

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ANTIMICROBIAIS SULFAMETOXAZOL E
TRIMETOPRIMA EM EFLUENTE HOSPITALAR:
DETERMINAÇÃO, DEGRADAÇÃO ATRAVÉS DE
ELETROCOAGULAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE
SUBPRODUTOS E METABÓLITOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Carla Geane Brandenburg Brenner

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**ANTIMICROBIAIS SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA EM
EFLUENTE HOSPITALAR: DETERMINAÇÃO, DEGRADAÇÃO
ATRAVÉS DE ELETROCOAGULAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE
SUBPRODUTOS E METABÓLITOS**

por

Carla Geane Brandenburg Brenner

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade
Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para
obtenção do grau de

MESTRE EM QUÍMICA

PPGQ

Orientador: Prof. Tit. Dr. Ayrton F. Martins

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova
a Dissertação de Mestrado

**ANTIMICROBIAIS SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA EM
EFLUENTE HOSPITALAR: DETERMINAÇÃO, DEGRADAÇÃO
ATRAVÉS DE ELETROCOAGULAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE
SUBPRODUTOS E METABÓLITOS**

Elaborada por

Carla Geane Brandenburg Brenner

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química

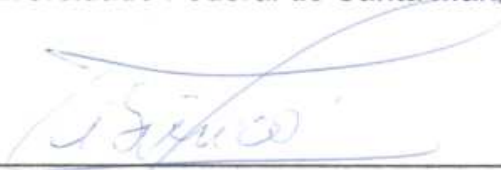
COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof. Dr. Ayrton F. Martins – Orientador
Universidade Federal de Santa Maria



Prof. Dr. Renato Zanella
Universidade Federal de Santa Maria



Dr. Tibiriça Gonçalves Vasconcelos

Santa Maria, 3 de março de 2009

“O químico que puder extrair de seu coração os elementos: compaixão, respeito, saudade, paciência, alegria, surpresa e esquecimento, e os juntar em um, pode criar aquele átomo que é chamado AMOR”.

Kahlil Gibran

***“Aos meus pais
Adenir e Nilze Brenner
e, em especial, à minha filha Dariéle,
que me faz sentir a cada dia
a alegria de viver”.***

Dedicatória

AGRADECIMENTOS

Ao professor Ayrton Figueiredo Martins pela oportunidade, estímulo e orientação;

Ao professor Carlos Augusto Mallmann pela oportunidade, confiança e apoio;

Ao professor Renato Zanella pela participação na banca examinadora e consideráveis sugestões;

À colega e amiga Carla Frank, por toda a ajuda e estímulo desde o início desta caminhada, bem como, pelas consideráveis sugestões na banca de qualificação;

Ao Tibiriçá Vasconcelos por toda a co-orientação e ajuda prestada no desenvolver do trabalho, como também pela participação na banca examinadora e consideráveis sugestões;

Aos colegas e amigos do LATER pelo convívio e apoio durante a realização da dissertação;

Aos colegas e amigos do LAMIC pelo companheirismo, ensinamentos e incentivos;

Aos familiares pelo apoio e apreço;

Ao grande amigo Flávio de Bortoli, pelo companheirismo, amizade e compreensão;

À minha filha Dariéle, por tornar meus dias mais alegres e dar sentido a minha caminhada pela estrada da vida;

Ao Ademir e à Valéria, pela atenção e disponibilidade;

A todos os demais amigos, que de uma forma ou de outra acompanharam essa trajetória.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Efluentes Hospitalares	4
3.2 Fármacos relevância ambiental.....	4
3.2.1 Antimicrobiais.....	5
3.2.2 Associação sulfametoxazol – trimetoprima	6
3.2.3 Toxicidade da combinação SMX - TMP no meio ambiente.....	7
3.2.4 SMX - TMP e sua resistência às bactérias.....	8
3.3 Espectrometria de massas para determinação de fármacos, seus metabólitos e produtos de biodegradação em matrizes ambientais.....	9
3.3.1 Determinação de SMX e TMP, seus metabólitos e produtos de degradação em matrizes ambientais	11
3.4 Processos utilizados na degradação de fármacos.....	16
3.5 Eletrocoagulação.....	18
3.5.1 Aplicações da eletrocoagulação.....	22
3.6 Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 Materiais.....	25
4.1.1 Aparelhos e acessórios.....	25
4.1.2 Reagentes e Soluções	25
4.2 Métodos.....	26
4.2.1 Coleta e preparo da amostra.....	26
4.2.2 Determinação de SMX e TMP por LC-MS/MS_Q-Trap operando em modo linear	26
4.2.3 Identificação dos metabólitos e produtos de degradação do	

SMX e TMP LC-MS/MS_Q-Trap operando em modo trapeamento iônico.....	27
4.2.4 Processo de avaliação da determinação da DQO	28
4.2.5 Descrição do sistema de eletrocoagulação.....	28
4.2.6 Descrição do sistema de extração por Soxhlet dos antimicrobiais SMX e TMP	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
5.1 Otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas e fonte de ionização.....	31
5.2 Determinação de SMX e TMP por LC-MS/MS_Q-Trap operando em modo linear.....	34
5.3 Metabólitos de SMX e de TMP	41
5.4 Eletrocoagulação aplicada ao efluente hospitalar PA-HUSM: Avaliação das melhores condições para o processo de redução da DQO.....	46
5.5 Validação da extração de SMX e TMP utilizando o método de Soxhlet.....	54
5.6 Eletrocoagulação da solução sintética contendo os antimicrobiais SMX e TMP.....	56
5.7 Eletrocoagulação do efluente hospitalar PA-HUSM enriquecido com os antimicrobiais SMX e TMP	58
5.8 Produtos da degradação do SMX pela aplicação do processo de eletrocoagulação	60
6. CONCLUSÃO.....	66
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Concentrações de SMX detectadas no meio ambiente, citadas na literatura consultada.....	12
TABELA 2. Concentrações de TMP detectadas no meio ambiente, citadas na literatura consultada.....	13
TABELA 3. Parâmetros otimizados para o espectrômetro de massas dependentes do analito.....	31
TABELA 4. Condições otimizadas da fonte de ionização para SMX e TMP através de injeção em fluxo.....	33
TABELA 5. Curva analítica para a determinação de SMX e de TMP.....	34
TABELA 6. Níveis de fortificação e média de recuperação (%) e precisão (RSD %) para SMX e TMP.....	40
TABELA 7. Concentrações de SMX e TMP no efluente hospitalar PA- HUSM em função dos dias de coleta.....	41
TABELA 8. Variáveis e níveis utilizados nos experimentos de avaliação da redução da DQO.....	47
TABELA 9. Experimentos realizados utilizando a matriz obtida por planejamento fatorial e as respectivas reduções de DQO do efluente PA-HUSM em cada experimento.....	48
TABELA 10. Resultados para a recuperação e para a reprodutibilidade da extração de SMX e de TMP do lodo de eletrocoagulação pelo método de extração Soxhlet.....	55

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estruturas químicas: (a) SMX; (b) sulfonamidas; (c) TMP; (d) diaminopirimidina.	7
FIGURA 2. Esquema de sistema de espectrometria de massas MS/MS com trapeamento iônico.	11
FIGURA 3. Principais produtos propostos e caminho da transformação para a reação da TMP com HOCl.	14
FIGURA 4. (a) (+)-ESI-MS ² espectro do metabólito M324, [M+H] ⁺ = <i>m/z</i> 325; (b) (+)-ESI-MS ² espectro de M324 após troca H/D, [M(D6) + D] ⁺ = <i>m/z</i> 332; (c) M324, (+)-ESI-MS ³ de <i>m/z</i> 325 → 308; (d) M324, (+)-ESI-MS ³ de <i>m/z</i> 325 → 307; (e) M324: (+)-ESI-MS ³ de <i>m/z</i> 325 → 290.	15
FIGURA 5. HPLC-PDA (HPLC – Detector com arranjo de fotodiodos), cromatograma dos principais intermediários orgânicos identificados (a) e espectros de LC-MS/MS correspondentes (B-D); (b) MS/MS espectro do intermediário 1 (<i>m/z</i> = 270), SMX hidroxilado; (c) MS/MS espectro do intermediário 2 (<i>m/z</i> = 288), SMX dihidroxilado; (d) MS/MS espectro do intermediário 3 (<i>m/z</i> = 99), 3-amino-5-metilisoxazol.	16
FIGURA 6. Diagrama esquemático de um sistema de eletrocoagulação.....	21
FIGURA 7. (a) Espectrômetro de massas API 4000 Q-Trap; (b) Forno para coluna; (c) Autosampler; (d) Bomba binária; (e) Desgaseificador.	28
FIGURA 8. Sistema reacional de eletrocoagulação: a) reator; b) fonte de corrente contínua; c) eletrodos e d) agitador magnético.....	29
FIGURA 9. Extração Soxhlet. (a) manta de aquecimento; (b) balão de fundo redondo (200 mL) com solvente; (c) sifão; (d) cartucho de amostras; (e) câmara de extração; (f) condensador.	30
FIGURA 10. Espectro MS/MS obtido através da infusão direta da solução padrão de SMX.	32
FIGURA 11. Espectro MS/MS obtido através da infusão direta da solução padrão de TMP.....	33
FIGURA 12. Curva analítica construída para o SMX	35
FIGURA 13. Curva analítica construída para TMP.....	35
FIGURA 14. Cromatograma XIC dos analitos SMX e TMP obtido por LC-MS/MS ...	36

FIGURA 15. Cromatograma XIC da amostra de efluente hospitalar obtido por LC-MS/MS.....	37
FIGURA 16. Cromatograma da TMP a $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$, concentração que gera um sinal/ruído de aproximadamente 3. S/N = 3 é referente ao LD.....	38
FIGURA 17. Cromatograma da TMP a $0,50 \mu\text{g L}^{-1}$, concentração que gera um sinal/ruído de aproximadamente 10. S/N = 10 é referente ao LQ.....	38
FIGURA 18. Cromatograma do SMX a $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$, concentração que gera um sinal/ruído de aproximadamente 3. S/N = 3 é referente ao LD.....	39
FIGURA 19. Cromatograma do SMX a $0,50 \mu\text{g L}^{-1}$, concentração que gera um sinal/ruído de aproximadamente 10. S/N = 10 é referente ao LQ.....	39
FIGURA 20. Espectro de massas obtido pela injeção do efluente PA-HUSM onde o metabólito m/z 325,0 foi identificado.....	42
FIGURA 21. Espectro de massas obtido por EPI do metabólito m/z 325 e seus respectivos fragmentos encontrados no efluente PA-HUSM.....	43
FIGURA 22. Espectro de massas obtido pelo experimento de IDA com PI m/z 108 seguido de EPI do efluente PA-HUSM onde o metabólito m/z 296 foi encontrado.....	44
FIGURA 23. Espectro de massas obtido por EPI do metabólito m/z 296 e seus respectivos fragmentos encontrados no efluente PA-HUSM.....	45
FIGURA 24. Caminho proposto para a fragmentação do metabólito N_4 -acetilsulfametoxazol m/z 296.....	46
FIGURA 25 - Gráfico de Pareto apresentando as variáveis e suas influências no processo.....	49
FIGURA 26. Eficiência na redução de DQO em função da distância entre os eletrodos e a corrente aplicada.....	50
FIGURA 27. Eficiência na redução de DQO em função da corrente aplicada e da quantidade de eletrólito utilizada.....	51
FIGURA 28 - Eficiência na redução de DQO em função da distância entre eletrodos e da quantidade de eletrólito utilizada.....	52
FIGURA 29 - Gráfico de tendências das variáveis em relação à eficiência de redução de DQO.....	53
FIGURA 30. Remoção de cor do efluente após a aplicação do processo de EC. (a) Efluente hospitalar antes da aplicação de EC. (b) Efluente hospitalar após a aplicação de EC.....	54

FIGURA 31. Lodo gerado no processo de eletrocoagulação da solução desprovida dos analitos SMX e TMP.	55
FIGURA 32. Gráfico das médias de redução da concentração das soluções sintéticas pH 5, 7 e 9 de SMX submetidas ao processo de eletrocoagulação....	57
FIGURA 33. Gráfico das médias de redução da concentração das soluções sintéticas pH 5, 7 e 9 de TMP submetidas ao processo de eletrocoagulação	58
FIGURA 34. Gráfico das médias de redução da concentração de SMX em efluente hospitalar enriquecido.....	59
FIGURA 35. Gráfico das médias de redução da concentração de TMP em efluente hospitalar enriquecido.....	60
FIGURA 36. Espectro de massas obtido pela injeção da solução de 1 mg L^{-1} de SMX após 60 minutos de tratamento por EC onde o SMX dihidroxilado foi encontrado m/z 288.	61
FIGURA 37. Cromatograma de massas EPI de m/z 288 e 270 e estruturas moleculares propostas.....	62
FIGURA 38. (a) Espectro de massas EPI da solução de 1 mg L^{-1} de SMX após aplicação de 60 minutos de EC. (a) Utilizando uma energia de colisão de 20 V. (b) Utilizando uma energia de colisão de 35 V. (c) Utilizando uma energia de colisão de 50 V.	63
FIGURA 39. Espectro de massas PI m/z 108, obtido pela injeção da solução de 1 mg L^{-1} de SMX após 60 minutos de tratamento por EC onde, o produto de degradação do SMX m/z 256 foi identificado.	64
FIGURA 40. EPI do produto de degradação m/z 256,2, seus fragmentos e estruturas moleculares propostas.	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

COT – carbono orgânico total

CMI – concentração mínima inibitória

DQO - demanda química de oxigênio

EC - eletrocoagulação

EC₅₀ - Concentração efetiva 50%, do inglês, *effective concentration*

ESI – ionização electrospray, do inglês, *electrospray ionization*

EPI – do inglês, *enhanced product ion*

EMS – do inglês, *enhanced MS*

ETE – Estação de tratamento de efluentes

EU - União Européia

FI - injeção em fluxo, do inglês, *Flow injection*

HO• - radical hidroxila

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês, *high performance liquid chromatography*

HUSM - Hospital Universitário de Santa Maria

IUPAC – do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*

IT-MS – Espectrometria de massas com trapeamento iônico, do inglês, *mass spectrometry – ion-trap*

LAMIC - Laboratório de Análises Micotoxicológicas

LATER - Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Efluentes e Resíduos

LC-MS/MS - cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas seqüencial, do inglês, *liquid chromatography with tandem mass spectrometry*

LC-MS/MS_Q-Trap – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas quadrupolo linear e trapeamento iônico, do inglês, *liquid chromatography quadrupole linear ion trap–mass spectrometry*

LD – limite de detecção

LQ – limite de quantificação

MS/MS – espectrometria de massas seqüencial, do inglês, *tandem mass spectrometry*

MS/MS_Q-Trap - espectrometria de massas quadrupolo linear e trapeamento iônico, do inglês, *quadrupole linear ion trap–mass spectrometry*

MRM – monitoramento múltiplo de reações, do inglês, *multiple reaction monitoring*
m/z – razão massa por carga
NL – perda neutra, do inglês, *neutral loss*
OECD – do inglês, *Organisation for Economic Co-operation and Development*
PA - pronto atendimento
p.a. – pro analysis
PAOs – Processos avançados de oxidação
PI – íon precursor, do inglês, *precursor ion*
QqQ - Triplo quadrupolo, do inglês, *triple quadrupole*
QqToF-MS - espectrômetro de massas quadrupolar híbrido por tempo de voo, do inglês, *hybrid quadrupole- time-of-flight mass spectrometer*
SPE - extração em fase sólida, do inglês, *solid-phase extraction*
SMX – sulfametoxazol, do inglês, *sulfamethoxazole*
TMP – trimetoprima, do inglês, *trimethoprim*
TIC – cromatograma de íons total, do inglês, *total ion chromatogram*
UFMS - Universidade Federal de Santa Maria
XIC – cromatograma de íons extraídos, do inglês, *extracted ion chromatograms*

RESUMO

ANTIMICROBIAIS SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA EM EFLUENTE HOSPITALAR: DETERMINAÇÃO, DEGRADAÇÃO ATRAVÉS DE ELETROCOAGULAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE SUBPRODUTOS E METABÓLITOS

Autora: Carla Geane Brandenburg Brenner

Orientador: Prof. Dr. Ayrton Figueiredo Martins

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 3 de março de 2009.

Neste estudo, desenvolveu-se método utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas seqüencial para determinação dos antimicrobiais sulfametoxazol e trimetoprima em efluente hospitalar, bem como para avaliar o processo de eletrocoagulação aplicado à solução sintética dos antimicrobiais e ao efluente hospitalar fortificado com os fármacos, ambos na concentração de 1 mg L^{-1} . Os limites de detecção e quantificação alcançados para ambos antimicrobiais foram de 0,25 e $0,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. A faixa linear do método foi de 0,5 a $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, com um coeficiente de correlação sempre superior à 0,9995, para ambos os antimicrobiais. As concentrações de sulfametoxazol e de trimetoprima encontradas no efluente hospitalar ficaram na faixa de 12,5 à 37,3 e 3,65 à $11,30 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Para determinação das melhores condições de aplicação do processo de eletrocoagulação ao efluente hospitalar utilizou-se planejamento fatorial com superfície de resposta. Como variáveis foram usadas a distância dos eletrodos, a concentração de eletrólito (NaCl) e a corrente aplicada (mA). Como parâmetro de avaliação usou-se a redução da demanda química de oxigênio (DQO). Os melhores resultados obtidos na redução da DQO (57,9%) foram alcançados utilizando-se 500 mg de NaCl, distância dos eletrodos de 30 mm e corrente de 800 mA.

Através da aplicação do processo de eletrocoagulação à solução sintética de ambos os antimicrobiais e por meio da extração Soxhlet pôde-se confirmar a real degradação ou a diminuição da concentração dos antimicrobiais em solução pela possível adsorção destes, no lodo gerado no processo. O sulfametoxazol apresentou uma diminuição média da concentração inicial de 84,7%, sendo que, destes, 6,0% ficaram adsorvidos ao lodo, alcançando, assim, uma degradação

média de 79,2%, em pH 5 e 7. A trimetoprima, em pH 5 e 7, apresentou uma redução média da concentração inicial de 28,7% sendo que ocorreu total adsorção ao lodo, não havendo degradação.

A identificação dos metabólitos no efluente hospitalar e de produtos de degradação gerados na aplicação de eletrocoagulação à solução sintética foi feita através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas quadrupolo linear e trapeamento iônico (LC-MS/MS_QTrap). Os metabólitos identificados foram o N₄-acetilsulfametoxazol e o dihidroxitrimetoprima. Caminhos de fragmentação foram propostos: os produtos da degradação do sulfametoxazol, identificados, foram o sulfametoxazol dihidroxilado (identificado apenas após 60 minutos de tratamento) e o sulfametoxazol dihidrogenado.

Na aplicação da eletrocoagulação ao efluente hospitalar, fortificado com solução padrão de ambos os antimicrobiais, observou-se que não ocorre degradação destes. Assim sendo, não foi possível estudar-se os produtos da degradação em amostras reais de efluente.

O processo de eletrocoagulação aplicado ao efluente hospitalar é eficiente na redução da DQO nas condições avaliadas; mas, não é eficiente na degradação dos antimicrobiais no efluente fortificado.

O método desenvolvido, utilizando-se como ferramenta analítica LC-MS/MS_QTrap operando em modo linear, para a determinação dos fármacos investigados, em efluente hospitalar, como também, para a avaliação da eficiência do processo de eletrocoagulação na redução da concentração ou na degradação dos antimicrobiais em solução sintética e, em efluente hospitalar, provou ser rápido, sensível, seletivo, dispensando laboriosa manipulação da amostra.

ABSTRACT

Master Dissertation

Post-Graduation Course in Chemistry

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

SULPHAMETHOXAZOLE AND TRIMETHOPRIM ANTIMICROBIALS IN HOSPITAL WASTEWATER: DETERMINATION, DEGRADATION THROUGH ELECTROCOAGULATION AND IDENTIFICATION OF BYPRODUCTS AND METABOLITES

Author: Carla Geane Brandenburg Brenner

Adviser: Prof. Dr. Ayrton Figueiredo Martins

Date and Location's Defense: Santa Maria, March, 03, 2009.

In this study, it was developed a methodology using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the determination of antimicrobials sulphamethoxazole and trimethoprim in hospital effluent and for monitoring the electrocoagulation process applied to synthetic solutions, as well as, to the hospital effluent fortified with the antimicrobials, both at the same concentration of 1 mg L^{-1} . The achieved limits of detection and quantification were 0.25 and $0.5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The linear range of the method was 0.5 to $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, with a correlation coefficient always greater than <0.9995 for both antimicrobials. The average concentration of sulphamethoxazole and trimethoprim found for the hospital effluent was 27.8 and $6.6 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, respectively.

In order to study the best conditions for conducting the electrocoagulation, factorial design with surface response methodology was used. It was set as variables the distance of the electrodes, the concentration of electrolyte (NaCl) and the applied current (mA). As evaluation parameter it was used the chemical oxygen demand (COD) reduction of the hospital effluent. The best result for the COD reduction (57.9%) was achieved using 500 mg of NaCl, electrode distance of 30 mm and current of 800 mA.

By means of the application of the electrocoagulation process to synthetic solutions of the antimicrobials and Soxhlet extraction, it was confirmed the true degradation or the reduction of the antimicrobial concentration by possible adsorption on the generated process sludge. From the average reduction of 84.7% of the initial

sulphamethoxazole concentration, 6.0% of which were adsorbed by the sludge, resulting an average reduction 79.3%, at pH 5 and 7. The antimicrobial trimethoprim, at pH 5 and 7, showed an average reduction of 28.7% of the initial concentration by sludge adsorption, and no degradation occurred.

The identification of the metabolites in hospital effluent and the degradation products generated by the electrocoagulation of the synthetic solution was performed using liquid chromatography – quadrupole linear ion trap mass spectrometry. The metabolites identified were N4-acetylsulphamethoxazole and dihydroxtrimethoprim, and their paths of fragmentation were proposed. The degradation products of sulfamethoxazole identified were dihydroxyl sulphamethoxazole (identified only after 60 minutes treatment) and dehydrogenate sulphamethoxazole.

For the electrocoagulation of the hospital effluent fortified with standard solutions of both antimicrobials, it was observed no degradation. Therefore, the degradation products in real effluent samples could not be studied.

The electrocoagulation process applied to the hospital effluent was efficient by reducing COD under the conditions evaluated; but, it was not efficient by the degradation of the fortified antimicrobials in the effluent.

The developed methodology used as analytical tool, LC-MS/MS_QTrap operating in lineal way, for the determination of the investigated antimicrobials in hospital wastewater, as well as for the efficiency evaluation of the electrocoagulation process by the concentration reduction or the degradation in synthetic solution and hospital wastewater, proved to be fast, sensitive, selective, sparing laborious manipulation of the sample.

1. INTRODUÇÃO

A elevação do padrão de vida e o crescimento ininterrupto da população humana levaram a um enorme aumento na demanda por água doce. A proteção deste recurso natural é assim um importante assunto da pauta ambiental.

Nos últimos anos a ocorrência de resíduos de fármacos no meio ambiente tem gerado uma nova espécie de preocupação. Uma grande variedade de resíduos de medicamentos e seus metabólitos vêm sendo detectados em diferentes compartimentos ambientais, em especial, em cursos d'água e efluentes¹.

A entrada de tais drogas no meio ambiente aquático pode acarretar riscos para a saúde humana, uma vez que estas espécies são biologicamente ativas e de limitada biodegradabilidade.

Fármacos podem alcançar águas de superfície por muitos caminhos: via efluentes industriais e de serviços médicos, efluentes domésticos (excreções podem conter ambos, compostos e seus metabólitos) e, efluentes da medicina veterinária^{1,2}. A concentração destas drogas no meio ambiente, em geral, é baixa, mas, a entrada contínua, por diversas vias, pode levar à concentrações de significância ambiental, oferecendo risco potencial para organismos aquáticos e terrestres².

Dentre as drogas utilizadas na medicina humana e animal, os antibióticos merecem uma atenção especial. O uso generalizado e a conseqüente descarga destes fármacos em efluentes podem induzir seleção genética de bactérias resistentes aos antimicrobiais³.

Neste trabalho, a combinação sulfametoxazol – trimetoprima, de nome comercial “Bactrim”, usada no tratamento de doenças infecciosas^{4,5}, teve sua concentração investigada no efluente hospitalar, bem como foram identificados seus metabólitos. O Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) consome anualmente 1,586 kg de Bactrim® (400 mg sulfametoxazol + 80 mg trimetoprima), segundo dados obtidos no ano de 2007.

Considerando-se a possibilidade de eventual desenvolvimento de resistência bacteriana a estes antimicrobiais, bastante utilizados no HUSM, como também, os potenciais riscos para os organismos aquáticos, avaliou-se a aplicação do processo de eletrocoagulação à solução sintética de ambos os antimicrobiais em concentração de 1 mg L⁻¹, bem como a aplicação do processo ao efluente hospitalar fortificado com os antimicrobiais na mesma concentração.

Desenvolveu-se metodologia analítica utilizando-se como ferramenta a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas seqüencial, na determinação dos antimicrobiais em efluente hospitalar, com vistas a avaliar a eficiência da eletrocoagulação para solução sintética e para efluente fortificado, procurando-se minimizar a manipulação da amostra e alcançando-se o menor tempo de análise possível.

Por meio de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas quadrupolo linear e trapeamento iônico fez-se a identificação dos metabólitos dos antimicrobiais no efluente hospitalar e estudaram-se os produtos da degradação dos antimicrobiais pela aplicação de eletrocoagulação à solução sintética dos fármacos.

A eletrocoagulação, sabidamente, é um processo eletroquímico que envolve, primariamente, a geração *in situ* de coagulantes através da oxidação eletrolítica de um ânodo de material apropriado, levando à geração de hidróxidos metálicos insolúveis capazes de remover poluentes pela complexação superficial ou atração eletrostática⁶. Ainda, através da transferência de elétrons, pode também promover, simultaneamente, a degradação de contaminantes orgânicos.

Por meio de planejamento fatorial com superfície de resposta, as melhores condições experimentais para a aplicação do processo de eletrocoagulação foram avaliadas através da redução da demanda química de oxigênio (DQO) no efluente hospitalar. Estas condições otimizadas foram utilizadas no estudo da degradação dos antimicrobiais sulfametoxazol e trimetoprima por meio da aplicação do processo em solução sintética, assim como no efluente hospitalar.

A literatura não cita a aplicação da eletrocoagulação na degradação destes fármacos; daí o interesse no estudo deste processo, assim como, dos produtos gerados.

2. OBJETIVOS

Este trabalho objetivou de maneira geral:

- Desenvolver metodologia analítica sensível, seletiva e rápida utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas seqüencial (LC-MS/MS), para a determinação dos antimicrobiais sulfametoxazol e trimetoprima no efluente hospitalar, minimizando manipulação da amostra, como também para avaliar a aplicação do processo de eletrocoagulação à soluções sintéticas dos antimicrobiais, assim como, ao efluente hospitalar fortificado com concentração conhecida dos fármacos;
- Identificar os metabólitos no efluente e estudar os produtos de degradação gerados no processo aplicado, por meio de LC-MS/MS_QTrap;
- Otimizar a metodologia de extração Soxhlet dos antimicrobiais sulfametoxazol e trimetoprima do lodo gerado no processo de eletrocoagulação para o estudo da real degradação ou possível adsorção no lodo gerado;
- Utilizar planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta para a adequação dos experimentos, tendo como parâmetro de avaliação a redução da DQO.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Efluentes Hospitalares

Efluentes hospitalares estão carregados com microorganismos patogênicos, fármacos parcialmente metabolizados, elementos radioativos e outras substâncias químicas tóxicas. Certas substâncias de origem hospitalar, como agentes anti-tumorais, antibióticos e organohalogenados, podem deixar as plantas de tratamento de efluentes sem sofrerem degradação apreciável. Estas substâncias químicas podem provocar contaminação do ambiente natural, podendo causar desequilíbrio biológico, sendo que, ainda, podem induzir efeitos negativos nas águas receptoras e nas espécies vivas. Algumas das substâncias encontradas em efluentes são genotóxicas e suspeita-se constituírem possível causa de tipos de câncer observados nas últimas décadas⁶⁻⁷.

Estes efluentes, por conterem contaminantes biologicamente ativos e não biodegradáveis, requerem tratamento *on-site* para prevenir a contaminação do sistema de esgoto e rios⁶.

Produtos farmacêuticos, desinfetantes, substâncias ativas, pigmentos, tinturas e reagentes são amplamente usados em hospitais. Desinfetantes, em particular, são produtos altamente complexos ou misturas de substâncias ativas. Muitos fármacos são excretados por pacientes na forma não-metabolizada, contribuindo, conseqüentemente, incólumes, para o efluente gerado^{6,8}.

3.2 Fármacos relevância ambiental

Resíduo de fármacos no meio ambiente e seus potenciais efeitos tóxicos, ou seja, seu comportamento, destino e impacto, tornou-se uma área de pesquisa emergente na química ambiental, nos últimos anos⁹⁻¹².

Fármacos são desenvolvidos e usados para exercerem efeitos biológicos específicos¹³. Por causa de suas propriedades físico-químicas e biológicas, há preocupação relativa ao seu potencial impacto ambiental. Embora uma variedade de combinações farmacêuticas tenha sido detectada no meio ambiente^{1,3,10,11,14-17}, a sua significância ecológica ainda não é completamente conhecida¹⁸.

Em virtude de sua entrada contínua, fármacos são considerados “compostos pseudopersistentes” no meio ambiente. Drogas de uso humano e veterinário são liberadas continuamente no meio ambiente como resultado de processos industriais, disposição imprópria ou excreção metabólica¹². A rota de entrada das drogas no meio ambiente, mais significativa, está relacionada com o esgoto urbano e a excreção animal¹².

Dentre os fármacos, que têm sido freqüentemente detectados em diferentes compartimentos ambientais, incluem-se: antibióticos, analgésicos e antiinflamatórios, agentes reguladores de lipídios, beta bloqueadores, antiepiléticos, contraceptivos, esteróides e hormônios relacionados¹². Estes fármacos residuais são encontrados no meio ambiente em concentrações (ng L^{-1} ou $\mu\text{g L}^{-1}$), contudo, mesmo em baixas concentrações, têm potencial para induzirem efeitos tóxicos^{12,17}. Todavia, o risco ecológico associado à maioria dos fármacos não está suficientemente esclarecido na literatura¹².

3.2.1 Antimicrobiais

Antibióticos são definidos como compostos polares¹⁹, não voláteis, hidrofílicos, semi-sintéticos e sintéticos, com atividade antimicrobial, que podem ser aplicados parenteralmente, oralmente ou topicamente²⁰.

Dentre os fármacos utilizados em medicina humana e animal, os antibióticos recebem a maior parcela de preocupação. Eles são desenvolvidos especificamente para serem biologicamente ativos, sendo que, a exposição crônica involuntária a eles pode causar efeitos adversos, mesmo em baixas concentrações. Além disso, possuem mecanismo comum de ação e podem apresentar efeito de sinérgicos em combinação com outras espécies químicas, presentes no meio ambiente^{11,14}.

A liberação de antibióticos em compartimentos aquáticos pode acarretar contaminação de águas em geral (água de superfície, subterrânea, não tratada ou tratada para consumo humano), potencializando resistência das bactérias à antibióticos, bem como, gerar efeitos negativos em bactérias importantes para os ecossistemas (morte ou inibição)²¹.

Entre 30 e 90% da dose dos antibióticos administrados a humanos e animais são excretados na urina como substâncias ativas^{11,21}.

3.2.2 Associação sulfametoxazol – trimetoprima

O sulfametoxazol (SMX), denominado pela IUPAC 4-amino-N-(5-metil-3-isoxazolil) benzenossulfonamida²², tem fórmula molecular $C_{10}H_{11}N_3O_3S$ e peso molecular $253,27 \text{ g mol}^{-1}$; seu ponto de fusão é de $166 - 169 \text{ }^\circ\text{C}$ e seus pKa $1,85$ e $5,60$ ²³. É uma sulfonamida de amplo espectro. As sulfonamidas foram as primeiras drogas antibacterianas sistêmicas eficazes, utilizadas em pacientes humanos¹⁴. Elas são primariamente bacteriostáticas e atuam interferindo na síntese bacteriana do ácido fólico²⁴.

O SMX apresenta picos de concentração plasmática de 1 a 4 horas, tempo de meia-vida de 11 horas, sendo eliminado quase exclusivamente pela urina, numa proporção de 10 a 30%, inalterado²⁵.

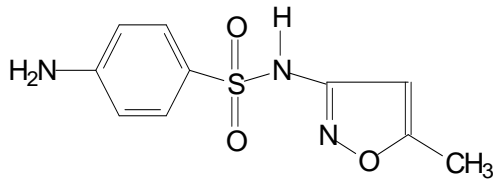
A trimetoprima (TMP), cujo nome oficial segundo a IUPAC é 5-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-2,4-pirimidinodiamina^{26,27}, apresenta fórmula molecular $C_{14}H_{18}N_4O_3$, peso molecular $290,32 \text{ g mol}^{-1}$, ponto de fusão entre $199 - 203 \text{ }^\circ\text{C}$ e pKa de $3,23$ e $6,76$ ³. É um derivado das diaminopirimidinas e possui atividade antimicrobiana e baixa toxicidade para o homem²⁶.

A TMP apresenta um tempo de meia-vida de 8 a 10 horas, atingindo a concentração plasmática máxima em 1 a 4 horas. Sua excreção é renal, sendo que, percentagens de 50 a 60 % da dose administrada são excretadas inalteradas na urina²⁵.

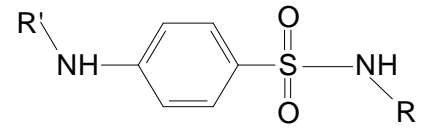
A introdução da associação SMX-TMP constituiu um importante avanço no desenvolvimento de fármacos antimicrobianos, clinicamente eficazes. Esta combinação é indicada no tratamento de infecções do trato respiratório superior e inferior, no tratamento de infecções do trato urinário e renal, infecções gastrintestinais e outras infecções bacterianas^{28,29}. Esta associação também é muito utilizada em profilaxia veterinária de infecções^{16,30}.

SMX-TMP agem sinergicamente, bloqueando duas enzimas que catalisam estágios sucessivos na biossíntese do ácido folínico no microorganismo. Este tipo de ação é conhecido como antagonismo metabólico, que nada mais é do que uma inibição competitiva, sendo freqüentemente eficaz contra germes que são resistentes a um deles, isoladamente³¹.

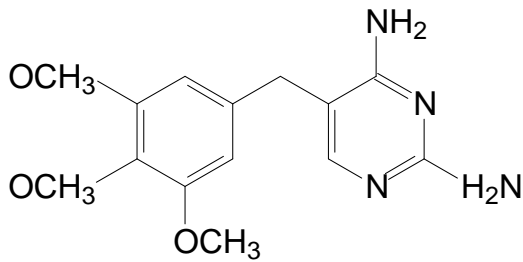
Na Figura 1, estão representadas as estruturas químicas do SMX, a estrutura química geral das sulfonamidas, da TMP e da diaminopirimidina.



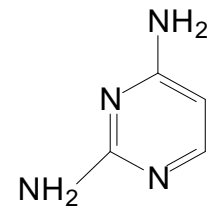
(a) Estrutura química do SMX



(b) Estrutura química geral das sulfonamidas



(c) Estrutura química da TMP



(d) Estrutura química da diaminopirimidina

FIGURA 1. Estruturas químicas: (a) SMX; (b) sulfonamidas; (c) TMP; (d) diaminopirimidina.

3.2.3 Toxicidade da combinação SMX-TMP no meio ambiente

A maioria das citações na literatura, relacionada aos efeitos tóxicos causados por fármacos, é focada em organismos representativos da cadeia alimentar. Métodos de ecotoxicidade-padrão, definidos pelas diretrizes OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), para testes químicos (incluindo, p. ex., algas, bactérias, invertebrados e peixes), são de comum aplicação nos estudos reportados³².

Na aplicação e interpretação de ensaios ecotoxicológicos são utilizados, normalmente, como referenciais, os parâmetros estabelecidos pela Comissão da Comunidade Européia (EU Directive 93/67/EEC). Nesta linha, as espécies químicas são classificadas de acordo com concentrações efetivas, que provocam a inibição do crescimento de 50% da população sob teste (valores EC_{50}), em um esquema com diferentes classes de risco. Um $EC_{50} < 1 \text{ mg L}^{-1}$ requer a classificação “muito tóxico”; de 1 até 10 mg L^{-1} , “tóxico”; e, de 10 a 100 mg L^{-1} , “prejudicial” para a espécie sob teste. Substâncias com um $EC_{50} > 100 \text{ mg L}^{-1}$ não foram classificadas³³.

Alguns valores de EC₅₀ para os antimicrobiais SMX e TMP são reportados na literatura^{34,35}. SMX apresentou um EC₅₀ de 1,53 mg L⁻¹ para algas, sendo classificado como tóxico para esta classe. Já a TMP, apresentou EC₅₀ de 80 mg L⁻¹, mostrando-se prejudicial para esta classe de organismos aquáticos.

Kim e colaboradores¹⁸ investigaram a toxicidade em meio ambiente aquático dos fármacos mais utilizados na Coreia. Dentre eles, estão as seis principais sulfonamidas, incluindo-se aí, SMX e TMP. Foram usados como organismos indicadores a bactéria marinha *Vibrio fischeri*, um invertebrado de água doce, *Daphnia magna*, e, um peixe japonês, medaka *Oryzias latipes*, espécies estas que representam diferentes níveis tróficos. Para o SMX, a bactéria marinha *V. fischeri* apresentou um EC₅₀ de 78,1 mg L⁻¹, em 15 minutos de exposição, mostrando-se prejudicial para esta classe. Para as outras espécies, o EC₅₀ apresentou-se >100 mg L⁻¹ para o SMX e TMP, não apresentando risco.

Lindberg e colaboradores³ avaliaram os efeitos causados pelo SMX na planta aquática *L. gibba*. Com sete dias de exposição apresentou EC₅₀ = 81 µg L⁻¹. No caso da TMP, seus efeitos sobre *R. Salina* (alga verde) correspondem a EC₅₀ = 16 mg L⁻¹, mostrando assim ser prejudicial para esta classe.

3.2.4 SMX – TMP e sua resistência às bactérias

O impacto mundial relacionado ao uso intensivo de agentes antimicrobiais com propósitos terapêutico e profilático, tem sido associado ao aumento da resistência bacteriana no ambiente microbiano exposto. Atualmente, a resistência a múltiplos antibióticos, tem sido evidenciada em uma larga gama de patógenos humanos ou bactérias oportunistas, tais como *campylobacter sp.*, *klebsiella pneumoniae*, *Salmonella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, e, também, em patógenos de peixes¹².

Potencial transferência de bactérias resistentes, ou genes resistentes, de animais para humanos, pode ocorrer através da cadeia alimentar. Segundo estas considerações, e devido à grande distribuição ambiental, a microflora de peixes deve ser considerada um importante reservatório¹².

Sarter e colaboradores⁹ examinaram arbitrariamente a suscetibilidade de bactérias isoladas de peixes (*Pangasius hypophthalmus*), em tanques de cultura no

Viet Nam, para os 6 principais antibióticos usados na aquicultura daquele país, dentre eles, a combinação SMX – TMP. Foram isoladas 19 diferentes bactérias de 92 peixes, de 3 diferentes tanques de cultura. Das 11 bactérias da espécie *Escherichia coli* isoladas, 10 apresentaram resistência de 90,9% à SMX – TMP, e, a resistência média para todas as 19 bactérias isoladas, foi de 69,9%.

Phuong e colaboradores²⁰ testaram a resistência de 123 bactérias isoladas de água e sedimentos, e, também, de diferentes peixes de cultivo em cinco rios de diferentes regiões. Os resultados mostraram que 89% das bactérias isoladas são resistentes ao SMX – TMP.

A sensibilidade antimicrobiana é expressa, em geral, como uma concentração mínima inibitória (CMI). O limiar de CMI chama-se “breakpoint”, ou seja, ponto de ruptura da resistência (tipicamente, entre 0,25 e 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$), representando as concentrações de antimicrobianos usadas em pacientes, constituindo padrões para definir as tensões de resistência, clinicamente³⁶.

Kostich e colaboradores³⁷ estudaram o potencial aumento da inibição bacteriana para alguns antimicrobianos, incluindo SMX e TMP; todavia, o SMX apresentou um “breakpoint” de 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e, a TMP, de 76 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.3 Espectrometria de massas para a determinação de fármacos, seus metabólitos e produtos de biodegradação em matrizes ambientais.

Muitas classes de fármacos têm sido detectadas em efluentes e águas de superfície. Entretanto, pouco se sabe sobre sua ocorrência, caminho e efeito prejudicial no meio ambiente. Isso faz deles um importante grupo de compostos considerados contaminantes emergentes³⁸.

Para entender o ciclo dos fármacos e seus metabólitos no meio ambiente, é essencial adquirir informação qualitativa e quantitativa sobre suas presenças no meio ambiente. Para tal, técnicas de espectrometria de massas, como LC-MS/MS, vêm se mostrando de grande eficiência na elucidação de estruturas de contaminantes-traço, metabólitos, produtos de degradação em complexas matrizes ambientais - em virtude de sua alta sensibilidade e habilidade em confirmar compostos^{38,39,40}.

Com a introdução de técnicas de ionização à pressão atmosférica, como a ionização electrospray (ESI), a técnica cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) passou a ter um papel crescente dentro da análise ambiental³⁸.

A ionização por electrospray gera íons através de um aerossol da solução amostra, aplicando uma carga voltaica através de uma sonda. Uma vez formado o spray do solvente contendo os compostos iônicos, estas gotas são rapidamente dessolvatadas por aquecimento ou banho de gás, ou ambos. À medida que o solvente evapora, os íons presentes nesta “gota carregada” são ejetados. Os íons são guiados eletrostaticamente para o orifício de entrada do analisador de massas⁴¹.

Tripla quadrupolos (QqQ) são usados extensamente para a quantificação, sensível e seletiva, de compostos conhecidos que mostram transições de massas específicas no modo monitoramento múltiplo de reações (MRM)³⁸.

No sistema MS/MS, um íon previamente separado no primeiro quadrupolo (Q1) é fragmentado no segundo quadrupolo (Q2), através da aplicação de uma frequência de ressonância elétrica e de choques com um gás inerte (N₂). Os fragmentos gerados no Q2, do íon selecionado no Q1, são separados por suas razões massa/carga (m/z) no terceiro quadrupolo (Q3) e direcionados ao sistema de detecção⁴².

Instrumentos de quadrupolo tridimensional, espectrometria de massas com trapeamento iônico (MS/MS_Q-Trap), permitem MS/MS em uma série de tempo seqüencial de isolamento de íon, fragmentação e trapeamento dos produtos formados. MS/MS_Q-Trap utiliza três eletrodos para isolar os íons, onde, um espectro de massas é gerado mudando-se as voltagens dos eletrodos para ejetar os íons para fora do trap. Estes instrumentos permitem etapas de fragmentação consecutivas (MSⁿ), o que é particularmente importante na identificação de novas combinações, pois, provê os caminhos de fragmentação que, em muitos casos, não se consegue com espectros obtidos com outros instrumentos^{28,38-27}.

A Figura 2 esquematiza o sistema MS/MS_Q-Trap, onde, no quadrupolo Q0 ocorre a focalização dos íons, no quadrupolo Q1 a seleção dos íons pela aplicação de corrente direta e radiofrequência e, o quadrupolo Q2 (ou célula de colisão) faz a fragmentação dos íons selecionados e os direciona ao Trap, onde os íons são trapeados e ejetados.

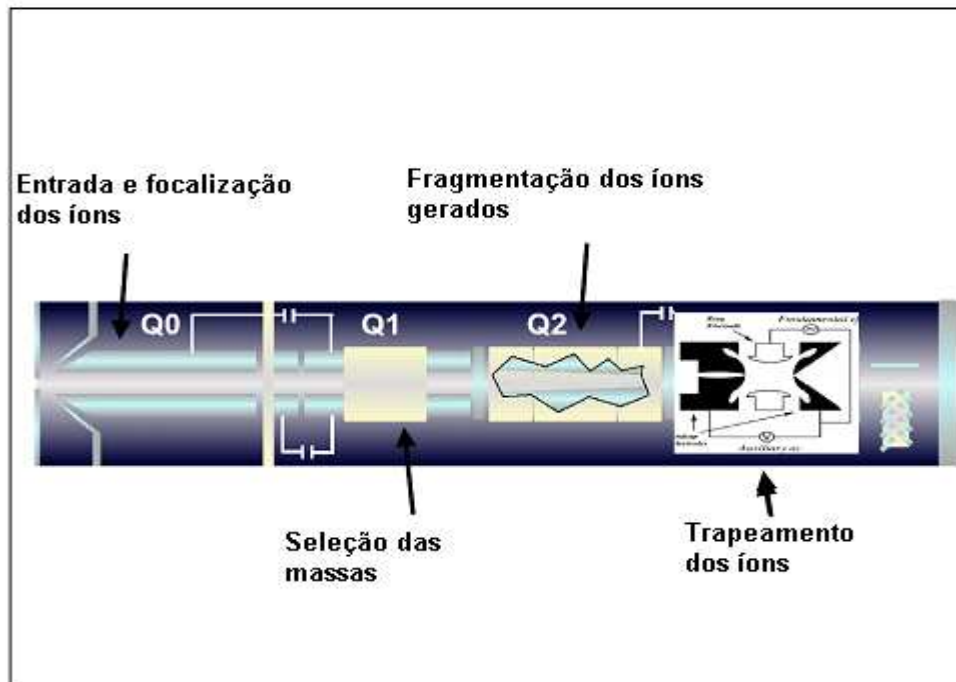


FIGURA 2. Esquema de um sistema de espectrometria de massas MS/MS com trapeamento iônico.

3.3.1 Determinação de SMX e TMP, seus metabólitos e produtos de degradação em matrizes ambientais

A ocorrência de resíduos de SMX e TMP em compartimentos ambientais tem sido amplamente investigada. Para avaliar seu risco ambiental há a necessidade da identificação destes compostos em várias matrizes ambientais⁴³.

Os principais metabólitos da TMP são os derivados ativos 1,3-óxidos, 3',4-hidroxi⁴⁴. Já no caso do SMX, o metabólito mais freqüentemente detectado no meio ambiente é o N4-acetilsulfametoxazol, que tem atividade antimicrobial reduzida^{1,14,15}.

Chang e colaboradores⁴³ utilizaram ESI-LC-MS/MS combinado com extração em fase sólida (SPE) para a determinação de 16 sulfonamidas e TMP em diversas matrizes aquosas. Os limites de detecção do método para os 17 analitos variaram de 8 a 60 pg L⁻¹, em água de rio. As recuperações médias globais foram de 62 - 102% em todas as matrizes estudadas.

Díaz-Cruz e colaboradores¹ utilizaram cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas quadrupolo linear com trapeamento iônico (LC-MS/MS_Q-Trap) para determinar nove sulfonamidas, dentre elas, SMX e um de seus metabólitos N4-acetilados, em águas ambientais (efluente, água de superfície e água subterrânea) e água mineral engarrafada. Neste estudo foram avaliadas três

diferentes estratégias de SPE para a eliminação dos componentes da matriz. Foram utilizados adsorventes sólidos (Oasis HLB e MCX) separadamente e de forma combinada. O método desenvolvido provou ser satisfatório para a determinação das sulfonamidas em todos os tipos de águas testadas. O método mostrou-se linear em uma larga faixa de concentração. Os limites de detecção encontrados para as sulfonamidas ficaram na faixa de 0,01 a 1,13 ng L⁻¹ e, para os metabólitos, 0,08 a 461 ng L⁻¹. As concentrações de SMX e TMP encontradas em compartimentos ambientais são mostradas nas Tabelas 1 e 2.

TABELA 1. Concentrações de SMX detectadas no meio ambiente, citadas na literatura consultada.

SULFAMETOXAZOL		
Fonte	Concentração µg L ⁻¹	Literatura
Efluente hospitalar	0,647	Zhang, <i>et al.</i> (2008) ⁴⁴
ETE Influyente	0,65	MCClure, <i>et al.</i> (2007) ⁴⁵
ETE Influyente	0,1444	Spongberg, <i>et al.</i> (2008) ⁴⁶
ETE Influyente	0,45	Choi, <i>et al.</i> (2007) ⁴⁷
ETE Influyente	7,91	Peng, <i>et al.</i> (2006) ¹⁹
ETE Efluente	0,304	Lindberg, <i>et al.</i> (2005) ³
ETE Efluentes	0,275	Spongberg, <i>et al.</i> (2008) ⁴⁶
ETE Efluente	9,46	Peng, <i>et al.</i> (2006) ¹⁹
ETE Efluente	0,29	MCClure, <i>et al.</i> (2007) ⁴⁵
Efluente	0,022	Zhang, <i>et al.</i> (2008) ⁴⁴
Esgoto	0,020	Zhang, <i>et al.</i> (2007) ⁴⁴
Esgoto	0,282	Zhang, <i>et al.</i> (2008) ⁴⁴
Água para consumo n/ tratada	0,023	Focazio, <i>et al.</i> (2008) ⁴⁸
Água de superfície	0,0006	Hordern, <i>et al.</i> (2008) ⁴⁹
Água de superfície	0,0006	Hordern, <i>et al.</i> (2008) ⁴⁹
Água de superfície	0,0709	Díaz-cruz, <i>et al.</i> (2008) ¹
Água de superfície	0,1 – 0,326	Heberer, <i>et al.</i> (2008) ⁵⁰
Água Subterrânea	0,0099	Díaz-cruz, <i>et al.</i> (2008) ¹
Água subterrânea	1,11	Barnes, <i>et al.</i> (2008) ⁵¹

TABELA 2. Concentrações de TMP detectadas no meio ambiente, citadas na literatura consultada.

TRIMETOPRIMA		
Fonte	Concentração $\mu\text{g L}^{-1}$	Literatura
Efluente hospitalar	0,025	Gómez, <i>et al.</i> (2006) ⁵²
Efluente hospitalar	1,04	Zhang, <i>et al.</i> (2008) ⁴⁴
ETE Influyente	0,171 – 0,57	Lacey, <i>et al.</i> (2008) ¹⁵
ETE Influyente	0,27	MCClure, <i>et al.</i> (2007) ⁴⁵
ETE Influyente	0,12	Gulkowska, <i>et al.</i> (2007) ¹¹
ETE Influyente	0,32	Gulkowska, <i>et al.</i> (2007) ¹¹
ETE Influyente	0,21	Gulkowska, <i>et al.</i> (2007) ¹¹
ETE Influyente	0,20	Gulkowska, <i>et al.</i> (2007) ¹¹
ETE Efluente	0,067 – 0,36	Lacey, <i>et al.</i> (2008) ¹⁵
ETE Efluente	0,321	Zhang, <i>et al.</i> (2008) ⁴⁴
ETE Efluente	0,26	MCClure, <i>et al.</i> (2007) ⁴⁵
ETE Efluente	0,17	Gulkowska, <i>et al.</i> (2007) ¹¹
ETE Efluente	0,14	Gulkowska, <i>et al.</i> (2007) ¹¹
ETE Efluente	0,23	Gulkowska, <i>et al.</i> (2007) ¹¹
Esgoto	0,803	Zhang, <i>et al.</i> (2008) ⁴⁴
Água para consumo n/ tratada	0,014	Focazio, <i>et al.</i> (2008) ⁴⁸
Água de superfície	0,007 – 0,049	Heberer, <i>et al.</i> (2008) ⁵⁰
Água de superfície	0,0297	Hordern, <i>et al.</i> (2008) ⁴⁹
Água de superfície	0,0368	Hordern, <i>et al.</i> (2008) ⁴⁹

Dodd e colaboradores⁵³ fizeram uso da técnica LC-MS para obter a informação estrutural dos produtos da transformação provenientes da cloração da TMP, simulando o processo utilizado na desinfecção da água para consumo humano e também no tratamento de efluente municipal.

Reações da TMP com cloro livre disponível, em pH 4, renderam um produto de m/z 325, que corresponde à estrutura da trimetoprima monoclorada considerando-se a presença de um pico de Cl isotópico. Outros produtos menos abundantes, incluindo m/z 359 (com 2 átomos de cloro) e 445 (com 4 átomos de cloro), foram também observados⁵³.

Reações da TMP com cloro livre disponível, em pH 7, forneceram uma ampla gama de produtos Cl⁻ e OH⁻ substituídos, com m/z 325 (1 Cl), 377 (2 Cl + 1 OH), 411 (3 Cl + 1 OH), 445 (4 Cl + 1 OH) e outros.

A Figura 3 mostra os produtos da transformação provenientes da reação da TMP com HOCl⁵³.

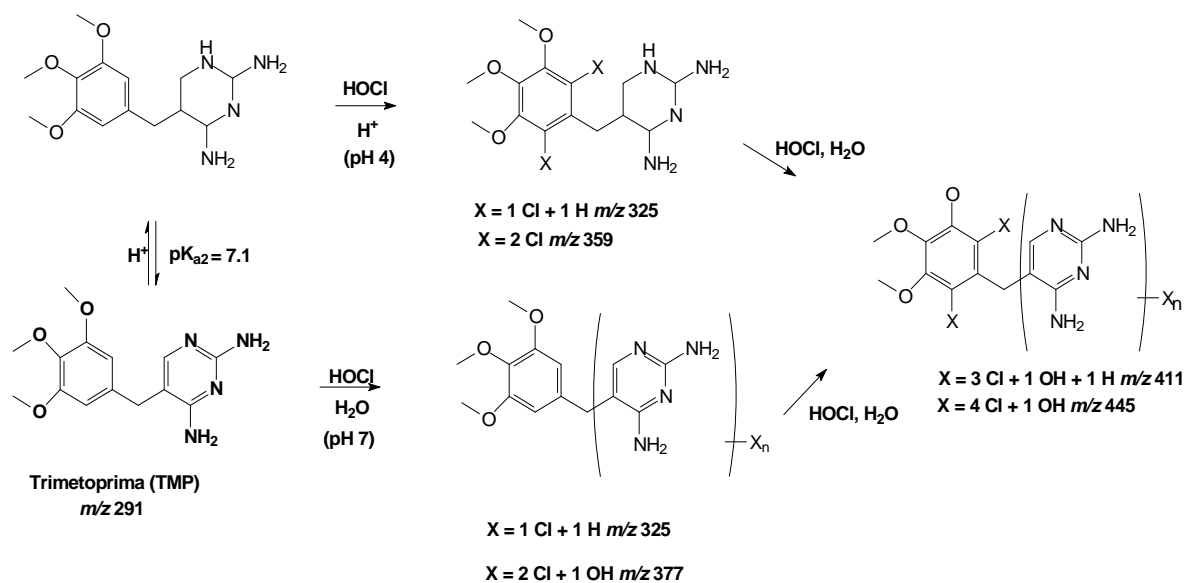


FIGURA 3. Principais produtos propostos e caminho da transformação para a reação da TMP com HOCl.

Eichhorn e colaboradores⁵⁴ identificaram dois produtos da degradação do antimicrobiano TMP (290 Da). A elucidação estrutural dos metabólitos, produzidos através do processo de nitrificação em tratamento com lodo ativado, em escala de bancada, foi realizada por espectrometria de massas com ionização eletrospray com trapeamento iônico, conduzindo-se etapas de fragmentação consecutivas (MS^n) combinadas com experimentos de troca Hidrogênio/Deutério. Um dos metabólitos encontrados foi α -hidroximetoprima (306 Da). O segundo metabólito é o produto da oxidação do anel aromático dentro da subestrutura da diaminopirimidina (324 Da). A precisão das medidas de massa dos dois metabólitos foram conferidas com espectrômetro de massas quadrupolar híbrido por tempo de voo (QqToF-MS), operando em modo MS/MS.

Na Figura 4, os autores mostram os espectros adquiridos nos modos MS^2 e MS^3 do metabólito de $m/z \text{ 325}$ ⁵⁴.

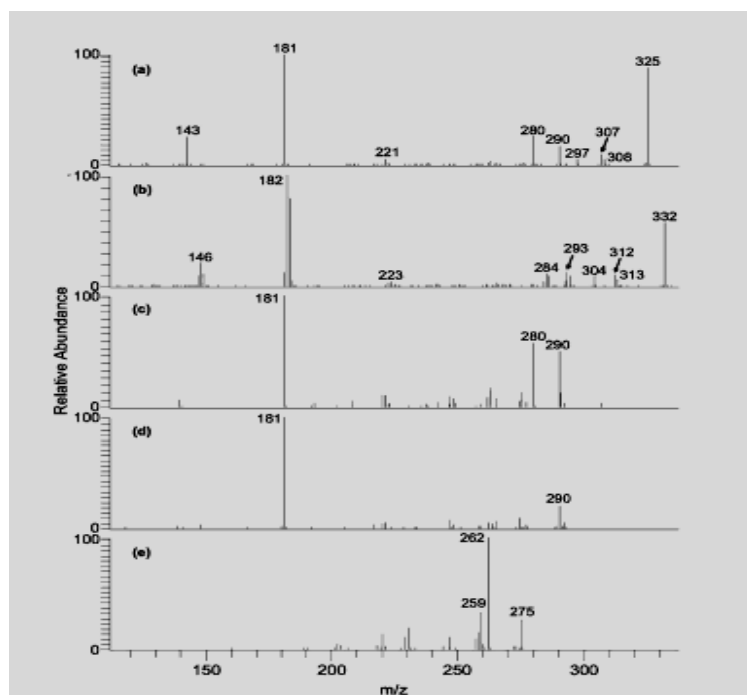


FIGURA 4. (a) (+)-ESI-MS² espectro do metabólito M324, $[M+H]^+ = m/z$ 325; (b) (+)-ESI-MS² espectro de M324 após troca H/D, $[M(D6) + D]^+ = m/z$ 332; (c) M324, (+)-ESI-MS³ de m/z 325 \rightarrow 308; (d) M324, (+)-ESI-MS³ de m/z 325 \rightarrow 307; (e) M324: (+)-ESI-MS³ de m/z 325 \rightarrow 290.

Hu e colaboradores⁵⁵ identificaram três intermediários do SMX gerados pela aplicação do processo de degradação fotocatalítica com TiO₂, fazendo uso para tal da técnica LC-MS/MS. O primeiro intermediário foi identificado como sendo o SMX hidroxilado, com $m/z = 270$ para MH^+ . O segundo intermediário foi identificado como SMX dihidroxilado, $m/z = 288$ para MH^+ . E, o terceiro intermediário, foi identificado como sendo o 3-amino-5-metilsoxazol $m/z = 99$ para MH^+ . Na Figura 5, pode-se observar os cromatogramas obtidos para estes intermediários⁵⁵.

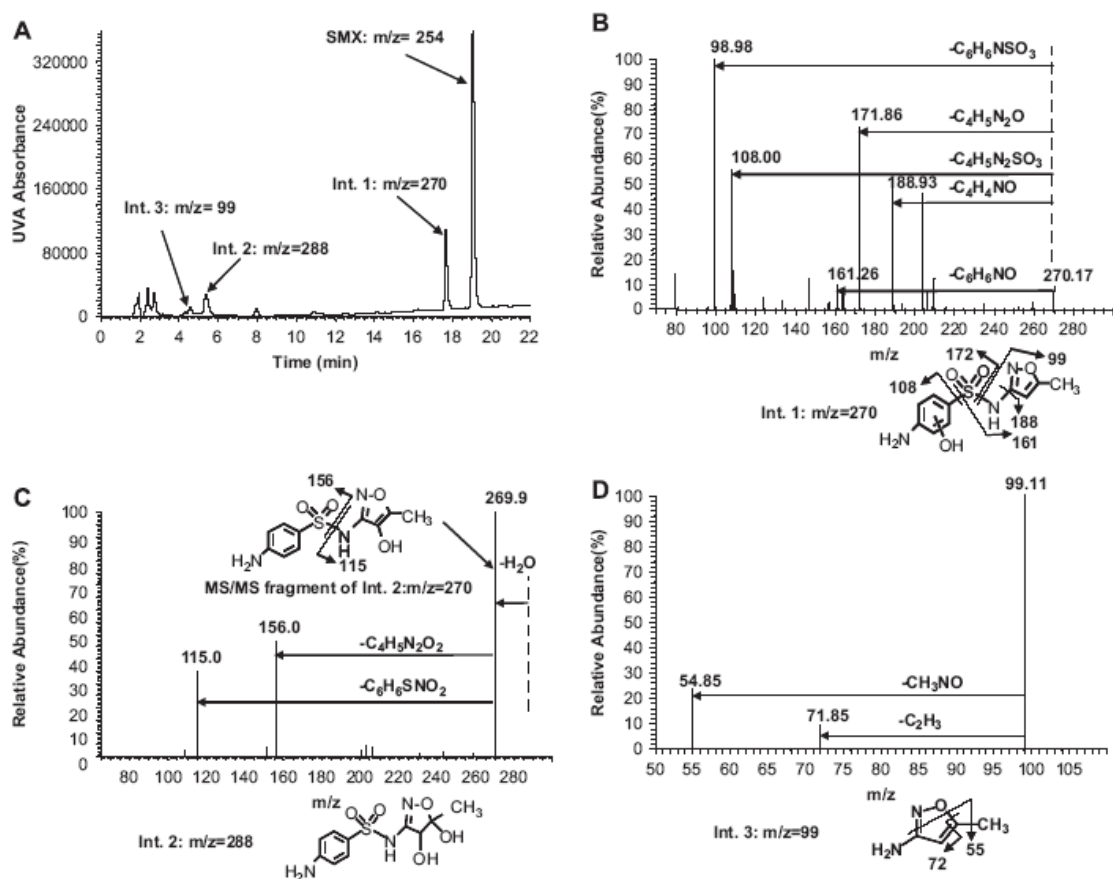


FIGURA 5. HPLC-PDA, cromatograma dos principais intermediários orgânicos identificados (a) e espectros de LC-MS/MS correspondentes (B-D); (b) MS/MS espectro do intermediário 1 ($m/z = 270$), SMX hidroxilado; (c) MS/MS espectro do intermediário 2 ($m/z = 288$), SMX dihidroxilado; (d) MS/MS espectro do intermediário 3 ($m/z = 99$), 3-amino-5-metilisoxazol.

3.4 Processos utilizados na degradação de fármacos

Processos avançados de oxidação (PAOs) constituem alternativa para o tratamento de efluentes contendo fármacos e outros contaminantes, podendo transformá-los em substâncias mais biodegradáveis, visando-se posterior tratamento biológico.

De modo geral, os PAOs baseiam-se na geração de espécies radicalares como o radical hidroxila ($\text{HO}\cdot$), que promove oxidação não seletiva, termodinâmica e cineticamente favorável, de espécies orgânicas, incluindo xenobióticos e micropoluentes⁵⁶. Os PAOs podem gerar $\text{HO}\cdot$ fazendo uso de oxidantes primários como O_3 e H_2O_2 , semicondutores como TiO_2 e radiação UV⁵⁷⁻⁶⁰.

Vasconcelos⁶¹ estudou a degradação do antimicrobiano ciprofloxacina aplicando processos avançados de oxidação a efluente hospitalar, sendo estes: processo fotoinduzido, fotocatalise heterogênea, ozonização e peroxone. Na aplicação de PAOs ao efluente do PA-HUSM, a oxidação fotoinduzida demonstrou ser muito mais lenta quando comparada aos outros processos: o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da ciprofloxacina durante degradação fotoinduzida foi de 2,5 h, enquanto que, durante os processos de fotocatalise heterogênea, peroxone e ozonização, o $t_{1/2}$ foi de 20, 15 e 9 min, respectivamente. Os melhores resultados obtidos para a ozonização na degradação de ciprofloxacina foram consequência da maior reatividade do fármaco com ozônio, do que com espécies radicalares formadas durante os processos. Porém, no que diz respeito à redução da DQO e absorvância integrada, os processos peroxone e fotocatalise heterogênea (maior geração de HO•) foram mais efetivos que os processos fotoinduzido e de ozonização (menor geração de HO•).

Frank⁶² construiu e avaliou fotorreatores catalisados na degradação de carga poluente e amoxicilina em efluente hospitalar, aplicando processo de fotocatalise heterogênea e processo foto-Fenton. Esta autora conclui que, o desempenho dos fotorreatores de discos rotativos e frasco de Dewar no tratamento do efluente hospitalar e de solução sintética de amoxicilina por processos de fotocatalise heterogênea e foto-Fenton, foram satisfatórios.

Abellán e colaboradores² estudaram a degradação fotocatalítica do SMX com suspensão aquosa de dióxido de titânio. Neste estudo, SMX em solução aquosa foi tratado com TiO₂ em suspensão, como catalisador, e irradiação de luz UV. As melhores condições de degradação do SMX e de redução de carbono orgânico total (COT) foram alcançadas quando a concentração de TiO₂ foi aumentada, chegando a um ponto ótimo situado entre 0,5 e 1,0 g TiO₂ L⁻¹. Nestas condições, obtiveram-se 82% de degradação de SMX e 23% de redução do COT.

Hu e colaboradores⁵⁵ aplicaram fotocatalise com TiO₂ para estudo da degradação do SMX e outros agentes antimicrobianos sulfonamidas. Os resultados mostraram que a fotocatalise acompanhada com irradiação UVA-TiO₂ é efetiva para degradação de micropoluentes sulfonamidas, em águas naturais que possuem pH alcalino ou baixas concentrações de matéria orgânica natural, ou ambas as condições.

3.5 Eletrocoagulação

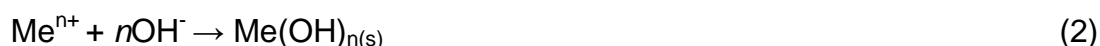
A eletrocoagulação (EC) é um processo que envolve complexos fenômenos químicos e físicos que usam o consumo de eletrodos para prover íons em solução⁶. A EC envolve a geração do coagulante *in situ* pela dissolução do metal do ânodo com a simultânea formação de OH[·] e gás hidrogênio no cátodo. Este processo produz os hidróxidos correspondentes de alumínio ou ferro, dependendo do eletrodo utilizado, e/ou polihidróxidos. A geração do gás ajuda na flotação das partículas floculadas à superfície da solução^{6,63,64}. Em resumo, o processo de EC envolve três estágios sucessivos^{6,65}:

1 – formação do coagulante por oxidação eletrolítica do “eletrodo de sacrifício”. A reação pode ser observada na equação 1.

2 – desestabilização dos contaminantes, partículas em suspensão e quebra de emulsões, onde a redução eletroquímica direta dos cátions do metal (Meⁿ⁺) pode ocorrer na superfície do cátodo:



Além disso, os OH[·] formados no cátodo aumentam o pH do efluente induzindo assim a precipitação de íons do metal, como os hidróxidos correspondentes. A equação 2 exemplifica a reação.



3 – agregação das fases desestabilizadas para a formação dos flocos.

Íons do metal anódico e OH[·] gerados na superfície do eletrodo reagem no efluente para formar vários hidróxidos e polímeros: Equações 3 e 4, hidróxidos de alumínio formados pela reação de OH[·] com o Al⁺³ proveniente do eletrodo.



Entretanto, dependendo do pH do meio aquoso, outras espécies iônicas como Al(OH)₂⁺ dissolvido, Al₂(OH)₂⁴⁺ e Al(OH)₄⁻ e hidroxocomplexos podem estar

presentes no sistema. O hidróxido de alumínio em suspensão pode remover poluentes da solução por sorção, co-precipitação ou atração eletrostática.

O mecanismo de desestabilização dos contaminantes, partículas em suspensão e quebra das emulsões pode ser descrito como segue:

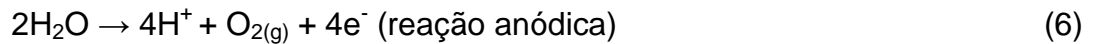
- Compressão da dupla camada difusa ao redor das espécies carregadas pelas interações dos íons gerados por oxidação do ânodo de sacrifício;
- Neutralização das cargas das espécies presentes no efluente por contra-íons produzidos pela dissolução eletroquímica do ânodo de sacrifício. Estes contra-íons reduzem a repulsão eletrostática inter-partículas, fazendo com que, a atração de Van der Waals predomine, ocorrendo a coagulação. Uma carga zero resulta no processo;
- Os flocos formados como resultado da coagulação criam uma manta de lodo que atrai e adsorve as partículas coloidais que ainda permanecem em meio aquoso.

Os óxidos sólidos, hidróxidos e oxihidróxidos provêm superfícies ativas para a adsorção das espécies poluentes⁶.

Neste processo de EC, um potencial é aplicado aos ânodos de metal, tipicamente fabricados de alumínio ou ferro, causando duas reações separadas:

1 – Fe/Al é dissolvido do ânodo gerando íons dos metais correspondentes, que hidrolisam quase que imediatamente em ferro polimérico ou hidróxido de alumínio^{6,63}. Estes hidróxidos poliméricos são excelentes agentes coagulantes. Os eletrodos de sacrifício, ânodos de metal, são usados para produzir continuamente hidróxidos poliméricos na redondeza do ânodo. A coagulação ocorre quando cátions de metal combinam-se com as partículas negativas levadas ao ânodo por movimento eletroforético. Contaminantes presentes no efluente são tratados por reações químicas e precipitação física e química, formando materiais coloidais que são gerados pela erosão do eletrodo. Estes contaminantes são removidos por eletroflotação, ou sedimentação e filtração⁶.

2 – A água é também eletrolisada em uma reação paralela produzindo pequenas bolhas de oxigênio no ânodo e hidrogênio no cátodo. Estas bolhas atraem as partículas floculadas e, por flutuabilidade natural, faz com que flitem para a superfície os contaminantes floculados⁶. As reações observadas na eletrólise da água são demonstradas nas equações 5 e 6⁶⁵:



Além disso, as seguintes reações físico-químicas podem acontecer na cela de EC⁶:

- Redução catódica das impurezas presentes no efluente;
- Descarga e coagulação das partículas coloidais;
- Migração eletroforética dos íons em solução;
- Eletroflotação das partículas coaguladas por bolhas de O₂ e H₂ produzidas nos eletrodos;
- Redução de íons metal no cátodo;
- Outros processos eletroquímicos e químicos.

A tecnologia de EC oferece uma alternativa ao uso de sais de metal ou polímeros e adição de polieletrólito para quebrar emulsões estáveis e suspensões. É uma tecnologia de remoção de metais, partículas sólidas coloidais e contaminantes inorgânicos solúveis em meios aquosos, introduzindo espécies de hidróxido de metal e polímeros altamente carregados⁶.

Como vantagens, esta técnica apresenta⁶:

- EC requer equipamento simples e é fácil de operar;
- Efluente tratado por EC resulta em água incolor e inodora;
- O lodo formado por EC tende a ser prontamente sedimentável e fácil de ser depositado, porque é composto principalmente de óxidos e hidróxidos metálicos;
- Os flocos formados por eletrocoagulação são semelhantes aos formados na floculação química, só que muito maiores, com menos água adsorvida; são resistentes e mais estáveis, permitindo rápida separação por filtração;
- A EC produz efluente com menor conteúdo de sólidos totais dissolvidos comparando com tratamentos químicos;
- O processo de EC tem a vantagem de remover as partículas coloidais menores, visto que o campo elétrico aplicado as põe rapidamente em movimento, facilitando assim a coagulação;
- O processo de EC evita o uso de substâncias químicas, sendo assim, não há possibilidade de poluição secundária por estas substâncias, como quando a coagulação química é usada;

- As bolhas de gás produzidas durante a eletrólise podem levar o poluente ao topo da solução, onde pode ser facilmente concentrado, coletado e removido;
- O processo eletrolítico na cela de EC é eletricamente controlado, requerendo, desta forma, pouca manutenção;

Como desvantagens têm-se⁶:

- Os “eletrodos de sacrifício” são dissolvidos dentro do efluente, como resultado da oxidação, precisando ser substituídos regularmente;
- O uso de eletricidade pode ser financeiramente inviável;
- Um filme de óxido impermeável pode ser formado no cátodo levando à perda de eficiência da unidade de EC;
- Alta condutividade da suspensão do efluente é requerida;
- Hidróxido gelatinoso pode permitir solubilização, em muitos casos;
- No caso da remoção de compostos orgânicos, alguns compostos clorados tóxicos podem ser formados *in situ*, no caso de presença de cloro;
- Se estiverem presentes fenóis, metabólitos de algas e produtos de decomposição em geral (ex. cloro), pode surgir gosto e/ou odor desagradável.

Na Figura 6 encontra-se o diagrama esquemático de um sistema de eletrocoagulação.

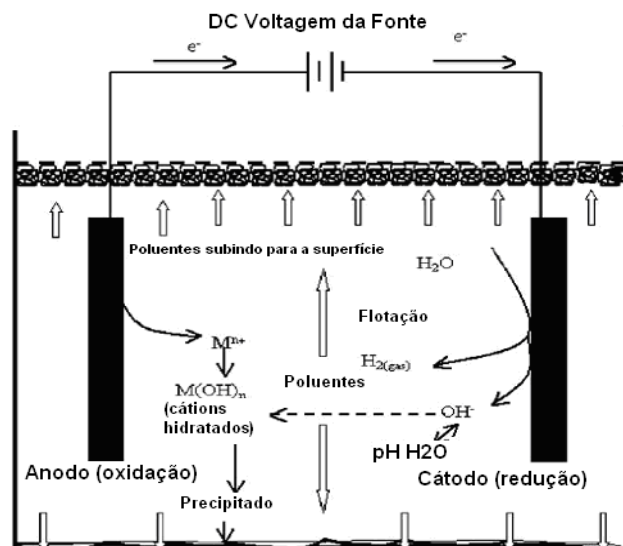


FIGURA 6. Diagrama esquemático de um sistema de eletrocoagulação

3.5.1 Aplicações da eletrocoagulação

Henriques⁶⁶ utilizou o processo de eletrocoagulação no estudo da degradação de nonilfenol polietoxilado; em apenas 15 minutos de reação alcançou redução de nonilfenol e de DQO da ordem de 95 e 50%, respectivamente.

Morales e colaboradores⁶⁷ avaliaram a remoção de poluentes orgânicos de efluente industrial da produção de macarrão e biscoitos através de eletrocoagulação combinada com H₂O₂, fazendo uso de reator em escala piloto. Nas condições ótimas, o método eletroquímico rendeu uma remoção muito efetiva da poluição orgânica. Redução de 90% da DQO e de 96% da demanda bioquímica de oxigênio (DBO); sólidos totais 95% e coliformes fecais 99,9%.

Ghosh e colaboradores⁶⁸ aplicaram eletrocoagulação com eletrodos de alumínio na redução de Fe (II) em água. Foi obtida uma satisfatória redução de Fe (II), em torno de 99,2%, em 35 minutos de tratamento da concentração inicial de 25 mg L⁻¹ de Fe (II).

Ugurlu e colaboradores⁶⁹ investigaram a aplicação do processo de eletrocoagulação em efluente de indústria de papel; a remoção de lignina, fenol, DQO e DBO foram avaliadas em várias intensidades de corrente, utilizando-se eletrodos de alumínio e ferro, e vários tempos de eletrólise (1,0; 2,5; 5,0 e 7,5 min). Foi observado que os experimentos feitos com 12 V e intensidade de corrente de 77,13 mA são suficientes para remoção dos poluentes com ambos os eletrodos. No processo utilizando eletrodos de alumínio, a capacidade de remoção do processo foi de 80% da lignina, 98% do fenol, 70% da DBO e 75% da DQO, após 7,5 min. Utilizando-se eletrodos de ferro, as capacidades de remoção foram de 92, 93, 80 e 55%, respectivamente.

3.6 Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO)

Em química ambiental, o parâmetro DQO é comumente usado para medir, indiretamente, a carga de compostos orgânicos presentes em águas residuárias e superficiais, como também, no monitoramento de estações de tratamento de efluentes líquidos^{70,71}.

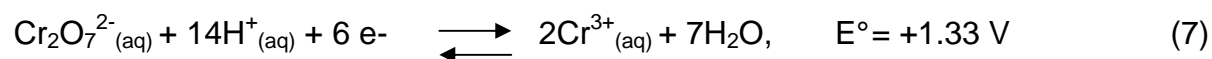
Efluentes municipais e industriais, geralmente, são ricos em matéria orgânica. Esta matéria orgânica é consumida pelas bactérias e algas presentes em fontes de água potável e isto leva a um aumento na concentração destes microorganismos. Além da matéria orgânica, efluentes também contém compostos orgânicos e inorgânicos oxidáveis que, diretamente e indiretamente, consomem o oxigênio livre presente. Este processo é chamado eutroficação e, pode, eventualmente, aniquilar outros organismos vivos (plantas, animais e insetos) em sistemas aquáticos, que requerem alta oxigenação. Conseqüentemente, governos fazem um controle estrito destes poluentes que demandam oxigênio, fixando padrões para níveis máximos de “demanda de oxigênio” para todas as descargas de efluente⁶⁴.

A DQO é uma medida da quantidade de oxigênio usada na oxidação química da matéria orgânica e inorgânica presente no efluente^{64,71}. Contudo, os compostos que contribuem para a DQO são: compostos orgânicos biodegradáveis, compostos não biodegradáveis e compostos inorgânicos oxidáveis⁶⁴.

A DQO pode ser determinada de duas maneiras: método titulométrico ou colorimétrico. No caso do método titulométrico, sua principal vantagem é a possibilidade de sua utilização em amostras de elevada turbidez e cor residual, após a digestão com dicromato. As desvantagens incluem o consumo e preparo de agente titulante e indicador, o uso de vidraria adicional e a potencial relativização do ponto final da titulação, ou seja, cada analista pode ter uma percepção diferente do ponto de mudança de cor que determina o término da titulação com o sulfato ferroso amoniacal⁷¹. Ademais, o uso de reagente tóxicos vem inibindo o seu emprego.

Por sua vez, a grande restrição ao método colorimétrico reside no fato de poder ser usado somente para amostras que não exibam turbidez ou cor (principalmente, com absorção máxima em torno de 600 nm), persistentes após a digestão da amostra⁷¹.

Todavia, os métodos tradicionais para a determinação da DQO confiam na ação de um oxidante forte como íons permanganato ou dicromato. A decomposição do dicromato durante a oxidação de cargas orgânicas pode ser expressa como determinado na equação⁷²:



Martins e colaboradores⁷³ desenvolveram método de determinação da DQO por deconvolução espectrofotométrica UV-visível, aplicável a efluente hospitalar e assemelhados, que evita o uso de dicromato e demais reagentes tóxicos, com dispensa de gastos com reagentes químicos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

A parte experimental deste trabalho foi realizada no LATER (Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Efluentes e Resíduos) e no LAMIC (Laboratório de Análises Micotoxicológicas), ambos da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. Todos os aparelhos e equipamentos utilizados são propriedade destes laboratórios.

4.1.1 Aparelhos e acessórios

- Fonte de corrente elétrica Apparatus Corporation® modelo EC570;
- Eletrodos de alumínio comercial, de área superficial de 62,65 cm²;
- Reator de eletrocoagulação cilíndrico com diâmetro interno de 9,50 cm, altura 18 cm e capacidade de 1 L;
- Agitador magnético Hanna Instruments® (www.hannainst.com.br), modelo HI190M;
- Bomba de vácuo Weg modelo B481194 (<http://www.weg.com.br>);
- Bloco digestor Licit® modelo Dry Block (www.licit.com.br);
- Cromatógrafo Agilent Série 1200, equipado com bomba binária, degaseificador, autosampler, forno para coluna (www.home.agilent.com);
- Espectrômetro de massas API 4000 Q-Trap – Applied Biosystems equipado com fonte de ionização eletrospray (www.appliedbiosystems.com.br);
- Bomba de infusão Harvard Apparatus (www.harvardapparatus.com).

4.1.2 Reagentes e Soluções

As soluções-padrão de trabalho de ambos os analitos, SMX e TMP, foram feitas com substâncias adquiridas em farmácia de manipulação local, com pureza de 98,5 e 101,0%, respectivamente. As soluções de trabalho foram feitas em uma concentração de 1000 mg L⁻¹ por meio de diluição dos princípios ativos em metanol.

Para os experimentos de eletrocoagulação, o eletrólito escolhido foi cloreto de sódio (NaCl) Synth® p.a., com teor de pureza de 99,0% (<http://www.synth.com.br>).

As soluções para a determinação da DQO foram preparadas conforme o manual Standard Methods⁷⁰.

Demais solventes e reagentes utilizados foram de grau HPLC.

4.2 Métodos

4.2.1 Coleta e preparo da amostra

Os experimentos foram realizados utilizando-se amostras do efluente gerado pela seção de pronto atendimento do Hospital Universitário da Universidade de Santa Maria (PA-HUSM). O efluente foi coletado após passar por um sistema de tratamento dotado de uma fossa séptica tipo doméstica e um filtro anaeróbio. As coletas foram realizadas 4 vezes ao dia (8:00, 12:00, 16:00, 20:00 h), durante 7 dias, de segunda a domingo. Após a coleta, as amostras foram homogeneizadas, filtradas em filtro qualitativo de porosidade (14 µm), filtradas à vácuo em filtro de membrana de porosidade (0,45 µm) e a concentração dos antimicrobiais foi determinada em cada dia de coleta. As amostras foram analisadas diretamente, sem passar por etapas de pré-concentração.

4.2.2 Determinação de SMX e TMP por LC-MS/MS_Q-Trap operando em modo linear

As condições cromatográficas, utilizadas para a determinação analítica da concentração dos antimicrobiais, foram as seguintes: coluna cromatográfica Eclipse XDB-C18 (5 µm; 4,6 x 150 mm) e fase móvel Metanol:H₂O:ácido acético, nas proporções 49,5:49,5:1 v/v/v, e acetato de amônio 1 mmol L⁻¹, conforme **Nebot e colaboradores**⁷⁴. Operou-se com vazão de 600 µL min⁻¹ e tempo de corrida de 5 min. O forno da coluna foi mantido na temperatura de 30 °C, conforme **Babic e colaboradores**²³. O volume de injeção utilizado foi de 5 µL.

A curva analítica foi construída com as soluções-padrão dos analitos, através de diluições da solução-padrão de trabalho de concentração de 1000 mg L⁻¹, em fase móvel.

A otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas foi feita através de infusão direta de solução-padrão dos analitos SMX e TMP em uma concentração de 100 µg L⁻¹.

As condições da fonte de ionização electrospray foram otimizadas através de injeção em fluxo da solução-padrão de 100 µg L⁻¹ de SMX e TMP. Estas condições foram otimizadas para os dois analitos em solução sintética, ionizados ao mesmo tempo; sendo assim, foi feita uma média das melhores condições dos parâmetros para a ionização de ambos.

Para a determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) utilizou-se como parâmetro de avaliação a relação sinal/ruído, por meio de injeção dos padrões analíticos dos compostos de interesse, em triplicata, visando alcançar 3 vezes a relação sinal/ruído para a detecção e 10 vezes a relação sinal/ruído para a quantificação, conforme descrito por **Lacey e colaboradores**¹⁵.

Para a validação do método fez-se a fortificação da amostra de efluente com alíquotas de padrões de concentração conhecida, em três níveis (triplicatas para cada nível), medindo-se, também, em triplicata, a concentração atribuída ao efeito da matriz, descontando-se as concentrações existentes dos analitos, para a quantificação das amostras fortificadas. Os testes foram realizados em diferentes dias, assim como reportado na literatura^{15,75}.

O *software* Analyst 1.4.2, foi usado na aquisição e no tratamento dos dados.

4.2.3 Identificação dos metabólitos e produtos de degradação do SMX e TMP LC-MS/MS_Q-Trap operando em modo trapeamento iônico

Para a identificação dos metabólitos no efluente do PA-HUSM, bem como para o estudo dos produtos de degradação de ambos os antimicrobiais pela aplicação do processo de eletrocoagulação em solução sintética, desenvolveram-se experimentos de informação dependente da aquisição (IDA). O volume de injeção utilizado foi de 25 µL.

A coleta e o preparo das amostras não sofreram alterações e estão descritas no item **4.2.1**; da mesma forma, as condições cromatográficas utilizadas na identificação dos metabólitos e produtos da degradação são as descritas no item **4.2.2**.

Para o estudo da remoção/degradação dos antimicrobiais SMX e TMP no efluente hospitalar do PA-HUSM por meio da aplicação de EC fez-se a fortificação do efluente com ambos os compostos. Em 1 litro de efluente, em pH 7 (pH de

origem do efluente), adicionou-se 1 mg L^{-1} de ambos antimicrobiais e aplicou-se o processo de eletrocoagulação.

A Figura 7 mostra a fotografia do sistema de LC-MS/MS_Q-Trap utilizado nas análises.

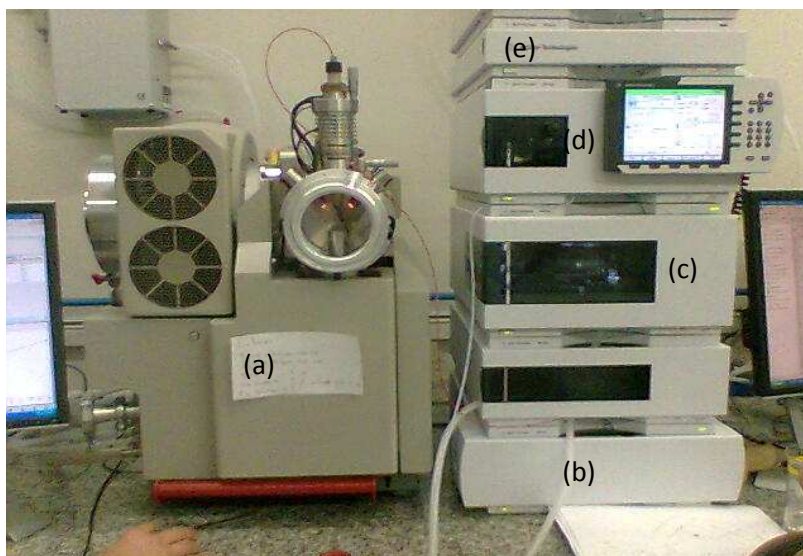


FIGURA 7. (a) Espectrômetro de massas API 4000 Q-Trap; (b) Forno para coluna; (c) Autosampler; (d) Bomba binária; (e) Desgaseificador.

4.2.4 Processo de avaliação da determinação da DQO

As determinações da DQO foram feitas conforme o Standard Methods⁷⁶.

Para o estudo das melhores condições experimentais do processo de eletrocoagulação utilizou-se planejamento fatorial com superfície de resposta, em que a redução da DQO do efluente hospitalar (após a aplicação do processo) foi usada como parâmetro para a avaliação do processo de eletrocoagulação com relação aos antimicrobiais em estudo.

O planejamento fatorial foi realizado utilizando-se o programa Statistic.

4.2.5 Descrição do sistema de eletrocoagulação

Na Figura 8 está representado o sistema utilizado para o processo de eletrocoagulação. Empregou-se reator em batelada, cilíndrico, com capacidade de 1 litro, com agitação magnética. Os eletrodos foram mantidos paralelos através de

separador de material polímero não condutor. Antes de cada experimento os eletrodos foram tratados segundo **Mouedhen e colaboradores**⁷⁷. A fotografia do sistema pode ser observada.

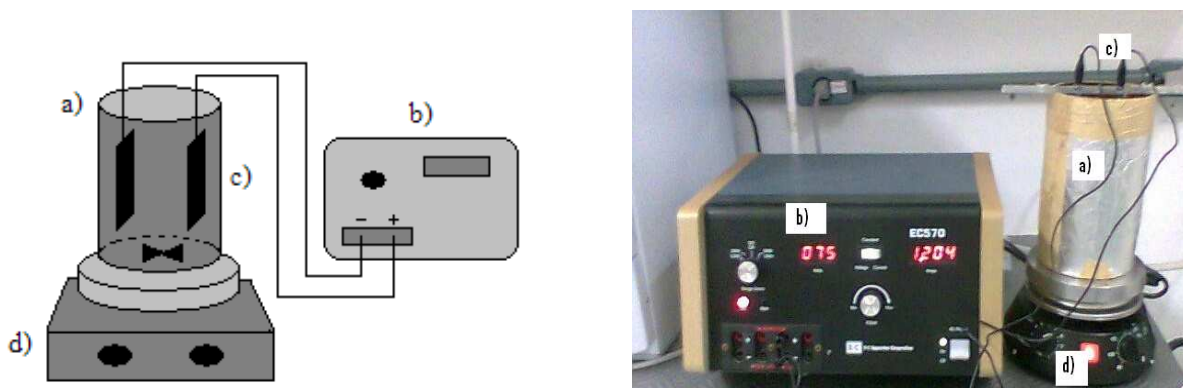


FIGURA 8. Sistema reacional de eletrocoagulação: a) reator; b) fonte de corrente contínua; c) eletrodos e d) agitador magnético.

4.2.6 Descrição do sistema de extração por Soxhlet dos antimicrobiais SMX e TMP

Na Figura 9 está representado o sistema utilizado para a extração dos compostos possivelmente adsorvidos no lodo gerado na eletrocoagulação. Utilizou-se manta de aquecimento, balão de vidro com capacidade para 200 mL, câmara de extração e condensador.

O lodo gerado na EC foi filtrado em papel filtro qualitativo de porosidade 14 μm , pesado e submetido a extração com 150 mL de metanol, por 4 horas. A foto correspondente pode ser observada ao lado do esquema.

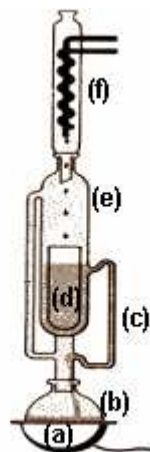


FIGURA 9. Extração Soxhlet. (a) manta de aquecimento; (b) balão de fundo redondo (200 mL) com solvente; (c) sifão; (d) cartucho de amostras; (e) câmara de extração; (f) condensador.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Adequação dos parâmetros do espectrômetro de massas e da fonte de ionização

Os resultados obtidos pela adequação (otimização) dos parâmetros do espectrômetro de massas por infusão direta dos analitos SMX e TMP são mostrados na Tabela 3.

TABELA 3. Parâmetros otimizados do espectrômetro de massas dependentes do analito.

Analito	Íon Precursor (<i>m/z</i>)	Íon Produto (<i>m/z</i>)	Potencial de Entrada (V)	Potencial de Declustering (V)	Energia de Colisão (V)	Potencial de Saída da Célula (V)
SMX	254,0	155,8/108,0	10	56	25/35	8/6
TMP	291,2	230,0/123,1	10	80	30/35	3/6

O íon precursor de *m/z* 254 é proveniente da ionização do SMX de massa 253 Da, mais o hidrogênio ionizável $[M + H]^+$. Os produtos da fragmentação do SMX que se apresentaram com maior intensidade, *m/z* 155,8 e *m/z* 108,0, estão de acordo com os encontrados por **Díaz-Cruz e colaboradores**⁷⁸, sendo que eles foram usados na análise quantitativa e qualitativa deste composto. Na Figura 10 pode-se observar o espectro de massas seqüencial (MS/MS) obtido por infusão direta do padrão de SMX na concentração de 100 µg L⁻¹, onde podemos observar o íon precursor e seus fragmentos.

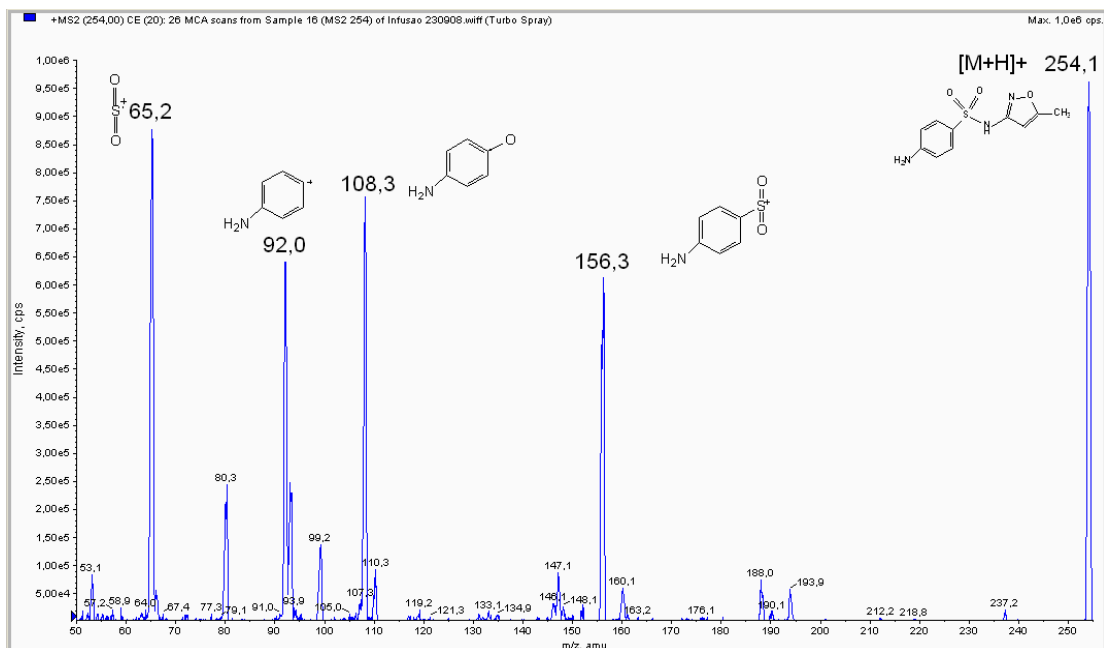


FIGURA 10. Espectro MS/MS obtido através da infusão direta da solução padrão de SMX.

A TMP tem como íon precursor a m/z 291,2, proveniente da ionização da sua massa 290,2 Da com o hidrogênio ionizável $[M+H]^+$. Os produtos da fragmentação da TMP, que apresentaram maior intensidade e que foram usados para análise quantitativa e qualitativa deste composto, foram aqueles de m/z 230,0 e m/z 123,1, respectivamente. Eles são os mesmos encontrados por **Barbarin e colaboradores**²⁷ e por **Eichhorn e colaboradores**⁵⁴. A Figura 11 mostra o espectro MS/MS obtido por infusão direta da solução padrão de TMP com o íon precursor e seus respectivos produtos da fragmentação.

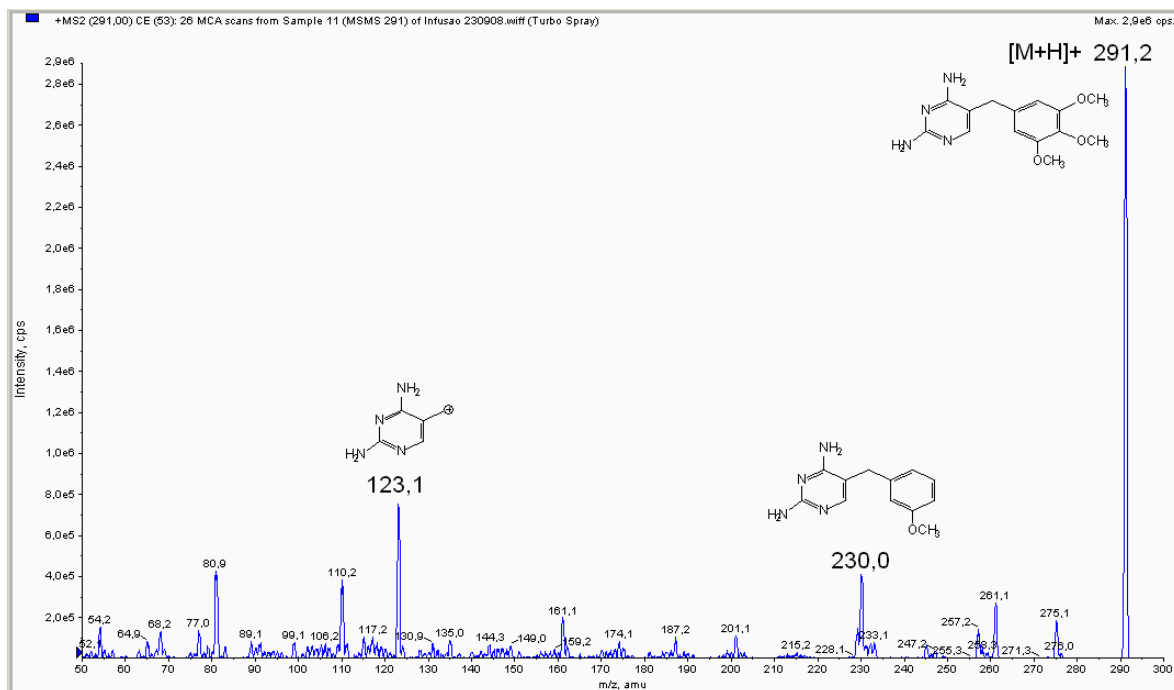


FIGURA 11. Espectro MS/MS obtido através da infusão direta da solução padrão de TMP.

A ionização dos analitos foi feita no modo positivo $[M+H]^+$ através de uma fonte de ionização electrospray. As condições otimizadas da fonte de ionização são apontadas na Tabela 4.

TABELA 4. Condições otimizadas da fonte de ionização para SMX e TMP através de injeção em fluxo.

Parâmetro	Condição otimizada
Gás de colisão	Baixa
Gás cortina	35 psi
Gás da fonte de íons 1	45 psi
Gás da fonte de íons 1	50 psi
Temperatura	500 °C
Voltagem do spray de íons	1500 V

5.2 Determinação de SMX e TMP por LC-MS/MS_Q-Trap operando em modo linear

As condições cromatográficas utilizadas foram citadas no item 4.2.2. A otimização do método cromatográfico foi feita testando-se diferentes gradientes de fase móvel e diferentes concentrações de acetato de amônia. Observou-se que este interfere na forma do pico da TMP, assim como, também, no seu tempo de retenção. Após várias tentativas chegou-se à melhor condição para a corrida cromatográfica dos compostos, no menor tempo de corrida alcançado (5 minutos), sem comprometimento da eficiência analítica. O mesmo tempo foi conseguido por **Akay e colaboradores**⁷⁵ na determinação de SMX e TMP em formulações farmacêuticas.

A faixa linear dinâmica utilizada para o levantamento da curva analítica foi estabelecida levando-se em consideração a linearidade do método e a faixa de concentração necessária para a quantificação dos compostos no efluente hospitalar, com o necessário rigor analítico. A Tabela 5 mostra os níveis de concentração da curva analítica para SMX e TMP.

TABELA 5. Curva analítica para a determinação de SMX e de TMP

SULFAMETOXAZOL			TRIMETOPRIMA	
Curva Analítica $\mu\text{g L}^{-1}$	Concentração Lida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Exatidão %	Concentração estimada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Exatidão %
0,5	0,54	108,0	0,48	96,8
1,0	0,94	94,3	1,11	111,0
2,5	2,64	106,0	2,28	91,3
5,0	4,64	92,7	4,60	92,1
10,0	10,40	104,0	10,60	106,0
25,0	23,40	93,7	24,90	99,5
50,0	50,10	100,0	50,30	101,0
100,0	101,00	101,0	99,70	99,7

As curvas analíticas construídas para o SMX e para a TMP apresentaram coeficiente de correlação superior à 0,9995. Segundo **Ribani e colaboradores**⁷⁹, um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. Nas Figuras 12 e 13 estão representadas curvas analíticas típicas, levantadas para SMX e TMP, respectivamente.

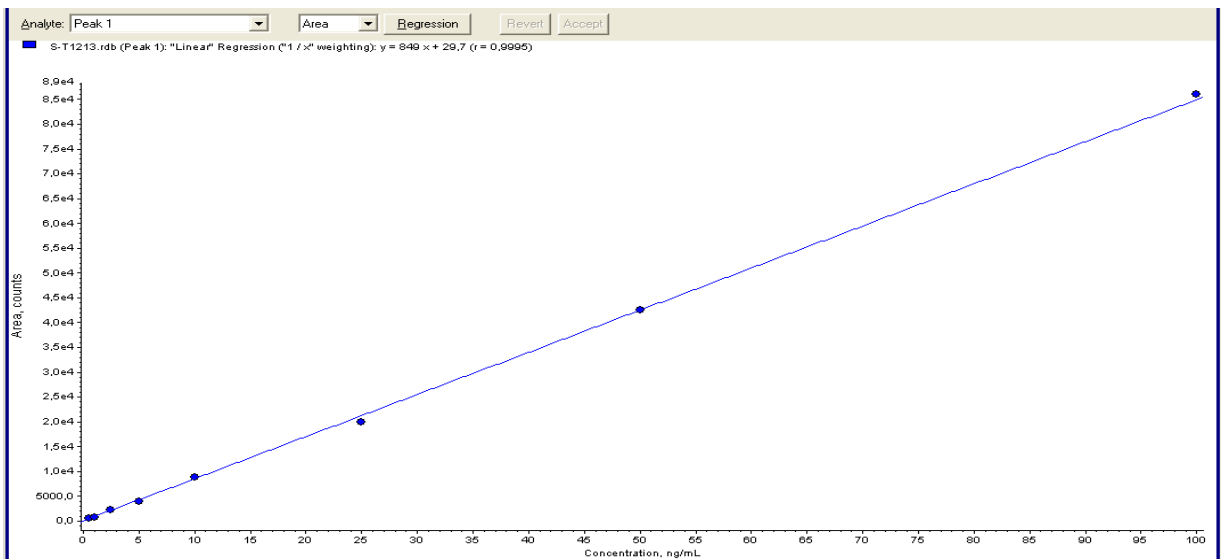


FIGURA 12. Curva analítica levantada para SMX

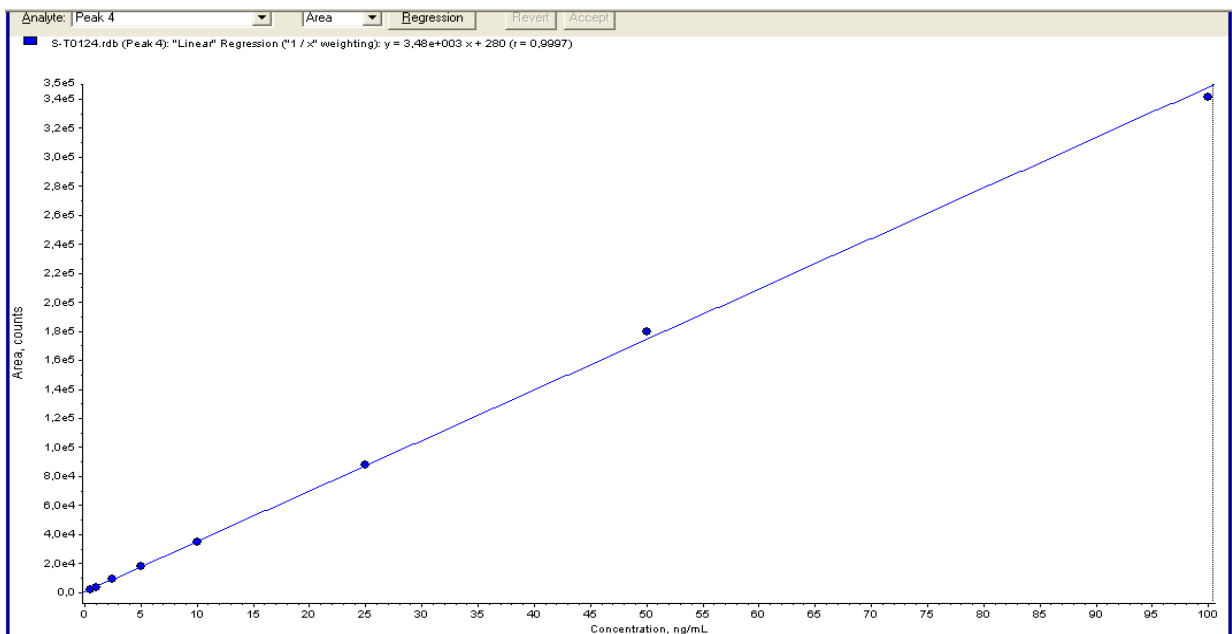


FIGURA 13. Curva analítica levantada para TMP

Na Figura 14 tem-se um cromatograma de íons extraídos (XIC) dos respectivos analitos, em solução-padrão, na concentração de $25,0 \mu\text{g L}^{-1}$, em que podem ser observados os tempos de retenção de cada um dos compostos, assim como, os dois pares de fragmentos empregados para a quantificação e confirmação, de cada composto.

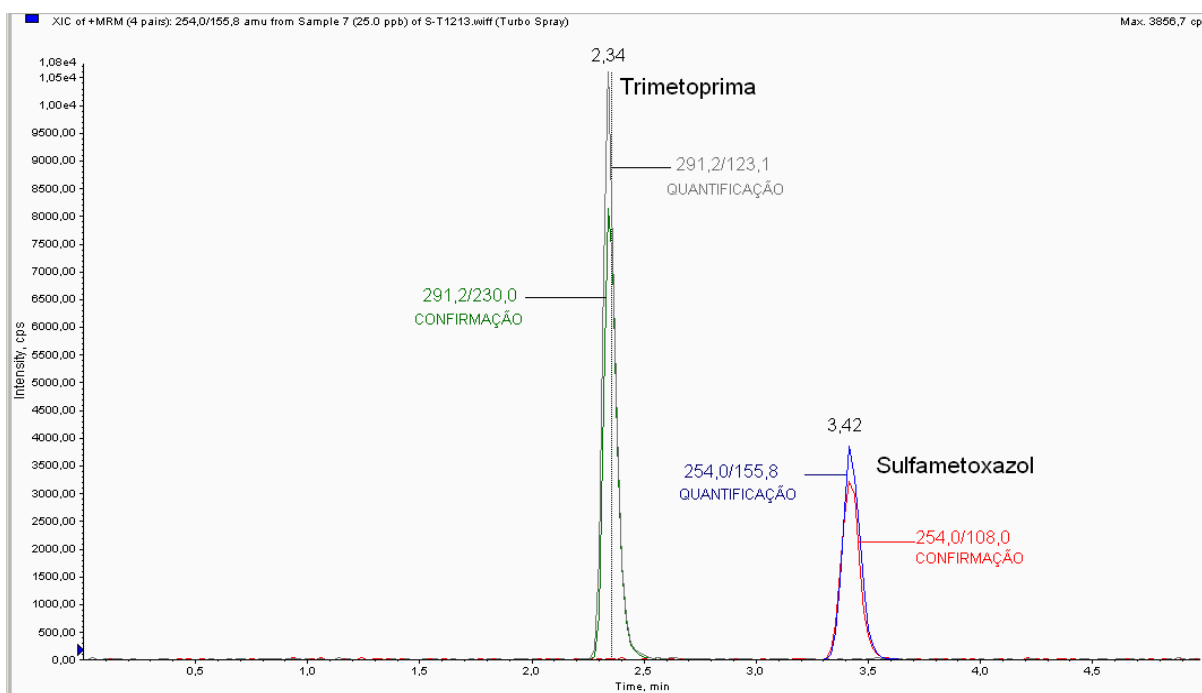


FIGURA 14. Cromatograma XIC dos analitos SMX e TMP obtido por LC-MS/MS

No cromatograma XIC da Figura 15 podem ser observados os picos referentes aos analitos SMX e TMP de uma amostra real de efluente hospitalar, em que foram determinadas as concentrações de $14,8$ e $7,3 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

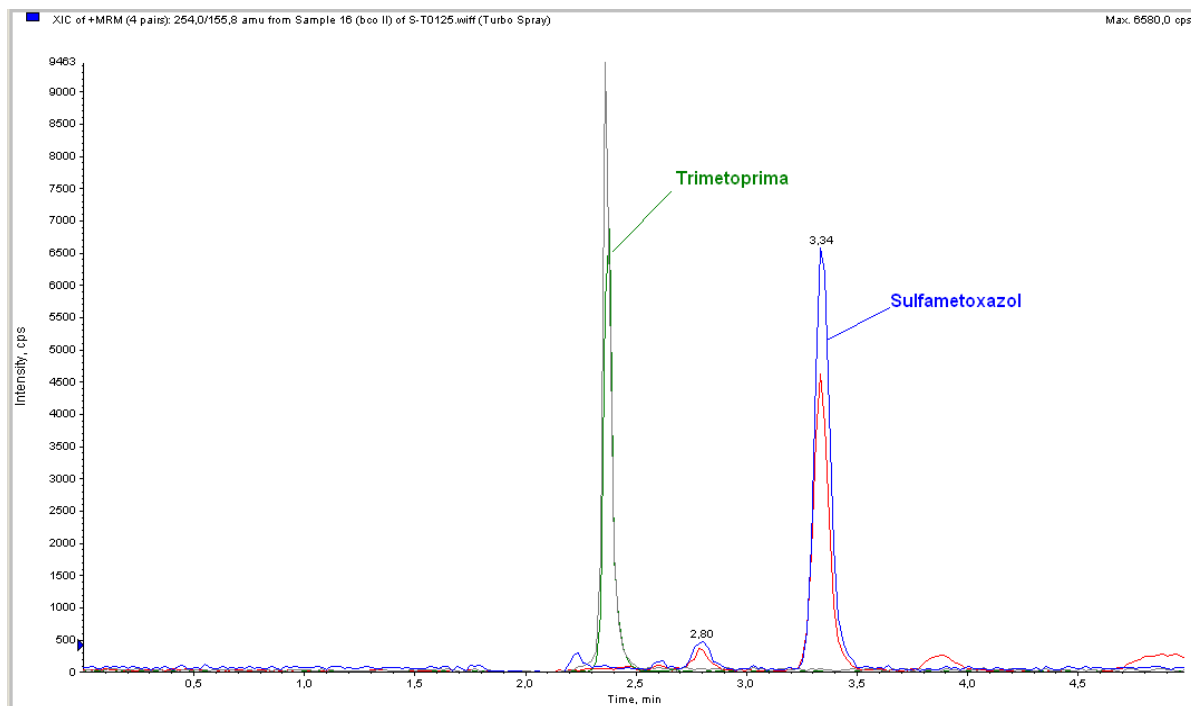


FIGURA 15. Cromatograma XIC da amostra de efluente hospitalar obtido por LC-MS/MS.

A metodologia utilizada para a determinação dos LDs e LQs está descrita no item **4.2.2**. Os LDs e LQs para o SMX e para TMP foram determinados utilizando-se a transição de maior intensidade de sinal dos antimicrobiais, ou seja, m/z 155,8 e 123,1 respectivamente. Os LDs alcançados para o SMX e TMP foram de $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$ e LQs $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, para ambos os analitos. Nas Figuras 16, 17, 18 e 19 podem ser observados os cromatogramas com a relação sinal/ruído dos LDs e LQs de ambos os analitos. TMP tempo de retenção (2,63 min) e SMX (3,45 min) respectivamente.

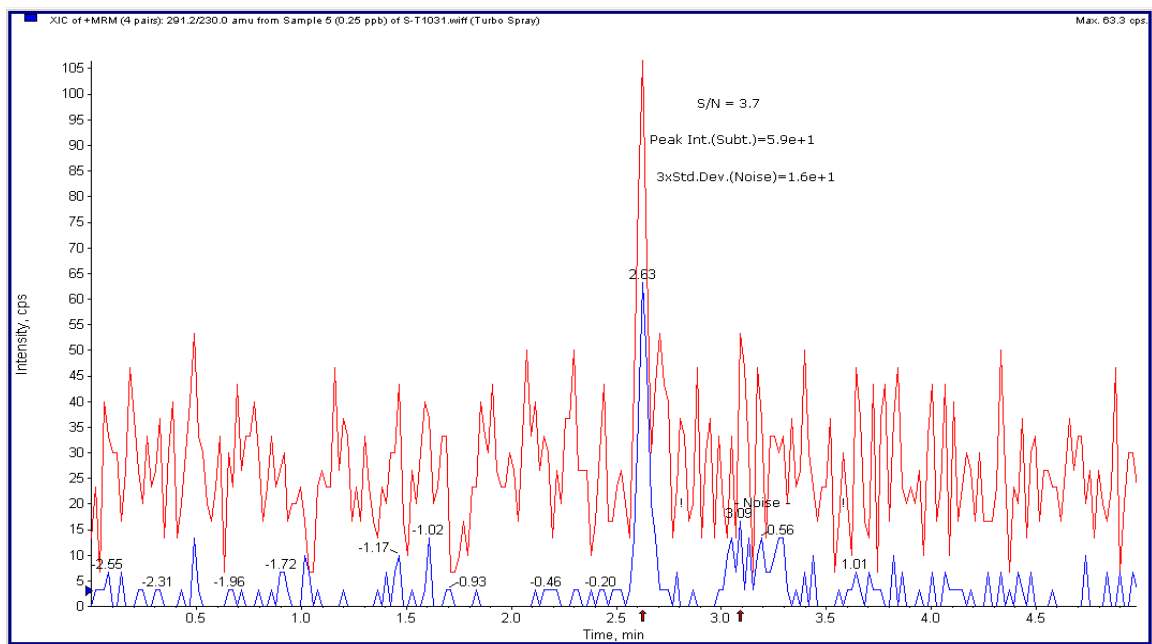


FIGURA 16. Cromatograma de solução $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$ de TMP, concentração que gera um sinal/ruído de aproximadamente 3. $S/N = 3$ é referente ao LD.

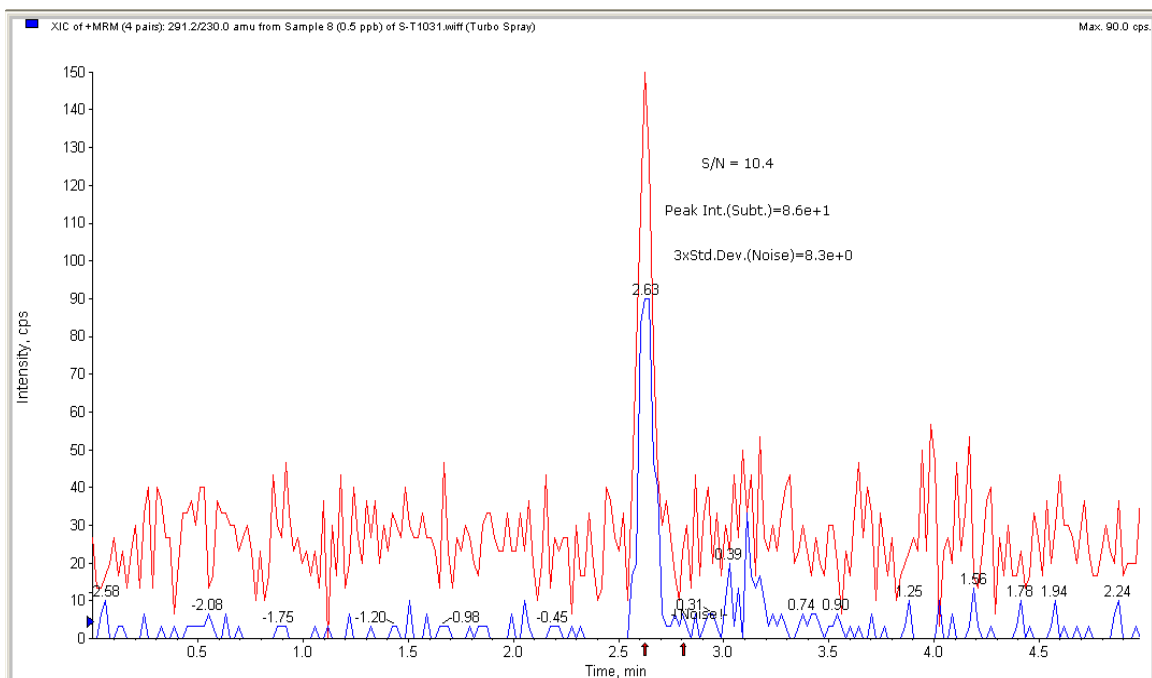


FIGURA 17. Cromatograma de solução de $0,50 \mu\text{g L}^{-1}$ TMP, concentração que gera um sinal/ruído de aproximadamente 10. $S/N = 10$ é referente ao LQ.

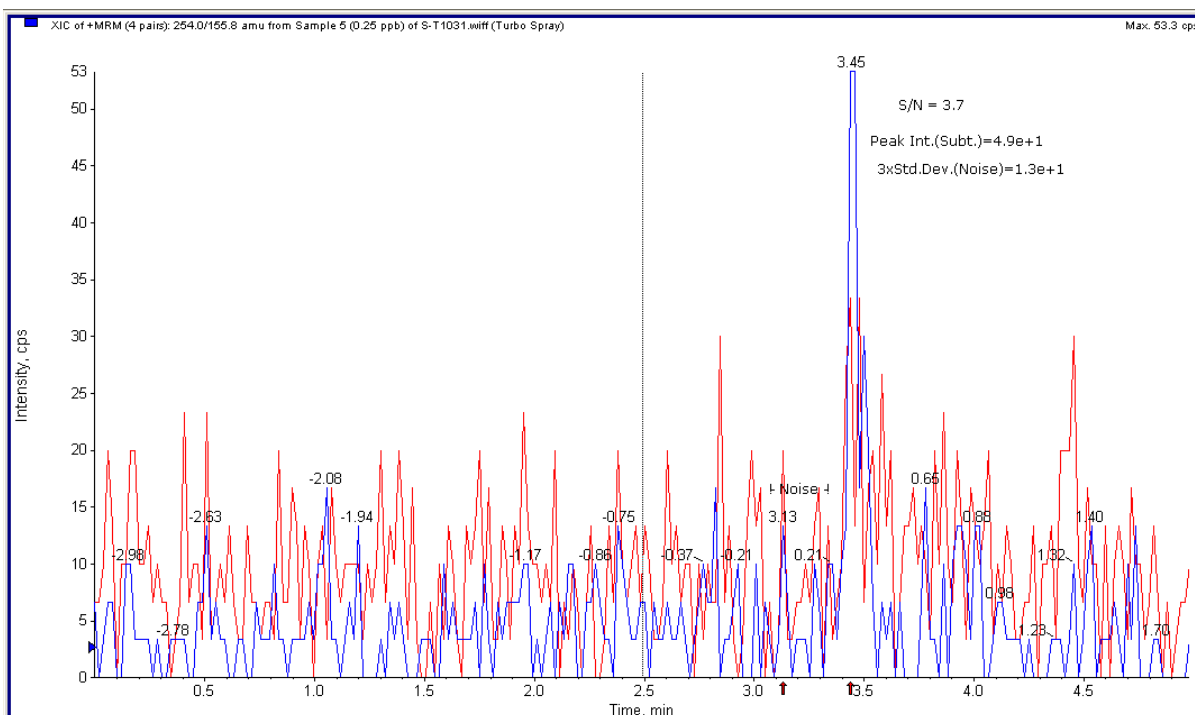


FIGURA 18. Cromatograma de solução $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$ de SMX , concentração que gera um sinal/ruído de aproximadamente 3. $S/N = 3$ é referente ao LD.

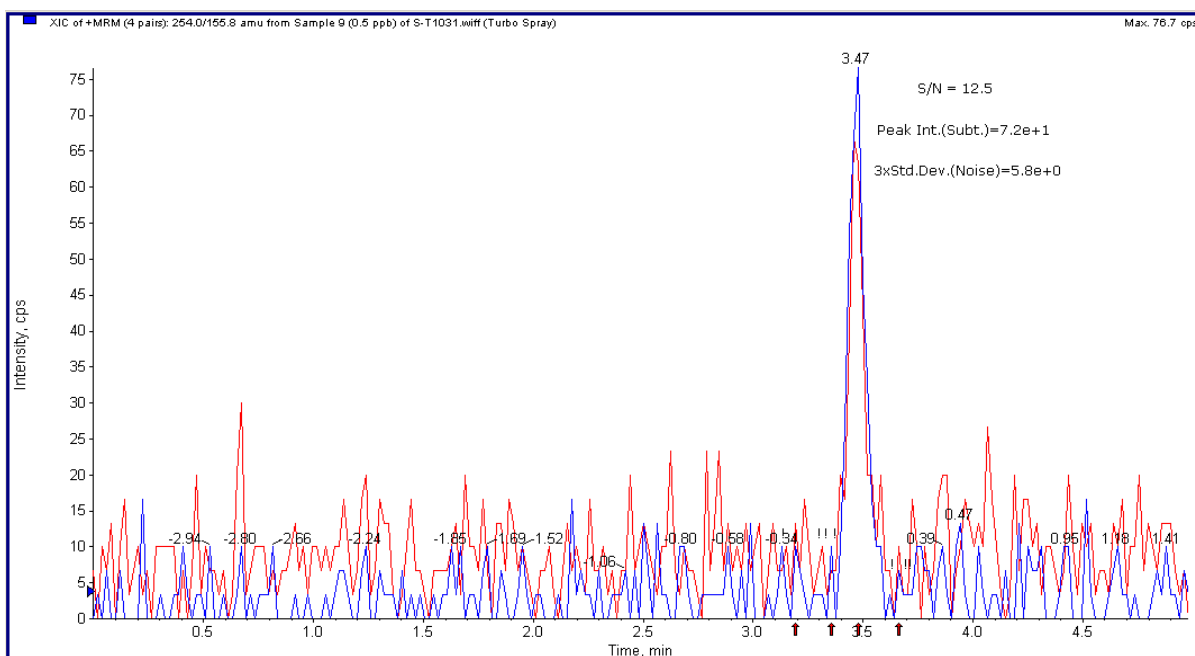


FIGURA 19. Cromatograma de solução $0,50 \mu\text{g L}^{-1}$ de SMX, concentração que gera um sinal/ruído de aproximadamente 10. $S/N = 10$ é referente ao LQ.

Os testes de recuperação para SMX e TMP foram feitos conforme descrito no item **4.2.2**. O resultado da validação pode ser visto na Tabela 6.

TABELA 6. Níveis de fortificação e média da recuperação (%) e precisão (RSD %) para SMX e TMP.

Compostos	Concentração $\mu\text{g L}^{-1}$	Média das recuperações (%)	Precisão (RSD%)
SMX	2,5	84,0	4,8
	10,0	99,0	5,6
	25,0	99,8	3,7
	50,0	99,6	1,0
TMP	2,5	86,1	10,0
	10,0	82,15	0,9
	25,0	104,4	3,2
	50,0	99,6	1,5

Os níveis de fortificação foram estabelecidos levando-se em consideração as concentrações encontradas, normalmente, no efluente hospitalar PA-HUSM.

O método analítico desenvolvido para a determinação direta dos antimicrobiais SMX e TMP no efluente hospitalar PA-HUSM não necessita de etapa laboriosa de preparo da amostra, como por exemplo, pré-concentração ou diluição; apenas uma filtração em filtros qualitativo e quantitativo é necessária; nestas condições a amostra é injetada diretamente no sistema LC-MS/MS_Q-Trap, reduzindo-se assim, significativamente, erros atribuídos ao manuseio e preparo de amostras. Na Tabela 7 estão especificadas as concentrações encontradas no efluente, sendo que a coleta e o preparo das amostras foram descritas no item **4.2.1**.

TABELA 7. Concentrações de SMX e TMP no efluente hospitalar PA-HUSM em função dos dias de coleta.

Dias de coleta	SMX ($\mu\text{g L}^{-1}$)	TMP ($\mu\text{g L}^{-1}$)
6/out/08	12,5	4,29
7/out/08	22,3	6,52
8/out/08	30,5	6,05
9/out/08	25,3	4,64
10/out/08	37,3	11,30
11/out/08	34,5	10,10
12/out/08	32	3,65
Média	27,77	6,65

Pode-se observar, que as concentrações de ambos os antimicrobiais encontradas no efluente hospitalar PA-HUSM estão bem acima das concentrações citadas na literatura (Tabelas 1 e 2, item 3.3.1).

Ademais, foi realizada uma coleta do efluente do hospital veterinário da UFSM para verificar a existência dos antimicrobiais em estudo. No efluente liberado pela ala hospitalar onde é feito o tratamento de equinos foram encontrados ambos os compostos; $4,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de SMX e, para TMP, concentração abaixo do LQ do método.

5.3 Metabólitos do SMX e da TMP

Para a determinação dos metabólitos dos antimicrobiais no efluente hospitalar PA-HUSM utilizaram-se experimentos IDA, no modo de varredura ion trap linear. Este experimento fornece um grande número de informações estruturais, em uma única corrida cromatográfica. O volume de injeção utilizado foi de $25 \mu\text{L}$ de amostra para obter-se um melhor sinal, considerando que os metabólitos presentes no efluente estão em baixas concentrações. As demais condições cromatográficas e o manuseio da amostra não sofreram alterações.

O metabólito da TMP de massa 324 Da , m/z 325, proposto por **Eichhorn e colaboradores**⁵⁴ como sendo um produto da oxidação do anel aromático dentro da subestrutura da diaminopirimidina, foi identificado através de experimentos IDA. Na

Figura 20 pode ser observado o espectro de massas onde o metabólito m/z 325 foi identificado.

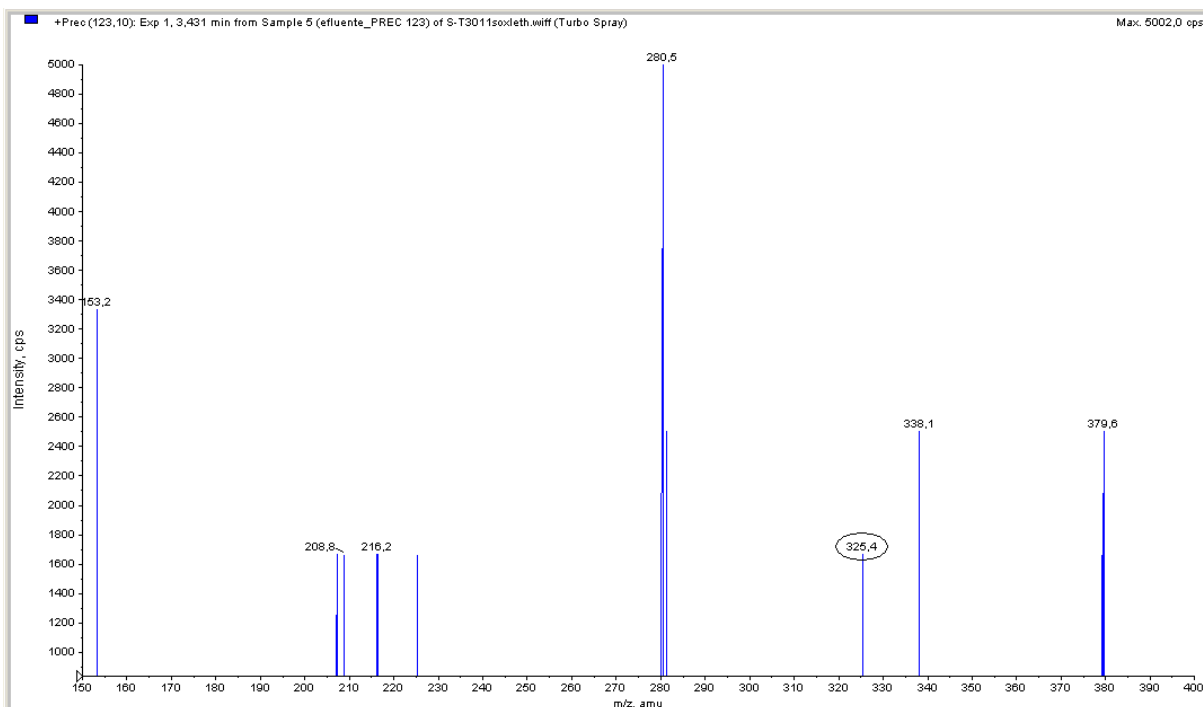


FIGURA 20. Espectro de massas obtido pela injeção do efluente PA-HUSM onde o metabólito m/z 325,0 foi identificado

Utilizou-se o experimento de enhanced product ion EPI com uma energia de colisão (EC) 35 V para a fragmentação do metabólito m/z 325 encontrado no efluente PA-HUSM. Os fragmentos gerados e o metabólito podem ser observados na Figura 21.

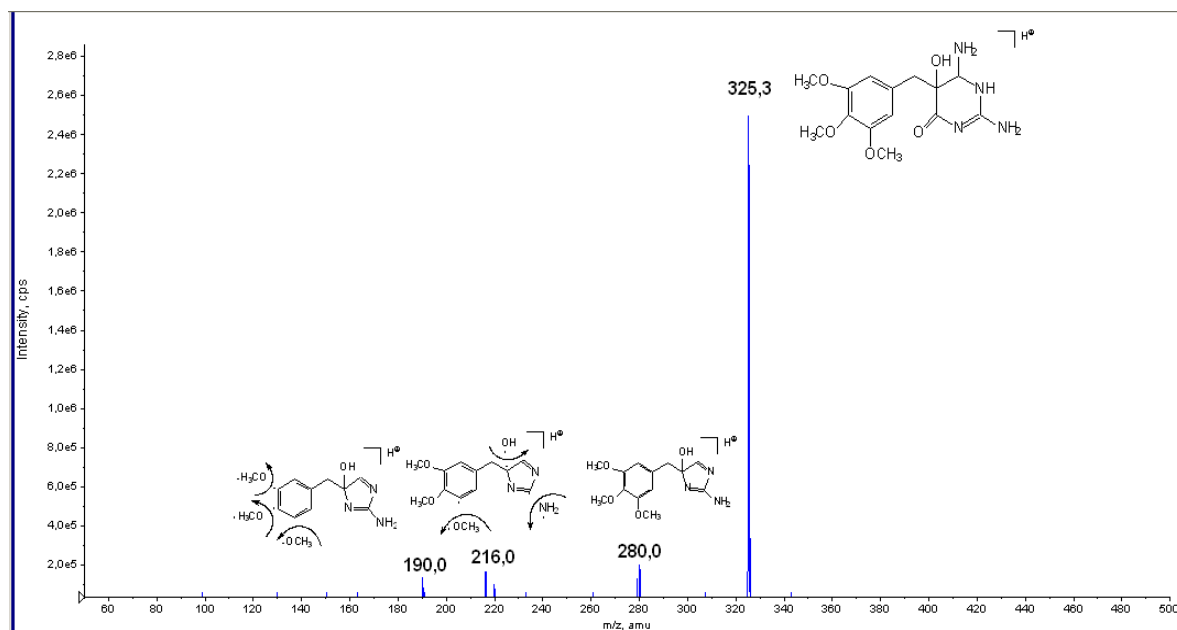


FIGURA 21. Espectro de massas obtido por EPI do metabólito m/z 325 e seus respectivos fragmentos encontrados no efluente PA-HUSM

O fragmento de m/z 280 é o mesmo encontrado por **Eichhorn e colaboradores**⁵⁴. O autor propôs que a principal rota de fragmentação para este metabólito passa pela formação deste íon. Experimentos de múltiplo estágio foram utilizados. O fragmento m/z 280 ocorre devido à perda de um NH_3 e do CO do metabólito de m/z 325. A partir da fragmentação do m/z 280 surgem os fragmentos de m/z 216 pela perda de uma NH_2 , OH e OCH_3 e de m/z 190 devido à perda das três OCH_3 , como observou-se na Figura 21.

O metabólito do SMX N_4 -acetilsulfametoxazol de massa 295 Da e m/z 296 foi, freqüentemente, detectado em águas de superfície e ETES^{24,81}. Este metabólito também foi isolado da urina e do plasma humano¹⁵. Porém, a rota de fragmentação deste metabólito não foi encontrada na literatura. Neste trabalho, o metabólito de m/z 296 foi encontrado no efluente hospitalar do PA-HUSM pelo experimento IDA precursor ion PI m/z 108 seguido de EPI. Na Figura 22 encontra-se o espectro de massas do experimento IDA onde o metabólito m/z 296 foi encontrado no efluente do PA-HUSM.

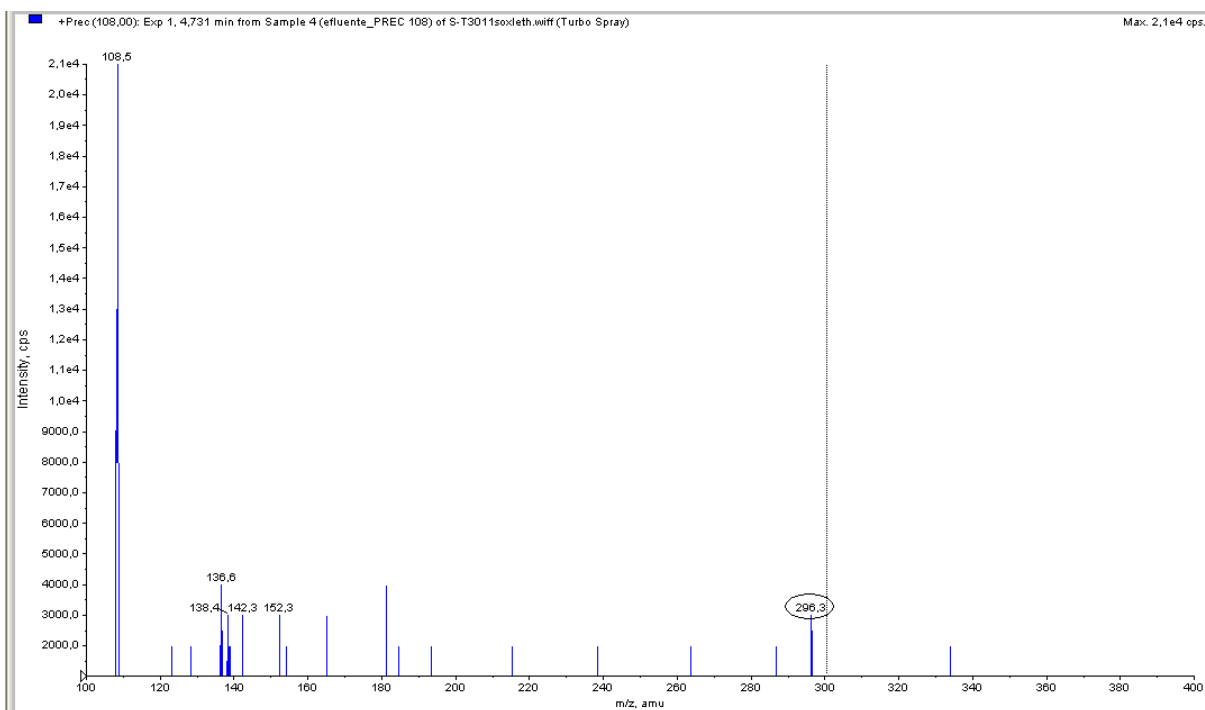


FIGURA 22. Espectro de massas obtido pelo experimento de IDA com PI m/z 108 seguido de EPI do efluente PA-HUSM onde o metabólito m/z 296 foi encontrado

O precursor de m/z 108 (Figura 22) foi selecionado para este experimento por ser uma massa característica das sulfonamidas.

Utilizou-se o experimento de enhanced product ion EPI com uma energia de colisão (EC) 35 V para a fragmentação do metabólito do SMX m/z 296 encontrado no efluente PA-HUSM. Os fragmentos gerados e o metabólito podem ser observados na Figura 23.

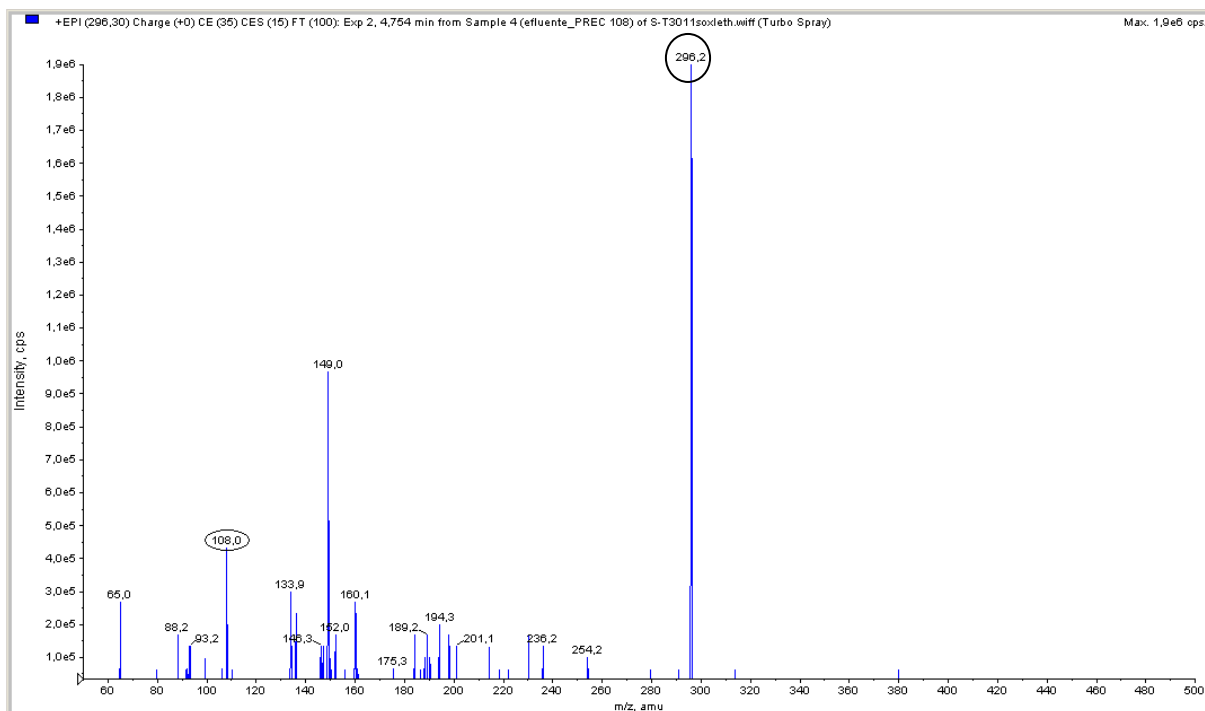


FIGURA 23. Espectro de massas obtido por EPI do metabólito m/z 296 e seus respectivos fragmentos encontrados no efluente PA-HUSM

Os fragmentos do metabólito m/z 296 obtidos pelo experimento de EPI tiveram o seu caminho de fragmentação proposto e, encontram-se descritos na Figura 24.

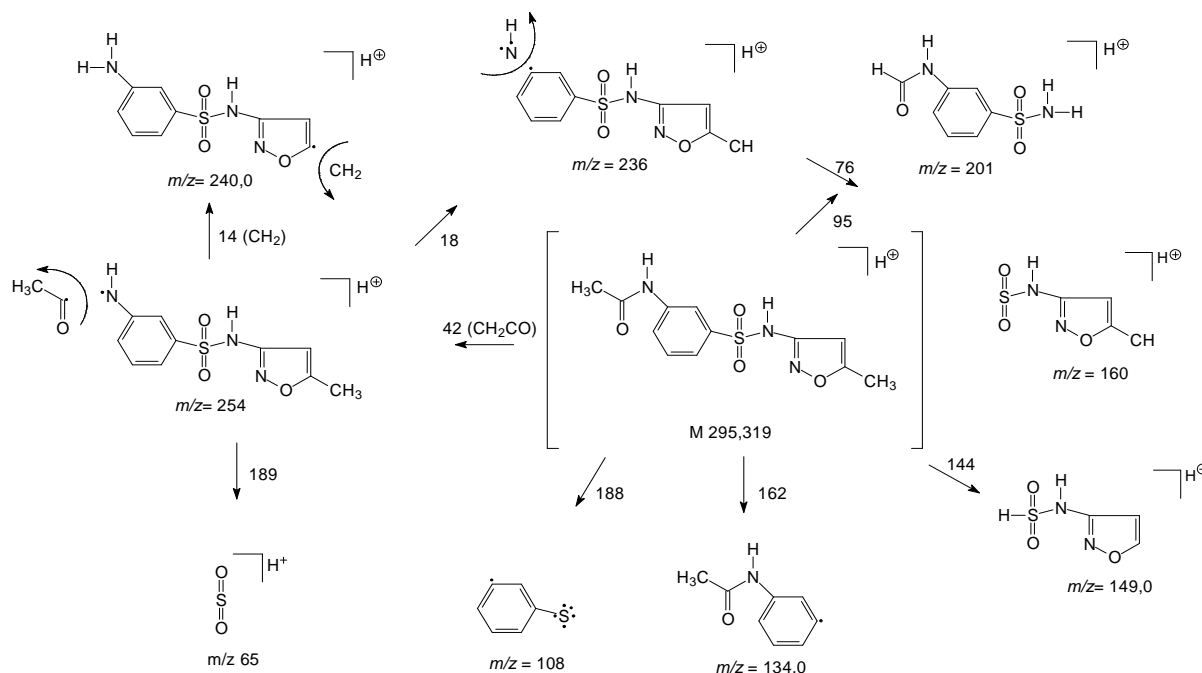


FIGURA 24. Caminho proposto para a fragmentação do metabólito N₄-acetilsulfametoxazol *m/z* 296.

Na Figura 24 propõem-se as estruturas moleculares para as massas de cada um dos fragmentos encontrados para o metabólito *m/z* 296, bem como a perda de massas para a formação dos fragmentos.

5.4 Eletrocoagulação aplicada ao efluente hospitalar PA-HUSM: Avaliação das melhores condições para o processo de redução da DQO.

Iniciou-se este estudo investigando-se as melhores condições para a aplicação da eletrocoagulação para a redução da DQO de efluente hospitalar gerado no PA-HUSM, considerando-se, particularmente, o efluente sem tratamento versus o efluente tratado. As variáveis consideradas foram: distância entre os eletrodos de alumínio, concentração de eletrólito utilizada (NaCl) e corrente aplicada nos experimentos. Segundo **Molhah e colaboradores**⁸⁰, as variáveis que influenciam o processo de eletrocoagulação são: densidade de corrente, condutividade (influenciada pela concentração do eletrólito), pH e material constitutivo do eletrodo. **Casillas e colaboradores**⁶⁴ também utilizaram a remoção da DQO de efluentes como parâmetro de avaliação da eficiência do processo de eletrocoagulação.

A etapa de otimização dos experimentos foi feita utilizando-se planejamento fatorial completo das variáveis citadas. A Tabela 8 apresenta as variáveis e os níveis utilizados nos experimentos:

TABELA 8. Variáveis e níveis utilizados nos experimentos de avaliação da redução da DQO.

	-2	-1	0 (ponto central)	+1	+2
NaCl (Mg)	250	500	750	1000	1200
Distância intereletrodos (mm)	15	30	45	60	75
Intensidade de corrente (mA)	400	800	1200	1600	2000

A matriz obtida com os experimentos e as respectivas reduções da DQO são apresentadas na Tabela 9. Os experimentos foram realizados de forma aleatória para garantir a confiabilidade dos resultados.

TABELA 9. Experimentos realizados utilizando a matriz obtida pelo planejamento fatorial e as respectivas reduções de DQO do efluente PA-HUSM em cada experimento.

Experimento	NaCl (mg)	Distância intereletrodos (mm)	Corrente (mA)	Δ DQO (%)
1	-1 (500)	30	800	57,9
2	+1 (1000)	30	800	1,4
3	-1 (500)	60	800	20,1
4	+1 (1000)	60	800	9,8
5	-1 (500)	30	1600	25,2
6	+1 (1000)	30	1600	8,1
7	-1 (500)	60	1600	26,4
8	+1 (1000)	60	1600	3,0
9	-2 (250)	45	1200	39,0
10	+2 (1250)	45	1200	48,7
11	0 (750)	15	1200	13,3
12	0 (750)	75	1200	37,2
13	0 (750)	45	400	14,7
14	0 (750)	45	2000	1,7
15	0 (750)	45	1200	16,2
16	0 (750)	45	1200	6,4
17	0 (750)	45	1200	12,9

Através dos resultados obtidos para a eficiência de redução de DQO foram analisados os fatores que influenciam o processo de tratamento. A Figura 25 apresenta as variáveis e sua influência no processo de eletrocoagulação em termos de redução de DQO.

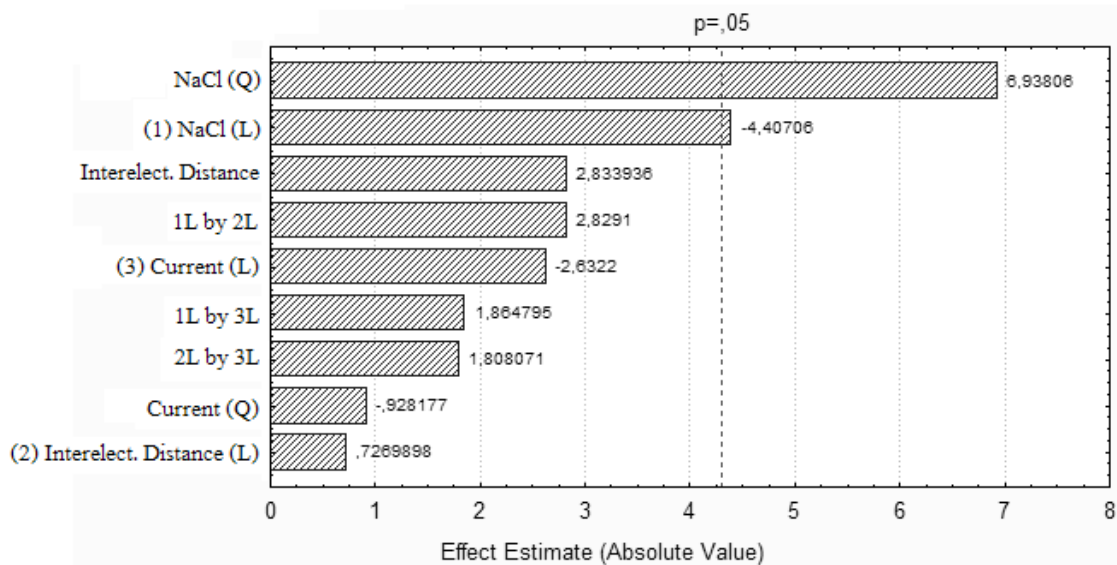


FIGURA 25 - Gráfico de Pareto apresentando as variáveis e suas influências no processo.

Observando-se a Figura 25 pode-se perceber que a única variável que apresenta influência significativa no processo, dentro das condições testadas, é a concentração do eletrólito (NaCl). As demais variáveis e suas correlações não apresentam influência nos valores obtidos de eficiência de redução da DQO. Estes dados são condizentes com o que relatam **Bensadok e colaboradores**⁸¹, com relação ao uso de NaCl como eletrólito para aumentar a condutividade da água ou de efluentes para o tratamento. Estes autores concluem que a presença do íon cloreto em solução pode ser responsável pela diminuição da passivação da superfície do Al, aumentando a eficiência da eletrocoagulação.

As Figuras 26, 27 e 28 mostram a correlação entre distância dos eletrodos e corrente aplicada, quantidade de eletrólito e corrente aplicada e quantidade de eletrólitos e distância intereletrodos na redução da DQO do efluente hospitalar, em gráficos 3 D.

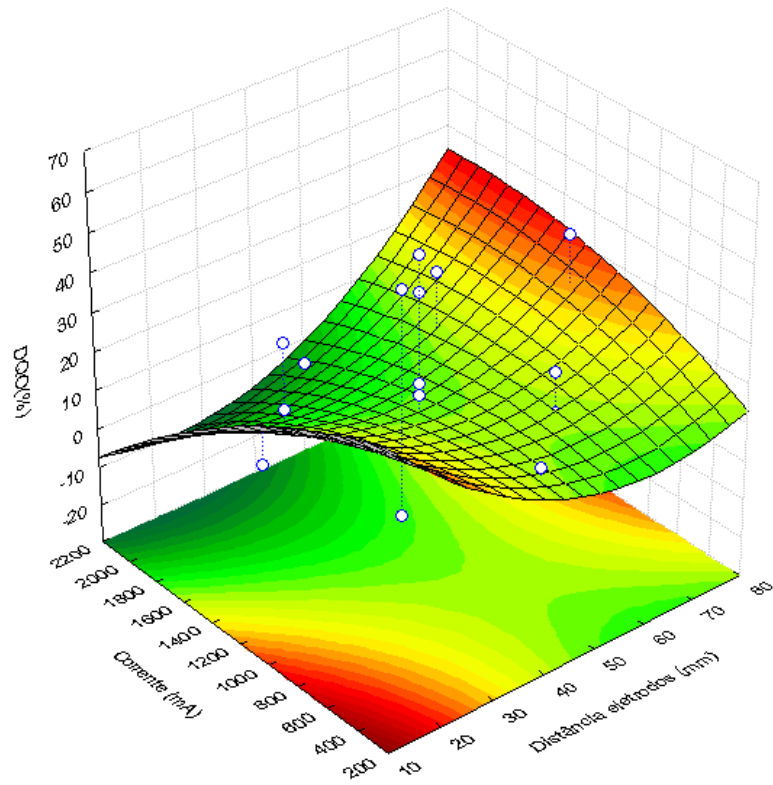


FIGURA 26. Eficiência na redução de DQO em função da distância entre os eletrodos e a corrente aplicada.

Com os resultados obtidos na Figura 26, pode-se perceber um aumento na eficiência da redução de DQO quando se utiliza maior distância intereletrodos e se aplica correntes mais altas, dentro da faixa estudada; assim como quando se aplica menores correntes e se utiliza menores distâncias intereletrodos, também se observa um aumento na redução da DQO.

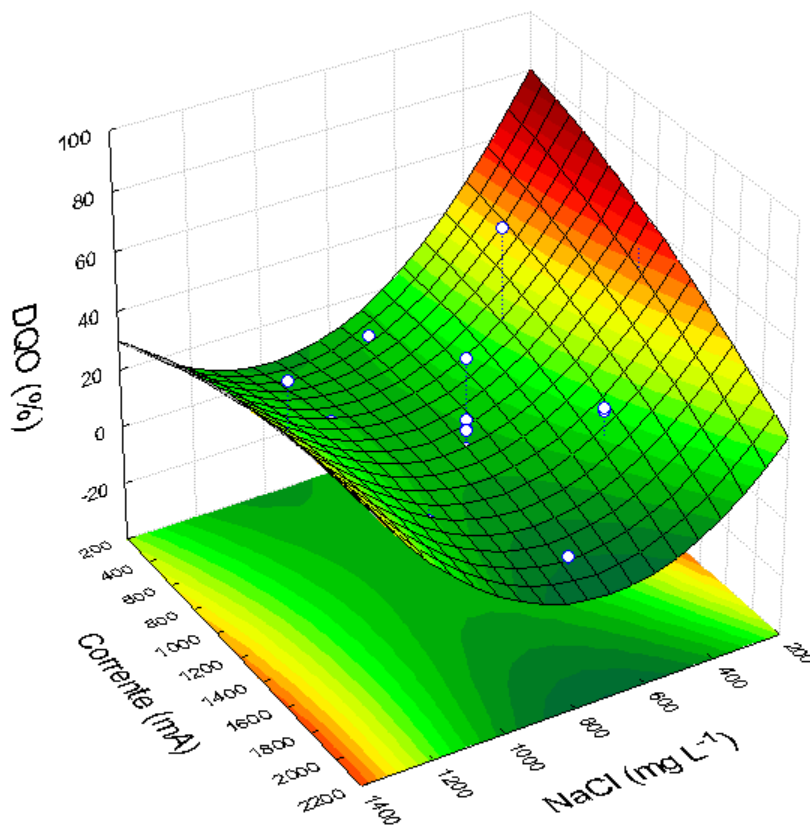


FIGURA 27. Eficiência na redução de DQO em função da corrente aplicada e da quantidade de eletrólito utilizada.

Na correlação entre estas duas variáveis pode-se perceber que os valores mais expressivos no tratamento do efluente foram conseguidos utilizando-se quantidades menores de NaCl. Entretanto, a eficiência do tratamento não sofreu variação significativa em relação às diferentes correntes aplicadas. A faixa de corrente onde os melhores resultados foram obtidos vai de 400 a 1200 mA.

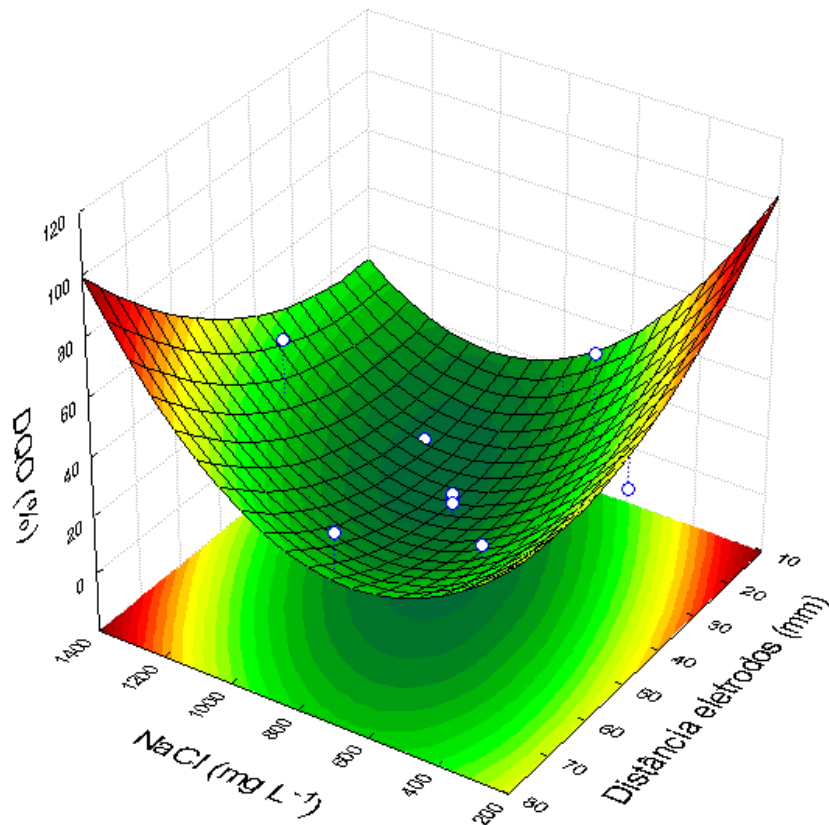


FIGURA 28 - Eficiência na redução de DQO em função da distância intereletrodos e da quantidade de eletrólito utilizada.

Correlacionando-se a distância intereletrodos e a quantidade de eletrólito utilizada, observa-se um aumento na redução da DQO nas condições extremas do processo, isto é, nas menores distâncias entre os eletrodos com concentrações menores de eletrólito, bem como, utilizando-se maiores distâncias intereletrodos e maiores concentrações de eletrólito.

Na Figura 29 pode-se observar a tendência do processo em relação às variáveis estudadas.

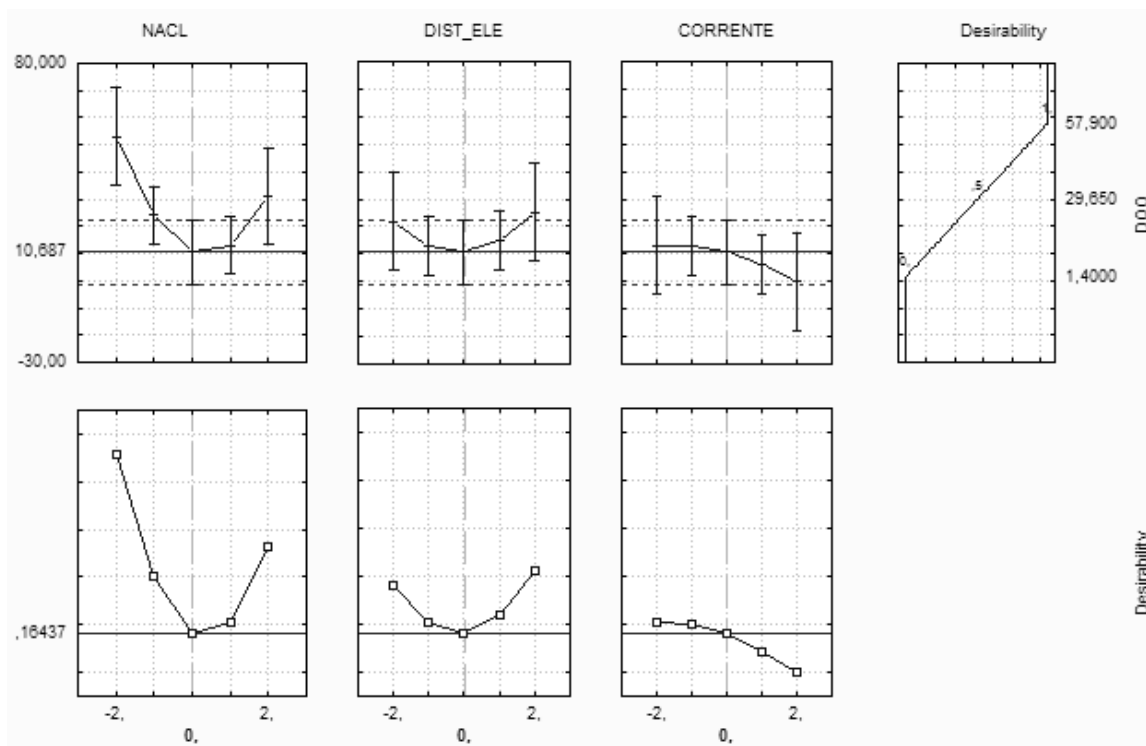


FIGURA 29 - Gráfico de tendências das variáveis em relação à eficiência de redução da DQO.

As tendências das variáveis, avaliadas pelo gráfico (Figura 29), demonstram que a redução da DQO varia de 1,4 a 57,9%. Dentro deste intervalo de eficiências, as variáveis apresentam diferentes tendências. A quantidade de eletrólito e a distância intereletrodos apresentam suas tendências na forma de parábolas, apresentando os melhores resultados de diminuição de DQO nas condições extremas testadas. Com menores e maiores quantidades de eletrólito, assim como com maiores e menores distâncias intereletrodos, obteve-se a maior redução de DQO. Desta forma, os pontos centrais testados para a quantidade de eletrólito e distância intereletrodos apresentaram valores baixos de eficiência na redução de DQO. Diferente é o que se observa para a eficiência do processo em relação à corrente aplicada. Dentro das condições testadas, a corrente apresenta uma menor resposta de redução de DQO. Entre 400 mA (-2) e 1200 mA (0) a redução de DQO não varia muito, porém, com valores acima de 1200 mA, a eficiência do processo diminuiu.

Isto é explicado por **Mollah e colaboradores**⁸⁰, que afirmam que aumentando-se a densidade da corrente, diminui-se a eficiência. O aumento da corrente aplicada gera uma resistência na solução, causando um sobre-potencial. Este sobre-potencial é gerado pelas diferenças de concentração das espécies

eletroativas entre a solução e a superfície do eletrodo. Esta condição ocorre quando a reação eletroquímica é suficientemente rápida para diminuir a concentração das espécies eletroativas na solução.

A concentração sobre-potencial, também interpretada como transferência de massa, ou difusão sobre-potencial, é causada pela mudança na concentração do analito nas proximidades do eletrodo.

Na Figura 30, observa-se o efluente hospitalar antes e depois da aplicação do tratamento, nas melhores condições experimentais determinadas. É visível a diminuição da coloração do efluente; tratado pelo processo de eletrocoagulação o efluente torna-se límpido e inodoro.

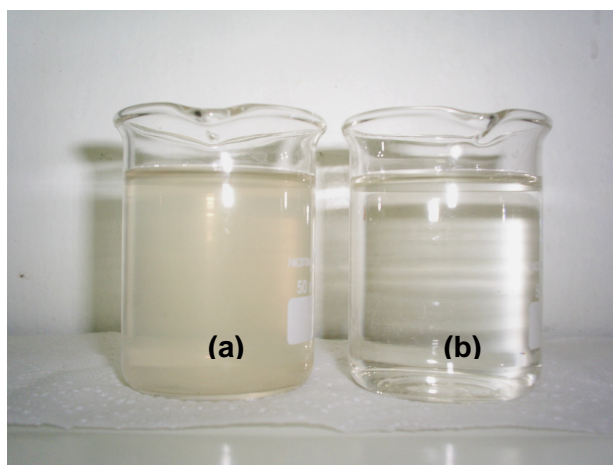


FIGURA 30. Remoção da cor do efluente após a aplicação do processo de EC. (a) Efluente hospitalar antes da aplicação de EC. (b) Efluente hospitalar após a aplicação de EC.

5.5 Validação da extração de SMX e TMP utilizando o método de Soxhlet

Para estudo da real degradação dos antimicrobianos SMX e TMP, ou sua adsorção no lodo de EC, utilizou-se extração Soxhlet. Experimentos em triplicata foram feitos, nos pH 5, 7 e 9, com solução desprovida dos analitos. Após 1 hora de tratamento por EC tem-se em solução o lodo formado no processo contendo Al_2O_3 . Este lodo foi filtrado em filtro qualitativo (Figura 31), pesado e enriquecido com 1 mg L^{-1} de SMX e TMP, respectivamente. Posteriormente, este papel filtro contendo o lodo enriquecido foi colocado no extrator Soxhlet e feita a extração com 150 mL de metanol. O tempo de extração foi testado em experimentos de 4 e 6 horas de

duração, não havendo diferenças nos rendimentos de extração. Assim sendo, foi feita a extração do lodo por 4 horas, em triplicata.

O procedimento de eletrocoagulação da solução sintética, nos 3 valores de pH em estudo, foi feito de acordo com as melhores condições otimizadas no experimento 1 do planejamento fatorial (NaCl 500 mg; distância entre eletrodos 30 mm; corrente 800 mA). A Tabela 10 mostra os resultados obtidos nos experimentos realizados.



FIGURA 31. Lodo gerado no processo de eletrocoagulação da solução desprovida dos analitos SMX e TMP.

TABELA 10. Resultados para a recuperação e para a reprodutibilidade da extração de SMX e de TMP do lodo de eletrocoagulação pelo método de extração Soxhlet.

	SMX		TMP	
	Recuperação média %	RSD%	Recuperação média %	RSD%
n=3 pH 5	53,0	4,0	101,4	2,4
n=3 pH 7	48,1	6,2	94,5	5,3
n=3 pH 9	48,9	3,8	95,5	8,6

Como pode ser observado na Tabela 10, não há variação acentuada de recuperação dos analitos nos pH estudados. A recuperação do SMX é de

aproximadamente 50% nos três pH; a confiabilidade destes resultados pode ser avaliada pelos baixos valores de RSD (3,8 a 6,2%). No caso da TMP, as recuperações obtidas nos três valores de pH estudados se aproximam de 100%, com RSD de 2,4 a 8,6%. Não existem dados na literatura sobre este tipo de estudo de extração de antimicrobianos. As medidas foram feitas por LC-MS/MS seguindo as condições citadas no item 4.2.2.

5.6 Eletrocoagulação da solução sintética contendo os antimicrobianos SMX e TMP

Concluído o estudo das melhores condições experimentais para o processo de eletrocoagulação e de redução da DQO do efluente hospitalar (experimento 1 do planejamento fatorial), e das condições de extração do SMX e da TMP por Soxhlet, estas condições otimizadas foram usadas no estudo da avaliação da redução da concentração dos antimicrobianos SMX e TMP em solução aquosa na concentração de 1 mg L⁻¹. Através de extração Soxhlet foi possível constatar a degradação dos antimicrobianos: a sua virtual ausência no lodo de eletrocoagulação significa que foram degradados. Ao final de cada experimento (60 minutos de tratamento), o lodo gerado pelo processo foi filtrado e submetido à extração Soxhlet, para verificar eventual adsorção dos antimicrobianos no lodo gerado no processo de EC.

No gráfico (Figura 32) pode-se observar a redução da concentração do SMX em solução sintética, em pH 5, 7 e 9. Em pH 5 obteve-se uma redução média da concentração inicial da solução de 88,0%; destes, 5,0% ficaram adsorvidos no lodo. A degradação média de SMX em solução sintética em pH 5 foi de 83,0%.

Em pH 7, a redução média da concentração inicial de SMX foi de 81,4%. Destes, 7,0% ficaram adsorvidos no lodo. Assim, 74,4% foi a degradação média obtida para o SMX em solução sintética neste pH.

Na solução sintética de SMX, em pH 9, obteve-se redução da concentração inicial de 74,0%; destes, 10,0% ficaram adsorvidos no lodo. A degradação média de SMX em solução foi de 64,0%.

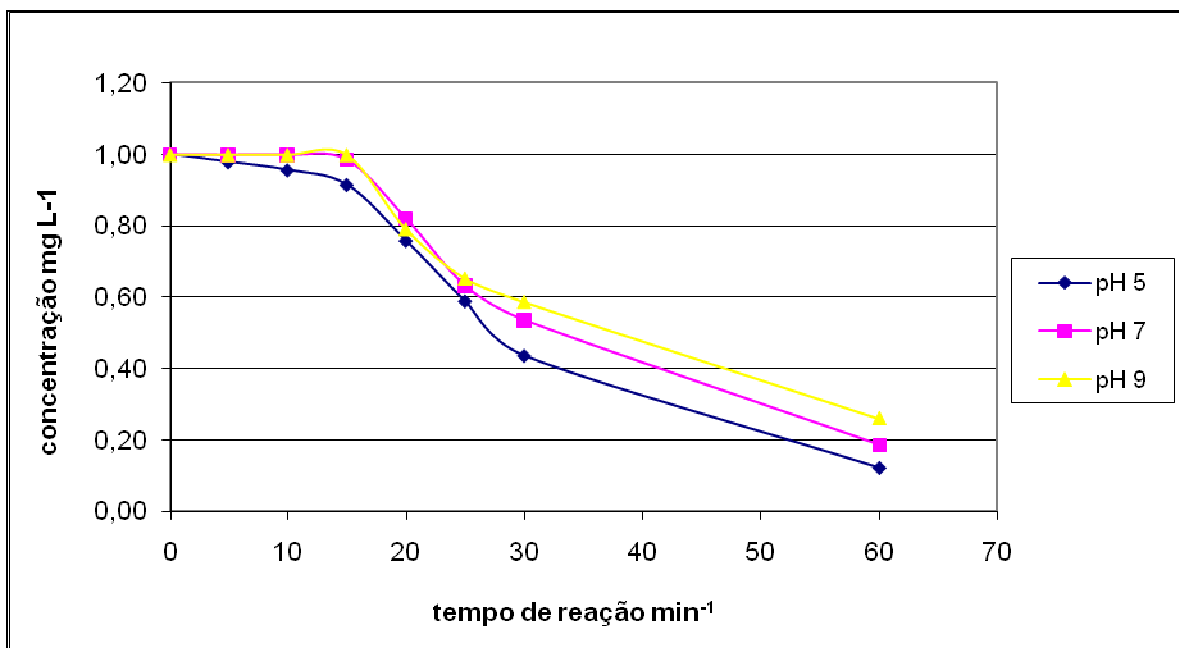


FIGURA 32. Gráfico das médias de redução da concentração das soluções sintéticas pH 5, 7 e 9 de SMX submetidas ao processo de eletrocoagulação

Observando-se o gráfico (Figura 32) pode-se concluir que não houve uma grande diferença na redução da concentração de SMX em solução sintética, nos 3 valores de pH estudados. Contudo, as maiores porcentagens de remoção/degradação foram obtidas em pH 5 e 7. Sendo assim, os produtos da degradação do SMX em solução sintética foram estudados nestes pH.

No gráfico (Figura 33) pode-se observar a redução da concentração inicial da TMP em solução sintética, em pH 5, 7 e 9. Em pH 5 a redução média da concentração inicial de TMP em solução foi de 33,0%, sendo que, destes, 28,7% ficaram adsorvidos no lodo. Sendo assim, a degradação média da concentração de TMP em solução foi de 4,3%.

Em pH 7, a redução média da concentração inicial de TMP em solução foi de 24,53%, sendo que, destes, 24,26% ficaram adsorvidos no lodo, não havendo degradação de TMP.

Na solução sintética de TMP em pH 9, a redução média da concentração inicial foi de 22,6%, sendo que, destes, 22,0% ficaram adsorvidos no lodo, não havendo degradação de TMP.

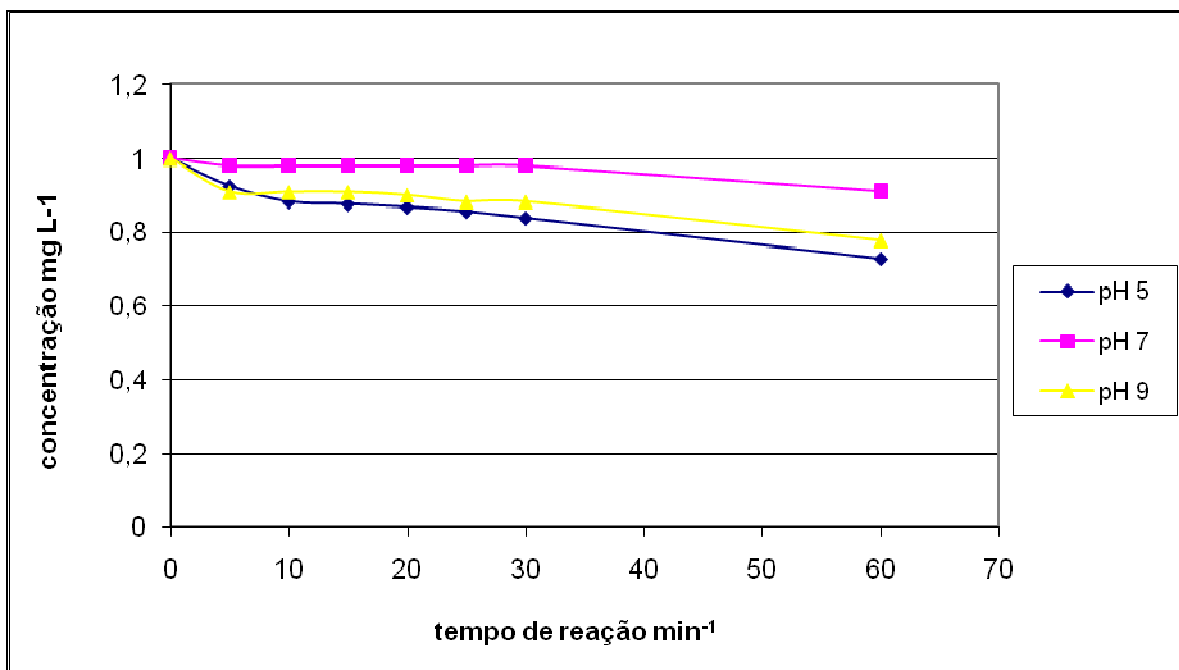


FIGURA 33. Gráfico das médias de redução da concentração das soluções sintéticas pH 5, 7 e 9 de TMP submetidas ao processo de eletrocoagulação

Observando-se o gráfico na Figura 33 conclui-se que a maior redução da concentração de TMP foi em pH 5, embora esta redução não seja tão considerável (33%). Pela análise dos dados obtidos pode-se concluir que, praticamente, não ocorre degradação de TMP em solução sintética. Sendo assim, não foi realizado estudo dos produtos da degradação da TMP por processo de eletrocoagulação.

5.7 Eletrocoagulação do efluente hospitalar PA-HUSM fortificado com os antimicrobianos SMX e TMP

Aplicou-se o processo de eletrocoagulação ao efluente hospitalar fortificado com SMX e TMP, como descrito no item 4.2.3, nas mesmas condições que foram aplicadas à solução sintética. Após o término da reação, o lodo gerado pelo processo foi filtrado e submetido à extração Soxhlet para verificar a possível adsorção dos compostos no lodo. O gráfico da Figura 34 mostra a redução da concentração de SMX no efluente hospitalar nos tempos de reação descritos no gráfico. A redução média da concentração de SMX em efluente hospitalar foi de

16,1%. Destes, 4,1% ficaram adsorvidos no lodo. Sendo assim, a degradação média alcançada para o SMX em efluente hospitalar foi de 12%.

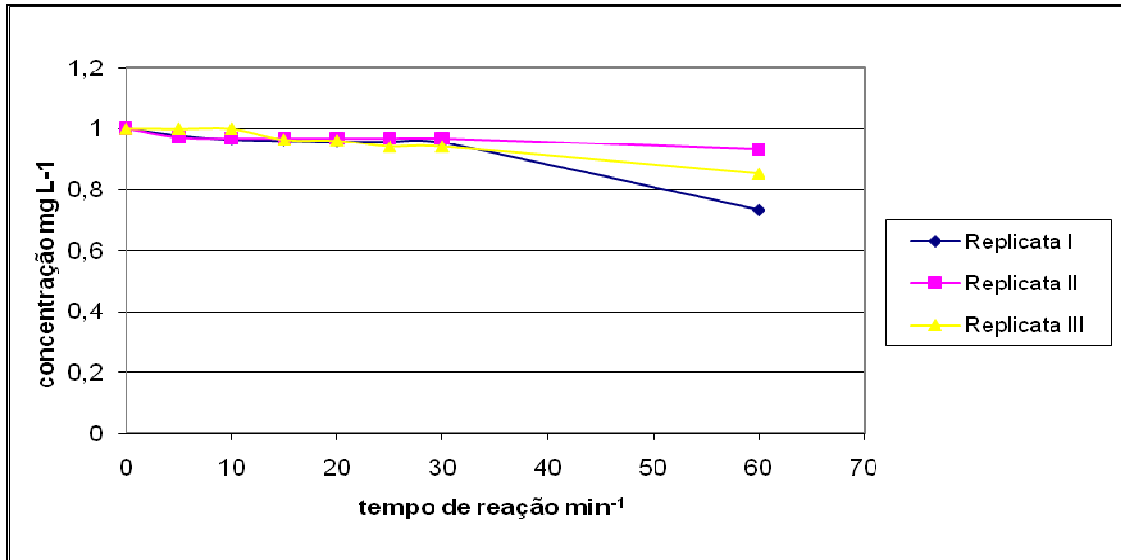


FIGURA 34. Gráfico das médias de redução da concentração de SMX em efluente hospitalar fortificado.

No gráfico da Figura 35 observa-se a redução da concentração de TMP no efluente hospitalar. A média de redução da concentração inicial de TMP no efluente ficou em 28,0%, sendo que destes, 3,8% ficaram adsorvidos no lodo. Sendo assim, a degradação média obtida foi de 24,23% da concentração inicial de TMP no efluente hospitalar.

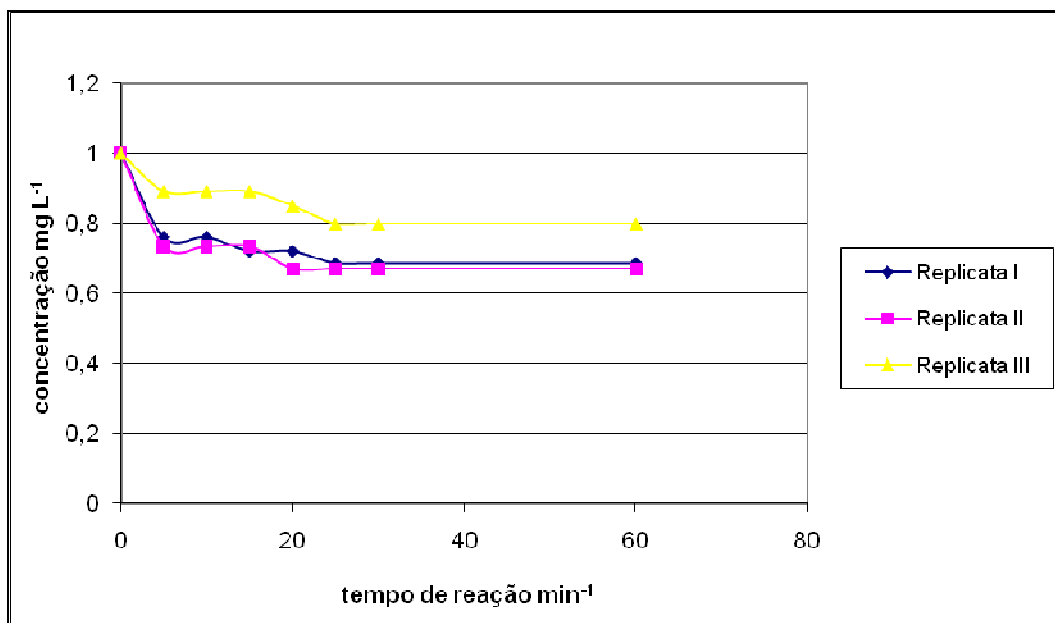


FIGURA 35. Gráfico das médias de redução da concentração de TMP em efluente hospitalar fortificado.

Observando-se os dados obtidos pela aplicação do processo de eletrocoagulação ao efluente hospitalar fortificado com solução padrão dos antimicrobiais SMX e TMP na concentração de 1 mg L^{-1} , pode-se verificar que a redução da concentração de ambos os antimicrobiais no efluente, assim como sua degradação, não foram significativos. Este fato pode ser explicado pela complexidade da matriz, bem como pela alta concentração de SMX e TMP adicionada ao efluente, o que não remete às condições reais de concentração de ambos os antimicrobiais neste efluente. Porém, tal concentração foi usada para que os produtos da degradação pudessem ser melhor observados e estudados.

5.8 Produtos da degradação do SMX pela aplicação do processo de eletrocoagulação

Após decorridos 60 minutos de tratamento aplicando o processo de EC, de soluções 1 mg L^{-1} de SMX e TMP, encontrou-se através de experimentos IDA com EPI o produto de m/z 288, proposto por **Hu e colaboradores**⁵⁵ como sendo SMX dihidroxilado (produto da degradação fotocatalítica com TiO_2). Como produto da fragmentação do SMX dihidroxilado m/z 288, encontrou-se o fragmento de m/z 270,

que os autores⁵⁵ identificaram como SMX hidroxilado. Na Figura 36 pode ser observado o espectro de massas em que encontrou-se o SMX dihidroxilado m/z 288 e o seu fragmento SMX hidroxilado m/z 270.

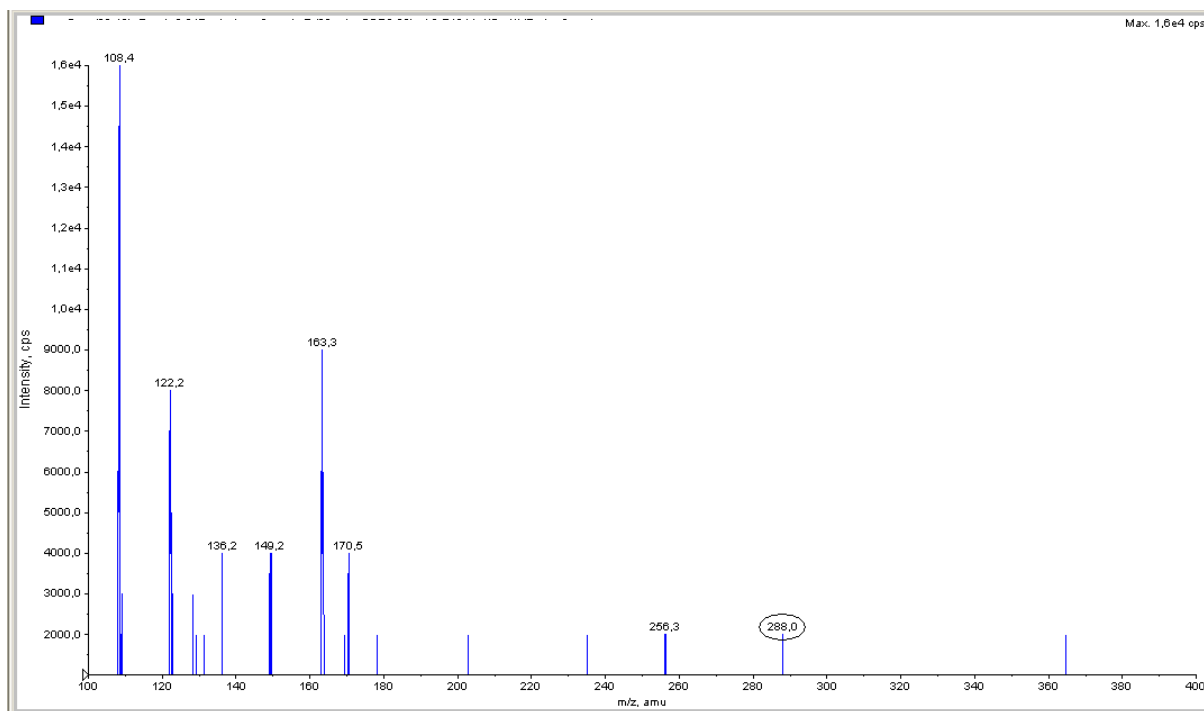


FIGURA 36. Espectro de massas obtido pela injeção da solução de 1 mg L⁻¹ de SMX, submetida a 60 minutos de tratamento por EC, encontrando-se SMX dihidroxilado m/z 288.

A Figura 37 mostra o cromatograma EPI do SMX dihidroxilado m/z 288 e seu fragmento SMX hidroxilado m/z 270, com suas respectivas estruturas moleculares propostas.

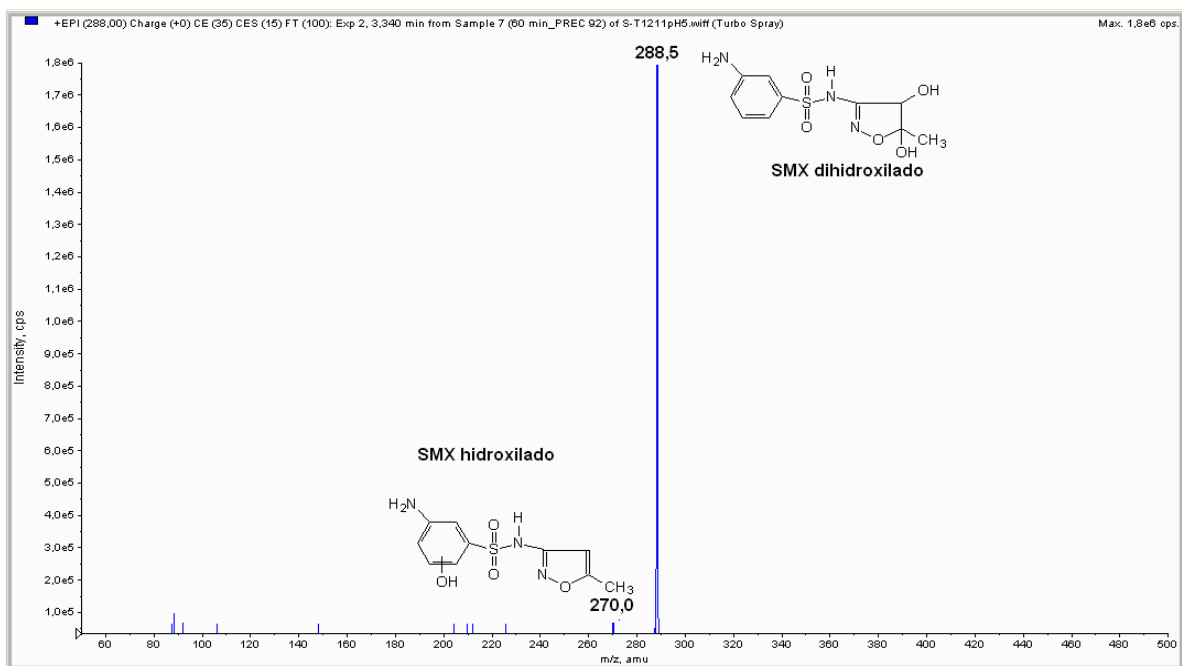


FIGURA 37. Cromatograma de massas EPI de m/z 288 e 270 e estruturas moleculares propostas.

Um segundo produto da degradação do SMX por eletrocoagulação foi o produto de m/z 256,2, para o qual propõe-se a ocorrência de dihidrogenação. Este produto foi identificado por experimentos IDA MRM (monitoramento múltiplo de reações) seguido de EPI com 3 energias de colisão (CE 20, 35 e 50). E, também, por PI m/z 108 seguido de EPI. Ambos os experimentos IDA podem ser observados nas Figuras 38 e 39.

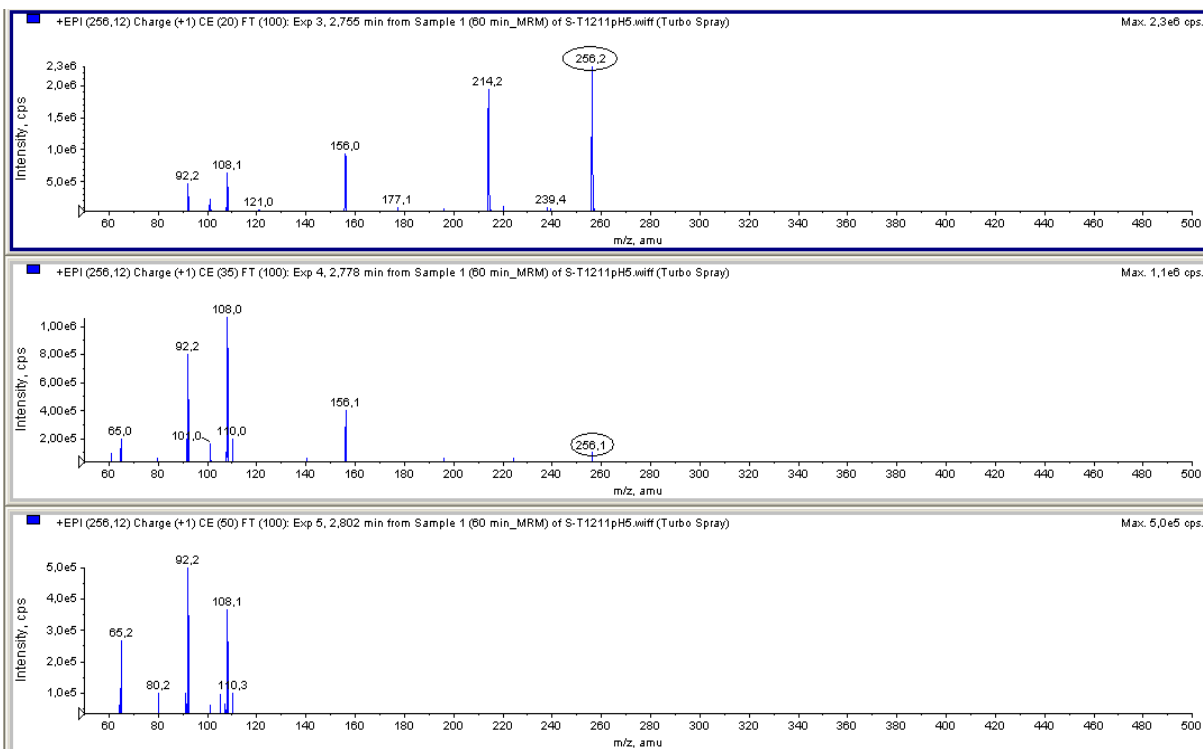


FIGURA 38. (a) Espectro de massas EPI da solução de 1 mg L^{-1} de SMX submetida a 60 minutos de EC. (a) Utilizando uma energia de colisão de 20 V. (b) Utilizando uma energia de colisão de 35 V. (c) Utilizando uma energia de colisão de 50 V.

Com este experimento podem ser observados os fragmentos gerados em energias de colisão baixa, média e alta, sendo que energias de colisão maiores fragmentam mais a molécula; sendo assim, massas maiores não são observadas. Neste experimento, uma CE de 20 V gerou um maior número de fragmentos.

Na Figura 39 pode-se observar o produto da degradação do SMX m/z 256 após 60 minutos de EC. Este produto foi identificado pelo experimento IDA PI m/z 108 seguido de EPI.

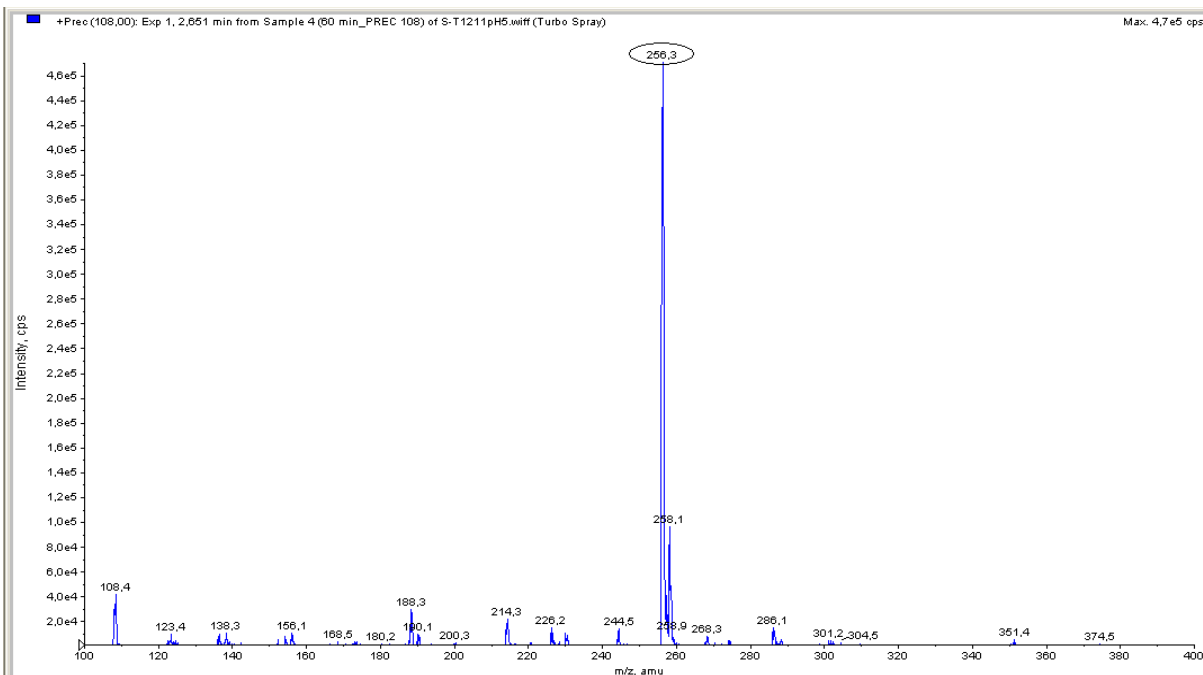


FIGURA 39. Espectro de massas PI m/z 108, obtido pela injeção da solução de 1 mg L^{-1} de SMX submetida a 60 minutos de EC, em que o produto de degradação do SMX m/z 256 foi identificado.

A Figura 40 mostra o espectro de massas do experimento EPI m/z 256 com seus fragmentos e estruturas moleculares propostas, de solução submetida a 60 minutos de EC.

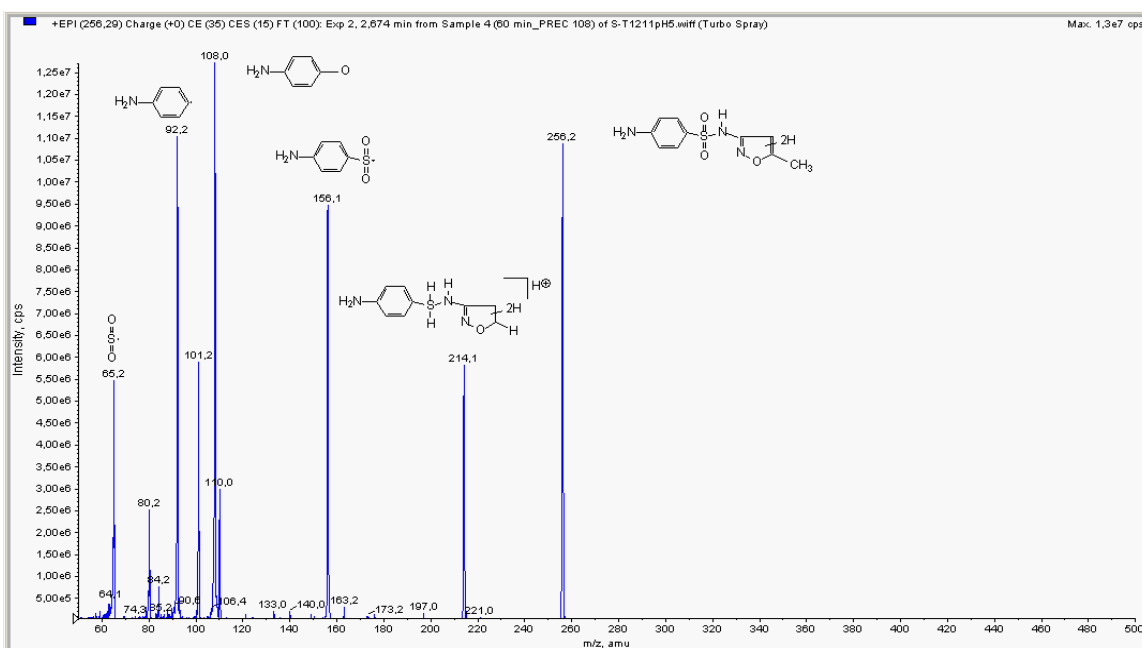


FIGURA 40. EPI do produto de degradação m/z 256,2, seus fragmentos e estruturas moleculares propostas.

Como pode ser observado na Figura 40, os fragmentos do produto de degradação SMX dihidrogenado m/z 256,2 são típicos da fragmentação do SMX m/z 254,0, como mostrado no item **5.1** (Figura 10).

6. CONCLUSÃO

Ao término deste trabalho pôde-se concluir que:

- O método analítico LC-MS/MS desenvolvido para a determinação dos fármacos investigados, em efluente hospitalar, como também, para a avaliação da eficiência do processo de eletrocoagulação aplicado a solução sintética dos antimicrobiais e ao efluente enriquecido com SMX e TMP, provou ser sensível, seletivo, dispensando manipulação laboriosa da amostra e exigindo corrida cromatográfica de apenas 5 minutos.
- Na investigação da presença dos antimicrobiais SMX e TMP no efluente PA-HUSM foram encontradas as concentrações médias de 27,7 e 6,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente, o que pode representar um risco para a saúde pública, uma vez que este efluente hospitalar final é descartado em curso d'água que corta o Campus da UFSM.
- No estudo com auxílio de LC-MS/MS_Q-Trap, os metabólitos N₄-acetilsulfametoxazol (295 Da) e dihidroxitrimetoprima (324 Da) foram identificados no efluente hospitalar, sendo possível a proposição se seus prováveis fragmentos.
- O processo de eletrocoagulação aplicado ao efluente hospitalar nas condições otimizadas com auxílio de planejamento com metodologia de superfície de resposta mostrou-se eficiente na redução da DQO do efluente (valor máximo de 57,9%).
- Identificou-se o produto da degradação do SMX, proposto por **Hu e colaboradores**⁵⁵, como sendo SMX dihidroxilado. Identificou-se, também, o dihidro-sulfametoxazol como produto da degradação do SMX. O analito TMP não foi degradado, mas sim, adsorvido no lodo gerado na eletrocoagulação.
- Na aplicação do processo de eletrocoagulação ao efluente hospitalar fortificado com 1 mg L^{-1} de ambos os antimicrobiais comprovou-se que, para o

SMX, a degradação não ocorre. No caso da TMP, ocorre uma degradação de 24,0% neste meio.

- Por último, com respeito a uma possível utilização do processo de eletrocoagulação para o tratamento de efluente hospitalar, pode-se afirmar que este processo permite um eficiente abatimento da carga orgânica, mas não promove uma degradação química considerável dos fármacos SMX e TMP, sendo que, grande parte destes fármacos fica adsorvida ao lodo. Considerando-se, ainda, que há necessidade de deposição final do lodo gerado no tratamento, acrescido grandemente do Al_2O_3 formado no processo, e que o consumo de energia é elevado, há necessidade de pesquisa e desenvolvimento em escalas maiores antes de assumir qualquer tipo julgamento de valor.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Investigar a eficiência dos Processos Avançados de Oxidação (PAOs) na degradação dos antimicrobianos SMX e TMP em amostras de efluente hospitalar, bem como, estudar os produtos gerados pela aplicação destes processos;
- Avaliar a variação da toxicidade do efluente hospitalar, contendo SMX e TMP, submetido a tratamento com PAOs;
- Fazer estudo detalhado de identificação de subprodutos da degradação;
- Fazer estudo de biodegradabilidade dos produtos antes e após o tratamento com PAOs;
- Aplicar a técnica analítica de LC-MS/MS na quantificação de resíduos de outros fármacos em amostras de efluente hospitalar.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DÍAZ-CRUZ, S. M. et al. Highly sensitive simultaneous determination of sulfonamide antibiotics and one metabolite in environmental waters by liquid chromatography-quadrupole linear ion trap-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1193, p. 50-59, 2008.
2. ABELLÁN, M. N. Photocatalytic degradation of sulfamethoxazole in aqueous suspension of TiO₂. **Applied Catalysis B: Environmental**, 74, p. 233 – 241, 2007.
3. LINDBERG, R. H. et al. Environmental risk assessment of antibiotics in the Swedish environment with emphasis on sewage treatment plants. **Water Research**, 41, p. 613 – 619, 2007.
4. BACTRIM: SULFAMETOXAZOL + TRIMETOPRIMA. Disponível em: <http://www.roche.com.br/NR/rdonlyres/38CE9618-7331-4F78-8EC9-2E5A90E413CA/17457/Bula1.pdf>. Acesso em : 23 de janeiro de 2009.
5. FUNED: SULFAMETOXAZOL + TRIMETOPRIMA. Disponível em: <http://www.funed.mg.gov.br/produtoseservicos/medicamentos/medicamentos-produzidos-bulas>. Acesso em: 23 de janeiro de 2009.
6. GAUTAM, A. K. et al. Preliminary study of physico-chemical treatment options for hospital wastewater. **Journal of Environmental Management**, 83, p. 298 – 306, 2007.
7. REZAEI, A. et al. Hospital wastewater treatment using an integrated anaerobic aerobic fixed film bioreactor. **American Journal of Environmental Sciences**, 1 (4), p. 259 – 263, 2005.
8. KUMMERER, K. Resistance in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 54(2), p. 311 - 320, 2004.
9. SARTER, S. et al. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish. **Food Control**, 18, p. 1391 – 1396, 2007.
10. KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecological Indicators**, 8, p. 1 – 13, 2008.
11. GULKOWSKA, A. et al. Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, China. **Water Research**, 2007.
12. HERNANDO, M. D. et al. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. **Talanta**, 69, p. 334 – 342, 2006.
13. CRANE, M. et al. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. **Science of the Total Environment**, 367, p. 23–41, 2006

14. GARCÍA-GALÁN, et al. Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics. **Trends in Analytical Chemistry**, 27, p. 11, 2008.
15. LACEY, C. et al. An LC-MS method for the determination of pharmaceutical compounds in Saúde Water treatment plant influent and effluent samples. **Talanta**, 75, p. 1089 – 1097, 2008.
16. BABIC, S. et al. Solid phase extraction and HPLC determination of veterinary pharmaceuticals in wastewater. **Talanta**, 70, p. 732 – 738, 2006.
17. WATRINSON, A. J. et al. Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and wastewater recycling. **Water Research**, 41, p. 4164 – 4176, 2007.
18. KIM, Y. et al. Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. **Environment International**, 33, p. 370 – 375, 2007.
19. PENG, X. et al. A preliminary study on the occurrence and behavior of sulfonamides, ofloxacin and chloramphenicol antimicrobials in wastewaters of two sewage treatment plants in Guangzhou, China. **Science of the Total Environment**, 371, p. 314 – 322, 2006.
20. PHUONG, N. T. et al. Bacterial resistance to antimicrobials use in shrimps and fish farms in the Mekong Delta, Viet Nam. In *Proceedings of the international workshop on antibiotic resistance in Asian aquaculture environments*. **Chianf May, Thailande**, ISBN 88-901344-3-7, 2005.
21. COSTANZO, S.D.; MURBY, J.; BATES, J. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. **Marine Pollution Bulletin**, p. 51, 218–223, 2005.
22. SILVEIRA, C. D. S. **Desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para a determinação de sulfonamidas empregando eletrodo de diamante dopado com boro**. 2008. 86 f. Dissertação (Mestrado em Química na área de Química Analítica) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
23. BABIC, S. et al. Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. **Trends in Analytical Chemistry**, vol. 26, p. 11, 2007.
24. REESE, R. E. et al. **Manual de Antibióticos**, 2 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1995.
25. BULÁRIO ELETRÔNICO DA ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2006. Disponível em: http://www.pdamed.com.br/bulanv/pdamed_0001_00412_01000.php. Acesso em: 07 de novembro de 2008.
26. TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Anti-infecciosos**. 1 reimp. 1ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1993.

27. BARBARIN, N. et al. Comparison between liquid chromatography – UV detection and liquid chromatography – mass spectrometry for the characterization of impurities and/ or degradants present in trimethoprim tablets. **Journal of Chromatography A**, 970, 2002.
28. CCS – Centro de Ciências da saúde da Universidade Federal de Santa Catarina, 2004. Disponível em: <http://www.ccs.ufsc.br/farmacia/tccgenericos/sulfametoxazol/farmacologia>. Acesso em: 08 de novembro de 2008.
29. AMINI, H. et al. Rapid and simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 43, p. 1146 – 1150, 2007.
30. HALLER, M. Y. et al. Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography – mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 952, p. 111 – 120, 2002.
31. CORDEIRO, G. A. **Desenvolvimento de metodologias espectroscópicas multivariadas para quantificação de fármacos em formas farmacêuticas**. 2006. 118 f. (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
32. OECD – Guidelines for the testing of chemicals, PDF (ISSN 1607 – 310X). Disponível em : http://fiordiliji.sourceoecd.org/vl=11308462/cl=16/nw=1/rpsv/periodical/p15_about.htm?jnlissn=1607310x. Acesso em: 08 de novembro de 2008.
33. Commission of the European Communities, Technical guidance document in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and commission regulation (EC) No. 1488/94 on risk assessment for existing substances. Part II. Environmental Risk Assessment, Office for Official Publications of the European Communities, Luxemburg, 1996.
34. LALUMERA, G. M. et al. Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. **Chemosphere**, 54, p. 661- 668, 2004.
35. EGUCHI, K. et al. Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. **Chemosphere**, 57, p. 1733, 2004.
36. SMAILL, F. Antibiotic susceptibility and resistance testing: an overview. **Can J Gastroenterol**, 14 (10), p. 871 – 5, 2000.
37. KOSTICH, M. et al. Risks to aquatic organisms posed by human pharmaceutical use. **Science of the Total Environment**. 389, p. 329 – 339, 2008.
38. KOSJEK, T. et al. Mass spectrometry for identifying pharmaceutical biotransformation products in the environment. **Trends in Analytical Chemistry**, 26, 2007.

39. FATTA, D. Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. **Trends in Analytical Chemistry**, 26, 2007.
40. FARRÉ, M. L. et al. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. **Trends in Analytical Chemistry**, 27, p. 991 – 1007, 2008.
41. CAPPIELLO, A.; FAMIGLINI, G.; PALMA, P. Ionization For LC/MS. **Analytical Chemistry**, p.497- 503, 2003.
42. SKOOG, D, A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN A. T. **Análise Instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.
43. CHANG, H. et al. Simultaneous analysis of 16 sulfonamide and trimethoprim antibiotics in environmental waters by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1190, p. 390–393, 2008.
44. ZHANG, Z. L. et al. Simultaneous determination of various pharmaceutical compounds in water by solid-phase extraction – liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1154, p. 205 – 213, 2007.
45. MCCLURE, E. L. et al. Solid phase microextraction of macrolide, trimethoprim, and sulfonamide antibiotics in wastewaters. **Journal of Chromatography A**, 2007.
46. SPONGBERG, A. L. et al. Pharmaceutical compounds in the wastewater process stream in Northwest Ohio. **Science of the Total Environment**, 397, p. 148 – 157, 2008.
47. CHOI, K. J. et al. Determination of antibiotic compounds in water by on-line SPE-LC/MSD. **Chemosphere**, 66, p. 977 – 984, 2007.
48. FOCAZIO, M. J. et al. A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States — II) Untreated drinking water sources. **Science Of The Total Environment**, 402, p. 201 – 216, 2008.
49. HORDERN, B. K. et al. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. **Water Research**, 42, p. 3498 – 3518, 2008.
50. HEBERER, T. et al. Behaviour and redox sensitivity of antimicrobial residues during bank filtration. **Chemosphere**, 73, p. 451–460, 2008.
51. BARNES, K. K. et al. A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States — I) Groundwater. **Science Of Total Environment**, 402, p.192 – 20, 2008.
52. GÓMEZ, M. J. et al. Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. **Journal of Chromatography A**, 1114, p. 224–233, 2006.

53. DODD, M. C. Aqueous chlorination of the antibacterial agent trimethoprim: Reaction kinetics and pathways. **Water Research**, 41, p. 647 – 655, 2007.
54. EICHHORN, P. et al. 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**, 77, p. 4176 – 4184, 2005.
55. HU, L. et al. Oxidation of sulfamethoxazole and related antimicrobial agents by TiO₂ photocatalysis. **Water Research**, 41, p. 2612 – 2626, 2007.
56. TROVÓ, A.G.; MELO, S.A.S.; NOGUEIRA, R.F.P. Photodegradation of the pharmaceuticals amoxicillin, bezafibrate and paracetamol by the photo-Fenton process – application to sewage treatment plant effluent. **J. Photochem. Photobiol. A: Chem.**, 198, p. 215-220, 2008.
57. BENNER, J.; SALHI, E.; TERNES, T.; GUNTEN, U. Ozonation of reverse osmosis concentrate: Kinetics and efficiency of beta blocker oxidation. **Water Res.**, doi:10.1016/j.watres.2008.04.002.
58. YURDAKAL, S.; LODDO, V.; AUGUGLIARO, V.; BERBER H.; PALMISANO, G.; PALMISANO, L. Photodegradation of pharmaceutical drugs in aqueous TiO₂ suspensions: Mechanism and kinetics. **Catal. Today**, 129, 9-15, 2007.
59. MOZIA, S.; TOMASZEWSKA, M.; MORAWSKI, A.W. Photocatalytic membrane reactor (PMR) coupling photocatalysis and membrane distillation—Effectiveness of removal of three azo dyes from water. **Catal. Today**, 129, 3-8, 2007.
60. FABBRI, D.; PREVOT A.B.; ZELANO, V.; GINEPRO, M.; PRAMAURO E. Removal and degradation of aromatic compounds from a highly polluted site by coupling soil washing with photocatalysis. **Chemosphere**, 71, 59-65, 2008.
61. VASCONCELOS, T.G. **Antimicrobial ciprofloxacina em efluente hospitalar: exposição ambiental, avaliação de risco e degradação através de processos avançados de oxidação**, RS. 2006. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal Santa Maria, Santa Maria, 2006.
62. FRANK, C.S. **Concepção, construção e avaliação de fotorreatores catalisados na degradação de carga poluente e amoxicilina em efluente hospitalar**, RS. 2008. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal Santa Maria, Santa Maria, 2008.
63. ILHAN, F. et al. Treatment of leachate by electrocoagulation using aluminum and iron electrodes. **Journal of Hazardous Materials**, 154, p. 381 – 389, 2008.
64. CASILLAS, H. A. M. et al. Electrocoagulation mechanism for COD removal. **Separation and Purification Technology**, 56, p. 204 – 211, 2007.
65. HEIDMANN, I. et al. Removal of Zn(II), Cu(II), Ni(II), Ag(II) e Cr(II) present in aqueous solutions by aluminium electrocoagulation. **Journal of Hazardous Materials**, 152, p. 934 – 941, 2008.

66. HENRIQUES, D.M. **Degradação de nonilfenol polietoxilado e de efluente textil por meio de eletrocoagulação e processos Fenton**, RS. 2004. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal Santa Maria, Santa Maria, 2004;
67. MORALES, G.R. et al. Aluminum electrocoagulation with peroxide applied to wastewater from pasta and cookie processing. **Separation and Purification Technology**, 54, p. 124 – 129, 2007.
68. GHOSH, D.; SOLANKI, H.; PURKAIT, M.K. Removal of Fe (II) from tap water by electrocoagulation technique. **Journal of Hazardous Materials**, 2007.
69. UGURLU, M. et al. The removal of lignin and phenol from paper mill effluents by electrocoagulation. **Journal of Environmental Management**, 2007.
70. CHEMICAL OXYGEN DEMAND – Wikipedia, the free encyclopedia. Disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/Chemical_oxygen_demand. Acesso em: 18 de dezembro de 2008.
71. AQUINO, S. F. et al. Considerações práticas sobre o teste de demanda química de oxigênio (DQO) aplicado a análise de efluentes anaeróbios. **Nova Técnica – Eng. sanit. Ambient**, 11, p. 295 – 304, 2006.
72. MARTINS, A. F. et al. Semi-micro reflux procedure for minimization of chloride interference by COD determination. **Clean**, 36, p. 66 – 69, 2008.
73. MARTINS, A. F. et al. COD Evaluation of Hospital Effluent by Means of UV-Spectral Deconvolution. **Clean**, 36, (10 -11), p. 66-69, 2008.
74. NEBOT, C. et al. Quantification of human pharmaceuticals in water samples by high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 598, p. 87-94, 2007.
75. AKAY, C. et al. Simultaneous LC determination of trimethoprim and sulphamethoxazole in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 30, p. 1207 – 1213, 2002.
76. APHA-AWWA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed., **American Public Health Association**, 1995.
77. MOUEDHEN, G. et al. Behavior of aluminum electrodes in electrocoagulation process. **Journal of Hazardous Materials**. 150, p. 124 – 135, 2008.
78. DIAZ-CRUZ, S. M. et al. LC-MS² trace analysis of antimicrobials in water, sediment and soil. **Trends in Analytical Chemistry**, 24, p. 645 – 653, 2005.
79. RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, 27, p. 771 – 780, 2004.
80. MOLLAH, M. Y. A. et al. Fundamentals, present and future perspectives of electrocoagulation. **Journal of Hazardous Materials**, B114, p. 199 – 210, 2004.

81. BENSADOK, K. et al. Eletrocoagulation of cutting oil emulsions using aluminium plate electrodes. **Journal of Hazardous Materials**, 152, p. 423 – 430, 2008.