



UFSM

Tese de Doutorado

**ANTIMICROBIAL CIPROFLOXACINA EM EFLUENTE
HOSPITALAR: EXPOSIÇÃO AMBIENTAL, AVALIAÇÃO DE
RISCO E DEGRADAÇÃO ATRAVÉS DE PROCESSOS
AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO**

Tibiriçá Gonçalves Vasconcelos

PPGQ

Santa Maria - RS, BRASIL

2006

**ANTIMICROBIAL CIPROFLOXACINA EM EFLUENTE
HOSPITALAR: EXPOSIÇÃO AMBIENTAL, AVALIAÇÃO DE
RISCO E DEGRADAÇÃO ATRAVÉS DE PROCESSOS
AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO**

Tibiriçá Gonçalves Vasconcelos

Tese 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
DOCTOR EM QUÍMICA

PPGQ

Santa Maria, RS, Brasil

2006

Universidade Federal de Santa Maria

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química

A comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova a tese de doutorado

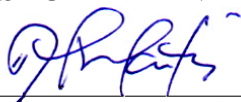
**ANTIMICROBIAL CIPROFLOXACINA EM EFLUENTE HOSPITALAR:
EXPOSIÇÃO AMBIENTAL, AVALIAÇÃO DE RISCO E DEGRADAÇÃO
ATRAVÉS DE PROCESSOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO**

elaborada por

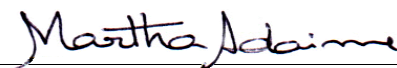
TIBIRIÇÁ GONÇALVES VASCONCELOS

Como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em química

COMISSÃO EXAMINADORA:



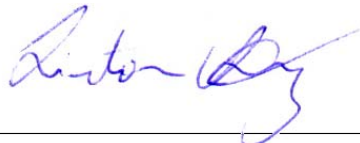
Prof. Dr. Ayrton F. Martins - Orientador
Universidade Federal de Santa Maria



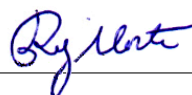
Prof. Dr. Martha Bohrer Adaime
Universidade Federal de Santa Maria



Prof. Dr. Adilson Bem da Costa
Universidade de Santa cruz do Sul



Prof. Dr. Airton Kunz
Universidade de Santa cruz do Sul



Prof. Dr. Rejane Helena Ribeiro da Costa
Universidade Federal de Santa Catarina

Santa Maria, 01 de setembro de 2006

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores Prof. Dr. Ayrton Figueiredo Martins e Prof. Dr. Klaus Kümmerer pela oportunidade e confiança, aos meus colegas do Laboratório de Tratamento de Efluentes e Resíduos da Universidade Federal de Santa Maria e da Seção de Epidemiologia e Medicina Ambiental do Hospital Universitário de Freiburg pelo companheirismo, às bancas examinadoras do exame de qualificação e defesa pela valiosa contribuição e a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço também a minha família pelo apoio e especialmente a minha esposa Ana Carla pelo amor e compreensão.

Agradeço à **Universidade Federal de Santa Maria**, à **Universidade de Freiburg**, ao **CNPq**, ao **CT-Hidro** e ao **DAAD** pela infra-estrutura e suporte financeiro para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS -----	ix
LISTA DE FIGURAS -----	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS -----	xii
RESUMO -----	xiv
ABSTRACT -----	xvi
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS -----	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -----	5
2.1. Fármacos no meio ambiente-----	5
2.2. Uso de antibióticos-----	6
2.3. Destino, ocorrência, efeitos e riscos da ciprofloxacina no meio ambiente-----	9
2.4. Degradação da ciprofloxacina: características relevantes-----	13
2.4.1 Fotosensibilidade da ciprofloxacina-----	13
2.4.2. Reatividade entre ozônio e ciprofloxacina-----	15
2.5. Processos avançados de oxidação-----	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS -----	16
3.1. Materiais-----	16
3.2. Reagentes e soluções-----	16
3.3. Determinação de ciprofloxacina no efluente do PA-HUSM-----	16
3.3.1. Coleta de amostras-----	16
3.3.2. Caracterização das amostras-----	17
3.3.3. Determinação cromatográfica da concentração de ciprofloxacina-----	19
3.4. Degradação fotoinduzida de ciprofloxacina em solução sintética-----	21
3.4.1. Estudo cinético-----	21
3.4.2. Estudo da biodegradabilidade-----	22
3.4.3. Estudo quantitativo de ciprofloxacina e qualitativo de seus metabólitos de fotodegradação-----	23
3.5. Processos avançados de oxidação na degradação de ciprofloxacina em efluente do PA-HUSM-----	23
3.5.1. Amostras-----	23
3.5.2. Determinações analíticas-----	24
3.5.3. Processo fotoinduzido-----	24
3.5.4. Fotocatálise heterogênea-----	24

3.5.5. Ozonização e peroxônio-----	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	27
4.1. Cito/genotoxicidade do efluente do PA-HUSM-----	27
4.2. Determinação de ciprofloxacina no efluente do PA-HUSM-----	28
4.3. Degradação fotoinduzida de ciprofloxacina em solução sintética-----	35
4.3.1. Estudo cinético -----	35
4.3.2. Estudo da biodegradabilidade -----	37
4.3.3. Subprodutos de degradação-----	40
4.4. Processos avançados de oxidação na degradação de ciprofloxacina no efluente do PA-HUSM-----	49
5. CONCLUSÕES-----	55
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS-----	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações ambientais de ciprofloxacina -----	10
Tabela 2. Escala de fatores de indução e relação com efeitos genotóxicos-----	12
Tabela 3. Estudos envolvendo fotodegradação da ciprofloxacina -----	14
Tabela 4. Características das amostras de efluente do PA-HUSM tomadas em P1 e que foram utilizadas no estudo envolvendo PAOS-----	18
Tabela 5. Condições das células das radículas de <i>Allium cepa</i> durante o ciclo mitótico	27
Tabela 6. Figuras de mérito do procedimento 1 usado na determinação de ciprofloxacina no efluente do PA-HUSM -----	29
Tabela 7. Concentrações de ciprofloxacina no efluente do PA-HUSM medidas nos pontos P1 e P2-----	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do sistema de esgotos da unidade de Pronto Atendimento do Hospital Universitário de Santa Maria -----	3
Figura 2. Fontes e distribuição de fármacos no meio ambiente-----	8
Figura 3. Estrutura da ciprofloxacina-----	9
Figura 4. Processos fotoquímicos relevantes para fluoroquinolonas-----	14
Figura 5. Sistemas utilizados na degradação fotoinduzida e fotocatalítica da ciprofloxacina em amostras de efluente do PA-HUSM.-----	25
Figura 6. Sistema utilizado nos processos de ozonização -----	26
Figura 7. Divisão mitótica de células de radículas de <i>Allium cepa</i> .-----	28
Figura 8. Espectros de massas no tempo de retenção característico da ciprofloxacina, obtidos através do procedimento 2, na determinação por LC-MS-----	30
Figura 9. Variação da concentração de ciprofloxacina no efluente do PA-HUSM após passagem pelo sistema de tratamento -----	34
Figura 10. Frações das microespécies da ciprofloxacina em diferentes pH -----	35
Figura 11. Processo fotoinduzido de degradação de ciprofloxacina em solução sintética-----	37
Figura 12. Pronta biodegradabilidade de soluções sintéticas de ciprofloxacina, medida através de CBT, durante processo fotoinduzido -----	39
Figura 13. Variação de concentração de ciprofloxacina em diferentes amostras de processo fotoinduzido (amostras dos tempos 0, 2 e 4 min) durante os 28 dias de análise do CBT-----	39
Figura 14. Espectros de fluorescência de amostras de solução sintética de ciprofloxacina tomadas em diferentes tempos (0, 2 e 4 min) de processo fotoinduzido com identificação dos sinais de interesse-----	40
Figura 15. Metabólitos possivelmente formados e suas respectivas massas -----	41
Figura 16. Espectros de massas obtidos através de análise por LC-MS referentes ao tempo de retenção 7,5, característico do sinal 1 (sinal obtido através de análise por HPLC-FLD – Figura 14) durante diferentes tempos (0, 2 e 4 min) de processo fotoinduzido -----	42
Figura 17. Espectros de massas obtidos através de análise por LC-MS referentes ao tempo de retenção 7,2 min, característico do sinal 2 (sinal obtido através de análise por HPLC-FLD, Figura 14) durante diferentes tempos (0, 2 e 4 min) de processo fotoinduzido -----	43

Figura 18. Fotometabólitos de ciprofloxacina em solução aquosa formados em diferentes condições e suas respectivas rotas reacionais-----	45
Figura 19. Compostos provavelmente formados durante degradação fotoinduzida de ciprofloxacina em solução sintética (pH 9 e em meio a HO ⁻) e rotas possíveis -----	47
Figura 20. Compostos com maior probabilidade de serem formados durante degradação fotoinduzida de ciprofloxacina em solução sintética (pH 9 e em meio HO ⁻) e rotas reacionais possíveis-----	48
Figura 21. PAOs na degradação de ciprofloxacina em efluente do PA-HUSM -----	50
Figura 22. Cromatogramas de soluções do efluente do PA-HUSM durante ozonização como um modelo do perfil dos metabólitos, primariamente formados, em função do tratamento com PAOs-----	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- τ - Tempo de existência
- Φ - Rendimento quântico
- λ^{\max}_{T-T} - Comprimento de onda máximo de absorção triplete-triplete
- ϵ_T^{\max} - Absortividade triplete molar
- 1O_2 - Oxigênio no estado singlete
- CAM - Concentrações ambientais medidas
- CAP - Concentração ambiental predita
- CBT - *Closed bottle test*
- CE - Concentração efetiva
- CE_0 - Concentração efetiva de inibição em algum grau do crescimento
- CE_{100} - Concentração efetiva de inibição de 100% do crescimento
- CE_{50} - Concentração efetiva de inibição de 50% do crescimento
- CEO - Concentração de efeito observado
- CIP - Ciprofloxacina
- CPENO - Concentração predita de efeito não observado
- DQO - Demanda química de oxigênio
- ETE - Estação de tratamento de esgotos
- FI - Fator de indução
- FQ - Fluoroquinolonas
- FQ^{1*} - Fluoroquinolonas no estado singlete
- FQ^{3*} - Fluoroquinolonas no estado triplete
- HPLC-FLD - Cromatografia líquida com detecção de fluorescência
- HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência
- HUSM - Hospital Universitário de Santa Maria
- IM - Índice mitótico
- ISC - Cruzamentos intersistemas
- K - Constante de velocidade de reação
- k''_{app} - Constante aparente de velocidade de reação
- LATER - Laboratório de Tratamento de Efluentes e Resíduos
- LC-MS - Cromatografia líquida com detecção de massas
- LD - Limite de detecção

$\log K_d$ - Coeficiente de partição

$\log K_{ow}$ - Coeficiente de partição octanol-água

LQ - Limite de quantificação

P1 - Ponto de coleta 1 (antes do sistema de fossa séptica e filtro anaeróbio da rede PA-HUSM)

P2 - Ponto de coleta 2 (depois do sistema de fossa séptica e filtro anaeróbio da rede PA-HUSM)

PA-HUSM - Pronto Atendimento do Hospital Universitário de Santa Maria

PAOs - Processos avançados de oxidação

ST - Sólidos totais

T-T - Absorção triplete-triplete

t - Tempo

$t_{1/2}$ - Tempo de meia-vida

ThOD - Demanda teórica de oxigênio

UFMS - Universidade Federal de Santa Maria

VMT - Valor médio teórico

RESUMO

ANTIMICROBIAL CIPROFLOXACINA EM EFLUENTE HOSPITALAR: EXPOSIÇÃO AMBIENTAL, AVALIAÇÃO DE RISCO E DEGRADAÇÃO ATRAVÉS DE PROCESSOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO

Autor: **Tibiriçá Gonçalves Vasconcelos**

Orientador: **Ayrton Figueiredo Martins**

Neste trabalho, investigou-se a presença do antimicrobial ciprofloxacina (CIP) em efluente do Pronto Atendimento do Hospital Universitário de Santa Maria (PA-HUSM) e a sua destruição através de processos avançados de oxidação (PAOs) - processo fotoinduzido (lâmpada de Hg de média pressão de 125 W, reator em batelada com recirculação, pH 3), fotocatalise heterogênea (lâmpada de Hg de média pressão de 125 W, reator tubular helicoidal, pH 3, 400 mg TiO₂), ozonização e peroxônio (450 mg h⁻¹ de O₃, pH 9, sistema de semi-batelada e 500 mg H₂O₂ L⁻¹ no caso do peroxônio). A determinação de CIP, realizada através de cromatografia líquida com detector de fluorescência (HPLC-FLD), envolveu dois pontos de amostragem: antes (P1) e depois (P2) do sistema de tratamento (fossa séptica e filtro anaeróbio) durante 7 dias. As concentrações ambientais medidas (CAMs) foram 19-155 µg L⁻¹ (média: 65±45 µg L⁻¹) e 32-99 µg L⁻¹ (média: 54±21 µg L⁻¹) em P1 e P2, respectivamente. Realizou-se avaliação de risco baseado nas CAMs e em dados ecotoxicológicos retirados da literatura. Usando-se três diferentes valores de concentrações preditas de efeito não observado (CPENO), foram calculadas razões CAM/CPENO entre 4-1.980. Estes quocientes indicam alto risco ao meio ambiente e a necessidade de um projeto de gerenciamento de risco. Além disso, estes valores são 48-3.300 vezes maiores que aqueles encontrados em países desenvolvidos, o que significa uma situação bem mais crítica do que as que vinham sendo reportadas e mundialmente discutidas. Na aplicação de PAOs ao efluente do PA-HUSM a oxidação fotoinduzida demonstrou ser muito mais lenta quando comparada aos outros processos: tempo de meia-vida (t_{1/2}) da CIP durante degradação fotoinduzida foi de 2,5 h, enquanto durante os processos de fotocatalise heterogênea, peroxônio e ozonização, t_{1/2} foi 20, 15 e 9 min, respectivamente. Os melhores resultados obtidos para a ozonização na degradação de CIP 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 demanda química de oxigênio (DQO) e absorvância integrada, os processos peroxônio e de fotocatalise heterogênea, (maior capacidade de geração de HO•) foram mais efetivos que os processos fotoinduzido e de ozonização (menor capacidade de geração de HO•). Os produtos formados durante os diferentes processos demonstraram ser bastante semelhantes. Avaliou-se também a degradação fotoinduzida de CIP em solução sintética (lâmpada de Hg de média pressão de 150 W, reator em batelada), em concentração ambiental de 0,1 mg L⁻¹ (0,3 x 10⁻³ mol L⁻¹) e pH 9 (NH₄Cl/KOH) por meio de HPLC-FLD. A taxa de reação de primeira ordem e t_{1/2} foram 1,56 ± 0,11 x 10⁻² s⁻¹ e 44±7 s, respectivamente. As estruturas dos fotometabólitos foram investigadas através de cromatografia líquida com detecção de massas (LC-MS). Cinco prováveis fotometabólitos primários foram identificados e demonstraram não ser prontamente biodegradáveis frente a *closed bottle test* (CBT). Estes compostos são produtos de

defluoração, descarboxilação e abertura do anel piperazínico e já foram identificados em estudos anteriores, porém, nunca nas condições testadas na presente investigação.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Autor: **Tibiriçá Gonçalves Vasconcelos**

Orientador: **Ayrton Figueiredo Martins**

Título: **Antimicrobial ciprofloxacina em efluente hospitalar: exposição ambiental, avaliação de risco e degradação através de processos avançados de oxidação.**

Tese de Doutorado

Santa Maria, 1 de setembro de 2006

ABSTRACT

ANTIMICROBIAL CIPROFLOXACIN IN HOSPITAL EFFLUENT: ENVIRONMENTAL EXPOSURE, RISK ASSESSMENT AND DEGRADATION BY ADVANCED OXIDATION PROCESSES

Author: **Tibiriçá Gonçalves Vasconcelos**

Adviser: **Ayrton Figueiredo Martins**

In the present study, the presence of the antimicrobial ciprofloxacin (CIP) in effluent from the first-aid clinic of the University Hospital of Santa Maria (PA-HUSM) and its degradation by advanced oxidation processes (AOPs) - photo-induced process (medium pressure Hg-lamp 125 W, batch recirculation reactor, pH 3), heterogeneous catalysis (medium pressure Hg-lamp 125 W, helicoidal tubular reactor, pH 3, 400 mg TiO₂), ozonation and peroxone (450 mg O₃ h⁻¹, pH 9, semi-batch system, 500 mg H₂O₂ L⁻¹ for peroxone) were investigated. Determination of the CIP concentration developed by high pressure liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD) was measured before (P1) and after (P2) treatment system (cesspit and anaerobic filter), during 7 days. Measured environmental concentrations (MECs) were 19-155 µg L⁻¹ (average: 65±45 µg L⁻¹) and 32-99 µg L⁻¹ (average: 54±21 µg L⁻¹) in P1 and P2, respectively. In addition, risk assessment based on the MECs and ecotoxicity data from the literature was proposed. Using three different values of predicted no-effect concentration (PNEC), MECs/PNEC ratios between 4-1,980 were calculated. These risk quotients imply a high risk for a negative impact of CIP to aquatic environment and suggest that risk management is necessary. These quotients are 48-3,300-fold higher than those found in developed countries and mean a worse-case than the discussed wide world until now. Regarding the treatment of the effluent by AOPs, photo-induced degradation was slowest than the other processes: half-life (t_{1/2}) during photo-induced of CIP was 2.5 h, while heterogeneous photocatalysis, peroxone and ozonation presented 20, 15 and 9 min, respectively. The best results obtained through ozonation were consequence of the higher reactivity of CIP with ozone than with radicalar species formed during the processes. However, about chemical oxygen demand (COD) and integrated absorbance, peroxone and heterogeneous photocatalysis (higher capacity for hydroxyl radical generation) were more effective than the photo-induced and ozonation processes (lower hydroxyl radical generation capacity). The metabolites formed during the processes demonstrated to be very similar. In addition, photo-induced degradation of CIP (medium pressure Hg-lamp 150 W, batch reactor) in environmental concentration of 0.1 mg L⁻¹ (0.3 x 10⁻⁶ mol L⁻¹) and pH 9 (NH₄Cl/KOH) was studied. The first order rate constant and half-life were 1.56 ± 0.11 x 10⁻² s⁻¹ (R² > 0.999) and 44±7 s, respectively. The first formed metabolites were identified by HPLC-FLD and high pressure liquid chromatography with mass detection (LC-MS). Five compounds were qualitatively identified as probable metabolites and were not ready biodegradable by closed bottle test (CBT). They would be products from reactions of defluorination, decarboxilation and break of the piperazine ring. They have been already reported in the literature but under other conditions.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Author: Tibiriçá Gonçalves Vasconcelos

Adviser: Ayrton Figueiredo Martins

Title: Antimicrobial ciprofloxacin in hospital effluent: environmental exposure, risk assessment and degradation by advanced oxidation processes.

PhD Thesis

Santa Maria, September 1st, 2006

1. Introdução e objetivos

“Fármacos no meio ambiente” é um campo que tem despertado crescente interesse da comunidade científica. A ocorrência, os efeitos e os riscos destas espécies xenobióticas têm sido amplamente reportados^{10,38,54,57}, sendo que, atualmente, o foco da discussão está cada vez mais se voltando para a avaliação da capacidade de sua destruição/remoção, tanto através de sistemas convencionais como não-convencionais de tratamento de efluentes^{44,45,46,48}. Considerando-se estudos de exposição ambiental, concentrações de fármacos na faixa de ng- $\mu\text{g L}^{-1}$ vêm sendo reportadas na literatura.

Preocupada com esta situação, a Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) colocou os resíduos gerados pelo Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), uma das mais importantes instituições de saúde da região centro do estado do Rio Grande do Sul (atendimento diário de cerca de 2000 pessoas) como ponto prioritário dentro de uma parceria firmada com a Universidade de Freiburg - Alemanha, que visa avaliar as condições da UFSM no que diz respeito ao tratamento e gerenciamento de seus resíduos. Ações referentes ao resíduo sólido do hospital já encontram-se em estágio mais avançado, enquanto a condição dos efluentes líquidos gerados pelo HUSM é ainda um grande problema. O desconhecimento de sua composição e da real dimensão do impacto ambiental por eles causado impossibilita a tomada de ações corretivas adequadas. Assim, os primeiros passos do trabalho de remediação do problema passam pela avaliação das condições dos efluentes no que diz respeito à presença de fármacos.

Ambientalmente, antibióticos constituem a classe de fármacos considerada uma das mais problemáticas. Isto devido a sua baixa biodegradabilidade, e toxicidade para bactérias^{1,3,59}, além do potencial para o desenvolvimento de espécies bacterianas resistentes⁵⁸. Dito isto, estudos de exposição e risco ambiental são uma forma adequada de iniciar a caracterização dos efluentes do HUSM.

Partindo para uma abordagem mais específica, dentre as classes de antibióticos de maior relevância ambiental estão as fluoroquinolonas, sendo que a ciprofloxacina (CIP), espécie que atua contra uma ampla gama de bactérias gram-positivas e gram-negativas¹⁰⁴ tem demonstrado ser a mais problemática. Isto devido aos efeitos tóxicos mais acentuados que ela exerce sobre bactérias, além, também, da sua biorecalcitrância^{1,37,40,41,59}. Devido a sua ampla utilização, a CIP vem sendo identificada em concentrações-traço em estações de tratamento de esgotos (ETEs), águas superficiais e efluentes hospitalares (vide Tabela 1, seção 2.3), sendo que estudos visando avaliar a carga ambiental da CIP demonstram a sua alta taxa de adsorção a partículas sólidas como aquelas de lodos ativados, solos e sedimentos^{33,34,62}. A CIP é um dos antibióticos mais administrados do HUSM (consumo anual de aproximadamente 6,5 kg) sendo que a unidade que mais a utiliza é a de pronto atendimento (PA-HUSM). O quadro descrito acima, credencia a CIP a ser a primeira espécie a ter o comportamento investigado no efluente do HUSM.

O tratamento das águas servidas, geradas pelo hospital, é feito através de um sistema doméstico dotado de fossa séptica e filtro anaeróbio, sendo o resíduo tratado descartado em córrego que corta o campus da UFSM (Figura 1). Nos últimos anos, o atendimento do HUSM foi intensificado; porém, nenhuma medida foi tomada no sentido de adequar a rede de esgotos à nova demanda.

Frente a este panorama, admite-se como necessárias tecnologias de tratamento de efluentes adequadas à conversão de fármacos como a CIP a espécies menos tóxicas e/ou mais suscetíveis a tratamento microbiológico. O conhecimento deste quadro faz com que tecnologias alternativas baseadas no uso de oxidantes com ozônio, radiação UV e peróxido de hidrogênio na degradação de fármacos, isoladamente ou de forma combinada (processos avançados de oxidação, PAOs), venham sendo amplamente investigadas^{6,65,102}. Os resultados têm demonstrado que estes processos são bastante promissores. Entretanto, a grande maioria dos estudos restringe-se à investigação de solução aquosa dos compostos isolados. Este tipo de estudo é bastante útil como primeira abordagem na elucidação do mecanismo global da reatividade do substrato. Por outro lado, a

utilização desta via de investigação como modelo e base para a implementação de processos de degradação de compostos específicos em efluentes reais, é bastante discutível. Por esse motivo, é indispensável verificar-se também a resposta dos processos investigados face a amostras reais.

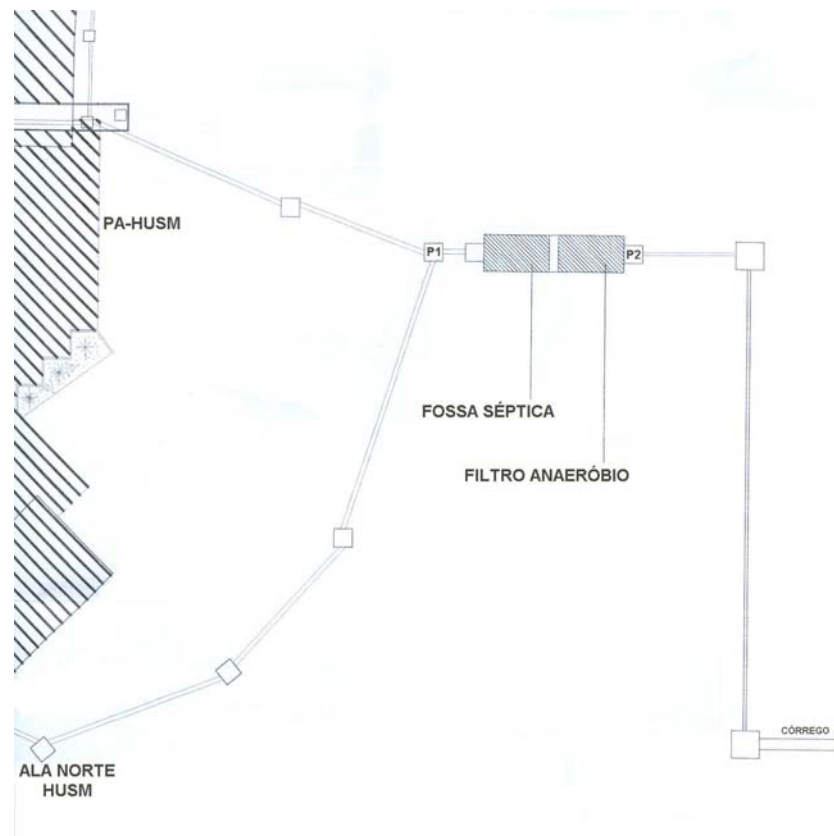


Figura 1 - Esquema do sistema de esgotos da unidade de Pronto Atendimento do Hospital Universitário de Santa Maria.

Em relação à aplicação de oxidantes na degradação da CIP, é importante considerar uma característica de fluoroquinolonas que é a sua fotoinstabilidade. Dentro disto, uma série de estudos a respeito da identificação dos metabólitos de fotodegradação da CIP^{14,74,93} e sobre a diminuição da atividade biológica de soluções irradiadas⁸⁴ vêm sendo feitos. Entretanto, pouco se sabe a respeito da biodegradabilidade destes compostos e da sua toxicidade para bactérias.

Dentro deste contexto, o objetivo central deste estudo foi dar início a um trabalho de gerenciamento dos efluentes gerados pelo HUSM, passando por

estudos de exposição e risco ambiental dos fármacos utilizados pelo hospital. Já de forma mais específica - tomando-se a CIP - este trabalho visa:

- Avaliar a capacidade de eliminação de cito/genotoxicidade do efluente do PA-HUSM pelo sistema de fossa séptica e filtro anaeróbio;
- Investigar a exposição ambiental da CIP presente no efluente do PA-HUSM e avaliar a eficiência de remoção do sistema de fossa séptica e filtro anaeróbio;
- Conduzir estudo de avaliação de risco ambiental da CIP, comparando com resultados de estudos em países desenvolvidos;
- Avaliar a degradação fotoinduzida da CIP em concentrações similares às aquelas encontradas no efluente do PA-HUSM, definindo parâmetros cinéticos;
- Identificar metabólitos primários da fotodegradação da CIP e sua pronta biodegradabilidade, além de discutir possíveis rotas de formação;
- Avaliar a efetividade dos processos fotoinduzido, ozonização, peroxônio e fotocatalise heterogênea na degradação da CIP no efluente PA-HUSM.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Fármacos no meio ambiente

O interesse científico pela questão “fármacos no meio ambiente” foi despertada nos anos 70^{77,91}. A principal informação tirada deste período foi de que estas espécies apresentavam baixa biodegradabilidade. Durante os anos 80, os holofotes da ciência ambiental se voltaram para uma série de outros compostos deixando os fármacos um pouco esquecidos. A partir da metade dos anos 90 a pesquisa a este respeito voltou a crescer, juntamente com a discussão envolvendo compostos químicos disruptores endócrinos. De lá para cá a ocorrência, os efeitos e os riscos destas espécies ao meio ambiente vêm sendo investigados^{10,21,38,42,54, 56,57,97,99}.

Em relação ao destino de fármacos no ambiente, um editorial publicado na revista *Chemosphere*, em 2000²¹, faz uma boa análise, ressaltando que, para identificar as rotas de exposição no meio ambiente, é necessário dividirem-se as substâncias usadas, em tratamento humano e tratamento veterinário, mesmo que a droga seja utilizada nos dois casos. Isto porque o local de aplicação e, conseqüentemente, as rotas seguidas pelos fármacos, após sua excreção, serão diferentes de acordo com um ou outro grupo. A identificação da rota de exposição é crucial para a estimativa da carga ambiental correspondente, visto que, assim como acontece com os pesticidas, é a dose da droga e a duração do tratamento que determinam a carga ambiental. Fármacos de uso humano, normalmente, atingem as ETEs através das fezes e da urina. O possível destino de drogas em ETEs, assim como qualquer outro xenobiótico, pode ser dividido da seguinte maneira:

- A droga e/ou seus metabólitos são mineralizados por microrganismos;
- A droga e/ou seus metabólitos são relativamente persistentes em ETEs, o que implica, dependendo da lipofilicidade ou outras possíveis ligações (p. ex., força iônica) que uma fração da substância será retida no lodo. Se este

lodo é utilizado como adubo, esta substância alcançará o solo. Novamente, o destino da droga depende da lipofilicidade ou outra habilidade de se ligar a lodos, sedimentos e solos. Espécies que apresentam mobilidade no solo podem percolar e contaminar lençóis freáticos ou águas superficiais;

- A droga e/ou seus metabólitos são persistentes e ao mesmo tempo polares e com baixa capacidade de se ligarem a lodos, sedimentos e solos. Estas espécies não são retidas nem degradadas em ETEs, alcançando facilmente ambientes aquáticos, afetando os organismos destes ecossistemas.

Uma vez em águas superficiais, a possibilidade de fármacos atingirem água potável aumenta, como já vem sendo reportado na literatura⁷². A situação é ainda mais grave no que diz respeito a países em desenvolvimento, onde grande parte das comunidades não possui rede de esgotos e de água tratada para consumo. Em ETEs os principais mecanismos de remoção de fármacos são a degradação biológica⁴⁸ e a adsorção³⁴. Entretanto, visto que uma ampla gama de compostos é recalcitrante aos tratamentos aplicados em ETEs, processos como ozonização, oxidação avançada e fotoprocessos vem sendo extensivamente investigados^{44,45,46,65}. O esquema da Figura 2 ilustra as fontes e distribuição de fármacos no meio ambiente⁵⁵.

2.2. Uso de antibióticos

Os antibióticos são considerados um dos mais importantes grupos de fármacos. Estas espécies são extensivamente utilizadas na medicina humana e veterinária, e, em aquicultura, com o propósito de prevenir ou tratar infecções microbiais, embora na pecuária sejam também usadas como promotoras de crescimento. Estima-se que o mercado mundial consuma algo em torno de 100.000 e 200.000 toneladas de antibióticos¹⁰³. Em 1996, na Comunidade Européia foram usadas cerca de 10.200 toneladas destes medicamentos, sendo que, aproximadamente, 50% foram administrados em medicina veterinária como promotores de crescimento. Nos Estados Unidos, em torno de 16.200 toneladas de antibióticos

foram produzidas no ano de 2000. Destes, 70% são destinados à pecuária. Isto corresponde a 8 vezes o que é usado em medicina humana⁵⁶. Posteriormente, o uso de uma série de promotores de crescimento foi proibido na comunidade europeia, o que fez com que seu consumo diminuísse em relação aos antibióticos empregados em medicina humana⁵². No Brasil, a legislação que abrange resíduos hospitalares é não-específica e não trata separadamente antibióticos nem qualquer outra espécie de fármaco. Segundo as resoluções nº 358 do Conselho Nacional de Meio Ambiente e RDC nº 306 da Agência Nacional de Saúde, os efluentes hospitalares líquidos, para serem lançados na rede pública de esgoto ou em corpo receptor, devem atender às diretrizes estabelecidas pelos órgãos ambientais, gestores de recursos hídricos e de saneamento. Porém, estas diretrizes não incluem parâmetros para produtos farmacêuticos.

Quinolonas e Fluoroquinolonas. Fluoroquinolonas são agentes bactericidas extremamente úteis, particularmente, devido ao seu amplo espectro de ação e boa absorção oral⁶⁰. As primeiras quinolonas (ácido nalidíxico, ácido oxolínico, cinoxacina) apresentavam a limitação de não atingirem níveis antibacterianos sistêmicos, sendo, por isso, úteis apenas como anti-sépticos urinários. Os análogos fluorados mais novos são derivados do ácido nalidíxico sintético (norfloxacina, ciprofloxacina, enrofloxacina) e exibem atividade antibacteriana muito maior, atingem níveis bactericidas no sangue e nos tecidos e possuem baixa toxicidade⁵¹. Estes fármacos são potentes inibidores da síntese de ácidos nucleicos, bloqueando a ação da enzima DNA-girase (topoisomerase II)⁵⁰. Acredita-se que isto ocorre através de pontes de hidrogênio e interações de cargas com o DNA bacterial, na presença da enzima. De acordo com o modelo aceito para a ligação fluoroquinolona-DNA, a fração quinolônica da molécula é responsável por estas interações⁸⁷.

Dentre as fluoroquinolonas, tomemos a CIP, objeto de estudo desta tese. A CIP (Figura 3) possui alta atividade contra uma ampla gama de bactérias gram-positivas, incluindo várias espécies de *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas*, algumas gram-positivas e muitas aeróbias e anaeróbias facultativas, *Mycoplasma* e *Rickettsia*^{8,19,26,104}. Comparado à fluoroquinolonas similares, como

norfloxacin, ofloxacin, pefloxacin and enoxacin, the CIP is approximately 4 times more active against almost all bacteria mentioned above¹⁰⁰. When administered orally, the CIP is well absorbed and distributed in tissues and excreted in urine and bile, in high concentrations^{11,83,105} (81% of administered to humans¹¹).

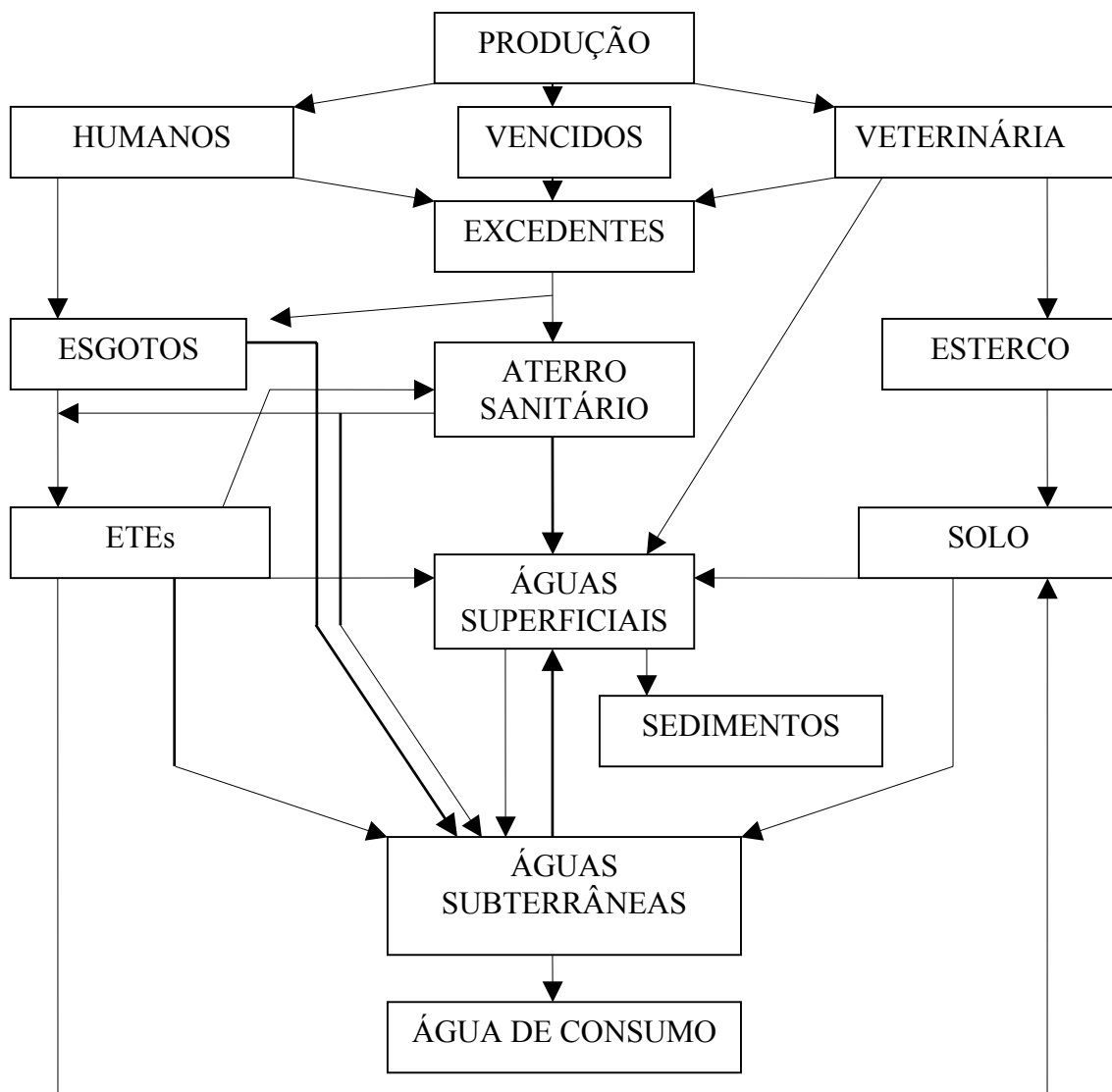


Figura 2 - Fontes e distribuição de fármacos no meio ambiente⁵⁵

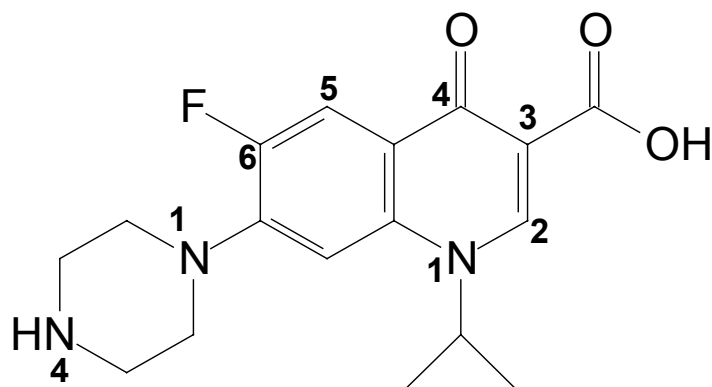


Figura 3 - Estrutura da ciprofloxacina

2.3. Destino, ocorrência, efeitos e riscos da ciprofloxacina no meio ambiente

Uma série de estudos vêm sendo realizados para a identificação de CIP em efluentes hospitalares, ETEs e águas superficiais (Tabela 1). Além disso, a eficiência das ETEs na remoção de CIP vem sendo avaliada através do balanço de massa durante a sua passagem por estes compartimentos. O principal destino do medicamento foi identificado como sendo a fauna microbiana ativa (lodo biológico), uma vez que 70-100% da CIP que entra em ETEs é adsorvida em lodo bruto proveniente de diferentes passos do processo, sendo o restante detectado no efluente final^{34,62,64}. Isto, aliado a resultados que comprovaram a recalcitrância da CIP à ação biológica^{1,37,59}, demonstra que o mecanismo de remoção se dá através de adsorção, e não de biodegradação. CIP é também recalcitrante a tratamento anaeróbio, visto que apenas pequena remoção foi identificada em lodos anaerobicamente digeridos (aproximadamente 11%)³⁴. Por outro lado, tratamentos térmicos de secagem do lodo em ETEs (180 °C) apresentaram cerca de 65% de remoção de CIP⁶².

Esta mesma capacidade de adsorção em lodos ativados verifica-se, também, em solos e sedimentos. Coeficientes de partição ($\log K_d$) de 2,4 e 2,6 L kg⁻¹ para solos⁷⁸ e matéria orgânica dissolvida⁹², respectivamente, foram já reportados. Investigações utilizando solos tratados com lodos impactados por

CIP demonstraram a sua pequena mobilidade nestes compartimentos, além da resistência à foto e bioprocessos^{16,33}.

Tabela 1 - Concentrações ambientais de ciprofloxacina

Concentração, $\mu\text{g L}^{-1}$	Tipo de água	País	Fonte
3-87	Efluente hospitalar	Suíça	40
14,5 ^c	Efluente hospitalar	Suíça	40
0,7-124,5	Efluente hospitalar	Suíça	41
2,3 ^c	Efluente hospitalar	Alemanha	1,59
0,6 ^c	ETE	Alemanha	1,59
0,06 ^c	Águas superficiais	Alemanha	1,59
0,055-0,405	ETE	Suíça	32
0,434/0,072	Antes e depois de ETE	Suíça	31
0,005-0,018	Águas superficiais	Suíça	31
0,27-2,42 ^{a,e}	Lodo (ETE); solo trat. c/ lodo	Suíça	33
0,02 ^a e 0,03 ^b	Águas superficiais	EUA	52
0,427/0,071	Antes e depois de ETE	Suíça	34
5,3 ^{a,e,f}	Lodo ativado de ETE	Suíça	34
0,118 ^a e 0,4 ^b	ETE	Canadá	75
3,6-101	Efluente hospitalar	Suécia	63
0,1-0,16	ETEs	EUA	85
0,03 ^b	Águas superficiais ^d	EUA	53
0,238 ^a e 0,514 ^b	Efluentes de ETes	Itália	17
0,36	Efluentes de ETes	Holanda	7
0,60	Efluentes de ETes	França	4
0,70 ^a	Efluentes de ETes	Grécia	4
0,057 ^a	Efluentes de ETes	Itália	4
0,030	Efluentes de ETes	Suécia	4
15 ^c	Efluente hospitalar	Suécia	47
0,5	Efluente hospitalar	Suécia	47
151,4 ^g	Sedimento efluente hospitalar	Suécia	47
0,158/0,018 ^a	Antes e depois de ETes	Suécia	64
2,54 ^{a,e,f}	Lodo de ETes	Suécia	64
0,22/0,048 ^a	Antes e depois de ETE	Suécia	62
31,2 ^{a,e,f}	Lodo de ETE	Suécia	62
6,3 ^c	Águas superficiais	Europa	37
0,15 ^a (0,21 ^b)/0,06 ^a (0,14 ^b)	Antes e depois de ETes	EUA	49
259 ^a (120-507)/97 ^a (37-271)	Antes e depois de ETes ^h	Itália	18

^a concentração média; ^b concentração máxima; ^c concentração ambiental predita; ^d encontrado em 3,3% das amostras; ^e mg kg^{-1} ; ^f soma de concentração de CIP encontrada em lodos de diferentes passos de tratamento dentro da ETE; ^g $\mu\text{g g}^{-1}$; ^h mg dia^{-1} a cada 1000 habitantes.

Após alcançar águas superficiais, CIP é continuamente removida do meio aquoso, mas os mecanismos envolvidos neste processo não são totalmente conhecidos³¹. Apesar disso, a fotodegradação e a adsorção em sedimentos vêm sendo reportadas como os caminhos mais prováveis¹². As concentrações de CIP encontradas em ETEs, principalmente, são da mesma ordem de magnitude daquelas que causam efeitos tóxicos a bactérias^{40,41, 59}.

De forma geral, fluoroquinolonas são consideradas muito tóxicas para bactérias (concentração de inibição de crescimento em 50% (CE₅₀) = 1 mg L⁻¹), tóxicas para algas (1 mg L⁻¹ < CE₅₀ < 10 mg L⁻¹) e perigosas para crustáceos e peixes (10 mg L⁻¹ < CE₅₀ < 100 mg L⁻¹)²³.

CIP, respectivamente, em concentrações de 10, 80 e 320 µg L⁻¹, inibe em algum grau (CE₀), em 50% (CE₅₀) e em 100% (CE₁₀₀), o crescimento de *Pseudomonas putida*, organismo indicador de toxicidade para ampla gama de bactérias gram-negativas ambientais⁵⁹. Exibe fraca, mas significativa, toxicidade para bactérias encontradas em efluentes⁵⁹ (CE₅₀ = 0,61 (0,31-1,22) mg L⁻¹ ³⁷). Para a cianobactéria *Microcystis aeruginosa*, a CE₅₀ é de 5 µg L⁻¹ e, a concentração predita de efeito não observado (CPENO), foi estabelecida como sendo 0,05 µg L⁻¹. Uma relação CAP/CPENO (onde CAP é a concentração ambiental predita) de aproximadamente 13 foi calculada³⁷. Em testes de genotoxicidade para bactérias, a CIP apresentou fator de indução (FI) superior a 20, indicando, segundo escala demonstrada na Tabela 2, a sua alta genotoxicidade⁵⁹. Danos causados pela CIP ao DNA de bactérias de relevância ambiental, podem ser observados em concentrações da ordem de 0,2-0,4 µg L⁻¹. Esta faixa é, em alguns casos, até 150 vezes menor que a concentração normalmente encontrada em efluentes de hospitais e muito similar àquela encontrada em ETEs⁵⁹ (vide Tabela 1).

Hartmann et al.⁴⁰ investigaram todos os possíveis causadores da genotoxicidade em amostras de efluente hospitalar e verificaram que a CIP foi a principal responsável. As evidências foram as seguintes:

- Os valores médios teóricos da concentração de CIP (VMTs) no efluente foram superiores à menor concentração de efeito observado (CEOs) em, no

mínimo, uma ordem de magnitude quando comparadas aos outros fármacos investigados. Os valores de VMTs e CEOs para CIP foram de 14,5 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente;

- Testes em amostras de urina de pacientes tratados com antibióticos e antineoplásicos demonstraram que amostras de pacientes tratados com CIP apresentaram genotoxicidade até mesmo quando diluídas de 2.000 a 20.000 vezes. Para pacientes tratados com enrofloxacin, outra fluoroquinolona investigada, as amostras foram genotóxicas quando diluídas até 200 vezes. No caso dos outros fármacos, o teste só foi positivo quando as amostras não foram diluídas ou quando diluídas no máximo 4 vezes. É importante ressaltar que o fator de diluição, normalmente, para urina em efluentes hospitalares, é assumido como sendo de 100 a 5000 vezes;
- Encontrou-se uma forte correlação ($r^2 = 0,84$) entre a genotoxicidade de amostras de efluentes de 16 hospitais e a concentração de CIP. Este valor de r^2 foi posteriormente confirmado, utilizando-se amostras de efluentes de mais 5 hospitais⁴¹.

Apesar disso, alguns casos foram reportados dando conta de que a mutagenicidade de amostras de efluentes medidas através de aberrações cromossômicas Ames e V79 nada têm a ver com a concentração de CIP⁴¹.

Tabela 2 – Escala de fatores de indução e relação com efeitos genotóxicos⁵⁹

Fator de indução (FI)	Genotoxicidade do composto
$FI < 1,5$	Composto não-genotóxico
$1,5 < FI < 2,0$	Composto marginal
$FI > 2,0$	Composto genotóxico

Confrontando-se o que foi reportado acima, com a situação brasileira e de outros países em desenvolvimento, é preciso lembrar que a grande maioria dos dados gerados, atualmente, sobre exposição ambiental e avaliação de risco da CIP, diz respeito à América do Norte e Europa (vide Tabela 1). Porém, é sabido

que em países em desenvolvimento, uma grande fatia da população não é assistida por ETEs, ou mesmo, rede de esgotos. Some-se a isto o atraso destes países no que diz respeito a gerenciamento de risco e legislação ambiental específica, além da prática da auto-medicação. Esta falta de informação a respeito da exposição ambiental da CIP, em países em desenvolvimento, restringe a discussão mundial à situações que, ao que tudo indica, não são as mais críticas, subestimando, conseqüentemente, o potencial de risco ao meio ambiente.

2.4. Degradação da ciprofloxacina: características relevantes

2.4.1. Fotossensibilidade da ciprofloxacina²

A fotossensibilidade é uma propriedade bem conhecida das fluoroquinolonas. Um trabalho de revisão feito por Albini e Monti² é uma excelente ferramenta para o entendimento dos fenômenos fotofísicos e fotoquímicos relacionados a esta classe de fármacos. De maneira geral, moléculas contendo 4-quinolona ou 4-naftipiridona convertem-se eficientemente ao estado triplete ao absorver luz. No referido trabalho de revisão, os espectros de absorção triplete-triplete (T-T) de fluoroquinolonas são caracterizados por λ_{T-T}^{\max} no intervalo entre 500 e 650 nm. Os coeficientes de absorvidade triplete molar (ϵ_T^{\max}) são na faixa de 4000-14000 M⁻¹ cm⁻¹ dependendo da estrutura molecular e do método utilizado para sua determinação. Mella et al.⁷⁴ investigando a fotoquímica da CIP verificaram absorção T-T em $\lambda^{\max} = 610$ nm e com perfil de tempo de $\tau = 1,5 \times 10^{-6}$ s. A formação de T-T dita a fotoreatividade de fluoroquinolonas, sendo que a ocorrência de reações, após fotoexcitação, é devido a processos envolvendo os substituintes que atuam como sítios fotoquimicamente instáveis (p. ex., a ligação carbono-flúor, o anel piperazínico e a carboxila). Um perfil geral é mostrado na Figura 4. A Tabela 3 mostra uma série de estudos relacionados à fotodegradação da CIP.

A fotoinstabilidade de fluoroquinolonas² e, mais especificamente, da CIP^{12,93}, é uma importante característica a ser explorada. Quando irradiadas, as moléculas de CIP são excitadas a sua forma $\pi\pi^*$ triplete, que possui maior caráter eletrofílico que aquele da CIP no estado fundamental⁷⁴. A formação e reatividade deste intermediário são extremamente dependentes das características do meio, e, em boa parte dos casos, podem favorecer a destruição da espécie-mãe. Estudos apontam para a fotodecomposição de CIP em águas superficiais sob condições naturais¹⁶, o que reforça a idéia de aplicação de fotoprocessos no tratamento de efluentes contendo esta espécie.

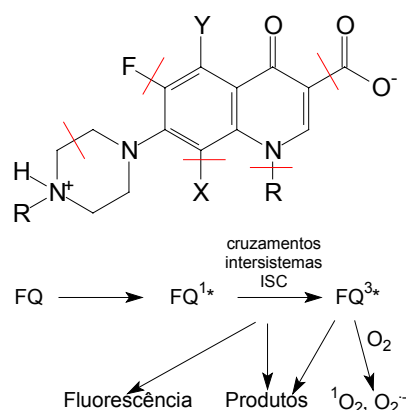


Figura 4 – Processos fotoquímicos relevantes para fluoroquinolonas²

Tabela 3 - Estudos envolvendo fotodegradação da ciprofloxacina

Tipo de investigação	Fonte
Estudo cinético; fotoprodutos formados	12-14
Destino da CIP em sistemas aquáticos	16
Fotofísica/fotoquímica do processo; subprodutos	74
Subprodutos	93-96
Perda da atividade biológica	84
Fluoroquinolonas: fotofísica/fotoquímica (review)	2
Fotodegradação na presença de espécies húmicas	86
Estabilidade da CIP	98

2.4.2. Reatividade entre ozônio e ciprofloxacina

A reatividade da CIP frente a O₃ molecular depende do pH. A constante de velocidade de reação de segunda ordem aparente $k''_{03,app,CIP}$ varia na faixa de 4×10^2 a 10^5 L mol⁻¹ s⁻¹, em pH entre 3 e 8⁹⁰. Esta dependência do pH é governada pela desprotonação do N(4) amina. As constantes específicas de reação $k''_{03/CIP}$ das espécies diprotonada, monoprotionada e desprotonada são $4,0 (\pm 1,2) \times 10^2$, $7,5 (\pm 2,8) \times 10^3$ e $9,0 (\pm 3,1) \times 10^5$ L mol⁻¹ s⁻¹, respectivamente⁹⁰. Em pH inferior a 4, a reatividade não foi atribuída ao átomo N(4) ou ao anel quinolínico heterocíclico e, sim, ao nitrogênio piperazínico N(1) ou ao carbono não-substituído na posição orto do anel aromático adjacente. Porém, esta reatividade não significa necessariamente perda da atividade antimicrobiana, visto que os sítios reativos nada têm a ver com o mecanismo de ação de fluoroquinolonas sobre bactérias^{20,90}.

2.5. Processos avançados de oxidação

O Laboratório de Tratamento de Efluentes e Resíduos (LATER) da UFSM vem investigando a utilização de processos não-convencionais no tratamento de efluentes⁶⁶⁻⁷¹. Tais tecnologias baseiam-se na utilização de oxidantes químicos (ozônio, peróxido de hidrogênio, etc.) e físicos (radiação ultravioleta, ultra-som, etc.) na destruição de espécies químicas biorecalcitrantes. A combinação destes oxidantes, além de outras espécies, de maneira a gerar radicais hidroxil, espécie química de alta reatividade, originam os chamados PAOs. São exemplos de PAOs os processos de ozonização (O₃/HO⁻), peroxônio (O₃/H₂O₂), fotoperoxidação (UV/H₂O₂) e fotocatalise heterogênea (UV/TiO₂). Devido ao já discutido interesse na questão fármacos no meio ambiente e à resistência destas espécies a tratamento microbiológico, uma série de estudos do uso de PAOs na degradação de fármacos têm sido publicadas e vêm demonstrando o potencial destas tecnologias para esta finalidade^{44,45,61,73,102}.

3. Materiais e métodos

3.1. Materiais

A parte experimental deste trabalho foi realizada no LATER e na Seção de Epidemiologia e Medicina Ambiental do Hospital Universitário de Freiburg - Alemanha, sendo que os aparelhos e equipamentos utilizados são integrantes dos recursos instrumentais de ambos os órgãos.

3.2. Reagentes e soluções

Nos estudos de determinação da concentração de CIP e de sua degradação, no efluente do HUSM, utilizou-se ciprofloxacina hidrocloreídrica gentilmente doada pela empresa Galena Química e Farmacêutica (www.galena.com.br). Já nos estudos de degradação fotoinduzida de CIP, utilizou-se ciprofloxacina na forma neutra (Fluka, www.sigmaaldrich.com). Todos os outros reagentes foram de grau analítico.

3.3. Determinação de ciprofloxacina no efluente do PA-HUSM

3.3.1. Coleta das amostras

Como já referido, no HUSM, o maior consumo de CIP e de antibióticos em geral é no PA-HUSM. A rede de esgotos do hospital é dividida em duas grandes linhas que abrangem, separadamente, as alas norte e sul do hospital (Figura 1 - seção 1). A rede do PA-HUSM, devido ao fato de ter sido construída recentemente, encontra-se com a rede sul num ponto externo. Após isto, passam por um sistema de tratamento dotado de fossa séptica doméstica e filtro

anaeróbio, para depois desaguar em um curso d'água que corta o campus da UFSM.

A fim de avaliar a eficiência do sistema de tratamento, as amostras foram coletadas, antes e depois dele, em pontos denominados P1 e P2, respectivamente (Figura 1). A coleta foi realizada diariamente, durante uma semana. Foram obtidas 2 amostras a cada dia (1 de P1 e 1 de P2), sendo que cada uma delas era composta por frações de efluente tomadas ao longo de 10 horas de amostragem (das 08:00 às 18:00 h, a cada 2 h). Cada fração foi imediatamente filtrada (0,45 µm), sendo transferidos 50 mL para frasco de vidro âmbar e estocados a 4 °C. Ao final de cada dia, as amostras resultantes (1 de P1 e 1 de P2) eram armazenadas no escuro, a -4 °C. Tendo em vista que CIP apresenta baixa atividade biológica sob condições aeróbias e anaeróbias^{34,62}, e o curto espaço de tempo entre a amostragem e a determinação, considerou-se que apenas o resfriamento a -4 °C era suficiente para a diminuição da atividade biológica. Assim, também não se reduziu o pH das amostras.

3.3.2. Caracterização das amostras

Visto que, no presente estudo, o interesse da investigação restringe-se apenas à CIP, a caracterização do efluente foi realizada apenas com a intenção de se obter a ordem de grandeza de alguns parâmetros. Não foram levadas em consideração possíveis diferenças entre amostras de P1 e P2. Foram consideradas as características da amostra de P1 utilizada no estudo da degradação através de PAOs. Todos os procedimentos analíticos seguiram métodos-padrão (APHA-AWWA, 1995)⁵ e são demonstrados na Tabela 4.

Utilizou-se o sistema teste *Allium cepa* na obtenção de informações gerais de cito/mutagenicidade do efluente do PA-HUSM. *Allium cepa* é uma das espécies vegetais mais utilizadas na avaliação da genotoxicidade de espécies tóxicas ou inibidores biológicos, em efluentes. O índice mitótico (IM) e o índice de replicação são usados como indicadores de proliferação adequada das

células²⁹, o que pode ser medido através do sistema teste vegetal de *Allium cepa*. O método da aberração cromossômica em raízes de *Allium cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, WHO) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP), como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais¹⁵.

Tabela 4 - Características das amostras de efluente do PA-HUSM tomadas em P1 e que foram utilizadas no estudo envolvendo PAOS.

Parâmetros	Concentrações
DQO	658 mg O ₂ L ⁻¹
ST	720 mg L ⁻¹
Cl ⁻	139 mg L ⁻¹
pH	7,4

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Citogenética Vegetal do Departamento de Biologia da UFSM. As amostras avaliadas foram tomadas em P1e P2, sendo compostas de 10 amostragens efetuadas entre 9-18 horas do dia 3 de janeiro de 2005. Após a coleta, as amostras foram imediatamente filtradas, acidificadas e resfriadas a 4 °C. O procedimento utilizado no estudo de cito/mutagenicidade do efluente do PA-HUSM foi realizado conforme Fiskejő²⁷, com modificações. Para o sistema teste de *Allium cepa* colocou-se para enraizar, em água, 3 grupos de 6 bulbos de cebola. O grupo controle permaneceu em água e os bulbos dos outros dois grupos foram tratados por 24 h nas distintas amostras do efluente do PA-HUSM. Feito isto, realizou-se a coleta das radículas e colocou-se em fixador 3:1 (álcool etílico; ácido acético) por 48 horas, sendo conservadas em álcool 70%, a 4 °C. Para o preparo das lâminas, as radículas foram hidrolisadas em HCl 1 mol L⁻¹ por 5 min, lavadas em água destilada e submetidas à técnica de esmagamento³⁶, sendo que, orceína acética a 2% foi usada para a coloração. Foram feitas lâminas das pontas de raízes de cada bulbo e a contagem de 6000 células por grupo de bulbos, calculando-se os IMs e

comparando-se estatisticamente os dados pelo teste χ^2 do programa estatístico Bioestat 3.0.

Utilizou-se, também, sistema teste de *E. sativa*⁸⁸. O teste consistiu da colocação de 50 sementes para germinar em placas de Petri, com papel filtro e água destilada, com duas repetições para o controle e três repetições para cada amostra P1 e P2 de efluente (1,5 mL), por 72 horas. Avaliou-se a influência das amostras sobre o número de sementes germinadas.

3.3.3. Determinação cromatográfica da concentração da ciprofloxacina

Esta parte da investigação foi realizada conforme Hartmann et al.⁴⁰. De acordo com o que foi anteriormente referido, este estudo foi desenvolvido em dois diferentes laboratórios. Por isso, foram feitas algumas modificações na metodologia a fim de adequá-la às condições de cada laboratório. Assim, três diferentes procedimentos foram executados:

a) Procedimento 1. Este foi o principal procedimento, visto que foi empregado para determinação da concentração de CIP no estudo de exposição ambiental.

Preparação das amostras. Foi feito através de pré-concentração em cartuchos C18 3 mL/200 mg (Phenomenex; www.phenomenex.com), pré-condicionados com 6 mL de metanol, utilizando-se dispositivo de vácuo. O analito foi retido no cartucho com a passagem das amostras em vazão de 1 mL min⁻¹. Após isto, deixou-se o cartucho secar por 5 min. A eluição foi efetuada com 2 mL de solução aquosa de HCl 10% e metanol (20:80). O solvente foi então evaporado sob fluxo de nitrogênio até quase secagem, sendo a seguir reconstituído ao volume de 2 mL com fase móvel. As amostras foram, depois, centrifugadas e, o sobrenadante, tomado para a determinação por cromatografia líquida com detecção de fluorescência (HPLC-FLD). A recuperação foi de 103 ($\pm 1,4$)%.

Determinação por HPLC-FLD. Foi feita utilizando-se bomba LC-10AD Shimadzu (www.shimadzu.com), detector de fluorescência (λ_{exc} : 278 nm; λ_{em} : 445 nm) HP 1046A (www.hp.com), coluna de fase reversa C18 (250 x 460 mm,

4 μm) e pré-coluna (4 x 3 mm), ambas Phenomenex (www.phenomenex.com). A aquisição dos dados foi feita utilizando-se integrador Shimadzu C-R6A Chromatopac (www.shimadzu.com). A fase móvel foi uma mistura dos solventes A (*o*-H₃PO₄ 0,02 mol L⁻¹ e trietilamina 0,008 mol L⁻¹) e B (acetonitrila), na proporção de 85:15. O volume de injeção foi de 20 μL e o fluxo foi de 1,0 mL min⁻¹.

b) Procedimento 2. Determinação por cromatografia líquida com detecção de massas (LC-MS), a fim de confirmar a presença de CIP no efluente.

Preparo das amostras. 5 replicatas de uma mesma amostra de P2 foram pré-concentradas conforme procedimento 1 acima descrito, acondicionadas nos cartuchos e enviadas à Seção de Epidemiologia e Medicina Ambiental do Hospital Universitário de Freiburg para análise pelo doutorando, em estágio de curta duração na Alemanha. Soluções de referência de CIP foram enviadas juntamente com as amostras e submetidas ao mesmo procedimento a fim de garantir idêntico tratamento de amostras e padrões. A eluição do analito do cartucho foi realizada conforme procedimento 1, porém, a reconstituição foi feita com 0,5 mL do solvente A. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante tomado para determinação por LC-MS.

Determinação por LC-MS. Fez-se a determinação de CIP com aparelho Agilent Series 1100 LC (www.chem.agilent.com), equipado com duas bombas binárias, degaseificador, forno para coluna e amostrador automático. O *software* Chemstation (Agilent Technologies) foi utilizado como instrumento de controle. O sistema MS foi o Esquire 3000 plus (Bruker Daltonics, www.bdal.com), com fonte ortogonal de ionização eletrospray e íon trap. Aquisição e tratamento dos dados foram feitos usando-se *software* Bruker Daltonics Esquire 5.1. A separação foi efetuada em coluna de fase reversa (C18 RP18 CC 125x4 mm Nuclodur 100-5 Macherey-Nagel, www.mn-net.com), dotada de pré-coluna (C18 RP18 CC 8x4 mm Nucleosil 100-5). Utilizou-se programa de gradiente para a fase móvel combinando os solventes C (solução aquosa de ácido fórmico 0,1%, v/v) e B (acetonitrila), conforme descrito a seguir: 1-40% de B até 25 min, 40-

1% de B até 30 min. O fluxo foi de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, o volume de injeção, de $50 \text{ }\mu\text{L}$ e a temperatura do forno da coluna mantida a $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.4. Degradação fotoinduzida de ciprofloxacina em solução sintética

Os experimentos foram conduzidos em fotorreator, em batelada ($2,5 \text{ L}$), dotado de agitação magnética, sistema de resfriamento e de monitoramento de temperatura e pH. Foi utilizada uma lâmpada de mercúrio Heraeus de 150 W e média pressão (www.heraeus.com), revestida com camisa de quartzo. A lâmpada foi ligada 2 min antes de cada experimento a fim de alcançar estabilização. Todos os experimentos foram realizados com água Milli-Q, a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 9. Para o estudo cinético e de avaliação da natureza e biodegradabilidade dos metabólitos trabalhou-se sob diferentes condições, descritas a seguir.

3.4.1. Estudo cinético

Um terceiro procedimento analítico foi utilizado para a realização do estudo cinético:

Procedimento 3. Soluções de CIP tiveram seu pH ajustado com NH_4Cl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e KOH 3 mol L^{-1} . A concentração de CIP utilizada foi de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ($0,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), da mesma ordem de grandeza daquelas encontradas no efluente do HUSM.

Preparação das amostras para a análise. As amostras foram pré-tratadas adicionando-se 1 mL de NH_4Cl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, ajustando-se à pH 9 com KOH 3 mol L^{-1} e $0,1 \text{ mL}$ de acetonitrila. Após isto, fez-se extração em fase sólida usando-se sistema de vácuo e cartuchos C18 $3 \text{ mL}/500 \text{ mg}$ Macherey-Nagel (www.mn-net.com), pré-condicionados com metanol (6 mL). O fluxo de extração foi de 1 mL min^{-1} . Após cada extração, o conteúdo retido no cartucho foi eluído com 2 mL de mistura aquosa de HCl 10% e metanol (20:80). O solvente foi

evaporado até secagem sob fluxo de nitrogênio e, posteriormente, reconstituído com 0,5 mL do eluente A (vide seção 3.3.3.a). Então, as amostras foram centrifugadas e, o sobrenadante, tomado para análise por HPLC-FLD.

Análise por HPLC-FLD. Utilizou-se sistema LC10 HPLC equipado com duas bombas LC 10 AT, forno para coluna, detector de fluorescência ($\lambda_{exc.}$: 278 nm; $\lambda_{em.}$: 445 nm) e amostrador automático (Shimadzu, www.shimadzu.com). Na aquisição e avaliação dos dados utilizou-se *software* Class LC10 (Shimadzu). A separação foi realizada utilizando-se a mesma coluna empregada na análise por LC-MS descrita na seção 3.3.3.b. A metodologia foi aquela descrita na seção 3.3.3.a readequada como segue: regime de gradiente, sendo a fase móvel mistura dos solventes A (seção 3.3.3.a) e D (acetonitrila e solvente A, 90:10), com a seguinte programação: 2% de D até 4 min, 2-35% de D até 18 min e 35-2% de D até 20 min. O fluxo foi de 1,2 mL min⁻¹, o volume de injeção, de 5 μ L, e a temperatura do forno da coluna de 35 °C.

3.4.2. Estudo da biodegradabilidade

Utilizou-se o *closed bottle test* (CBT), padrão para a avaliação da pronta biodegradabilidade, recomendado como um primeiro simples teste para a verificação da biodegradabilidade de compostos orgânicos (Nyholm⁷⁹, 1991; OECD⁸⁰, 1992). O CBT foi realizado segundo teste padrão^{79,80}, no escuro, a 20 \pm 1 °C, como descrito por Kümmerer et al.⁶⁰. O período de incubação do CBT foi de 28 dias. Cada teste consiste em quatro diferentes séries: controle de qualidade (acetato de sódio, correspondendo à demanda teórica de oxigênio, ThOD, de 5 mg L⁻¹); amostra em branco, amostras do fotoprocesso e controle de toxicidade (amostras do fotoprocesso e acetato de sódio). Os experimentos foram feitos em duplicata. Todos os frascos foram inoculados com alíquota de efluente final de uma ETE não impactada por efluentes hospitalares a fim de garantir uma carga adequada de microorganismos. A fim de alcançar condições adequadas de ThOD para o CBT, os experimentos de fotoprocesso foram realizados utilizando-se

soluções de CIP de 6 mg L^{-1} ($1,81 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e amostragens, durante o tratamento (em tempos de 0, 2 e 4 min), de grandes volumes (2 L cada). Como o volume total da amostra submetida ao fotoprocesso foi de 2,5 L, amostragens de 2 L obrigaram a realização de um experimento para cada amostragem. Outra consequência da amostragem de grandes volumes foi a necessidade de saturar com ar a água utilizada na preparação da solução de CIP para o fotoprocesso. O objetivo foi obter concentrações adequadas de oxigênio para o CBT. Amostras tomadas após 0, 2 e 4 min foram submetidas ao CBT. A concentração de O_2 foi monitorada em diferentes dias durante o processo (dias 0, 1, 7, 14 e 28).

3.4.3. Estudo quantitativo de ciprofloxacina e, qualitativo, de seus metabólitos de fotodegradação

As mesmas amostras submetidas ao CBT foram encaminhadas à determinação da concentração de CIP através do procedimento 3 (seção 3.4.1), porém sem pré-concentração. O estudo qualitativo dos sub-produtos de fotodegradação da CIP foi feito utilizando-se LC-MS conforme descrito no procedimento 2 da seção 3.3.3.b.

3.5. Processos avançados de oxidação na degradação de ciprofloxacina em efluente do PA-HUSM

3.5.1. Amostras

A amostra foi tomada em P1 a fim de avaliar a aplicabilidade dos diferentes processos na remoção de CIP, sob condições mais drásticas do que aquelas que seriam encontradas, realmente, se aplicadas no efluente após o sistema de tratamento. Após a coleta, a amostra foi filtrada (filtração rápida), acidificada e medida a concentração de CIP. Se inferior a $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$,

concentração superior à faixa encontrada anteriormente nas amostras de P1, fortificou-se a amostra com CIP até este valor. Tomou-se o cuidado de se utilizar amostra que tivesse características típicas daquelas encontradas para o efluente, em estudos prévios de determinação de CIP. As características são demonstradas na Tabela 4 (seção 3.3.2).

3.5.2. Determinações analíticas

A efetividade dos processos foi avaliada acompanhando-se o decréscimo da concentração de CIP através de medidas por HPLC-FLD, conforme descrito na seção 3.3.3.a, da DQO (método padrão: 5020-C, APHA-AWWA, 1995⁵) e da absorvância UV-vis integrada, utilizando-se Espectrofotômetro UV-vis Shimadzu modelo Multispec-1501, com arranjo de diodos (www.shimadzu.com).

3.5.3. Processo fotoinduzido

Os experimentos foram realizados utilizando-se 500 mL de amostra e pH inicial igual a 3; fotorreator em regime de batelada, com recirculação, dotado de agitação magnética e câmara de irradiação com lâmpada de mercúrio de 125 W, de média pressão (Phillips; www.phillips.com), e tubo de quartzo por onde recircula o fluxo impulsionado por bomba peristáltica Cole Parmer Masterflex L/S (www.coleparmer.com). Uma foto do sistema é mostrada na Figura 5a.

3.5.4. Fotocatálise heterogênea

Os testes foram realizados em um reator tubular helicoidal⁷⁰ (700 mL), utilizando-se a lâmpada descrita na seção 3.5.3 (Figura 5b), e 400 mg de TiO₂ P-25 Degussa (www.degussa.com) em suspensão. O pH inicial da amostra foi

regulado a 3,0. Após o tratamento, as amostras foram filtradas para remoção das partículas de TiO_2 utilizando-se papel com tamanho de poro de $0,22 \mu\text{m}$.

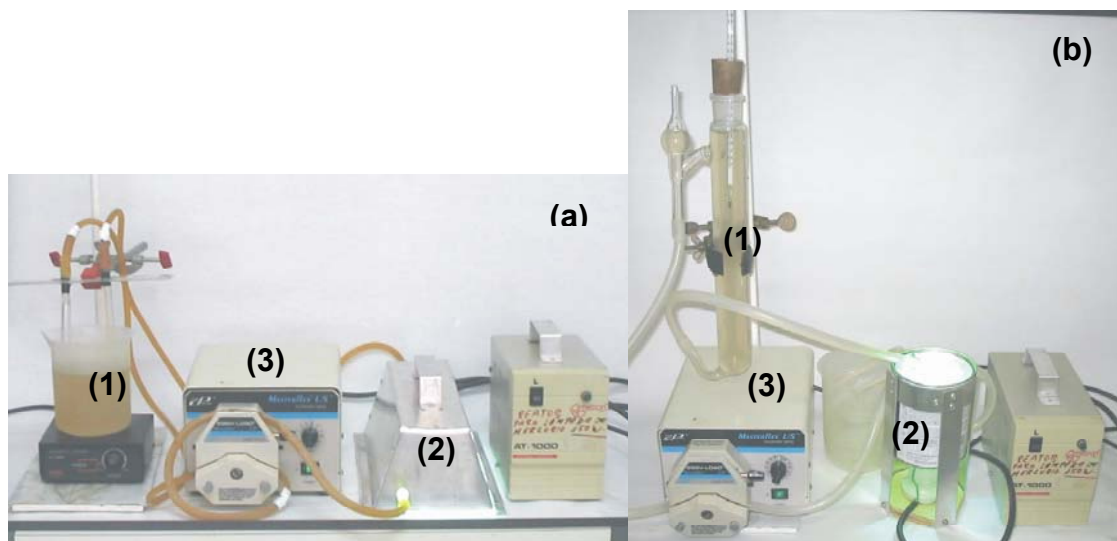


Figura 5 - Sistemas utilizados na degradação fotoinduzida e fotocatalítica da ciprofloxacina em amostras de efluente do PA-HUSM. **(a)** Processo fotoinduzido: **(1)** tanque de recirculação; **(2)** câmara de fotoirradiação; **(3)** bomba peristáltica; **(b)** Fotocatálise heterogênea: **(1)** Coluna de recirculação, **(2)** Reator helicoidal de fotoirradiação; **(3)** Bomba peristáltica.

3.5.5. Ozonização e peroxônio

Os ensaios foram realizados utilizando-se reator tubular de vidro borossilicato, em sistema de semi-batelada. Utilizou-se ozonizador modelo experimental MV01 (desenvolvido pela Qualidor Saneamento Inc e pelo Instituto Tecnológico da Aeronáutica) e ar como gás de alimentação, previamente seco pela passagem por uma coluna contendo carvão ativo, cloreto de cálcio e sílica gel (Figura 6). A determinação da capacidade de geração de ozônio foi feita segundo Flamm²⁸ e as condições de maior geração de ozônio foram determinadas previamente. O fluxo de ar foi de 8 L min^{-1} tendo-se, sob tais condições, a

geração de $450 \text{ mg O}_3 \text{ h}^{-1}$. O volume de amostra foi de 500 mL e o pH inicial 9 . No processo peroxônio, a concentração de H_2O_2 utilizada foi de 500 mg L^{-1} .

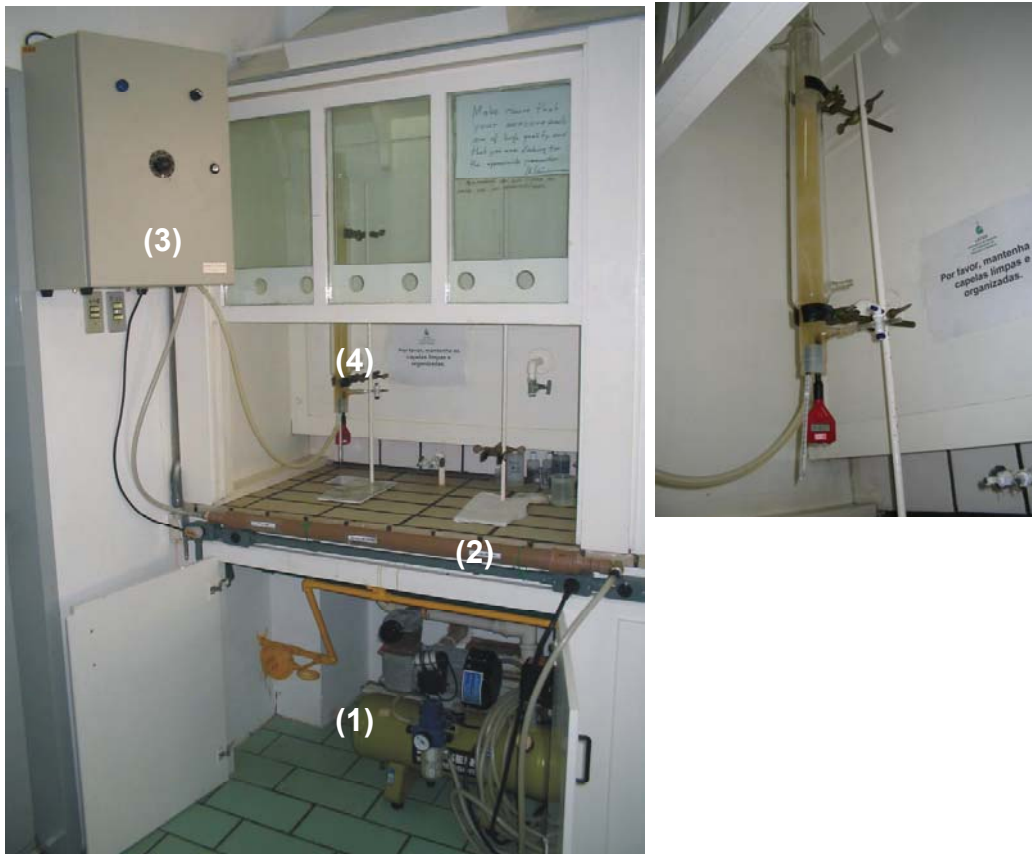


Figura 6 - Sistema utilizado nos processos de ozonização. No detalhe, o reator tubular. (1) compressor de ar; (2) tubo com secantes; (3) gerador de ozônio; (4) reator.

4. Resultados e discussão

4.1. Cito/genotoxicidade do efluente do PA-HUSM

Avaliou-se a cito/genotoxicidade do efluente do PA-HUSM, em P1 e P2, através do sistema teste *Allium cepa*. Os resultados mostrados na Tabela 5 dão conta de que houve decréscimo do IM para ambas as amostras. Isto indica, qualitativamente, a presença no efluente de compostos com algum grau de citotoxicidade.

Foram avaliadas também possíveis alterações genéticas provocadas pelos constituintes do efluente em células das radículas de *Allium cepa*. Os resultados indicam freqüentes disrupções cromossômicas na metáfase (Figura 7a), formação de pontes anafásicas (Figura 7b) e presença de micronúcleos na telófase (Figura 7c). Estas alterações observadas indicam claramente a presença de substâncias tóxicas e mutagênicas e/ou genotóxicas nas amostras do efluente.

Tabela 5 - Condições das células das radículas de *Allium cepa* durante o ciclo mitótico.

	Total de células	Células em divisão	Células em interfase	% Células em divisão
Controle	6000	523	5477	8,72
P1	6000	196	5804	3,27
P2	6000	424	5576	7,07

Em relação aos IMs, as amostras de P1 apresentaram uma diminuição mais acentuada do que naquelas de P2. Isto demonstra a capacidade parcial do sistema de fossa séptica e filtro anaeróbio de diminuição da citotoxicidade do efluente, sendo que a citotoxicidade residual reforça a idéia de sobrecarga no sistema de tratamento. Como fora apresentado na seção 2.3, efeitos genotóxicos de CIP em bactérias já foram comprovados^{10,27,32}. Porém, deve-se levar em conta

que os testes realizados com *Allium cepa* dizem respeito a células eucariontes, sendo que a CIP afeta mais acentuadamente células procariontes. De qualquer maneira, no presente estudo, nenhum tipo de investigação a respeito da presença de CIP foi realizada nesta etapa do trabalho, o que impossibilita qualquer relação entre a cito/genotoxicidade e a concentração do fármaco. Os testes com *E. sativa* não demonstraram efeitos estatisticamente consideráveis.

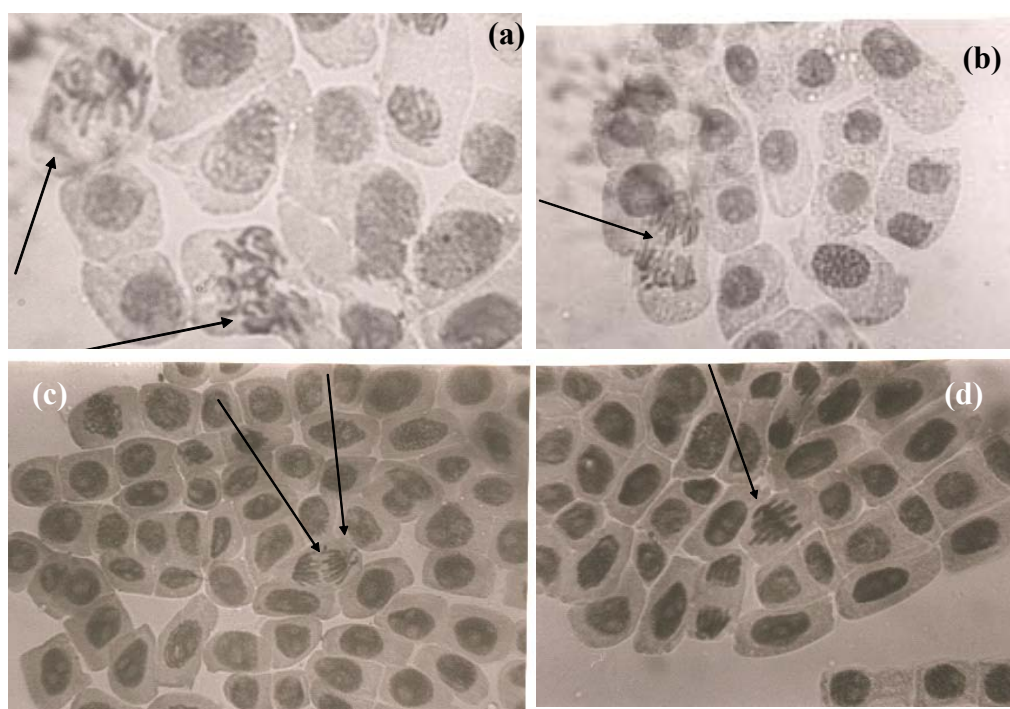


Figura 7 - Divisão mitótica de células de radículas de *Allium cepa*. Radículas submetidas à (a) amostra P1: disrupção / desorganização cromossômica na metáfase; (b) amostra P1: ponte anafásica; (c) amostra P2; desorganização dos cromossomos na anáfase; (d) controle; metáfase normal, sem anomalias.

4.2. Determinação de ciprofloxacina no efluente do PA-HUSM

Como referido na seção 3.3.3, as determinações da concentração de CIP no efluente do PA-HUSM foram feitas segundo Hartmann et al.⁴⁰, com algumas adaptações. Variações desta metodologia vêm sendo amplamente referidas na

literatura^{32,33}. Por este motivo, não serão discutidas aqui todas as possibilidades investigadas. Utilizou-se pré-concentração em fase sólida, sempre que necessário, alcançando fatores de pré-concentração de até 200 vezes (recuperação: 103±1,4%). As condições são descritas na seção 3.3.3.a. A Tabela 6 mostra as figuras de mérito do procedimento 1, que foi empregado na determinação da concentração de CIP no efluente. A fim de confirmar a presença de CIP no efluente do hospital, fez-se análise por LC-MS. A similaridade entre os espectros de massas de uma solução analítica de CIP e de uma amostra de efluente do PA-HUSM, tomada em P2, no tempo de retenção característico do analito (Figura 8), demonstram a presença de CIP no efluente.

A fim de investigar a seletividade do procedimento 1, utilizado para a determinação da concentração de CIP, alguns testes adicionais foram feitos: utilizou-se método de adição do padrão a fim de comparar os coeficientes lineares “a” das retas das curvas analíticas obtidas através deste método e do método do padrão externo, utilizado para a determinação da concentração de CIP. Confrontando-se os valores do coeficiente angular (a) das duas retas (Tabela 6), é possível notar que não há diferença estatística (desvio padrão relativo, rsd < 5%).

Tabela 6 - Figuras de mérito do procedimento 1 usado na determinação de ciprofloxacina no efluente do PA-HUSM.

Método do padrão externo*				
Faixa linear	Equação da reta	r²	LQ***	LD****
0,08 – 4 mg L ⁻¹	y = 53996 x - 4102,3	0,9993	0,2 mg L ⁻¹	0,06 mg L ⁻¹
Método de adição do padrão**				
Equação da reta		r²		
y = 50640 x - 11441		0,9998		

* utilizado na determinação de CIP propriamente dita

** utilizado na avaliação da seletividade do método do padrão externo

***limite de quantificação

****limite de detecção

Em negrito nas equações das retas, o coeficiente linear “a”

Igualmente, nenhuma diferença estatística foi observada ($\text{rsd} < 2\%$) entre as razões “sinal da solução analítica de CIP/sinal da amostra do efluente do PA-HUSM” quando, durante a determinação, interrompeu-se o fluxo no momento da passagem do analito pelo detector, variou-se λ_{em} e manteve-se fixo λ_{exc} .

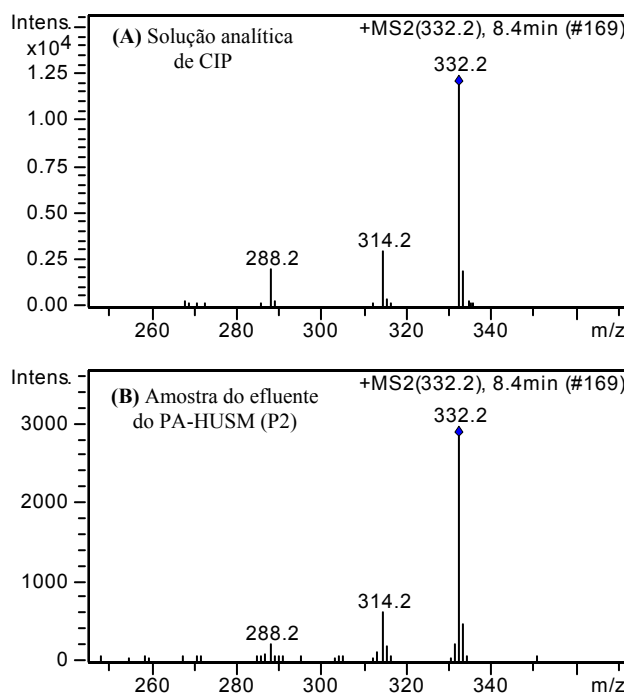


Figura 8 - Espectros de massas no tempo de retenção característico da ciprofloxacina, obtidos através do procedimento 2, na determinação por LC-MS. (A) amostra de solução analítica de ciprofloxacina; (B) amostra do efluente do PA-HUSM tomada em P2.

A Tabela 7 mostra os resultados obtidos através da determinação da concentração de CIP no efluente do PA-HUSM. As concentrações ambientais medidas (CAMs) foram entre 19 e 155 $\mu\text{g L}^{-1}$ (média de $65 \pm 45 \mu\text{g L}^{-1}$, $n = 7$) e 32 e 99 $\mu\text{g L}^{-1}$ (média de $54 \pm 21 \mu\text{g L}^{-1}$, $n = 7$) para P1 e P2, respectivamente.

Como já foi referido anteriormente (seções 1 e 3.3.1), após passar pelo sistema de tratamento, o efluente é despejado diretamente no córrego que corta o campus da UFSM. O efluente de outro prédio da universidade junta-se ao do PA-HUSM após o ponto P2. Entretanto, nenhuma investigação a respeito do fluxo e

da diluição resultante foi realizada. Assim, a fim de simular as condições mais drásticas, considerou-se não ocorrer nenhuma diluição. Uma vez que a legislação ambiental vigente não faz nenhuma consideração específica a fármacos, foram utilizados parâmetros europeus no presente estudo de avaliação de risco.

Tabela 7 - Concentrações de ciprofloxacina no efluente do PA-HUSM medidas nos pontos P1 e P2.

Dias de amostragem	CAMs de CIP ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
	P1	P2	Balanco entre P1 e P2*
28/06/2006, quarta-feira	39	56	Aumento de 44%
29/06/2006, quinta-feira	155	99	Diminuição de 36%
30/07/2006, sexta-feira	19	32	Aumento de 68%
01/07/2006, sábado	46	43	Diminuição de 7%
02/07/2006, domingo	44	45	Aumento de 2%
03/07/2006, segunda-feira	44	52	Aumento de 18%
04/07/2006, terça-feira	75	52	Diminuição de 31%
Média	65±45	54±21	Diminuição de 17%

* Obtido considerando-se o aumento ou diminuição relativos das CAMs de P1 para P2, considerando-se P1 como o 100%

A avaliação de risco ambiental para águas de superfície foi baseada no *Draft Discussion Paper* proposto pela *European Agency for the Evaluation of Medical Products (EMEA)*²². Os coeficientes de risco da CIP em corpos receptores foram avaliados comparando-se dados de toxicidade aguda da CIP (CE_{50}) a organismos de três níveis tróficos da cadeia alimentar (peixe, daphnia e alga)³⁷ como recomendado pela *EMEA*²². CPENOs em águas superficiais foram obtidas através da aplicação de um fator de segurança de 1000 ao menor valor de CE_{50} entre as três espécies. Apesar de conservador, o fator de segurança de 1000 é sugerido para testes de toxicidade aguda a curto prazo (*short-term data*)²². Ele considera incertezas advindas de variações intra e inter-espécies e extrapolações de toxicidade aguda para crônica.

O caminho seguido no presente trabalho já foi relatado na literatura³¹. Seguindo as recomendações do *European guidelines and draft documents* a CPENO em água superficiais é de 3 µg L⁻¹ usando-se os dados de CE₅₀ para a alga *Selenastrum capricornutum*³⁷. A partir destes dados calculou-se uma razão CAM/CPENO de 11-33 (média: 18). Este valor é 1.100-3.300 vezes maior que aqueles reportados pela literatura³¹. De acordo com as referências 22 e 24, a inclusão de microrganismos na avaliação de risco de fluoroquinolonas em águas superficiais não é recomendada, sendo que isto deve ser feito para a avaliação de risco em ETEs²⁴. Isto porque a concentração de antibióticos é consideravelmente maior em ETEs do que em águas de superfície. Assim pode-se assumir que o risco para microrganismos no último compartimento é coberto pelo primeiro. Entretanto, no presente trabalho, é necessário ter em mente a inexistência de ETEs e que o corpo receptor é composto quase que exclusivamente por efluente hospitalar, sendo um verdadeiro “esgoto a céu aberto”. Assim, o uso de microrganismos, nesta situação, para a caracterização de risco, foi considerado adequado. Considerando-se CPENO em ETEs de 8 µg L⁻¹ e usando-se dados de CE₅₀ para uma população de bactérias relevantes de *Pseudomonas putida*⁵⁹, a razão CAM/CPENO é de 4-12 (média: 7), 200-600 vezes maior que o reportado pela literatura³¹. Por outro lado, utilizando-se CPENO de 0,05 µg L⁻¹ obtido através da CE₅₀ de 58 µg L⁻¹, para a cianobactéria *Microcystis aeruginosa*³⁷, a razão CAM/CPENO é de 640-1.980 (média: 1.080). Este valor é aproximadamente 48-149 vezes maior que os reportados na literatura³⁷.

Os quocientes maiores obtidos no presente estudo demonstram a situação de risco mais crítica causada pelo efluente do PA-HUSM e enfatizam a necessidade de geração de mais dados de exposição ambiental de CIP em países em desenvolvimento. Estes resultados indicam possíveis perigos ambientais relacionados ao uso de CIP da maneira que é feito atualmente (quantidade administrada, condições de tratamento do efluente do PA-HUSM e características do corpo receptor).

Some-se a isto os efeitos positivos no teste umuC causado pela presença de 0,7 µg L⁻¹ de CIP em amostras de efluente de hospital^{40,41} e concentrações de

CIP de 0,2-0,4 $\mu\text{g L}^{-1}$, que causam efeitos danosos a DNA de bactérias características de efluentes⁵⁷. Estas concentrações, que causam efeitos genotóxicos em bactérias, são aproximadamente 80-270 vezes menores que as CAMs obtidas no presente estudo.

Comparando-se os resultados encontrados para P1 e P2, tem-se que a concentração de CIP algumas vezes aumentou e outras diminuiu com a passagem do efluente pelo sistema de tratamento (vide coluna de balanço entre P1 e P2 - Tabela 7. Este comportamento deve ser causado pela predominância de processos de adsorção, já amplamente reportados para a CIP^{33,34,62}. Além disso, não é esperada a degradação de CIP em condições de anaerobiose como as encontradas no sistema fossa séptica e filtro anaeróbio da rede PA-HUSM^{34,62}. Da mesma forma, reações de hidrólise^{30,59}, assim como fotodegradação, uma vez que nenhuma exposição à luz acontece até o efluente encontrar o córrego. Acredita-se que durante a passagem do efluente pelo sistema de tratamento ocorreu a partição de CIP entre as fases líquida (efluente) e sólida (lodo). Tal situação de equilíbrio demonstrou ser conduzida por dois processos: concentrações mais elevadas de CIP no efluente (onde o limiar pareceu ser aproximadamente 45 $\mu\text{g L}^{-1}$); e a saturação do lodo com o medicamento. Como pode-se ver no gráfico da Figura 8, quando a concentração de CIP em P1 é inferior a aproximadamente 45 $\mu\text{g L}^{-1}$, a concentração em P2 aumenta (variação positiva na concentração de CIP de P1 para P2 no gráfico). Já quando a concentração de CIP em P1 é superior a aproximadamente 45 $\mu\text{g L}^{-1}$, a concentração em P2 diminui (variação negativa na concentração de CIP de P1 para P2 no gráfico). Estes resultados dão indícios de haver a migração da CIP do efluente para o lodo e vice-versa. A Figura 9 também demonstra que quanto mais a concentração de CIP em P1 está próxima de 45 $\mu\text{g L}^{-1}$, menor a variação de concentração de P1 para P2, evidenciando a tendência de equilíbrio da CIP entre as fases sólida e líquida.

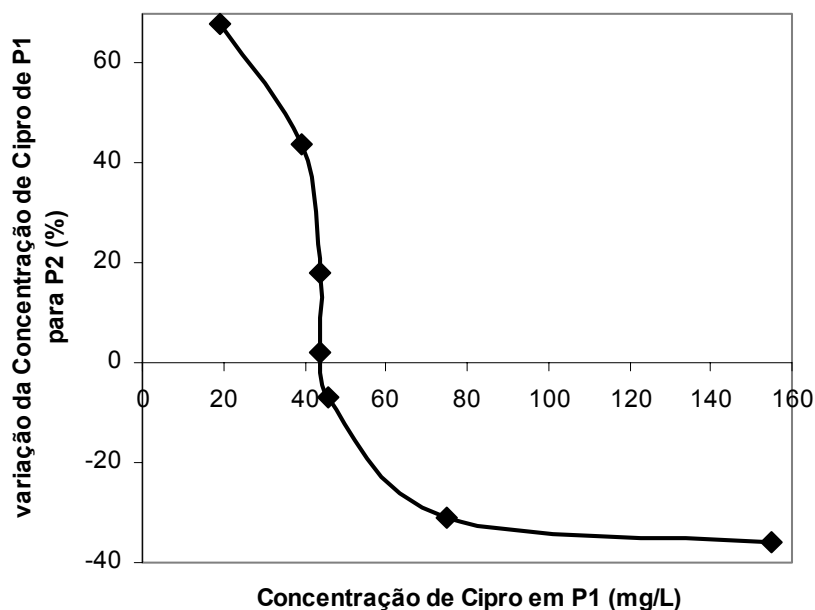


Figura 9 - Variação da concentração de ciprofloxacina no efluente do PA-HUSM após passagem pelo sistema de tratamento. Valores positivos e negativos na abscissa significam, respectivamente, aumento e diminuição da concentração de ciprofloxacina ao passar pelo sistema de tratamento.

Esta suposição é corroborada pelo alto coeficiente de partição lodo-efluente ($\log K_d$ lodo) da CIP ($\log K_d$ lodo = 4,2 L kg⁻¹). $\log K_d > 2,5$ significam alta capacidade de adsorção³⁴. Visto que cada CAM apresentada é uma amostra composta por coletas tomadas ao longo de cada dia (representando, portanto, tendência diária), desconsiderou-se qualquer imprecisão advinda do tempo de retenção hidráulica. Embora os processos envolvidos sejam muito complexos, algumas discussões ambientalmente relevantes já vem sendo feitas a respeito da adsorção de fluoroquinolonas em material orgânico particulado^{34,78,86}. O que se sabe é que CIP é uma quinolona anfótera, que contém dois prótons ionizáveis. Assim, a CIP existe na forma de quatro microespécies diferentes em solução, que são dependentes do pH: as formas positiva, zwitteriônica, neutra e negativa. A forma neutra, independente do pH, é a fração que ocorre em muito menor proporção (Figura 10)⁸⁹. Tal comportamento, aliado aos valores negativos de coeficiente partição octanol-água ($\log K_{ow}$) de CIP, indica que interações hidrofóbicas desempenham um papel menos importante no processo de adsorção.

Por outro lado, as formas carregadas que ocorrem em muito maior extensão sugerem que interações eletrostáticas são as principais responsáveis pela migração de CIP para partículas sólidas^{34,39,43}. Obviamente, o grau de adsorção de CIP depende, também, do pH do meio e das características do adsorvente, como por exemplo, que tipo de interações ele é capaz de fazer com o fármaco.

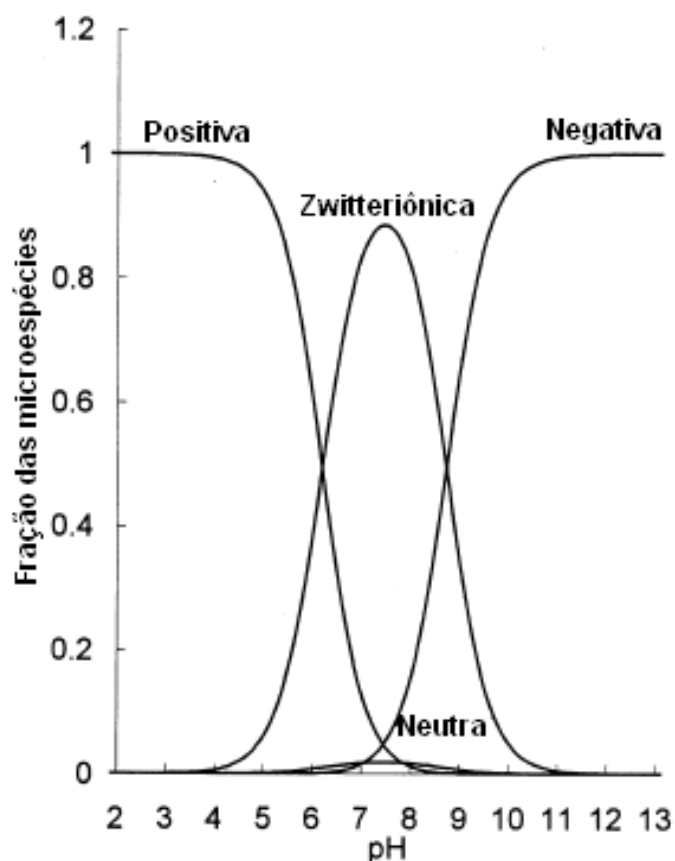


Figura 10 – Frações das microespécies da ciprofloxacina em diferentes pH⁸⁹.

4.3. Degradação fotoinduzida de ciprofloxacina em solução sintética

4.3.1. Estudo cinético

Alguns estudos têm sido realizados a cerca da fotodegradação da CIP. Porém, a grande maioria deles não é de relevância ambiental. Assim, a fim de ter-se uma primeira impressão do comportamento de CIP em concentrações

ambientais frente ao uso de processo fotoinduzido, uma série de ensaios foi feita com soluções sintéticas desta espécie.

Após 2 minutos de tratamento observou-se uma redução de quase 85% da concentração de CIP (Figura 11a). Após 4 min a concentração de CIP era inferior a 3% da concentração inicial. O decaimento de CIP demonstrou ser de primeira ordem (Figura 11b), sendo que a constante de velocidade de reação (k) foi determinada a partir da lei de cinética de primeira ordem, para o consumo de um reagente, no caso, a CIP,

$$\frac{d[\text{CIP}]}{dt} = -k[\text{CIP}] \quad (1)$$

Onde $[\text{CIP}]$ é a concentração de CIP, t é o tempo de reação de fotodegradação e k é a constante de velocidade de reação. A equação 1 pode ser independentemente integrada entre os limites t_0 ($[\text{CIP}]_0$) e t ($[\text{CIP}]$), como segue:

$$\int_{[\text{CIP}]_0}^{[\text{CIP}]} \frac{d[\text{CIP}]}{[\text{CIP}]} = -k \int_0^t dt$$

A partir daí, obtém-se

$$\ln \left(\frac{[\text{CIP}]}{[\text{CIP}]_0} \right) = -kt \quad (2)$$

Calculou-se, então, um k de $(1,56 \pm 0,11) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$.

O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) foi calculado considerando-se $[\text{CIP}] = 1/2[\text{CIP}]_0$, na equação 2. Como resultado obtém-se a equação:

$$t_{1/2} = \ln \frac{2}{k} \quad (3)$$

Assim, no presente trabalho, observou-se $t_{1/2}$ de 44 ± 7 s.

A não influência da concentração na fotodegradação de CIP está de acordo com os estudos realizados por Cardozo et al.¹⁶ que, em experimentos com mesocosmo, verificaram que a fotodegradação da CIP obedeceu a um regime de primeira ordem ($t_{1/2} = 68,4-58,2$ min). Utilizando fonte artificial de irradiação o tempo de meia-vida foi de 114 e 2760 min. Gagliano e McNamara³⁰ verificaram o mesmo perfil de primeira ordem, obtendo $k = 1,49 \times 10^{-2}$ ($t_{1/2} = 46,4$ min), $7,69 \times 10^{-2}$ ($t_{1/2} = 9,0$ min) e $3,00 \times 10^{-2} \text{ d}^{-1}$ ($t_{1/2} = 23,1$ min), em pH 5, 7 e 9, respectivamente. Por outro lado, Burhenne et al.¹² encontraram uma taxa de degradação de segunda ordem ($k = 1,11 \times 10^{-2} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $t_{1/2} = 90,2$ min).

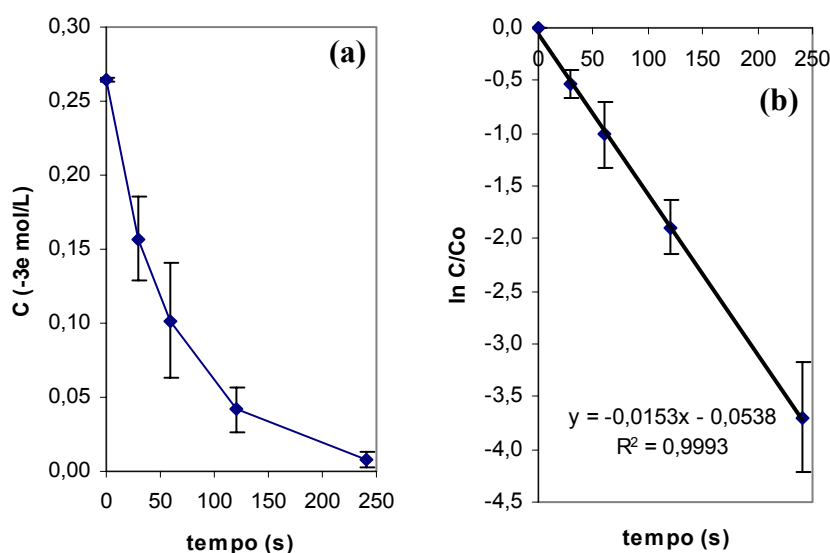


Figura 11 - Processo fotoinduzido de degradação de ciprofloxacina em solução sintética. **a)** decaimento da concentração de ciprofloxacina; **b)** decaimento de 1ª ordem. Condições: fotorreator, em batelada (2,5 L); 30 °C; pH 9 (NH_4Cl 0,05 mol L^{-1} e KOH 3 mol L^{-1}); 0,1 mg L^{-1} de ciprofloxacina ($0,3 \times 10^{-6}$ mol L^{-1}).

4.3.2. Estudo da biodegradabilidade

Valendo-se de estudos prévios a respeito da disposição geral dos subprodutos de degradação de CIP, determinou-se que seriam utilizadas amostras

tomadas em tempos de 0, 2 e 4 min de fotoprocesso. Escolheram-se amostras que possibilitassem a investigação dos efeitos de alguns metabólitos na biodegradabilidade das soluções irradiadas, além da sua identificação. Como pode ser visto na Figura 12, os experimentos realizados foram todos válidos, visto que o acetato de sódio, espécie prontamente biodegradável, utilizada como indicador de toxicidade e controle de qualidade, foi eliminado a uma taxa superior a 60%, após 14 dias. Apesar dos valores negativos para as três amostras do fotoprocesso, os resultados foram considerados estatística e quimicamente consistentes. Nenhuma diferença significativa de biodegradabilidade foi verificada entre a solução antes da irradiação e aquelas irradiadas. A degradação de CIP durante o fotoprocesso foi de 64% e 80%, após 2 e 4 min, respectivamente, o que significa que estava presente em todas as três amostras. Halling-Sørensen et al.³⁷ verificaram a biorecalcitrância de CIP através do CBT. Al-Ahmad et al.¹ e Kümmerer et al.⁵⁹ obtiveram o mesmo perfil, mesmo com testes prolongados de 28 para 40 dias. Analisando-se a Figura 13, verifica-se decréscimo na concentração de CIP em amostras sem tratamento, incubadas para o CBT. Já, para as amostras tomadas a 2 e 4 min de fotoprocesso, não houve variação significativa na concentração do fármaco após a incubação. Este comportamento está em desacordo com o que fora reportado por Kümmerer et al.⁶⁰, em que a concentração de CIP permanece constante no decurso do teste. Apesar de existir uma série de casos relatando a alta capacidade de adsorção da CIP^{33,34,64}, este fenômeno não é esperado ocorrer nas condições do CBT. Reações de hidrólise são igualmente improváveis^{30,59} e não devem explicar o comportamento observado.

Os resultados aqui apresentados evidenciam que os subprodutos formados não são prontamente biodegradáveis. Porém, tomando-se diferentes tempos de irradiação, diferentes compostos fluorescentes são formados, sendo que prolongando-se o tempo de exposição, os sinais referentes a eles tendem a desaparecer. Assim, é necessária uma nova investigação visando avaliar a biodegradabilidade de compostos formados em tempos de processo diferentes destes demonstrados no presente estudo.

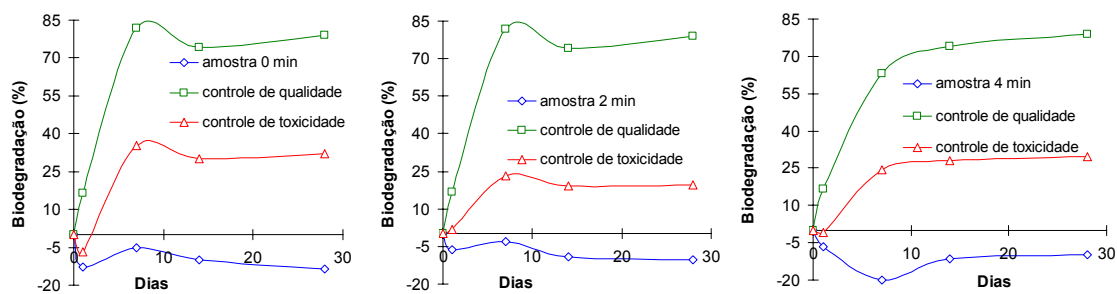


Figura 12 - Pronta biodegradabilidade de soluções sintéticas de ciprofloxacina, medida através de CBT, durante processo fotoinduzido. Condições: fotorreator, em batelada, 30 °C; pH: 9 (controlado com adição de solução de KOH, apenas); Concentração de ciprofloxacina: 6 mg L⁻¹ (1,81 x 10⁻⁵ mol L⁻¹).

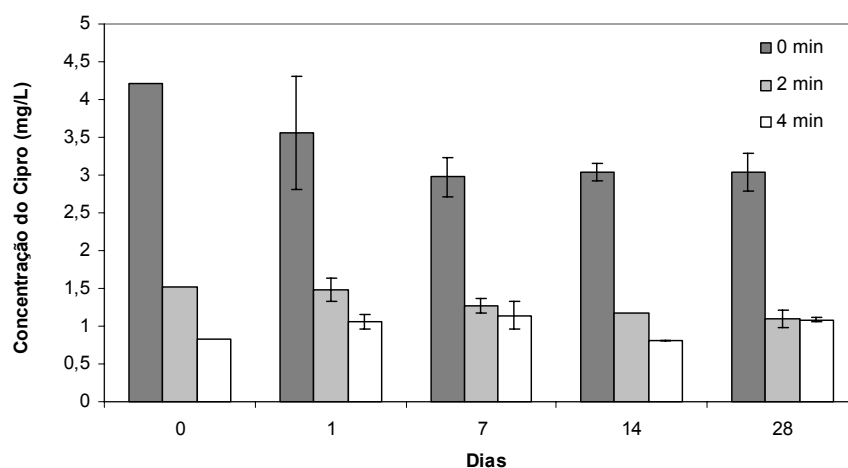


Figura 13 - Variação de concentração de ciprofloxacina em diferentes amostras de processo fotoinduzido (amostras dos tempos 0, 2 e 4 min), durante os 28 dias de análise do CBT.

Deve-se, também, ter em mente que o CBT é utilizado para determinar a biodegradabilidade de compostos e misturas sob baixa densidade bacteriana, sendo que, de uma maneira geral, os resultados obtidos através dele podem ser extrapolados para águas superficiais. Porém, no momento da escolha do teste de biodegradabilidade, deve-se considerar as características microbiológicas do ecossistema impactado pelo efluente, contendo o composto ou a mistura de

interesse. Normalmente, efluentes hospitalares são tratados em ETEs que se valem de sistemas de lodos ativados, o que nos remete à utilização de testes que utilizem maiores densidades bacterianas, como por exemplo, o *Zanb-Wellens test*. Assim, uma nova série de investigações será necessária, caso se queira avaliar a biodegradabilidade dos subprodutos de fotodegradação de CIP frente a um ambiente com uma população bacteriana diferenciada desta apresentada no corrente estudo.

4.3.3. Subprodutos de degradação

Utilizou-se análise por LC-MS na investigação dos subprodutos formados na fotodegradação de CIP. Como pode ser visto na Figura 14, a maioria dos compostos formados durante o processo apresentam polaridade similar a do composto-mãe. Por este motivo, não foi empregado nenhum tratamento diferenciado das amostras fotoprocessadas e considerou-se que o procedimento utilizado na determinação de CIP é adequado para a identificação dos metabólitos.

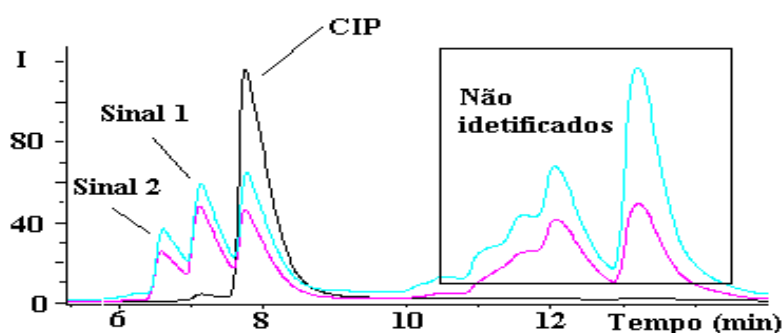


Figura 14 - Espectros de fluorescência de amostras de solução sintética de ciprofloxacina tomadas em diferentes tempos (0, 2 e 4 min) de processo fotoinduzido com identificação dos sinais de interesse. Condições: fotorreator em batelada, 30 °C, pH: 9 (controlado com adição de solução de KOH, apenas); Concentração 6 mg L⁻¹ de ciprofloxacina (1,81 x 10⁻⁵ mol L⁻¹).

Nos primeiros momentos do tratamento, dois sinais (1 e 2 - Figura 14) foram observados muito próximos ao sinal da CIP e referentes a compostos com maior polaridade (menor tempo de retenção). O sinal 1 foi o primeiro a ser detectado e aumentou à medida que o sinal referente à CIP diminuiu. O sinal 2 foi identificado um pouco mais tarde, no decorrer do fotoprocesso, e é referente a um composto mais polar. No decorrer do tratamento estes compostos tenderam a diminuir e desaparecer.

A investigação a respeito da estrutura dos metabólitos de fotodegradação de CIP e a discussão e proposição de possíveis rotas reacionais envolvidas neste processo foram feitas confrontando-se os dados obtidos através da análise por LC-MS das amostras de soluções sintéticas de CIP, tomadas durante fotoprocessos, com estudos encontrados na literatura. Visando o melhor entendimento, serão apresentados, já num primeiro momento, todos os compostos possivelmente identificados a partir de suas respectivas massas (Figura 15).

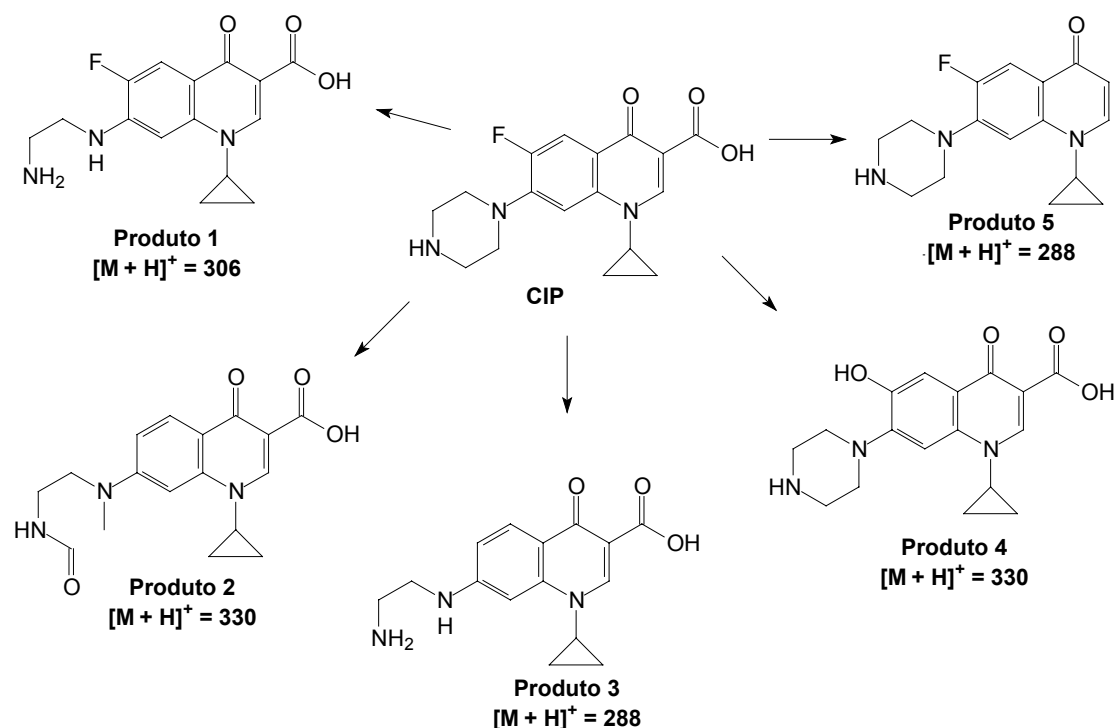


Figura 15 - Metabólitos possivelmente formados e suas respectivas massas^{12,13,74,93}

O espectro de massas correspondente ao sinal 1 apresentou, como o mais intenso, um fragmento de massa molecular 306,5 (Figura 16), a mesma do 7-[(2-aminoetil)amino]-6-fluoroquinolina (produto 1 - Figura 15), formado a partir da decomposição do anel piperazínico. Este produto é, normalmente, verificado durante a fotodegradação de CIP sob condições ácidas e é um intermediário da formação da amina primária 7-amino-6-fluoroquinolina^{12,74,93}. Entretanto, esta última espécie não foi observada na presente investigação. Uma provável explicação para isso é o curto tempo de reação empregado. Apesar destes compostos serem encontrados preferencialmente em condições ácidas, já foram também obtidos em pH neutro⁷⁴ e alcalino (8,6 e 10,6)⁹⁶.

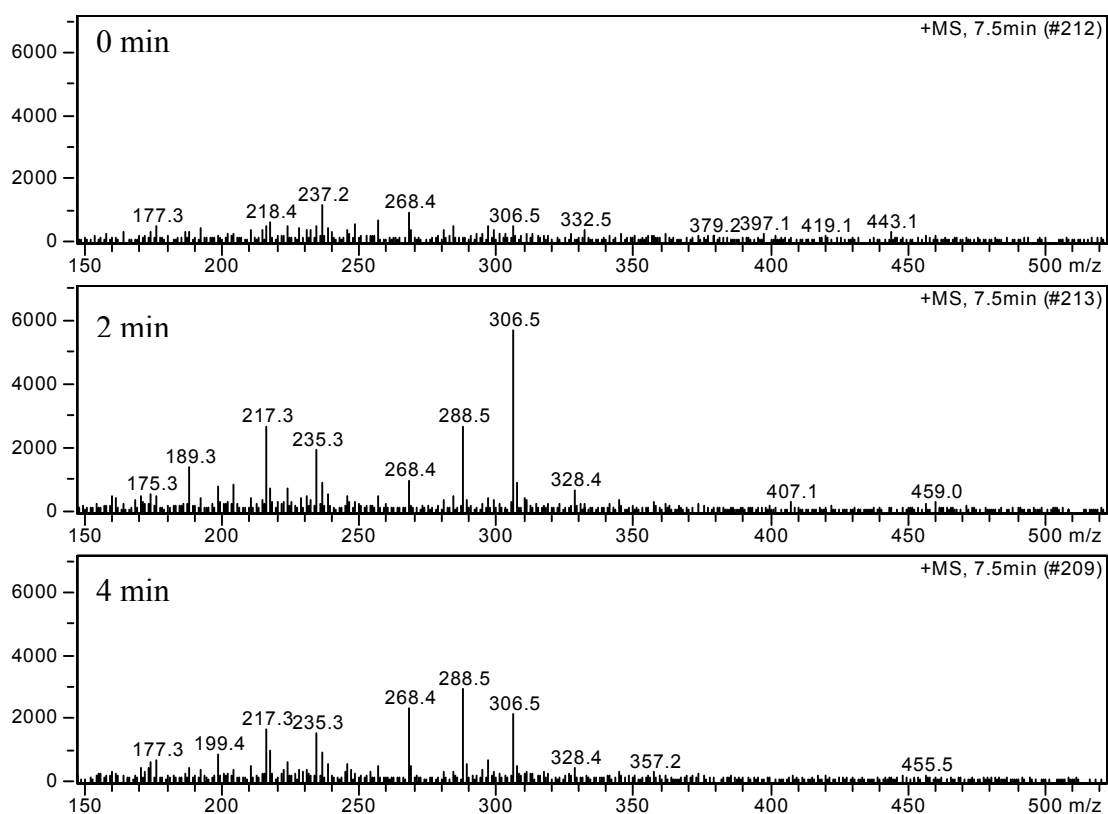


Figura 16 - Espectros de massas obtidos através de análise por LC-MS referentes ao tempo de retenção 7,5, característico do sinal 1 (sinal obtido através de análise por HPLC-FLD – Figura 14), durante diferentes tempos (0, 2 e 4 min) de processo fotoinduzido.

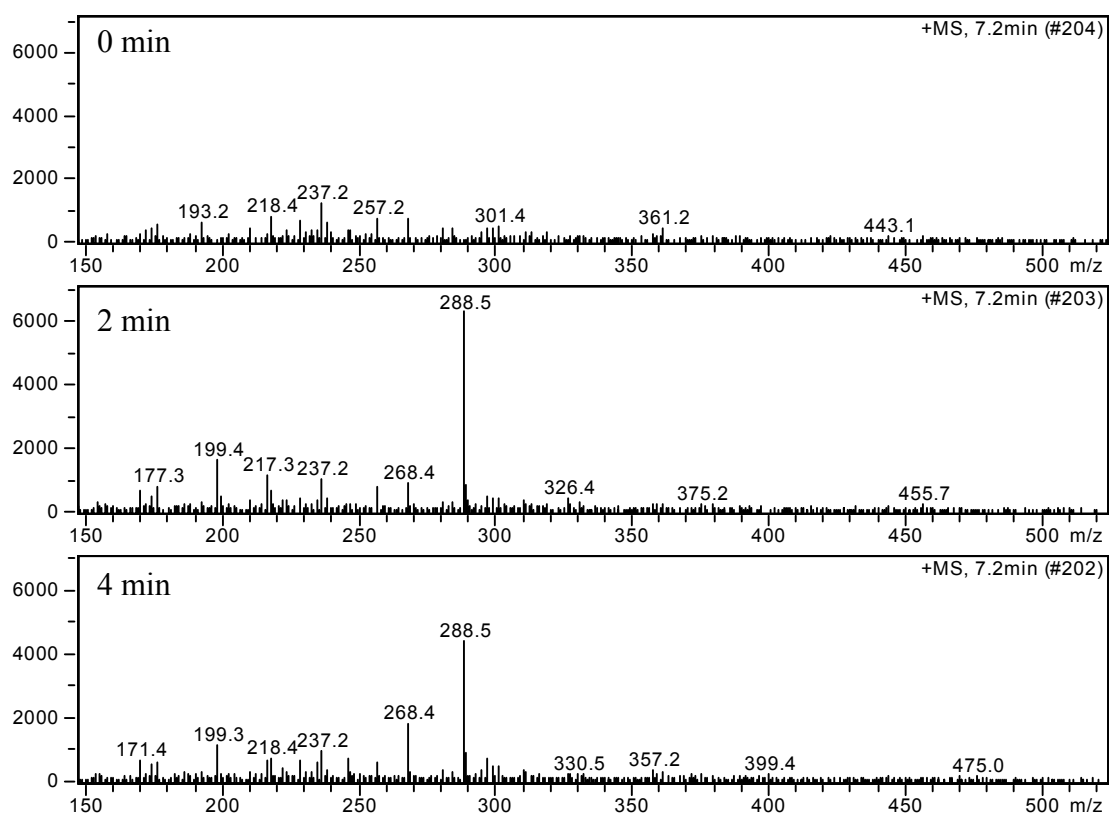


Figura 17 - Espectros de massas obtidos através de análise por LC-MS referentes ao tempo de retenção 7,2 min, característico do sinal 2 (sinal obtido através de análise por HPLC-FLD, Figura 14), durante diferentes tempos (0, 2 e 4 min) de processo fotoinduzido.

Nestas condições básicas, uma série de outros subprodutos foram detectados, corroborando os resultados apresentados aqui. Nada foi encontrado a respeito do mecanismo destas reações. Alguns pesquisadores consideram ocorrer abstração de um hidrogênio por algum estado excitado ou por radicais hidroxil formados a partir da reação direta da água com o fármaco, ou ativação de dióxigênio residual². Esta última hipótese parece ser especialmente possível quando se considera que as soluções utilizadas nestes experimentos foram saturadas com ar e continham, portanto, altas concentrações de O₂. O espectro de massa do sinal 2 demonstra que 288,5 é a massa do fragmento com sinal mais intenso (Figura 17). A partir disto, uma série de hipóteses podem ser consideradas:

Hipótese 1. A espécie formada pode ser referente à perda do átomo de flúor na posição 6, juntamente com a mesma quebra do anel piperazínico referida anteriormente, tendo-se, desta maneira, a formação do composto 3 (Figura 15).

É sabido que, durante a fotodegradação de CIP, sob condições redutoras, ocorre defluoração induzida por transferência de elétron^{2,76} através da estabilização do estado triplete por uma espécie doadora de elétron, para formar o anion radicalar **a** (Figura 18). O passo seguinte envolve a perda do flúor e a formação de um radical aril **b**.

Hipótese 1.a. Na presença de um bom agente redutor, como, por exemplo, o sulfito, a seqüência é completada por uma segunda transferência de elétrons seguida de protonação para formar o composto **c** (Figura 18)⁷⁴. Este comportamento foi observado durante fotodegradação da norfloxacina, fluoroquinolona estruturalmente bastante similar à CIP²⁵.

Hipótese 1.b. Por outro lado, quando, por exemplo, fosfato é usado como tampão, seu baixo potencial de redução impede a transferência de elétron para **b** e o ânion radical fosfato, inicialmente formado, abstrai um próton da cadeia lateral, gerando o diradical **d**. Por fim, esta espécie sofre clivagem do anel piperazínico e adição de água, formando o composto 2 ($M + H^+ = 330$) e, posteriormente, o composto 3⁷⁴ (Figura 18). No presente trabalho, um fraco sinal referente à massa de 330,5 foi observado no mesmo tempo de retenção da massa 288,5 (vide Figura 17), podendo ser um indicativo da formação do composto 2. Esta espécie também foi encontrada, porém, em menor concentração, na irradiação de CIP em água pura⁷⁴. Os autores dão como uma possível explicação a oxidação da água para a geração de **a** e HO•. Este último poderia, supostamente, abstrair um hidrogênio da mesma forma considerada para o caso do ânion radicalar fosfato. Isto obedeceria ao bem conhecido mecanismo de abstração de hidrogênio por radical hidroxil, que geralmente acontece com espécies alifáticas. Somado a isto, radicais orgânicos provenientes deste tipo de reação normalmente interagem com oxigênio molecular para formar radicais peroxil⁸¹, sendo adequado, portanto, considerar que o produto 2 pode ser obtido através deste tipo de mecanismo.

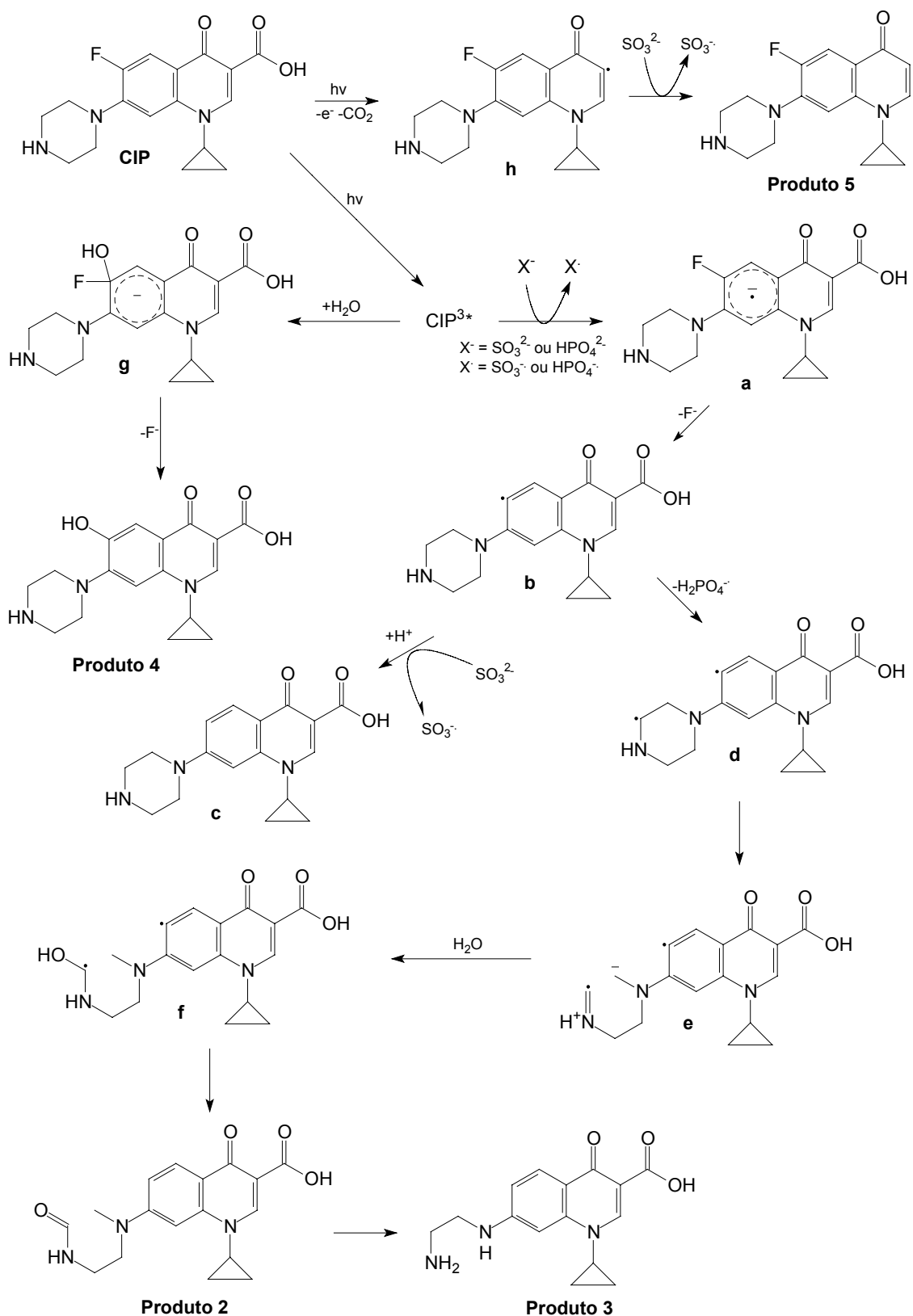


Figura 18 - Fotometabólitos de ciprofloxacina em solução aquosa formados em diferentes condições e suas respectivas rotas reacionais. Todas as informações contidas aqui já foram reportadas na literatura^{2,12,13,25,74,93}.

Hipótese 1.c. Deve-se, também, considerar a reação de terminação entre radical hidroxil e as espécies, ou **a**, ou **b**, com formação do composto 4. Este suposto metabólito foi identificado durante irradiação de CIP, em água pura, num processo de baixa eficiência (Φ 0,07)⁷⁴ e também apresenta $M + H^+ = 330$, indicando a possibilidade de ter sido formada nas condições aqui apresentadas. Porém, baseado no que fora obtido na irradiação da norfloxacin, e por outras substituições aromáticas nucleofílicas fotoinduzidas, o processo foi considerado ocorrer via mecanismo de adição-eliminação, através da formação do intermediário **g**, e, não, através de reações radicalares (vide Figura 18). Esta espécie, porém, teria sua formação inibida pela saturação da solução com ar, o que ocorre no presente estudo. Sob semelhantes condições, a defluoração da norfloxacin para formar a espécie análoga a 4, apresentou um menor rendimento quando comparado ao obtido com soluções sob fluxo de argônio²⁵. Fluoroquinolonas podem ser estabilizadas por oxigênio através de transferência de energia, via formação de oxigênio singlete e/ou transferência de elétron para formar o ânion superóxido e o cátion radicalar da correspondente fluoroquinolona. Este último fenômeno é indicado como sendo o mecanismo mais significativo², tendo-se a regeneração do composto original e a queda do rendimento quântico da fototransformação.

Hipótese 2. Outra possibilidade é a descarboxilação da CIP para formar o composto 5 ($M + H^+ = 288$). Ele foi observado, em menor extensão, na presença de sulfito (espécie doadora de elétrons), em pH neutro, após redução do radical aril formado pela perda do grupo carboxil¹³ (Figura 18).

Tomando-se o que foi discutido a cima, deve-se considerar, para o presente estudo, o fato de que o pH da solução foi ajustado apenas adicionando-se KOH. Sob tais condições, HO^- atuaria no lugar dos íons sulfito e fosfato, como doador de elétrons, segundo os mecanismos discutidos no parágrafo anterior. Não deve ser esquecido que tal comportamento implicaria na formação de radical hidroxil, devendo este participar ativamente da cadeia de reações. Para o melhor entendimento, os caminhos hipotetizados são demonstrados na Figura 19.

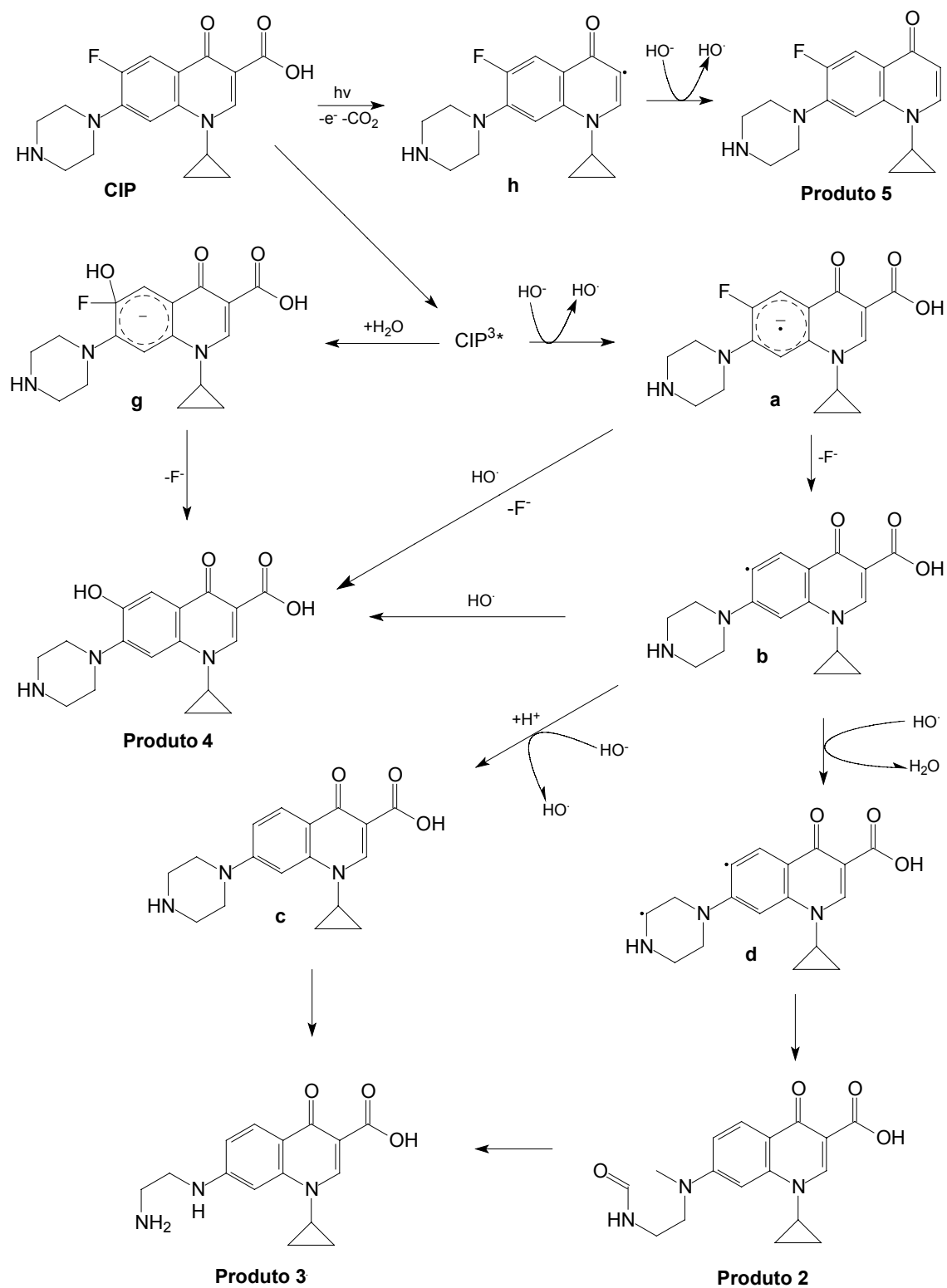


Figura 19 - Compostos provavelmente formados durante degradação fotoinduzida de ciprofloxacina, em solução sintética (pH 9 e em meio a HO^\bullet) e rotas possíveis. Os compostos e rotas foram propostos no presente trabalho, com base em informações disponíveis na literatura e resumidamente apresentados na Figura 18.

Porém, existe uma outra hipótese, quimicamente viável, que baseia-se indiretamente nos mecanismos acima referidos. Sabendo-se que, mesmo fluoroquinolonas que não possuem a parte piperazínica, são capazes de se converter ao estado triplete^{9,101}, deve-se considerar a obtenção do produto 3, via formação do produto 1. Como já foi dito anteriormente, a espécie de massa 306,5 se forma antes daquela de massa 288,5. Assim, é aceitável a rota reacional mostrada na Figura 20, onde o composto 1 seria convertido ao seu estado triplete e, em seguida, estabilizado por HO⁻ (doador de elétrons), com formação dos intermediários **i** e **j** (correspondentes aos intermediários **a** e **b**, respectivamente) e, finalmente, o produto 3 (correspondente, neste caso, ao composto **c**).

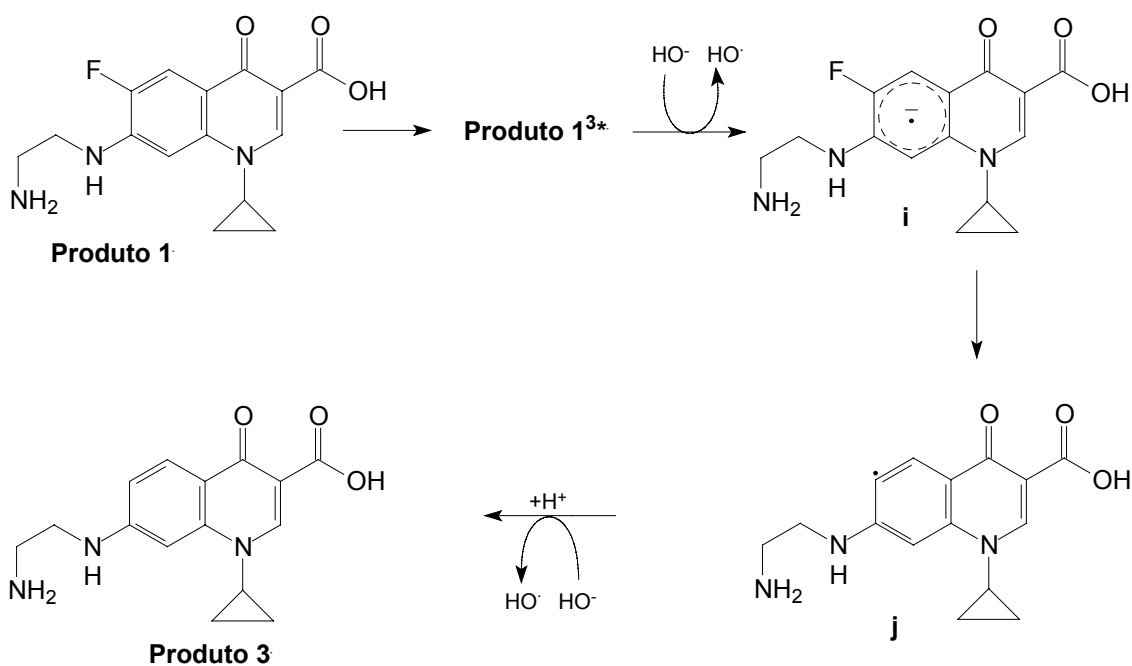


Figura 20 - Compostos com maior probabilidade de serem formados durante degradação fotoinduzida de ciprofloxacina em solução sintética (pH 9 e em meio a HO⁻) e rotas reacionais possíveis. Os compostos e rotas foram propostos no presente trabalho, com base em informações disponíveis na literatura e resumidamente apresentados na Figura 18.

Alguns outros compostos fluorescentes de menor polaridade (em tempos de retenção mais altos) são formados (Figura 14), porém seus espectros de massas não foram suficientes para obter qualquer informação estrutural.

É importante notar que nenhum dos compostos sofreu quebra da parte quinolônica da molécula, responsável pela atividade bacteriana de fluorquinolonas^{20,90}, sendo que o produto 3 apresenta fraça, mas comprovada atividade bacteriana (100 vezes mais fraça que a da CIP)¹⁰⁶. Apesar disso, radiação UV pode ser responsável pela perda da ação biológica de soluções contendo CIP⁸⁴.

Todos os metabólitos discutidos acima foram reportados na literatura apenas como um passo intermediário da fotodegradação de fluoroquinolonas, visto que produtos com maior polaridade, além de CO₂, foram observados em seguida¹²⁻¹⁴. Isto provavelmente aconteceu aqui, uma vez que os sinais dos produtos fluorescentes desapareceram, quando foram utilizados tempos reacionais mais prolongados. Entretanto, nenhum dos estudos referenciados aqui, e que investigaram fotometabólitos de fluoroquinolonas, foram realizados nas mesmas condições apresentadas nesta tese (soluções aquosas, pH 9, não-tamponadas e com excesso de HO⁻). Assim, no que diz respeito à estrutura dos metabólitos e rotas reacionais, o presente trabalho pode servir como uma abordagem primária para futuras investigações, mais detalhadas, a respeito (a) da natureza e concentração dos subprodutos obtidos neste estudo; (b) da natureza e concentração de subprodutos obtidos sob irradiação prolongada; e (c) rotas reacionais.

4.4. Processos avançados de oxidação na degradação de ciprofloxacina no efluente do PA-HUSM

Visto que o objetivo do uso de PAOs era, somente, investigar a sua aplicabilidade de uma maneira genérica, na degradação de CIP em efluentes hospitalares, nenhum estudo de otimização de processos será apresentado aqui.

Foram investigados os processos fotoinduzido, fotocatalise heterogênea, ozonização e peroxônio. Os resultados são demonstrados na Figura 21.

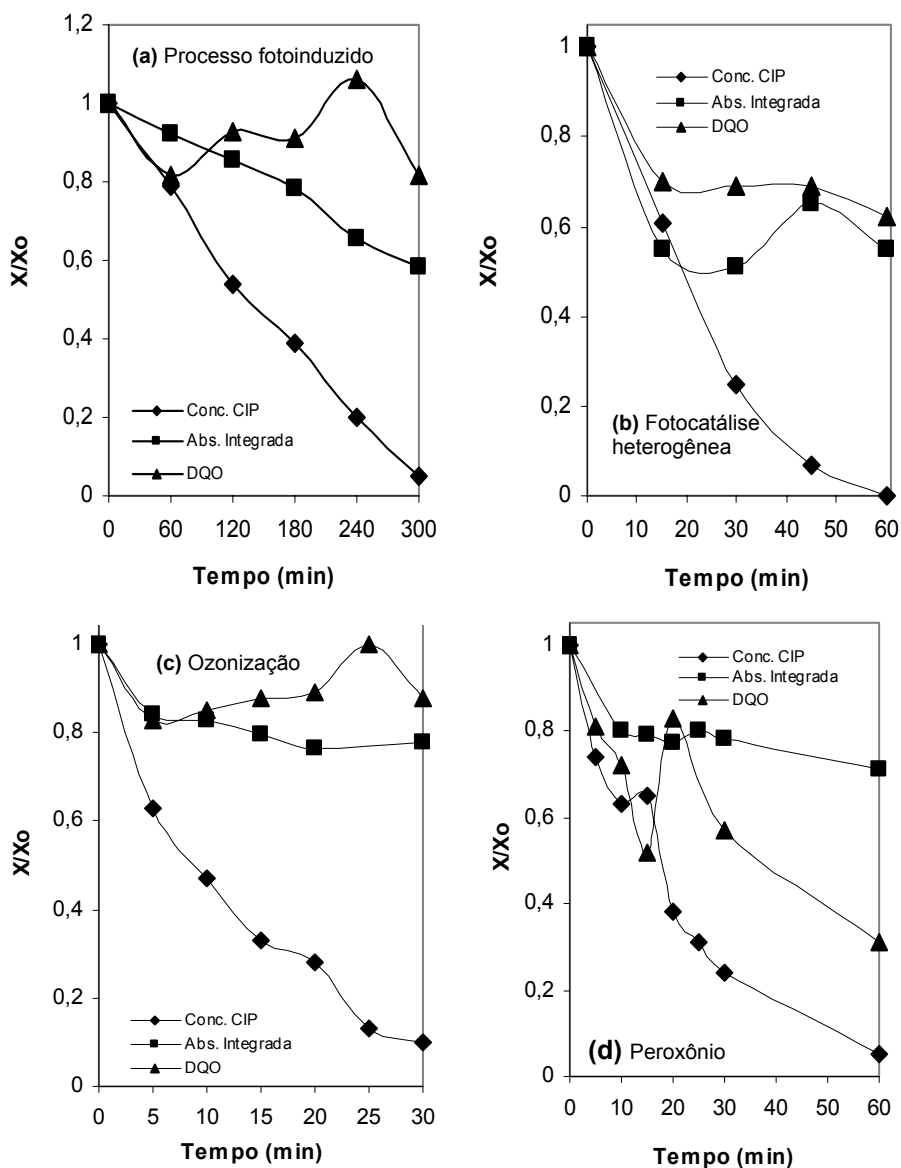


Figura 21 - PAOs na degradação de ciprofloxacina em efluente do PA-HUSM. Condições: X: concentração durante o processo; X_0 : concentração inicial, concentração de CIP: $200 \mu\text{g L}^{-1}$; DQO: 658 mg L^{-1} . Processo fotoinduzido - fotorreator, em batelada com recirculação (500 mL); lâmpada de vapor de mercúrio de 125 W e média pressão; pH 3. Fotocatálise heterogênea - Reator tubular helicoidal (700 mL), lâmpada de vapor de mercúrio de 125 W e média pressão; pH 3; 400 mg de TiO_2 em suspensão. Ozonização: reator tubular (500 mL), em regime de semi-batelada; fluxo de 8 L min^{-1} de ar; geração 450 mg h^{-1} de O_3 ; pH 9. Peroxônio: como na ozonização; 500 mg L^{-1} de H_2O_2 .

Analisando-se o que foi obtido através do processo fotoinduzido (Figura 21a), é possível notar o desfavorecimento da degradação da CIP dissolvida no efluente quando comparado a sua fotodegradação em solução sintética, uma vez que foram obtidos $t_{1/2}$ de 2,5 h e 44 s para a primeira e segunda condições, respectivamente. Este comportamento era esperado, visto que é conhecida a maior dificuldade na degradação de micropoluentes presentes em efluentes em concentrações-traço, já que a competição entre o substrato e outros constituintes do sistema, pelas espécies ativas responsáveis pela degradação, é normalmente ditada por suas concentrações.

Porém, nos casos de degradação fotoinduzida de CIP, em solução sintética e no efluente do PA-HUSM, aqui relatados, alguns fatores devem ser levados em consideração: o primeiro deles é a diferença entre os dois sistemas utilizados. Como estas duas séries de experimentos foram realizadas em laboratórios diferentes, por força da disponibilidade de equipamentos, os regimes de operação foram diferentes: em batelada para a degradação da CIP em solução sintética e, em batelada com recirculação, para a degradação de CIP no efluente do HUSM. Teoricamente, esta diferença nos regimes traz implicações no perfil dos subprodutos formados, uma vez que sistemas com recirculação, devido à exposição de pequenas frações da solução com a fonte de radiação, propiciam degradação simultânea dos compostos-mãe e de espécies intermediárias. No caso de reatores em batelada simples, de uma maneira geral, ocorre o acúmulo de intermediários, uma vez que a degradação destes dependerá do aumento da sua concentração e do desaparecimento do composto-mãe⁸². A diferença entre a potência das lâmpadas também deve ter influenciado na eficiência do processo. Porém, obviamente, os grandes responsáveis pela queda no rendimento do processo são as espécies constituintes do efluente que, devido à absorção da radiação e interação com espécies ativas formadas durante o processo, que têm papel fundamental nas cadeias reacionais radicalares, restringem os caminhos de reação do substrato. Os outros três processos investigados propiciaram melhores resultados e seus rendimentos na degradação da CIP foram mais próximos entre si, sendo que os processos de fotocatalise heterogênea, ozonização e peroxônio

apresentaram $t_{1/2}$ de 20, 9 e 15 min, respectivamente (Figuras 21b, 21c e 21d). Como se pode perceber, a ozonização foi o processo mais adequado para a remoção de CIP do efluente do PA-HUSM, inclusive, quando comparado ao processo peroxônio que, de maneira geral, propicia a formação de espécies ativas como o radical hidroxil, que apresentam potencial de oxidação mais elevado que o do ozônio e, normalmente, criariam condições mais propícias à degradação de poluentes. Entretanto, deve-se ter em mente que H_2O_2 atua na iniciação e terminação de cadeias radicalares, devendo promover a geração de radicais hidroxil e também consumi-los, no decorrer do processo. Baseado nisto, entende-se que a ação positiva ou negativa dependerá de fatores como a razão O_3/H_2O_2 , presença e concentração de consumidores de radicais, além da reatividade entre ozônio molecular e substrato³⁵. A razão molar O_3/H_2O_2 mais adequada tem sido demonstrado ficar na faixa 0,5-1. A concentração inicial de H_2O_2 foi de 500 mg L^{-1} , porém, nenhum estudo visando determinar a concentração de ozônio no meio reacional foi feito. Dodd et al²⁰ verificaram que a destruição de CIP durante ozonização de amostras de efluente ocorre, preferencialmente, através da reação direta do substrato com o O_3 . Considerando-se este comportamento, é coerente a queda na velocidade da reação com a adição de H_2O_2 , já que a concentração de O_3 em solução diminui em função da sua reação com H_2O_2 para iniciação de cadeias radicalares. Esta teoria é reforçada pelo maior decréscimo da DQO, uma vez que o mecanismo indireto, de uma maneira geral, deve favorecer a remoção de carbono orgânico. Entretanto, nada de conclusivo pode ser dito a respeito, sendo necessária uma investigação mais criteriosa a fim de definir o real efeito do H_2O_2 sobre o rendimento do processo. Novos experimentos de ozonização utilizando amostras de efluente em meio ácido ou de O_3/H_2O_2 , na presença de um consumidor de radicais hidroxil, podem ser úteis na definição do mecanismo preferencial de degradação de CIP.

Mais especificamente em relação à ozonização, Dodd et al.²⁰ verificaram que O_3 reage com CIP a uma taxa na faixa de 4×10^2 a $10^5 L mol^{-1} s^{-1}$, entre pH 3 e 8. Segundo os autores, esta dependência do pH é governada pela desprotonação do N(4) amina. Em pH inferior a 4, a reatividade não foi atribuída ao átomo N(4)

ou ao anel quinolínico heterocíclico, e, sim, ao nitrogênio piperazínico N(1), ou ao carbono não-substituído na posição orto do anel aromático adjacente.

De qualquer maneira, pode-se considerar que os resultados obtidos através da fotocatalise heterogênea e peroxônio apresentaram certa similaridade. No processo de fotocatalise heterogênea, a superfície do catalisador é ativada pela radiação UV e um elétron é promovido da banda de valência para a banda de condução, formando duas regiões altamente reativas e com características distintas: a lacuna eletrônica fotogerada que apresenta alto potencial de oxidação e a camada de condução, onde a presença destes elétrons excitados cria um ambiente altamente redutor. Desta maneira, água adsorvida na superfície do catalisador sofre reações de oxi-redução, podendo gerar radical hidroxil, além de uma série de outras espécies ativas. Poluentes também são adsorvidos na superfície do catalisador e estão sujeitos à ação, tanto direta, da excitação do catalisador, como indireta, da reação com os intermediários gerados. Assim, o mecanismo pelo qual a CIP reage durante o processo fotocatalítico é bastante parecido com aquele que o medicamento reage durante o processo peroxônio.

A similaridade entre os cromatogramas da análise por HPLC-FLD das amostras tomadas durante os experimentos com PAOs aplicados ao efluente faz crer que os produtos formados são, de maneira geral, similares. A Figura 22 mostra os cromatogramas obtidos através da análise por HPLC-FLD das amostras tomadas durante a ozonização do efluente do PA-HUSM e que ilustra o comportamento geral de todos os processos. Pode-se observar o aumento de um sinal referente a um composto já existente no efluente, provavelmente, algum dos metabólitos. Este sinal aumenta à medida que a CIP vai sendo destruída. A partir de certo momento, com a queda da concentração da CIP, inicia-se uma competição entre a CIP e o referido composto, pelas espécies responsáveis pela degradação dos poluentes, e a concentração de ambos passa, então, a cair.

Como pode ser visto na Figura 21, os processos de ozonização e de fotoindução demonstraram menor capacidade de redução de DQO e da absorbância integrada, uma vez que as eficiências de degradação, de uma maneira geral, foram em torno de 20% e nunca passaram de 40% (redução de

absorbância integrada durante processo fotoinduzido). Este comportamento era esperado, já que estes processos, devido à maneira seletiva com a qual atuam, não têm capacidade de remoção de carga orgânica. Já os processos peroxônio e, especialmente, fotocatalise heterogênea, apresentaram maior capacidade de remoção de DQO e de absorbância integrada, devido à capacidade dos intermediários formados de reagirem de forma indiscriminada com os constituintes do efluente.

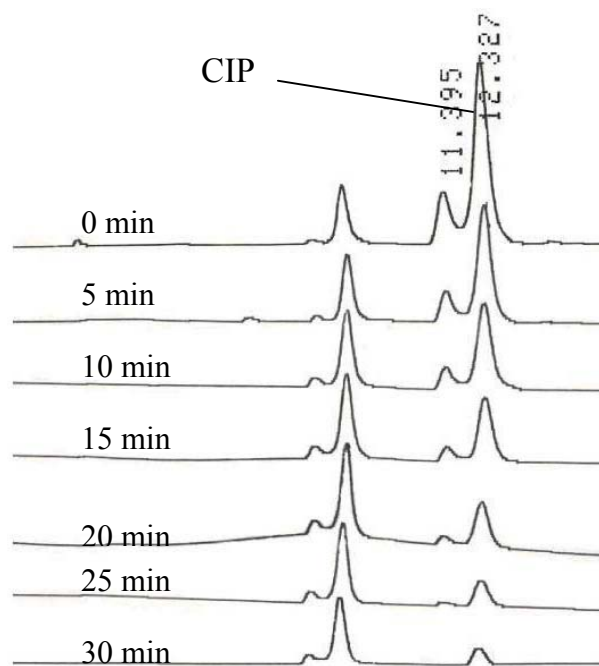


Figura 22 - Cromatogramas de soluções do efluente do PA-HUSM durante ozonização como um modelo do perfil dos metabólitos, primariamente formados, em função do tempo de tratamento com PAOs.

5. Conclusões

Os testes realizados através do sistema *Allium cepa* com o efluente do PA-HUSM evidenciaram a sua cito/genotoxicidade, inclusive, após passagem pelo sistema de fossa/filtro. Porém, apesar da comprovada genotoxicidade da CIP, nenhuma correlação pode ser feita entre a genotoxicidade do efluente e a eventual presença do fármaco.

CIP foi identificada no efluente do PA-HUSM em concentração média de $65 \pm 45 \mu\text{g L}^{-1}$ ($19-155 \mu\text{g L}^{-1}$) e $54 \pm 21 \mu\text{g L}^{-1}$ ($32-99 \mu\text{g L}^{-1}$), antes e depois do sistema de tratamento, respectivamente. O aumento ou diminuição da concentração de CIP no sistema fossa/filtro demonstrou obedecer a um equilíbrio entre a fase líquida (efluente) e a fase sólida (lodo), governado pela saturação do lodo com CIP e por concentrações do fármaco no efluente superiores a $45 \mu\text{g L}^{-1}$. Quando houve, a remoção de CIP demonstrou ser causada pela adsorção do medicamento no lodo do sistema de tratamento.

Utilizando-se três diferentes CPENO tomados da literatura, foram calculadas razões CAM/CPENO entre 4-1.980. Estes valores demonstram alto risco ambiental causado pela liberação de CIP, nas atuais condições e a necessidade de um plano de gerenciamento de risco do uso de CIP no PA-HUSM.

Os quocientes de risco encontrados no presente trabalho são 48-3300 vezes maiores que aqueles encontrados em países europeus, sendo este um indicativo de que é necessário um maior estudo de avaliação de risco ambiental causado por fármacos em países em desenvolvimento, a fim de que se tenha um panorama mais realístico da situação mundial.

A degradação fotoinduzida de CIP, em concentrações ambientais e dissolvida em solução tamponada com $\text{NH}_4\text{Cl/KOH}$ e pH 9, foi de primeira ordem, k : $1,56 (\pm 0,11) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$; $t_{1/2}$: $44 (\pm 7) \text{ s}$.

As soluções irradiadas de CIP não demonstraram aumento da pronta biodegradabilidade medida com CBT. Nenhuma diferença significativa foi observada entre a amostra sem tratamento e aquelas após processo fotoinduzido, indicando que os produtos formados não são prontamente biodegradáveis.

Porém, os resultados indicaram que estas espécies são metabólitos primários, visto que os cromatogramas demonstraram que os sinais referentes a eles desapareceram em tempos prolongados de tratamento, e que outros sinais surgiram.

A análise por LC-MS destes metabólitos sugere a possibilidade de formação de cinco diferentes compostos, já reportados na literatura, mas não nas condições utilizadas no presente trabalho (solução não tamponada e com o pH regulado a 9 com solução de KOH).

Estes compostos seriam produtos de reação de defluoração, descarboxilação, hidroxilação e rompimento da cadeia piperazínica, porém, os resultados demonstraram não haver ataque à cadeia quinolônica, responsável pela atividade biológica da CIP.

Considerando-se a fotossensibilidade da CIP, e de fluoroquinolonas em geral, as condições reacionais influenciam grandemente a reatividade. Assim, diferentes condições de pH, uso de diferentes soluções-tampão (ou a sua ausência), variadas concentrações de oxigênio, dentre outros parâmetros, devem propiciar diferentes mecanismos reacionais e, conseqüentemente, diferentes metabólitos. Desta forma, a predição do comportamento fotoquímico de fluoroquinolonas em sistemas complexos, como efluentes e águas superficiais, através de soluções preparadas em laboratório, fica bastante prejudicada.

Considerando-se a natureza estrutural dos metabólitos formados durante a fotodegradação de CIP e as rotas de sua formação, esta investigação serve como uma abordagem primária, sendo necessários novos e mais detalhados estudos.

A degradação fotoinduzida de CIP no efluente hospitalar do PA-HUSM demonstrou ser muito mais lenta do que aquela obtida em solução aquosa ($t_{1/2} =$

2,5 h). Porém, as diferenças de configuração dos sistemas utilizados impossibilitaram qualquer tipo de comparação.

De qualquer maneira, quando comparado aos outros processos utilizados na degradação de CIP no efluente, a degradação fotoinduzida foi igualmente menos efetiva em termos de degradação do fármaco-alvo: fotocátalise heterogênea, $t_{1/2} = 20$ min; ozonização, $t_{1/2} = 9$ min; peroxônio, $t_{1/2} = 15$ min.

Os melhores resultados obtidos para a ozonização na degradação de CIP demonstraram ser consequência da maior reatividade do fármaco com ozônio do que com espécies radicalares formadas durante os processos.

Porém, no que diz respeito à redução de matéria orgânica (DQO e absorvância integrada), os processos com maior capacidade de geração de radicais hidroxil (peroxônio e de fotocátalise heterogênea) foram mais efetivos do que aqueles com menor capacidade (fotoinduzido e ozonização).

A similaridade entre os cromatogramas dos diferentes processos foi um indicativo de que os produtos formados são bastante similares.

6. Sugestões para trabalhos futuros

- Estudo das CAMs de CIP no lodo da fossa séptica e no corpo receptor do efluente do PA-HUSM em pontos mais avançados (água e sedimento) a fim de avaliar os riscos ambientais da CIP ;
- Estudo de correlação da toxicidade com a concentração de CIP no efluente e no curso d'água receptor;
- Avaliação da pronta biodegradabilidade de amostras de CIP irradiadas em tempos mais longos dos que os estudados no presente trabalho, além de estudos de biodegradabilidade utilizando densidades bacterianas mais elevadas;
- Realização da mesma avaliação citada acima, porém, com diferentes PAOs;
- Avaliação da toxicidade de subprodutos de degradação da CIP através de PAOs.

7. Referências Bibliográficas

1. Al-Ahmad, A., Daschner, F.D., Kümmerer, K. (1999) Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, penicillin G, and sulfamethoxazole and inhibition of waste water bacteria. *Arch Environ Contam Toxicol* 37, 158-163.
2. Albin, A., Monti, S. (2003) Photophysics and photochemistry of fluoroquinolones. *Chem Soc Rev* 32, 238-250.
3. Alexy, R., Kümpel, T., Kümmerer, K. (2004) Assessment of degradation of 18 antibiotics in the Closed Bottle Test. *Chemosphere* 57, 505-512.
4. Andreozzi, R., Raffaele, M., Nicklas, P. (2003) Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* 50, 1319-1330.
5. APHA-AWWA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed., *American Public Health Association*, 1995.
6. Balcioglu, I.A., Ötker, M. (2003) Treatment of pharmaceutical wastewater containing antibiotics by O₃ and O₃/H₂O₂ processes. *Chemosphere* 50, 85-95.
7. Batt, A.L., Aga, D.S. (2005) Simultaneous analysis of multiple classes of antibiotics by ion trap LC/MS/MS for assessing surface water and groundwater contamination. *Anal Chem* 77, 2940-2947.
8. Bauernfeind, A., Petermüller, C. (1983) In vitro activity of ciprofloxacin, norfloxacin and nalidixic acid. *Eur J Clin Microbiol* 2, 111-115.
9. Bazin, M., Bosca, F., Marin, M.L., Miranda, M.A., Patterson, L.K., Santus, R. (2000) A laser flash photolysis and pulse radiolysis study of primary photochemical processes of flumequine. *Photochem Photobiol* 72, 451-457.
10. Bila, D.M., Dezotti, M. (2003) Fármacos no meio ambiente. *Quim Nova* 26, 523-530.
11. Borner, K., Lode, H. & Höffken, G. (1986) Renal elimination of sulfociprofloxacin, a new metabolite of ciprofloxacin. *Eur J Clin Microbiol* 5, 476.

12. Burhenne, J., Ludwig, M., Nikoloudis, P., Spiteller, M. (1997) Photolytic degradation of fluorquinolone carboxylic acids in aqueous solution. Part I: Primary photoproducts and half-lives. *Environ Sci & Pollut Res* 4(1), 10-15.
13. Burhenne, J., Ludwig, M., Spiteller, M. (1997) Photolytic degradation of fluorquinolone carboxylic acids in aqueous solution. Part II: Isolation and structural elucidation of polar photometabolites: Primary photoproducts and half-lives. *Environ Sci & Pollut Res* 4(2), 61-67.
14. Burhenne, J., Ludwig, M., Spiteller, M. (1999) Polar photodegradation products of quinolones determined by HPLC/MS/MS. *Chemosphere* 38(6), 1279-1286.
15. Cabrera, G.L., Rodriguez, D.M.G. (1999) Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. *Mutat Res* 426, 211-214.
16. Cardoza, L.A., Knapp, C.W., Larive, C.K., Belden, J.B., Lydy, M., Graham, D.W. (2005) Factors affecting the fate of Ciprofloxacin in aquatic field systems. *Water Air Soil Pollut* 161, 383-398.
17. Castiglioni, S., Bagnati, R., Calamari, D., Fanelli, R., Zuccato, E. (2005) A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewater. *J Chromatogr A* 1092, 206-215.
18. Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R., Pomati, F., Calamari, D., Zuccato, E. (2006) Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. *Environ Sci Technol* 40, 357-363.
19. Chin, N., Neu, H.C. (1984) Ciprofloxacin, a quinoline carboxylic acid compound active against aerobic and anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 25, 319-326.
20. Dodd, M.C., Buffle, M-O., Gunten, U.V. 2006 Oxidation of antibacterial molecules by aqueous ozone: moiety-specific reaction kinetics and application to ozone-based wastewater treatment. *Environ Sci Technol* 40, 1969-1977.

21. Editorial (2000) Drugs in the environment. *Chemosphere* 40, 691-699.
22. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA). Draft Discussion Paper on Environmental Risk Assessment of Non-genetically Modified Organism (non-GMO) Containing Medicinal Products for Human Use; London, 2001 **In** Golet, E.M., Alder, A.C., Giger, W. (2002) Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley watershed, Switzerland. *Environ Sci Technol* 36(17), 3645-3651.
23. European Commission. Directive 67/455/EEC on the Classification, Packaging and Labelling of Dangerous Substances, 1999 **In** Golet, E.M., Alder, A.C., Giger, W. (2002b) Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents *in* wastewater and river water of the Glatt Valley watershed, Switzerland. *Environ Sci Technol* 36(17), 3645-3651.
24. European Commission. Technical Guidance Document in Support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for New Notified Substances and Commission Regulation (EC) No1488/94 on Risk Assessment for Existing Substances Part II; 1996 **In** Golet, E.M., Alder, A.C., Giger, W. (2002) Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley watershed, Switzerland. *Environ Sci Technol* 36(17), 3645-3651.
25. Fasani, E., Barberis Negra, F.F., Mella, M., Monti, S., Albin, A. (1999) Photoinduced C-F Bond Cleavage in Some Fluorinated 7-Amino-4-quinolone-3-carboxylic Acids. *J Org Chem* 64, 5388-5395.
26. Fass, R.J. (1983) In vitro activity of ciprofloxacin (Bay 09867). *Antimicrob Agents Chemother* 24, 568-574.
27. Fiskejö, G. (1993) The *Allium* test in wastewater monitoring. *Environ Toxicol Water Qual* 8, 291-298.
28. Flamm, D.T. (1977) Analysis of ozone at low concentrations with boric acid buffered KI. *Environ Sci Technol* 11, 978-983.

29. Gadano., A, Gurni, A, López, P., Ferraro, G., Carballo, M. (2002) In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides*. *L. J Ethnopharmacol* 81, 11-16.
30. Gagliano, G.G., McNamara, F.T., Environmental assessment for Enrofloxacin BAYTRIL® 3,23% Concentrate antimicrobial solution. Guideline 21 CFR Part 25, Bayer Report No.: 106563, Bayer Study N° CN082401, 77.
31. Golet, E.M., Alder, A.C., Giger, W. (2002) Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley watershed, Switzerland. *Environ Sci Technol* 36(17), 3645-3651.
32. Golet, E.M., Alder, A.C., Hartmann, A., Ternes, T.A., Giger, W. (2001) Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Chem* 73, 3632-3638.
33. Golet, E.M., Strehler, A., Alder, A.C., Giger, W. (2002) Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction. *Anal Chem* 74, 5455-5462.
34. Golet, E.M., Xifra, I., Siegrist, H., Alder, A.C., Giger, W. (2003) Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. *Environ Sci Technol* 37(15), 3243-3249.
35. Gottschalk, C., Libra, J.A., Saupe, A. (2000) Ozonation of water and wastewater. 1° ed. Wiley, Germany, p149.
36. Guerra, M., Lopes, M.J.S. (2002) Como observar cromossomos - Um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. 1°. Ed. FUNPEC, Ribeirão Preto, p131.
37. Halling-Sørensen, B., Lützhof, H.C.H., Andersen, H.R., Ingerslev, F. (2000) Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and Ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother* 46, 53-58.

38. Halling-Sørensen, B., Nielsen, S.N., Lansky, P.F., Ingerslev, F., Lützhøft, H.C.H., Jørgensen, S.E. (1998) Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - a review. *Chemosphere* 36(2), 357-393.
39. Hari, A.C., Paruchuri, R.A., Sabatini, D.A., Kibbey T.C. 2005 Effects of pH and cationic and nonionic surfactants on the adsorption of pharmaceuticals to a natural aquifer material. *Environ Sci Technol* 39, 2592-2598.
40. Hartmann, A, Alder, A.C., Koller, T., Widmer, R.M. (1998) Identification of fluorquinolona antibiotics as the main source of *umuC* genotoxicity in native hospital wastewater. *Environ Toxic Chem* 17(3), 377-382.
41. Hartmann, A, Golet, E.M., Alder, A.C., Koller, T., Widmer, R.M. (1999) Primary DNA but not mutagenicity correlated with ciprofloxacin concentrations in Germany hospital wastewater. *Arch Environ Contam Toxicol* 36, 115-119.
42. Heberer, T. (2002) Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol Lett* 131, 5-17.
43. Holten Lützhøft, H-C., Vaes, W.H.J., Freidig, A.P., Halling-Sørensen, B., Hermens, J.L.M. (2000) Influence of pH and Other Modifying Factors on the Distribution Behavior of 4-Quinolones to Solid Phases and Humic Acids Studied by "Negligible-Depletion" SPME-HPLC. *Environ Sci Technol* 34, 4989-4994.
44. Huber, M.M., Canonica, S., Park, G.-Y., Von Gunten, U. (2003) Oxidation of Pharmaceuticals during ozonation and advanced oxidation processes. *Environ Sci Technol* 37, 1016-1024.
45. Huber, M.M., Göbel, A., Joss, A., Hermann, N., Löffler, D., Mc Ardell, C.S., Ried, A., Siegrist, H., Ternes, T.A., Von Gunten, U. (2005) Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewater effluents: A pilot study. *Environ Sci Technol* 39, 4290-4299.

46. Huber, M.M., Ternes, T.A., Von Gunten, U. (2004) Removal of estrogenic activity and formation of oxidation products during ozonation of 17 α -ethinylestradiol. *Environ Sci Technol* 38, 5177-5186.
47. Jarnheimer, P-Å., Ottoson, J., Linderg, R., Stenström, T-A., Johansson, M., Tysklind, M., Winner, M-M., Olsen, B. (2004) Fluoroquinolone antibiotics in a hospital sewage line; occurrence, distribution and impact on bacterial resistance. *Scand J Infect Dis* (36) 752-755.
48. Joss, A., Keller, E., Alder, A.C., Göbel, A., McArdell, C.S., Ternes, T., Siegrist, H. (2005) Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water Res* 39, 3139-3152.
49. Karthikeyan, K.G., Meyer, M.T. (2006) Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. *Sci Total Environ* 361, 196-207.
50. Katzung, B.G. (1995) Farmacologia básica e clínica. Guanabara Koogan, 6^o Ed. Rio de Janeiro, p516.
51. Katzung, B.G. (1995) Farmacologia básica e clínica. Guanabara Koogan, 6^o Ed. Rio de Janeiro, p565.
52. Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T. (2002) Pharmaceuticals, hormones, and other organics wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ Sci Technol* 36, 1202-1211.
53. Kolpin, D.W., Skopec, M., Meyer, M.T., Furlong, E.T., Zaugg, S.D. (2004) Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. *Sci Tot Environ* 328, 119-130.
54. Kümmerer, K. (2001) Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostics aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - a review. *Chemosphere* 45, 957-969.
55. Kümmerer, K. (2001) Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and Risks, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1^o ed., Germany, p 5.

56. Kümmerer, K. (2003) Significance of antibiotics in the environment *J Antimicrob Chemother* 52, 5-7.
57. Kümmerer, K. (2004) Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and Risks, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2° ed., Germany.
58. Kümmerer, K. (2004) Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and Risks, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2° ed., Germany, 223-230.
59. Kümmerer, K., Al-Ahmad, A., Mersch-Sundermann, V. (2000) Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere* 40, 701-710.
60. Kümmerer, K., Al-Ahmad, A., Steger-Hartmann, T. (1996) Epirubicin hydrochloride in the aquatic environment: biodegradation and bacterial toxicity. *Umweltmed Forsch Prax* 1, 133-137.
61. Lam, M.W., Young, C.J., Mabury, S.A. (2005) Aqueous photochemical reaction kinetics and transformations of fluoxetine. *Environ Sci Technol* 39, 513-522.
62. Lindberg, R.H, Olofsson, U., Rendahl, P., Johansson, M.I., Tysklind, M., Andersson, B.A.V. (2006) Behavior of Fluoroquinolones and Thrimethoprim during mechanical, chemical, and active sludge treatment of sewage water and digestion of sludge. *Environ Sci Technol* 40, 1042-1048.
63. Lindberg, R.H., Jarnheimer, P-A., Olsen, B., Johansson, M.I., Tysklind, M. (2004) Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. *Chemosphere* 57, 1479-1488.
64. Lindberg, R.H., Wennberg, P., Johansson, M.I., Tysklind, M., Andersson, B.A.V. (2005) Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flow in five sewage treatment plants in Sweden. *Environ Sci Technol* 39, 3421-3429.
65. Lopez, A., Bozzi, A., Mascolo, M., Kiwi, J. (2003) Kinetic investigation on UV and UV/H₂O₂ degradations of pharmaceutical intermediates in aqueous solution. *J Photochem Photobiol A: Chem* 156, 121-126.

66. Machado, E.L., Martins, A.F. (2004) Ozonização no pré-tratamento de efluentes da produção do herbicida trifluralina. *Engen Sanit Ambient* 9, 117-123.
67. Martins, A.F. (1998) Advanced oxidation processes applied to effluent streams and agrochemical industry. *Pure Appl Chem* 70, 2271-2279.
68. Martins, A.F., Henriques, D.M., Wilde, M.L., Vasconcelos, T.G. (2006) Advanced Oxidation Processes in the treatment of trifluraline effluent. *J Environ Sci Health B* 41, 245-252.
69. Martins, A.F., Vasconcelos, T.G., Wilde, M.L. (2005) Influence of variables of the combined coagulation-Fenton-sedimentation process in the treatment of trifluraline effluent. *J Hazard Mater* 127, 111-119.
70. Martins, A.F., Wilde, M.L., da Silveira, C. (2006) Photocatalytic Degradation of Brilliant Red Dye and Textile Wastewater. *J Environ Sci Health A* 41, 1-11.
71. Martins, A.F., Wilde, M.L., Vasconcelos, T.G., Henriques, D.M. (2006) Nonylphenol polyethoxylate degradation by means of electrocoagulation and electrochemical Fenton. *Sep Purif Technol* 50, 249-255.
72. Mcardell, C.S., Molnar, E., Suter, M.J.-F., Giger, W. (2003) Occurrence and Fate of Macrolide Antibiotics in wastewater treatment plants and in the Glatt Valley watershed, Switzerland. *Environ Sci Technol* 37, 5479-5486.
73. McDowell, D.C., Huber, M.M., Wagner, M., Von Gunten, U., Ternes, T.A. (2005) Ozonation of carbamazepine in drinking water: Identification and kinetic study of major oxidation products. *Environ Sci Technol* 39, 8014-8022.
74. Mella, M., Fasani, E., Albini, A. (2001) Photochemistry of 1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(piperazin-1-yl)quinoline-3-carboxylic acid (= ciprofloxacin) in aqueous solution. *Helv Chim Acta* 84, 2508-2519.
75. Miao, X-S., Bishay, S.F., Chen, M., Metcalfe, C.D. (2004) Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada. *Environ Sci Technol* 38, 3533-3541.

76. Monti, S., Sortino, S., Fasani, E., Albini, A. (2001) Multifaceted photoreactivity of 6-fluoro-7-aminoquinolones from the lowest excited states in aqueous media: a study by nanosecond and picosecond spectroscopic techniques. *Chem Eur J* 7, 2185-2196.
77. Norpoth, K., Nehr Korn, A., Kirchner, M., Holsen, H., Teipel, H. (1973) Investigations on the problem of solubility and stability of steroid ovulation inhibitors in water, wastewater and activated sludge. *Zbl Hyg I Abt Orig B* 156, 500-511.
78. Nowara, A., Burhenne, J., Spiteller, M. (1997) Binding of fluoroquinolone carboxylic acid derivatives to clay minerals. *J Agric Food Chem* 45, 1459-1463.
79. Nyholm, N., (1991) The European system of standardized legal tests for assessing the biodegradability of chemicals. *Environ Toxicol Chem* 10, 1237-1246.
80. OECD, 1992. Guidelines for testing of chemicals. 301D Closed Bottle Test Adopted by the Council on 17 July 1992. Paris.
81. Oppenländer, T. (2003) Photochemical purification of water and air. 1° ed. Wiley, Germany, 172-177.
82. Oppenländer, T. (2003) Photochemical purification of water and air. 1° ed. Wiley, Germany, p 242.
83. Parry, M.F., Smego, D.A., Digiovanni, M.A. (1988) Hepatobiliary kinetics and excretion of ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 32, 982-985.
84. Phillips, G., Johnson, B.E., Ferguson, J. (1990) The loss of antibiotic activity of ciprofloxacin by photodegradation, *J Antimicrob Chemother* 26, 783-789.
85. Renew, J.E., Huang, C-H. (2004) Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1042, 113–121.
86. Schmitt-Kopplin, Ph., Burhenne, J., Freitag, D., Spiteller, M., Kettrup, A. (1999) Development of capillary electrophoresis methods for the analysis of

- fluoroquinolones and application to the study of the influence of humic substances on their photodegradation in aqueous phase. *J Chromatogr A* 837, 253-265.
87. Shen, L.L., Mitscher, L.A., Sharma, P.N., O'Donnell, T.J., Chu, D.W.T., Cooper, C.S., Rosen, T., Pernet, A.G. (1989) Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: a cooperative drug-DNA binding model. *Biochemistry* 28, 3886-3894 **In** Supporting Information for the *Environmental Science and Technology* article: Dodd, M.C., Buffle, M-O, Gunten U.V. 2006 Oxidation of antibacterial molecules by aqueous ozone: moiety-specific reaction kinetics and application to ozone-based wastewater treatment. *Environ Sci Technol* 40, 1969-1977.
88. Silva, J., Erdtmann, B., Henriques, J.A.P. (2003) *Genética Toxicológica*. Porto Alegre, ed. Alcance, 70-74.
89. Sun, J., Sakai, S., Tauchi, Y., Deguchi, Y., Chen, J., Zhang, R., Morimoto, K. (2002) Determination of lipophilicity of two quinolone antibacterials, ciprofloxacin and grepafloxacin, in the protonation equilibrium. *Eur J Pharm Biopharm* 54, 51-58.
90. Supporting Information for the *Environmental Science and Technology* article: Dodd, M.C., Buffle, M-O, Gunten U.V. 2006 Oxidation of antibacterial molecules by aqueous ozone: moiety-specific reaction kinetics and application to ozone-based wastewater treatment. *Environ Sci Technol* 40, 1969-1977.
91. Tabak, H.H., Bunch, R.L. (1970) Steroid hormones as water pollutants. **In** *Developments in Industrial Biology*. Washington, p367-376.
92. Tolls J. (2001) Sorption of veterinary pharmaceuticals in soil: a review. *Environ Sci Technol* 35, 3397-3406.
93. Tornaiainen, K., Askolin, C-P., Mattinen, J. (1997) Isolation and structure elucidation of an intermediate in the photodegradation of ciprofloxacin. *J Pharm Anal* 16, 439-445.

94. Tornainen, K., Mäiki, E. (1995) Development of an isocratic high-performance liquid chromatographic method for monitoring of ciprofloxacin photodegradation. *J Chromatogr A* (697) 397-405.
95. Tornainen, K., Mattinen, J., Askolin, C-P., Tammilehto, S. (1997) Structure elucidation of a photodegradation product of ciprofloxacin. *J Pharm Biom Anal* 15, 887-894.
96. Tornainen, K., Tammilehto, S., Ulvi, V. (1996) The effect of pH, buffer type and drug concentration on the photodegradation of ciprofloxacin. *Int J Pharm* 132, 53-61.
97. Tove A. Larsen, Judit Lienert, Adriano Joss, Hansruedi Siegrist (2004) How to avoid pharmaceuticals in the aquatic environment. *J Biotechnol* 113, 295-304.
98. Turiel, E., Martín-Steban, A., Bordin, G., Rodriguez, A.R. (2004) Stability of fluoroquinolone antibiotics in river water samples and octadecyl silica solid-phase extraction cartridges. *Anal Bioanal Chem* 380, 123-128.
99. Valadas E. (2003) Consequência do uso e abuso de antibióticos e de desinfetantes na cadeia alimentar e no meio ambiente. *VI Jornadas de Doenças Infecciosas na Clínica Geral (1.ª Parte)* 8(5): 289-290.
100. Van Caekenberghe, D.L., Pattyn, S.R. (1984) In vitro activity of ciprofloxacin compared with those of other new fluorinated piperazinyl-substituted quinoline derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* 25, 518-521.
101. Vermeersch, G., Ronfard-Haret, J.C., Bazin, M., Carillet, V., Morliere, P., Santus, R. (1991) Type I and type II photosensitization by the antibacterial drug nalidixic acid. A laser flash photolysis study. *Photochem Photobiol* 54, 661-666 *In* Albini, A., Monti, S. (2003) Photophysics and photochemistry of fluoroquinolones. *Chem Soc Rev* 32, 238-250.
102. Vogna, D., Marotta, R., Napolitano, A., Andreozzi, R., d'Ischia, M. (2004) Advanced oxidation of the pharmaceutical drug diclofenac with UV/H₂O₂ and ozone. *Water Res* 38, 414-422.
103. Wise, R. (2002) Antimicrobial resistance: priority for action. *J Antimicrob Chemother* 49 585-586.

104. Wise, R., Andrews, J.M., Edwards, L.J. (1983) In vitro activity of Bay 09867, a new quinolone derivative, compared with those of other antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 23, 559-564.
105. Wise, R., Donovan, I.A. (1987) Tissue penetration and metabolism of ciprofloxacin. *Am J Med* 82, 103-107.
106. Zeiler, H-J., Petersen, U., Gau, W., Ploschke, H.J, (1987) Antibacterial activity of the metabolites of ciprofloxacin and its significance in the bioassay. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 37(2) 131-134.