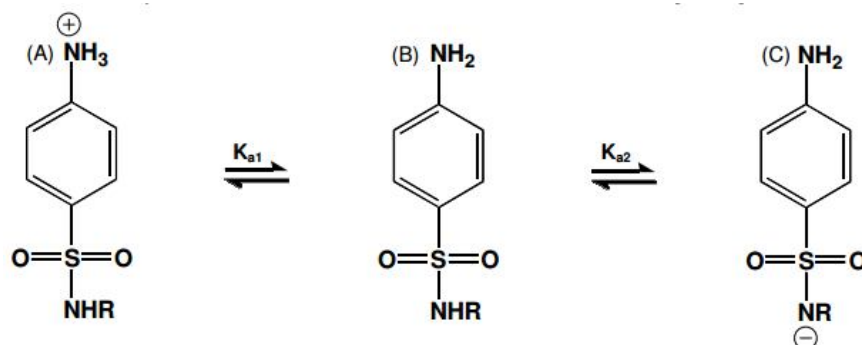


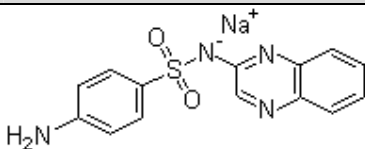
Figura 17: Equilíbrio de dissociação das sulfonamidas em sua forma catiônica (A), neutra (B) e aniônica (C).

Fonte: Orlando (2011).

Embora as sulfonamidas sejam anfotéricas, elas geralmente se comportam como ácidos fracos na faixa de pH fisiológico (entre 4,5-6,0). Deste modo se apresentam como sais de sódio, os quais são mais solúveis com o aumento do pH. A solubilidade das sulfonamidas pode variar na faixa de 0,1 - 8 gL⁻¹ (INGERSLEV; HALLING-SØRENSEN, 2000; SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006).

A maioria das sulfonamidas utilizada na medicina veterinária tem pelo menos duas funções nitrogenadas com a amida ligada ao enxofre (denominada N¹) e desprotonada a um pH > 5,5-7. A amina ligada ao anel aromático é chamada N⁴ e é protonada a um pH 2,5. Devido a motivo, a maior parte das sulfonamidas é carregada positivamente em condições ácidas, neutras entre pH 2,5 e 6, e carregada negativamente em condições alcalinas (HALLER et al., 2002; SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006). O Quadro 07 apresenta as propriedades físico-químicas da sulfaquinoxalina, enquanto o Quadro 08 descreve as características físico-químicas de algumas sulfonamidas.

Quadro 07: Características físico-químicas da sulfaquinoxalina.

| Características | Sulfaquinoxalina |
|---|--|
| Estrutura Molecular |  |
| Fórmula Molecular | C ₁₄ H ₁₁ N ₄ NaO ₂ S |
| Nome IUPAC | Sodium[(4-aminophenyl)sulfonyl](2-quinoxalinylnyl)azanide |
| Massa Molar | 322,3175 g·mol ⁻¹ |
| Densidade | 1,491 g·cm ⁻³ |
| Ponto de Ebulição | 551,1°C a 1 bar. |
| Ponto de Fusão | 287,1°C |
| Solubilidade | |
| (Estimada pelo Log K_{ow}) | 0,45 g·L ⁻¹ |
| Número CAS | 59-40-5 |
| Número ChemSpider | 5147 |
| Solubilidade | Praticamente insolúvel em água e éter, pouco solúvel em álcool metílico e etílico. Moderadamente solúvel em acetona. |
| Aparência | Pó de coloração amarela |

Fonte: Adaptado de Chemical Abstracts Service (2014), Chemspider (2015) e Martindale (2007).

Quadro 08: Propriedades físico-químicas das sulfonamidas a 25°C.

| Antibiótico | pK _a | Log K _{ow} | Solubilidade em água (mgL ⁻¹) | Pressão de Vapor (mmHg) | Massa Molar (g·mol ⁻¹) |
|------------------|-----------------|---------------------|---|-------------------------------|---------------------------------------|
| Sulfanilamida | 10,28; 2,54 | -0,62 | 7500 | 7,32x10 ⁻⁶ | 172,2 |
| Sulfacetamida | 5,26; 1,94 | -0,96 | 12500 | 3,32x10 ⁻⁸ | 214,2 |
| Sulfametazina | 7,22; 2,54 | 0,89 | 1500 | 6,82x10 ⁻⁹ | 278,3 |
| Sulfadiazina | 6,34; 2,54 | -0,09 | 77 | 5,26x10 ⁻⁹ | 250,3 |
| Sulfamerazina | 6,92; 2,24 | 0,14 | 202 | 4,71x10 ⁻⁹ | 264,3 |
| Sulfapiridina | 8,29; 2,74 | 0,35 | 270 | 4,14x10 ⁻⁸ | 249,3 |
| Sulfatiazol | 6,98; 2,54 | 0,05 | 373 | 3,24x10 ⁻⁸ | 255,3 |
| Sulfametoxazol | 5,45; 2,50 | 0,89 | 610 | 1,30x10 ⁻⁵ | 253,3 |
| Sulfaquinoxalina | 6,00; 2,30 | 1,68 | 7,5 | 1,12x10 ⁻¹⁰ | 322,3 |

Fonte: Adaptado de ChemsSpider (2014) e Martínez e Gómez (2001).

4.6 COMPOSTOS BETALACTÂMICOS

Os compostos β -lactâmicos compreendem as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos, carbapenens e os inibidores das β -lactamases, os quais compartilham entre si semelhanças nas características químicas, imunológicas, farmacológicas, mecanismos de ação e a estrutura química do anel lactâmico, composto de quatro carbonos (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014). As penicilinas apresentam uma estrutura básica composta de um anel tiazolidínico (A) ligado a um anel betalactâmico (B), que por sua vez se liga a uma cadeia lateral, que se constitui de um grupo amino secundário (R-NH-) (Figura 18). Vários substituintes podem estar fixados ao grupo amino (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012; KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014). A integridade estrutural do núcleo do ácido 6-aminopenicilânico (composto pelos anéis A e B) é o principal requisito para a atividade antibacteriana. (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012; KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

A descoberta que tornou possível a obtenção do ácido 6-aminopenicilânico por meio de culturas de *Penicillium chrysogenum* com a depleção dos precursores de cadeia lateral, permitiu o desenvolvimento das penicilinas semissintéticas. Estas são obtidas com uma amidase do *Penicillium chrysogenum*. Esta enzima cliva a ligação peptídica

entre a cadeia lateral e o núcleo do ácido 6-aminopenicilânico. A transformação química ou alteração biológica no núcleo da penicilina confere a perda de toda a ação antimicrobiana. (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012).

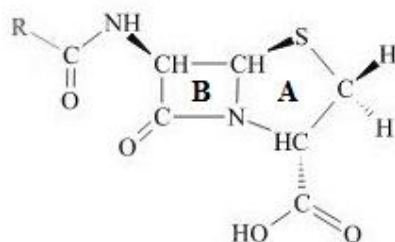


Figura 18: Estrutura química básica das penicilinas.
Fonte: Katzung, Masters e Trevor (2014).

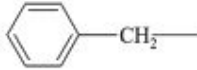
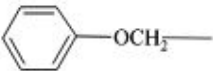
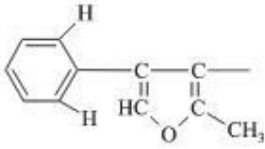
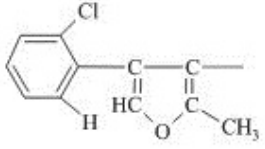
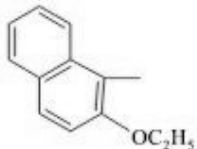
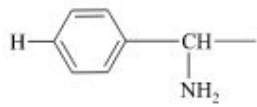
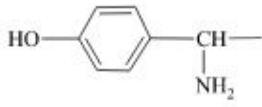
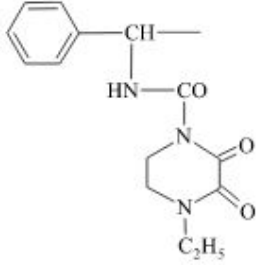
As cadeias laterais (substituintes do ácido 6-aminopenicilânico) determinam muitas propriedades farmacológicas e antibacterianas das moléculas resultantes (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012; KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014). Algumas cadeias laterais substituintes do núcleo do ácido 6-aminopenicilânico estão representadas no Quadro 09.

Os compostos β -lactâmicos são a maior e mais prescrita classe de antibióticos que impedem a síntese da parede celular bacteriana (GOLAN et al., 2009; QUINN et al., 2005). A parede celular é uma camada rígida que envolve por completo a célula bacteriana no lado externo de sua membrana citoplasmática. A sua função é manter o formato e a integridade celular ao impedir a sua lise em virtude de alta pressão osmótica (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014). O peptidoglicano, componente heteropolímero da parede celular, é uma rede polimérica tridimensional composta por cadeias de glicano, as quais consistem de filamentos lineares de dois aminoaçúcares alternados (N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico) com ligações cruzadas estabelecidas por cadeias peptídicas (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012; GOLAN et al., 2009).

O anel lactâmico se liga de modo covalente à transpeptidase bacteriana, formando um intermediário acil enzima e tornando a extremidade carboxi-terminal do β -lactâmico impossível de ser clivada do restante da molécula. Assim, a extremidade aminoterminal do peptídeo adjacente não pode atacar o intermediário acil enzima, interrompendo a síntese do peptidoglicano. Isso ocorre porque o anel lactâmico é um análogo estrutural do dipeptídeo D-Ala-D-Ala do peptídeo de Park, e assim, um substrato para as enzimas transpeptidases bacterianas (GOLAN et al., 2009), estas

responsáveis pela ligação cruzada das cadeias peptídicas conectadas ao esqueleto da peptidoglicano. (RANG et al., 2012). Quando as células bacterianas estão em crescimento ativo, a inibição das transpeptidases resulta em autólise por autolisinas e a consequente morte celular. Desta forma, os antibióticos β -lactâmicos são bactericidas para as células em divisão ativa (GOLAN et al., 2009).

Quadro 09: Cadeias laterais de algumas penicilinas.

| Antimicrobiano | R |
|----------------|--|
| Penicilina G |  |
| Penicilina V |  |
| Oxacilina |  |
| Dicloxacilina |  |
| Nafcilina |  |
| Ampicilina |  |
| Amoxicilina |  |
| Piperacilina |  |

Fonte: Katzung, Masters e Trevor (2014).

Apesar da importância da inibição das transpeptidases, cefalosporinas e penicilinas também inibem outras proteínas de ligação da penicilina (PBP). A inibição das transpeptidases leva à formação de esferoblastos e à lise celular imediata. Porém, a inibição de outras PBP leva à lise tardia ou à produção de longas formas filamentosas bacterianas. Desta forma, a ação letal das penicilinas envolve processos líticos ou não-líticos. A quebra do equilíbrio entre a montagem do peptidoglicano feita pela PBP e a atividade de hidrolase do mucopeptídeo pela penicilina ocasiona a autólise (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012). A Figura 19 apresenta o mecanismo de ação dos antimicrobianos beta-lactâmicos.

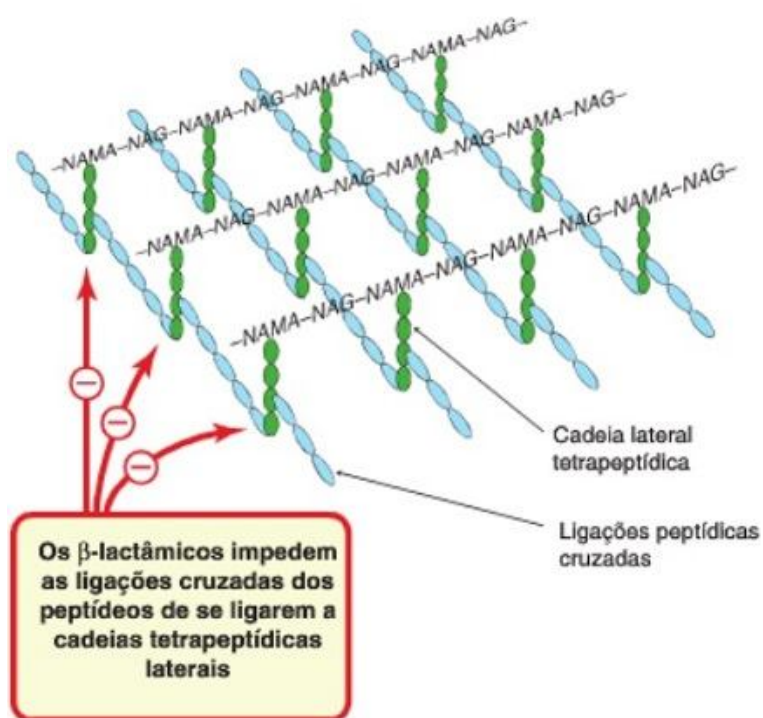


Figura 19: Mecanismo de ação dos antibióticos β -lactâmicos.

Fonte: Rang et al. (2012).

As penicilinas podem ser divididas em cinco grupos de acordo com o espectro de atividade antimicrobiana: penicilinas, penicilinas antiestafilocócicas, aminopenicilinas, carboxipenicilinas e ureidopenicilinas (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012):

- a) O primeiro grupo das penicilinas incluem a penicilina G (administrada por via intravenosa) e a penicilina V (administrada por via oral), as quais são bastante ativas

contra cepas sensíveis de cocos gram-positivos, gram-negativos e micro-organismos anaeróbios que não produzem β -lactamases. No entanto, são pouco ativas contra bastonetes gram-negativos e podem sofrer hidrólise pelas β -lactamases. (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012; KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014). A penicilina V (benzilpenicilina) é utilizada na prevenção da febre reumática recidivante, celulite estreptocócica e em infecções aeróbicas-anaeróbicas da cabeça e pescoço, como exemplo: abscessos dentários. Já a penicilina G (fenoximetilpenicilina) é utilizada no tratamento de infecções graves por bactérias gram-positivas como pneumococo e *Staphylococcus pyogenes*, diplococos gram-negativos, como algumas cepas de *Neisseria*, bacilos gram-positivos anaeróbios do gênero *Clostridium* e espiroquetas, como *Treponema pallidum* e gênero *Leptospira* (GOLAN et al., 2009).

- b) As penicilinas anti-estafilocócicas (metilicina, nafcilina, cloxacilina, oxacilina e dicloxacilina) são resistentes à β -lactamases estafilocócicas. As penicilinas são ativas contra estafilococos e estreptococos, mas são inativas contra bactérias anaeróbias, cocos, enterococos e bastonetes gram-negativos. (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012; KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014). São utilizadas no tratamento de infecções da pele e tecidos moles, sendo ativas contra *Staphylococcus epidermidis* e cepas de *Staphylococcus aureus* sensíveis a metilicina. O uso das penicilinas antiestafilocócicas no tratamento de infecções por *Staphylococcus aureus* tem sido limitado devido ao aparecimento de cepas de SARM (*Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina). (GOLAN et al., 2009; KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).
- c) As aminopenicilinas, como ampicilina, amoxicilina, bacampicilina e penicilinas antipseudomonas, formam um grupo de antibióticos de amplo espectro que atuam contra muitos cocos gram-positivos, cocos gram-negativos, como *Neisseria gonorrhoeae* e *N. meningitidis*, bacilos gram-positivos, como *Listeria monocytogenes*, bacilos gram-negativos, como *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas* e *Proteus mirabilis*. Entretanto, são facilmente hidrolisadas pela ação das enzimas β -lactamases de espectro ampliado que são cada vez mais encontradas em isolados clínicos (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012; GOLAN et al., 2009; KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

- d) As carboxipenicilinas incluem a carbenicilina e a ticarcilina. Possuem amplo espectro de ação, atuando contra *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Proteus* devido a sua resistência às β -lactamases.
- e) As ureidopenicilinas são representadas pela piperacilina, mezlocilina e azlocilina. Possuem o espectro de ação similar às carboxipenicilinas, embora sejam mais potentes. Atuam contra enterococos, *Klebsiella* e outras bactérias gram-negativas (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012; GOLAN et al., 2009).

Mesmo que as penicilinas sejam antibióticos bastante eficientes e amplamente utilizadas, podem ser desativadas por amidases e β -lactamases (penicilinases). Isso constitui uma das mais importantes formas de resistência a essa classe de antibacterianos. (RANG et al., 2012). As penicilinas associadas a outros antibióticos (inibidores das β -lactamases), como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, continuam sendo os fármacos de primeira escolha para o tratamento de muitas infecções (MARTINDALE, 2009; RANG et al., 2012).

4.6.1 Características Físico-Químicas das Penicilinas

Todas as penicilinas possuem a mesma estrutura: um anel tiazolidínico a um anel β -lactâmico ligado a um grupo amida. Isso permite concluir que pouca alteração é possível e limitada a cadeia lateral (Figura 20) (PATRICK, 2009).

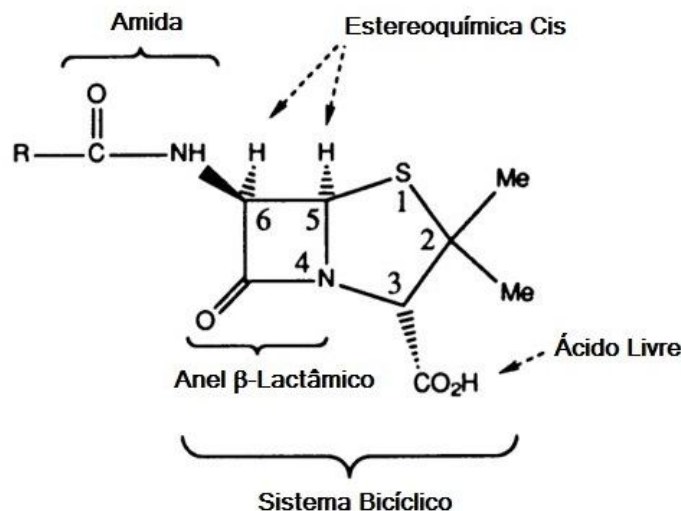


Figura 20: Estrutura das penicilinas.

Fonte: Adaptado de Patrick (2009).

O sistema bicíclico nas penicilinas consiste de um anel de quatro membros e outro composto por cinco elementos. Tal conformação leva a penicilina a sofrer ângulo e tensão torsional (Figura 21). A abertura do anel β -lactâmico, responsável pela reatividade desses compostos sob condições ácidas, permite o alívio da tensão de torção. Em virtude da não coplanaridade entre os dois anéis, a estabilização da carbonila da amida terciária é impossível no anel β -lactâmico, tornando grupo carbonila mais eletrofilico que o normal e sendo assim, é prontamente atacada por um nucleófilo sob condições ácidas (Figura 22). A taxa de decomposição varia conforme o composto. (ANDRADE; TROSSINI; FERREIRA, 2010; PATRICK, 2009; THOMAS, 2011). A piperacilina é tão instável sob pH ácido que necessita ser administrada por via intravenosa, porque as condições ácidas do estômago poderiam reduzir a eficácia deste fármaco. (THOMAS, 2011).

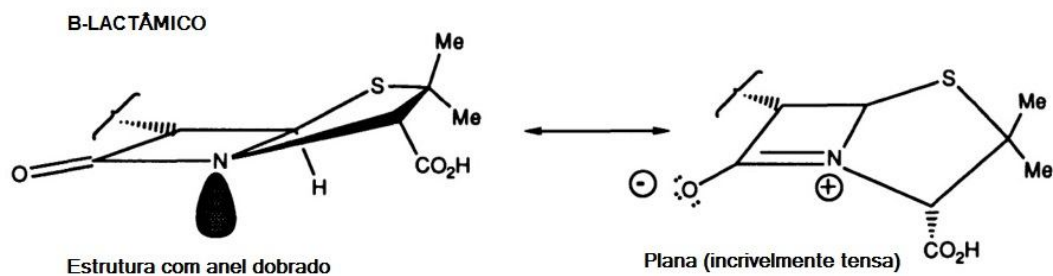


Figura 21: Tensão na molécula dos compostos β -lactâmicos.

Fonte: Adaptado de Patrick (2009).

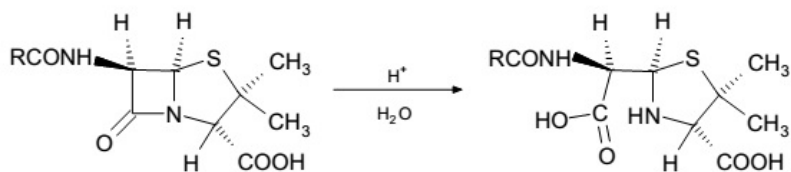


Figura 22: Reatividade das penicilinas em meio ácido.

Fonte: Thomas (2011).

A reatividade pode ser aumentada devido a presença da cadeia lateral acila (amida), causando o efeito do grupo vizinho. Este grupo reforça o caráter eletronegativo do oxigênio presente no grupo carbonila do anel lactâmico, tornando o carbono do grupo lactâmico mais susceptível ao ataque nucleófilo (Figura 23) (THOMAS, 2011).

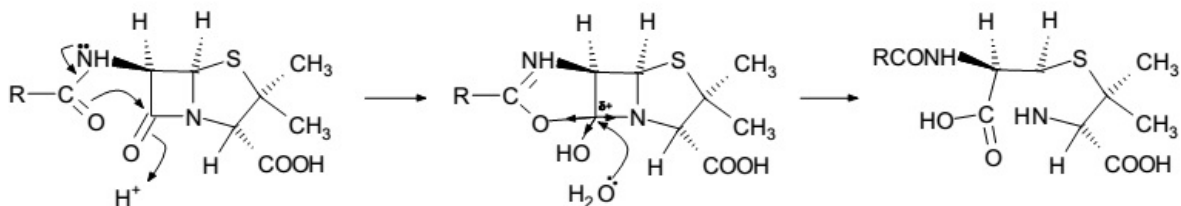


Figura 23: Mecanismo do aumento da reatividade do grupo carbonila da lactama por um grupo vizinho.

Fonte: Thomas (2011).

Penicilinas ácido-resistentes (Figura 24) foram produzidas por meio da introdução de um grupo retirador de elétrons no carbono alfa da cadeia lateral (substituinte R), que por efeito indutivo não permite o rearranjo do anel. Contribuindo assim para diminuir a influência do grupo vizinho e desta forma, reduz a reatividade do grupo carbonila dos β -lactâmicos. Foi deste modo que foram desenvolvidos a ampicilina, amoxicilina e penicilina V (fenoximetil penicilina), as quais possuem o grupo amino adjacente a carbonila da cadeia lateral (amida), a qual retira elétrons do grupo amida vizinho e, desta forma, reduz o ataque ao anel β -lactâmico (Figura 24) (ANDRADE; TROSSINI; FERREIRA, 2010; THOMAS, 2011). A ampicilina é moderadamente solúvel em água, dissolve-se em soluções diluídas de ácidos e de hidróxidos de metais alcalinos. Exibe polimorfismo. Uma solução a 1% de ampicilina apresenta pH entre 3,5 e 6,0 (MARTINDALE, 2009).

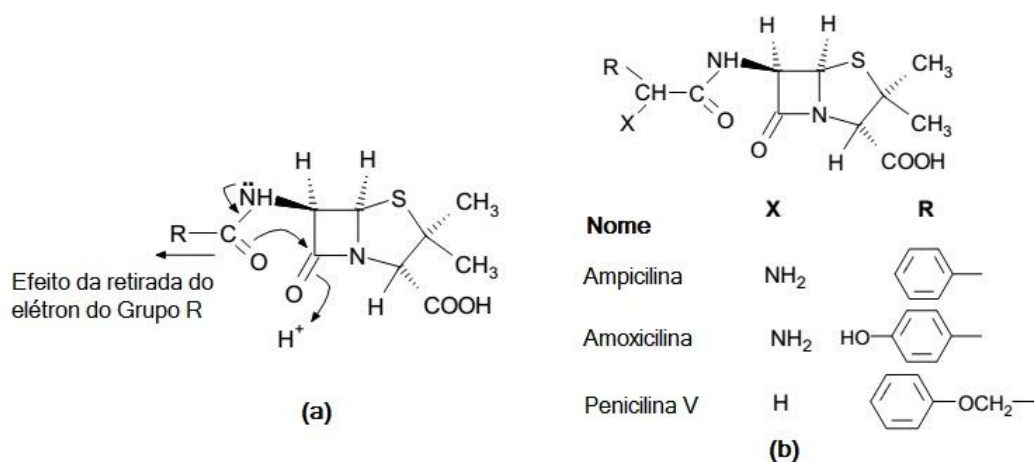


Figura 24: (a) A remoção de elétrons do grupo R diminui a capacidade dos elétrons do grupo carbonila da ligação amida de influenciar o grupo carbonila do anel β -lactâmico.

(b) Exemplos de penicilinas de uso clínico com a retirada de elétrons do grupo R.

Fonte: Thomas (2011).

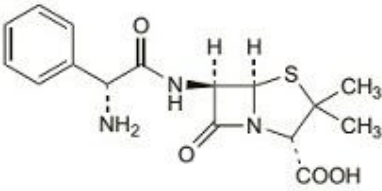
As aminopenicilinas são geralmente estáveis em estado seco. Tal como outras penicilinas, a estabilidade das aminopenicilinas é dependente do pH e da temperatura. As aminopenicilinas são mais resistentes à hidrólise catalisada por ácido e são geralmente estáveis na presença de secreções gástricas após a administração oral. Ampicilina em pó são estáveis quando armazenadas em um sistema fechado com umidade relativa entre 43% e 81% e temperatura ambiente durante seis semanas. A ampicilina também é estável a 35°C em sistema fechado durante nove semanas (PUBCHEM, 2015). As principais características físico-químicas das penicilinas e da Ampicilina podem ser observadas nos Quadros 10 e 11, respectivamente.

Quadro 10: Propriedades físico-químicas das penicilinas a 25°C.

| Antibiótico | pKa | Log K _{ow} | Log K _{oc} | Solubilidade | Pressão de Vapor (mmHg) | Massa Molar (g mol ⁻¹) |
|---------------------|------|---------------------|---------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| | | | | em água (mgL ⁻¹) | | |
| Amoxicilina | 2,40 | 0,87 | 2,94 | 3433,0 | 4,69x10 ⁻¹⁷ | 365,40 |
| Ampicilina | 2,53 | 1,35 | 2,73 | 439,3 | 2,84x10 ⁻¹³ | 349,40 |
| Penicilina G | 2,62 | 1,83 | 2,62 | 210,4 | 9,01x10 ⁻¹¹ | 334,39 |
| Penicilina V | 2,73 | 2,09 | 2,25 | 110,1 | 1,06x10 ⁻¹² | 350,39 |

Fonte: Adaptado de Park e Choi (2008), Chemspider (2015) e Sarmah, Meyer e Boxall (2006).

Quadro 11: Características físico-químicas da ampicilina.

| Características | Ampicilina |
|--------------------------------------|---|
| Estrutura Molecular |  The chemical structure of Ampicillin is shown. It consists of a phenylacetamido group attached to the 6-position of a 3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid core. The stereochemistry is (2S,5R,6R). |
| Fórmula Molecular | C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S |
| Nome IUPAC | (2S,5R,6R)-6-[[[(2R)-2-amino-2-phenylacetyl]amino]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid |
| Massa Molar | 349,405 g·mol ⁻¹ |
| Densidade | 1,60 g·cm ⁻³ |
| Ponto de Ebulição | 622,6°C a 1 bar. |
| Ponto de Fusão | 208,0°C |
| Solubilidade | |
| (Estimada pelo Log K _{ow}) | 0,44 g·L ⁻¹ |
| Número CAS | 69-53-4 |
| Número ChemSpider | 6013 |
| Solubilidade | Moderadamente solúvel em água e metanol. Praticamente insolúvel em álcool, em acetona e ácidos graxos. Insolúvel em clorofórmio, tetracloreto de carbono e benzeno. |
| Aparência | Pó inodoro, cristalino, de coloração branca. |

Fonte: Adaptado de Chemspider (2014), PubChem (2015) e Martindale (2009).

4.7 MACROLÍDEOS

Os macrolídeos constituem um grupo de compostos intimamente relacionados derivados principalmente do *Streptomyces erythreus*, e que apresentam em comum um anel de lactona macrocíclico (composto por 14 a 16 elementos), ao qual se ligam desoxiaçúcares. A eritromicina (Figura 25) constitui o macrolídeo mais conhecido. A claritromicina e a azitromicina são derivados semissintéticos da eritromicina e possuem

espectro de ação mais amplo do que a eritromicina (GOLAN et al., 2009; KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014). A claritromicina diverge da eritromicina somente pela metilação da hidroxila na posição 6, ao passo que a azitromicina difere pelo acréscimo de um átomo de nitrogênio metil substituído no anel de lactona. Tais mudanças garantiram melhor estabilidade em ácido e penetração nos tecidos, além de ampliar o espectro de atividade (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

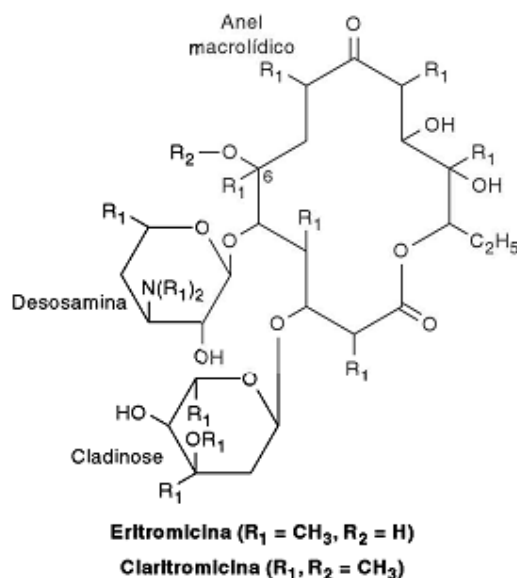


Figura 25: Estrutura química dos macrolídeos eritromicina e claritromicina.
 Fonte: Katzung, Masters e Trevor (2014).

Os macrolídeos mostraram-se importantes no tratamento de infecções pulmonares, inclusive a doença dos Legionários. Esses antimicrobianos possuem excelente penetração no tecido pulmonar e possuem atividade no meio intracelular contra *Legionella* (GOLAN et al., 2009). O espectro de atividade antibacteriano é similar ao da Penicilina G (bezilpenicilina), atuando contra *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma*, *Chlamydothilla*, *Chlamydia* e algumas *rickettsia*. A resistência a um dos membros do grupo implica em resistência cruzada a outros macrolídeos. Também é observada resistência cruzada entre os macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas (MARTINDALE, 2009).

Os macrolídeos comercializados no Brasil são a eritromicina, roxitromicina, espiramicina, claritromicina, azitromicina, diritromicina e telitromicina (TAVARES, 2009). Tilosina tilmicosina e tulatromicina são utilizadas na medicina veterinária. A tilosina é produzida por uma cepa de *Streptomyces fradiae*, que produz uma mistura de

macrolídeos na qual o principal componente (80%) é a tilosina A, embora tilosina B (desmicosina), tilosina C (macrocina), e tilosina D (relomicina) também possam estar presentes (MARTINDALE, 2009).

Os macrolídeos são bacteriostáticos ou bactericidas dependendo da concentração e da espécie de micro-organismo. Macrolídeos tem um efeito pós-antibiótico, isto é, seu efeito antibacteriano persiste mesmo após concentrações abaixo da concentração inibitória mínima (CIM) (MARTINDALE, 2009). Os macrolídeos atuam inibindo a síntese protéica bacteriana e impedem a etapa de translocação da síntese protéica ao agirem sobre o alvo do rRNA 23S da subunidade 50S, impedindo a saída a partir do qual surge a cadeia polipeptídica (Figura 26) (GOLAN et al., 2009). Os macrolídeos inibem a etapa de translocação, na qual a cadeia polipeptídica nascente, que reside temporariamente no local A da reação da transferase, não consegue deslocar-se até o local P, ou doador (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

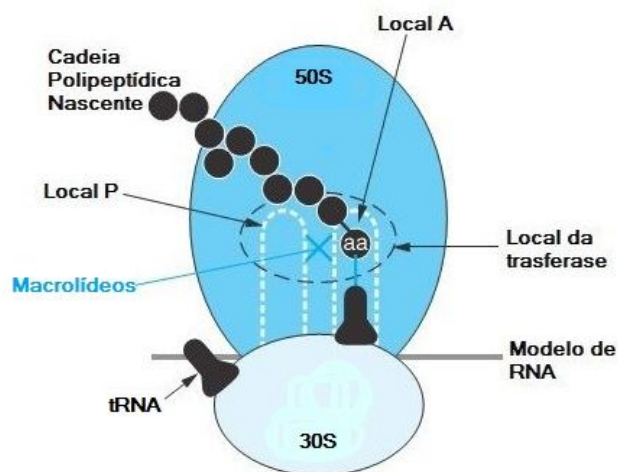


Figura 26: Inibição da síntese protéica bacteriana pelos macrolídeos.
Fonte: Brunton, Chabner e Knollmann (2012).

Os macrolídeos são a segunda classe de antibióticos quantitativamente mais utilizados em animais, perdendo apenas para as tetraciclina (GUARDABASSI; JENSEN; KRUSE, 2010). A tilosina, tilmicosina e espiramicina possuem aplicações para animais da espécie bovina, a josamicina somente para aves e a azitromicina para caninos e felinos. Tem-se observado um predomínio no mercado brasileiro de tilosina nas formulações indicadas para o tratamento da mastite (SINDAN, 2015).

A tilosina é um macrolídeo de amplo espectro que apresenta atividade antibacteriana contra a maior parte das bactérias gram-positivas e *Mycoplasma spp.* A tilosina também apresenta atividade contra *Chlamydia spp.* e algumas bactérias gram-

negativas, entretanto não apresenta atividade contra *Enterobacteriaceae*. Na pecuária, a tilosina pode ser administrada no alimento, água ou por via intramuscular com o intuito de melhorar o ganho de peso, a eficiência alimentar, diminuir a incidência de abscessos no fígado (doses de 50-100 mg /animal/dia); prevenir a pneumonia associada ao micoplasma e à *Pasteurella multocida* em bezerras (doses de 1g / animal por duas vezes ao dia); no tratamento da pneumonia, difteria, metrite, podridão dos cascos e mastite aguda em animais adultos (doses de 5-10 mg/kg/dia por via intramuscular) (FAO; WHO, 2006).

4.7.1 Características Físico-Químicas dos Macrolídeos

Os macrolídeos são bases fracas, ligeiramente solúveis em água e lipofílicas (ŞANLI et al., 2011). A eritromicina é praticamente insolúvel em água (0,1%), no entanto dissolve-se bem em solventes orgânicos. As soluções de eritromicina armazenadas a 4°C se conservam estáveis, entretanto a 20°C ou pH ácido perdem a atividade antibacteriana. Devido a isso, a eritromicina base é destruída pelo suco gástrico, necessitando de revestimento entérico (estolato de eritromicina), sendo dispensada como ésteres ou sais diversos. A atividade é aumentada em pH alcalino (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

A tilosina é uma base orgânica fraca ($pK_a = 7,73$) que rapidamente forma sais e ésteres. A tilosina A contém uma lactona policíclica (tilactona) substituída com três açúcares 3-deoxiexose (Figura 27) (FAO; WHO, 2006). Uma solução de tilosina a 2,5% em água tem pH variando de 8,5 a 10,5. Deve ser protegida da luz e de temperaturas que excedam 40°C (MARTINDALE, 2009). O Quadro 12 apresenta as propriedades físico-químicas da tilosina, enquanto o Quadro 13 apresenta as propriedades físico-químicas de outros macrolídeos.

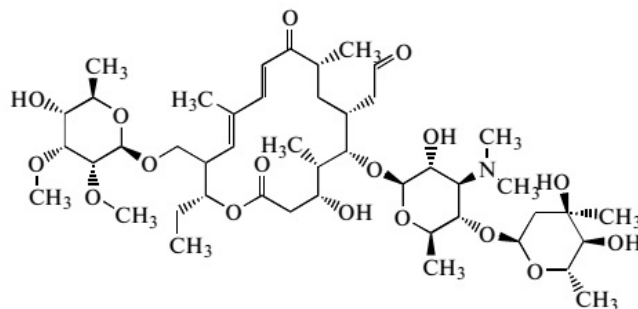
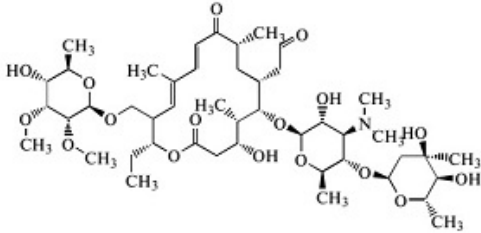


Figura 27: Estrutura química da tilosina.

Fonte: Şanlı et al. (2011).

Quadro 12: Características físico-químicas da tilosina.

| Características | Tilosina |
|---|---|
| Estrutura Molecular |  |
| Fórmula Molecular | C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇ |
| Nome IUPAC | 2-[(4R,5S,6S,7R,9R,11E,13E,15R,16R)-6-[(2R,3R,4R,5S,6R)-5-[(2S,4R,5S,6S)-4,5-dihydroxy-4,6-dimethyloxan-2-yl]oxy-4-(dimethylamino)-3-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-16-ethyl-4-hydroxy-15-[[[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-hydroxy-3,4-dimethoxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]-5,9,13-trimethyl-2,10-dioxo-1-oxacyclohexadeca-11,13-dien-7-yl]acetaldehyde |
| Massa Molar | 916,100 g·mol ⁻¹ |
| Densidade | 1,24 g·cm ⁻³ |
| Ponto de Ebulição | 980.7°C a 1 bar. |
| Ponto de Fusão | 128-132°C |
| Solubilidade | |
| (Estimada pelo Log K_{ow}) | 5,0 mg·L ⁻¹ |
| Número CAS | 1401-69-0 |
| Número ChemSpider | 4444097 |
| Solubilidade | Ligeiramente solúvel em água. Solúvel em álcool anidro, metanol, diclorometano, acetato de amila, clorofórmio e ácidos minerais diluídos. |
| Aparência | Pó quase branco ou de coloração ligeiramente amarela. |

Fonte: Adaptado de Chemspider (2014), PubChem (2015) e Martindale (2009).

Quadro 13: Propriedades físico-químicas dos macrolídeos a 25°C.

| Antibiótico | pKa | Log K _{ow} | Solubilidade em água (mgL ⁻¹) | Pressão de Vapor (mmHg) | Massa Molar (g mol ⁻¹) |
|----------------|------|------------------------|---|----------------------------|--|
| Eritromicina | 8,88 | 3,06 | 4,200 | 2,12x10 ⁻²⁵ | 733,93 |
| Claritromicina | 8,99 | 3,16 | 0,330 | 2,32X10 ⁻²⁵ | 747,95 |
| Tilmicosina | 8,18 | 3,80 | 0,015 | 4,6X10 ⁻³² | 869,13 |
| Tilosina | 7,73 | 1,63 | 5,000 | 2,00x10 ⁻³⁴ | 916,10 |

Fonte: Adaptado de Chemspider (2015), PubChem (2015) e Sarmah, Meyer e Boxall (2006).

4.8 USO DE ANTIBIÓTICOS NA PRODUÇÃO ANIMAL E VETERINÁRIA

O Brasil se consolida como um dos maiores produtores mundiais de alimentos de origem animal. No ano de 2013, foi o maior produtor de carne bovina, terceiro em produção de carne de frango, quarto maior produtor de leite e ocupou o quarto lugar na produção e exportação de carne suína, além do sexto lugar na produção mundial de tilápia (POLL et al., 2013). A utilização de antibióticos na produção animal durante o tratamento terapêutico e profilático com a finalidade de garantir a produtividade e competitividade se tornou muito comum (THIELE-BRUHN, 2003).

O uso de antimicrobianos na criação de animais teve origem há mais de 50 anos, quando o resíduo excedente da fermentação da clortetraciclina provou melhorar o crescimento e a saúde animal. Desde então, melhorias foram feitas na alimentação e manejo de animais de criação e na medicina dos animais de companhia. Isso implicou na utilização disseminada dos antibióticos tanto na produção animal como na medicina veterinária. Hoje se estima que mais da metade de todos os antibióticos produzidos no mundo é utilizada nos animais (GUARDABASSI; KRUSE, 2010).

Os antimicrobianos usados em animais geralmente são os mesmos ou estão estreitamente relacionados aos utilizados em humanos. As tetraciclina constituem a classe dos antibióticos quantitativamente mais usados em animais, seguidos por macrolídeos, pleuromutilins, lincosamidas, penicilinas, sulfonamidas, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, cefalosporinas e fenicóis (GUARDABASSI; KRUSE, 2010). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) autoriza a utilização de 15 antibióticos como aditivos na alimentação animal e outros 50 na medicina

veterinária, em maioria indicados para uso comum entre as diversas espécies animais, como bovinos, suínos, aves, cães, caprinos (PALERMO-NETO et al., 2006).

Os antibióticos podem ser administrados individualmente aos animais para tratamento (terapia) ou prevenção (profilaxia) de doenças. Na produção animal, os antimicrobianos também podem ser administrados em animais clinicamente saudáveis do mesmo rebanho, animais com manifestações clínicas (metafilaxia) ou para melhorar o crescimento (promotores de crescimento). Na metafilaxia, o antimicrobiano é administrado durante surtos de doenças ou antes do aparecimento de sintomas, sendo o período de tratamento mais curto do que o terapêutico. Os antimicrobianos empregados como promotores de crescimentos são utilizados na suplementação alimentar continuamente em doses subterapêuticas (GUARDABASSI; KRUSE, 2010).

As atividades de bactérias patogênicas no intestino dos animais implicam em uma redução substancial da sua performance. Isso sustenta muitas pesquisas que demonstram que animais livres de patógenos têm um desempenho melhor em relação aos convencionais ao crescerem mais rápido e com eficiência. Porém, animais convencionais demonstraram desempenho similar àqueles sem patógenos, quando receberam promotores de crescimento por meio da alimentação. Desta forma, os antibióticos vêm sendo largamente utilizados na suinocultura e na avicultura, desde a sua descoberta, com o objetivo de melhorar a desempenho de animais e reduzindo o custo produtivo (BRUMANO; GATTÁS, 2009).

4.9 OCORRÊNCIA DE ANTIBIÓTICOS NO MEIO AMBIENTE

Em uma revisão de literatura, Mompelat, Le Bot e Thomas (2009) constataram que cerca de 160 produtos farmacêuticos e apenas 30 subprodutos resultantes da fabricação de fármacos foram incluídos em investigações ambientais sobre a ocorrência, destino e ecotoxicologia. Porém, segundo os mesmos autores, na Europa aproximadamente 4000 fármacos utilizados na medicina humana e veterinária são suscetíveis de atingir os compartimentos ambientais (MOMPELAT; LE BOT; THOMAS, 2009). Díaz-Cruz e Barceló (2007) afirmam que poucos países dispõem de estatísticas acerca da quantidade de antibióticos utilizados na criação de animais. Na Coreia do Sul, 20 medicamentos veterinários foram selecionados como altamente prioritários para fins de monitoramento no meio aquático, sendo em maioria

antibióticos, como, por exemplo, amoxicilina, florfenicol, oxitetraciclina, tilosina e virginiamicina (KIM et al., 2008).

Na maioria das pesquisas de degradação tem-se observado a eficiência de remoção de um determinado fármaco, porém pouca atenção tem sido dada a quantificação e identificação dos produtos da degradação desses produtos farmacêuticos. Devido a isso há uma escassez de dados acerca dos metabólitos humanos e microbianos excretados no meio ambiente ou formados durante a biodegradação de resíduos farmacêuticos na matriz ambiental. Entretanto, a *Europe Medicines Agency* (EMA) recomenda, por meio de uma abordagem sistêmica, diretrizes para relatórios de avaliação de risco de concentrações totais de medicamentos, os quais devem prever o risco total associado, determinando que quando o metabólito for formado em uma concentração superior a 10%, devem ser investigados os efeitos ecológicos no meio ambiente (CELIZ; TSO; AGA, 2009).

Medicamentos no organismo são metabolizados por uma variedade de enzimas com o intuito de proteger o corpo contra a exposição a inúmeros produtos químicos e isso envolve a biotransformação em compostos mais polares e solúveis a fim de facilitar a eliminação. Durante o tratamento de água por meio de processos físico-químicos e de esgotos por processos biológicos pode ocorrer a formação de produtos bioativos, muitas vezes mais tóxicos do que a substância inicial e com atividade comparável ao composto derivado (CELIZ; TSO; AGA, 2009; KÖHLER et al., 2006). Conforme relatou Kemper (2008), a quantidade excretada do fármaco depende de uma série de fatores como o tipo de substância, a dosagem, a espécie e idade do animal. Porém, até 95% do fármaco é excretado inalterado sem sofrer qualquer metabolização no trato digestivo animal (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006).

Nas criações de animais, os antimicrobianos podem contaminar o meio ambiente devido a excreções dos animais em pastejo ou pela aplicação de esterco animal no solo (BLACKWELL; KAY; BOXALL, 2007). Estando no solo, a lixiviação, o escoamento superficial e a erosão transportam esses resíduos que alcançam assim os cursos d'água (HIRSCH et al., 1999). Pequenas concentrações de antibióticos de uso humano e animal são encontradas em amostras de lodo e efluente de estações de tratamento de esgotos devido a disposição final desse efluente nos corpos d'água ou aproveitamento agrícola do lodo (GIGER et al., 2003; KIM et al., 2007; REGITANO; LEAL, 2010; WATKINSON; MURBY; CONSTANZO, 2007). As principais vias de

contaminação de ambientes terrestres e aquáticos com resíduos de fármacos de uso veterinário são apresentadas na Figura 28.

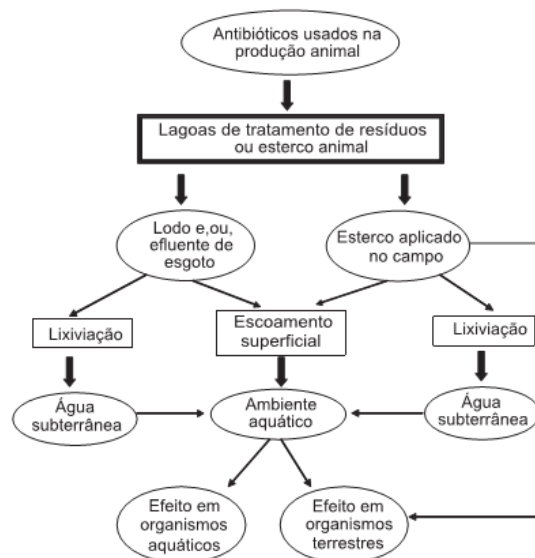


Figura 28: Principais vias de exposição ambiental aos fármacos de uso veterinário.
Fonte: Regitano e Leal (2010).

Koo et al. (2010) coletaram amostras de água na superfície de quatro rios na Coreia do Sul (rios Han, Nakdong, Geum e Youngsan) que receberam efluentes de estações de tratamento de esgotos. Para os rios que receberam efluente de estação de tratamento de esgoto doméstico, as concentrações dos antibióticos foram em média: $0,082 \text{ ngL}^{-1}$ de sulfatiazol, $0,308 \text{ ngL}^{-1}$ de clortetraciclina, $0,020 \text{ ngL}^{-1}$ de lincomicina, $0,018 \text{ ngL}^{-1}$ de sulfametoxazol e $0,012 \text{ ngL}^{-1}$ de sulfametazina. Enquanto para os rios que receberam efluente de estação de tratamento de esgoto de criação de animais, as concentrações foram em média: $0,168 \text{ ngL}^{-1}$ de clortetraciclina, $0,115 \text{ ngL}^{-1}$ de sulfatiazol, $0,064 \text{ ngL}^{-1}$ de lincomicina, $0,38 \text{ ngL}^{-1}$ de sulfametoxazol e $0,025 \text{ ngL}^{-1}$ de sulfametazina (KOO et al., 2010).

Batt, Kim e Aga (2007) detectaram a presença de quatro antibióticos (ciprofloxacina, sulfametoxazol, tetraciclina e trimetoprima) no efluente final de quatro estações de tratamento de água (Amherst, East Aurora, Holland e Lackawana) em Erie County, New York, nos Estados Unidos. As concentrações encontradas foram, respectivamente, em média, $0,32$, $0,44$, $0,18$ e $0,87 \text{ } \mu\text{gL}^{-1}$ (BATT; KIM; AGA, 2007). Zuccato et al. (2010) detectaram antibióticos no afluente e efluente de quatro estações de tratamento de esgotos, sendo três na Itália (Milan, Varese e Como) e uma na Suíça (Lugano), e em amostras de água dos rios Po e Arno (Itália). As médias das

concentrações de antibióticos encontradas são apresentadas no Quadro 15. Nödler et al. (2010) detectaram entre outros medicamentos farmacêuticos, os antibióticos claritromicina ($0,520 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), eritromicina ($0,173 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), roxitromicina ($0,078 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), sulfametoxazol ($0,509 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e trimetoprima ($0,681 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) em efluente de estação de tratamento de esgotos na Alemanha.

Resíduos de diversos fármacos de uso veterinário têm sido detectados em amostras de solo (HAMSCHER et al., 2005; BOXALL et al., 2005), água superficial (BOXALL et al., 2005), lençol freático (HAMSCHER et al., 2005; KRAPAC et al., 2005), amostras de esterco animal (BOXALL et al., 2005; DE LIGUORO et al., 2007; MARTÍNEZ-CARBALLO et al., 2007; ZHAO; DONG; WANG, 2009) e amostras de água no escoamento superficial (KAY; BLACKWELL; BOXALL, 2005). Nos Quadros 14, 15, 16 e 17 se encontram informações sobre a ocorrência e as concentrações médias de resíduos de antimicrobianos veterinários em diferentes matrizes ambientais. O destino e o comportamento ambiental dos fármacos sofrem influência de vários fatores como as propriedades físico-químicas da molécula e do solo, condições ambientais e de manejo prevalentes (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006; KEMPER, 2008).

As tetraciclina apresentam baixo potencial de mobilidade no solo devido ao seu elevado potencial de sorção aos sítios de troca orgânicos e, ou, minerais do solo (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006), porém estudos experimentais sobre a atividade antimicrobiana das tetraciclina mostraram que, apesar de estes compostos serem fortemente adsorvidos por partículas de argila, permanecem ativos, mostrando efeitos antimicrobianos que podem influenciar a seleção de bactérias resistentes aos antibióticos no ambiente terrestre (CHANDER et al., 2005) .

Quadro 14: Presença de antibióticos de uso veterinário na água.

| Antibiótico | Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | Ambiente | Localidade | Referência |
|-----------------|--|--------------------------------|-------------|--------------------------------|
| Lincomicina | 21,10 | Água superficial | Reino Unido | Boxall et al., (2005) |
| Oxitetraciclina | 71,70 | Água de escoamento superficial | Reino Unido | Kay, Blackwell e Boxall (2005) |
| | 44,90 | Água superficial | | Boxall et al., (2005) |
| Sulfadiazina | 41,30 | Água superficial | Reino Unido | Boxall et al., (2005) |
| Sulfametazina | 0,24 | Água subterrânea | Alemanha | Hamscher et al., (2005) |
| Sulfametoxazol | 0,07 | Água de abastecimento | Alemanha | Mückter (2006) |
| Tetraciclina | 0,24 | Água subterrânea | EUA | Krapac et al., (2005) |
| Trimetoprima | 0,02 | Água superficial | Reino Unido | Boxall et al., (2005) |

Fonte: Adaptado de Regitano e Leal (2010).

Os antibióticos macrolídeos, principalmente a claritromicina e a espiramicina em todos os pontos, e quinolonas (ciprofloxacina e l-floxacina/ofloxacina) nas estações de tratamento de Varese e Como, foram os antibióticos encontrados mais abundantemente nas águas residuais, conforme pode observado no Quadro 15. Em alguns casos, a espiramicina, a eritromicina e a claritromicina apresentaram-se mais abundantes no efluente do que no afluente, devido à capacidade destes compostos de se ligarem ao lodo e se desprenderem depois (ZUCCATO et al., 2010).

Quadro 15: Concentrações de antibióticos nos rios Po e Arno e em quatro estações de tratamento de efluentes.

| Antibiótico | Rio | | Estação de tratamento de efluentes | | | | | | | |
|----------------------------|-----------------------|------|---|-----|--------|-----|--------|-----|------|-----|
| | Po | Arno | Milan | | Varese | | Lugano | | Como | |
| | (ng·L ⁻¹) | | carga (mg·dia ⁻¹ ·1000 habitantes) | | | | | | | |
| | | | A | E | A | E | A | E | A | E |
| Amoxicilina | <2,1 | 5,7 | nd | nd | 6,1 | nd | 382 | 37 | 21 | nd |
| Ciprofloxacina | 8,8 | 19 | 32 | 24 | 203 | 60 | 4,9 | nd | 108 | nd |
| L-floxacina/ Ofloxacina | 10,9 | 5 | 7,7 | 5,3 | 184 | 77 | 0,3 | nd | 20 | 4,9 |
| Claritromicina | 1,7 | 25,4 | 322 | 104 | 121 | 52 | 318 | 437 | 939 | 500 |
| Eritromicina | 2,9 | 5,4 | 0,4 | 34 | 4,6 | 27 | 0,6 | 59 | nd | 6,5 |
| Lincomicina | 5,7 | 8,1 | 15 | 4,9 | 3,9 | 2,8 | 0,5 | 1,1 | 10 | 5,8 |
| Espiramicina | 1,1 | 7,9 | 24 | 121 | 234 | 146 | 1,7 | 393 | 97 | 75 |
| Sulfametoxazol | 2,1 | 5,3 | 40 | 16 | 97 | 11 | 33 | 15 | 33 | 30 |
| Vancomicina | 4,8 | 2,6 | 9,6 | 5,2 | 14 | 10 | nd | 24 | nd | 9,4 |
| Oleandomicina | <0,3 | <0,3 | nd | nd | 0,3 | 1,2 | nd | nd | nd | Nd |
| Oxitetraciclina | 1,1 | <1,1 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd |
| Tilmicosina | 2,5 | 2,3 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd |
| Tilosina | <0,7 | <0,7 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd |

A: Afluente E: Efluente na: não avaliado nd: não detectado

Fonte: Adaptado de Zuccato et al. (2010).

Quadro 16: Ocorrência de antibióticos de uso veterinário no solo.

| Antibiótico | Concentração (µg·Kg ⁻¹) | Matriz | Localidade | Referência |
|---------------|--|--------|-------------|-------------------------|
| Lincomicina | 8,5 | Solo | Reino Unido | Boxall et al., (2005) |
| Sulfametazina | 2,0 | Solo | Alemanha | Hamscher et al., (2005) |
| Trimetoprima | 0,5 | Solo | Reino Unido | Boxall et al., (2005) |

Fonte: Adaptado de Regitano e Leal (2010).

Quadro 17: Ocorrência de antibióticos de uso veterinário em amostras de esterco.

| Antibiótico | Concentração ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) | Ambiente | Localidade | Referência |
|------------------|---|-------------------|-------------|----------------------------------|
| Ciprofloxacina | $2,8 \times 10^{-1}$ | Esterco suíno | Reino Unido | Boxall et al., (2005) |
| Clortetraciclina | $4,6 \times 10^4$ | Esterco suíno | Áustria | Boxal et al., (2005) |
| Enrofloxacina | $2,8 \times 10^3$ | Esterco de frango | Áustria | Martínez-Carballo et al., (2007) |
| Oxitetraciclina | $3,3 \times 10^4$ | Esterco suíno | China | Zhao, Dong e Wang (2009) |
| | $2,9 \times 10^4$ | Esterco suíno | Áustria | Martínez-Carballo et al., (2007) |
| Sulfadiazina | $5,9 \times 10^4$ | Esterco suíno | China | Zhao, Dong e Wang (2009) |
| | $5,1 \times 10^4$ | Esterco de frango | Áustria | Martínez-Carballo et al., (2007) |
| | $9,1 \times 10^4$ | Esterco de peru | | |
| Sulfadimetoxina | $3,9 \times 10^2$ | Esterco bovino | Itália | De Liguoro et al., (2007) |
| Trimetoprima | $1,7 \times 10^4$ | Esterco de frango | Áustria | Martínez-Carballo et al., (2007) |

Fonte: Adaptado de Regitano e Leal (2010).

4.10 RESISTÊNCIA MICROBIANA

A resistência é definida como a insuscetibilidade de um microrganismo em relação a um tratamento em particular sob um determinado conjunto de condições. Para antibacterianos, a resistência é normalmente quantificada como a concentração mínima necessária para afirmar um efeito definido (por exemplo: inibição de crescimento) na população de células (KÜMMERER, 2004). A resistência pode ser adquirida por mutação, seleção ou transmitida verticalmente às células filhas, ocorrendo no cromossomo ou em fragmentos de DNA denominados plasmídeos. Para que a mutação e a seleção tenham êxito não podem resultar na morte do microrganismo (AUTO; CONSTANT, 2008; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

Normalmente, a resistência é adquirida por transferência horizontal de genes de resistência de uma célula doadora para outra, geralmente de outra espécie. Esse tipo de transferência é de propagação rápida entre a cepa resistente e cepas sensíveis. A resistência bacteriana pode ser derivada de: mutação, resistência transferível, transdução, conjugação, transformação e transposição. A mutação ocorre quando há alteração do código genético do microrganismo devido a um fenômeno raro. Quanto à resistência transferível, ela é ligada ao cromossomo e comumente extra cromossômica,

pois é mediada por fragmentos de DNA dispersos no citoplasma: os plasmídeos e os episossomos. Os primeiros são livres no citoplasma bacteriano, ao passo que os episossomos estão presos ao cromossomo. Os plasmídeos têm função acessória trazendo vantagens à bactéria: metabólicos (genes que auxiliam no metabolismo), virulência (genes que codificam a produção de toxinas, efeito evasivo), plasmídeos conjugantes ou R (resistência) (AUTO; CONSTANT, 2008; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

Mackie et al. (2006) detectaram resíduos de tetraciclina e genes de resistência a tetraciclina em amostras coletadas de 23 poços de monitoramento de águas subterrâneas impactadas por fazendas de criação intensiva de suínos no estado americano de Illinois. Koike et al. (2007) também detectaram a presença de genes de resistência a tetraciclina em amostras de águas subterrâneas coletadas abaixo de 2 fazendas de criação intensiva de porcos (Estados Unidos) ao longo de três anos, sendo continuamente detectados ao longo deste período 7 genes de resistência a tetraciclina. Wu et al. (2010), coletaram amostras de solo de fazendas adjacentes a nove criadouros de suínos localizados em três cidades (Pequim, Tianjin e Jiaying) na província de Zhejiang, China. Foram identificados 15 diferentes genes de resistência, além de resíduos e metabólitos da tetraciclina (WU et al., 2010).

Tamminen et al. 2010 coletaram amostras de sedimentos em 2 fazendas de criação de peixes de médio porte no Mar Báltico, no norte do arquipélago de Turku (Finlândia) e em 2 fazendas de aquicultura de pequeno a médio porte no arquipélago de Estocolmo (Suécia). A pesquisa evidenciou a presença de vários genes de resistência às tetraciclina em elevada frequência, especialmente nas fazendas finlandesas (TAMMINEN et al., 2010). Yamanaka (2011) avaliou 39 amostras de água de fontes alternativas utilizadas pela população de Curitiba e região metropolitana com o intuito de verificar a incidência e perfil de resistência aos antibióticos de isolados de *Escherichia coli* e *Enterococcus spp.* Foi avaliada a sensibilidade aos antibióticos (amicacina, ampicilina, cefepime, ciprofloxacina, clidamicina, cloranfenicol, eritromicina, estreptomicina, gentamicina, oxacilina, penicilina, rifampicina, tetraciclina, sulfazotrim) por meio do método de disco-difusão. Todos os 37 isolados de *Enterococcus spp* foram sensíveis à vancomicina e à ampicilina, entretanto apenas 24% destes isolados foram sensíveis a todos os antibióticos testados, sendo que 37,8% dos isolados *Enterococcus spp* apresentaram multirresistência. Todos os 23 isolados de *Escherichia coli* foram sensíveis à cefoxitina, gentamicina, ciprofloxacina, amicacina e

cefepime, porém apenas 39,1% destes isolados foram sensíveis a todos os antibióticos testados e 26,1% dos isolados de *Escherichia coli* apresentaram multirresistência (YAMANAKA, 2011).

Li et al. (2010) caracterizaram as populações bacterianas em águas superficiais que recebiam efluentes de uma fábrica de oxitetraciclina (OTC) localizada na província de Hebei (China). Foram encontrados altos níveis de OTC nas águas residuais e o antibiótico ainda foi detectado na água do rio a jusante, não sendo detectado na água do rio a montante. Um total de 341 cepas bacterianas foram isoladas e 23 genes de resistência às tetraciclina foram identificados. Quase todas as bactérias (97%) das amostras do efluente e da água do rio a jusante apresentaram fenótipos de múltipla resistência, enquanto em amostras do rio a montante isso foi menos freqüente (28%) (LI et al., 2010).

Resende (2009), em um estudo de detecção de bactérias gram-negativas em efluentes hospitalares e na estação de tratamento de esgotos (ETE) da cidade de Goiânia, identificou 73 bactérias e observou que: as cepas de *Escherichia coli* apresentaram 100% de resistência total ao aztreonam, 40% à ampicilina, 30% à piperacilina, 20% à ciprofloxacina e 10% à gentamicina. *Pseudomonas aeruginosa* apresentou 100% de resistência à ampicilina-sulbactam e 100% apresentaram resistência intermediária à gentamicina. Cerca de 70% das cepas de *Klebsiella pneumoniae* apresentaram resistência à ampicilina e 50% apresentaram resistência intermediária a este mesmo antimicrobiano (RESENDE, 2009).

4.11 CARBONIZAÇÃO HIDROTHERMAL

A carbonização hidrotermal (CHT) é um processo que converte biomassa (cascas, bagaços e folhagens), lodo de estação de tratamento de esgotos e resíduos industriais em um biocarvão, semelhante ao linhito (FRAUNHOFER, 2015; VOM EYSER et al., 2014). Ao contrário da pirólise, este processo se processa em meio aquoso, convertendo materiais úmidos como o lodo de esgoto sem uma etapa de pré-secagem, o que representa uma alternativa de baixo custo (FRAUNHOFER, 2015; VOM EYSER et al., 2014) e permite a aplicação como fertilizantes naturais (VOM EYSER et al., 2014). A CHT opera em temperaturas relativamente baixas (180-350°C) (BERGE et al., 2011), quando comparadas à pirólise (500°C) (FRAUNHOFER, 2015),

e que, sob pressões autógenas é avaliado como um método para converter carboidratos em um resíduo carbonáceo (BERGE et al., 2011). A CHT é um processo de conversão térmica que pode ser um meio viável para o tratamento ou estabilização de resíduos, minimizando a produção de gases de efeito estufa e produção de material residual com valor intrínseco (BERGE et al., 2011).

A utilização de catalisadores homogêneos como soluções de hidróxido de potássio e ácido sulfúrico no processo de carbonização hidrotermal oferecem vantagem por não sofrerem craqueamento térmico ou inativação tal como os catalisadores heterogêneos. Catalisadores heterogêneos sólidos podem permanecer no reator e são propensos a incrustações e inativação subsequente sólidos, podendo degradar ou oxidar sob condições hidrotermais (PETERSON et al., 2010).

Titirici, Thomas e Antonietti (2007), Sevilla e Fuertes (2009) e Funke e Ziegler (2010) relataram que a reação resulta na formação de uma série de hidrólises, condensações, descarboxilações e reações de desidratação. A água é um ingrediente necessário e a chave da CHT (FUNK; ZIEGLER, 2010; TITIRICI; THOMAS; ANTONIETTI, 2007). À medida que as temperaturas aumentam, as propriedades físicas e químicas da água alteram significativamente, imitando as propriedades de solventes orgânicos. Portanto, as concentrações de saturação dos componentes inorgânicos e orgânicos dissolvidos aumentam grandemente e reações iônicas são promovidas, aumentando a hidrólise conseqüentemente (AKIYA; SAVAGE, 2002; SISKIN; KATRITZKY, 2001; WATANABE et al., 2004).

Vom Eyser et al. (2014) trataram lodo proveniente de uma estação de esgotos de Rheinhausen, no distrito de Emmendingen (Alemanha), com CHT. Foi desenvolvido um método de HPLC-MS/MS para identificar a presença no lodo de 12 fármacos, incluindo 4 antibióticos (eritromicina, roxitromicina, claritromicina e sulfametoxazol). Foi utilizado um reator de alta pressão. As amostras sob agitação de 500 rpm foram tratadas utilizando temperatura de 210°C por um período de 4 horas. Foram identificados no lodo de esgoto 8 fármacos dos 12 investigados (diclofenaco, ibuprofeno, fenazona, carbamazepina, metoprolol, propranolol, ácido fenofibrico, roxitromicina). Benzofibrato, claritromicina e eritromicina ficaram abaixo do limite de quantificação (LOQ) no lodo de esgoto. Nas amostras de lodo de esgoto pós-CHT, foram detectados apenas 3 dos 12 compostos, e estes foram medidos por grama de matéria seca (gDM): fenazona (130±10 ng), metoprolol (220±10 ng) e propranolol (26±9 ng). Os limites de quantificação (LOQ) elevados destes compostos no *biochar*

impedem uma comparação quantitativa entre os valores detectados destes fármacos no lodo de esgoto e no biochar: fenazona ($LOQ_{\text{biochar}} = 57 \text{ g}_{\text{DM}}$, $LOQ_{\text{lodo de esgoto}} = 4,1 \text{ g}_{\text{DM}}$), propranolol ($LOQ_{\text{biochar}} = 14 \text{ g}_{\text{DM}}$, $LOQ_{\text{lodo de esgoto}} = 2,8 \text{ g}_{\text{DM}}$), metoprolol ($LOQ_{\text{biochar}} = 110 \text{ g}_{\text{DM}}$, $LOQ_{\text{lodo de esgoto}} = 30 \text{ g}_{\text{DM}}$). Porém, foram determinadas as concentrações do metoprolol e do propranolol após a CHT, implicando em reduções, respectivamente, de 49% e 77% (VOMEYSER et al., 2014).

Com o intuito de estudar as implicações ambientais associadas à carbonização hidrotermal de amostras representativas e sintéticas de resíduos sólidos e líquidos municipais, Berge et al. (2011) trataram tais amostras em reatores tubulares de aço inoxidável com volume de 160 mL, dimensionados para suportar pressões e temperaturas pré-estabelecidas, sob temperatura de 250°C por 20 horas em uma mufla, obteve-se um carvão com 20-68% de carbono, onde 49-75% do carbono é retido no interior do carvão, enquanto 20-37% e 2-11% é transferida para as fases líquida e gasosa, respectivamente. O gás produzido predominante é o dióxido de carbono, com traços de outros gases. O pH da fase aquosa é ácido, em virtude da presença de ácidos orgânicos resultantes da decomposição de monossacarídeos. O ácido acético foi detectado em todas as amostras devido a ser um produto da decomposição dos produtos provenientes das reações de hidrólise. Vários compostos aromáticos, fenólicos e furânicos também foram detectados, além de aldeídos e alcenos. Isso indica que a carbonização segue uma sequência de reações de hidrólise, desidratação, descarboxilação, condensação e decomposição dos diferentes compostos intermediários (BERGE et al., 2011).

Zhang, Lin e Zhao (2014) investigaram as propriedades dos biocarvões produzidos na carbonização hidrotermal a partir de lodo de esgotos municipais sob diferentes temperaturas (190 e 260°C) e tempo reacional (1, 6, 12, 18 e 24 horas). Houve redução significativa dos conteúdos de N (nitrogênio) (54,6%), O (oxigênio) (37,9%) e H (hidrogênio) (10,0%) e pequenas alterações de conteúdo de carbono, devido à redistribuição destes elementos nas fases sólida, líquida e gasosa. As concentrações de COT (Carbono Orgânico Total) e nitrogênio total na fase aquosa aumentam devido à decomposição de compostos orgânicos, porém diminuem na fase sólida do *hydrochar*. Todos os biocarvões obtidos apresentaram relações atômicas H/C e O/C aproximadamente 15,3% e 62,7% menores do que a matéria-prima, respectivamente. A composição elementar dos *hydrochars* reflete tanto a carbonização como a decomposição, além do fracionamento dos elementos nas fases gasosa e líquida.

As proporções atômicas O/C e H/C no *hydrochar* refletem a reação de carbonização: relações mais baixas indicam uma carbonização mais profunda dos materiais, enquanto uma proporção mais alta implica em uma carbonização mais baixa no *hydrochar* (ZHANG; LIN; ZHAO, 2014).

Zhang et al. (2014) investigaram a degradação de 2 resíduos da fabricação do antibiótico cefalosporina C (CPC) (denominados Ara e Arb) fornecidos por duas fábricas de medicamentos da província de Hebei, China. As amostras são oriundas do processo de fermentação do milho, proteína da soja e outros aditivos necessários à produção de cefalosporina C (CPC). O reator utilizado tinha volume interno de 1000 mL e diâmetro interno de 70 mm. Foi utilizado também um recipiente de aço inoxidável com 700 ml de volume interno e 68 mm de diâmetro externo. Um agitador foi acoplado no centro do reator, sendo acionado por um motor regulável. A condição de temperatura utilizada foi de 100-220°C por 30-60 min. A amostra foi agitada a 120 rpm durante todo o experimento. Após 30 minutos de tratamento e sob temperatura de 180°C, já havia ocorrido a decomposição de 99,8% do antibiótico CPC, partindo de um volume 500 mL de uma solução de 2% (p/v) de cefalosporina C de sódio (ZHANG et al., 2014).

Fundada no Brasil em 1986, a organização não-governamental Pro-Natura ganhou em 2002 o primeiro prêmio da Fundação Altran para por sua inovação tecnológica, com a sua unidade pioneira de produção de *biochar*, a Pyro-6F (Figura 29). Essa unidade é capaz de fazer biocarvão a partir de resíduos agrícolas ou florestais não utilizados. A Pyro-6F pode processar até 500 kg de biomassa por hora, para uma produção de 200 kg de biochar. As unidades da Pyro-6F são atualmente fabricadas e vendidas pela empresa Green Charcoal Internacional (PRO-NATURA, 2015).



Figura 29: Unidade de produção de biochar: Pyro-6F.
Fonte: Pro-Natura (2015).

Desde 2010, a empresa Ingelia iniciou as operações de sua primeira planta de tratamento de biomassa por carbonização hidrotérmica em processo contínuo. Ela está localizada no município de Náquera, Valência (Espanha) (Figura 30). O reator de fluxo invertido em meio líquido dispõe de um controle de temperatura e pressão e opera sob as seguintes condições de processo: 17-24 bar de pressão e temperatura de 180-200°C. Essa planta tem a capacidade de processar 6000 toneladas de biomassa por ano e é auto-suficiente no fornecimento de água, uma vez que a água extraída da biomassa supre as necessidades do processo. O biocarvão produzido tem alto poder calorífico: $>5736 \text{ kcal}\cdot\text{kg}^{-1}$ (EXPOBIOENERGIA, 2011).



Figura 30: Reator de Carbonização Hidrotérmica em Valência, Espanha.
Fonte: Expobioenergia (2011).

Morais (2012) obteve resultados bem satisfatórios ao decompor hidrotérmicamente os hormônios etinilestradiol, gestodeno e acetato de ciproterona. Em relação ao tratamento de cada um dos compostos de forma isolada, a eficiência de decomposição ficou acima de 99,0%. As melhores condições encontradas foram aquelas nas quais foi utilizado o ácido fosfórico como catalisador e o tempo reacional de 90 minutos (MORAIS, 2012).

4.12 ANÁLISE DE ANTIBIÓTICOS POR HPLC

A cromatografia gasosa (CG) acoplada a espectrometria de massa (GC/MS ou GC-MS/MS) é uma das técnicas de análise mais utilizadas e preferidas para a detecção de compostos relativamente apolares e termicamente estáveis. Embora GC/MS forneça limites de detecção mais baixos do que a LC/MS, a sua aplicação na análise de fármacos tem sido limitada por causa da necessidade de derivatização de analitos polares com o intuito de aumentar a volatilidade antes da análise por CG/MS (CELIZ; TSO; AGA, 2009). A necessidade de efetuar a derivatização em mais análises por GC/MS dos produtos farmacêuticos e dos seus metabolitos torna a pesquisa laboriosa porque tempo adicional precisa ser dedicado ao desenvolvimento do método. Em alguns casos, as etapas da reação de derivatização podem variar de 1 a 12 horas (KOSJEK; HEATH; KOMPARE, 2007).

Yuan et al. (2011) em um estudo de fotodegradação dos antibióticos oxitetraciclina (OTC), doxiciclina (DTC) e ciprofloxacino (CIP) usando fotólise direta e processo UV/H₂O₂, utilizaram um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) equipado com detector UV/Vis com arranjo de diodos (DAD) e coluna C18 (4.6×150mm, 5 µm), com o intuito de identificar a presença destes três antimicrobianos em amostras de água e efluente. A fase móvel utilizada nas análises de OTC e DTC foi composta por 11% de metanol, 22% de solução 0,01 M de ácido oxálico e 67% de acetonitrila e a vazão foi mantida a 1 mL·min⁻¹. O detector UV/Vis foi fixado em 355 nm. Para CIP, a fase móvel foi de 20% de acetonitrila e 80% de solução (pH = 2,5) 0,01 M de KH₂PO₄ e a taxa de fluxo mantida a 1 mL·min⁻¹. O detector UV/Vis foi fixado em 278 nm. Para detecção dos produtos de degradação foi utilizada cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS/MS) com ionização por *Electrospray* e analisador do tipo quadrupolo em tempo-de-voo em seqüência (ESI-QToF-MS/MS). Os produtos resultantes de reações de hidroxilação foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massas (GC-MS) (YUAN et al., 2011).

Skotnicka-Pitak et al. (2009) afirmam que existem vários métodos para identificar metabólitos de fármacos em amostras ambientais, porém as técnicas mais utilizadas têm sido a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) e a cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas (CG-MS). A identificação de metabólitos farmacêuticos em matrizes ambientais complexas é um

desafio, especialmente por causa de suas concentrações muito baixas na presença de matéria orgânica natural, proteínas e outras macromoléculas complexas que podem interferir no sistema de detecção. Neste contexto, a cromatografia líquida de alto desempenho combinada com ionização por *electrospray* e detector de espectrometria de massas (LC-ESI-MS) emergiu como um dos principais métodos de análise para identificação de metabólitos polares. No entanto, tal tecnologia (LC-MS) baseada em ionização por *electrospray* é propensa à supressão do sinal, especialmente na presença de grandes quantidades de matéria orgânica natural, tipicamente encontrada em amostras ambientais (SKOTNICKA-PITAK et al., 2009).

Conforme afirmaram Celiz, Tso e Aga (2009), os dados obtidos a partir do padrão de MS gerado por fragmentação em fase múltipla de uma molécula em IT-MS, combinada com a informação obtida a partir de medições de massa de alta precisão por ToF-MS, pode facilitar a identificação de metabólitos em concentrações muito baixas. A capacidade de realizar vários estágios de MS em um IT-MS pode fornecer grandes quantidades de informação estrutural, auxiliando na identificação de metabólitos desconhecidos (CELIZ; TSO; AGA, 2009). Cromatografia líquida com espectrometria de massa com ionização por *Eletrospray* acoplada ao detector *ion-trap* (LC-ESI-IT-MS) combinado com LC com espectrometria de massa com ionização por *Eletrospray* e detector do tipo quadrupolo tempo-de-voe (LC-ESI-QqToF-MS) em sequência foram utilizadas com sucesso por Eichhorn e Aga (2004) e Eichhorn et al. (2005), objetivando identificar um produto originado por foto-oxigenação da tetraciclina no esterco suíno e os produtos de biodegradação do antimicrobiano trimetoprima em lodo ativado de uma estação de tratamento de efluente, respectivamente.

Eichhorn et al. (2005) identificaram dois produtos de biotransformação do antimicrobiano trimetoprima em um ensaio em pequena escala, utilizando um reator em batelada. Foram utilizadas duas soluções de trimetoprima em concentrações diferentes (20 mg L^{-1} e $20 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), objetivando a caracterização por meio de espectrometria de massas dos metabólitos, e com o intuito de obter um perfil de degradação num ambiente com concentração relevante de trimetoprima. Essas soluções foram colocadas, separadamente, em contato com uma amostra de lodo ativado proveniente do tanque de nitrificação de uma estação de tratamento de esgoto em Amherst, New York (Estados Unidos). O ar foi continuamente borbulhado com o intuito de manter o material particulado do lodo ativado em suspensão. Foi utilizada cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao analisador de espectrometria de massas com ionização por

Eletrospray e detector do tipo *ion-trap* em sequência (HPLC-ESI-IT-MS) para identificar estes compostos. Além disso, um cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massa com ionização por *Eletrospray* e detector do tipo quadrupolo/tempo-de-voô (HPLC-ESI-QqToF-MS) foi utilizado para fornecer medições de massa precisas. Dos dois metabolitos produzidos no experimento, o primeiro a eluir foi a α -hidroxi-trimetoprima (tempo de retenção = 8,6 min) com uma massa molar 16 Da ($[M + H]^+$, m/z 307) maior do que a trimetoprima (tempo de retenção = 10,1 min), sugerindo que o composto original sofreu uma transformação oxidativa. O metabólito de segunda eluição da trimetoprima (tempo de retenção = 8,9 min) apresentou uma massa molar 34 Da maior em relação ao composto de origem, indicando a oxidação ou a adição de um grupo funcional (EICHHORN et al., 2005).

4.13 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE À ANTIMICROBIANOS

Existem vários métodos para testar a suscetibilidade de microrganismos aos antibióticos. O princípio geral se baseia em determinar a menor concentração de um antimicrobiano capaz inibir o crescimento visível de um microrganismo em um teste após 18 a 24 horas de incubação, sendo este valor denominado CIM (concentração inibitória mínima) (MACHADO; BARROS, 2008; MADIGAN et al., 2010). Os métodos podem ser divididos em qualitativos ou quantitativos, sendo que estes últimos permitem a determinação tanto da CIM quanto da CBM (concentração bactericida mínima). No meio quantitativo uma quantidade determinada de microrganismos é inoculada em um meio de cultura contendo concentrações conhecidas de antibióticos. A CBM é determinada cultivando, em meio sem presença de antimicrobianos, os germes anteriormente expostos a esses medicamentos, verificando se ocorre o crescimento após 24 horas (MACHADO; BARROS, 2008).

Um método qualitativo de testar a suscetibilidade é método de difusão em ágar ou Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966). Este teste é o mais utilizado em laboratórios clínicos em virtude de apresentar boa reprodutividade, ser de fácil execução e baixo custo. (QUINN et al., 2005; SOARES et al., 2012). Neste método, uma suspensão do microrganismo-teste é inoculada em placa de ágar, onde discos de papel-filtro embebidos com as soluções de antibióticos a serem testados são depositados. Após 24 horas de incubação, as zonas de inibição ao redor do disco são medidas,

correlacionando os dados com a suscetibilidade ou resistência (RAMOS et al., 2007; SOARES et al., 2012).

A Figura 31 ilustra um antibiograma de *Escherichia coli* usando crescimento bacteriano em base ágar Müller-Hinton. Depois da aplicação dos discos com antibióticos, a placa inoculada é incubada a 37°C por 18 horas. Os diâmetros das zonas de inibição são medidos (mm) e correlacionados com medidas aceitas internacionalmente para determinar a suscetibilidade ou resistência do isolado (QUINN et al., 2005).

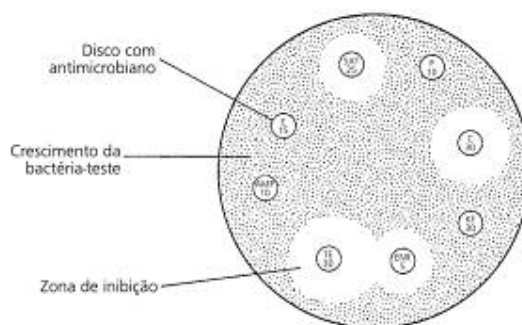


Figura 31: Antibiograma de *Escherichia coli* em base ágar.
Fonte: Adaptado de Quinn et al. (2005).

4.14 ENSAIO DE TOXICIDADE COM *ALLIUM CEPA*

O uso de *Allium cepa* como organismo-teste, originalmente descrito por Levan (1938), como um teste biológico para avaliar os efeitos citogenéticos da colchicina, desde então tem sido utilizado para avaliar a presença no meio ambiente de substâncias químicas (FISKEJÖ, 1988) com potencial citotóxico, genotóxico e multagênico que representam riscos diretos ou indiretos a todos os organismos vivos (SMAKA-KINCL et al., 1996). O bioensaio com *Allium cepa* tem sido empregado para avaliação de amostras águas superficiais (AMARAL et al., 2007; FERREIRA et al., 2012; SILVA; NASCIMENTO, 2013) e efluentes (ALVIM et al., 2011; BAKARE et al., 2009; RADIĆ et al., 2010) em ensaios de toxicidade devido à facilidade do manuseio e armazenagem, além de permitir a avaliação de parâmetros macroscópicos como a inibição do crescimento das raízes e microscópicos como: metáfase, anáfase e inibição da divisão celular (FISKEJÖ, 1988; LONGHIN, 2008; SMAKA-KINCL et al., 1996).

Este ensaio também apresenta um bom desempenho quando comparado a outros sistemas celulares, sejam eucariotos ou procariotos (FISKESJÖ, 1988),

As raízes das plantas são muito úteis em testes biológicos, pois são elas as primeiras a ficarem expostas às variações químicas da água e do solo (FISKESJÖ, 1988). Deste modo o ensaio de inibição do crescimento das raízes utilizando *Allium cepa* é um método simples, sensível e adequado para monitoramento ambiental, pois permite a avaliação da toxicidade de compostos em diferentes concentrações (FISKESJÖ, 1988; SMAKA-KINCL et al., 1996). Amaral et al. (2007) avaliaram o potencial citotóxico e genotóxico em amostras de água da bacia do Rio Tapanhon, em Pindamonhangaba, estado de São Paulo, usando o bioensaio com *Allium cepa*. O índice mitótico para todas as amostras mostrou-se alterado em comparação ao controle, significando que houve a estimulação da mitose em todas. Não foi encontrada diferença estatística entre as amostras com relação a aberrações cromossômicas quando comparadas entre si, entretanto foram observadas células com aberrações em todos os tratamentos quando comparadas ao controle (AMARAL et al., 2007).

O ensaio de inibição do crescimento de raízes dos bulbos de *Allium cepa* foi utilizado por Radić et al. (2010) com o intuito de avaliar os possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos em amostras de cursos de água e efluentes industriais nas proximidades do rio Sava (Croácia) ao longo de um período de acompanhamento de três meses. Foram observados: divisão celular, indução de mitose e aberrações cromossômicas. As amostras de efluentes industriais causaram resultados em inibição do crescimento da raiz em mais de 50%, diminuição no índice mitótico em mais de 40% e um aumento considerável de aberrações cromossômicas em comparação ao controle (RADIĆ et al., 2010).

Ferreira et al. (2012) avaliaram o potencial citotóxico das águas dos Ribeirões Varginha e Tabatinga, localizados, respectivamente, nos municípios de Califórnia e Mandaguari, no Estado do Paraná. Estes ribeirões recebem efluentes industriais e urbanos nos seus respectivos cursos. Foram utilizadas como sistema-teste as células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*. Não houve alterações, estatisticamente significativas, pelo teste do qui-quadrado, nos índices de divisão celular nas células de *Allium cepa*, tratadas com as amostras dos ribeirões, em relação ao controle (FERREIRA et al., 2012). O potencial citotóxico e genotóxico dos efluentes bruto e tratado de duas indústrias têxteis localizadas no sul de Minas Gerais, foi investigado por Alvim et al. (2011). Foi usado o sistema-teste *Allium cepa*. Os efluentes não

demonstraram ação citotóxica, entretanto a divisão celular ocorreu de forma desordenada, favorecendo o aumento do número de anormalidades cromossômicas e caracterizando um efeito genotóxico (ALVIM et al., 2011).

Silva e Nascimento (2013) usaram a *Allium cepa* como bioindicador em um ensaio de citogenotoxicidade de amostras das águas do Rio Tietê coletadas nos municípios de Salesópolis-SP (nascente do rio), em Mogi das Cruzes-SP e na cidade de São Paulo (Ponte da Vila Maria, Ponte das Bandeiras e Ponte dos Remédios). Os bulbos de cebola foram expostos durante 48 horas às amostras de água e após este período, foram observadas ocorrência de alterações nucleares (micronúcleos e deformações nucleares). Em quatro das cinco amostras houve formações significativas de alterações nucleares. Apenas na amostra proveniente de Salesópolis não foram detectadas alterações, constatando a citogenotoxicidade destas amostras sobre células meristemáticas radiculares de *Allium cepa* (SILVA; NASCIMENTO, 2013).

Bakare et al. (2009) investigaram a genotoxicidade do efluente bruto de uma fábrica de medicamentos situada no estado de Lagos, na Nigéria, realizando quatro bioensaios: ensaios de micronúcleos, morfologia espermática e aberrações cromossômicas, todos em ratos, e também o teste de toxicidade utilizando bulbos de *Allium cepa*. Foram utilizadas nos testes com *Allium cepa* e com animais, respectivamente, as seguintes concentrações: 0,5, 1, 2,5, 5 e 10%; e 1, 5, 10, 25 e 50% do efluente. Houve uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a concentração inibitória do crescimento da raiz da cebola e o índice mitótico, e entre a indução de aberrações cromossômicas na cebola o mesmo teste com o rato. A avaliação da morfologia espermática mostrou que a fração do esperma que apresentava anormalidade foi significativamente ($p < 0,05$) maior do que valor encontrado no controle negativo. A análise de micronúcleos demonstrou uma indução de eritrócitos policromáticos micronucleados dependendo da dose entre os grupos de estudo. Desta forma, foi constatada a presença de substâncias tóxicas e genotóxicas nas amostras de efluente utilizadas nos experimentos. Conclui-se que o efluente farmacêutico testado é potencialmente genotóxico e mutagênico, podendo induzir efeitos adversos na saúde dos organismos expostos a ele (BAKARE et al., 2009).

5. MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental da pesquisa foi desenvolvida no laboratório de Enzimologia e Biocatálise Ambiental da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás – UFG, no laboratório de Química Geral do Instituto Federal de Goiás – IFG, no laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás – UFG, no laboratório da Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, e foi dividida em 04 etapas: (1) Tratamento do efluente sintético contendo antibióticos com o reator de carbonização hidrotermal, (2) realização de antibiogramas, (3) realização de ensaio de toxicidade, (4) avaliação do tratamento por meio de leitura em HPLC.

5.1 ANTIBIÓTICOS

A pesquisa foi realizada utilizando antibióticos adquiridos comercialmente que possuem os seguintes nomes comerciais: Ampicilina Veterinária Oral (25 mg·mL⁻¹ de ampicilina anidra), fabricado por Vetnil Ind. e Com. de Produtos Veterinários Ltda.; Chemitril[®] Injetável 2,5% 20 mL (25 mg·mL⁻¹ de enrofloxacin), fabricado por Chemitec Agro-veterinária Ltda.; Avitrin[®] Sulfa Uso Oral 10 mL (250 mg·mL⁻¹ de sulfaquinoxalina sódica), fabricado por Coveli Indústria e Comércio Ltda.; Terramicina[®]/LA Solução Injetável 100 mL (200 mg·mL⁻¹ de oxitetraciclina dihidratada), fabricado por Laboratórios Pfizer Ltda.; Tyladen Solução Antimicrobiana Injetável (200 mg·mL⁻¹ de tilosina sob forma de base), fabricado por Sespo Indústria e Comércio Ltda.

Os padrões primários utilizados na pesquisa foram: **ampicilina anidra** 100 mg (grau HPLC com pureza $\geq 95,0$ %, fabricante Fluka); **enrofloxacin** 100 mg (grau HPLC com pureza $\geq 99,2$ %, fabricante Fluka); **oxitetraciclina dihidratada** 10 g (grau HPLC com pureza ≥ 99 %, fabricante Sigma-Aldrich[®]); **sulfaquinoxalina** 250 mg (grau HPLC com pureza $\geq 98,9$ %, fabricante Fluka); **tilosina** 150 mg (grau HPLC com pureza ≥ 99 %, fabricante Sigma-Aldrich[®]).

5.1.1 Soluções de Antibióticos

Foram utilizadas nesta pesquisa soluções com concentração de $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ dos antibióticos ampicilina, enrofloxacina, oxitetraciclina, sulfaquinoxalina e tilosina. Esta concentração foi escolhida com o intuito de simular o efluente gerado após a produção deste medicamento na indústria farmacêutica, em concentração similar aos utilizados nos trabalhos de Aureliano, Silva e Cunha (2012) e na pesquisa de Buth (2009).

Foram preparadas soluções dos antibióticos de $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), pipetando com o auxílio de uma micropipeta, $62,5 \mu\text{L}$ da solução estoque ($200 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) de oxitetraciclina e transferindo para balão volumétrico de 250 mL. Em seguida, o balão volumétrico foi completado com água Mili-Q ultrapurificada (praticamente livre de matéria orgânica, sais e microrganismos) obtida pelo sistema de tratamento de água Q-Gard[®] Purification Pack da Millipore.

Na Equação 2 tem-se o cálculo do volume pipetado da solução de antibiótico oxitetraciclina (OTC), sabendo que a concentração final da amostra de 100 mL coletada para tratamento em reator de carbonização hidrotermal foi de $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$:

- Concentração Inicial da Solução de OTC: $200 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (200000 ppm)
- Concentração Final da Solução de OTC: $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (50 ppm)
- Volume Final da Solução: 250 mL

$$\begin{aligned} V_1 \cdot C_1 &= V_2 \cdot C_2 \\ V_1 \cdot 200000 \text{ ppm} &= 250 \text{ mL} \cdot 50 \text{ ppm} \\ V_1 &= 0,0625 = 62,5 \mu\text{L} \end{aligned} \quad (2)$$

O mesmo cálculo foi realizado para o preparo das soluções dos outros antibióticos a partir das soluções estoque de ampicilina ($25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), enrofloxacina ($25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), sulfaquinoxalina ($250 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e tilosina ($200 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Para realização dos experimentos com o reator de CHT foi preciso ajustar o valor de pH das soluções da faixa de 6 a 8 para a faixa de 3 – 5 adicionando uma solução ácida. O ajuste do valor de pH nesta faixa (ácido) funciona como catalisador da reação durante o processo de carbonização hidrotermal. Devido a isso, foram preparadas soluções ácidas com dois ácidos diferentes conforme a pesquisa desenvolvida por Morais (2012).

Uma solução de ácido fosfórico 10% (v/v) foi preparada pipetando 11,8 mL de ácido fosfórico 85% (v/v) e diluindo com água ultrapurificada em um balão volumétrico

de 100,0 mL. Uma solução de ácido cítrico 5% (p/v) foi preparada dissolvendo 12,5 g de ácido cítrico P.A., pesado em balança analítica, em água ultrapurificada e transferindo para balão volumétrico de 250,0 mL.

A correção do pH foi feita da seguinte forma: Primeiramente, a solução do antibiótico foi preparada. Então, uma alíquota de 100 mL foi transferida para o recipiente do reator de CHT. A seguir com o auxílio de uma pipeta Pasteur e de um pHmetro, foram adicionadas lentamente gotas da solução ácida na solução do antibiótico ajustando até valor de pH de interesse (Figura 32). Foi utilizado um pHmetro digital portátil modelo PH-500 do fabricante Ion.



Figura 32: Correção do pH da solução de antibiótico.

5.2 TRATAMENTO POR CARBONIZAÇÃO HIDROTHERMAL

O reator de carbonização hidrotermal (CHT) utilizado nos ensaios foi desenvolvido pelo departamento de química tecnológica do Instituto Federal de Goiás - IFG, que cedeu o direito de utilização do equipamento com o requisito de que seja mantido sigilo de informações quanto às especificações técnicas e condições ideais de uso. Os experimentos foram realizados no laboratório de química do Instituto Federal de Goiás – IFG, campus Goiânia.

5.2.1 O Reator de Carbonização Hidrotermal

O reator de CHT é composto por um reator, uma resistência e um controlador digital de temperatura modelo N480D do fabricante Novus (Figura 33). O reator é composto por um recipiente e uma tampa (Figura 34). O recipiente é confeccionado em PTFE (Politetrafluoretileno, Teflon[®]). O volume interno do recipiente é de 256,6 mL e o volume útil é de 150,0 mL.



Figura 33: Sistema de CHT em funcionamento.



Figura 34: Reator de Carbonização Hidrotermal.

5.2.1.1 Ensaios com o Reator de Carbonização Hidrotermal

Os ensaios com o reator de carbonização hidrotermal foram realizados conforme planejamento fatorial (Quadro 18) com o intuito de avaliar a influência dos parâmetros pH e temperatura na remoção dos antibióticos no efluente sintético. Os experimentos com reator foram realizados da seguinte forma: após a lavagem e esterilização do recipiente e tampa, foram colocados dentro do reator 150,0 mL da solução de antibiótico com pH corrigido para a faixa 3 – 5, após a adição da solução ácida, e em seguida, foi colocada a tampa do recipiente e esta foi então rosqueada.

O recipiente foi fechado e foi utilizada manta de lã de rocha ao redor do reator com o intuito de evitar a perda de calor. Uma resistência foi colocada ao redor do reator. A temperatura interna foi medida com um termômetro digital (tipo termopar) inserido na lateral do reator. O aquecimento foi ligado e então a temperatura superficial do reator foi monitorada no mostrador digital do controlador de temperatura. O controlador de temperatura foi configurado para que a cada 1 minuto ocorresse a elevação de 5°C na temperatura superficial do reator. O tempo dos experimentos variou de 90 a 120 minutos. Então, para que reator atingisse uma temperatura de 180°C partindo da temperatura ambiente, foram necessários pelo menos 30 minutos. A temperatura máxima da resistência é de 250°C. A pressão interna do reator não foi monitorada.

Em estudos anteriores com o reator de carbonização hidrotermal na degradação de hormônios sexuais sintéticos, foram determinadas as melhores condições para início do tratamento: temperatura na superfície do reator: 180-190°C; temperatura na base do reator: 200-240°C; pressão interna do reator: 12-20 bar; catalisador: ácido fosfórico (MORAIS, 2012).

Depois de finalizar o experimento, aguardou-se o reator esfriar até a temperatura ambiente para que a pressão interna do reator se igualasse a pressão atmosférica, possibilitando assim a saída de gases e vapor gerado durante o processo. O tempo necessário para que o reator atingisse a temperatura ambiente a partir de uma temperatura de 180°C foi de 8 a 10 horas.

Logo em seguida, a tampa do reator foi removida. Então, o efluente foi coletado em béquer de vidro de 500,0 mL e foi transferido para um frasco de vidro do tipo Schott de 250,0 mL devidamente limpo com água ultrapurificada e sabão alcalino e desinfetado com álcool 70% (v/v). O frasco foi fechado, identificado e armazenado em geladeira a 4°C para posterior análise em HPLC e realização de teste de sensibilidade

antimicrobiana (TSA). Posteriormente à realização de cada ensaio, o reator (recipiente e tampa) e outros utensílios utilizados foram lavados, desinfetados e secos para a realização do próximo experimento. O reator (recipiente e tampa) foi devidamente lavado, sanitizado e seco para que outra amostra pudesse ser tratada.

Quadro 18: Planejamento fatorial 3^{3-1} dos experimentos com reator de CHT.

| Variável | Nível (-) | Nível (●) | Nível (+) |
|------------------|---------------|-------------|-----------------|
| pH | 3 | 4 | 5 |
| Temperatura (°C) | 180 | 190 | 200 |
| Catalisador | Ácido Cítrico | . | Ácido Fosfórico |
| Experimentos | Variáveis | | |
| | pH | Temperatura | Catalisador |
| 1 | - | - | - |
| 2 | - | ● | - |
| 3 | - | + | - |
| 4 | - | - | + |
| 5 | - | ● | + |
| 6 | - | + | + |
| 7 | ● | - | - |
| 8 | ● | ● | - |
| 9 | ● | + | - |
| 10 | ● | - | + |
| 11 | ● | ● | + |
| 12 | ● | + | + |
| 13 | + | - | - |
| 14 | + | ● | - |
| 15 | + | + | - |
| 16 | + | - | + |
| 17 | + | ● | + |
| 18 | + | + | + |

Com o intuito de verificar o potencial de decomposição hidrotermal do antibiótico oxitetraciclina, foi realizado o Experimento 01 com a oxitetraciclina nas seguintes condições: volume da solução = 150,0 mL; pH da solução = 3,23 (corrigido com solução de ácido cítrico a 5%); concentração de oxitetraciclina na solução = 200 mgL⁻¹; tempo de reação de CHT = 150 minutos; temperatura máxima superficial do reator de CHT = 220°C (Quadro 19).

Quadro 19: Condições do experimento realizado para avaliação do potencial do reator de carbonização hidrotermal na decomposição da oxitetraciclina

| EXPERIMENTO 01 → OXITETRACICLINA | | | |
|--|------|-----------------------|-------------------------|
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 200 mgL ⁻¹ ; pH = 3,0 (Solução de Ácido Cítrico 5%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 3,23 | 150 | 220 |

5.3 ANTIBIOGRAMA

Foram realizados antibiogramas com o intuito de verificar o potencial do reator de carbonização hidrotermal na decomposição dos antibióticos ampicilina, enrofloxacina, oxitetraciclina, sulfaquinoxalina e tilosina.

5.3.1 MICRODILUIÇÃO EM CALDO

As amostras, após o tratamento com o reator, foram levadas para o laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da UFG para realização de antibiograma. As amostras do efluente sintético bruto e tratado foram acondicionadas em geladeira a 4°C até a realização do teste. O antibiograma foi realizado pelo método da microdiluição em caldo por meio do teste de difusão em poço conforme recomendação do CLSI (2006):

- O inóculo foi preparado a partir de cultura em ágar ASI e incubado a 37°C por 24 h em 2 mL de solução salina até a obtenção de uma turvação equivalente a 0,5 na escala MacFarland;
- Foram utilizadas cepas de bactérias ATCC;
- Este ensaio foi realizado em microplaca estéril de 96 cavidades com fundo em “U”;
- Primeiramente foi preparada uma solução de 1000 µg·L⁻¹ partindo-se da solução 50 mg·L⁻¹ de cada um dos antibacterianos;
- Essa solução 1000 µg·L⁻¹ foi obtida pipetando-se 1,0 mL da solução 50 mg·L⁻¹ dos antibióticos e diluindo-se em um balão volumétrico de 100 mL com água ultrapurificada;
- Os orifícios da microplaca foram preenchidos com 100 µL de caldo Müller-Hinton;

- Uma alíquota de 100 μL da solução 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada um dos antibióticos foi adicionada ao primeiro poço da linha A e homogeneizada, obtendo a concentração inicial de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para o efluente puro (EP);
- Em seguida, uma alíquota de 100 μL do conteúdo do primeiro orifício da linha A foi transferida para o orifício seguinte da mesma linha, e após homogeneização, o mesmo volume foi transferido para o próximo orifício, e assim sucessivamente de modo que a seja obtida concentração decrescente do poço anterior em relação ao seguinte até o final da linha B (500, 250, 125 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, etc.);
- Foram adicionados 100 μL do efluente tratado (ET) no primeiro poço da linha C e foi realizado o mesmo procedimento de diluição realizado nas linhas A e B até o final da linha C;
- Em seguida, 20 μL do inóculo microbiano na concentração 0,5 da escala de McFarland diluídos 1/10 em salina estéril (0,9%) foram adicionados em todos os orifícios;
- A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a maior diluição do antibiótico capaz de inibir o crescimento microbiano, isso foi verificado no orifício onde não se verificou o desenvolvimento de coloração vermelha;
- As linhas G e H foram utilizadas como controle da esterilidade das substâncias em amostra, onde foram adicionados aos poços dessas linhas apenas o meio de cultura e as soluções do efluente puro e tratado, respectivamente;
- As microplacas após a inoculação foram incubadas a 35°C por 18 horas.

5.4 ENSAIO DE TOXICIDADE COM *ALLIUM CEPA*

Com o intuito de realizar ensaio de germinação com *Allium cepa*, foram adquiridas comercialmente em lojas de produtos agropecuários sementes de cebola (*Allium cepa*) da variedade baia periforme, marca TopSee Garden.

Os experimentos foram realizados conforme método de “blotter” de acordo com Rodo (2002), com adaptações. Em uma caixa de papelão foram colocadas sementes de *Allium cepa* para germinar em temperatura ambiente e protegidas da luz solar direta, dentro de placas de *Petri* forradas com papel filtro embebido com 4,0 mL das amostras

do estudo. Todos os dias, por 7 dias, foram adicionados 1,5 mL da solução de interesse na placa de *Petri* com os seguintes experimentos:

Grupo I: Controle negativo (água destilada);

Grupo II: Soluções dos antibióticos sem qualquer tratamento (soluções com concentração 50 mg.mL⁻¹);

Grupo III: Soluções dos antibióticos após tratamento com carbonização hidrotermal.

Em cada placa foram colocadas 10 sementes para germinar, conforme Figura 35. A contagem das sementes germinadas, por tratamento, foi feita diariamente, sempre à mesma hora, durante 7 dias. Ao final do tratamento, após os 7 dias de germinação, foram medidos o comprimento dos brotos com o auxílio de um paquímetro.



Figura 35: Placa de *Petri* contendo 10 sementes de *Allium cepa* para o ensaio de toxicidade.

5.5 ANÁLISE DOS ANTIBIÓTICOS COM HPLC

As análises de concentração inicial e final do antibiótico por cromatografia líquida de alta eficiência ou HPLC foram realizadas no Laboratório da Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Unicamp.

Dados do HPLC: Sistema Cromatográfico Alliance Waters 2695, constituído por bomba quaternária, Detector de Arranjo de Diodos (DAD) Waters 2996. Foi utilizado o *software* Empower 2 Software 2005 para realizar a integralização dos picos dos cromatogramas. Foi utilizada em todas as análises a coluna Chromolith® Performance

RP-18 (100 x 3,0 mm). Seguem as condições cromatográficas e referências utilizadas para cada um dos antibióticos analisados:

a) **Ampicilina:**

- Coluna: Chromolith[®] Performance RP-18 (100 x 3,0 mm);
- Comprimento de onda: 215 nm;
- Fase móvel: Tampão fosfato de potássio dibásico pH 3,7 e metanol (80:20);
- Sistema isocrático;
- Vazão: 1,2 mL·min⁻¹;
- Temperatura: 35°C;
- Volume de Injeção: 5 µL

(CIONE; LIBERALE; SILVA, 2010)

● **Enrofloxacin**

- Coluna: Chromolith[®] Performance RP-18 (100 x 3,0 mm);
- Comprimento de onda: 280 nm;
- Fase móvel: Ácido Fórmico 0,1% (v/v) e acetonitrila (92:8);
- Sistema isocrático;
- Vazão: 1,5 mL·min⁻¹;
- Temperatura: 40°C;
- Volume de Injeção: 10 µL

(REZENDE, 2012).

b) **Oxitetraciclina:**

- Coluna: Chromolith[®] Performance RP-18 (100 x 3,0 mm);
- Comprimento de onda: 275 nm;
- Fase móvel: ácido oxálico 0,01 mol·L⁻¹ pH 3,0 e metanol (85:15);
- Sistema isocrático;
- Vazão: 0,5 mL·min⁻¹;
- Temperatura: 30°C;
- Volume de Injeção: 10 µL

(PAPADOYANNIS; SOMANIDOU; KOVATSI, 2000):

c) **Sulfaquinoxalina:**

- Coluna: Chromolith[®] PerformanceH RP-18 (100 x 3,0 mm);
 - Comprimento de onda: 248 nm;
 - Fase móvel: ácido fórmico 0,1% (v/v) e metanol (70:30);
 - Sistema isocrático;
 - Vazão: 1,0 mL·min⁻¹;
 - Temperatura: 40°C;
 - Volume de Injeção: 10 µL
- (DORETTO; PERUCHI; RATH, 2014).

d) **Tilosina:**

- Coluna: Chromolith[®] PerformanceH RP-18 (100 x 3,0 mm);
 - Comprimento de onda: 280 nm;
 - Fase móvel: solução Na₂PO₄ 0,04 mol·L⁻¹ pH 2,4 e acetonitrila (75:25);
 - Sistema isocrático;
 - Vazão: 0,5 mL·min⁻¹;
 - Temperatura: 30°C;
 - Volume de Injeção: 10 µL
- (PRATS et al., 2001).

As amostras foram previamente passadas em filtro Millex[®] Millipore com 0,45µm de poro. Então, as amostras foram colocadas no carrossel do equipamento, onde também passam por membrana de 0,22 µm antes de serem injetadas. A filtração remove partículas sólidas e gases presentes nas amostras. O *software* Empower 2 Software 2005, programa controlador do cromatógrafo, possui um programa destinado à integração dos picos e tratamento de dados referentes às análises. Este programa, por intermédio de recursos analíticos e estatísticos, elimina e distingue ruídos de picos e identifica o analito em estudo, permitindo a integração de seu pico e quantificação posterior da sua presença.

A eficiência do tratamento foi calculada de acordo com a Equação (3).

$$E = \left(\frac{C_i - C_f}{C_i} \right) \times 100 \quad (3)$$

Onde:

E: Eficiência (%)

C_i: Concentração Inicial (mgL⁻¹)

C_f: Concentração Final (mgL⁻¹)

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As avaliações da decomposição dos antibióticos ampicilina, enrofloxacin, oxitetraciclina, sulfaquinoxalina e tilosina são muito importantes, haja visto que concentrações baixas de antimicrobianos no meio ambiente são capazes de promover o desenvolvimento de cepas bacterianas multi-resistentes.

O processo de carbonização hidrotermal envolve uma fase de monomerização da matéria orgânica, seguida de processo de polimerização, depois deste é obtido um carvão desidratado com um alto poder calorífico e água por união das moléculas de hidrogênio e oxigênio que perderam as cadeias de hidrocarbonetos. O objetivo é encontrar condições mais amenas de temperatura e pressão, e menor tempo reacional, com o intuito de que esse processo possa a ser usado no tratamento de efluentes e águas contaminadas com antibióticos. Os antibióticos são substâncias recalcitrantes e podem exercer efeitos tóxicos a organismos aquáticos, como é o caso das penicilinas segundo Balcioğlu e Ötker (2003). Além de que mesmo presentes em baixas concentrações, os antibióticos promovem o desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes aos antimicrobianos utilizados atualmente.

6.1 ENSAIOS COM O REATOR DE CARBONIZAÇÃO HIDROTERMAL

O Experimento 01 realizado para saber o potencial do reator de carbonização hidrotermal na decomposição do antibiótico oxitetraciclina foi considerado satisfatório, haja visto que reduziu a atividade antimicrobiana no efluente puro não tratado (EP) ($>100 \mu\text{g mL}^{-1}$) em 75% em comparação ao efluente tratado (ET) ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 36).

Uma observação importante foi o desenvolvimento de coloração marrom-amarelada resultante amostra tratada pelo processo de carbonização hidrotermal (Figura 37), em virtude do processo de carbonização dos compostos em solução. A amostra também apresentou odor ácido moderado.

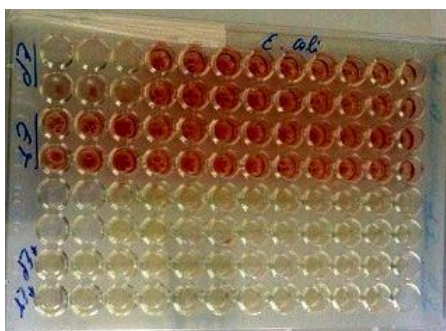


Figura 36: Placa utilizada no teste de difusão em poço após incubação. Oxitetraciclina antes do tratamento (EP) e após tratamento em reator de CHT (ET) frente ao micro-organismo *E.coli*.

Levando em conta as condições deste experimento, uma planta em escala industrial do reator de carbonização hidrotermal para tratamento de efluentes, deverá observar a necessidade de um processo para remoção de cor, como por exemplo, carvão ativado em pó, que pode aumentar uma etapa no processo de tratamento e os custos da operação.

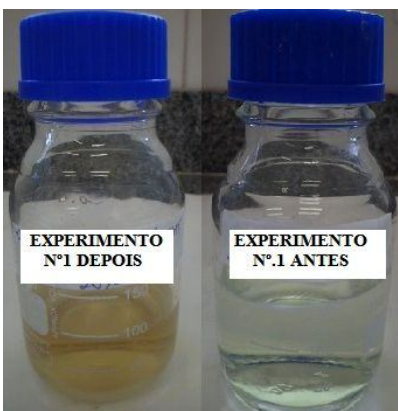


Figura 37: Aspecto da solução depois e antes do tratamento de carbonização hidrotermal.

Depois de confirmado o potencial do sistema de CHT na decomposição do antibiótico oxitetraciclina, foram realizados os Experimentos 02 a 09 com outros antibióticos, tempo de reação e pH diferentes, conforme os Quadros 20 e 21. Os Experimentos 02 a 09 foram testados quanto à redução da atividade antibacteriana dos antimicrobianos com a realização de antibiogramas.

Quadro 20: Condições dos experimentos realizados para avaliação do potencial do reator de carbonização hidrotermal na decomposição dos antibióticos ampicilina, enrofloxacina e oxitetraciclina.

| EXPERIMENTO 02 → AMPICILINA | | | |
|--|-----------|------------------------------|--------------------------------|
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 500 mg·L⁻¹; pH = 4,0 (Solução de Ácido Cítrico 5%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 4,05 | 120 | 194 |
| EXPERIMENTO 03 → ENROFLOXACINA | | | |
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 500 mg·L⁻¹; pH = 4,0 (Solução de Ácido Cítrico 5%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 4,01 | 120 | 192 |
| EXPERIMENTO 04 → OXITETRACICLINA | | | |
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 500 mg·L⁻¹; pH = 4,0 (Solução de Ácido Cítrico 5%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 4,03 | 120 | 193 |

Quadro 21: Condições dos experimentos realizados para avaliação do potencial do reator de carbonização hidrotermal na decomposição dos antibióticos ampicilina, enrofloxacina, oxitetraciclina, sulfaquinoxalina e tilosina.

| EXPERIMENTO 05 → SULFAQUINOXALINA | | | |
|--|------|-----------------------|-------------------------|
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 500 mg·L ⁻¹ ; pH = 4,0 (Solução de Ácido Cítrico 5%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 4,08 | 120 | 191 |
| EXPERIMENTO 06 → TILOSINA | | | |
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 500 mg·L ⁻¹ ; pH = 4,0 (Solução de Ácido Cítrico 5%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 4,02 | 120 | 192 |
| EXPERIMENTO 07 → AMPICILINA | | | |
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 500 mg·L ⁻¹ ; pH = 3,0 (Solução de Ácido Fosfórico 10%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 3,07 | 120 | 193 |
| EXPERIMENTO 08 → ENROFLOXACINA | | | |
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 500 mg·L ⁻¹ ; pH = 3,0 (Solução de Ácido Fosfórico 10%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 3,03 | 120 | 192 |
| EXPERIMENTO 09 → OXITETRACICLINA | | | |
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 500 mg·L ⁻¹ ; pH = 3,0 (Solução de Ácido Fosfórico 10%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 3,01 | 120 | 194 |

Nos Experimentos 2 (ampicilina), 3 (enrofloxacino), 4 (oxitetraciclina), 5 (sulfaquinoxalina) e 6 (tilosina) foram utilizados o mesmo catalisador (ácido cítrico), pH (4,0), temperatura (195±5°C) e tempo de reação (120 minutos) (Figuras 38, 39 e 40). Foi observado o desenvolvimento da coloração marrom-amarelada no Experimento 4 (Figura 39). A coloração da solução do Experimento 5 (Figura 39) apresentou coloração levemente amarelada, após o tratamento com CHT. O odor ácido moderado irritante foi percebido em todas as amostras. Porém, nos Experimentos 7 (ampicilina), 8 (enrofloxacino) e 9 (oxitetraciclina) nos quais foram utilizados catalisador diferente (ácido fosfórico), mesmo tempo de reação (120 minutos), temperatura igual (195±5°C) e

pH diferente (3,0) não foi observado o desenvolvimento de odor ácido moderado irritante. O odor ácido desenvolvido é possivelmente devido à formação de frações de aldeído. O ácido cítrico foi utilizado na correção do pH nos Experimentos 1, 2, 3, 4, 5 e 6, e por isso nos experimentos subsequentes não foi observado o odor ácido moderado irritante. Observando isso, a implantação de uma planta industrial de tratamento de efluentes contendo antibióticos, o ácido fosfórico apresenta mais vantagens operacionais quando comparado ao ácido cítrico.

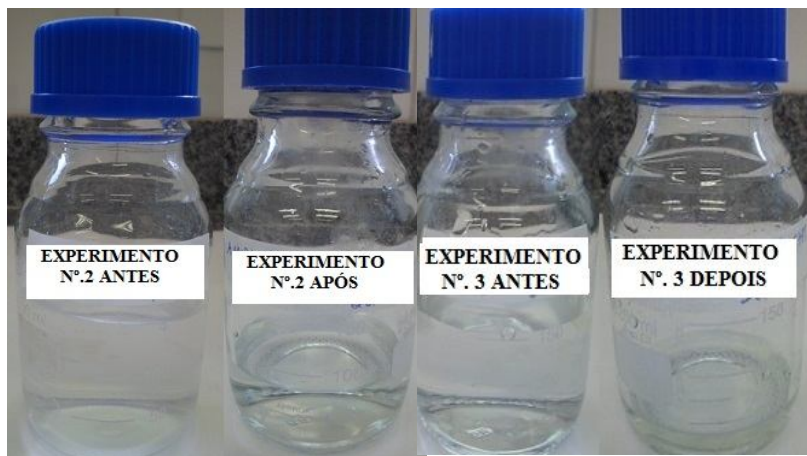


Figura 38: Aspecto das soluções dos Experimentos 2 e 3 antes e depois do tratamento de carbonização hidrotermal.

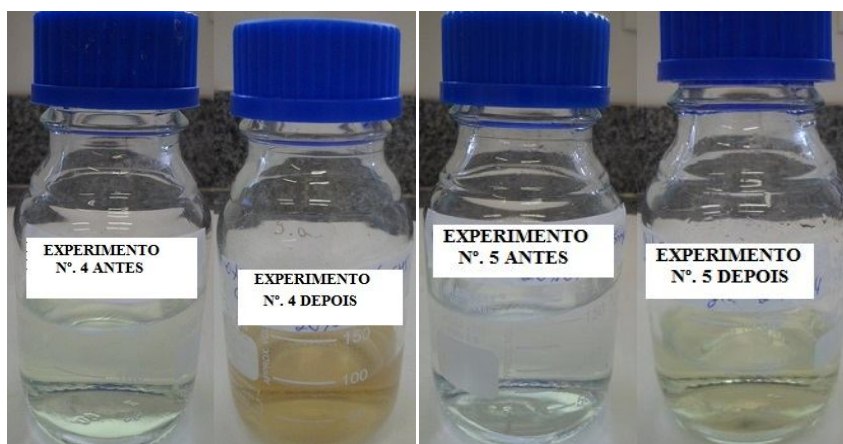


Figura 39: Aspecto das soluções dos Experimentos 4 e 5 antes e depois do tratamento de carbonização hidrotermal.

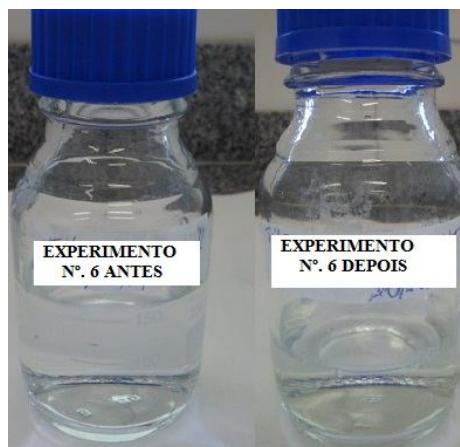


Figura 40: Aspecto das soluções do Experimento 6 antes e depois do tratamento de carbonização hidrotermal.

Após os Experimentos 02 a 09 terem sido realizados e comprovada a redução da atividade antibacteriana dos antibióticos testados no reator de CHT mediante a realização de antibiogramas, foram realizados novamente outros ensaios com o reator com o intuito de quantificar a eficiência do tratamento com análises em HPLC-DAD. Foram utilizadas nos Experimentos Nº 10 a 35, concentrações, pH e temperaturas diferentes. Os Quadros 22 a 32 demonstram as condições de realização dos ensaios com o reator de CHT.

Quadro 22. Condições do ensaio realizado com o reator de CHT para decomposição do antibiótico oxitetraciclina.

| EXPERIMENTO 10 → OXITETRACICLINA | | | |
|---|-----------|------------------------------|--------------------------------|
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 50 mg·L⁻¹; pH = 3,0 (Solução de Ácido Cítrico 5%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 3,09 | 120 | 183 |
| Nº. 02 | 3,06 | 120 | 182 |
| Nº. 03 | 3,08 | 120 | 180 |
| Média | 3,08 | 120 | 182 |
| DP | 0,01 | 0 | 1,25 |

Quadro 23. Condições dos ensaios realizados com o reator de CHT para decomposição do antibiótico oxitetraciclina.

| EXPERIMENTO 11 → OXITETRACICLINA | | | |
|--|-----------|------------------------|--------------------------------|
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 50 mg·L⁻¹; pH = 4,0 (Solução de Ácido Cítrico 5%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 4,05 | 120 | 183 |
| Nº. 02 | 4,02 | 120 | 181 |
| Nº. 03 | 4,01 | 120 | 182 |
| Média | 4,03 | 120 | 182 |
| DP | 0,02 | 0 | 0,82 |
| EXPERIMENTO 12 → OXITETRACICLINA | | | |
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 50 mg·L⁻¹; pH = 5,0 (Solução de Ácido Cítrico 5%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 5,02 | 120 | 180 |
| Nº. 02 | 5,03 | 120 | 183 |
| Nº. 03 | 5,01 | 120 | 180 |
| Média | 5,02 | 120 | 181 |
| DP | 0,01 | 0 | 1,41 |
| EXPERIMENTO 13 → OXITETRACICLINA | | | |
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 50 mg·L⁻¹; pH = 7,0 (Solução de Ácido Fosfórico 10%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 7,01 | 120 | 184 |
| Nº. 02 | 7,08 | 120 | 182 |
| Nº. 03 | 7,05 | 120 | 183 |
| Média | 7,05 | 120 | 183 |
| DP | 0,04 | 0 | 0,82 |
| EXPERIMENTO 14 → OXITETRACICLINA | | | |
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 50 mg·L⁻¹; pH = 3,0 (Solução de Ácido Fosfórico 10%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 3,05 | 90 | 174 |
| Nº. 02 | 3,10 | 90 | 170 |
| Nº. 03 | 3,08 | 90 | 172 |
| Média | 3,08 | 90 | 172 |
| DP | 0,03 | 0 | 1,63 |

Quadro 24. Condições dos ensaios realizados com o reator de CHT para decomposição do antibiótico enrofloxacin.

| EXPERIMENTO 15 → ENROFLOXACINA | | | |
|--|-----------|------------------------------|--------------------------------|
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 50 mgL⁻¹; pH = 3,0 (Solução de Ácido Fosfórico 10%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 3,01 | 120 | 183 |
| Nº. 02 | 3,07 | 120 | 181 |
| Nº. 03 | 3,09 | 120 | 184 |
| Média | 3,06 | 120 | 183 |
| DP | 0,03 | 0 | 1,25 |
| EXPERIMENTO 16 → ENROFLOXACINA | | | |
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 50 mgL⁻¹; pH = 4,0 (Solução de Ácido Fosfórico 10%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 4,08 | 120 | 181 |
| Nº. 02 | 4,06 | 120 | 183 |
| Nº. 03 | 4,09 | 120 | 180 |
| Média | 4,08 | 120 | 181 |
| DP | 0,02 | 0 | 1,25 |
| EXPERIMENTO 17 → ENROFLOXACINA | | | |
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 50 mgL⁻¹; pH = 5,0 (Solução de Ácido Fosfórico 10%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 5,06 | 120 | 183 |
| Nº. 02 | 5,09 | 120 | 181 |
| Nº. 03 | 5,04 | 120 | 181 |
| Média | 5,06 | 120 | 182 |
| DP | 0,03 | 0 | 0,94 |
| EXPERIMENTO 18 → ENROFLOXACINA | | | |
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 200 mgL⁻¹; pH = 3,0 (Solução de Ácido Fosfórico 10%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 3,10 | 120 | 203 |
| Nº. 02 | 3,06 | 120 | 205 |
| Nº. 03 | 3,02 | 120 | 202 |
| Média | 3,06 | 120 | 203 |
| DP | 0,03 | 0 | 1,25 |

Quadro 25. Condições dos ensaios realizados com o reator de CHT para decomposição do antibiótico enrofloxacin.

| EXPERIMENTO 19 → ENROFLOXACINA | | | |
|--|-----------|------------------------------|--------------------------------|
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 200 mgL⁻¹; pH = 4,0 (Solução de Ácido Fosfórico 10%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 4,05 | 90 | 203 |
| Nº. 02 | 4,03 | 90 | 200 |
| Nº. 03 | 4,01 | 90 | 202 |
| Média | 4,03 | 90 | 202 |
| DP | 0,02 | 0 | 1,25 |
| EXPERIMENTO 20 → ENROFLOXACINA | | | |
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 200 mgL⁻¹; pH = 7,0 (Solução de Ácido Fosfórico 10%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 6,99 | 120 | 182 |
| Nº. 02 | 7,06 | 120 | 180 |
| Nº. 03 | 7,03 | 120 | 181 |
| Média | 7,03 | 120 | 181 |
| DP | 0,04 | 0 | 0,82 |

Quadro 26. Condições dos ensaios realizados com o reator de CHT para decomposição do antibiótico ampicilina.

| EXPERIMENTO 21 → AMPICILINA | | | |
|---|-----------|------------------------------|--------------------------------|
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 50 mgL⁻¹; pH = 3,0 (Solução de Ácido Fosfórico 10%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 3,02 | 120 | 184 |
| Nº. 02 | 3,06 | 120 | 180 |
| Nº. 03 | 3,02 | 120 | 183 |
| Média | 3,03 | 120 | 182 |
| DP | 0,02 | 0 | 1,70 |
| EXPERIMENTO 22 → AMPICILINA | | | |
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 50 mgL⁻¹; pH = 4,0 (Solução de Ácido Fosfórico 10%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 4,02 | 120 | 183 |
| Nº. 02 | 4,08 | 120 | 181 |
| Nº. 03 | 4,01 | 120 | 184 |
| Média | 4,04 | 120 | 183 |
| DP | 0,04 | 0 | 1,25 |

Quadro 27. Condições dos ensaios realizados com o reator de CHT para decomposição do antibiótico ampicilina.

| EXPERIMENTO 23 → AMPICILINA | | | |
|---|-----------|------------------------------|--------------------------------|
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 50 mgL⁻¹; pH = 5,0 (Solução de Ácido Fosfórico 10%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 5,02 | 120 | 182 |
| Nº. 02 | 5,06 | 120 | 183 |
| Nº. 03 | 5,00 | 120 | 185 |
| Média | 5,03 | 120 | 183 |
| DP | 0,03 | 0 | 1,53 |
| EXPERIMENTO 24 → AMPICILINA | | | |
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 60 mgL⁻¹; pH = 7,0 (Solução de Ácido Fosfórico 10%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 7,00 | 120 | 181 |
| Nº. 02 | 7,04 | 120 | 183 |
| Nº. 03 | 7,02 | 120 | 182 |
| Média | 7,02 | 120 | 182 |
| DP | 0,02 | 0 | 1,00 |
| EXPERIMENTO 25 → AMPICILINA | | | |
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 60 mgL⁻¹; pH = 4,0 (Solução de Ácido Fosfórico 10%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 4,08 | 90 | 204 |
| Nº. 02 | 4,04 | 90 | 201 |
| Nº. 03 | 4,02 | 90 | 203 |
| Média | 4,06 | 90 | 203 |
| DP | 0,02 | 0 | 1,25 |

Quadro 28. Condições dos ensaios realizados com o reator de CHT para decomposição do antibiótico sulfaquinoxalina.

| EXPERIMENTO 26 → SULFAQUINOXALINA | | | |
|---|-----------|------------------------------|--------------------------------|
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 30 mgL⁻¹; pH = 3,0 (Solução de Ácido Fosfórico 10%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 3,09 | 120 | 183 |
| Nº. 02 | 3,05 | 120 | 184 |
| Nº. 03 | 3,08 | 120 | 180 |
| Média | 3,07 | 120 | 182 |
| DP | 0,02 | 0 | 1,70 |

Quadro 29. Condições do ensaio realizado com o reator de CHT para decomposição do antibiótico sulfaquinoxalina.

| EXPERIMENTO 27 → SULFAQUINOXALINA | | | |
|---|-----------|------------------------------|--------------------------------|
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 30 mgL⁻¹; pH = 4,0 (Solução de Ácido Fosfórico 10%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 4,02 | 120 | 180 |
| Nº. 02 | 4,03 | 120 | 184 |
| Nº. 03 | 4,09 | 120 | 183 |
| Média | 4,05 | 120 | 182 |
| DP | 0,04 | 0 | 1,70 |
| EXPERIMENTO 28 → SULFAQUINOXALINA | | | |
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 30 mgL⁻¹; pH = 5,0 (Solução de Ácido Fosfórico 10%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 5,07 | 120 | 184 |
| Nº. 02 | 5,05 | 120 | 182 |
| Nº. 03 | 5,07 | 120 | 185 |
| Média | 5,07 | 120 | 184 |
| DP | 0,01 | 0 | 1,25 |
| EXPERIMENTO 29 → SULFAQUINOXALINA | | | |
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 80 mgL⁻¹; pH = 7,0 (Solução de Ácido Fosfórico 10%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 7,03 | 120 | 180 |
| Nº. 02 | 7,05 | 120 | 184 |
| Nº. 03 | 7,01 | 120 | 181 |
| Média | 7,03 | 120 | 182 |
| DP | 0,02 | 0 | 1,70 |

Quadro 30. Condição do ensaio realizado com o reator de CHT para decomposição do antibiótico tilosina.

| EXPERIMENTO 30 → TILOSINA | | | |
|--|-----------|------------------------------|--------------------------------|
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 60 mgL⁻¹; pH = 3,0 (Solução Ácido Fosfórico 10%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 3,04 | 120 | 184 |
| Nº. 02 | 3,05 | 120 | 182 |
| Nº. 03 | 3,01 | 120 | 183 |
| Média | 3,03 | 120 | 183 |
| DP | 0,02 | 0 | 0,82 |

Quadro 31. Condições dos ensaios realizados com o reator de CHT para decomposição do antibiótico tilosina.

| EXPERIMENTO 31 → TILOSINA | | | |
|---|-----------|------------------------------|--------------------------------|
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 60 mgL⁻¹; pH = 4,0 (Solução de Ácido Fosfórico 10%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 4,09 | 120 | 183 |
| Nº. 02 | 4,00 | 120 | 180 |
| Nº. 03 | 4,03 | 120 | 183 |
| Média | 4,04 | 120 | 182 |
| DP | 0,05 | 0 | 1,41 |
| EXPERIMENTO 32 → TILOSINA | | | |
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 60 mgL⁻¹; pH = 5,0 (Solução de Ácido Fosfórico 10%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 5,01 | 120 | 182 |
| Nº. 02 | 5,06 | 120 | 180 |
| Nº. 03 | 5,02 | 120 | 183 |
| Média | 5,03 | 120 | 182 |
| DP | 0,03 | 0 | 1,25 |
| EXPERIMENTO 33 → TILOSINA | | | |
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 50 mgL⁻¹; pH = 7,0 (Solução de Ácido Fosfórico 10%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 7,05 | 120 | 183 |
| Nº. 02 | 7,02 | 120 | 182 |
| Nº. 03 | 7,08 | 120 | 184 |
| Média | 7,05 | 120 | 183 |
| DP | 0,03 | 0 | 0,82 |
| EXPERIMENTO 34 → TILOSINA | | | |
| Condições iniciais: | | | |
| Volume = 150 mL; Concentração = 50 mgL⁻¹; pH = 3,0 (Solução de Ácido Fosfórico 10%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 3,05 | 90 | 184 |
| Nº. 02 | 3,08 | 90 | 182 |
| Nº. 03 | 3,01 | 90 | 180 |
| Média | 3,05 | 90 | 182 |
| DP | 0,04 | 0 | 1,63 |

Quadro 32. Condição do ensaio realizado com o reator de CHT para decomposição do antibiótico tilosina

| EXPERIMENTO 35 → TILOSINA | | | |
|---|------|-----------------------|-------------------------|
| Condições iniciais: Volume = 150 mL; Concentração = 50 mgL ⁻¹ ; pH = 4,0 (Solução de Ácido Fosfórico 10%) | | | |
| Amostra | pH | Tempo de reação (min) | Temperatura Máxima (°C) |
| Nº. 01 | 4,00 | 90 | 182 |
| Nº. 02 | 4,03 | 90 | 180 |
| Nº. 03 | 4,05 | 90 | 183 |
| Média | 4,03 | 90 | 182 |
| DP | 0,03 | 0 | 1,25 |

6.2 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE À ANTIMICROBIANOS

Foi realizado o teste de susceptibilidade à antimicrobianos de acordo com a recomendação do CLSI (2006) com o intuito de verificar o potencial da reação hidrotermal na decomposição dos antibióticos ampicilina (AMP), enrofloxacina (ENR), oxitetraciclina (OTC), sulfaquinoxalina (SQX) e tilosina (TIL). Foram utilizadas as seguintes cepas bacterianas derivadas de cepas padrão ATCC (*American Type Culture Collection*): *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Salmonella spp.* (ATCC 19430), *Serratia marcescens* (ATCC 14756), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12229). A concentração inicial dos antibióticos no primeiro teste foi de 100 µg mL⁻¹, enquanto nos outros testes foi utilizada a concentração de 125 µg mL⁻¹ (Quadros 33, 34, 35 e 36).

Quadro 33: Teste de microdiluição em caldo após o Experimento Nº 1 realizado com o intuito de verificar o potencial de degradação de antibióticos pelo sistema de CHT.

| Antibiótico | Experimento | Concentração (µg mL ⁻¹) | CIM (µg mL ⁻¹) <i>Escherichia coli</i> |
|--------------|-------------|-------------------------------------|---|
| OTC | | 100 | 25 |
| OTC após CHT | 1 | na | >100 |

OTC: oxitetraciclina, CIM: concentração inibitória mínima, na: concentração não avaliada.

Quadro 34: Teste de microdiluição em caldo dos antibióticos frente aos micro-organismos *S.aureus* e *E.coli*.

| Antibiótico | Experimento | Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | |
|--------------|-------------|--|-------------------------------|------------------|
| | | | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> |
| AMP | | 125 | 15,62 | > 125 |
| AMP após CHT | 2 | na | 62,5 | > 125 |
| ENR | | 125 | 0,48 | 0,48 |
| ENR após CHT | 3 | na | 1,95 | 1,95 |
| OTC | | 125 | 31,25 | 31,25 |
| OTC após CHT | 4 | na | > 125 | > 125 |
| SQX | | 125 | > 125 | > 125 |
| SQX após CHT | 5 | na | > 125 | > 125 |
| TIL | | 125 | > 125 | > 125 |
| TIL após CHT | 6 | na | > 125 | > 125 |

AMP: ampicilina, ENR: enrofloxacina, OTC: oxitetraciclina, SQX: sulfaquinoxalina, TIL: tilosina, CIM: concentração inibitória mínima, na: não avaliada.

Quadro 35: Teste de microdiluição em caldo dos antibióticos frente aos micro-organismos *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Salmonella spp.* (SS), *Serratia Marcenses* (SM) e *Staphylococcus epidermidis* (SE).

| Antibiótico | Experimento | Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | | | |
|--------------|-------------|--|-------------------------------|--------|--------|--------|
| | | | PA | SS | SM | SE |
| SQX | | 125 | 31,25 | 1,95 | 15,62 | < 0,12 |
| SQX após CHT | 5 | na | 125 | 31,25 | 250 | 250 |
| TIL | | 125 | < 0,12 | < 0,12 | < 0,12 | < 0,12 |
| TIL após CHT | 6 | na | 0,97 | 0,97 | 0,97 | < 0,12 |

SQX: sulfaquinoxalina, TIL: tilosina, CIM: concentração inibitória mínima, na: concentração não avaliada.

Quadro 36: Teste de microdiluição em caldo dos antibióticos frente aos micro-organismos *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Salmonella spp.* (SS), *Serratia Marcenses* (SM) e *Staphylococcus epidermidis* (SE).

| Antibiótico | Experimento | Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | | | |
|--------------|-------------|--|-------------------------------|-------|-------|-------|
| | | | PA | SS | SM | SE |
| AMP | | 125 | 125 | 0,24 | 62,5 | 15,62 |
| AMP após CHT | 7 | na | 250 | 125 | 250 | 250 |
| ENR | | 125 | 0,97 | <0,12 | 0,48 | 0,48 |
| ENR após CHT | 8 | na | 1,95 | 0,48 | 0,97 | 1,95 |
| OTC | | 125 | 7,81 | 1,95 | 31,25 | 7,81 |
| OTC após CHT | 9 | na | 250 | 31,25 | >250 | 125 |

AMP: ampicilina, ENR: enrofloxacina, OTC: oxitetraciclina, CIM: concentração inibitória mínima, na: concentração não avaliada.

O teste de microdiluição em caldo após o Experimento 1 mostrou que para a temperatura, pH e tempo de reação utilizados, o reator de carbonização hidrotermal reduziu totalmente (100%) a atividade antibacteriana da oxitetraciclina frente a cepa de *Escherichia coli*, considerando a concentração inicial na microplaca e a cepa bacteriana usada. Isso evidenciou o potencial do reator de CHT na remoção de antimicrobianos e estimulou a realização de novos testes.

Observou-se que para os antibióticos ampicilina (AMP) e oxitetraciclina (OTC), o tratamento com carbonização hidrotermal reduziu a atividade antimicrobiana consideravelmente frente a todas as cepas bacterianas utilizadas, quando comparamos a concentração inibitória mínima (CIM) dos antibióticos sem tratamento. Evidenciando a eficiência do tratamento com carbonização hidrotermal na remoção dos antibióticos ampicilina e oxitetraciclina. O antibiótico enrofloxacinol pós-tratamento também teve sua atividade antibacteriana reduzida para todas as cepas bacterianas, porém verificamos que a taxa de degradação foi menor quando comparamos com a ampicilina e a oxitetraciclina.

As cepas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* mostraram-se resistentes à sulfaquinoxalina e à tilosina, não sendo possível calcular a CIM para estes antibióticos. O tratamento com carbonização hidrotermal para o antibiótico sulfaquinoxalina também resultou em consideráveis taxa de decomposição porque reduziu a atividade antibacteriana consideravelmente para *P. aeruginosa* ($125 \mu\text{g mL}^{-1}$), *Salmonella* ($31,25 \mu\text{g mL}^{-1}$), *S. marcescens* e *S. epidermidis* ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$).

O tratamento também reduziu a atividade antibacteriana da solução de tilosina frente às cepas utilizadas, porém em taxas menores ao tratamento da ampicilina, oxitetraciclina e sulfaquinoxalina. A tilosina na amostra sem tratamento inibiu totalmente o crescimento para todas as bactérias na concentração testada, exceto *E. coli* e *S. aureus* que se mostraram resistentes, evidenciando que as cepas utilizadas *P. aeruginosa* (ATCC 9027), *S. marcescens* (ATCC 14756), *Salmonella* (ATCC 19430) e *S. epidermidis* (ATCC 12229) não apresentaram resistência a este antibiótico. A solução de tilosina, mesmo pós-tratamento (Figura 41), apresentou o potencial de inibir o crescimento bacteriano, resultando em concentrações inibitórias mínimas (CIM) baixas para as cepas de *P. aeruginosa* ($0,97 \mu\text{g mL}^{-1}$), *S. marcescens* ($0,97 \mu\text{g mL}^{-1}$), *Salmonella* ($0,97 \mu\text{g mL}^{-1}$) e *S. epidermidis* ($<0,12 \mu\text{g mL}^{-1}$), sendo que para esta última bactéria, a solução tratada inibiu por completo o crescimento, evidenciando atividade antibacteriana mesmo após tratamento.

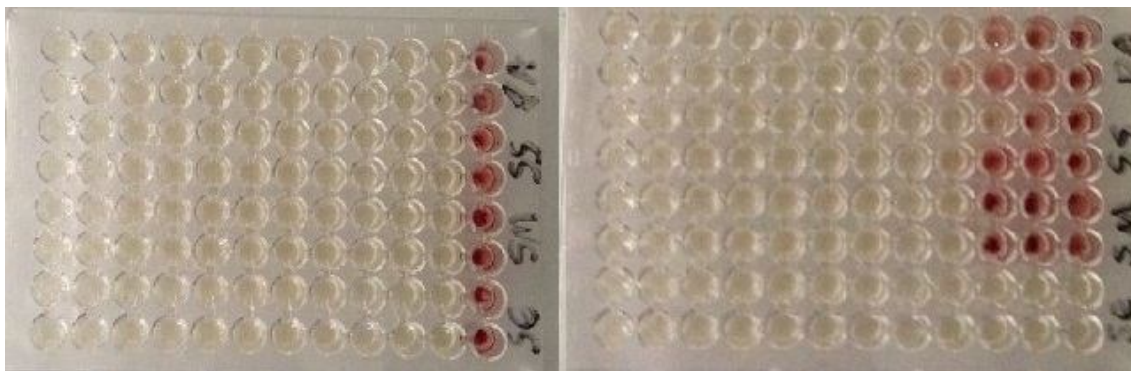


Figura 41: Placa utilizada no teste de difusão em poço após incubação. Tilosina antes do tratamento (à esquerda) e após tratamento com CHT (à direita). Cepas testadas: *S.epidermidis* (SE), *Serratia Marcenses* (SM), *Salmonella spp.* (SS) e *Pseudomonas aeruginosa* (PA).

6.3 ANÁLISE DOS ANTIBIÓTICOS APÓS O TRATAMENTO COM CHT

Depois de avaliar o potencial do sistema de CHT na decomposição dos antibióticos por meio de antibiogramas, foram realizados os ensaios 10 a 14 (oxitetraciclina), 15 a 20 (enrofloxacina), 21 a 25 (ampicilina), 26 a 29 (sulfaquinoxalina) e 30 a 35 (tilosina) com o reator de CHT em diferentes pH, temperaturas e tempos de reação. As amostras foram coletadas e encaminhadas para análise em HPLC.

6.3.1 Oxitetraciclina

O método utilizado para detecção da oxitetraciclina foi o proposto por Papadoyannis, Somanidou e Kovatsi (2000). A curva analítica das soluções-padrão de oxitetraciclina é apresentada na Figura 42. Foram utilizadas as seguintes concentrações da solução-padrão: 1,28, 3,20, 6,40, 12,80, 19,20, 32,00 e 64,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Os resultados das análises em HPLC nas amostras de oxitetraciclina pós-CHT demonstraram que em todas as condições testadas o reator de CHT mostrou-se eficiente no abatimento desse antibiótico (Quadros 37 e 38): reduções acima de 97% (Experimento 13) e 99% (Experimento 10) até a verificação do abatimento total (100%) da oxitetraciclina nos Experimentos 11, 12 e 14.

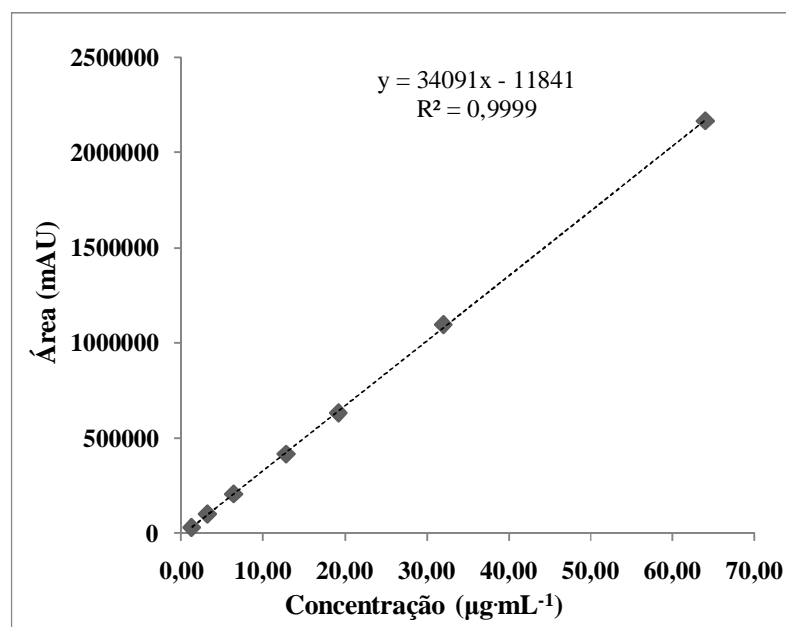


Figura 42: Curva analítica das soluções-padrão de oxitetraciclina.

Quadro 37: Resultados dos cromatogramas da solução padrão e dos experimentos 10, 11 e 12.

| Amostra | Experimento | Área | Concentração (µg·ml ⁻¹) | Concentração média (µg·ml ⁻¹) | Redução (%) |
|---------------|-------------|---------|-------------------------------------|---|-------------|
| Padrão | OTC | 1535264 | 45,38 | | |
| Nº. 1 | 10 | 4323 | 0,12 | 0,13 | 99,71 |
| Nº. 2 | | 3590 | 0,10 | | |
| Nº. 3 | | 5676 | 0,16 | | |
| Nº. 1 | 11 | 0 | 0,00 | 0,00 | 100,00 |
| Nº. 2 | | 0 | 0,00 | | |
| Nº. 3 | | 0 | 0,00 | | |
| Nº. 1 | 12 | 0 | 0,00 | 0,00 | 100,00 |
| Nº. 2 | | 0 | 0,00 | | |
| Nº. 3 | | 0 | 0,00 | | |

Quadro 38: Resultados dos cromatogramas da solução padrão e dos experimentos 13 e 14.

| Amostra | Experimento | Área | Concentração (µg·ml ⁻¹) | Concentração média (µg·ml ⁻¹) | Redução (%) |
|---------------|-------------|---------|-------------------------------------|---|-------------|
| Padrão | OTC | 1080527 | 28,73 | | |
| Nº. 1 | 13 | 16615 | 0,81 | 0,82 | 97,15 |
| Nº. 2 | | 17281 | 0,83 | | |
| Nº. 3 | | 16704 | 0,81 | | |
| Nº. 1 | 14 | 0 | 0,00 | 0,00 | 100,00 |
| Nº. 2 | | 0 | 0,00 | | |
| Nº. 3 | | 0 | 0,00 | | |

Houve a decomposição da oxitetraciclina, identificada no pico característico com tempo de retenção de 8,2 minutos no cromatograma da solução padrão (Figura 43). Porém, podemos perceber a formação de compostos de degradação com tempos de retenção distintos, os quais absorvem no mesmo comprimento de onda (275 nm). Isso pode ser verificado no cromatograma da solução tratada com CHT (Figura 44). Nesse cromatograma verificou-se a formação do pico característico da oxitetraciclina em 8,1 minutos na leitura da amostra 02 do experimento 10.

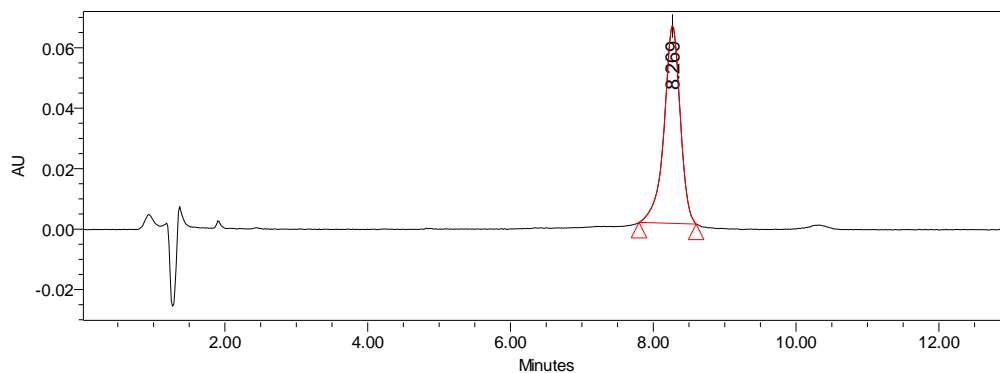


Figura 43: Cromatograma da solução padrão de $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ de oxitetraciclina.

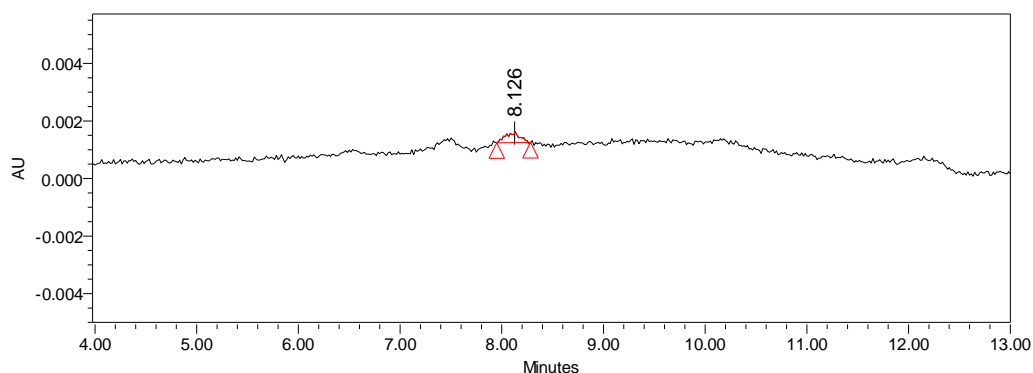


Figura 44: Cromatograma da solução de oxitetraciclina após tratamento com CHT utilizada no experimento 10 – amostra 02.

O pH ácido favoreceu a decomposição da oxitetraciclina (Figura 45), haja visto que na faixa da neutralidade (pH 7) foi registrada a menor taxa de redução (97,15%). Segundo Maia, Rath e Reyes (2009), as tetraciclinas possuem baixa estabilidade sob condições bastante alcalinas ou ácidas. E conforme Martindale (2009), em temperaturas acima de 180°C , as tetraciclinas se decompõem. Isso explica as altas taxas de

decomposição da oxitetraciclina quando tratada em reator de CHT sob pH ácido e temperatura de 180°C.

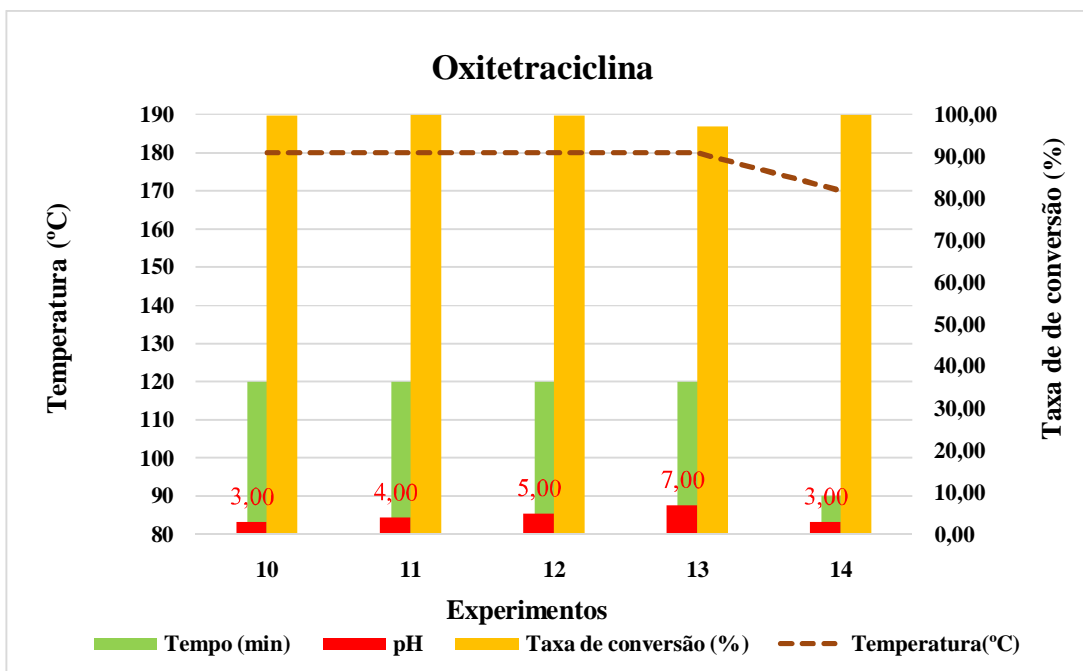


Figura 45: Condições dos experimentos com CHT e taxa de conversão da oxitetraciclina.

6.3.2 Enrofloxacinina

O método utilizado para detecção da enrofloxacinina foi desenvolvido por Rezende (2012). A curva de calibração (Figura 46) foi contruída a partir das seguintes concentrações da solução-padrão: 5,00, 10,00, 20,00, 30,00, 50,00, 70,00 e 100,00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

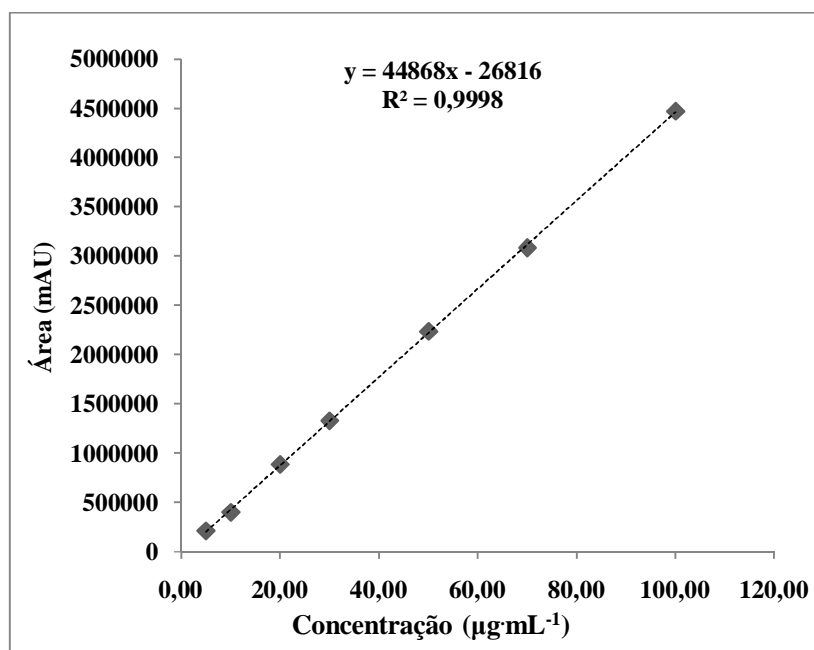


Figura 46: Curva analítica das soluções-padrão de enrofloxacin.

As análises de HPLC das amostras da enrofloxacin demonstraram que houve reduções menores que 30% para todos os experimentos, exceto o experimento 18 no qual houve a decomposição de 98,37% a partir da concentração inicial (Quadros 39 e 40).

Quadro 39: Resultados dos cromatogramas da solução padrão e dos experimentos 15, 16 e 17.

| Amostra | Experimento | Área | Concentração (µg mL ⁻¹) | Concentração média (µg mL ⁻¹) | Redução (%) |
|---------------|-------------|---------|-------------------------------------|---|-------------|
| Padrão | ENR | 1897719 | 42,89 | | |
| Nº. 1 | 15 | 1405051 | 31,91 | 31,07 | 27,56 |
| Nº. 2 | | 1385540 | 31,48 | | |
| Nº. 3 | | 1311235 | 29,82 | | |
| Nº. 1 | 16 | 1590482 | 36,05 | 36,99 | 13,75 |
| Nº. 2 | | 1665778 | 37,72 | | |
| Nº. 3 | | 1642577 | 37,21 | | |
| Nº. 1 | 17 | 1685765 | 38,17 | 38,98 | 9,12 |
| Nº. 2 | | 1715800 | 38,84 | | |
| Nº. 3 | | 1764794 | 39,93 | | |

Quadro 40: Resultados dos cromatogramas da solução padrão e dos experimentos 18, 19 e 20.

| Amostra | Experimento | Área | Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Concentração média ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Redução (%) |
|---------------|-------------|---------|--|--|-------------|
| Padrão | ENR | 2228874 | 199,06 | | |
| Nº. 1 | 18 | 16522 | 3,53 | 3,25 | 98,37 |
| Nº. 2 | | 15759 | 3,47 | | |
| Nº. 3 | | 7653 | 2,75 | | |
| Nº. 1 | 19 | 1777711 | 159,18 | 156,03 | 21,61 |
| Nº. 2 | | 1695640 | 151,93 | | |
| Nº. 3 | | 1752798 | 156,98 | | |
| Nº. 1 | 20 | 2082257 | 186,10 | 186,10 | 6,51 |
| Nº. 2 | | 2084565 | 186,30 | | |
| Nº. 3 | | 2079944 | 185,90 | | |

Houve a identificação da enrofloxacinina por meio do pico característico em 3,7 minutos no cromatograma da solução padrão (Figura 47). Verificou-se a formação de compostos de degradação na solução tratada (Figura 48) com tempos de retenção diferentes da substância padrão, mas que absorvem no mesmo comprimento de onda (280 nm).

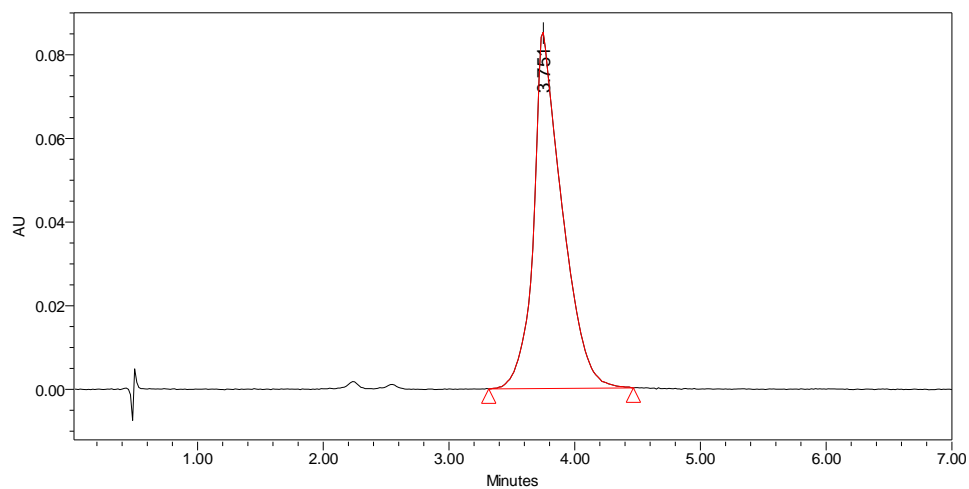


Figura 47: Cromatograma da solução padrão de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ de enrofloxacinina.

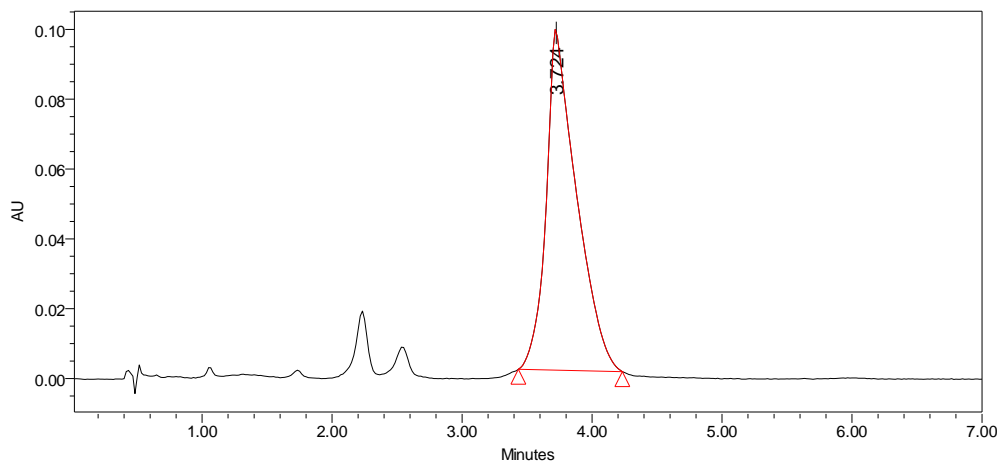


Figura 48: Cromatograma da solução de enrofloxacina após tratamento com CHT utilizada no Experimento 15 – Amostra 03.

As taxas de redução encontradas para a enrofloxacina são menores (Figura 49) quando são comparadas às taxas de abatimento dos outros antibióticos e do Experimento 18, e se devem à estabilidade térmica da enrofloxacina que se mostra bem resistente aos tratamentos térmicos. Isso é confirmado por Roca et al. (2010), que encontrou baixas taxas de decomposição de antibióticos ao tratar termicamente amostras de leite contendo quinolonas, incluindo a enrofloxacina. Segundo Roca et al. (2010), as amostras foram tratadas em temperaturas que variaram de 80°C a 120°C por até 180 minutos. As maiores taxas de decomposição encontradas por Roca et al. (2010), foram quando a temperatura foi de 120°C e o tempo foi de 20 minutos: ciprofloxacina (12,71%), norfloxacino (12,01%) e enrofloxacino (5,22%). Isso coincide com as taxas de redução registradas para a enrofloxacina, excluindo o experimento 18.

Quanto aos experimentos 18 e 19, o acréscimo de 20°C na temperatura de tratamento favoreceu maiores abatimentos da enrofloxacina (98,37% e 21,61%), quando comparamos aos experimentos 15 e 16 (27,56% e 13,75%), realizados sob os mesmos pH 3,00 e 4,00, respectivamente. O aumento na temperatura também favoreceu uma maior decomposição nos ensaios conduzidos por Roca et al. (2010). Wu et al (2006) obtiveram taxas de hidrólise da enrofloxacina menores que 10% sob condições de temperatura de 50°C, faixa de pH 1-10 e por um período de 5 dias. Wu et al. (2006) relataram não haver relação significativa entre o pH e a taxa de hidrólise da enrofloxacina. Porém, verificamos neste estudo que a taxa de decomposição da enrofloxacina tende a diminuir com o aumento do pH, sob mesma temperatura (180°C).

Isso é verificado nos experimentos 15, 16, 17 e 20 que foram realizados sob pH 3,00, 4,00, 5,00 e 7,00, os quais resultaram em taxas de redução de 27,56%, 13,75%, 9,12% e 6,51%, respectivamente.

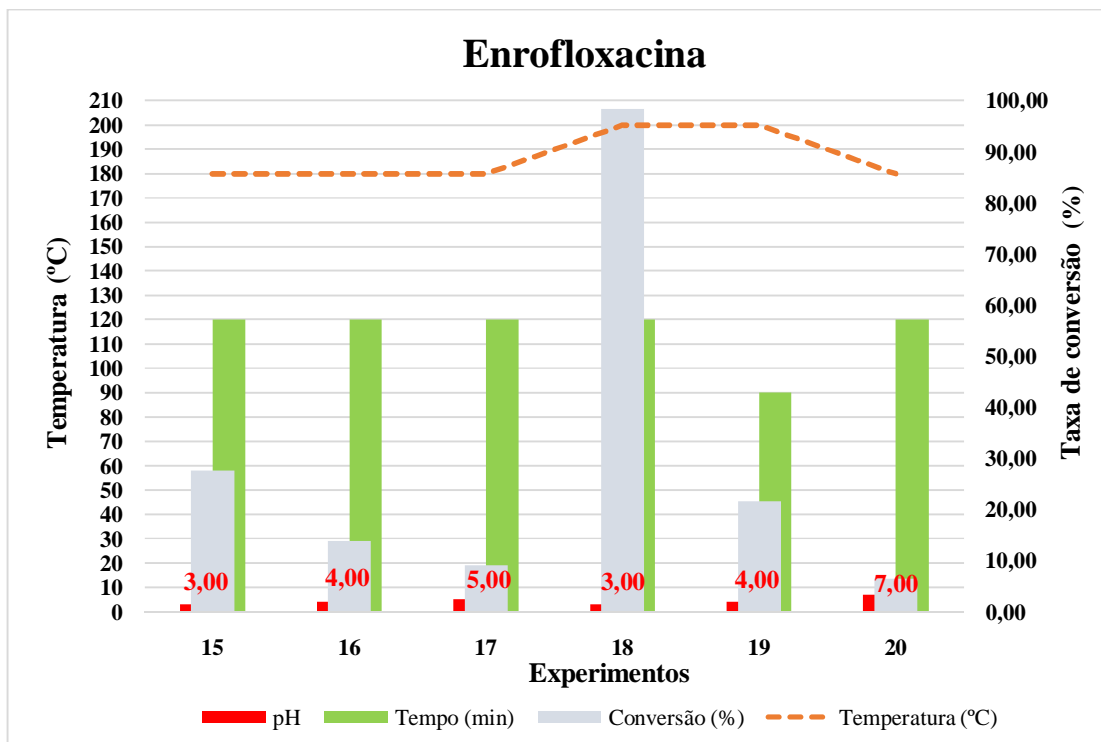


Figura 49: Condições dos experimentos com CHT e taxa de conversão da enrofloxacina.

Dias (2013) encontrou também baixas taxas de decomposição da enrofloxacina ao conduzir um ensaio de hidrólise deste antibiótico em duas concentrações (25 mg L^{-1} e 50 mg L^{-1}) em diferentes valores de pH (3, 5, 7 e 9) durante um período de 24 horas sob agitação (100 rpm). A maior taxa de decomposição encontrada foi de 5,2% em pH 9 e por 24 horas de tratamento a partir da solução 25 mg L^{-1} . Dias (2013) concluiu que tanto em meio ácido (pH 3), neutro (pH 7) ou alcalino (pH 9) e independentemente da concentração, a solução apresentou estabilidade, não ocorrendo a hidrólise no tempo considerado. Mesmo que a taxa decomposição encontrada em meio alcalino (5,2%) seja maior do que as maiores taxas registrada em meio ácido (5,0%) e neutro (3,4%). Em relação a degradação no meio ambiente, o fato de a Enrofloxacina ser resistente a hidrólise está de acordo com Sarmah, Meyer e Boxall (2006) e Boxall et al. (2002), que

relatam a que meia vida da Enrofloxacina é maior que 30 dias e ressaltam a sua persistência após ser lançada no meio aquático e no solo.

6.3.3 Ampicilina

O método utilizado para detecção da ampicilina foi desenvolvido por Cione, Libérale e Silva (2010). A curva de calibração (Figura 50) foi construída a partir das seguintes concentrações da solução-padrão: 1,48, 2,96, 7,40, 14,80, 29,60, 44,40 e 74,00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

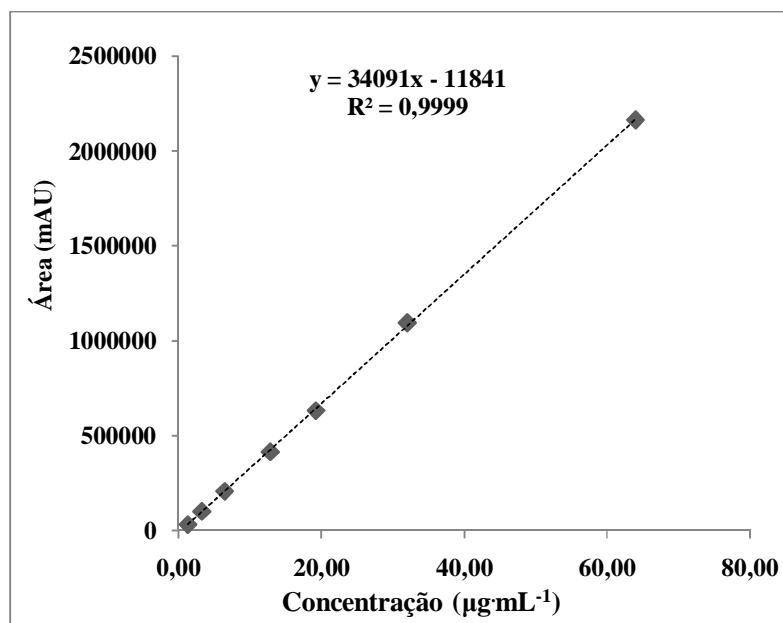


Figura 50: Curva analítica das soluções-padrão de ampicilina.

As análises de HPLC das amostras de ampicilina tratadas demonstraram que houve abatimento acima de 60% (experimentos 22 e 24), 70% (experimento 23), 80% (experimento 21) e 90% (experimento 25) do antibiótico a partir da solução inicial (Quadros 41 e 42).

Quadro 41: Resultados dos cromatogramas da solução padrão de ampicilina e dos experimentos 21, 22 e 23.

| Amostra | Experimento | Área | Concentração ($\mu\text{g ml}^{-1}$) | Concentração média ($\mu\text{g ml}^{-1}$) | Redução (%) |
|---------------|-------------|---------|--|--|-------------|
| Padrão | AMP | 1327720 | 41,39 | | |
| Nº. 1 | 21 | 176292 | 5,55 | 5,77 | 86,07 |
| Nº. 2 | | 159273 | 5,02 | | |
| Nº. 3 | | 213815 | 6,72 | | |
| Nº. 1 | 22 | 430917 | 13,48 | 13,91 | 66,40 |
| Nº. 2 | | 453846 | 14,19 | | |
| Nº. 3 | | 449494 | 14,06 | | |
| Nº. 1 | 23 | 352694 | 11,04 | 10,91 | 73,64 |
| Nº. 2 | | 349937 | 10,96 | | |
| Nº. 3 | | 342733 | 10,73 | | |

Quadro 42: Resultados dos cromatogramas da solução padrão de ampicilina e dos experimentos 24 e 25.

| Amostra | Experimento | Área | Concentração ($\mu\text{g ml}^{-1}$) | Concentração média ($\mu\text{g ml}^{-1}$) | Redução (%) |
|---------------|-------------|---------|--|--|-------------|
| Padrão | AMP | 1247094 | 61,78 | | |
| Nº. 1 | 24 | 393786 | 19,71 | 19,63 | 68,23 |
| Nº. 2 | | 386927 | 19,38 | | |
| Nº. 3 | | 395226 | 19,79 | | |
| Nº. 1 | 25 | 61268 | 3,32 | 3,18 | 94,86 |
| Nº. 2 | | 52322 | 2,88 | | |
| Nº. 3 | | 61359 | 3,33 | | |

Houve a identificação do pico característico da ampicilina no tempo de retenção de 2,1 minutos no cromatograma da solução padrão (Figura 51). Também houve a formação de compostos de degradação com tempos de retenção diferentes da substância padrão mas, que absorvem luz no mesmo comprimento de onda (215 nm). Isso pode ser verificado no cromatograma da solução tratada de ampicilina (Figura 52). Houve a identificação do pico característico da ampicilina no tempo de retenção de 2,08 minutos na leitura da amostra 02 do experimento 21.

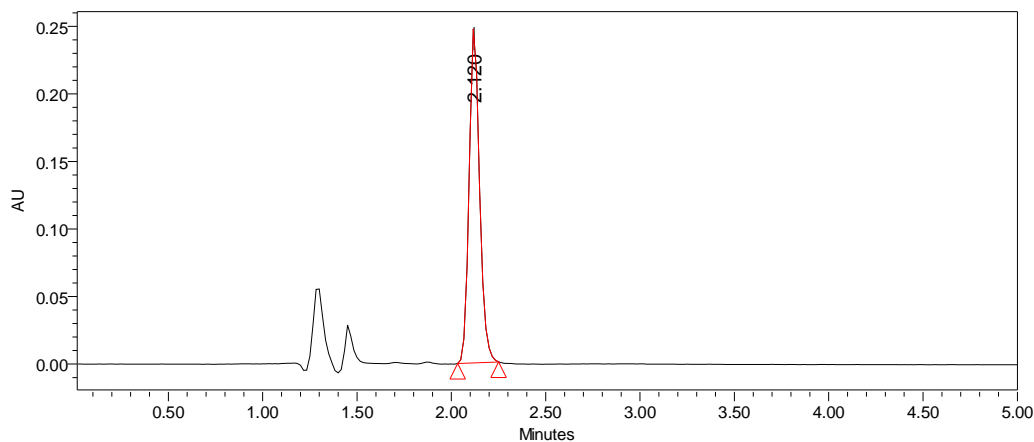


Figura 51: Cromatograma da solução padrão de $29,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina.

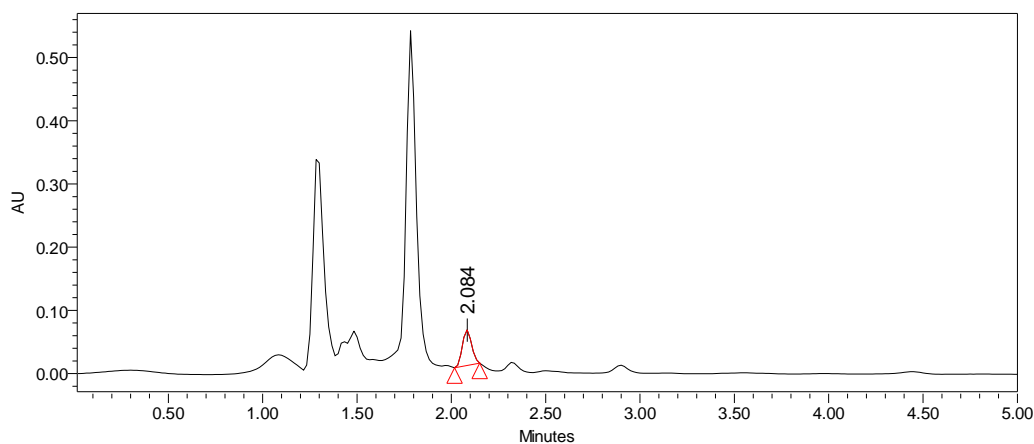


Figura 52: Cromatograma da solução de ampicilina após tratamento com CHT utilizada no experimento 21 – amostra 02.

A ampicilina é uma aminopenicilina e tal como outras penicilinas, tem sua estabilidade dependente do pH e da temperatura. Mitchell et al (2014) demonstraram que um acréscimo de 10°C na temperatura promove um acréscimo de 2,5 vezes na taxa de hidrólise da ampicilina sob condições de pH na faixa de 4-9 e sob temperaturas de 25°C a 60°C . Isso é verificado na taxa de abatimento do experimento 25 (Figura 53), no qual mesmo com tempo de reação menor (90 minutos), houve a redução de 94,86% do antibiótico devido ao acréscimo de 20°C . Quando comparamos a taxa de redução do experimento 22 (66,40%) com tempo reacional de 120 minutos e mesmo pH (4,0), porém com temperatura menor (180°C), verifica-se que o aumento na temperatura promoveu uma maior taxa de redução. Sob mesmo tempo reacional (120 minutos) e

temperatura (180°C), o aumento no pH favoreceu a decomposição da ampicilina, quando comparamos as taxas de abatimento dos experimentos 22 (66,40%) e 23 (73,64%). Isso corrobora a relação entre o pH e a taxa de hidrólise demonstrada na pesquisa de Mitchell et al (2014), onde o aumento no pH propiciou o acréscimo da taxa de hidrólise da ampicilina. A decomposição da ampicilina é devido à clivagem do anel β -lactâmico em meio ácido e sob temperaturas mais elevadas, com a consequente formação de compostos de degradação. Segundo Hou e Poule (1969), são formados os ácidos α -aminobenzilpenicilóico e α -aminobenzilpenamáldico na decomposição da ampicilina sob condições fortemente ácidas.

A taxa de abatimento do experimento 21 (86,07%) realizado sob pH 3 mostrou que a ampicilina foi mais instável em pH abaixo de 4, quando comparamos com a faixa de pH de 3-5 sob mesma temperatura (180°C). Isso concorda com as conclusões de um estudo de estabilidade da Penicilina G realizado por Kheirolomoom et al. (2014): A penicilina G é mais instável em pH abaixo de 4 e acima de 8 e também em altas temperaturas, considerando a faixa de temperatura (0-52°C) e os valores de pH (1,8-10) utilizados no experimento.

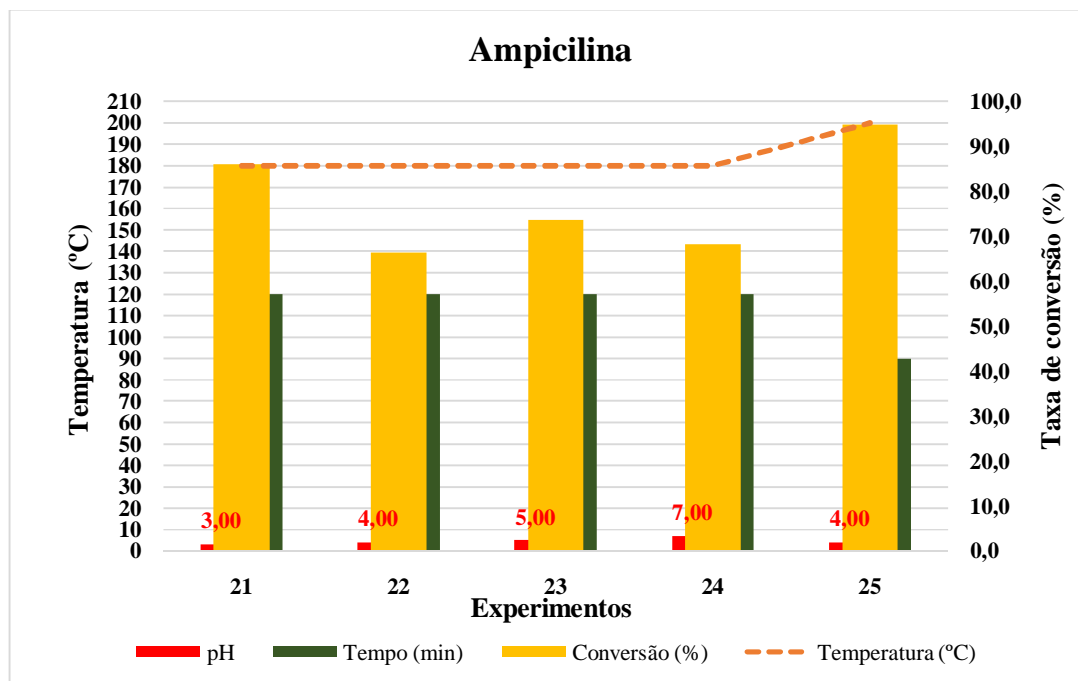


Figura 53: Condições dos experimentos com CHT e taxa de conversão da ampicilina.

6.3.4 Sulfaquinoxalina

O método utilizado para detecção da sulfaquinoxalina foi desenvolvido por Doretto, Peruchi e Rath (2014). A curva de calibração (Figura 54) foi contruída a partir das seguintes concentrações da solução-padrão: 2,00, 5,00, 10,00, 20,00, 30,00, 50,00, 70,00 e 100,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

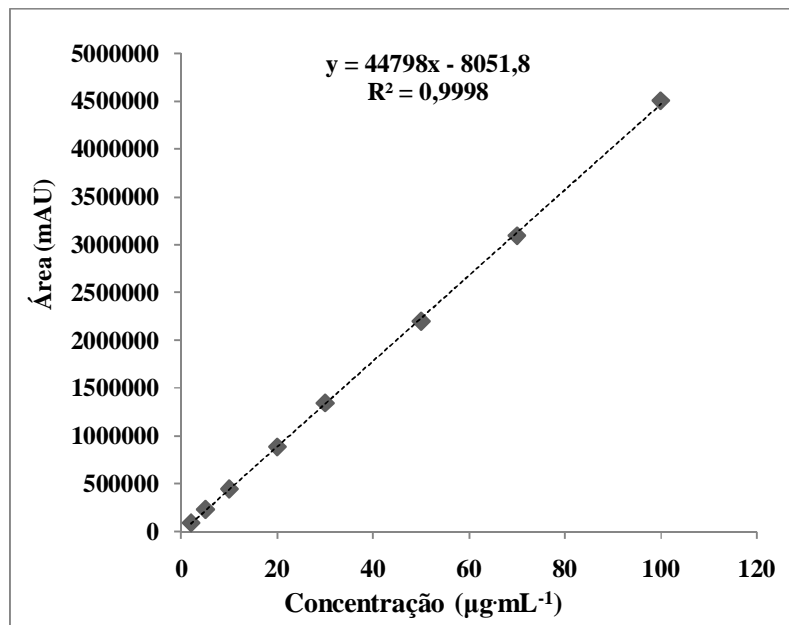


Figura 54: Curva analítica das soluções-padrão de sulfaquinoxalina.

As análises de HPLC das amostras tratadas de sulfaquinoxalina demonstraram que houve redução acima de 70% em todos os experimentos, exceto nos experimentos 26 e 29, nos quais houve redução de 15,91% e 12,21%, respectivamente, a partir da concentração inicial (Quadros 43 e 44).

Quadro 43: Resultados dos cromatogramas da solução padrão de sulfaquinoxalina e dos experimentos 26, 27 e 28.

| Amostra | Experimento | Área | Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Concentração média ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Redução (%) |
|---------------|-------------|---------|--|--|-------------|
| Padrão | SQX | 1467617 | 32,94 | | |
| Nº. 1 | | 1225242 | 27,53 | | |
| Nº. 2 | 26 | 1237188 | 27,80 | 27,70 | 15,91 |
| Nº. 3 | | 1236020 | 27,77 | | |
| Nº. 1 | | 181391 | 4,23 | | |
| Nº. 2 | 27 | 176510 | 4,12 | 4,20 | 87,26 |
| Nº. 3 | | 181806 | 4,24 | | |
| Nº. 1 | | 63567 | 1,60 | | |
| Nº. 2 | 28 | 54124 | 1,39 | 1,41 | 95,71 |
| Nº. 3 | | 48004 | 1,24 | | |

Quadro 44: Resultados dos cromatogramas da solução padrão de sulfaquinoxalina e do experimento 29.

| Amostra | Experimento | Área | Concentração (μgml^{-1}) | Concentração média (μgml^{-1}) | Redução (%) |
|---------|-------------|--------|---------------------------------------|---|-------------|
| Padrão | SQX | 495244 | 86,65 | | |
| Nº. 1 | 29 | 442269 | 77,29 | 76,07 | 12,21 |
| Nº. 2 | | 449212 | 78,52 | | |
| Nº. 3 | | 414464 | 72,38 | | |
| Nº. 1 | 30 | 127815 | 21,78 | 22,42 | 74,12 |
| Nº. 2 | | 137548 | 23,50 | | |
| Nº. 3 | | 129041 | 22,00 | | |

Foi identificado o pico característico da sulfaquinoxalina no tempo de retenção de 2,3 minutos no cromatograma da solução padrão (Figura 55). Houve também a formação de outros compostos de degradação com tempos de retenção diferentes. Isso é verificado no cromatograma da amostra tratada 02 do Experimento 28 (Figura 56), onde picos correspondentes aos outros compostos que absorvem no mesmo comprimento de onda (248 nm) são separados nos tempos de retenção entre 1,0 e 2,0 minutos.

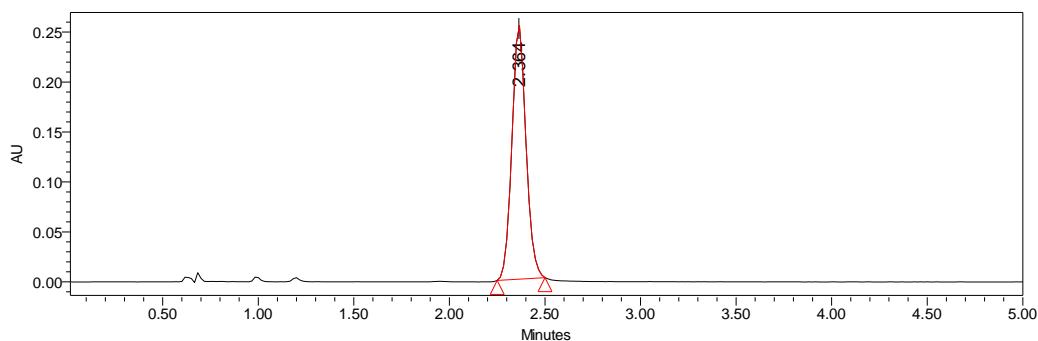


Figura 55: Cromatograma da solução padrão de $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de sulfaquinoxalina.

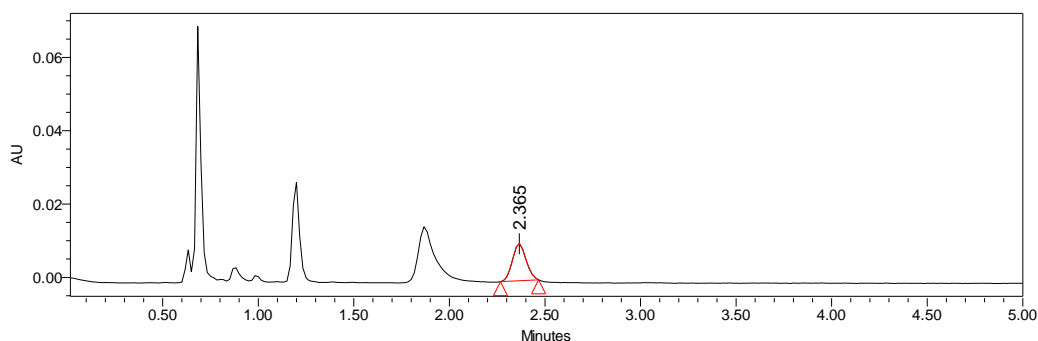


Figura 56: Cromatograma da solução de sulfaquinoxalina após tratamento com CHT utilizada no experimento 28 – amostra 02.

As taxas de decomposição hidrotermal encontradas e as condições de realização dos ensaios (Figura 57) permitem que seja notada uma maior taxa de redução sob pH ácido na faixa de pH 4-5 (74,12%, 87,26% e 95,71%), quando comparamos a redução verificada no ensaio 29 (12,21%) realizado sob pH neutro (pH 7). Ghanem, Abu-Lafi e Mohammad (2014) relataram uma taxa de decomposição de 9% ao tratarem em um forno sob 105°C por 72 horas uma amostra de 25 mg de sulfaquinoxalina, que posteriormente foi dissolvida em metanol e fase móvel, obtendo a concentração final de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Ghanem, Abu-Lafi e Mohammad (2014) também descreveram taxas de decomposição de 4,4 e 3,7%, respectivamente, correspondendo a hidrólise ácida (HCl 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e a hidrólise básica (NaOH 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) de alíquotas de 100 mL da solução estoque com mesma concentração de Sulfaquinoxalina (25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) após 60 minutos de reação.

Verifica-se, deste modo, que a decomposição da sulfaquinoxalina é favorecida pelo pH ácido e pelo aumento da temperatura. Isso concorda com as taxas de abatimento dos experimentos 27 e 28, onde a faixa de pH 4-5 promoveu as maiores taxas de remoção da sulfaquinoxalina (87,26% e 95,71%) sob temperatura de 180°C. Porém, quando a temperatura decresce 10°C (170°C), no experimento 30, mesmo com pH 5 apresentou taxa de redução menor (74,12%) quando comparamos a taxa de redução de sulfaquinoxalina apresentada no experimento 28 (95,71%) realizado sob mesmo pH 5, porém realizado a 180°C. O pH 3 pareceu não favorecer a decomposição do antibiótico, degradando somente 15,91% em relação a concentração inicial. Todos os experimentos foram realizados com tempo de 120 minutos.

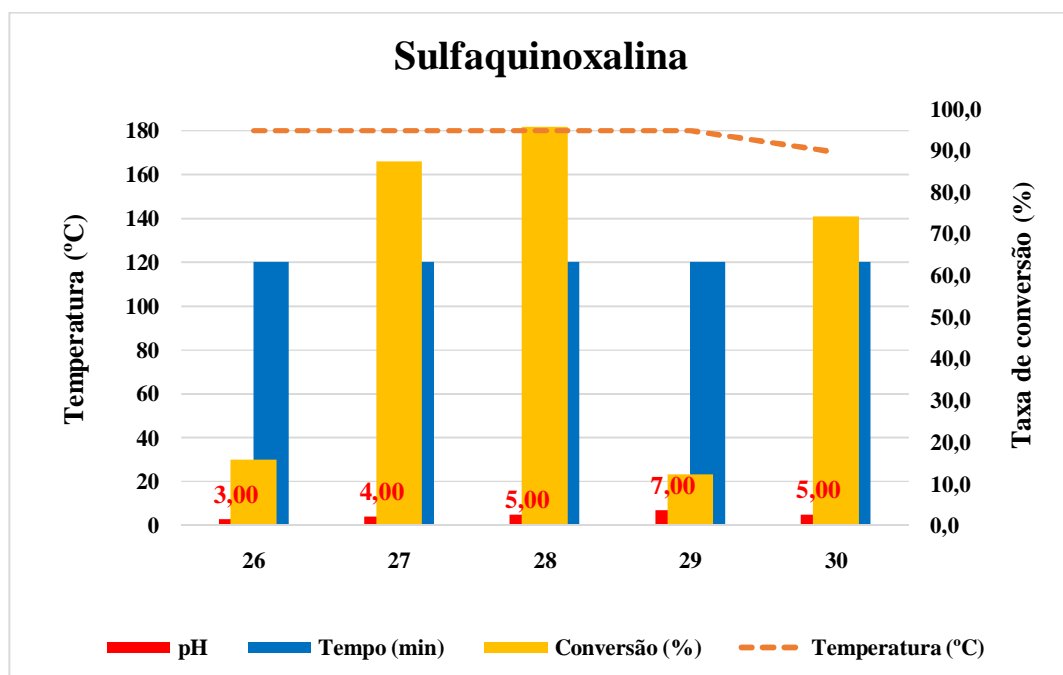


Figura 57: Condições dos experimentos com CHT e taxas de conversão da sulfaquinoxalina.

De acordo com Fink, Martin e Blodinger (1978), mesmo que a maior parte das sulfonamidas seja muito estável, pode sofrer degradação por hidrólise catalisada por ácido da ligação enxofre-azoto ou da ligação azoto-carbono. A hidrólise da sulfaquinoxalina, segundo Fink, Martin e Blodinger (1978), produz como compostos resultantes o ácido sulfanílico e a sulfanilamida.

6.3.5 Tilosina

O método utilizado para detecção da tilosina foi o proposto por Prats et al. (2001). A curva analítica das soluções-padrão de tilosina é apresentada na Figura 58. Foram utilizadas as seguintes concentrações da solução-padrão: 1,20, 3,60, 6,00, 12,00, 24,00, 36,00 e 60,00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

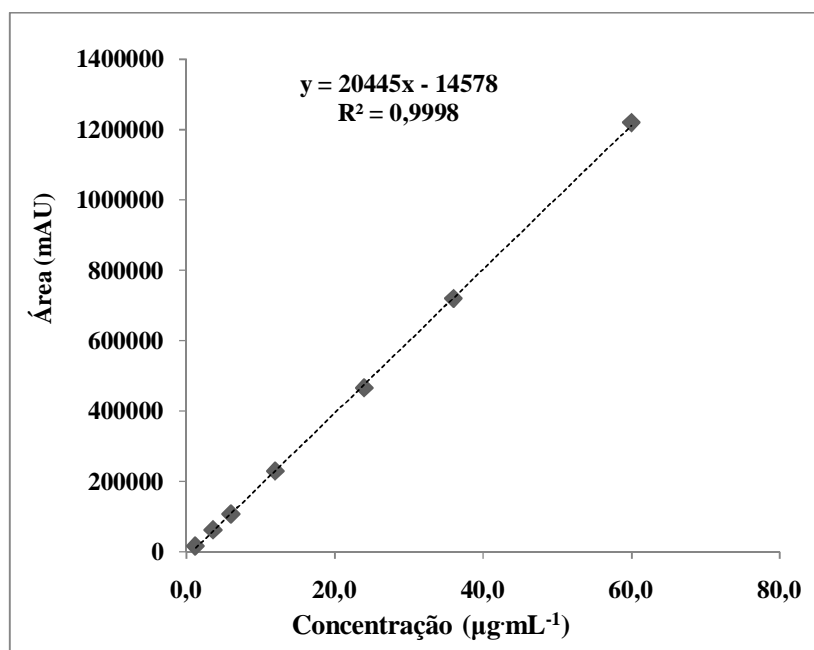


Figura 58: Curva analítica das soluções-padrão de tilosina.

As análises de HPLC das amostras tratadas de tilosina demonstraram que houve abatimento total do antibiótico (100%) em todos os experimentos realizados em meio ácido (pH 3-5). O experimento 33 realizado em meio neutro (pH 7) resultou em uma taxa de remoção de 59,55% a partir da concentração inicial (Quadros 45 e 46).

Quadro 45: Resultados dos cromatogramas da solução padrão de tilosina e dos experimentos 30, 32 e 32.

| Amostra | Experimento | Área | Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Concentração média ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Redução (%) |
|---------------|-------------|---------|--|--|-------------|
| Padrão | TIL | 1319744 | 65,26 | | |
| Nº. 1 | | 0 | 0,00 | | |
| Nº. 2 | 30 | 0 | 0,00 | 0,00 | 100,00 |
| Nº. 3 | | 0 | 0,00 | | |
| Nº. 1 | | 0 | 0,00 | | |
| Nº. 2 | 31 | 0 | 0,00 | 0,00 | 100,00 |
| Nº. 3 | | 0 | 0,00 | | |
| Nº. 1 | | 0 | 0,00 | | |
| Nº. 2 | 32 | 0 | 0,00 | 0,00 | 100,00 |
| Nº. 3 | | 0 | 0,00 | | |

Quadro 46: Resultados dos cromatogramas da solução padrão de tilosina e dos experimentos 33, 34 e 35.

| Amostra | Experimento | Área | Concentração (μgml^{-1}) | Concentração média (μgml^{-1}) | Redução (%) |
|---------------|-------------|---------|---------------------------------------|---|-------------|
| Padrão | TIL | 1565193 | 50,20 | | |
| Nº. 1 | | 600085 | 19,76 | | |
| Nº. 2 | 33 | 630249 | 20,71 | 20,31 | 59,55 |
| Nº. 3 | | 622055 | 20,45 | | |
| Nº. 1 | | 0 | 0,00 | | |
| Nº. 2 | 34 | 0 | 0,00 | 0,00 | 100,00 |
| Nº. 3 | | 0 | 0,00 | | |
| Nº. 1 | | 0 | 0,00 | | |
| Nº. 2 | 35 | 0 | 0,00 | 0,00 | 100,00 |
| Nº. 3 | | 0 | 0,00 | | |

Foi identificado o pico característico da tilosina no tempo de retenção de 7,2 minutos no cromatograma da solução padrão (Figura 59). Houve também a formação de outros compostos de degradação com tempos de retenção diferentes. Isso pode ser verificado nos cromatogramas da amostra tratada 03 do experimento 31 (Figura 60), onde um pico correspondente ao outro composto que absorve no mesmo comprimento de onda (280 nm) foi separado nos tempos de retenção de 3,8 minutos. Porém, não foi identificado nos cromatogramas dos experimentos Nº 30, 31, 32, 34 e 35 o pico correspondente a tilosina no tempo de retenção de 7,2 minutos, evidenciando o abatimento total da tilosina.

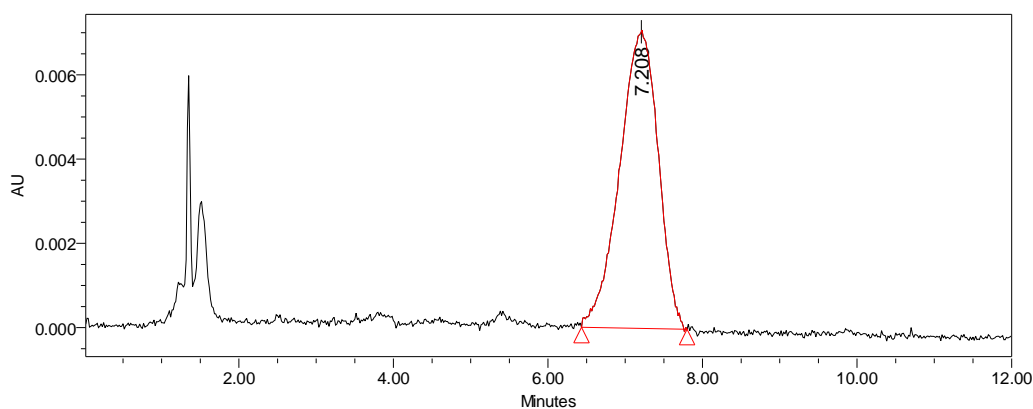


Figura 59: Cromatograma da solução padrão de $12 \mu\text{g mL}^{-1}$ de tilosina.

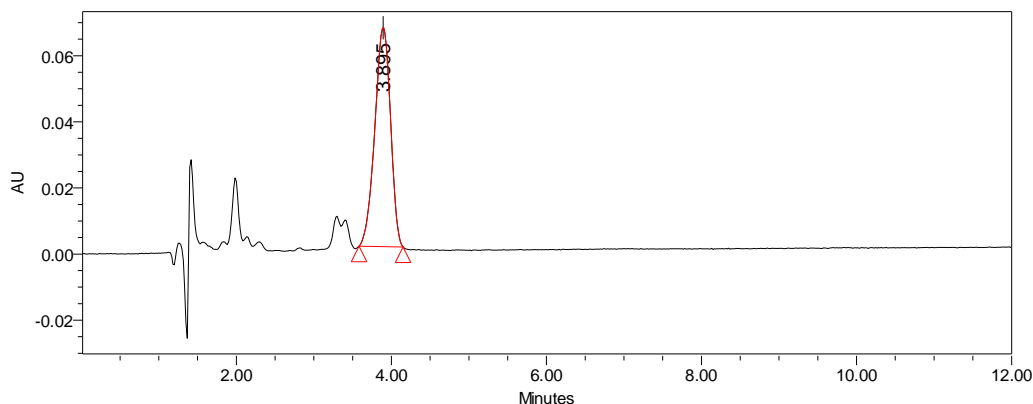


Figura 60: Cromatograma da solução de tilosina após tratamento com CHT utilizada no experimento 31 – amostra 03.

As taxas de decomposição encontradas e as condições de realização dos ensaios N° 30, 31, 32, 34 e 35 (Figura 61) permite notar que sob as condições ácidas utilizadas (pH 3-5) e temperatura de 180°C em 120 minutos de tratamento, há total abatimento da tilosina (100%). Isso evidencia a instabilidade da tilosina sob condições ácidas, conforme evidenciou Kochansky (2004). Segundo Kochansky (2004), a tilosina A sofre hidrólise em acidez média (pH < 4), sendo convertida em desmicosina: a micarose (molécula de açúcar que está ligada na extremidade direita da molécula da tilosina) é removida e substituída por um átomo de hidrogênio (Figura 62).

Em condições neutras (pH 7), a taxa de redução foi menor (59,55%) no experimento 33, comparando aos outros experimentos onde houve o abatimento total da tilosina (100%) (Figura 61). Isso evidencia que a tilosina em pH neutro é mais estável do que em pH ácido.

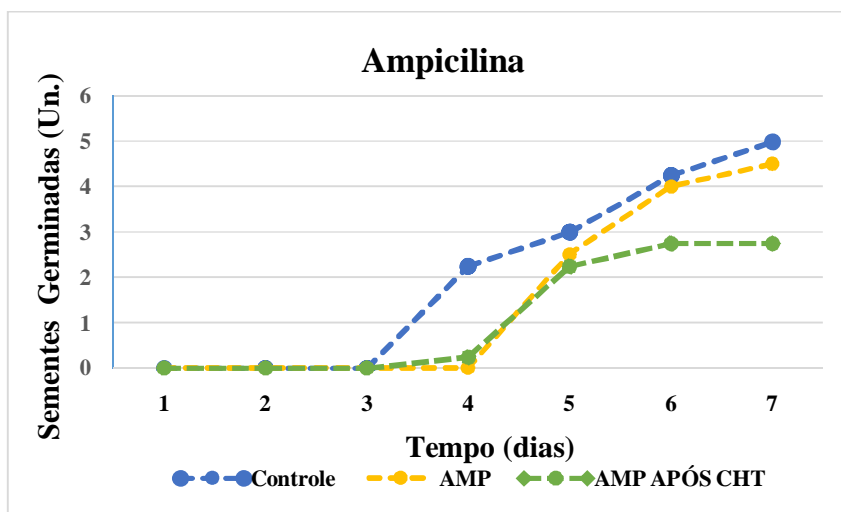
6.4 ENSAIO DE TOXICIDADE COM *ALLIUM CEPA*

O objetivo do ensaio com *Allium cepa* foi verificar se os produtos formados pelo processo de carbonização hidrotermal das soluções com os antibióticos são mais tóxicos que os compostos nas soluções sem tratamento.

6.4.1 *Allium cepa*

No teste de germinação com *Allium cepa*, as sementes foram colocadas à prova frente aos possíveis agentes tóxicos, determinando quantas sementes, em dez, em quadruplicata, germinaram por dia quando expostas a estes agentes.

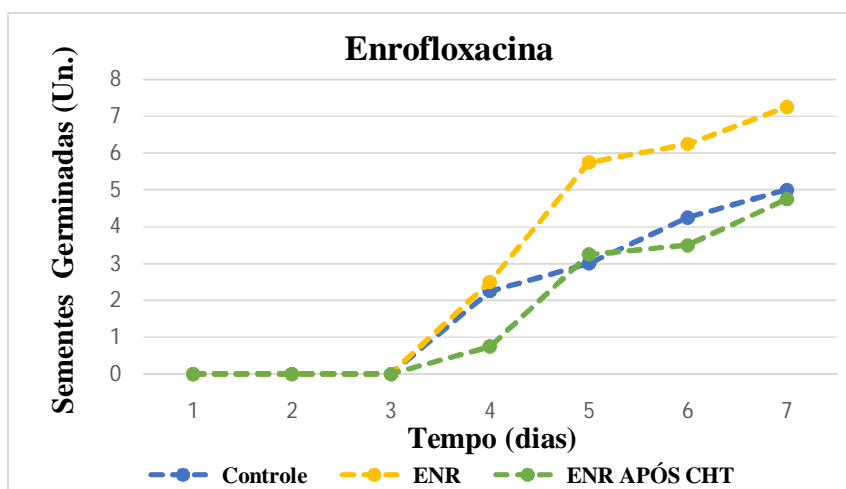
Foi observado que a taxa de germinação média das sementes do Grupo Controle (50%) após os sete dias ficou abaixo da fornecida pelo fabricante (85%). Considerando que a taxa de germinação das sementes de *Allium cepa* do Grupo Controle corresponda a taxa máxima de germinação, podemos observar que o antibiótico ampicilina (AMP) antes do tratamento com carbonização hidrotermal não interferiu no processo de germinação (Figura 63). Isto porque temos taxas de crescimento muito similares ao do Grupo Controle. No entanto, a solução com antibiótico ampicilina após o tratamento interferiu quantitativamente no processo de germinação, caracterizando ser potencialmente tóxica para as sementes de *Allium cepa*. Os produtos de degradação gerados podem apresentar potencial fitotóxico.



AMP: ampicilina, CHT: carbonização hidrotermal.

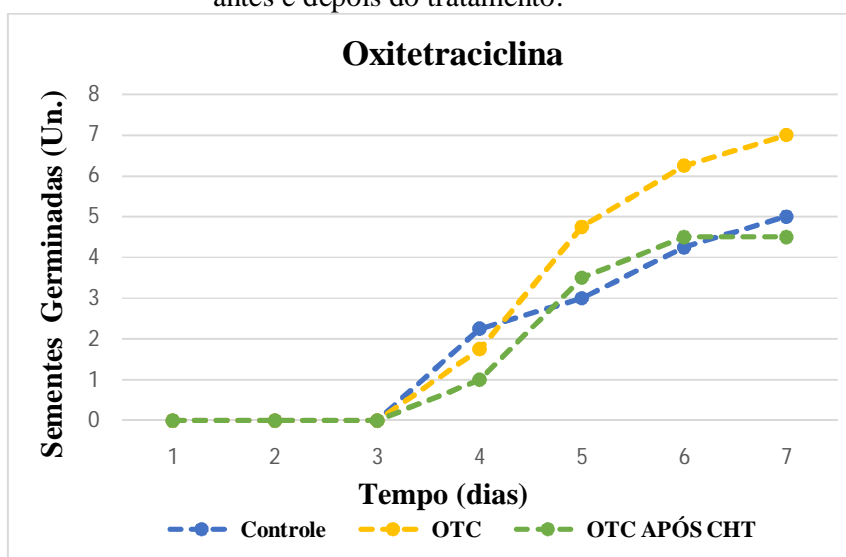
Figura 63: Germinação das sementes de *Allium cepa* em amostras de ampicilina antes e depois do tratamento.

No entanto, para os outros antibióticos enrofloxacina, oxitetraciclina, sulfaquinoxalina e tilosina, as soluções dos fármacos *in natura*, não tratadas, estimularam o processo de germinação das sementes em taxas superiores ao do Grupo Controle. Porém, as soluções dos antimicrobianos enrofloxacina, oxitetraciclina, sulfaquinoxalina e tilosina após tratamento apresentaram taxas de crescimento das sementes similares aos encontrados no Grupo Controle, isso pode ser observado, respectivamente, nas Figuras 64, 65, 66 e 67.



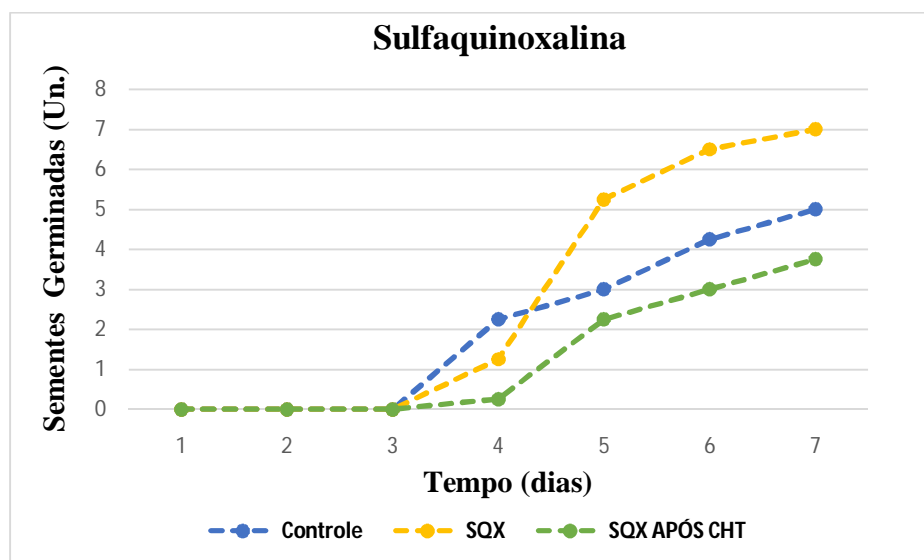
CHT: carbonização hidrotermal, ENR: enrofloxacina.

Figura 64: Germinação das sementes de *Allium cepa* em amostras de enrofloxacina antes e depois do tratamento.



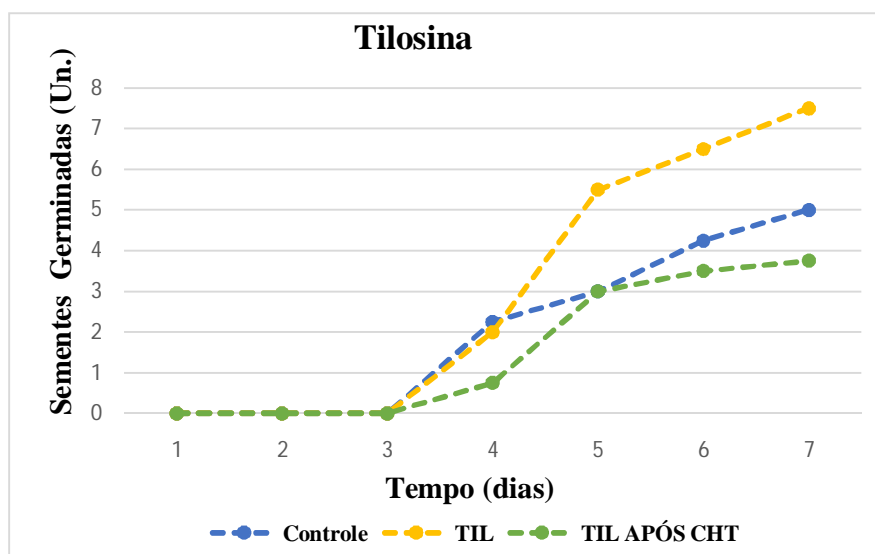
CHT: carbonização hidrotermal, OTC: oxitetraciclina.

Figura 65: Germinação das sementes de *Allium cepa* em amostras de oxitetraciclina antes e depois do tratamento.



CHT: carbonização hidrotermal, SQX: sulfaquinoxalina.

Figura 66: Germinação das sementes de *Allium cepa* em amostras de sulfaquinoxalina antes e depois do tratamento.



CHT: carbonização hidrotermal, TIL: tilosina.

Figura 67: Germinação das sementes de *Allium cepa* em amostras de tilosina antes e depois do tratamento com CHT.

Quando é observado o crescimento médio dos brotos (Figura 68), verifica-se que todas as soluções com os antibióticos sem o tratamento parecem favorecer o processo de germinação, devido ter a germinação média acima do Grupo Controle. Não caracterizando serem tóxicas para as sementes de *Allium cepa*. Isso também pode ser observado nas soluções tratadas dos antibióticos oxitetraciclina, sulfaquinoxalina e

tilosina que tiveram crescimento médio acima do encontrado para o Grupo Controle. Porém, as soluções tratadas dos antimicrobianos enrofloxacina e ampicilina parecem inibir o processo de germinação, resultando em crescimento médio dos brotos abaixo do registrado para o Grupo Controle. Isso pode evidenciar um potencial tóxico para as sementes *Allium cepa*.

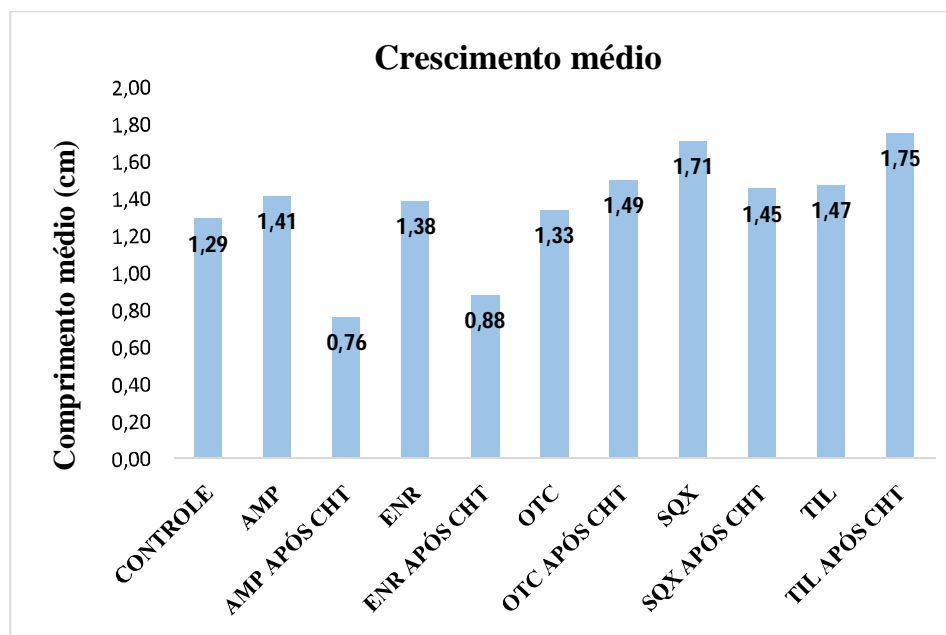


Figura 68: Crescimento médios dos brotos a partir de sementes de *Allium cepa*.

Foi observado que as sementes germinadas em contato com as amostras dos antibióticos tratados com o reator de CHT apresentam vigor do broto inferior ao do Grupo Controle (Figura 69).

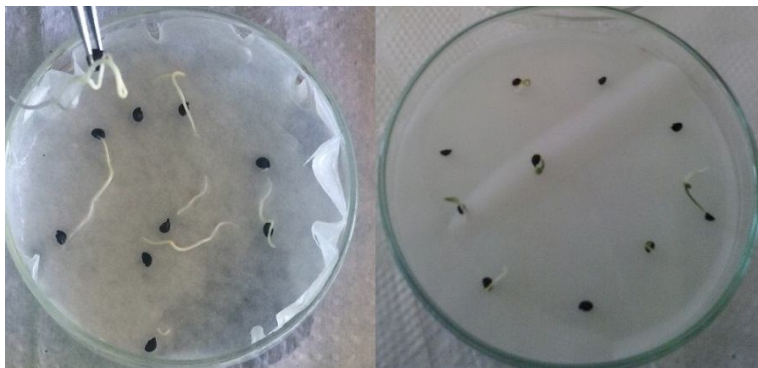


Figura 69: Placas de Petri contendo as sementes de *Allium cepa* após germinação com a solução de enrofloxacina antes e depois do tratamento com CHT (Grupo antes do tratamento à esquerda e Grupo após tratamento à direita).

7 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Em virtude dos resultados obtidos da parte experimental e das discussões, considera-se que o processo de carbonização hidrotermal apresenta grande potencial no tratamento dos antibióticos ampicilina, enrofloxacina, oxitetraciclina, sulfaquinoxalina e tilosina.

Outras considerações a seguir:

- As condições mais favoráveis de decomposição da oxitetraciclina, levando-se em conta maior taxa de redução (100%), menor gasto energético e tempo, foi aquela onde foi utilizado tempo de reação de 90 minutos, pH 3, temperatura de 170°C e ácido fosfórico como catalisador;
- As melhores condições de decomposição da enrofloxacina, observando a maior taxa de redução (98,37%), foram aquelas onde foram utilizados tempo reacional de 120 minutos, pH 3, temperatura de 200°C e ácido fosfórico como catalisador;
- A maior taxa de decomposição da ampicilina (94,86%) foi observada quando se utilizou tempo de reação de 120 minutos, pH 4, temperatura de 200°C e ácido fosfórico como catalisador;
- As condições mais adequadas para a decomposição da sulfaquinoxalina, levando-se em conta a maior taxa de decomposição (95,71%) foi observada quando utilizou-se tempo reacional de 120 minutos, pH 5, temperatura de 180°C e ácido fosfórico como catalisador;
- Todas as condições, exceto o pH 7, levaram a decomposição total da tilosina (100%) das amostras. Contudo, observando menor consumo energético, menor gasto de catalisador (pH mais próximo da neutralidade) e menor tempo, a melhor condição para a redução da tilosina foi aquela onde se utilizou tempo de reação de 90 minutos, pH 4, temperatura de 180°C e ácido fosfórico como catalisador;
- O ácido fosfórico apresentou melhor desempenho no processo de carbonização hidrotermal, quando observados os aspectos de odor, maior taxa de decomposição e menor tempo de reação (oxitetraciclina);
- Não foi possível nesta pesquisa identificar os produtos gerados com a carbonização hidrotermal dos antibióticos.

Para complementação dos resultados e continuidade da pesquisa, recomenda-se:

- Analisar as amostras tratadas pelo processo de carbonização hidrotermal por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com o intuito de determinar quantitativamente os compostos gerados dos antibióticos ampicilina, enrofloxacin, oxitetraciclina, sulfaquinoxalina e tilosina;
- Desenvolver um sistema para medir a temperatura interna do reator de CHT durante os ensaios;
- Analisar os gases formados durante o processo de carbonização hidrotermal dos antibióticos;
- Realizar um ensaio com delineamento experimental fracionado para identificar as melhor condições do reator de CHT;
- Realizar os ensaios com o reator de CHT em efluente da indústria farmacêutica produtora dos antibióticos estudados;
- Realizar testes de toxicidade com outros organismos-teste, como por exemplo: *zebrafish*.

8. REFERÊNCIAS

AKIYA, Naoko; SAVAGE, Phillip E. **Roles of water for chemical reactions in high-temperature water.** Chemical Reviews, v. 102, n. 8, p. 2725-2750, 2002.

ALVIM, L. B.; KUMMROW, F.; BEIJO, L. A.; LIMA, C. A. D. A.; BARBOSA, S. **Avaliação da citogenotoxicidade de efluentes têxteis utilizando *Allium cepa* L.** Revista Ambiente e Água, v. 6, n. 2, 2011.

AMARAL, A. D. M.; VOLTOLINI, J. C.; BARROS, L.; BARBÉRIO, A. **Avaliação preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade, da água da bacia do rio Tapanhon (SP-Brasil) através do teste *Allium* (*Allium cepa*).** Rev. bras. toxicol, v. 20, n. 1/2, p. 65-72, 2007.

ANDRADE, Carolina Horta; TROSSINI, Gustavo Henrique Goulart; FERREIRA, Elizabeth Igne. **Modelagem molecular no ensino de química farmacêutica.** Revista Eletrônica de Farmácia, v. 7, n. 1, p. 23, 2010.

ANDRADE, Fernando F. M. **O criador de bicudos e curios.** São Paulo: Nobel Editora, 2004.

ANDREOZZI, R.; CANTERINO, M.; MAROTTA, R.; PAXEUS, N. **Antibiotic removal from wastewaters: the ozonation of amoxicillin.** Journal of hazardous Materials, v. 122, n. 3, p. 243-250, 2005.

ATTWOOD, D.; FLORENCE, Alexander Taylor; ROTHSCILD, Zuleika. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia Vol. 4.** EdUSP, 2003.

AURELIANO, A. K. P.; SILVA, D. P.; CUNHA, C. O. **Degradação do antibiótico tetraciclina por processos oxidativos avançados.** 52º Congresso Brasileiro de Química. Recife - Pernambuco, 2012.

AUTO, Hélvio Farias; CONSTANT, André Beltrão Lessa; CONSTANT, José Maria Cavalcanti. **Antibióticos e Quimioterápicos.** 5ª Ed., Edufal, Maceió, 2008.

BAKARE, A. A.; OKUNOLA, A. A.; ADETUNJI, O. A.; JENMI, H. B. **Genotoxicity assessment of a pharmaceutical effluent using four bioassays.** Genetics and molecular biology, v. 32, n. 2, p. 373-381, 2009.

BALCIOĞLU, Işıl Akmeahmet; ÖTKER, Merih. **Treatment of pharmaceutical wastewater containing antibiotics by O₃ and O₃/H₂O₂ processes.** Chemosphere, v. 50, n. 1, p. 85-95, 2003.

BARREIRO, Eliezer J. ; FRAGA, Carlos Alberto Manssour. **Química medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos.** 2ª edição. Artmed, Porto Alegre, p. 109, 2008

BARROS, E.; BITTENCOURT, H.; CARMORI, M. L.; MACHADO, A. **Antimicrobianos Consulta Rápida**. 2ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas, p. 110-117, 1996.

BATT, Angela L.; KIM, Sungpyo; AGA, Diana S. **Comparison of the occurrence of antibiotics in four full-scale wastewater treatment plants with varying designs and operations**. Chemosphere, v. 68, n. 3, p. 428-435, 2007.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C. T.; TURCK, M. **Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method**. American journal of clinical pathology, v. 45, n. 4, p. 493, 1966.

BELISÁRIO, M.; BORGES, P. S.; GALAZZI, R. M.; DEL PIERO, P. B.; ZORZAL, P. B.; RIBEIRO, A. V. F. N.; RIBEIRO, J. N. **O emprego de resíduos naturais no tratamento de efluentes contaminados com fármacos poluentes**. InterSciencePlace, 2010.

BEOVIĆ, Bojana. **The issue of antimicrobial resistance in human medicine**. International journal of food microbiology. v. 112, n. 3, p. 280-287, 2006.

BERGE, N. D.; RO, K. S.; MAO, J.; FLORA, J. R.; CHAPPELL, M. A.; BAE, S. **Hydrothermal carbonization of municipal waste streams**. Environmental science & technology, v. 45, n. 13, p. 5696-5703, 2011.

BLACKWELL, P. A.; KAY, P.; BOXALL, A.B.A. **The dissipation and transport of veterinary antibiotics in a sandy loam soil**. Chemosphere, 67:292-299, 2007

BOXALL, A.B.A.; FOGG, L.A.; BAIRD, D.J.; LEWIS, C.; TELFER, T.C.; KOLPIN, D.; GRAVELL, A. **Targeted monitoring study for veterinary medicines in the UK environment**. Final Report to the UK Environmental Agency, 2005.

BOXALL, A. B. A.; FOGG, L.A.; BLACKWELL, P. A.; KAY, P.; PEMBERTON, E. J. **Review of veterinary medicines in the environment**. Bristol, UK: Environment Agency, 2002.

BOWER, C. K.; DAESCHEL, M. A. **Resistance responses of microorganisms in food environments**. International journal of food microbiology, v. 50, n. 1, p. 33-44, 1999.

BOWMAN, Dwight. **Parasitologia veterinária de Georgis**. 9.ed. Elsevier Brasil, 2010.

BRASIL. CONAMA. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Brasília, DF, 2005.

Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 28 mai. 2014.

BRASIL. CONAMA. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011**. Brasília, DF, 2011. Disponível em:

<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res11/propresol_lanceflue_30e31mar11.pdf>
. Acesso em: 28 mai. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria 2914 de 12 de dezembro de 2011**. Brasília, DF, 2011. Disponível em:
<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>.
Acesso em: 28 mai. 2014.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Programa Nacional de capacitação de gestores ambientais: Módulo específico licenciamento ambiental de estações de tratamento de esgoto e aterros sanitários**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 2009. 67 p. Disponível em:
<http://www.mma.gov.br/estruturas/dai_pnc/_publicacao/76_publicacao19042011110356.pdf>. Acesso em: 28 mai. 2014.

BRUMANO, Gladstone; GATTÁS, Gustavo. **Implicações sobre o uso de antimicrobianos em rações de monogástricos**. Revista Eletrônica Nutritime, v. 6, n. 3, p. 953-959, 2009.

BRUNTON, Laurence L.; CHABNER, Bruce A.; KNOLLMANN, Björn C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12.ed. McGraw Hill Brasil, 2012.

BRUNTON, Laurence; PARKER, Keith; BLUMENTHAL, Donald; BUXTON, Iain. **Goodman & Gilman. Manual of Pharmacology and Therapeutics**. McGraw-Hill, 2008.

BUTH, Daniel Frederico. **Degradação fotocatalítica da tetraciclina em solução aquosa EMPREGANDO TiO₂ suportado**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre: 2009.

CELIZ, Mary D.; TSO, Jerry; AGA, Diana S. **Pharmaceutical metabolites in the environment: analytical challenges and ecological risks**. Environmental toxicology and chemistry, v. 28, n. 12, p. 2473-2484, 2009.

CHANDER, Y.; KUMAR, K.; GOYAL, S. M.; GUPTA, S. C. **Antibacterial activity of soil-bound antibiotics**. Journal of environmental quality, v. 34, n. 6, p. 1952-1957, 2005.

CHARTONE-SOUZA, E.; LOYOLA, T. L.; BUCCIARELLI-RODRIGUEZ, M.; MENEZES, M. Â.; REY, N. A.; PEREIRA-MAIA, E. C. **Synthesis and characterization of a tetracycline-platinum (II) complex active against resistant bacteria**. Journal of inorganic biochemistry, v. 99, n. 5, p. 1001-1008, 2005.

CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE (CAS). Disponível em:
<http://www.chemnet.com/>. Acesso em: 19 jul. 2015.

CHEMSPIDER. Disponível em: <http://www.chemspider.com/>. Acesso em: 26 jul. 2015.

CIONE, Ana Paola Prata; LIBERALE, Márcio José; DA SILVA, Paulo Marcos. **Desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinação de associação de ampicilinas em pó liofilizado para injeção.** Química Nova, v. 33, n. 1, p. 203-207, 2010.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Seventh Edition.** Clinical and Laboratory Standards Institute document M7-A7 [ISBN 1-56238-587-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2006.

DA CRUZ, L. H.; HENNING, F. G.; DOS SANTOS, A. B.; PERALTA-ZAMORA, P. **Degradação fotocatalítica de sulfametoxazol, trimetoprima e diclofenaco em solução aquosa.** Química Nova, v. 33, n. 6, p. 1270-1274, 2010.

DE LIGUORO, M.; POLTRONIERI, C.; CAPOLONGO, F.; MONTESISSA, C. **Use of sulfadimethoxine in intensive calf farming: evaluation of transfer to stable manure and soil.** Chemosphere, v. 68, n. 4, p. 671-676, 2007.

DIAS, Meriellen. **Estudo da degradação da enrofloxacin em solução aquosa por meio de processos foto-oxidativos.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo: 2013.

DÍAZ-CRUZ, M. Silvia; BARCELÓ, Damià. **Recent advances in LC-MS residue analysis of veterinary medicines in the terrestrial environment.** TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 26, n. 6, p. 637-646, 2007.

DOLLIVER, Holly; KUMAR, Kuldip; GUPTA, Satish. **Sulfamethazine uptake by plants from manure-amended soil.** Journal of environmental quality, v. 36, n. 4, p. 1224-1230, 2007.

DORETTO, Keity Margareth; PERUCHI, Livia Maniero; RATH, Susanne. **Sorption and desorption of sulfadimethoxine, sulfaquinoxaline and sulfamethazine antimicrobials in Brazilian soils.** Science of The Total Environment, v. 476, p. 406-414, 2014.

DUARTE, H. A.; CARVALHO, S.; PANIAGO, E. B.; SIMAS, A. M. **Importance of tautomers in the chemical behavior of tetracyclines.** Journal of pharmaceutical sciences, v. 88, n. 1, p. 111-120, 1999.

EICHHORN, Peter; AGA, Diana S. **Identification of a photooxygenation product of chlortetracycline in hog lagoons using LC/ESI-ion trap-MS and LC/ESI-time-of-flight-MS.** Analytical chemistry, v. 76, n. 20, p. 6002-6011, 2004.

EICHHORN, P.; FERGUSON, P. L.; PÉREZ, S.; AGA, D. S. **Application of ion trap-MS with H/D exchange and QqTOF-MS in the identification of microbial degradates of trimethoprim in nitrifying activated sludge.** Analytical chemistry, v. 77, n. 13, p. 4176-4184, 2005.

EXPOBIOENERGIA, 2011. **Solid CHT Biofuel from Hydrothermal Carbonisation.** 6th

International Bionergy Congress. Valladolid - Espanha, 2011. Disponível em:
<http://www.rhc-platform.org/fileadmin/user_upload/Structure/Biomass/Download/17.-_Marisa_HERNANDEZ.pdf>. Acesso em: 03 de ago de 2015.

FAO; WHO. JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. **Residue Evaluation of Certain Veterinary Drugs.** 66th Meeting 2006. Food & Agriculture Org., Rome: 2006.

FEITOSA, Rafael Silva; SODRÉ, Fernando Fabriz; MALDANER, Adriano Otávio. **Drogas de abuso em águas naturais e residuárias urbanas: ocorrência, determinação e aplicações forenses.** Química Nova, v. 36, n. 2, p. 291-305, 2013.

FERREIRA, C. F.; FRUEH, A. B.; DÜSMAN, E.; HECK, M. C.; VICENTINI, V. E. P. **Avaliação da citotoxicidade das águas dos ribeirões Varginha (Califórnia-PR) e Tabatinga (Mandaguari-PR), em *Allium cepa* L.** SaBios-Revista de Saúde e Biologia, v. 7, n. 2, 2012.

FINK, D. W.; MARTIN, R. P.; BLODINGER, J. **Facile separation of sulfonamides from their degradates by liquid-liquid extraction.** Journal of pharmaceutical sciences, v. 67, n. 10, p. 1415-1419, 1978.

FISKESJÖ, Geirid. **The *Allium* test—an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions.** Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v. 197, n. 2, p. 243-260, 1988.

FRAUNHOFER, 2015. **Projetos no Brasil: Carbonização Hidrotermal por Meio do Processo de Poço profundo.** Disponível em:
<http://www.brazil.fraunhofer.com/pt/projects_in_brazil/hydrothermal_carbonizationusing_hedeeep-shaftprocess.html>. Acesso em: 03 de ago. 2015.

FUNKE, Axel; ZIEGLER, Felix. **Hydrothermal carbonization of biomass: a summary and discussion of chemical mechanisms for process engineering.** Biofuels, bioproducts and biorefining, v. 4, n. 2, p. 160-177, 2010.

GEBHARDT, Wilhelm; SCHRÖDER, Horst Fr. **Liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry for the follow-up of the elimination of persistent pharmaceuticals during wastewater treatment applying biological wastewater treatment and advanced oxidation.** Journal of Chromatography A, v. 1160, n. 1, p. 34-43, 2007.

GHANEM, MASHHOUR; ABU-LAFI, SALEH; MOHAMMAD, DIYAA. **Development and validation of a stability-indicating hydrophilic interaction liquid chromatographic method for the determination of sulfaquinoxaline sodium in water soluble powder formulation.** Int J Pharm Pharm Sci, v.6, n. 2, p. 652-657, 2014.

GIGER, W.; ALDER, A. C.; GOLET, E. M.; KOHLER, H. P. E.; MCADELL, C. S.; MOLNAR, E.; SIEGRIST, H.; SUTER, M. J. F. **Occurrence and fate of antibiotics as**

trace contaminants in wastewaters, sewage sludges, and surface waters. CHIMIA International Journal for Chemistry, v. 57, n. 9, p. 485-491, 2003.

GOLAN, D. E.; TASHJIAN, A. H.J.; ARMSTRONG, E. J.; ARMSTRONG, A. W. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia.** 3^a ed. Guanabara Koogan, 2009.

GUARDABASSI, Luca; KRUSE, Hilde. Princípios da utilização prudente e racional de antimicrobianos em animais. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. **Guia de antimicrobianos em veterinária.** Porto Alegre: Artmed, 2010. 268 p.

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

HALLER, M.Y.; MULLER, S.R.; McARDELL, C.S.; ALDER, A.C.; SUTER, M.J.-F. **Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography–mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, v. 952, n. 1, p. 111-120, 2002.

HAMSCHER, G.; PAWELZICK, H. T.; HÖPER, H.; NAU, H. **Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure.** Environmental toxicology and chemistry, v. 24, n. 4, p. 861-868, 2005.

HERSHBERGER, E.; OPREA, S. F.; DONABEDIAN, S. M.; PERRI, M.; BOZIGAR, P.; BARTLETT, P.; ZERVOS, M. J. **Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 55, n. 1, p. 127-130, 2005.

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

HOU, Joseph P.; POOLE, John W. **Kinetics and mechanism of degradation of ampicillin in solution.** Journal of pharmaceutical sciences, v. 58, n. 4, p. 447-454, 1969.

INGERSLEV, Flemming; HALLING-SØRENSEN, Bent. **Biodegradability properties of sulfonamides in activated sludge.** Environmental Toxicology and Chemistry, v. 19, n. 10, p. 2467-2473, 2000.

KATZUNG, B.G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Farmacologia Básica e Clínica.** 12 ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

KAY, Paul; BLACKWELL, Paul A.; BOXALL, Alistair. **Transport of veterinary antibiotics in overland flow following the application of slurry to arable land.** Chemosphere, v. 59, n. 7, p. 951-959, 2005.

KEMPER, Nicole. **Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment.** Ecological indicators, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2008.

KHEIROLOMOOM, A.; KAZEMI-VAYSARI, A.; ARDJMAND, M.; BARADAR-KHOSHFETRAT, A. **The combined effects of pH and temperature on penicillin G decomposition and its stability modeling.** *Process Biochemistry*, v. 35, n. 1, p. 205-211, 1999.

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

KIM, Y.; JUNG, J.; KIM, M.; PARK, J.; BOXALL, A.; CHOI, K. **Prioritizing veterinary pharmaceuticals for aquatic environment in Korea.** *Environmental toxicology and pharmacology*, v. 26, n. 2, p. 167-176, 2008.

KIMURA, Katsuki; HARA, Hiroe; WATANABE, Yoshimasa. **Removal of pharmaceutical compounds by submerged membrane bioreactors (MBRs).** *Desalination*, v. 178, n. 1, p. 135-140, 2005.

KOCHANSKY, Jan. **Evaluation of purification schemes in the determination of tylosin in honey using high performance liquid chromatography.** *Journal of apicultural research*, v. 43, n. 2, p. 60-64, 2004

KÖHLER, A.; HELLWEG, S.; ESCHER, B. I.; HUNGERBÜHLER, K. **Organic pollutant removal versus toxicity reduction in industrial wastewater treatment: The example of wastewater from fluorescent whitening agent production.** *Environmental science & technology*, v. 40, n. 10, p. 3395-3401, 2006.

KOIKE, S.; KRAPAC, I. G.; OLIVER, H. D.; YANNARELL, A. C.; CHEE-SANFORD, J. C.; AMINOV, R. I.; MACKIE, R. I. **Monitoring and source tracking of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater adjacent to swine production facilities over a 3-year period.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 15, p. 4813-4823, 2007.

KOSJEK, Tina; HEATH, Ester; KOMPARE, Boris. **Removal of pharmaceutical residues in a pilot wastewater treatment plant.** *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 387, n. 4, p. 1379-1387, 2007.

KOO, S. H.; JO, C. H.; SHIN, S. K.; MYUNG, S. W. **Simultaneous Determination and Occurrences of Pharmaceuticals by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) in Environmental Aqueous Samples.** *Bull. Korean Chem. Soc*, v. 31, n. 5, p. 1192-1198, 2010.

KRAPAC, I. G.; KOIKE, S.; MEYER, M. T.; SNOW, D. D.; CHOU, S. F. J.; MACKIE, R. I. **Long-term monitoring of the occurrence of antibiotic residues and antibiotic resistance in groundwater near swine confinement facilities.** Report of the CSREES Project 2001-35102-10774, 2005.

KÜMMERER, K.; HENNINGER, A. **Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent.** *Clinical Microbiology and Infection*, v. 9, n. 12, p. 1203-1214, 2003.

KÜMMERER, Klaus. **Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks**. Springer, 2008.

KÜMMERER, Klaus. **Resistance in the environment**. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 54, n. 2, p. 311-320, 2004.

LEVAN, Albert. **The effect of colchicine on root mitoses in *Allium***. Hereditas, v. 24, n. 4, p. 471-486, 1938.

LI, D.; YU, T.; ZHANG, Y.; YANG, M.; LI, Z.; LIU, M.; QI, R. (**Antibiotic resistance characteristics of environmental bacteria from an oxytetracycline production wastewater treatment plant and the receiving river**). Applied and environmental microbiology, v. 76, n. 11, p. 3444-3451, 2010.

LIZONDO, M.; PONS, M.; GALLARDO, M.; ESTELRICH, J. **Physicochemical properties of enrofloxacin**. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, v. 15, n. 12, p. 1845-1849, 1997.

LONGHIN, Sandra Regina. **Estudo da degradação dos antibióticos beta-lactâmicos amoxicilina e ampicilina e avaliação da toxicidade e biodegradabilidade dos seus produtos**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Brasília, Brasília: 2008.

LÓPEZ, José Manuel Miranda. **Tratamientos antimicrobianos en medicina veterinaria: efectos sobre la microbiota intestinal de pollos y su repercusión en carnes de producción convencional y ecológica**. Tese de Doutorado, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo: 2007.

MACHADO, Adão; BARROS, Elvino. **Antimicrobianos em Cirurgia: Consulta Rápida**. Porto Alegre: Artmed, 2008.

MACKIE, R. I.; KOIKE, S.; KRAPAC, I.; CHEE-SANFORD, J.; MAXWELL, S.; AMINOV, R. I. **Tetracycline residues and tetracycline resistance genes in groundwater impacted by swine production facilities**. Animal biotechnology, v. 17, n. 2, p. 157-176, 2006.

MACLEAN, R. C.; HALL, A. R.; PERRON, G. G.; BUCKLING, A. **The population genetics of antibiotic resistance: integrating molecular mechanisms and treatment contexts**. Nature Reviews Genetics, v. 11, n. 6, p. 405-414, 2010.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12ª Edição, Artmed, 2010.

MAIA, Patrícia Penido; RATH, Susanne; REYES, Felix G.R. **Antimicrobianos em Alimentos de Origem Vegetal - Uma Revisão**. Segurança Alimentar e Nutricional, Campinas, v. 16, n.1, p.49-64, 2009.

MARTINDALE. **The Complete Drug Reference**. 36ª Ed. London: Pharmaceutical Press, 2009.

MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; GONZÁLEZ-BARREIRO, C.; SCHARF, S.; GANS, O. **Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria.** Environmental Pollution, v. 148, n. 2, p. 570-579, 2007.

MARTÍNEZ, Fleming; GÓMEZ, Alfredo. **Thermodynamic study of the solubility of some sulfonamides in octanol, water, and the mutually saturated solvents.** Journal of solution chemistry, v. 30, n. 10, p. 909-923, 2001.

MARTINEZ, Jose Luis. **Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants.** Environmental pollution, v. 157, n. 11, p. 2893-2902, 2009.

MELO, S. A. S.; TROVÓ, A. G.; BAUTITZ, I. R.; NOGUEIRA, R. F. P. **Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados.** Química nova, v. 32, n. 1, p. 188-197, 2009.

MINE KURTBAY, H.; BEKÇI, Z.; MERDIVAN, M.; YURDAKOÇ, K. **Reduction of ochratoxin A levels in red wine by bentonite, modified bentonites, and chitosan.** Journal of agricultural and food chemistry, v. 56, n. 7, p. 2541-2545, 2008.

MITCHELL, S. M.; ULLMAN, J. L.; TEEL, A. L.; WATTS, R. J. **pH and temperature effects on the hydrolysis of three β -lactam antibiotics: ampicillin, cefalotin and cefoxitin.** Science of the Total Environment, v. 466, p. 547-555, 2014.

MOMPELAT, S.; LE BOT, B.; THOMAS, O. **Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water.** Environment International, v. 35, n. 5, p. 803-814, 2009.

MORAIS, Ruteir Lima. **Remoção de hormônios sexuais sintéticos por carbonização hidrotermal e por fungos de decomposição branca.** Dissertação de Mestrado, Universidade de Federal de Goiás, Goiânia: 2012.

MÜCKTER, H. **Antibiotika-Rückstände im Trinkwasser.** 47. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets Lebensmittelhygiene, Garmisch-Patenkirchen, 2006.

MULROY, A. **When the cure is the problem.** Water Environment Technology. 13 (2): p. 32-36, 2001.

NÖDLER, K.; LICHA, T.; BESTER, K.; SAUTER, M. **Development of a multi-residue analytical method, based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry, for the simultaneous determination of 46 micro-contaminants in aqueous samples.** Journal of Chromatography A, v. 1217, n. 42, p. 6511-6521, 2010.

O'CONNOR, Seamus; AGA, Diana S. **Analysis of tetracycline antibiotics in soil: Advances in extraction, clean-up, and quantification.** TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 26, n. 6, p. 456-465, 2007.

ÖNAL, Y.; AKMIL-BAŞAR, C.; SARICI-ÖZDEMİR, Ç. **Elucidation of the naproxen sodium adsorption onto activated carbon prepared from waste apricot: kinetic, equilibrium and thermodynamic characterization.** Journal of hazardous materials, v. 148, n. 3, p. 727-734, 2007

ORLANDO, Ricardo Mathias. **Aplicação de campos elétricos em procedimentos de extração em fase sólida.** Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas: 2011.

PALERMO-NETO, J.; ALMEIDA, R.; SPINOZA, H.; GÓRNIK, S.; BERNARDI, M. **Antimicrobianos como aditivos em animais de produção.** Farmacologia aplicada à medicina veterinária. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 641-658, 2006.

PAPADOYANNIS, I. N.; SAMANIDOU, V. F.; KOVATSI, L. A. **A rapid high performance liquid chromatographic (HPLC) assay for the determination of oxytetracycline in commercial pharmaceuticals.** Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, v. 23, n. 2, p. 275-280, 2000.

PARK, Sujung; CHOI, Kyungho. **Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems.** Ecotoxicology, v. 17, n. 6, p. 526-538, 2008.

PATRICK, Graham L. **An introduction to medicinal chemistry.** Oxford university press, 2013.

PEREIRA-MAIA, E. C.; SILVA, P. P.; ALMEIDA, W. B.; SANTOS, H. F.; MARCIAL, B. L.; RUGGIERO, R.; GUERRA, W. **Tetraciclina e gliciliclinas: uma visão geral.** Química Nova, v. 33, n. 3, p. 700-706, 2010.

PETERSON, A. A.; VOGEL, F.; LACHANCE, R. P.; FRÖLING, M.; ANTAL JR, M. J.; TESTER, J. W. **Thermochemical biofuel production in hydrothermal media: a review of sub-and supercritical water technologies.** Energy & Environmental Science, v. 1, n. 1, p. 32-65, 2008.

POLL, Heloísa; KIST, Benno Bernardo; DOS SANTOS, Cleiton Evandro; CARVALHO, Cleonice; REETZ, Erna Regina; SILVEIRA, Daniel Neves. **Anuário brasileiro da pecuária 2013.** Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2013. 128p.

PRATS, C.; FRANCESCH, R.; ARBOIX, M.; PEREZ, B. **Determination of tylosin residues in different animal tissues by high performance liquid chromatography.** Journal of Chromatography B, v. 766, n. 1, p. 57-65, 2002.

PRO-NATURA. Pro-Internacional. **Biochar la troisième révolution verte.** Disponível em: <http://www.pronatura.org/?page_id=521>.

PUBCHEM. Disponível em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 12 jul. 2015.

QUINA, Frank H. **Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos.** Química Nova, v. 27, n. 6, p. 1028-1029, 2004.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas.** Artmed, 2005.

RADIĆ, S.; STIPANIČEV, D.; VUJČIĆ, V.; RAJČIĆ, M. M.; ŠIRAC, S.; PEVALEK-KOZLINA, B. **The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test.** Science of the total environment, v. 408, n. 5, p. 1228-1233, 2010.

RAMOS, José Geraldo Lopes; MARTINS-COSTA, Sérgio H.; BARROS, Elvino; MACHADO, Adão. **Antimicrobianos em Ginecologia e Obstetrícia: Consulta rápida.** Porto Alegre: Artmed, 2007.

RANG, H. P.; DALE, M. M., RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Rang and Dale Farmacologia.** 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

REGITANO, Jussara Borges; LEAL, Rafael Marques Pereira. **Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira.** Bras. Ci. Solo, v. 34, p. 601-616, 2010.

RESENDE, Aline Cristina Batista. **Deteção de microrganismos presentes no efluente hospitalar e na estação de tratamento de esgoto de Goiânia: presença de bactérias gram-negativas resistentes aos antimicrobianos.** Dissertação de Mestrado, Universidade Católica de Goiás, Goiânia: 2009.

REZENDE, Renata Antunes Estaiano de. **Enrofloxacin na piscicultura: estudo da incorporação do fármaco na ração visando a redução da taxa de lixiviação na água.** Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas: 2012.

ROCA, M.; CASTILLO, M.; MARTI, P.; ALTHAUS, R. L.; MOLINA, M. P. **Effect of heating on the stability of quinolones in milk.** Journal of agricultural and food chemistry, v. 58, n. 9, p. 5427-5431, 2010.

RODO, Angelica Brod. **Avaliação do potencial fisiológico de sementes de cebola e sua relação com o desempenho das plantas em campo.** Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo: 2002.

ROSENBLATT-FARRELL, Noah. **The landscape of antibiotic resistance.** Environmental health perspectives, v. 117, n. 6, p. A244, 2009.

RUY, Mayara Regina dos Santos. **Desenvolvimento de sistemas de screening utilizando procedimentos em fluxo para monitoramento de sulfonamidas em urina e produtos de origem animal.** Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Araraquara: 2010.

SALVADOR, André João de Lemos Miguéis. **Efeito do substituinte “-F” nas propriedades eletrônicas e estruturais das fluoroquinolonas de 3ª e 4ª gerações.** Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências da Saúde, Porto: 2012.

SARMAH, A. K.; MEYER, M. T.; BOXALL, A. B. A. **A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment.** Chemosphere, v. 65, n. 5, p. 725-759, 2006.

SEVILLA, Marta; FUERTES, Antonio B. **Chemical and structural properties of carbonaceous products obtained by hydrothermal carbonization of saccharides.** Chemistry-A European Journal, v. 15, n. 16, p. 4195-4203, 2009.

SEVILLA, Marta; FUERTES, Antonio B. **The production of carbon materials by hydrothermal carbonization of cellulose.** Carbon, v.47, n. 9, p. 2281-2289, 2009.

SILVA, Cinthia Claudino da; NASCIMENTO, Fábio Mesquita do. **Citogenotoxicidade de amostras de água do Rio Tietê em células meristemáticas radiculares de *Allium cepa*.** Atas de Saúde Ambiental-ASA, v. 1, n. 1, p. 26-35, 2013.

SINDAN. SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL. **Compêndio de Produtos Veterinários.** Disponível em: <http://www.cpvv.com.br/cpvv/>. Acesso em: 05 jul.2015.

SISKIN, Michael; KATRITZKY, Alan R. **Reactivity of organic compounds in superheated water: general background.** Chemical Reviews, v. 101, n. 4, p. 825-836, 2001.

SKOTNICKA-PITAK, J.; KHUNJAR, W.O.; LOVE, N.G.; AGA, D.S. **Characterization of metabolites formed during the biotransformation of 17 α -ethinylestradiol by *Nitrosomonas europaea* in batch and continuous flow bioreactors.** Environ. Sci. Technol., v.43, n. 10, p. 3549–3555, 2009.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA, M.; TOMAN, M. J. **The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure.** Mutation Research/Genetic Toxicology, v. 368, n. 3, p. 171-179, 1996.

SOARES, J. L. M.; ROSA, D. D.; LEITE, V. R. S.; PASQUALOTTO, A. C. **Métodos diagnósticos: consulta rápida.** Porto Alegre: Artmed, 2012.

STACKELBERG, P. E.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; ZAUGG, S. D.; HENDERSON, A. K.; REISSMAN, D. B. **Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant.** Science of the total environment, v. 329, n. 1, p. 99-113, 2004.

ŞANLI, S.; PALABIYIK, I. M.; ŞANLI, N.; GUZEL-SEYDIM, Z. B.; ALSANCAK, G. **Optimization of the experimental conditions for macrolide antibiotics in high performance liquid chromatography by using response surface methodology and determination of tylosin in milk samples.** Journal of Analytical Chemistry, v. 66, n. 9, p. 838-847, 2011.

TAMMINEN, M.; KARKMAN, A.; LÖHMUS, A.; MUZIASARI, W. I.; TAKASU, H.; WADA, S.; SUZUKI, S.; VIRTÁ, M. **Tetracycline resistance genes persist at aquaculture farms in the absence of selection pressure.** Environmental science & technology, v. 45, n. 2, p. 386-391, 2011.

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico.** 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2009

THIELE-BRUHN, Sören. **Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review.** Journal of Plant Nutrition and Soil Science, v. 166, n. 2, p. 145-167, 2003.

THOMAS, Gareth. **Medicinal chemistry: an introduction.** John Wiley & Sons, 2011.

TITIRICI, Maria-Magdalena; THOMAS, Arne; ANTONIETTI, Markus. **Back in the black: hydrothermal carbonization of plant material as an efficient chemical process to treat the CO₂ problem?** New Journal of Chemistry, v. 31, n. 6, p. 787-789, 2007.

TURIEL, Esther; BORDIN, Guy; RODRÍGUEZ, Adela R. **Trace enrichment of (fluoro) quinolone antibiotics in surface waters by solid-phase extraction and their determination by liquid chromatography–ultraviolet detection.** Journal of Chromatography A, v. 1008, n. 2, p. 145-155, 2003.

VALGAS, Saléte. **Desenvolvimento de um novo sistema de liberação controlada do fármaco enrofloxacin a partir de microesferas de malonilquitosana a ser aplicado em medicina veterinária.** Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis: 2005.

VOM EYSER, C.; PALMU, K.; OTTERPOHL, R.; SCHMIDT, T. C.; TUERK, J. **Determination of pharmaceuticals in sewage sludge and biochar from hydrothermal carbonization using different quantification approaches and matrix effect studies.** Analytical and bioanalytical chemistry, v. 407, n. 3, p. 821-830, 2015.

VON SPERLING, Marcos. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos.** 2ª Ed., Editora UFMG, 1998.

WATANABE, M.; SATO, T.; INOMATA, H.; SMITH, R. L.; ARAI, K.; KRUSE, A.; DINJUS, E. **Chemical reactions of C1 compounds in near-critical and supercritical water.** Chemical Reviews, v. 104, n. 12, p. 5803-5822, 2004.

WATKINSON, A. J.; MURBY, E. J.; COSTANZO, S. D. **Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and wastewater recycling.** Water research, v. 41, n. 18, p. 4164-4176, 2007.

WU, N.; QIAO, M.; ZHANG, B.; CHENG, W. D.; ZHU, Y. G. **Abundance and diversity of tetracycline resistance genes in soils adjacent to representative swine feedlots in China.** Environmental science & technology, v. 44, n. 18, p. 6933-6939, 2010.

WU, Y.; LIAO, X.; WANG, Z.; CHEN, Z.; ZHOU, Y. [**Hydrolysis characteristics of enrofloxacin**]. Ying yong sheng tai xue bao= The journal of applied ecology/Zhongguo sheng tai xue xue hui, Zhongguo ke xue yuan Shenyang ying yong sheng tai yan jiu suo zhu ban, v. 17, n. 6, p. 1086-1090, 2006.

YAMANAKA, Elisa Hizuru Uemura. **Incidência, fatores de virulência e resistência a antibióticos de *Escherichia coli* e *Enterococcus spp* isolados como indicadores de contaminação fecal em água de consumo de fontes alternativas de Curitiba e**

região metropolitana. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba: 2011.

YUAN, F.; HU, C.; HU, X.; WEI, D.; CHEN, Y.; QU, J. **Photodegradation and toxicity changes of antibiotics in UV and UV/H₂O₂ process.** Journal of hazardous materials, v. 185, n. 2, p. 1256-1263, 2011.

ZHANG, G.; MA D.; PENG, C.; LIU, X.; XU, G. **Process characteristics of hydrothermal treatment of antibiotic residue for solid biofuel.** Chemical Engineering Journal, v. 252, p. 230-238, 2014.

ZHANG, Jin-hong; LIN, Qi-mei; ZHAO, Xiao-rong. **The hydrochar characters of municipal sewage sludge under different hydrothermal temperatures and durations.** Journal of Integrative Agriculture, v. 13, n. 3, p. 471-482, 2014.

ZHANG, X.; WU, F.; WU, X.; CHEN, P.; DENG, N. **Photodegradation of acetaminophen in TiO₂ suspended solution.** Journal of Hazardous Materials, v. 157, n. 2, p. 300-307, 2008.

ZHANG, Xu-Xiang; ZHANG, Tong; FANG, Herbert H.P. **Antibiotic resistance genes in water environment.** Applied microbiology and biotechnology, v. 82, n. 3, p. 397-414, 2009.

ZHAO, Ling; DONG, Yuan Hua; WANG, Hui. **Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China.** Science of the Total Environment, v. 408, n. 5, p. 1069-1075, 2010.

ZUCCATO, E.; CASTIGLIONI, S.; BAGNATI, R.; MELIS, M.; FANELLI, R. **Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment.** Journal of Hazardous Materials, v. 179, n. 1-3, p. 1042-1048, 2010.