



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

**ANTIBIÓTICOS MACROLÍDEOS: DETERMINAÇÃO
E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS E
SUBPRODUTOS DE DEGRADAÇÃO EM EFLUENTE
HOSPITALAR**

TESE DE DOUTORADO

LUCIANE MINETTO

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

**ANTIBIÓTICOS MACROLÍDEOS: DETERMINAÇÃO E
IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS E SUBPRODUTOS DE
DEGRADAÇÃO EM EFLUENTE HOSPITALAR**

Luciane Minetto

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do 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
Doutor em Química.

Orientador: Prof. Emérito Tit. Dr. Ayrton Figueiredo Martins

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**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

**ANTIBIÓTICOS MACROLÍDEOS: DETERMINAÇÃO E
IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS E SUBPRODUTOS DE
DEGRADAÇÃO EM EFLUENTE HOSPITALAR**

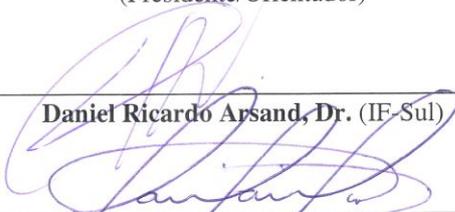
elaborada por
Luciane Minetto

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Química

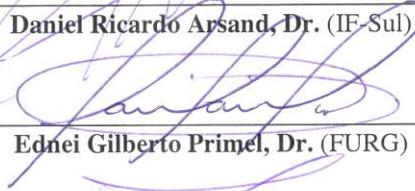
COMISSÃO EXAMINADORA:



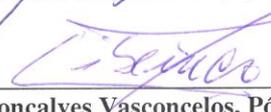
Prof. Emérito Tit. Dr. Ayrton Figueiredo Martins
(Presidente/Orientador)



Daniel Ricardo Arsand, Dr. (IF-Sul)



Ednei Gilberto Primel, Dr. (FURG)



Tibiriçá Gonçalves Vasconcelos, Pós-doutor (SAMITEC)



Manoel Leonardo Martins, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 09 de Agosto de 2013.

Porque ter a mente boa não é o bastante; o principal é aplicá-la bem. As maiores almas são capazes tanto das maiores virtudes quanto dos maiores vícios e aqueles que marcham lentamente podem avançar muito mais, se seguirem o caminho certo, do que os que correm, porém dele se afastam...

Descartes

Dedico esta aos meus queridos pais, Celestino e Soeli, meus irmãos Lucilene (*in memoriam*) e Laércio, e a minha linda sobrinha Eduarda.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Ayrton pela oportunidade, orientação e por proporcionar meu crescimento profissional e intelectual.

Ao Prof. Mallmann pela oportunidade, confiança e compreensão para a realização deste trabalho.

Ao Lamic pelo apoio financeiro para a realização desta tese.

A banca de qualificação pelas correções e sugestões.

A banca de defesa pelas correções e sugestões.

Aos secretários Ademir e Valéria pela disposição sempre que precisei.

Aos meus colegas e amigos do Lamic pelo companheirismo, estímulo e apoio durante a realização desta tese, principalmente ao Maurício, Fernanda e Fabi pelas longas conversas, ensinamentos e ajuda.

A Marilía e a Andressa pela amizade, incentivo e por sempre conseguirem uma forma de me fazer sorrir.

À minha amiga Carol pelo incentivo, apoio e amizade.

Ao meu amigo Tiba pelo incentivo, apoio, ajuda nas correções e principalmente pela amizade em todos os momentos.

Aos colegas do Later pelo apoio.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, meu irmão e minha sobrinha pelo amor, compreensão, carinho e apoio nas minhas decisões.

À minha irmã que tão cedo partiu de minha vida, mas deixou em meu coração e em minha memória o amor e o incentivo de sempre seguir adiante para realizar os meus sonhos.

E a Deus por ter me dado coragem e força para superar os tropeços da vida e não ter desistido do meu caminho.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

ANTIBIÓTICOS MACROLÍDEOS: DETERMINAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS E SUBPRODUTOS DE DEGRADAÇÃO EM EFLUENTE HOSPITALAR

AUTOR: LUCIANE MINETTO

ORIENTADOR: PROF. EMÉRITO TIT.DR. AYRTON FIGUEIREDO MARTINS

DATA E LOCAL DA DEFESA: SANTA MARIA, 9 DE AGOSTO DE 2013.

Os antibióticos macrolídeos são uma importante classe de fármacos prescritos no tratamento das mais variadas infecções, e como consequência se seu grande e contínuo uso são comumente encontradas no ambiente.

No presente estudo foi desenvolvido e otimizado método de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detector de massas quadrupolo íon trap (HPLC-MS/MS_QTrap) e de *clean-up*/pré-concentração por extração em fase sólida com auxílio de Metodologia de Superfície de Resposta para avaliar a ocorrência dos antibióticos macrolídeos Azitromicina, Claritromicina, Eritromicina e Roxitromicina no efluente hospitalar do Hospital Universitário de Santa Maria em dois pontos de amostragem. As concentrações médias durante o ciclo de uma semana de amostragem no efluente do pronto atendimento foram de $1,32 \pm 0,13$ e $0,22 \pm 0,06 \mu\text{g L}^{-1}$ para Azitromicina e Claritromicina; no corpo receptor foram de $1,12 \pm 0,20$; $0,20 \pm 0,05$ e $0,01 \pm 0,004 \mu\text{g L}^{-1}$ para Azitromicina, Claritromicina e Eritromicina, respectivamente. Roxitromicina não foi detectada. Após foi feita a avaliação do quociente de risco dos antibióticos macrolídeos. O quociente de risco no efluente do pronto atendimento para Azitromicina e Claritromicina foi de 11, risco alto, o qual também foi evidenciado no corpo receptor com quociente de risco de 9,3 e 10 para Azitromicina e Claritromicina, e risco médio para Eritromicina de 0,5.

Para degradação dos antibióticos foi utilizado fotólise artificial em solução aquosa, sendo avaliado a influência do pH de 3-11 na degradação destes compostos. Azitromicina apresentou baixa degradação em pH ácido, para os outros pH e demais compostos a degradação foi acima de 70% após 60 min de tratamento. Foi feito um estudo cinético do processo de degradação dos antibióticos macrolídeos em diferentes pH, observando-se que a Azitromicina apresentou um perfil recalcitrante para o processo, e Roxitromicina foi degradada com maior facilidade.

Para a identificação dos produtos formados durante os experimentos de fotodegradação foram montados experimentos de informação independente de aquisição utilizando como íons precursores os íons de *m/z* 116 e 158 característicos dos compostos macrolídeos em três energias de colisão (30, 45 e 60 V). Foram identificadas e propostas rotas de fragmentação para 8 produtos de degradação de Azitromicina, 7 para Claritromicina, 6 para Eritromicina e 8 produtos de degradação de Roxitromicina. Através dos mesmos experimentos de informação independente de aquisição, foi investigada a presença de possíveis metabólitos no efluente hospitalar sendo encontrados 3 metabólitos.

Com a aplicação de fotólise ao efluente hospitalar fortificado, em pH 7, observou-se que ocorre degradação acima de 80% para todos os compostos após 60 min de tratamento. Foi observada a formação de produtos de degradação, que tinham sido previamente determinados em solução aquosa. Foram encontrados 3 produtos de degradação de Azitromicina, 2 para Claritromicina, 1 para Eritromicina e 3 produtos para Roxitromicina.

Palavras-Chave: Antibióticos Macrolídeos, Efluente Hospitalar, Fotodegradação, Produtos de Degradação, Metabólitos.

ABSTRACT

Ph.D. Thesis
Chemistry Post-Graduation Program
Federal University of Santa Maria

MACROLIDES ANTIBIOTICS: DETERMINATION AND IDENTIFICATION OF METABOLITES AND DEGRADATION SUBPRODUCTS IN HOSPITAL EFFLUENT

AUTHOR: LUCIANE MINETTO
ADVISER: PROF. EMERITUS TIT.DR. AYRTON FIGUEIREDO MARTINS
SANTA MARIA, AUGUST 09, 2013

Macrolide antibiotics are an important group of prescription drugs; as a consequence of the large and continuous use, they are commonly found in the environment.

In the present study, it was developed and optimized a chromatographic method to assess the occurrence of macrolide antibiotics Azithromycin, Clarithromycin, Erythromycin and Roxithromycin in the effluent of the University Hospital of Santa Maria, in two sampling points, by applying high performance liquid chromatography coupled to mass detection with quadrupole ion trap (HPLC-MS/MS_QTrap) and clean-up/pre-concentration by solid phase extraction with the aid of Surface Methodology Response. The concentrations measured during a week in the hospital effluent were 1.32 ± 0.13 and $0.22 \pm 0.06 \mu\text{g L}^{-1}$ for Azithromycin and Clarithromycin; in the receptor water stream was 1.12 ± 0.20 , 0.20 ± 0.05 and $0.01 \pm 0.004 \mu\text{g L}^{-1}$ for Azithromycin, Clarithromycin and Erythromycin. Roxithromycin was not detected in all effluent samples. After this, it was done the evaluation of the risk quotient of the macrolide antibiotics. The value of the risk quotient for the hospital effluent for Azithromycin and Clarithromycin was 11 (high risk), and for the receptor water stream the risk quotient was 9.3 and 10.0 for Azithromycin and Clarithromycin; for Erythromycin, a quotient risk value of 0.5 (medium risk).

For degradation of the antibiotics in aqueous solution, it was used UV-photolysis, by which the influence of pH (3-11) was evaluated. Azithromycin showed low degradation by acid pH; for other pH, as well, for all the other antibiotics, the degradation was above 70% after 60 min of treatment. It was conducted a kinetic study of the degradation process of macrolide antibiotics in different pHs, by which Azithromycin revealed a recalcitrant profile, and Roxithromycin, as the more easily degradable one.

For identification of the products formed during the photolysis experiments it was used independent information acquisition and as precursor ions of fragments m/z 116 and 158, characteristic of the macrolide compounds, at three collision energies (30, 45, and 60 V). It was proposed fragmentation routes of the degradation products: 8 products for Azithromycin, 7 for Clarithromycin, 6 of Erythromycin and 8 Roxithromycin. Through the same experiments with independent information acquisition, it was investigated the presence of eventual metabolites in hospital effluent, and three metabolites were found.

By applying photolysis to the hospital effluent fortified, at pH 7, it was observed that the degradation occurs above 80% for all compounds after 60 min of irradiation. It was observed the formation of degradation products previously determined by experiments in aqueous solution. It was also found three degradation products for Azithromycin, 2 for Clarithromycin, 1 for Erythromycin and 3 for Roxithromycin.

Keywords: Macrolide Antibiotics, Effluent Hospital, Photodegradation, Degradation products, Metabolites.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XVII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Fármacos no meio ambiente.....	4
2.2. Antibióticos	5
2.3. Macrolídeos	6
2.3.1. Eritromicina.....	8
2.3.2. Azitromicina.....	10
2.3.3. Claritromicina.....	11
2.3.4. Roxitromicina.....	12
2.4. Ocorrência, destino, efeitos e riscos de macrolídeos no meio ambiente	13
2.5. Processos Avançados de Oxidação (PAOs)	14
2.5.1. Fotólise	16
2.5.1.1. Fotólise direta	16
2.5.1.2. Fotólise Indireta.....	17
2.6. Efluente Hospitalar	17
2.7. Risco potencial de substâncias ativas no ambiente	21
2.8. Método de análise.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Materiais	27
3.2. Reagentes e soluções	27
3.3. Estabilidade dos macrolídeos	27
3.4. Coleta das amostras de efluente hospitalar.....	28
3.5. Planejamento fatorial das condições de pré-concentração.	30
3.6. <i>Clean-up</i> e pré-concentração	31
3.7. Otimização do sistema cromatográfico	32
3.8. Determinação cromatográfica dos macrolídeos, identificação de metabólitos e produtos de transformação por LC-ESI-MS/MS.....	33
3.9. Validação do método	34

3.10. Avaliação de risco preliminar da exposição de antibióticos macrolídeos no meio ambiente	35
3.11. Degradação por fotólise.....	36
3.12. Cinética de degradação.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1. Desenvolvimento do método por LC-MS/MS.....	39
4.2. Estabilidade dos antibióticos macrolídeos.....	43
4.3. Extração em fase sólida	45
4.4. Validação método	51
4.4.1. Seletividade	51
4.4.2. Curva analítica e linearidade	53
4.4.3. Efeito de matriz	53
4.4.4. Determinação do LOD e LOQ.....	54
4.4.5. Recuperação/exatidão.....	54
4.4.6. Repetitividade e precisão intermediária	55
4.5. Exposição ambiental e avaliação de risco de antibióticos macrolídeos	56
4.6. Identificação de metabólitos.....	62
4.7. Experimento de fotólise em solução aquosa.....	65
4.7.1. Cinética de degradação.....	65
4.8. Experimento de fotólise em efluente hospitalar	69
4.9. Produtos de degradação	70
4.9.1. Produtos de degradação propostos para AZI em solução aquosa.....	70
4.9.2. Produtos de degradação da AZI em efluente hospitalar	83
4.9.3. Produtos de degradação propostos para ERI solução aquosa.....	85
4.9.4. Produtos de degradação da ERI em efluente hospitalar	93
4.9.5. Produtos de degradação propostos para CLARI em solução aquosa	94
4.9.6. Produtos de degradação da CLARI em efluente hospitalar.....	103
4.9.7. Produtos de degradação propostos para ROXI em solução aquosa.....	104
4.9.8. Produtos de degradação da ROXI em efluente hospitalar.....	113
4.10. Investigação de produtos de degradação no efluente hospitalar.....	115
5. CONCLUSÕES.....	116
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	117
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades dos antibióticos macrolídeos estudados.	7
Tabela 2. Potenciais de redução padrão em solução aquosa de alguns agentes oxidantes (Weast et al., 1985).	15
Tabela 3. Parâmetros físico-químicos médios do efluente lançado no PA do HUSM.	19
Tabela 4. Concentrações médias de fármacos e produtos de cuidado pessoal medidos no efluente do HUSM analisados pelo LATER entre 2006 à 2012.	20
Tabela 5. Gradiente da fase móvel utilizadas.	33
Tabela 6. Parâmetros do espectrômetro de massas otimizados referentes aos analitos AZI, CLARI, ERI e ROXI.	39
Tabela 7. Parâmetros da fonte de ionização.	40
Tabela 8. Planejamento experimental para a otimização das variáveis de extração em fase sólida por metodologia de superfícies de resposta (RSM) para os antibióticos macrolídeos estudados e as respectivas respostas.	46
Tabela 9. Coeficientes de determinação (r^2) das curvas analíticas (solvente e matriz) dos antibióticos.	53
Tabela 10. Limites de detecção e quantificação.	54
Tabela 11. Porcentagem de recuperação e RSD para a repetitividade do método de extração de efluente hospitalar.	55
Tabela 12. Porcentagem de recuperação e RSD para precisão intermediária do método de extração de efluente hospitalar.	56
Tabela 13. Concentração medida em $\mu\text{g L}^{-1}$ no ponto de coleta A.	57
Tabela 14. Concentração medida em $\mu\text{g L}^{-1}$ no ponto de coleta B.	58
Tabela 15. Concentração medida em $\mu\text{g L}^{-1}$ nos pontos de coleta A e B no período de 24 horas.	59
Tabela 16. Concentração ambiental predita (PEC) e o quociente de risco (QR) dos antibióticos macrolídeos.	60
Tabela 17. Concentração ambiental medida (MEC) e o quociente de risco (QR) dos antibióticos macrolídeos.	61
Tabela 18. Porcentagem de degradação dos macrolídeos após 60 min de tratamento.	65
Tabela 19. Constante cinética de primeira ordem (k), $t_{1/2}$, e ajuste do modelo da degradação de macrolídeos por fotodegradação.	68
Tabela 20. Produtos de degradação identificados por LC-MS/MS para AZI.	72

Tabela 21. Produtos de degradação identificados por LC-MS/MS para ERI.....	86
Tabela 22. Produtos de degradação identificados por LC-MS/MS para CLARI.....	96
Tabela 23. Produtos de degradação identificados por LC-MS/MS para ROXI.....	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Possíveis rotas de fármacos no meio ambiente.....	5
Figura 2. Estrutura química da eritromicina e suas substâncias relacionadas.....	9
Figura 3. Estrutura química da azitromicina.....	10
Figura 4. Estrutura química da claritromicina.....	11
Figura 5. Estrutura química da roxitromicina.....	12
Figura 6. Esquema ilustrativo do sistema de esgotos do HUSM (Wilde, 2012).....	29
Figura 7. Esquema ilustrativo dos pontos de amostragem do efluente hospitalar (Wilde et al., 2012).....	30
Figura 8. Esquema do procedimento de <i>clean-up</i> /pré-concentração do efluente hospitalar....	32
Figura 9. Fotorreator utilizado na degradação dos antibióticos. a) fonte da lâmpada; b) agitador magnético; c) termômetro; d) lâmpada UV; e) sistema para manutenção da temperatura.....	37
Figura 10. Resultados do teste de fase móvel. 1 (A: acetato de amônio 0,005 mol L ⁻¹ ; B: Metanol); 2 (A: ácido fórmico 1%; B: Metanol); 3 (A: ácido acético 1%; B: Metanol); 4 (A: acetato de amônio 0,005 mol L ⁻¹ ; B: Acetonitrila); 5 (A: ácido fórmico 1%; B: Acetonitrila) e 6 (A: ácido acético 1%; B: Acetonitrila). A: azitromicina; C: claritromicina; E: eritromicina e R: roxitromicina.....	41
Figura 11. Resultados do teste de temperatura do forno da coluna.....	42
Figura 12. Cromatograma de solução padrão de 10 µg L ⁻¹ dos macrolídeos nas condições validadas.....	43
Figura 13. Porcentagem de degradação em diferentes pH após 24 horas. A: azitromicina; C: claritromicina; E: eritromicina e R: roxitromicina.....	44
Figura 14. Superfície de resposta AZI. (A) pH água vs pH amostra, (B) %Acetonitrila vs pH amostra e (C) %Acetonitrila vs pH água.....	47
Figura 15. Superfície de resposta CLARI. (A), pH água vs pH amostra, (B) %Acetonitrila vs pH amostra e (C) %Acetonitrila vs pH água.....	48
Figura 16. Superfície de resposta ERI. (A) pH água vs pH amostra, (B) %Acetonitrila vs pH amostra e (C) %Acetonitrila vs pH água.....	49
Figura 17. Superfície de resposta ROXI. (A) pH água vs pH amostra, (B) %Acetonitrila vs pH amostra e (C) %Acetonitrila vs pH água.....	50

Figura 18. Cromatograma de amostra em branco de efluente (efluente coletado no período de verão).....	52
Figura 19. Cromatograma de amostra branco de efluente fortificado com 10 $\mu\text{g L}^{-1}$	52
Figura 20. Espectro de MS^2 e rota de fragmentação proposta para o metabólito 591 encontrado no efluente hospitalar.....	62
Figura 21. Espectro de MS^2 e rota de fragmentação proposta para o metabólito 546 encontrado no efluente hospitalar.....	63
Figura 22. Espectro de MS^2 e rota de fragmentação proposta para o metabólito 764 encontrado no efluente hospitalar.....	64
Figura 23. Decaimento de primeira ordem para o fotoprocesso de degradação dos antibióticos macrolídeos. Condições: 500 mL; 27 ± 2 °C; 2 mg L^{-1}	66
Figura 24. Constantes cinética de primeira ordem para a degradação de antibióticos macrolídeos em solução aquosa em função do pH.....	67
Figura 25. Degradação dos antibióticos macrolídeos em efluente hospitalar. Condições: 500 mL; 27 ± 2 °C; 2 mg L^{-1}	69
Figura 26. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e fragmentos propostos para a AZI (m/z 750,5 MS^2).....	71
Figura 27. Fragmentos de m/z 116 e 158 obtidos da cladinose e desosamina.....	72
Figura 28. Cromatograma de íons totais durante o processo de degradação e formação dos PDs de AZI.....	73
Figura 29 . Estruturas químicas propostas para os produtos de fotodegradação de AZI.	75
Figura 30. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 733.....	76
Figura 31 . Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação.....	77
Figura 32. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 735.....	78
Figura 33. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 765.....	79
Figura 34. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 721.....	80
Figura 35. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 752.....	81
Figura 36. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 578.....	82

Figura 37. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 705.....	83
Figura 38. Estruturas químicas propostas para os produtos de fotodegradação de AZI em efluente hospitalar.....	84
Figura 39. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação proposto para a ERI (m/z 735,5 MS^2).....	85
Figura 40. Cromatograma de íons totais durante o processo de degradação e formação dos PDs de ERI.	87
Figura 41 . Estruturas químicas propostas para os produtos de fotodegradação de ERI.....	88
Figura 42. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 717.	89
Figura 43. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 577.	90
Figura 44. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 559.	91
Figura 45. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 721.	92
Figura 46. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 369.	93
Figura 47 . Estrutura química proposta para o produto de fotodegradação de ERI em efluente hospitalar.	94
Figura 48. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação proposto para a CLARI (m/z 748.4 MS^2).	95
Figura 49. Cromatograma de íons totais durante o processo de degradação e formação dos PDs de CLARI.....	96
Figura 50 . Estruturas químicas propostas para os produtos de fotodegradação de CLARI. ...	98
Figura 51. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 623.	99
Figura 52. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 591.	100
Figura 53. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 737.	101
Figura 54. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 381.	102

Figura 55. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 369.	103
Figura 56 . Estruturas químicas propostas para os produtos de fotodegradação de CLARI em efluente hospitalar.....	104
Figura 57. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação proposto para a ROXI (m/z 837.6 MS^2).	105
Figura 58. Cromatograma de íons totais durante o processo de degradação e formação dos PDs de ROXI.....	106
Figura 59 . Estruturas químicas propostas para os produtos de fotodegradação de ROXI. ...	108
Figura 60. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 735.....	109
Figura 61. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 717.....	110
Figura 62. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 680.....	111
Figura 63. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 577.....	112
Figura 64. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 560.....	113
Figura 65 . Estruturas químicas propostas para os produtos de fotodegradação de ROXI em efluente hospitalar.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI: Ionização Química à Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

AZI: Azitromicina

CAD: gás de colisão, do inglês *Collision Gas*

CCD: Planejamento Composto com Delineamento Central, do inglês *Central Composite Design*

CE: energia de colisão, do inglês *Collision Energy*

CID: Dissociação Induzida por Colisão, do inglês *Collision Induced Dissociation*

CLARI: Claritromicina

CUR: cortina de gás, do inglês *curtain gas*

CXP: potencial de saída da célula de colisão, do inglês *collision cell exit potential*

Da: Dalton

DP: potencial de quebra, do inglês *Declustering Potential*

EMA: Agência Europeia de Avaliação de Medicamentos (EMA, do inglês *European Medicines Evaluation Agency*) :

EP: potencial de entrada, do inglês *Entrance Potential*

ERI: Eritromicina

ESI: Ionização por eletrospray, do inglês *Electrospray Ionization*

ETE: Estação de Tratamento de Efluentes

FS: *Full Scan*

GS1: gás da fonte de ions 1, do inglês *ion source gas 1*

GS2: gás da fonte de ions 2, do inglês *ion source gas 2* IS: *ion spray voltage*

HUSM: Hospital Universitário de Santa Maria

IP: Íon Precursor

IT: Armadilha de Íons, do inglês *Ion Trap*

IT-MS: Detectores de Massas com Armadilha de Íons, do inglês *Ion Trap Mass Detector*

k: Constante Cinética

LC₅₀: Concentração Letal, 50%, do inglês *Lethal Concentration, 50%*

LC-MS: Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*

- LOD: Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*
- LOEC: Menor Concentração Observada com Efeito, do inglês *Lowest-Observed-Effects Concentration*
- log K_{ow} : Coeficiente de Partição Octanol-Água
- LOQ: Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*
- m/z : Relação massa/carga
- MEC: Concentração Ambiental Mensurada, do inglês *Measured Environment Concentration*
- MRM: Monitoramento de Reações Múltiplas, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*
- NI: Não Identificado
- NLS: Espectro de Perda Neutra Constante, do inglês *Neutral Loss Scan*
- NOEC: Concentração de Efeito Não Observado, do inglês *No-Observed-Effects Concentration*
- PA-HUSM: Pronto Atendimento do Hospital Universitário de Santa Maria
- PAOs: Processos Avançados de Oxidação
- PD: Produtos de Degradação
- PEC: Predição da Concentração Ambiental, do inglês *Predicted Environmental Concentration*
- PIS: Espectro de Íon Precursor, do inglês *Precursor Ion Scan*
- pKa: Constante de Acidez
- PNEC: Concentração Predita que Não Causa Efeito, do inglês *Predict No-Effect Environment Concentration*
- QR: Quociente de Risco
- R^2 : Coeficiente de Regressão
- ROXI: Roxitromicina
- RSD: Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*
- RSM: Metodologia de Superfície de Resposta, do inglês *Response Surface Methodology*
- SPE: Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*
- $t_{1/2}$: Tempo de Meia Vida
- TEM: Temperatura
- TIC: Cromatograma Total de Íons, do inglês *Total Ion Chromatogram*
- TAOs: Tecnologias Avançadas de Oxidação

1. INTRODUÇÃO

As atividades antropogênicas geram poluentes que são lançados no ambiente, fato que constitui causa de preocupação para a sociedade hodierna. Dentro outros bens ambientais, os recursos hídricos são indispensáveis à vida, recebendo atenção redobrada em face aos possíveis danos de inúmeros poluentes orgânicos e inorgânicos descartados no ambiente. Entre os variados xenobióticos encontrados no meio aquático, os fármacos e seus metabólitos têm provocado crescente interesse científico (Kümmerer, 2001a; Kümmerer, 2001b; Khetan & Collins, 2007; Lim & Fox, 2013).

Estes medicamentos, de uso humano e veterinário, são continuamente liberados no ambiente, principalmente, por meio da excreção de pacientes, de processos de produção e de disposição inadequada de medicamentos não utilizados ou com prazo de validade vencido. A faixa de concentração dos fármacos encontrados no ambiente varia de ng - $\mu\text{g L}^{-1}$ (Petrovic et al., 2005; Ternes, 1998; Tixier et al., 2003; Jiang et al., 2013).

Uma vez no ambiente, os medicamentos podem apresentar persistência e não serem completamente removidos em estações de tratamento de efluentes (ETEs) (Stumpf et al., 1999; Ternes et al., 1999). Estudos mostram que muitos fármacos residuais, resistentes a processos convencionais de tratamento de esgotos, têm sido detectados não só em ETEs, mas também em águas de superfície, subterrâneas, potáveis e, em solos, e que estes compostos podem causar efeitos adversos nos organismos aquáticos e terrestres, como desenvolvimento de resistência por bactérias, mutação genética, efeitos estrogênicos, entre outros (Ternes, 1998; Hernando et al., 2006; Pleiter et al., 2013).

Efluentes hospitalares apresentam grande ocorrência de fármacos. Este tipo de efluente é caracterizado por apresentar matriz complexa, carregada de micro-organismos, metais pesados, substâncias químicas tóxicas e elementos radioativos, além se substâncias quimicamente ativas, como os medicamentos. Assim, a descarga direta destes efluentes, sem tratamento preliminar, em sistemas de esgoto urbano e cursos d'água, constitui risco potencial para os ecossistemas (Suarez et al., 2009).

Entre as diversas classes de medicamentos encontrados em efluentes hospitalares, os antibióticos estão presentes em concentrações de risco ecotoxicológico. Dentre estes, encontra-se o grupo dos macrolídeos, potentes antibióticos contra ampla variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. São moléculas básicas e lipofílicas formadas por

um anel de lactona macrocíclica, com 14, 15 ou 16 átomos de carbono, e açúcares (desosamina, cladinose, etc.) ligados através de ligações glicosídicas. São classificados com base no número de átomos no núcleo da lactona. Os mais utilizados na medicina humana são a Eritromicina (ERI), Roxitromicina (ROXI), e Claritromicina (CLARI), que possuem a lactona com 14 membros, e, a Azitromicina (AZI), com 15 membros (Wang, 2009).

Os macrolídeos têm sido detectados em efluentes de ETEs e águas de superfície, em concentrações de ng L^{-1} , mesmo em água potável. Também foi relatada a ocorrência em sedimentos de rios, o que pode indicar possível acumulação (Li et al., 2012). Os resíduos de macrolídeos merecem atenção, pois possuem alta toxicidade para algas verdes e persistência no ambiente aquático, o que pode cooperar para a seleção de estirpes bacterianas resistentes a essa classe de antibióticos (Vione et al., 2009; Feitosa-Felizzola et al., 2009; Louvet et al., 2010).

No Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), o consumo anual aproximado dos antibióticos macrolídeos é de: ERI 600 g ano^{-1} , AZI 1500 g ano^{-1} e CLARI 900 g ano^{-1} (ROXI não é administrado no HUSM). Com a utilização crescente, estes macrolídeos podem apresentar riscos ecotoxicológicos quando descartados, e devem ser objeto de atenção, pois, como no caso de outros xenobióticos, podem alcançar cursos d'água e acarretar danos ao ambiente natural, e, possivelmente, a seres humanos - no final da cadeia alimentar e no ciclo da água.

O tratamento das águas servidas, geradas pelo HUSM, é feito através de sistema composto por fossa séptica e tanque anaeróbio. O efluente assim tratado é descartado em vala que se comunica com o arroio Mariano da Rocha, que corta o campus da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Em face disto, e no sentido de colaborar com o programa de gerenciamento ambiental do Campus da UFSM, o LATER – Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Efluentes e Resíduos do Departamento de Química passou a estudar a presença de concentrações residuais de medicamentos no efluente hospitalar do HUSM e no corpo receptor. Com base nesta meta, também passou a desenvolver a aplicação de várias tecnologias avançadas de oxidação (TAOs) na degradação de moléculas de fármacos no efluente hospitalar. Das tecnologias avançadas, mais investigadas, atualmente, os chamados processos avançados de oxidação (PAOs) são os mais conhecidos, e aplicados há algum tempo (Lam et al., 2005; Lam & Mabury, 2005; Liu & Williams, 2007).

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivos:

- Validar método cromatográfico para a determinação de AZI, CLARI, ERI e ROXI utilizando SPE e LC-ESI-MS/MS;

- Determinar a ocorrência de antibióticos macrolídeos em amostras de efluente hospitalar e do corpo hídrico receptor;
- Estudar o risco potencial da ocorrência de AZI, CLARI, ERI E ROXI em efluente hospitalar e no corpo hídrico receptor;
- Identificar a presença de metabólitos dos antibióticos macrolídeos em efluente hospitalar;
- Aplicar fotólise para degradação dos antibióticos macrolídeos em solução aquosa e no efluente hospitalar;
- Determinar os produtos de degradação provenientes da fotodegradação em solução aquosa e efluente hospitalar.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Fármacos no meio ambiente

A preocupação com a presença de fármacos no ambiente aumenta progressivamente. Pesquisas demonstram que os sistemas de tratamento de esgotos não são eficientes para a total mineralização destes compostos, que no ambiente, podem vir a expor organismos aquáticos e terrestres a riscos ainda pouco previsíveis e, em consequência, também os seres humanos, através da água potável e da cadeia alimentar (Castiglione et al., 2005; Jiang et al., 2013).

Um alto percentual de fármacos de uso humano é excretado, via urina e fezes, em efluentes domésticos e hospitalares. A atuação dos processos de purificação de ETEs sobre estas substâncias pode levar à completa biodegradação dos xenobióticos, mineralizando-os a gás carbônico e água; à degradação parcial, através de processos metabólicos; em caso de persistência, o fármaco pode passar inalterado pelo sistema; ou ficar adsorvidos no lodo (Jelic et al., 2012; Schlusener & Bester, 2006).

Pouco se conhece dos riscos oferecidos ao ambiente e à saúde humana por exposição crônica à fármacos ou a seus produtos de transformação, em concentrações-traço. Entretanto, isto não pode ser negligenciado. Identificar a rota de exposição para a estimativa da contaminação ambiental correspondente é de suma importância (Jones et al., 2005).

Alguns destes compostos, até onde se conhece, não têm efeitos diretos nas bactérias presentes nas plantas de tratamento de esgoto, não sendo este o caso de antibióticos, que podem induzir danos em ecossistemas aquáticos (Alighardashi et al., 2009). Os antibióticos lançados no ambiente, além de causar distúrbios nos micro-organismos aquáticos, podem aumentar a resistência bacteriana em lodo ativado e no ambiente (Schlusener & Bester, 2006). Há um risco potencial para o ambiente aquático e organismos do solo, associado à presença destes compostos bioativos. Hospitais também são um dos mais importantes contribuintes da ocorrência dos antibióticos no meio aquático (Chang et al., 2010).

A Figura 1 representa as possíveis rotas dos fármacos quando descartados no ambiente. Além da excreção de fármacos de uso humano e veterinário, outras formas de contaminação ambiental dão-se pelo uso de esterco e de lodos das ETEs na agricultura como fertilizantes, disposição inadequada de resíduos da indústria farmacêutica, de medicamentos não utilizados ou com o prazo de validade vencido, etc. (Bila & Dezotti, 2003).

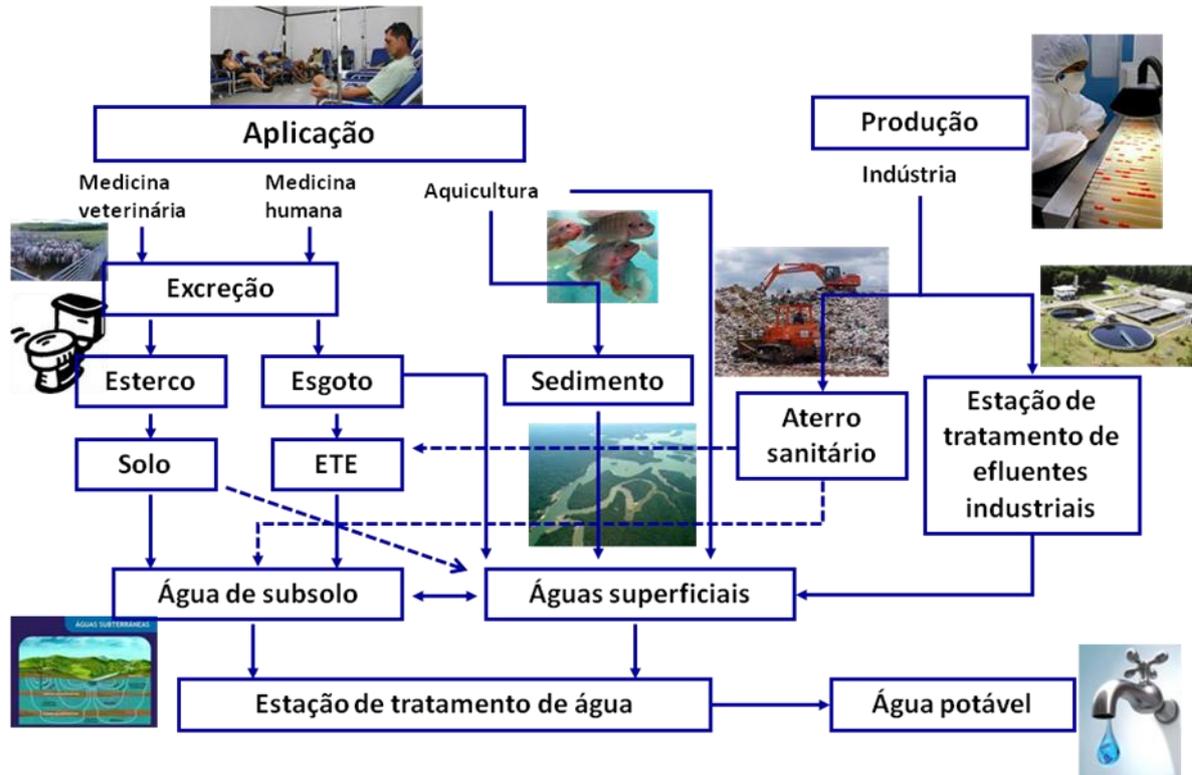


Figura 1. Possíveis rotas de fármacos no meio ambiente.

2.2. Antibióticos

Os antibióticos são uma classe de substâncias químicas sintéticas ou derivadas de organismos vivos como fungos ou bactérias, assim como podem ser obtidas por síntese, mas com equivalência estrutural ao composto natural. Esses compostos são capazes de inibir processos vitais de outros organismos, mesmo em concentrações pequenas (Korolkovas & Burckhalter, 1988).

Constitui a classe de fármacos que é considerada a mais problemática para o ambiente. Isto decorre de sua baixa biodegradabilidade e efeito tóxico sobre bactérias além da potencialidade de promover o desenvolvimento de espécies mais resistentes (Chang et al., 2010). Uma vez no ambiente, a manutenção do efeito do antibiótico depende das propriedades físico-químicas, prevalecendo às condições climáticas, tipos de solo e uma variedade de fatores ambientais. Um panorama da presença e efeitos dos antibióticos no ambiente é apresentado por Kemper et al., 2008.

O aumento da produção e do uso de antibióticos durante as últimas cinco décadas tem causado uma seleção genética de bactérias. Expostas a estes compostos por longos períodos de tempo, as bactérias podem desenvolver resistência, provocar mudanças no código genético e efeitos irreversíveis. Esses danos podem ocorrer até mesmo em baixas concentrações e para várias classes de antibióticos (Alighardashi et al., 2009).

Essa resistência tem aumentado gradativamente para a maioria dos patógenos humanos, o que levou ao reconhecimento do assunto como questão de saúde pública, pela consequência do uso deliberado e equivocado pela sociedade em geral (Jansen et al., 2006). Assim, a multirresistência bacteriana tem ocorrido de forma evolucionária em um tempo relativamente pequeno (Berger & Mccallum, 2006).

A resistência é a propriedade de uma bactéria de inativar ou excluir antibióticos, mecanismos que bloqueiam a ação, e interrompem os efeitos dos antibióticos. Pode ser uma característica própria do organismo, adquirida por meios de mutação no seu próprio DNA ou aquisição de DNA resistente de outra fonte. A mutação ocorre espontaneamente no DNA bacteriano que modifica e elimina o alvo de ação do antibiótico, causando modificações na superfície da bactéria, podendo promover a produção de uma enzima que inativa o antibiótico. A excreção do antibiótico pela célula bacteriana é outra consequência da mutação (Berger & Mccallum, 2006).

2.3. Macrolídeos

O termo macrolídeo é derivado de duas palavras: ‘macro’ – que significa grande e ‘olideo’ – que significa lactona. Estes compostos são a segunda classe antibacteriana mais importante usada no tratamento humano depois da família das β -lactamas. Durante 40 anos os macrolídeos têm sido usados no tratamento de diversas condições infecciosas. Eles têm sido utilizados, principalmente, em pacientes que são alérgicos às penicilinas (Hub & Hua, 2005).

Apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e anaeróbias. Por apresentar concentração intracelular em vários tipos de células, como macrófagos, podem tratar infecções provocadas por patógenos intracelulares. Esta classe de antibióticos é utilizada na medicina humana e veterinária (Wang, 2009; Hub & Hua, 2005).

Produzidos por vários micro-organismos *Streptomyces*, são modificados por derivação química. São moléculas básicas e lipofílicas que consistem de um anel de lactona

macrocíclica, com 14, 15 ou 16 átomos, e açúcares (desosamina, cladinose, micaminose, micarose, micosamina) através de ligações glicosídicas podendo apresentar caráter neutros e/ou básicos (Kanfer et al., 1998). Os antibióticos macrolídeos contém uma base dimetilamina $[-N(CH_3)_2]$, grupo que é capaz de obter um próton. Assim, de acordo com a estrutura química, os macrolídeos são compostos com valores de pKa em torno de 8 (Tabela 1) (Kanfer et al., 1998). Por serem relativamente hidrofóbicos e ter baixa biodegradabilidade, suspeita-se que uma quantidade considerável destes fármacos possa ficar adsorvida em lodos (Louvet et al., 2010).

Tabela 1. Propriedades dos antibióticos macrolídeos estudados.

Característica	Composto			
	CLARI	AZI	ERI	ROXI
Número CAS	81103-11-9	83905-01-5	114-07-8	80214-83-1
Fórmula molecular	$C_{38}H_{69}NO_{13}$	$C_{38}H_{72}N_2O_{12}$	$C_{37}H_{67}NO_{13}$	$C_{41}H_{76}N_2O_{15}$
Massa molecular	747,95	748,92	733,93	837,05
pKa	8,3 -8,9	8,1-9,4	8,9	8,8
Log k_{ow}	3,16	4,02	3,06	2,75

(Segura et al., 2007; Sahar et al., 2011)

Eles são subdivididos em dois grupos: os macrolídeos de origem natural e os macrolídeos de origem semissintética. Estes, por sua vez, podem ainda ser divididos em três subgrupos, de acordo com a modificação química realizada no núcleo da ERI. No primeiro subgrupo temos: ROXI e CLARI. No segundo subgrupo temos a AZI. No terceiro e último subgrupo temos os cetolídeos. As modificações realizadas na estrutura dos macrolídeos alteram as propriedades farmacocinéticas e antimicrobianas dos compostos, produzindo macrolídeos mais resistentes ao suco gástrico e com um espectro de ação mais abrangente (Kanfer et al., 1998).

Diversos congêneres semissintéticos foram produzidos, mas somente AZI e CLARI e ROXI têm uso clínico corrente em humanos. Estes apresentam maior estabilidade em meio ácido, melhor disponibilidade por via oral, maior duração de efeito, melhor atividade sobre bactérias de desenvolvimento intracelular e aumento da concentração intrafagocitária. Sua

ação pode ser bacteriostática ou bactericida, dependendo da concentração, do tamanho do inóculo e de micro-organismos infectantes (Zuckerman, 2004; Menezes et al., 2007).

2.3.1. Eritromicina

A ERI foi o primeiro macrolídeo identificado, assim como, foi o primeiro a se tornar disponível comercialmente, tendo sido isolado de cepa de *Streptomyces erythreus* em 1952. Atualmente são sintetizados quimicamente (Lange et al., 2006). É um dos compostos mais comumente utilizados na medicina humana (Alighardashi et al., 2009).

Este antibiótico é indicado nas infecções em que se utiliza a penicilina, sendo escolhido para pacientes com hipersensibilidade à penicilina. A ERI tem espectros antimicrobianos extenso, incluindo cocos aeróbios Gram-positivos e Gram-negativos (Wang, 2009; Zuckerman, 2004).

Este antibiótico é formado por uma estrutura que consiste de um macrociclo de 14 membros de anel de lactona ligado a duas unidades de açúcar (um açúcar neutro, cladinose, e um açúcar amino, desosamina). No ambiente ácido do estômago, é rapidamente degradada para o 8,9-anidro-6,9-hemicetal e, em seguida, para a forma 6,9,9,12-espirocetal. O intermediário hemicetal pode ser responsável pelos efeitos gastrointestinais adversos associados com ERI (Cobos-Trigueros et al., 2009). Existem vários tipos de ERI identificadas (Figura 2). Elas são provenientes do processo de fermentação e purificação, mas o composto ativo principal é a eritromicina A (Wang, 2009).

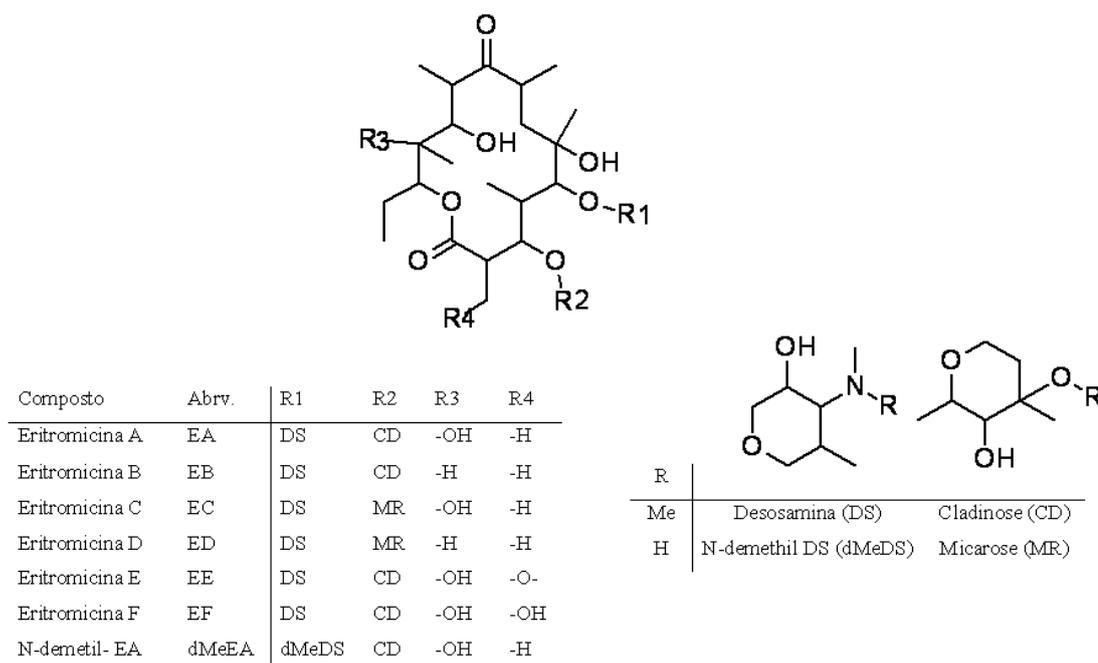


Figura 2. Estrutura química da eritromicina e suas substâncias relacionadas.

Esta droga é metabolizada no fígado, e sua excreção ocorre por via biliar. Passando ao intestino, é eliminada nas fezes. O metabolismo de ERI tem sido estudado em diferentes espécies de animais e em seres humanos. Estudos feitos em ratos e em cães e no sistema microsomal do fígado de coelhos mostraram que a ERI é rapidamente metabolizada no fígado, principalmente por meio de um processo de N-demetilação. Coletivamente, estes estudos sugerem fortemente que o metabolismo de ERI por N-desmetilação ocorre em todas as espécies testadas. Des-N-metil-eritromicina é o principal metabólito e o único metabólito microbiologicamente ativo da ERI. No entanto, a atividade antimicrobiana é presumivelmente baixa e a única forma de ERI conhecida por ser ativos *in vivo* é a base livre (Kanfer et al., 1998).

Em pH abaixo de 7 a ERI é degradada imediatamente, sendo convertida no seu produto de degradação, ERI desidratada, com a perda de uma molécula de água. Da mesma forma no ambiente, a ERI pode ser detectada e quantificada como seu produto de degradação, assumindo assim que a ERI foi totalmente convertida neste composto (Seifrtova et al., 2009).

A instabilidade da ERI em meio ácido ocorre devido à interação dos ligantes de C₆-OH com C₉=O que forma o enoléter e o espirocetal que não possuem atividade antibacteriana. Em virtude desta instabilidade foram sintetizados a partir da ERI diferentes antibióticos onde

a cetona no C₉ é convertida em grupos que não possam sofrer a reação, catalisada por ácido, com a hidroxila em C₆, tornando estes compostos sintéticos mais estáveis em meio ácido (Souto, 1998).

2.3.2. Azitromicina

Azitromicina é um semissintético macrolídeo derivados da ERI, através da inserção de um átomo de nitrogênio no anel lactônico na posição C₉, formando uma lactona constituída por 15 membros (Figura 3). Este fármaco é considerado o primeiro antibiótico da subclasse dos “azalídeos” (Zuckerman, 2004; Wang, 2009).

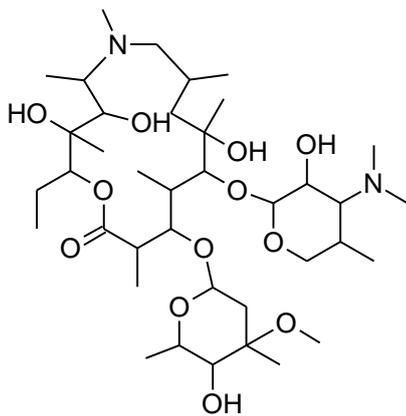


Figura 3. Estrutura química da azitromicina.

Algumas das características, que faz a AZI ter maior utilização que a ERI, são seu espectro de ação mais amplo frente aos micro-organismos Gram-positivos, alta partição no tecido, longo tempo de resistência, estabilidade em meio ácido e uma taxa de metabolismo baixa (Menezes et al., 2007).

A maior parte da AZI é eliminada do organismo na forma inalterada pelas fezes, o que sugere que quantidades significativas de AZI ativa podem ser introduzidas em ETes. Além disso, o metabolismo lento deste composto indica pobre degradação em plantas de tratamento. A presença do antimicrobiano ativo em conjunto com a degradação incompleta de AZI em estações de tratamento de águas residuais pode ser um fator na promoção do

desenvolvimento de resistência antimicrobiana nestas estações de tratamento e, depois de seu lançamento, no ambiente em geral. A AZI também possui propriedades catiônicas, o que demonstra que esta pode ser susceptível a ligar-se ao solo (Zuckerman, 2004; Koch et al., 2005).

2.3.3. Claritromicina

Claritromicina é um macrolídeo semissintético. Como todo macrolídeo, apresenta atividade bacteriostática, tendo seu espectro de ação semelhante ao da ERI, entretanto, com maior potência contra pneumococos, estafilococos e estreptococos (Zuckerman, 2004; Menezes et al., 2007).

A CLARI é sintetizada por substituição de um grupo metoxi por um grupo hidroxil no carbono 6 da ERI (Figura 4). Esta substituição cria um antimicrobiano mais estável em meio ácido e previne a degradação da base de ERI para o intermediário hemicetal. Com a estabilidade ácida, a biodisponibilidade da CLARI é melhor que a ERI e a intolerância gastrointestinal é reduzida (Zuckerman, 2004; Trigueros et al., 2009).

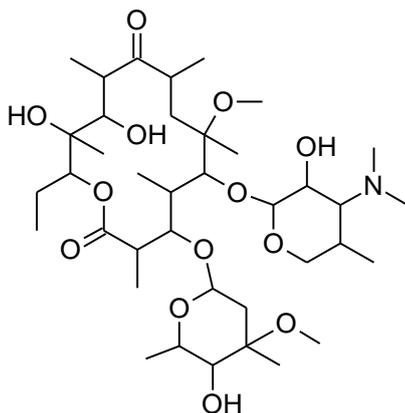


Figura 4. Estrutura química da claritromicina.

A CLARI é metabolizada no fígado pelo citocromo P-450, formando 14-hidroxi-claritromicina, um metabólito ativo e em seis outros metabólitos. Aproximadamente entre 30

e 40% de uma dose oral de CLARI é excretada na urina na forma inalterada ou como o metabolito ativo 14-hidroxi. O restante é excretado na bile (Velde et al., 2009).

2.3.4. Roxitromicina

Roxitromicina é um macrolídeo semissintético, derivado da ERI (Figura 5). Apresenta propriedades semelhantes às da ERI, diferenciando-se desta por sua meia vida prolongada. É ativa contra Gram-positivos e Gram-negativos (Lange et al., 2006).

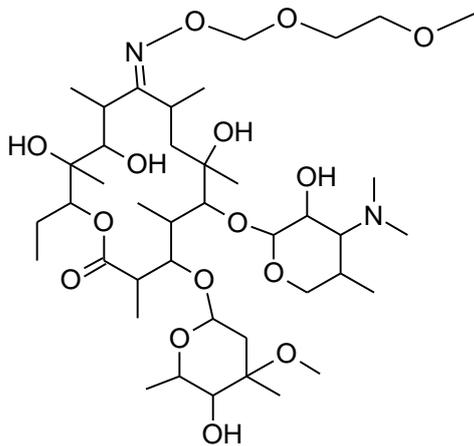


Figura 5. Estrutura química da roxitromicina.

A molécula de ERI tem a adição de um N-oxime na cadeia lateral da lactona na posição 9 formando a ROXI. Esta adição confere uma maior estabilidade em meio ácido para o anel da lactona, impedindo assim a degradação. Existem poucos estudos em animais e humanos quanto aos metabólitos formados após a administração. Apenas quatro foram identificados em urina e fezes. Assim a biotransformação de ROXI não é bem elucidada (Zhong et al., 2000).

2.4. Ocorrência, destino, efeitos e riscos de macrolídeos no meio ambiente

Antibióticos macrolídeos têm sido detectados, em níveis traço, em água de rios, água potável, estações de tratamento de efluentes, lodo ativado, sedimentos de rios, entre outros. Estes compostos ao serem lançados no ambiente podem gerar riscos aos ecossistemas e saúde humana e animal, pois estas drogas têm a capacidade de modificar os perfis fisiológicos de microbianos e aumentar a resistência aos antibióticos em bactérias (Wang, 2009).

Yang e Carlson (2004) determinaram concentrações de ERI e ROXI em matrizes de água de rio e efluente. Foram 5 pontos de coleta no rio Cache la Poudre no norte de Colorado-EUA, no qual foi encontrado $0,17 \mu\text{g L}^{-1}$ de ERI no ponto 3 de coleta, e $0,04\text{-}0,06 \mu\text{g L}^{-1}$ de ROXI nos pontos 2 e 3. Em efluente, dos 3 pontos analisados, ROXI não foi detectado, e ERI foi determinada na concentração de $0,08\text{-}0,20 \mu\text{g L}^{-1}$.

Abuin et al. (2006) desenvolveram metodologia para a determinação de AZI, CLARI, ERI e ROXI em água de rios da Espanha. Foram encontradas, exceto ROXI, no nível de traços, com concentração média de $0,2$; $0,04$ e $0,12 \mu\text{g L}^{-1}$ para ERI, AZI, CLARI, respectivamente. Chang et al. (2010) analisaram efluentes de hospitais da China, quanto à presença de antibióticos, nos quais foi verificado a presença de ERI e ROXI nas concentrações médias de $0,2$ e $2,1 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Os lodos gerados no processo de tratamento de efluentes podem ser um sumidouro para alguns fármacos e a aplicação destes lodos no solo pode introduzir estes compostos no ambiente. Segundo estudo feito por Chenxi et al. (2008) ERI e CLARI podem ser degradadas após 17 dias de exposição a luz solar e a aeração, entretanto, são desconhecidos os possíveis produtos de degradação destes compostos e seus impactos.

A resistência e modificação genética de alguns organismos são de conhecimento comum. Para a ERI foi feito um estudo (Knapp et al., 2010) dos impactos deste sobre a modificação de genes presentes em bactérias no efluente de suíno, onde foi verificado o surgimento de genes resistentes.

Isidori et al. (2005) testaram o efeito de antibióticos, entre eles ERI e ROXI, sobre organismos aquáticos pertencentes a diferentes níveis tróficos (bactérias, algas, rotíferos, crustáceos e peixes). Os resultados mostraram que a toxicidade aguda foi da ordem de mg L^{-1} , enquanto a toxicidade crônica foi em concentrações na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$, principalmente para

as algas. Os antibióticos mostraram-se menos ativos contra rotíferos, crustáceos e peixes, onde nenhum efeito foi notado até mesmo para as concentrações até 1000 mg L⁻¹.

Organismos fotossintéticos aquáticos também podem ser afetados. Estudos realizados tanto na cianobactéria *Synechocystis sp.* e em lentilhas d'água *L. minor*, mostraram inibição de crescimento na presença de 1-1000 mg L⁻¹ de ERI (Pomati et al., 2004).

Yamashita et al. (2006) avaliaram a inibição do crescimento das algas *P. subcapitata* por CLARI, mostrando que esta tem efeito tóxico com uma EC50 de 11 µg L⁻¹ e uma Menor concentração de efeito observável (LOEC) e Concentração de efeito não observado (NOEC) de 6,3 e 3,1 µg L⁻¹, respectivamente. Efeitos de toxicidade crônica também foram observados na reprodução do crustáceo *D.magna*, quando exposto a CLARI com valor de 40 µg L⁻¹.

2.5. Processos Avançados de Oxidação (PAOs)

Os PAOS podem ser usados como tratamento alternativo para efluentes quando técnicas convencionais de tratamento de efluentes não são eficientes para a degradação de contaminantes. PAOs baseiam-se em processos físico-químicos capazes de produzir mudanças na estrutura química dos contaminantes por meio de reações químicas envolvendo a formação *in situ* do radical hidroxila (HO·), de alto poder de oxidação (2,8 V) (Tabela 2).

Radicais HO· podem mineralizar compostos orgânicos, mesmo encontrados em pequenas concentrações, a CO₂, H₂O e íons inorgânicos (Gogate & Pandit, 2004a, 2004b). O ataque do radical HO· a moléculas orgânicas se dá pela dehidrogenação ou abstração de hidrogênio para formar H₂O, por hidroxilação ou adição eletrofílica à ligação insaturada, e pela transferência de elétrons (Agustina et al., 2005).

Tabela 2. Potenciais de redução padrão em solução aquosa de alguns agentes oxidantes (Weast et al., 1985).

Oxidante	Reação	E° (V) vs SHE ^a
Flúor	$F_{2(g)} + 2H^+ + 2e^- \rightarrow 2HF$	3,05
	$F_{2(g)} + 2e^- \rightarrow 2F^-$	2,87
Radical Hidroxila	$HO\cdot + H^+ + e^- \rightarrow H_2O$	2,80
Ânion radicalar Sulfato	$SO_4\cdot^- + e^- \rightarrow SO_4^{2-}$	2,60
Ozônio	$O_{3(g)} + 2H^+ + 2e^- \rightarrow O_{2(g)} + H_2O$	2,07
	$O_3 + H_2O + 2e^- \rightarrow O_2 + 2HO^-$	1,24
Peróxido de Hidrogênio	$H_2O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow 2H_2O$	1,76
Íon Permanganato	$MnO_4^- + 4H^+ + 3e^- \rightarrow MnO_{2(s)} + 2H_2O$	1,67
	$MnO_4^- + 8H^+ + 5e^- \rightarrow Mn^{2+} + 4H_2O$	1,51
Radical Hidroperoxila	$HO_2\cdot + 3H^+ + 3e^- \rightarrow 2H_2O$	1,65
	$HO_2\cdot + H^+ + e^- \rightarrow H_2O_2$	1,44
Hipoclorito	$HClO^- + H^+ + 2e^- \rightarrow Cl^- + H_2O$	1,48
	$ClO^- + H_2O + 2e^- \rightarrow Cl^- + 2HO^-$	0,84
Íon Dicromato	$Cr_2O_7^{2-} + 14H^+ + 6e^- \rightarrow 2Cr_3^+ + 7H_2O$	1,36
Cloro	$Cl_{2(g)} + 2e^- \rightarrow 2Cl^-$	1,36
Oxigênio	$O_{2(g)} + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$	1,23
Dióxido de Cloro	$ClO_{2(aq)} + e^- \rightarrow ClO_2^-$	0,95

^aSHE: *Standard hydrogen electrode*

Os PAOs incluem uma larga gama de processos que podem conduzir à geração de HO·, dentre eles fotocatalise homogênea ou heterogênea com irradiação artificial ou solar, eletrocatalise, ozonização, reagente de Fenton, ultrassom e oxidação com ar umidificado. Outros processos menos convencionais, mas que também podem gerar radicais livres são radiação ionizante, micro-ondas, entre outros (Agustina et al., 2005; Oller et al., 2011).

PAOs podem ser empregados combinados com processos biológicos de tratamento, transformando compostos recalcitrantes em compostos possíveis de serem biodegradados. Com base nessas características, PAOs tornaram-se alvo de estudos na aplicação para a degradação de contaminantes emergentes não biodegradáveis, como os fármacos (Klavarioti et al., 2009; Homem & Santos, 2011).

2.5.1. Fotólise

Quando os fármacos alcançam o ambiente aquático eles estão susceptíveis a sofrer processos bióticos ou abióticos de degradação. Para os fármacos, as transformações abióticas podem acontecer mediante hidrólise ou fotólise. Como os fármacos, em geral, estão planejados para a ingestão oral e serem resistentes à hidrólise, por isso a fotólise pode ser considerada como uma das principais rotas de degradação para estes compostos em águas superficiais (Doll & Frimmel, 2003).

A fotólise é a decomposição ou dissociação dos compostos químicos por efeito de luz natural ou artificial. Dois tipos de processos podem ser aplicados: a fotólise direta ou indireta (Klavarioti et al., 2009; Tong et al., 2011).

2.5.1.1. Fotólise direta

Fotólise direta ocorre quando um composto absorve luz, torna-se instável, originando subsequente decomposição. Durante a fotólise direta, a radiação absorvida é usada para produzir estados excitados eletronicamente das espécies fotossensíveis iniciando o processo de desativação ou da formação de fotoprodutos (Oppenlander, 2003).

O fluxo de fótons necessários para iniciar este processo pode ser fornecido pela luz solar ou por lâmpadas artificiais. Existe uma ampla variedade de fontes artificiais de radiação: lâmpadas negras, germicidas, lâmpadas simuladoras solares e outras. As mais comumente utilizadas são as lâmpadas de mercúrio de baixa, média e alta pressão, e lâmpadas de xenônio para gerar radiação UV (Bayarri, 2007).

O uso de radiação UV é bem estabelecido na desinfecção de águas para consumo, e também, é uma tecnologia crescente na purificação de efluentes, sendo eficiente na inativação de micro-organismos patogênicos como vírus e bactérias além de cistos de protozoários como a *Giardia* e *Cryptosporidium* que não são eliminados por cloração (Hijnen et al., 2006).

Além desta utilidade, a radiação vem sendo empregada na simulação de condições ambientais para se estudar o comportamento de fármacos em águas superficiais e rios. Acredita-se que um dos mecanismos principais de reação nestes ecossistemas seria a fotodegradação por meio de luz solar, entretanto, ainda não se tem suficiente conhecimento

dos subprodutos formados e que podem por sua vez, apresentar uma toxicidade maior do que seus compostos de origem (Latch et al., 2003; Doll e Frimmel, 2003).

2.5.1.2. Fotólise Indireta

A eficiência da fotólise é geralmente maior quando combina-se irradiação com um catalisador como, por exemplo, peróxido de hidrogênio, que pode sofrer dissociação fotolítica e originar radicais hidroxil. A este processo dá-se o nome de fotólise indireta (Klavarioti et al., 2009). O radical hidroxil, uma espécie química com capacidade para promover a oxidação não-seletiva de uma ampla gama de substâncias, sendo eficiente na degradação de compostos persistentes que demonstraram fotodegradação lenta através de fotólise direta. Outras propriedades como o espectro de absorvância, o rendimento quântico da fotólise, a concentração de peróxido de hidrogênio e a matriz são igualmente importantes na eficiência da degradação de fármacos por fotólise indireta (Klavarioti et al., 2009; Kassinos et al., 2011). Estes oxidantes também podem ser produzidos através da fotólise de compostos húmicos ou inorgânicos existentes nas matrizes aquosas. Os processos de fotólise têm provado serem eficientes no tratamento de águas naturais contaminadas com antibióticos (Klavarioti et al., 2009, Tong et al., 2011; Homem & Santos, 2011).

2.6. Efluente Hospitalar

Efluentes hospitalares lançam, no ambiente, variados xenobióticos, entre eles os antibióticos, e o conhecimento sobre este problema ambiental e seus efeitos na saúde humana são ainda incipientes (Chang et al., 2010). Estes efluentes podem ser separados em efluentes do tipo doméstico, que compreendem descargas de cozinhas, lavanderias e de higiene pessoal, e efluentes específicos de unidades hospitalares. A descarga deste último tipo contém desinfetantes, detergentes, fluidos biológicos, resíduos de drogas, metais, radioelementos, ácidos, bases, benzeno, hidrocarbonetos, entre outros (Boillot et al., 2009).

Segundo a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n° 306/04 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é permitido que o descarte dos efluentes sanitários

hospitalares seja feito através da rede de esgotos, ou em corpo receptor, desde que atendam respectivamente as diretrizes estabelecidas pelos órgãos ambientais, gestores de recursos hídricos e de saneamento competentes. Além disto, a ANVISA estabelece que resíduos de produtos hormonais e produtos antimicrobianos, citostáticos, antineoplásicos, imunossupressores, digitálicos, imunomoduladores, anti-retrovirais, quando descartados por serviços assistenciais de saúde, farmácias, drogarias e distribuidores de medicamentos ou apreendidos, devem ser submetidos à tratamento ou disposição final específicos.

Os tratamentos de efluentes hospitalares são feitos, normalmente, por uma fossa séptica seguida de caixa de contato, filtro anaeróbio, onde ocorre a decomposição anaeróbia e cloração. (Augustinho & Ferreira, 2004).

O HUSM dispõe de 302 leitos e sua força de trabalho é composta, em média, por 1650 pessoas (médicos, enfermeiras, professores, servidores, residentes e bolsistas). Sua abrangência regional é de 112 cidades, somando uma população de aproximadamente 3 milhões de habitantes (<http://www.husm.ufsm.br>).

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 e à legislação específica (Vasconcelos, 2006). Além disto, no sistema de saneamento do HUSM não é feita separação entre as categorias de efluentes. A literatura apresenta estudos que mostram o potencial genotóxico deste tipo de efluente (Gupta et al., 2009).

O efluente do PA-HUSM tem sido o mais estudado. As características físico-químicas médias desta corrente, pós-fossa séptica/filtro anaeróbico, podem ser vistas na Tabela 3. Como observado, mesmo após passar por esse sistema de tratamento, a corrente efluente apresenta ainda alta carga orgânica variável e outros parâmetros acima dos limites estabelecidos pela agência reguladora.

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos médios do efluente lançado no PA do HUSM.

Parâmetro	Valor	Limites^{c, d}
DBO ₅ (mg L ⁻¹) ^b	303,7	≤ 120
DQO (mg L ⁻¹) ^a	200-612	≤200
A _{UV 254}	1,254	-
Nitrogênio amoniacal (mg L ⁻¹) ^b	52,0	20
Nitrogênio Total (mg L ⁻¹) ^b	59,1	10
Alcalinidade (HCO ₃ ⁻) (mg L ⁻¹)	200	-
NO ₃ ⁻ (µg L ⁻¹) ^a	680	< 10,0
Cl ⁻ (mg L ⁻¹) ^a	132	-
PO ₄ ³⁻ total (mg L ⁻¹) ^b	7,5	1
SO ₄ ²⁻ (mg L ⁻¹) ^a	4,0	-
K ⁺ (mg L ⁻¹) ^a	21,9	-
Na ⁺ (mg L ⁻¹) ^a	150,5	-
Sólidos Suspensos (mg L ⁻¹) ^b	57	≤ 150
Sólidos Totais 105 °C (mg L ⁻¹) ^b	484	-
pH	7-8	5-9
Temperatura média (°C)	23	< 40

^aMartins et al. (2008), ^bMartins et al. (2009); ^cCONAMA, 2011; ^dCONSEMA (2006)

Estudos enfocando a problemática do lançamento de efluentes do HUSM (Tabela 4) e potenciais soluções têm sido reportados pelo grupo de pesquisas do LATER (Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Efluentes e Resíduos) da UFSM (Martins et al., 2011; Martins et al., 2009; Martins et al., 2008; Vasconcelos et al., 2009; Brenner et al., 2011; Minetto et al., 2012; Wilde et al., 2012). Todavia, até o momento, os órgãos competentes não deram a merecida atenção ao problema.

Tabela 4. Concentrações médias de fármacos e produtos de cuidado pessoal medidos no efluente do HUSM analisados pelo LATER entre 2006 à 2012.

Fármacos/Produtos de cuidado pessoal	Consumo anual HUSM (kg)	Técnica analítica	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	QR
Amoxicilina	5,810	SPE +HPLC-UV	27,0	>1
Atenolol	0,095	SPE +HPLC-FLD	1,38-4,48	0,27
Propranolol	0,172	SPE +HPLC-FLD	0,00-1,63	4,25
Metoprolol	0,072	SPE +HPLC-FLD	1,37-9,93	>1
Ciprofloxacina	1,67	SPE +HPLC-DAD LC-MS/MS	21,0	2,0-4,0
Cefazolina	2,5	SPE +HPLC-DAD LC-MS/MS_QTRAP	Somente metabólitos	-----
Ceftazidima	3,0	SPE +HPLC-DAD LC-MS/MS_QTRAP	Somente metabólitos	-----
Diclofenaco	0,025	SPE +HPLC-DAD	1,7	17,7
Dexametazona	2,508	SPE +HPLC-DAD	2,63	-----
Nonilfenol Etoxilado	-----	SPE +HPLC-DAD	916	>1
Nonilfenol	-----	SPE +HPLC-UV	----	>1
Sulfametoxazol	5,41	LC-MS/MS_QTRAP	27,8	11,4
Trimetoprima	----	LC-MS/MS_QTRAP	6,65	<1
Acetato de Ciproterona	0,17	SPE +HPLC-DAD	2,2	----
Flutamina	0,45	SPE +HPLC-DAD	9,0	----
Citrato de Tamoxifeno	1,56	SPE +HPLC-DAD	0,0	----
Espironolactona	0,335	SPE +HPLC-DAD	4,0	----
Bromazepam	0,006	LC-MS/MS_QTRAP	0,19	----
Carbamazepina	1,5	LC-MS/MS_QTRAP	0,59	0,85
Clonazepam	0,014	LC-MS/MS_QTRAP	0,13	----
Diazepam	0,178	LC-MS/MS_QTRAP	0,64	0,90
Lorazepam	0,005	LC-MS/MS_QTRAP	0,09	----

QR: Quociente de risco.

Os riscos provocados pelos poluentes emergentes aos seres vivos são pouco conhecidos. A Europa possui normas que avaliam o risco ambiental provocado pelos PPCPs (*Pharmaceutical and Personal Care Products* – produtos farmacêuticos e de higiene pessoal) e desreguladores endócrinos. Nesta regulamentação consta que produtos farmacêuticos ativos devem passar por avaliações de toxicidade crônica. A União Européia possui também uma diretriz, que orienta e estabelece níveis seguros de concentrações de fármacos de uso veterinário no meio ambiente, não devendo exceder de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ no solo e $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ em efluentes (Costa et al., 2008).

Em 1998, o FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) publicou um guia - “*Guidance for Industry: Environmental Assessment of Human Drug and Biologics Applications*”- que fornece informações sobre quando uma avaliação ambiental deve ser realizada e como preparar estas avaliações (Pedroso, 2007).

O Brasil não possui uma legislação sobre limites toxicológicos para fármacos, somente uma norma, a RDC Nº 306, da ANVISA, e a Resolução Nº 358, de 29 de abril de 2005 (Ministério do Meio Ambiente, 2005) que dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos. A resolução nº 128/2006 do Conselho Estadual de Meio Ambiente – CONSEMA, da Secretaria do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul dispõe sobre a definição de critérios e padrões de emissão para a toxicidade de efluentes líquidos lançados em águas superficiais no Estado do Rio Grande do Sul.

2.7. Risco potencial de substâncias ativas no ambiente

A finalidade de realizar uma avaliação do risco ambiental é prever a possível contaminação no ambiente. A Agência Européia de Avaliação de Medicamentos (EMEA) propôs metodologias para a avaliação do risco ambiental de determinada substância (EMEA, 2006). A avaliação do risco potencial ambiental baseia-se em dados como consumo, características físico-químicas, exposição ambiental, entre outros. Substâncias que apresentam um aumento significativo em sua exposição ambiental são incluídas no grupo de substâncias com potencial risco ambiental (Jensen et al., 2007).

Os estudos de impacto ambiental utilizam testes padronizados para a avaliação da ecotoxicidade, onde verificam os efeitos em curto prazo e utilizam predominantemente a mortalidade como ponto final (Domene et al., 2008). Para avaliar os potenciais efeitos negativos são utilizados peixes, algas, bactérias, vermes terrestres, plantas e invertebrados presentes. Porém estes testes não determinam a cronicidade destes efeitos, que em condições reais estes organismos estão expostos a diferentes xenobióticos durante um período de tempo mais prolongado do que o considerado nestes estudos. Outro fator também a ser considerado é o efeito resultante da interação entre vários destes compostos (Grung et al., 2008).

Conforme o EMEA, a avaliação do risco potencial ao ambiente apresenta três fases. A primeira fase compreende a Predição da Concentração Ambiental (PEC), que avalia

teoricamente a quantidade de fármaco lançado no meio ambiente de acordo com seu uso e exposição ambiental. O limite de ação desta fase é a concentração de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$, ou seja, se o fármaco apresenta uma concentração abaixo deste limite, este fármaco não apresenta risco ao meio ambiente (EMEA, 2006). Quando o PEC for maior ou igual a $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$, então o fármaco passa para a segunda fase. A segunda fase consiste em informações sobre o destino e os efeitos ao ambiente onde são fornecidos dados de concentração diária do fármaco, taxas de excreção humana e taxas de remoção em sistemas de tratamento. A terceira fase avalia o comportamento específico e risco (EMEA, 2006).

O valor para PEC é estimado, e restrito a ambientes aquáticos. Pode, também, guiar o estudo de fármacos como contaminantes emergentes. Através deste cálculo podem-se tomar decisões sobre quais fármacos prioritários devem ser estudados e qual decisão deve ser tomada para diminuir o seu potencial risco como contaminante. O PEC pode, então, ser calculado segundo a Equação 1.

$$PEC_{conv.} (\text{g L}^{-1}) = \frac{A - (1 - \frac{R}{100})}{365 \times P \times V \times D} \quad (1)$$

Onde:

A – Quantidade predita usada por ano em uma área geográfica (kg);

R – Taxa de remoção (%) (biodegradação, adsorção, hidrólise, etc.);

P – Número de habitantes da área considerada;

V – Volume de efluente *per capita* diário ($\text{m}^3 \text{cap}^{-1}$);

D – Fator de diluição do efluente pela água superficial (em geral 10).

As seguintes situações podem ser levadas em consideração: todo o fármaco receitado foi usado para o tratamento no hospital; a fração de fármacos excretada foi lançada no sistema de esgotos; sem transformações dos fármacos após a excreção no sistema de esgotos e o padrão de uso foi distribuído uniformemente temporal e espacialmente (Carlsson et al., 2006).

De acordo com Escher et al. (2010), para o estudo de um caso específico como de um hospital onde o efluente é lançado sem tratamento adequado, não ocorrendo nenhuma degradação ou diluição, a Equação 1 pode ser reduzida para a Equação 2.

$$PEC_{Efl.} = \frac{A \cdot E}{V_{Efl.} \cdot 365} \quad (2)$$

Onde:

$PEC_{Efl.}$ é a concentração predita no efluente ($g L^{-1}$);

A é o quantidade do fármaco consumido no hospital (g);

E é a fração excretada na urina e nas fezes (%);

$V_{Efl.}$ é a quantidade de efluente lançado por dia ($L dia^{-1}$).

A Concentração Predita que Não Causa Efeito (PNEC) no ambiente é outro índice aceito para a avaliação de risco de uma substância. O PNEC é derivado do menor valor da toxicidade aguda (LC_{50} , EC_{50}) dividido por fator de 1000 (Hernando et al. 2006). O valor para PNEC é obtido experimentalmente através de metodologia prevista na EMEA. Este valor estima qual a concentração em que uma substância pode ser encontrada no ambiente sem trazer perigo a este meio. Quando se usa dados de toxicidade crônica, ou seja, Concentração de Efeito Não Observado (NOEC), o valor é dividido por fator de 10 (Carlson et al., 2006).

A relação $PEC/PNEC$ é utilizada para avaliar o risco ambiental de uma determinada substância. O valor resultante desta relação é conhecido como quociente de risco (QR) e 1 foi o valor estipulado como sendo o limite máximo para que uma substância não apresente risco ao ambiente. Pode ser utilizada para o cálculo de QR a Concentração Ambiental Medida (MEC) que é estabelecida pela determinação do composto. Sendo proposto um critério para a avaliação de risco que o QR seja $< 0,1$ como mínimo risco para organismos aquáticos, $0,1 \leq QR < 1$ risco médio e $QR \geq 1$ risco alto (Hernando et al., 2006).

2.8. Método de análise

Para determinação de fármacos no ambiente, a técnica instrumental mais utilizada é a cromatografia, principalmente cromatografia líquida, acoplada a detectores de fluorescência, ultravioleta, e, nas últimas décadas, detectores de massas têm sido de uso preferencial

(Carrera et al., 2010). A Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS) permitiu à química analítica a análise de complexas misturas de compostos orgânicos no nível de traços. Um exemplo é o trabalho desenvolvido por Ferrer et al., (2010), onde foram analisados 70 fármacos em água potável e efluente.

A LC-MS é uma técnica hifenada que combina a capacidade de separação do HPLC com o poder de detecção do espectrômetro de massa. Mesmo com um instrumento de detecção muito sofisticado, o HPLC é útil para remover as interferências da amostra que podem influenciar a ionização do analito. A maioria dos instrumentos recorre à técnica de ionização à pressão atmosférica (API), em que a eliminação do solvente e a etapa de ionização ocorrem na fonte de ionização (Crotti, 2006).

As interfaces de ionização mais utilizadas correspondem a fontes de ionização a pressão atmosférica por *electrospray* (ESI) e por ionização química (APCI). As interfaces APCI e ESI constituem a melhor escolha para a análise de fármacos e a sua seleção deve ser efetuada atendendo aos compostos estudados. Recorrendo a ionização por ESI e APCI as moléculas são protonadas no modo de ionização positivo $[M+H]^+$ e desprotonadas no modo de ionização negativo $[M-H]^-$, e também pode ocorrer a formação de adutos iônicos (Crotti, 2006).

Um instrumento simples de LC-MS é o que possui apenas um analisador Quadrupolo (Q-MS), onde todos os compostos são ionizados, o que resulta em dados espectrais bastante complexos e ambíguos, tendo em vista que os componentes da matriz também são ionizados. O analisador Triplo Quadrupolo (QqQ-MS) compreende em dois analisadores quadrupolos com uma câmara de colisão entre eles, onde podem ser usadas técnicas tais como Dissociação Induzida por Colisão (CID), Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM), Espectro de Íon Precursor (PIS) e Espectro de Perda Neutra (NLS), permitindo maior flexibilidade e precisão experimental (Gross, 2004).

Por outro lado, analisadores de massas com trapeamento iônico (IT-MS) possuem alta sensibilidade e a característica única de isolar e acumular íons (por interação de armadilha de íons e varredura) permitindo espectros de massas do composto de partida e seus fragmentos, resultando em um número variado de padrões de fragmentação. Além disso, a técnica de MS que utiliza IT pode ser operado em modo de Monitoramento de Íon Selecionado (SIM), *Full Scan* (FS), CID e MRM, permitindo MS^n o que faz com que o instrumento com essas características seja adequado para propósitos de identificação e análise quantitativa (Gross, 2004; Skoog, 1992).

O preparo de amostras, para análise, normalmente envolve a extração dos analitos e a subsequente limpeza do extrato com a finalidade de isolar os compostos de interesse e remover interferentes da matriz que afetam os sistemas de análise, aumentando a concentração dos analitos a níveis acima do LOD da técnica analítica. Nas últimas décadas, várias técnicas de extração foram desenvolvidas baseadas na redução do volume de solvente e na automatização das etapas do procedimento de extração. Entre as técnicas mais utilizadas está Extração em fase sólida (SPE). Nesta técnica, um sorvente com alta afinidade para determinados analitos irá reter e concentrar os compostos. Também, tem sido empregada como técnica de limpeza de extratos para remover compostos coextraídos com muitas classes de analitos (Prestes et al., 2013). É amplamente aplicada para muitos tipos de matrizes, incluindo amostras ambientais.

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve passar por um processo denominado validação (RIBANI et al., 2004). A validação é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (NBR ISO/IEC 17025/2005).

Os parâmetros analíticos normalmente utilizados na validação de métodos de separação são linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação (Ribani et al., 2004).

Linearidade é a habilidade do método analítico de produzir resultados que são diretamente, ou por uma transformação matemática bem definida, proporcionais à concentração do analito dentro de uma dada faixa (Barros, 2002).

Seletividade de um método de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa (Ribani et al., 2004).

Precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições definidas, e engloba os estudos de repetitividade e precisão intermediária. Repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento; repetições em um curto intervalo de tempo. Precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores (Ribani et al., 2004). Para avaliação dos parâmetros de precisão, pode-se usar os resultados de recuperação do analito. A recuperação

do analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo. As amostras podem ser fortificadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações: baixa, média e alta, da faixa de uso do método (INMETRO, 2011).

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro.

O parâmetro limite de detecção (LOD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, enquanto que o limite de quantificação (LOQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida (INMETRO, 2011).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Materiais

A parte experimental deste trabalho foi realizada no LATER (Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Efluentes e Resíduos) e LAMIC (Laboratório de Análises Micotoxicológicas) sendo que os aparelhos e equipamentos utilizados são integrantes dos recursos destes laboratórios. O LAMIC trabalha com a ISO 17025, assim todos os equipamentos possuem certificados de calibração.

3.2. Reagentes e soluções

Os reagentes usados nas análises cromatográficas foram de grau HPLC. Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico. Os padrões foram adquiridos da empresa *Sigma Aldrich* (Brasil), com as seguintes especificações: Eritromicina A dihidratada >95%, CAS: 59319-72-1; Claritromicina >95%, CAS: 81103-11-9; Azitromicina >99%, CAS: 83905-01-5 e Roxitromicina >90%, CAS: 80214-83-1.

Os padrões foram preparados em metanol obtendo-se uma solução estoque para cada padrão em separado na concentração de 1000 mg L⁻¹ para ERI, CLARI e ROXI, e de 2500 mg L⁻¹ para AZI. A partir destas soluções foram preparadas diluições conforme a necessidade de uso para os experimentos e análises cromatográficas, sendo estes diluídos em solução de Acetonitrila:água (1:1).

3.3. Estabilidade dos macrolídeos

A estabilidade dos macrolídeos foi testada em diferentes valores de pH. Soluções aquosas de AZI, CLARI, ERI e ROXI, com concentração de 10 µg L⁻¹ tiveram seus pH

ajustados com solução de ácido fórmico 10% e/ou hidróxido de amônio 10%, na faixa de 3 a 11. A determinação da concentração foi feita no ato e 24 h depois (temperatura de 20 ± 2 °C e protegidas da luz).

Foi verificada, também, a estabilidade dos antibióticos (sem ajuste de pH) em amostras dispostas à temperatura ambiente (20 ± 2 °C), com e sem a presença de luz ambiente, bem como a 4 °C e -20 °C no período de um mês, e determinadas a cada 5 dias. Estas amostras foram preparadas na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando solução de acetonitrila:água (1:1).

3.4. Coleta das amostras de efluente hospitalar

O efluente do HUSM passa por um tratamento dotado de fossa séptica, com capacidade volumétrica de $38,4 \text{ m}^3$. Este efluente é conduzido através de tubulação localizada na parte superior da fossa, por gravidade, para a parte inferior do filtro anaeróbio. O filtro anaeróbio, com capacidade para $15,12 \text{ m}^3$, possui uma divisória de lajes pré-moldadas, com orifícios de 3 cm e, à medida que aumenta o volume o efluente atravessa os orifícios atingindo uma camada de brita. A parte superior do filtro possui uma calha que conduz o sobrenadante para fora da caixa, encerrando o tratamento.

O sistema de saneamento do HUSM contém dois locais para o lançamento do esgoto tratado e um corpo receptor (córrego). O ponto A (Figura 6 a) compreende os esgotos lançados pelo PA-HUSM dos efluentes da ala sul do hospital, enquanto que, o ponto B (Figura 6 b) contém o esgoto lançado pelos demais setores do HUSM. Contudo, esse ponto recebe, ainda, adicionalmente, o esgoto gerado pela biblioteca central da UFSM. Esses dois pontos lançam todo o esgoto num único corpo receptor (Figura 6 c) (Wilde, 2012).

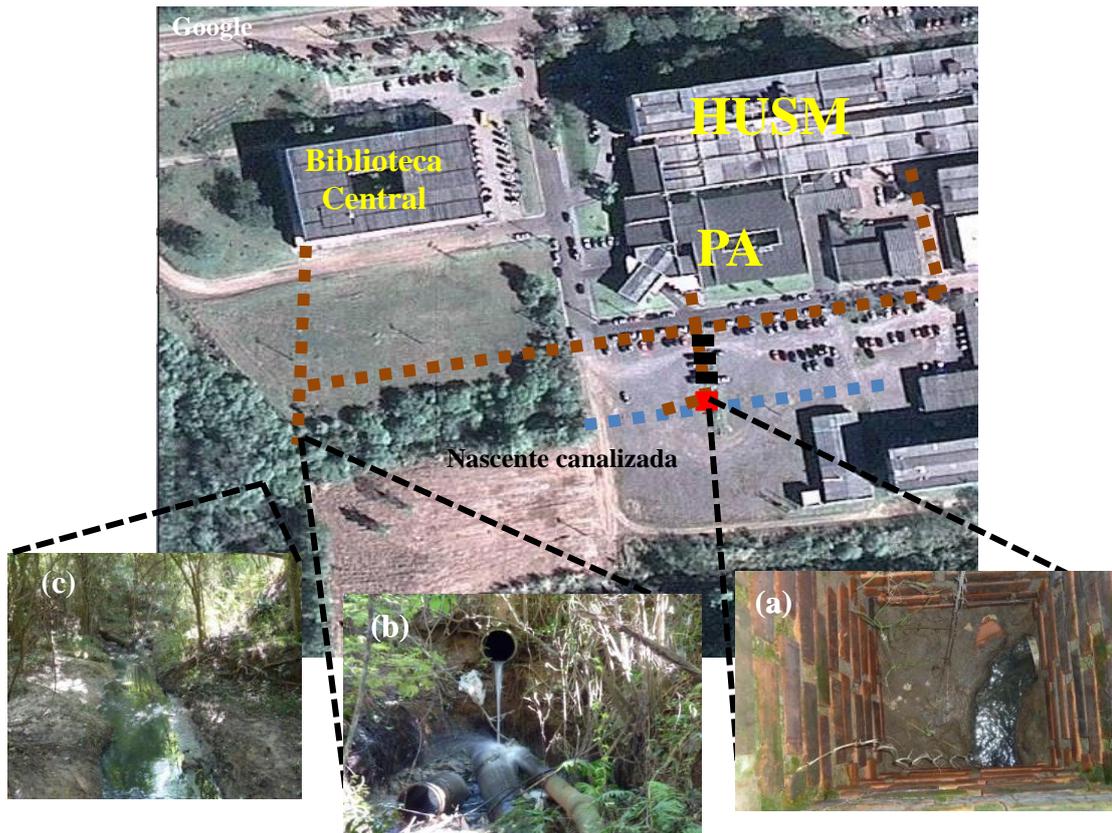


Figura 6. Esquema ilustrativo do sistema de esgotos do HUSM (Wilde, 2012).

Para este estudo foram coletadas amostras do efluente do PA-HUSM (Ponto A) e do corpo receptor (Ponto B) (Figura 6 a e c). Na Figura 7 é apresentado um esquema ilustrativo dos pontos de coleta.

As amostras foram coletadas em frascos de polietileno, filtradas em papel filtro qualitativo de porosidade de $14 \mu\text{m}$. Após foram filtradas em filtro de nitrato de celulose de porosidade $0,45 \mu\text{m}$ e armazenadas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

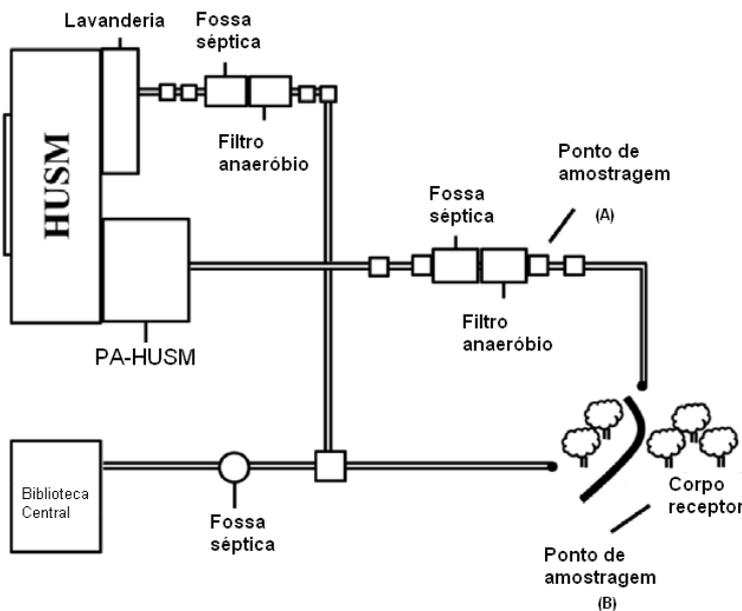


Figura 7. Esquema ilustrativo dos pontos de amostragem do efluente hospitalar (Wilde et al., 2012).

Para a determinação de AZI, CLARI, ERI e ROXI, presentes no efluente, as amostras foram coletadas durante 7 dias. Cada amostragem realizada ao longo do dia (às 7, 9, 11, 13, 15, 17 e 19 h) foi analisada. Para verificar se ocorria variação entre o período do dia e da noite, foi feita uma coleta de 24 horas, com subamostragens a cada duas horas.

3.5. Planejamento fatorial das condições de pré-concentração.

Alguns estudos sobre a determinação de antibióticos macrolídeos utilizaram SPE para a extração destes, porem nenhuma otimização das variáveis de extração por SPE foi feita (Abuin et al., 2006; Yang & Carlson, 2004). Assim, neste estudo, decidiu-se por utilizar planejamento fatorial para a escolha das condições de extração mais adequadas.

Para otimização das condições de *clean-up*/pré-concentração de SPE, foi utilizado planejamento fatorial, que tem como objetivo a determinação do número de ensaios a ser realizado, assim como descobrir experimentalmente propriedades particulares de um fenômeno ou comparar efeitos da variação de condições experimentais. O planejamento

fatorial leva em conta a interação entre o conjunto de diferentes variáveis sobre uma variável resposta dependente, buscando, a maior precisão estatística possível na resposta. As variáveis independentes a serem estudadas são escolhidas e os experimentos são realizados com diferentes valores destas. A metodologia de superfície de resposta (RSM) usa duas etapas distintas, modelagem e deslocamento, que são repetidas até alcançar-se superfície ótima para a investigação. O planejamento de composto central (CCD) é a metodologia mais aplicada das metodologias de superfície de resposta.

A fim de adequar as condições de trabalho para a otimização do procedimento de *clean-up*/pré-concentração do efluente hospitalar no tratamento do efluente hospitalar foi utilizado CCD. Foi elaborado planejamentos 2^3 para os experimentos; as variáveis independentes utilizadas foram pH da amostra (7, 8, 9, 10, 11), pH da água de condicionamento (6, 7, 8, 9, 10) e % acetonitrila utilizada na eluição dos analitos (60, 70, 80, 90, 100). Os resultados obtidos foram submetidos à verificação do modelo que melhor se adequou a cada planejamento foi feita com o software STATISTICA 6.0. A variável dependente do planejamento foi a concentração recuperada dos antibióticos em estudo.

3.6. *Clean-up* e pré-concentração

A otimização da extração de antibióticos macrolídeos foi feita primeiramente em amostras de soluções padrões em água, considerando a interação entre os compostos estudados e o sorvente escolhido. O sorvente escolhido para o presente estudo foi o sorvente Strata-X 3 mL/200 mg (Phenomenex), um sorbente que possui uma superfície modificada de estireno divinilbenzeno polimérico, superfície que tem mecanismos de retenção que servem para fármacos polares e apolares.

A amostra foi percolada pelo cartucho utilizando um sistema Manifold à vácuo para SPE e bomba de vácuo. Os cartuchos foram condicionado com 5 mL de metanol seguidos por 5 mL de água (pH 7), após, 10 mL de amostra (pH 8) foram percolados pelo cartucho, vazão aproximada de 2 mL min^{-1} . O cartucho foi lavado com 5 mL de água Milli-Q. O ajuste de pH foi feito utilizando solução de ácido fórmico e/ou hidróxido de amônio na concentração de 10%. O cartucho foi seco sob fluxo de ar. Para a eluição foi utilizado 1 mL de solução de acetonitrila:acetato de amônio $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, (9:1), o qual foi evaporado sob fluxo de nitrogênio, a reconstituição foi com 500 μL do diluente (acetonitrila:água, 1:1) e este foi acondicionado em vial e levado para análise. O fator de concentração foi de 20 x (Figura 8).

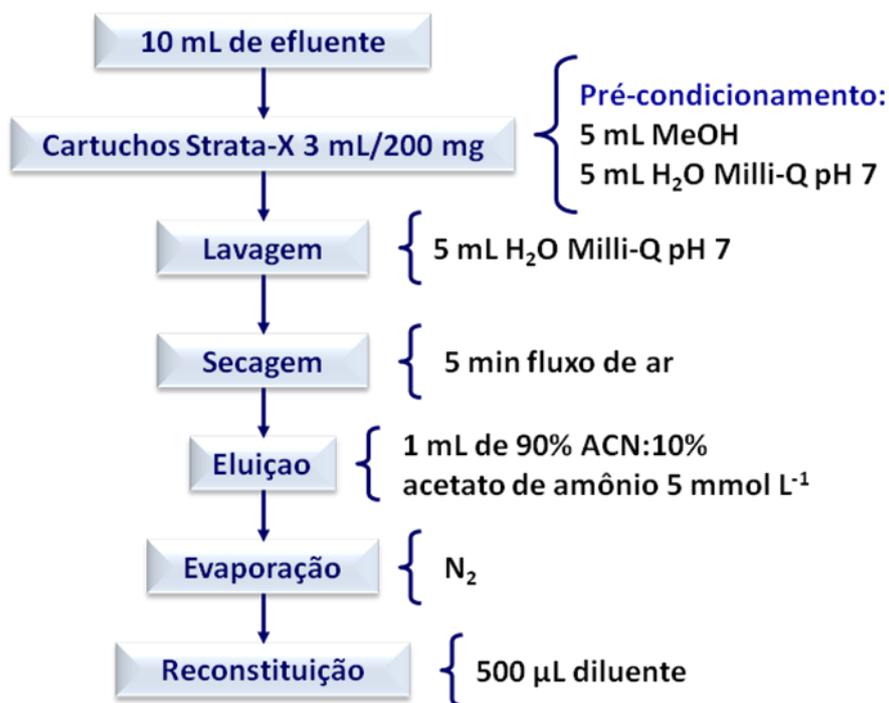


Figura 8. Esquema do procedimento de *clean-up*/pré-concentração do efluente hospitalar.

3.7. Otimização do sistema cromatográfico

Para a otimização do método cromatográfico foram feitos experimentos analisando diferentes fases móveis, colunas e temperaturas de forno.

Os experimentos para teste de fase móvel foram conduzidos com vazão de 500 $\mu\text{L min}^{-1}$ e volume de injeção de 5 μL . Foi utilizado rampa de fase móvel, iniciando em 100% de fase A e acabando com 100% da fase B (A: aquosa com aditivo; B: orgânica com aditivo) por 30 min. A coluna utilizada foi uma Eclipse XDB-C18, 5 μm , 4.6 x 150 mm. Foram testas as seguintes fases móveis: A: acetato de amônio 0,005 mol L⁻¹; B: Metanol; A: ácido fórmico 1%; B: Metanol; A: ácido acético 1%; B: Metanol; A: acetato de amônio 0,005 mol L⁻¹; B: Acetonitrila; A: ácido fórmico 1%; B: Acetonitrila e A: ácido acético 1%; B: Acetonitrila.

Para os experimentos de coluna foi utilizada a fase móvel que forneceu a melhor resultados nos testes de fase, com vazão de 500 $\mu\text{L min}^{-1}$, volume de injeção de 5 μL e rampa de fase móvel, iniciando em 100% de fase A e acabando com 100% da fase B. Foram testadas as seguintes colunas: Eclipse XDB-C18, 5 μm , 4.6 x 150 mm; Eclipse XDB-C8, 5 μm , 4.6 x

150 mm; Zorbax ODS, 5 μ m, 4.6 x 150 mm; Synergi 4 μ , Fusion-RP 80 4.6 x 150 mm e Nucleosil 5 μ NH₂ 100A 4.6 x 150 mm.

Após a escolha das fases e colunas, trabalhou-se no gradiente da cromatografia, verificado que uma vazão de 800 μ L min⁻¹ foi a mais adequada no modo gradiente (Tabela 5). O tempo de cromatografia foi ajustado em 10 minutos. Após estes parâmetros estabelecidos a temperatura do forno foi testada em 20 °C; 30 °C e 40 °C.

Tabela 5. Gradiente da fase móvel utilizadas.

Tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0,0	80	20
1,0	80	20
3,0	50	50
7,0	50	50
7,1	10	90
8,0	10	90
8,1	80	20
10,0	80	20

3.8. Determinação cromatográfica dos macrolídeos, identificação de metabólitos e produtos de transformação por LC-ESI-MS/MS

A separação cromatográfica dos macrolídeos foi feita com o uso de um cromatógrafo Agilent Series 1200 equipado com bomba binária, degaseificador, forno de coluna, e amostrador automático. A coluna utilizada foi Eclipse XDB-C8, 5 μ m, 4.6 x 150 mm (Agilent Technologies), mantida a 30 °C. A fase móvel utilizada foi bombeada no modo de gradiente sendo a fase A: água, 1% ácido fórmico, e, fase B: acetonitrila, 1% ácido fórmico. A vazão utilizada foi 800 μ L min⁻¹ e o volume de injeção foi de 5 μ L. O tempo de separação cromatográfica foi ajustado em 10 minutos. O *software* utilizado para controle e aquisição de dados foi o Analyst 1.4.2 da Applied Biosystems.

Os compostos foram identificados e quantificados por meio de um espectrômetro de massas Applied Biosystems/MDS Sciex 4000 Q_trap triplo quadruplo provido de fonte de ionização por *electrospray* Turbo Íon Spray. Foi utilizado a fonte de ionização no modo positivo. Os parâmetros do Q_Trap 4000 (*declustering potential* - DP, *collision energy* - CE, *collision cell exit potential* - CXP e *entrance potential* - EP) referentes aos analitos foram otimizados, infundindo-se diretamente no aparelho soluções de 100 µg L⁻¹ de AZI, CLARI, ERI e ROXI. As condições de fonte de ionização (*collision gas* - CAD, *curtain gas* - CUR, *ion source gas 1* - GS1, *ion source gas 2* - GS2, *ion spray voltage* - IS, *temperature* - TEM) foram otimizadas através de análise por injeção em fluxo de 10 µg L⁻¹.

O modo linear de scan IDA ion trap foi usado para determinação de metabólitos e produtos de degradação. Foi utilizado o *software* LightSight 2.3 para auxílio na automatização do processo de identificação de metabólitos.

3.9. Validação do método

Os testes foram desenvolvidos conforme a recomendações da ANVISA (2005) e INMETRO (2011).

A seletividade foi avaliada pelas análises dos cromatogramas de padrão, e comparação com uma amostra branco e uma amostra fortificada com padrão, para verificação da presença ou não de interferentes.

A curva analítica foi avaliada a partir de análise cromatográfica de uma solução de padrões dos antibióticos preparados em metanol e outra curva preparada na matriz (efluente). As concentrações utilizadas para a confecção das curvas analíticas foram de 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 µg L⁻¹ e analisadas em triplicatas. Foi avaliada a linearidade do método através da análise de regressão utilizando os mínimos quadrados.

Para a determinação dos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) utilizou-se como parâmetro de avaliação a relação sinal-ruído, pela injeção dos padrões analíticos em triplicata, visando alcançar 3 vezes o sinal/ruído para o LOD e 10 vezes o sinal/ruído para o LOQ. Para confirmação dos limites de detecção e de quantificação, foram feitas 7 análises independentes da amostra sem o analito e com o analito, na menor concentração. Foi calculado a média e desvio padrão dos resultados.

Para avaliar a exatidão do método fortificou-se as amostras de efluente hospitalar com 3 níveis de concentração que foram analisadas em triplicata. O estudo da precisão do

instrumento foi realizado efetuando-se 6 injeções de cada concentração das soluções analíticas no sistema LC-MS/MS. Para avaliar a precisão intermediária, as amostras foram analisadas em dias diferentes. Para determinar a repetitividade (RSD_r) e a Precisão intermediária (RSD_{pi}), foram analisadas um conjunto de amostras fortificadas em 3 níveis, cada nível foi analisado em triplicata.

Para determinar o efeito de matriz foram coletadas amostras de efluente hospitalar e a seguir filtradas e fortificadas. Em seguida foi realizada a técnica de SPE. O cálculo do efeito de matriz (Vieno et al., 2006).

$$ME(\%) = \frac{A_{std} - (A_a - A_b)}{A_{std}} \cdot 100 \quad (3)$$

Onde: - ME(%) é o efeito de matriz em percentagem;

- A_{std} = Área do pico do analito em solvente puro;
- A_a = Área do pico da matriz enriquecida com o analito;
- A_b = Área do pico da matriz sem enriquecimento.

3.10. Avaliação de risco preliminar da exposição de antibióticos macrolídeos no meio ambiente

Estudo conduzido por Vasconcelos et al. (2006) mostrou que o consumo de água do HUSM é em torno de 1,3 m³/paciente.dia e, o lançamento de esgoto do HUSM possui um fluxo médio de aproximadamente 190 m³ dia⁻¹.

Segundo Carlsson et al. (2006) para a predição foram considerados alguns critérios, sendo estes considerados como a pior hipótese. Para os cálculos de PEC as seguintes situações foram admitidas: todo o fármaco receitado foi usado para o tratamento no hospital; a fração de fármacos excretada foi lançada no sistema de esgotos; sem transformações dos fármacos após a excreção no sistema de esgotos e o padrão de uso foi distribuído uniformemente temporal e espacialmente.

Para a predição em águas superficiais, riacho ou córrego, onde os esgotos do HUSM são lançados após passar pela fossa séptica - filtro anaeróbico, o fator de diluição (10) foi inserido na Equação 4.

$$PEC_{Córr.} = \frac{A \cdot E}{V_{Efl.} \cdot 365 \cdot D} \quad (4)$$

A excreção de 5% foi assumida para ERI, com respeito à absorção e excreção sem transformação na urina, enquanto que para a AZI 72%, para CLARI 40% e ROXI 74% de excreção (Tavares, 1996). O quociente de risco de cada fármaco foi calculado dividindo PEC por PNEC. Os valores de PEC foram estimados pelas Equações 2 e 4.

3.11. Degradação por fotólise

Para os experimentos de degradação por fotólise foi utilizado um fotorreator com capacidade de 500 mL utilizando uma lâmpada de média pressão de mercúrio com 125 W potência e 401 W m⁻² de intensidade. A temperatura foi mantida entre 27±2 °C por recirculação de água. Foi feito experimento para cada composto em separado na concentração de 2000 µg L⁻¹ e nos pH de 3, 5, 7, 9, 11 em solução aquosa. O tempo de cada experimento foi de 60 min, com coleta de alíquota de 2 mL, de 5 em 5 min. Para a degradação dos antibióticos macrolídeos em efluente hospitalar foram utilizadas as mesmas condições, com pH 7.

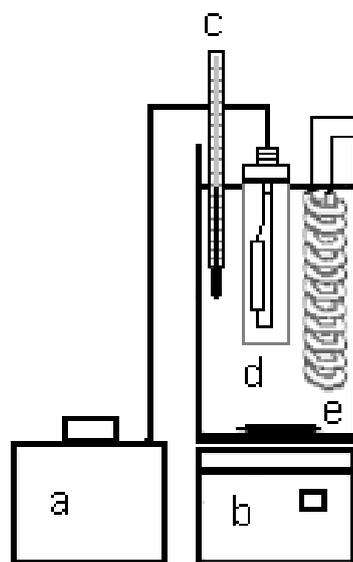


Figura 9. Fotorreator utilizado na degradação dos antibióticos. a) fonte da lâmpada; b) agitador magnético; c) termômetro; d) lâmpada UV; e) sistema para manutenção da temperatura.

3.12. Cinética de degradação

Estudos envolvendo a cinética de degradação dos antibióticos também foram avaliados. 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, os antibióticos macrolídeos.

$$\frac{d[AM]}{dt} = -k[AM] \quad (5)$$

Onde $[AM]$ é a concentração de AZI, CLARI, ERI ou ROXI, t é o tempo de reação de fotodegradação e k é a constante de velocidade de reação. A Equação 5 pode ser independentemente integrada entre os limites $t_0([AM]_0)$ e $t([AM])$, como segue:

$$\int_{[AM]_0}^{[AM]} \frac{d[AM]}{[AM]} = -k \int_0^t dt \quad (6)$$

Apartir daí, obtém-se:

$$\ln\left(\frac{[AM]}{[AM]_0}\right) = -kt \quad [AM] = [AM]_0 e^{-kt} \quad (7)$$

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) foi calculado, considerando-se $[AM] = \frac{1}{2} [AM]_0$, na Equação 7, como resultado obtém-se a equação:

$$t_{1/2} = \ln \frac{2}{k} \quad (8)$$

Neste estudo adotou-se apenas a determinação de k em diferentes pH (3-11) com objetivo de avaliar o comportamento dos antibióticos macrolídeos frente a fotólise em solução.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento do método por LC-MS/MS

A partir das infusões feitas, de cada um dos compostos, foram determinados os parâmetros do espectrômetro de massas (Tabela 6). Os antibióticos apresentaram maior intensidade com a utilização da fonte de ionização ESI no modo positivo, sendo este selecionado como modo padrão. Foram utilizados três fragmentos para a identificação de cada composto, sendo o mais intenso usado para quantificação e os outros dois utilizados para a confirmação. Os fragmentos de m/z 158 e 116 são característicos dos macrolídeos devido à ruptura dos açúcares cladinose e desosamina (Abuin et al., 2006; Nollet & Gelder, 2007).

Os fragmentos obtidos para quantificação e confirmação estão de acordo com o estudo feito por Nodler et al. (2010) e Ferrer et al. (2010).

Tabela 6. Parâmetros do espectrômetro de massas otimizados referentes aos analitos AZI, CLARI, ERI e ROXI.

Composto	Transição selecionada	DP ^a	CE ^b	CXP ^c	EP ^d
AZI	750,5→592,4	111,0	39,0	14,0	10,0
	750,5→158,0	111,0	57,0	8,0	10,0
	750,0→116,0	111,0	65,0	6,0	10,0
CLARI	748,5→590,0	86,0	39,0	6,0	10,0
	748,5→116,2	86,0	29,0	8,0	10,0
	748,5→158,2	86,0	71,0	4,0	10,0
ERI	735,5→577,4	91,0	43,0	14,0	10,0
	735,5→116,1	91,0	29,0	14,0	10,0
	735,5→158,2	91,0	73,0	20,0	10,0
ROXI	837,5→679,4	96,0	31,0	10,0	10,0
	837,5→158,2	96,0	49,0	14,0	10,0
	837,5→116,1	96,0	73,0	20,0	10,0

^aDP: declustering potential; ^bCE: collision energy; ^cCXP: collision cell exit potential; ^dEP entrance potential.

Para os parâmetros de fonte de ionização (Tabela 7) foi feito FIA com uma solução padrão contendo os quatro compostos na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 7. Parâmetros da fonte de ionização.

Parâmetros	Valores
CAD ^a	Médio
CUR ^b	18
GS1 ^c	50
GS2 ^d	40
IS ^e	5000
TEM ^f	600

^aCAD: *collision gas*; ^bCUR: *curtain gas*;
^cGS1: *ion source gas 1*; ^dGS2: *ion source gas 2*;
^eIS: *ion spray voltage*; ^fTEM: *temperature*.

Para a separação cromatográfica a fase móvel que se obteve os melhores resultados foi aquosa com 1% de ácido fórmico e acetonitrila com 1% ácido fórmico (Figura 10). Após trabalhou-se na cromatografia, onde foi verificado que uma vazão de $800 \mu\text{L min}^{-1}$ foi a mais adequada. O tempo de cromatografia foi ajustado em 10 minutos. Na revisão feita por Seifrtova et al. (2009) a maioria os métodos faz uso de acetonitrila para a separação cromatografia, assim como, o uso de ácido fórmico como aditivo.

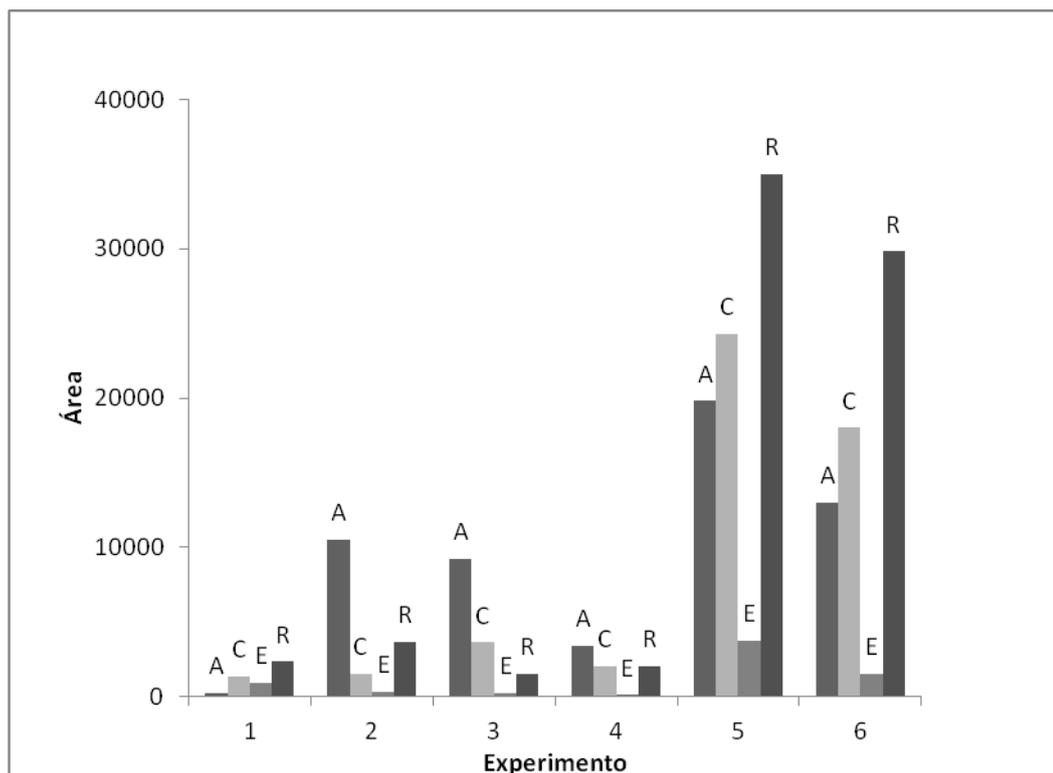


Figura 10. Resultados do teste de fase móvel. 1 (A: acetato de amônio 0,005 mol L⁻¹; B: Metanol); 2 (A: ácido fórmico 1%; B: Metanol); 3 (A: ácido acético 1%; B: Metanol); 4 (A: acetato de amônio 0,005 mol L⁻¹; B: Acetonitrila); 5 (A: ácido fórmico 1%; B: Acetonitrila) e 6 (A: ácido acético 1%; B: Acetonitrila). A: azitromicina; C: claritromicina; E: eritromicina e R: roxitromicina.

A coluna que apresentou melhor separação cromatográfica foi a Eclipse XDB-C8, 5 μ m, 4.6 x 150 mm (Figura 12). Segundo Seifrtova et al. (2009), são utilizadas em sua maioria colunas C18, entretanto, neste estudo obteve-se resultados mais satisfatórios com coluna C8.

A temperatura da coluna foi ajustada em 30° C, em virtude do aumento da área para dois compostos, sendo um a eritromicina que é o composto que possui menor sensibilidade no método (Figura 11).

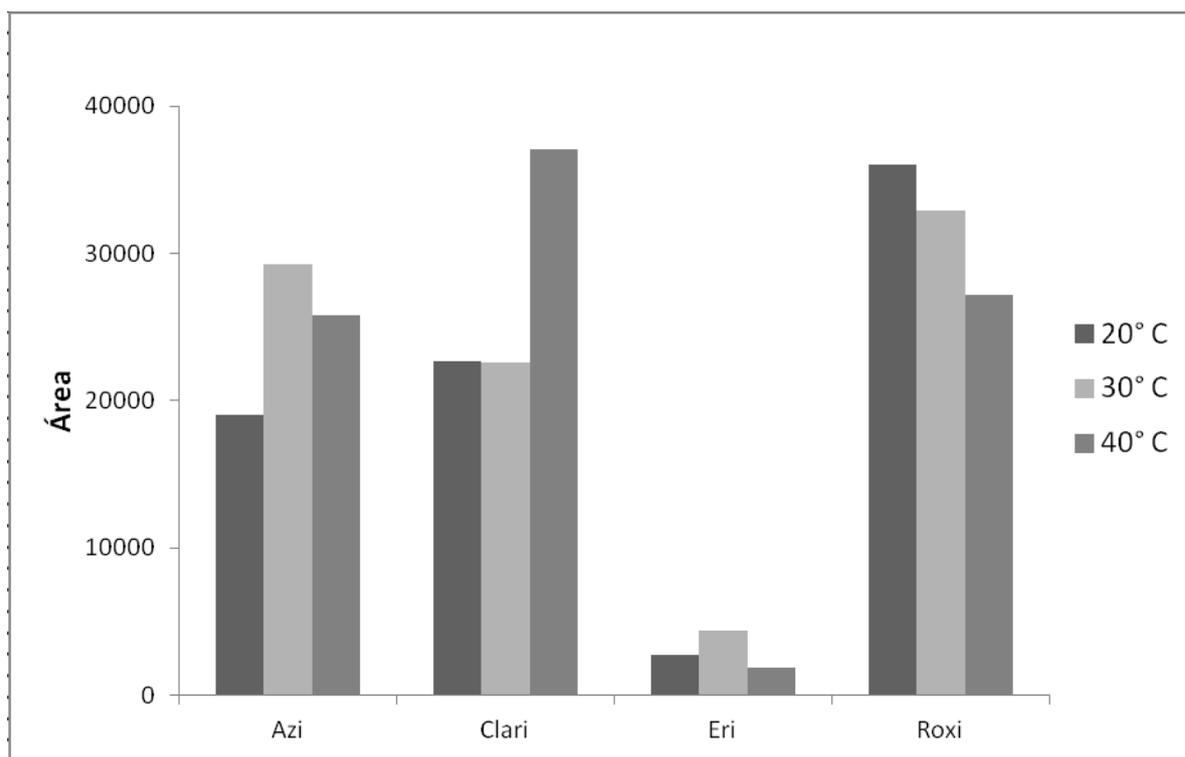


Figura 11. Resultados do teste de temperatura do forno da coluna.

A Figura 12 apresenta o cromatograma no modo MRM, com todas as transições. Pode se observar que a separação cromatográfica obtida é satisfatória, conseguindo-se uma pequena separação dos compostos CLARI e ROXI, os quais, segundo literaturas consultadas acabam eluindo no mesmo tempo de retenção, como foi demonstrado por Abuin et al. (2006), que desenvolveram método para a determinação de antibióticos macrolídeos em águas de rio. A coeluição de CLARI e ROXI também pode ser visualizada no trabalho de Li et al. (2006)

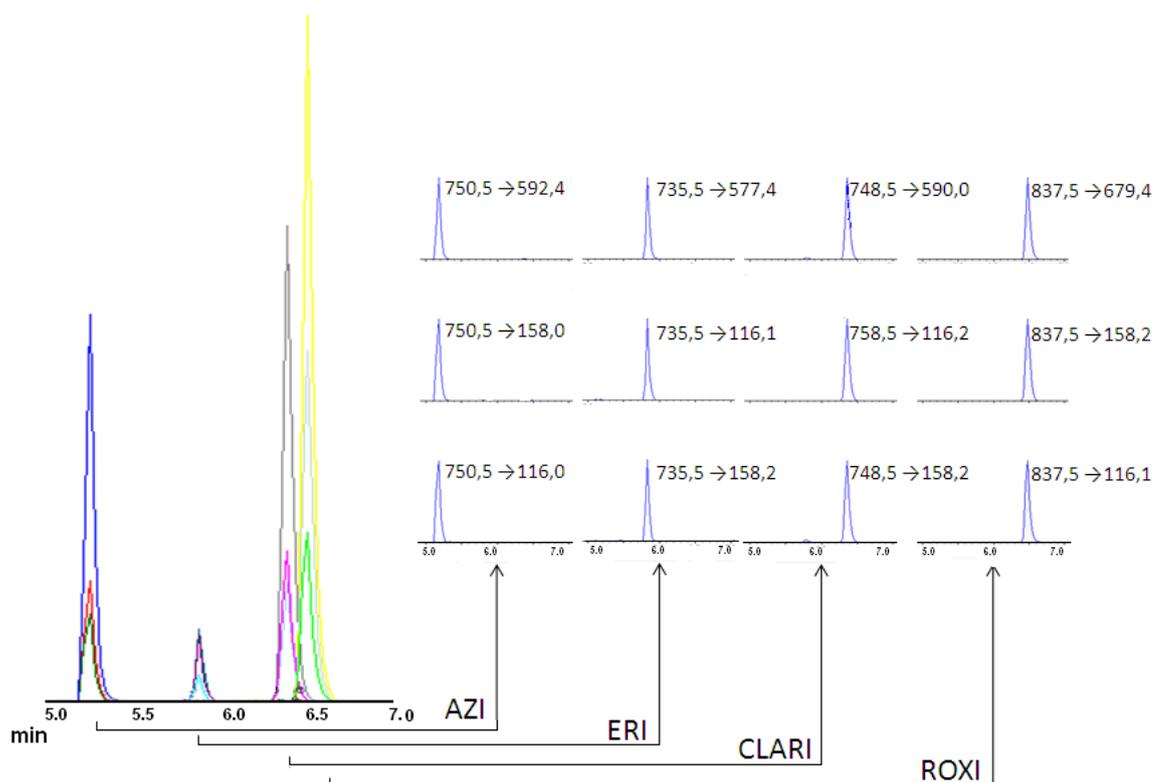


Figura 12. Cromatograma de solução padrão de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ dos macrolídeos nas condições validadas.

4.2. Estabilidade dos antibióticos macrolídeos

O objetivo dos testes de estabilidade é identificar e avaliar qualquer degradação significativa do analito quando submetido ao armazenamento em longo prazo e condições adversas (Isla et al., 2005).

O pH do efluente hospitalar do HUSM, se encontra numa faixa de 6-7. Um teste com diferentes pH foi elaborado para avaliar a estabilidade dos antibióticos, em 24 h, para possíveis degradações durante o tempo que as amostras ficam esperando para análise. Foram testados os pH 3, 5, 7, 9 e 11. Com relação ao teste pode-se afirmar que AZI e ROXI são estáveis nos pH testados, a CLARI após 24 h tem uma degradação de 24% em pH 3, sendo estável nos demais pH. Em relação a ERI, como esperado em pH 3, ela é convertida imediatamente no seu produto de degradação a ERI desidratada (Seifrtora et al., 2009), nos

demais pH ela apresenta uma pequena degradação, principalmente nos pH 9 e 11, apresentando 21% e 25%, respectivamente em 24 horas (Figura 13).

Para as amostras mantidas a temperatura ambiente (20 ± 2 °C), no escuro ou sob a presença de luz, observa-se degradação a partir do quinto dia de armazenamento para a ERI, para as demais a partir do décimo dia ocorre uma pequena porcentagem de degradação, principalmente nas amostras mantidas sob luz. Para os padrões armazenado a 4 °C a ERI apresenta degradação de 16% após 15 dias e AZI, CLARI e ROXI apresentaram 4%, 6% e 5% de degradação, para as amostras mantidas a -20 °C não observou-se degradação.

O estudo de estabilidade destes compostos foi feito para verificar o comportamento destes durante os experimentos realizados e tempo de análise, pois os dados da literatura normalmente referem-se ao estudo da estabilidade do medicamento processado, e não apenas do princípio ativo, como é o caso do estudo feito por Moreno et al. (2009) e Sotiro (2007).

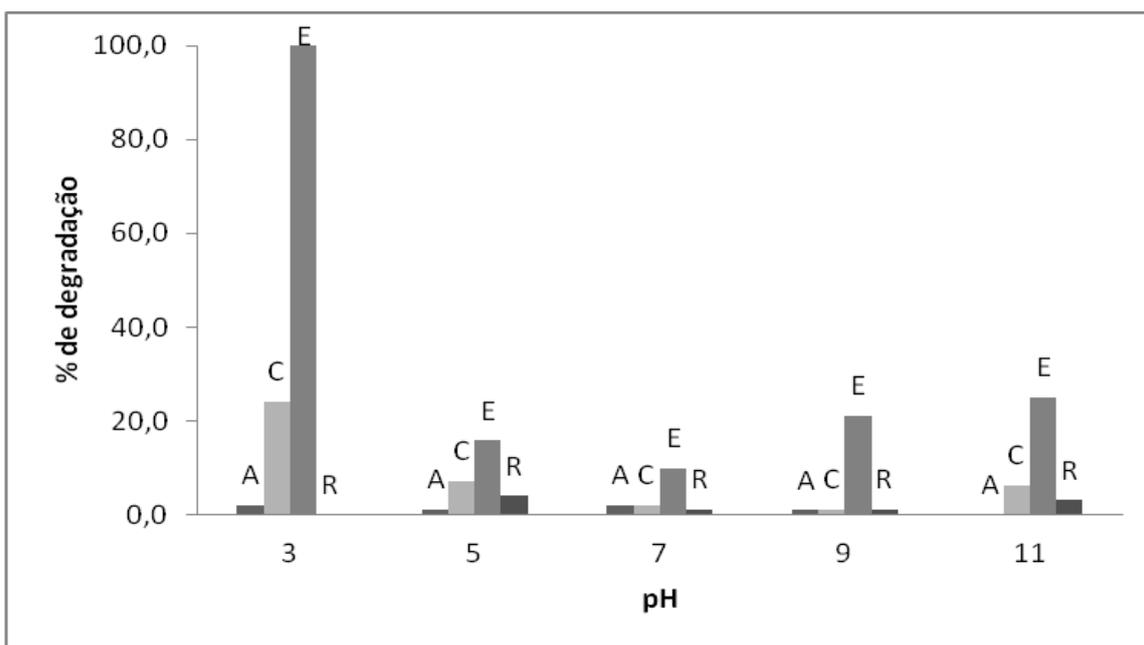


Figura 13. Porcentagem de degradação em diferentes pH após 24 horas. A: azitromicina; C: claritromicina; E: eritromicina e R: roxitromicina.

4.3. Extração em fase sólida

A extração em fase sólida foi escolhida em virtude do efluente hospitalar se caracterizar por sua complexa matriz, que interfere nas análises de microcontaminantes como fármacos. A eliminação destes interferentes foi considerada necessária e esta técnica foi adotada por ser mais usada para *clean-up* e pré-concentração nestas condições.

Alguns estudos sobre a determinação de antibióticos macrolídeos utilizaram SPE para a extração destes, porém, nenhuma otimização das variáveis de extração por SPE foi feita (Abuin et al., 2006; Yang & Carlson, 2004).

As variáveis, assim como os respectivos níveis estudados e a recuperação dos analitos, podem ser observadas na Tabela 8. As replicatas para os quatro antibióticos estudados apresentaram RSD abaixo de 10%.

Tabela 8. Planejamento experimental para a otimização das variáveis de extração em fase sólida por metodologia de superfícies de resposta (RSM) para os antibióticos macrolídeos estudados e as respectivas respostas.

Item	Variáveis			Níveis				
				$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
X₁	pH da amostra			7	8	9	10	11
X₂	pH da H₂O			6	7	8	9	10
X₃	ACN (%)			60	70	80	90	100
Exp.	pH da amostra	pH da H ₂ O	ACN(%)	REC. AZI (%)	REC. CLARI (%)	REC. ERI(%)	REC. ROXI (%)	
1	8	7	70	80,7	98,7	88,9	83,9	
2	8	7	90	88,7	101,8	95,6	91,6	
3	8	9	70	78,2	88,2	85,3	83,5	
4	8	9	90	73,5	86,3	85,7	89,4	
5	10	7	70	77,7	87,7	91,9	82,5	
6	10	7	90	79,9	89,9	86,3	89,4	
7	10	9	70	74,9	84,9	82,9	66,9	
8	10	9	90	75,5	85,5	90,2	83,9	
9	7	8	80	74,6	84,6	78,3	69,5	
10	11	8	80	74,8	74,8	88,1	78,8	
11	9	6	80	66,1	86,1	90,9	84,7	
12	9	10	80	73,9	83,9	90,9	80,7	
13	9	8	60	76,6	86,6	81,9	64,4	
14	9	8	100	77,7	87,7	94,5	86,5	
15	9	8	80	79,2	89,2	93,1	85,7	
16	9	8	80	74,7	84,7	91,2	85,4	
17	9	8	80	78,9	85,9	91,4	85	
18	9	8	80	75,5	85,5	92,9	85,7	

Por meio dos experimentos de planejamento fatorial pode-se afirmar que as maiores recuperações foram alcançadas quando o pH da amostra foi ajustado em 8, enquanto que o pH da água durante a etapa de condicionamento foi ajustado em 7 e a % acetonitrila de 90%.

A Figura 14 mostra a superfície de resposta para o planejamento de extração da AZI. A interação entre o pH da água e o pH da amostra (A) indica que toda a faixa de ajuste do pH da amostra apresenta disponibilidade para ser usada, entretanto, está ligada com o pH da água de condicionamento e lavagem que apresenta melhores condições entre pH 8 e 6,5. Para a interação em porcentagem de acetonitrila e pH da amostra (B) fica nítida a necessidade da porcentagem de acetonitrila ser maior que 90% para que ocorra uma eluição satisfatória da AZI. Para a interação entre a porcentagem de acetonitrila e pH da água (C) mostram-se dois máximos, mas para % menores de acetonitrila necessita-se que a água esteja em pH mais básico, porém, em pH mais alto na água de lavagem poderia levar a eluição deste composto visto o pKa deste, devido a proximidade de pH acarretando numa afinidade entre a água de lavagem e o composto.

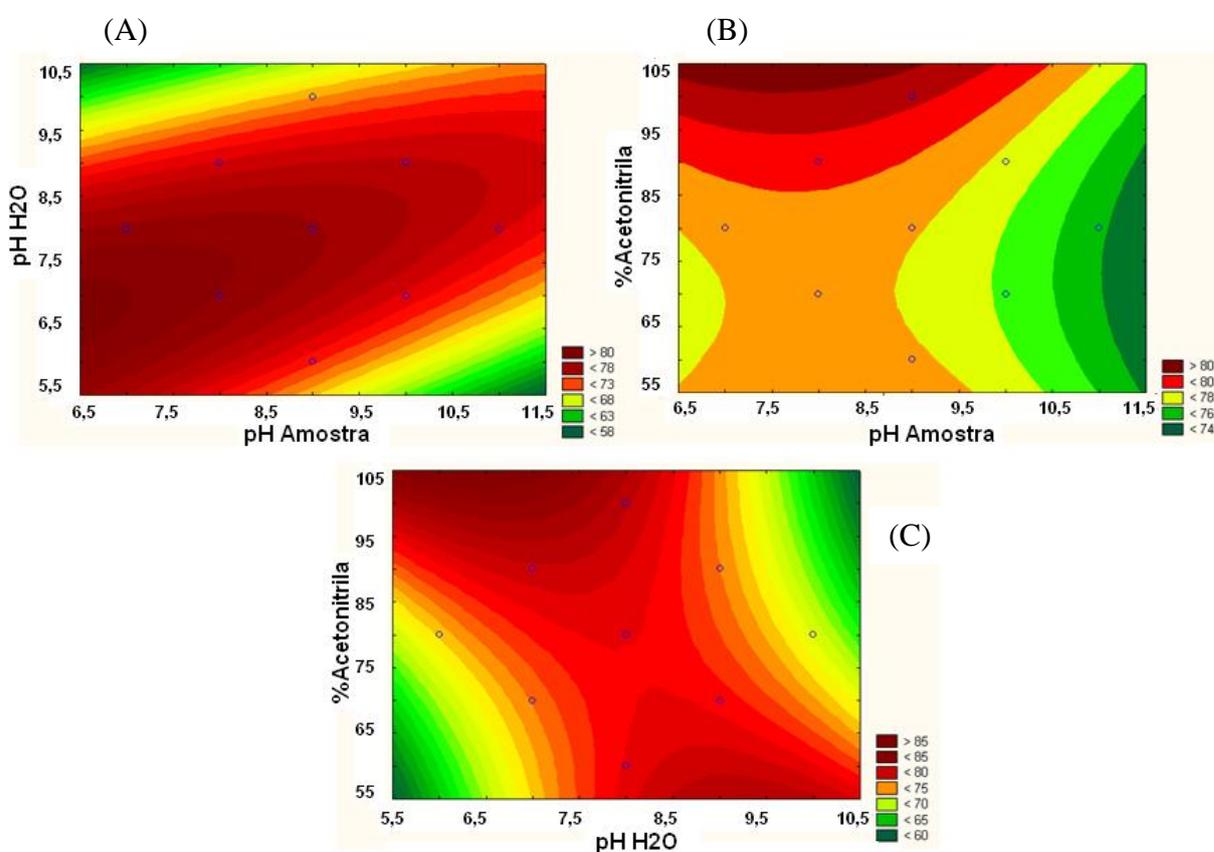


Figura 14. Superfície de resposta AZI. (A) pH água vs pH amostra, (B) %Acetonitrila vs pH amostra e (C) %Acetonitrila vs pH água.

Analisando a superfície de resposta para a extração da CLARI (Figura 15) para a relação pH da água e pH da amostra observa-se que em pH mais baixo as recuperações são melhores. Já a interação entre a %acetoneitrila e o pH da amostra apresenta que a maior influencia é do pH, pois em toda a faixa de % de acetoneitrila ocorre recuperação da CLARI. Pode-se verificar que a % de acetoneitrila acima de 85% apresenta os melhores resultados de recuperação versus o pH da água de entre 6 e 7.

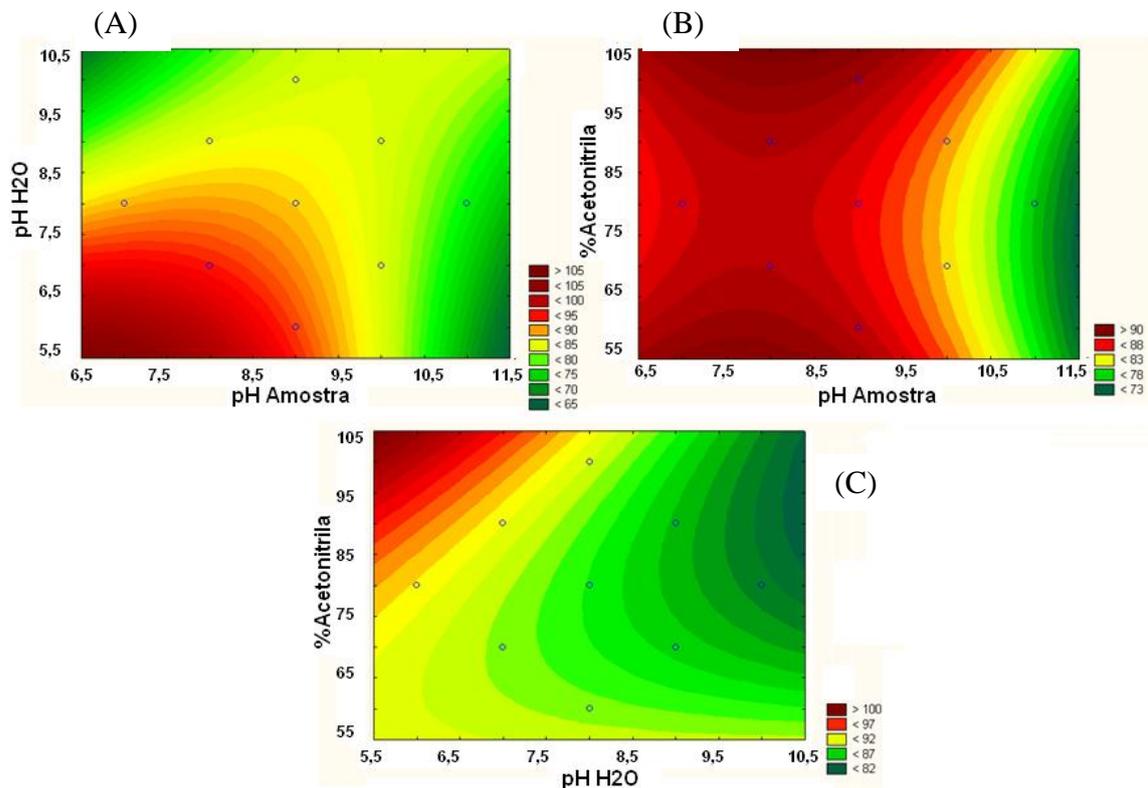


Figura 15. Superfície de resposta CLARI. (A), pH água vs pH amostra, (B) %Acetonitrila vs pH amostra e (C) %Acetonitrila vs pH água.

A Figura 16 mostra a interação das variáveis de extração pela superfície de resposta para ERI. A relação entre o pH da água e o pH da amostra apresenta que as recuperações máximas se dão com pH da água de 7 e da amostra entre 8,5 e 9,5, porém toda a faixa apresenta recuperações satisfatórias. A interação entre a %acetoneitrila e o pH da amostra traz como maior recuperação % de acetoneitrila acima de 80% e pH da amostra entre 9. Para a relação da % de acetoneitrila e o pH da água verifica-se que em pH mais baixos a eluição se daria em qualquer proporção de acetoneitrila.

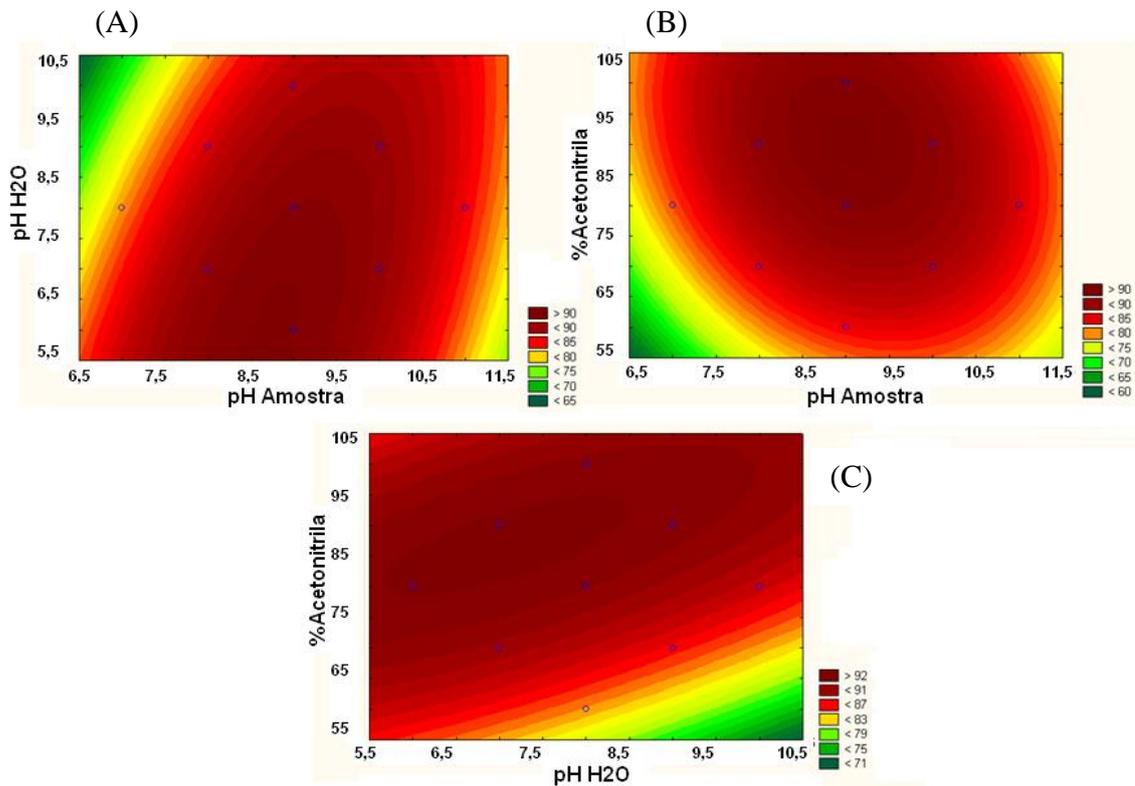


Figura 16. Superfície de resposta ERI. (A) pH água vs pH amostra, (B) %Acetonitrila vs pH amostra e (C) %Acetonitrila vs pH água.

A Figura 17 mostra a interação das variáveis de extração pela superfície de resposta para ROXI. A relação entre o pH da água e o pH da amostra expõe que as recuperações máximas se dão com pH da água de 7 e da amostra entre 9 e 10. A interação entre a %acetonitrila e o pH da amostra mostra que as maiores recuperações ocorrem em % acetonitrila entre 80 a 100% e pH da amostra entre 9. Para a interação da % de acetonitrila e o pH da água verifica-se que em pH em torno de 7 e % de acetonitrila acima de 70% as recuperações apresentam melhores resultados.

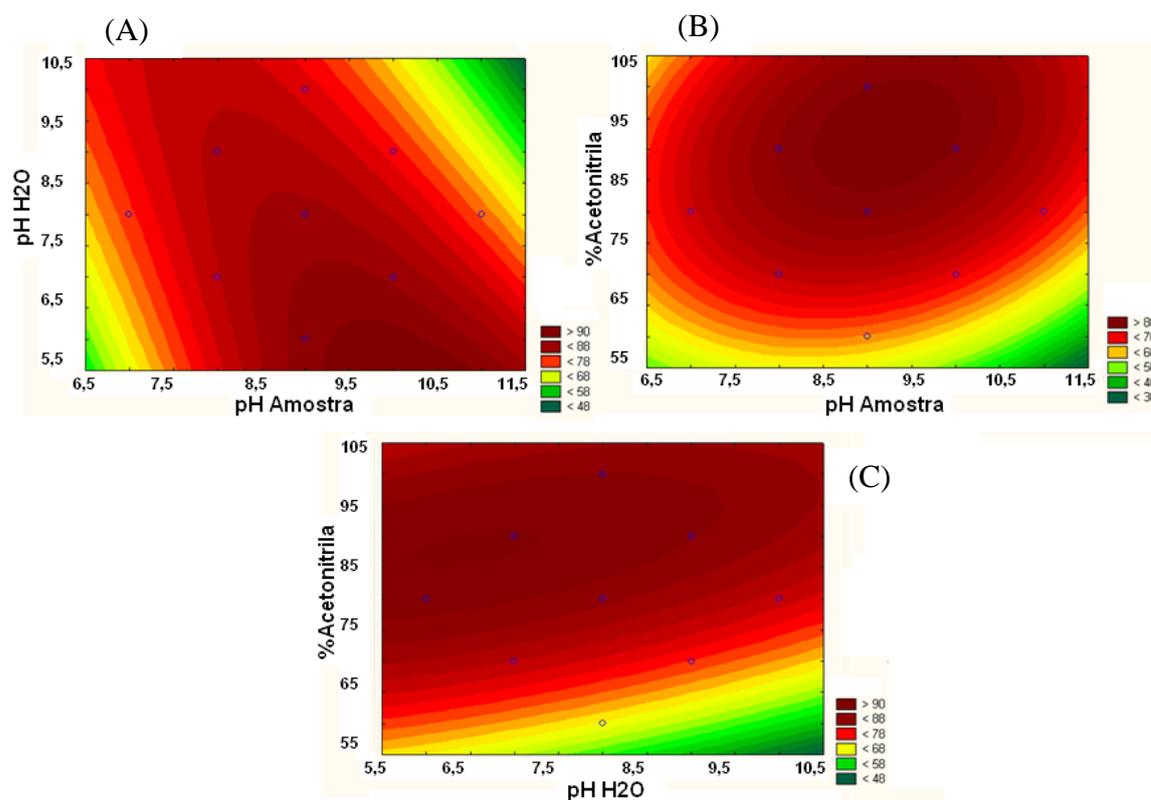


Figura 17. Superfície de resposta ROXI. (A) pH água vs pH amostra, (B) %Acetonitrila vs pH amostra e (C) %Acetonitrila vs pH água.

Considerando-se as superfícies de resposta verificou-se as maiores recuperações se dão quando o pH da amostra foi ajustado em 8, enquanto que o pH da água durante a etapa de condicionamento foi ajustado em 7 e a porcentagem de acetonitrila de 90%.

Os antibióticos macrolídeos são compostos básicos com valores de pK_a em torno de 8. Assim o pH da amostra apresenta influência, pois quanto mais próximo da pK_a do composto mais estes tendem a neutralidade, ajudando assim na retenção destes compostos ao sorvente. Conforme estudos da literatura o pH entre 6-8 (Abuin et al., 2006; Yang & Carlson, 2004) é o mais utilizado, exceto quando é feita a análise de ERI hidratada, pois esta é susceptível ao pH abaixo de 7.

O condicionamento do sorvente em SPE é um fator determinante para preparar a retenção dos analitos de interesse. Assim, para uma melhor ativação do sorvente, a primeira etapa do condicionamento foi conduzido com metanol, solvente polar, e, por conseguinte, água, em ordem crescente de polaridade. O pH da água nessa etapa torna-se importante devido às características do analito envolvido, preparando o sorvente para reter o analito. Assim pH próximos ao pK_a da amostra mostram-se melhores para o condicionamento. A

etapa de lavagem do cartucho de SPE com o mesmo pH usado no condicionamento não resultou em perdas dos analitos.

Acetonitrila foi escolhida como eluente devido à sua alta força eluotrópica e por se mostrar mais favorável na separação cromatográfica. Na etapa de eluição torna-se importante a desestabilização das interações entre a amostra e o sorvente, desta forma escolheu-se utilizar um aditivo (acetato de amônio) para que, quando da eluição do analito, as moléculas de antibióticos adquirissem cargas resultando em maiores recuperações ao final desta etapa. Não foi utilizado ácido, pois este levaria a degradação instantânea, por exemplo, da ERI.

4.4. Validação método

4.4.1. Seletividade

O método utilizando LC-MS/MS apresenta alta seletividade, a qual foi assegurada pela ausência de interferentes com mesmos íons de quantificação e qualificação no tempo de retenção dos analitos avaliados em amostras do efluente hospitalar com e sem fortificação (Figura 18).

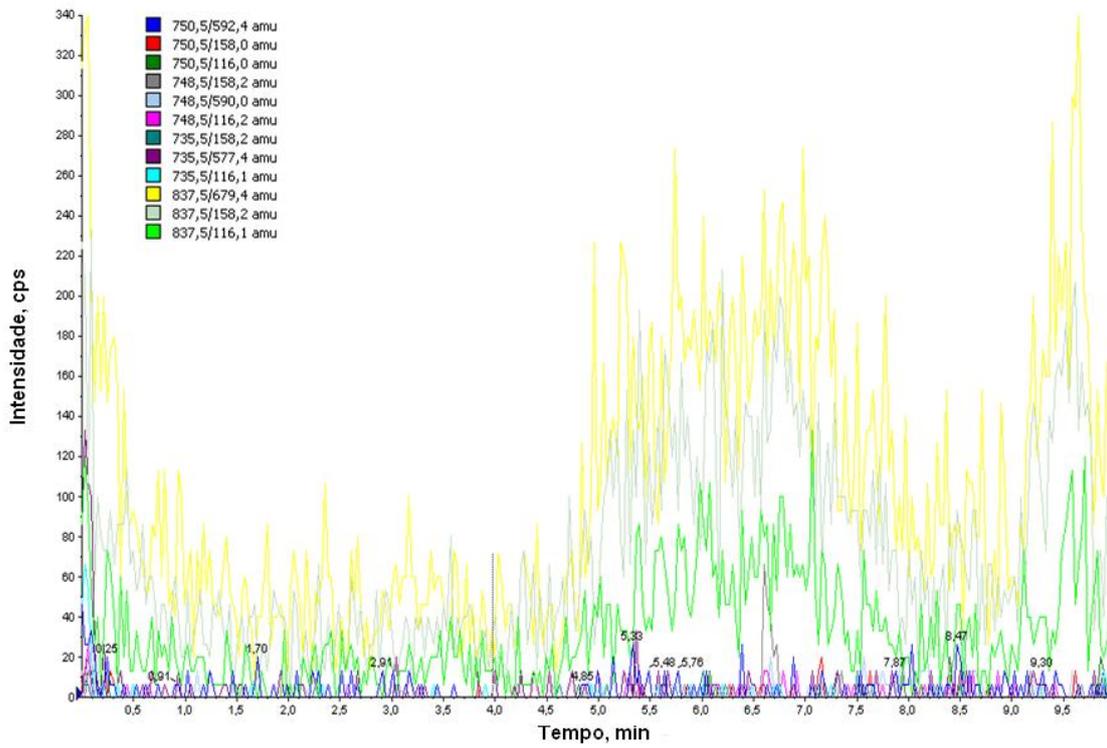


Figura 18. Cromatograma de amostra em branco de efluente (efluente coletado no período de verão).

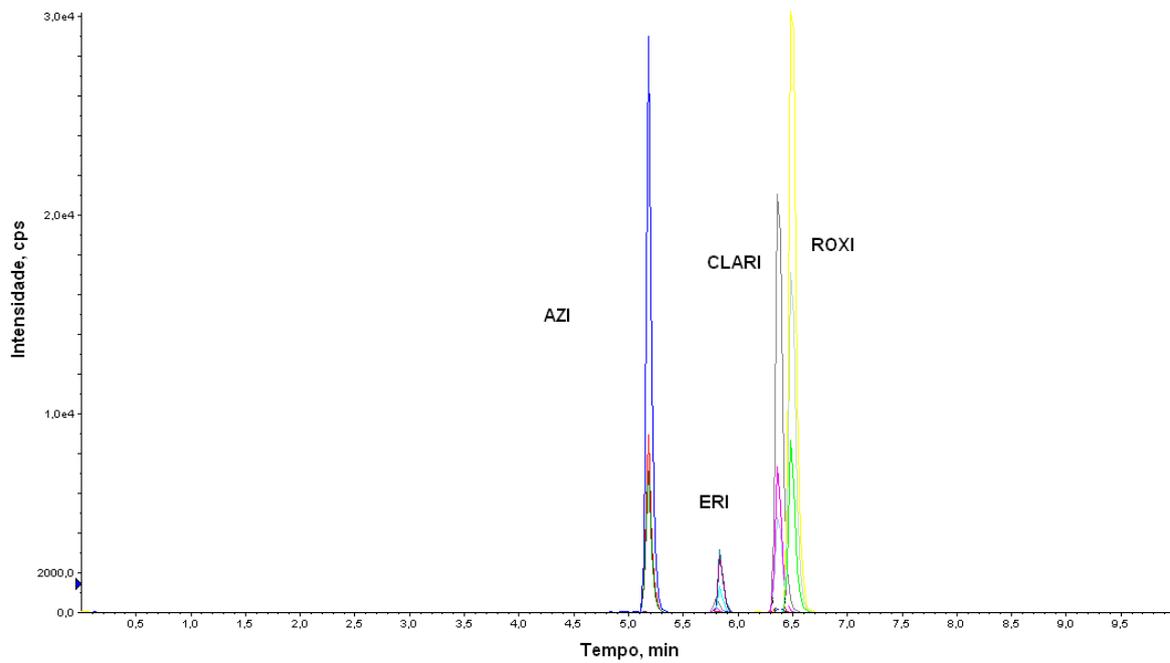


Figura 19. Cromatograma de amostra branco de efluente fortificado com $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

4.4.2. Curva analítica e linearidade

Os valores de coeficiente de determinação (r^2) para as equações das curvas em solução de acetonitrila:água (1:1) e no efluente hospitalar para os antibióticos estudados estão apresentadas na Tabela 9. As concentrações das soluções utilizadas na construção da curva analítica foram de 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 9. Coeficientes de determinação (r^2) das curvas analíticas (solvente e matriz) dos antibióticos.

Composto	Coeficiente de determinação		Equação da reta	
	Solvente	Efluente hospitalar	Solvente	Efluente hospitalar
AZI	0,9995	0,9954	$y = 5,94.10^3x - 423$	$y = 3,16.10^3x - 119$
CLARI	0,9999	0,9949	$y = 6,66.10^4x - 277$	$y = 3,49.10^4x + 293$
ERI	0,9999	0,9975	$y = 1,05.10^4x - 285$	$y = 4,92.10^3x + 38,1$
ROXI	0,9996	0,9969	$y = 5,74.10^4x - 220$	$y = 3,52.10^4x + 498$

Pode-se verificar através dos dados obtidos para a construção das curvas analíticas e análise das equações das retas que o modelo linear é adequado para as determinações analíticas. O r^2 apresentou no mínimo 0,99. Assim, este parâmetro está de acordo com as orientações da ANVISA e INMETRO. Pode-se verificar que a matriz não inferiu na linearidade das curvas sendo o valor do $r^2 > 0,99$

4.4.3. Efeito de matriz

O efeito de matriz encontrado ficou abaixo de 10% para os quatro compostos estudados no efluente do PA-HUSM e do córrego. O efeito matriz sobre a AZI foi de 8,4%, CLARI de 6,3%, ERI de 8,5% e ROXI de 8,9%.

4.4.4. Determinação do LOD e LOQ

Para a determinação do limite de detecção instrumental foi realizada a análise da relação sinal/ruído, que deve ser, no mínimo, igual a 3. Para isto foram injetados diferentes padrões em ordem crescente de concentração até se obter a relação sinal ruído igual a 3, repetiu-se então sete vezes a injeção desta concentração para confirmação. O mesmo foi feito para a determinação do limite de quantificação instrumental. O padrão que apresentou sinal com relação sinal/ruído, no mínimo, igual a 10, ou seja, 10 vezes superior a média de oscilações da linha base, foi definido como limite de quantificação (Tabela 10). Os resultados estão de acordo com os obtidos por López-Serna et al. (2012).

Tabela 10 . Limites de detecção e quantificação.

Composto	LOD _i ^a (µg L ⁻¹)	LOQ _i ^b (µg L ⁻¹)	LOD _m ^c (µg L ⁻¹)	LOQ _m ^d (µg L ⁻¹)
Azitromicina	0,020	0,05	0,001	0,003
Claritromicina	0,015	0,05	0,001	0,003
Eritromicina	0,035	0,1	0,002	0,005
Roxitromicina	0,015	0,05	0,001	0,003

^aLOD_i: Limite de detecção; ^bLOQ_i: Limite de quantificação; ^cLOD_m: Limite de detecção; ^dLOQ_m: Limite de quantificação.

4.4.5. Recuperação/exatidão

A eficiência da recuperação foi avaliada em amostras de efluente hospitalar, em três níveis de fortificação (0,05, 0,5 e 1 µg L⁻¹) em triplicata, para os quatro fármacos estudados. Os resultados estão expressos na Tabela 11 com a média das recuperações e a repetitividade, em termos de Desvio Padrão Relativo (RSD(%)).

Tabela 11. Porcentagem de recuperação e RSD para a repetitividade do método de extração de efluente hospitalar.

Composto	Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)					
	0,05		0,5		1	
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)
AZI	85,2	5,8	87,2	7,8	83,2	9,8
CLARI	87,5	8,4	91,5	9,4	89,5	8,4
ERI	83,2	9,1	87,2	7,1	83,2	10,2
ROXI	90,1	7,6	93,1	5,6	90,1	8,6

Para métodos empregados em determinação de níveis traço, valores de RSD% até 20% são aceitáveis nesta faixa de concentração. Assim, o método validado para a determinação de antibióticos macrolídeos em efluente hospitalar está de acordo (López-Serna et al., 2012).

4.4.6. Repetitividade e precisão intermediária

A precisão foi avaliada em função da repetitividade e da precisão intermediária, em dias diferentes, estimadas de acordo com as recomendações da ANVISA. Os valores de RSDr e RSDpi são apresentados com os resultados de recuperação nas tabelas Tabela 11 Tabela 12.

Os valores para o estudo dos antibióticos macrolídeos ficaram abaixo de 20% para todos os compostos. Para matrizes ambientais, a precisão depende da concentração do analito e da técnica de análise, podendo variar entre 2% a 20%. Para a faixa de concentração avaliada neste trabalho recomenda-se que a precisão deva ser $\leq 20\%$, assim, os resultados obtidos estão dentro dos limites sugeridos.

Tabela 12. Porcentagem de recuperação e RSD para precisão intermediária do método de extração de efluente hospitalar.

Composto	Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)					
	0,05		0,5		1	
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)
AZI	87,2	6,7	81,2	9,9	80,2	9,6
CLARI	83,5	9,4	89,5	8,4	90,5	8,9
ERI	83,2	10,1	86,2	10,5	86,2	8,2
ROXI	85,1	7,6	90,1	7,6	94,1	9,6

4.5. Exposição ambiental e avaliação de risco de antibióticos macrolídeos

Após a validação do método de separação/quantificação e de *clean-up*/pré-concentração, foi feita a análise da concentração ambiental de antibióticos macrolídeos no efluente do PA-HUSM (ponto A) e do corpo receptor (ponto B) onde este efluente é lançado juntamente com outra porção da parte do hospital e biblioteca central.

A avaliação da concentração de antibióticos lançados no meio-ambiente pelo HUSM foi realizada durante 7 dias, perfazendo o período de uma semana (ciclo semanal de exposição). E durante 24 horas para a verificação da variação entre o dia e a noite.

As Tabela 13 e Tabela 14 mostram as concentrações encontradas nos 2 pontos de coleta do sistema de esgotos do HUSM, ponto A e B respectivamente. O primeiro sistema compreendido abrange o PA-HUSM e a ala sul do hospital. As amostras foram coletadas após a passagem pelo sistema de tratamento por filtro anaeróbico, seguida por filtro anaeróbio. Nenhum estudo foi feito para avaliar a eficiência do tratamento sobre os fármacos, desta forma, o que foi detectado representa as concentrações emitidas pelo PA-HUSM diretamente para o meio ambiente. O outro ponto analisado é o efluente do corpo receptor onde os efluentes do PA, HUSM e biblioteca se encontram. ROXI não foi detectada, conforme suposição, pois esta não é utilizada no HUSM. Entretanto, foi avaliada igualmente como os outros antibióticos estudados, visto que este poderia estar sendo usado pelo paciente antes da internação, ou visitante e funcionários do hospital. ERI foi detectada apenas no ponto B, no segundo (amostragem das 11 horas) e quarto (amostragem das 07 horas) dias de coletas, e apenas em uma amostragem em cada dia, nas concentrações de 0,34 e 0,31 $\mu\text{g L}^{-1}$

respectivamente. Sabe-se que a ERI degrada facilmente no seu produto de degradação ERI-H₂O (Seifrtora et al., 2009).

Ternes e Joss (2006) afirmaram que os compostos com $\log K_{ow} \geq 3$ são considerados potencialmente bioacumuláveis, e portanto, surge a hipótese de que estes compostos podem ser adsorvido no lodo. A bioacumulação deve ser mais dominante para AZI, CLARI e ERI, com $\log K_{ow}$ de 4,02, 3,16 e 3,06, respectivamente.

Tabela 13. Concentração medida em $\mu\text{g L}^{-1}$ no ponto de coleta A.

Composto	Dia	Hora de amostragem						
		7	9	11	13	15	17	19
AZI	1	1,28	1,02	1,34	1,27	1,54	1,01	1,10
	2	1,50	1,78	1,28	1,52	1,17	0,91	0,82
	3	1,28	1,76	1,93	1,76	1,11	0,98	1,09
	4	1,30	2,81	1,50	1,98	1,13	1,02	0,80
	5	1,73	1,18	1,07	1,78	1,03	1,14	0,90
	6	1,37	1,76	1,38	1,42	1,17	0,97	0,82
	7	1,90	1,02	1,44	1,17	1,34	1,10	1,18
CLARI	1	Nd	0,45	0,52	0,47	0,48	0,44	0,45
	2	Nd	nd	nd	Nd	nd	Nd	nd
	3	Nd	nd	nd	Nd	nd	Nd	nd
	4	0,60	1,18	0,72	0,96	0,65	0,21	nd
	5	0,78	0,50	0,46	0,59	0,36	0,70	0,32
	6	Nd	nd	nd	Nd	nd	Nd	nd
	7	Nd	nd	nd	Nd	nd	Nd	nd

nd = não detectado.

Tabela 14. Concentração medida em $\mu\text{g L}^{-1}$ no ponto de coleta B.

Composto	dia	Hora de amostragem						
		7	9	11	13	15	17	19
AZI	1	Nd	1,30	1,22	0,98	1,35	1,47	1,46
	2	0,96	0,88	1,60	1,25	1,41	1,44	1,03
	3	1,11	1,26	1,22	1,16	0,97	0,78	0,92
	4	1,06	nd	0,98	1,49	1,96	0,76	0,56
	5	1,12	0,92	2,81	0,93	0,47	1,19	0,98
	6	0,96	0,88	1,60	1,25	1,41	1,44	1,03
	7	1,07	1,26	1,18	1,42	0,97	0,76	0,84
CLARI	1	Nd	0,45	0,43	Nd	nd	0,44	nd
	2	Nd	nd	0,44	0,45	nd	nd	nd
	3	Nd	0,43	0,44	Nd	0,68	nd	0,23
	4	0,54	0,52	0,50	0,63	0,41	0,51	0,40
	5	0,51	0,46	nd	Nd	nd	nd	0,57
	6	Nd	nd	0,44	0,45	nd	nd	nd
	7	Nd	nd	nd	Nd	nd	nd	0,23

nd = não detectado.

A Tabela 15 mostra as concentrações encontradas nos 2 pontos de coleta do sistema de esgotos do HUSM, ponto A e B, para os antibióticos AZI e CLARI no período de 24 horas. Não foram detectados ROXI e ERI. Através dos dados, pode-se concluir que o turno de amostragem não apresenta diferença, sendo encontrado AZI e CLARI sem uma correlação de acréscimo ou decréscimo das concentrações em relação ao período do dia ou noite. A provável explicação está na afinidade dos compostos macrolídeos pelo lodo, em virtude de suas cargas positivas (Feitosa-Felizzola et al., 2009).

Tabela 15. Concentração medida em $\mu\text{g L}^{-1}$ nos pontos de coleta A e B no período de 24 horas.

Hora de amostragem	AZI		CLARI	
	A	B	A	B
18	1,25	1,01	0,23	0,45
20	1,41	0,91	nd	0,34
22	0,97	0,98	0,23	0,43
24	0,47	1,02	0,40	0,52
02	0,97	0,97	0,57	0,46
04	1,41	1,10	0,12	nd
06	1,05	1,16	0,23	nd
08	1,57	1,49	0,30	0,44
10	1,86	0,93	0,58	0,34
12	1,47	1,25	0,35	0,50
14	1,41	0,96	0,32	0,66
16	0,97	1,11	0,41	0,59
18	1,32	1,06	0,15	0,40

nd = não detectado.

Xue et al. (2013) avaliaram a contaminação, por antibióticos macrolídeos, em água de rio e efluente de atividades antropogênicas. Eles determinaram a concentração média para AZI, CLARI, ERI e ROXI de 0,27; 0,11; 3,6 e 0,3 ng L^{-1} , respectivamente, em água de rio. Para efluente a concentração média foi de 3,7 ng L^{-1} para AZI, 3,0 ng L^{-1} de CLARI, para ERI de 43,5 ng L^{-1} e ROXI 4,9 ng L^{-1} .

Massey et al. (2010) determinaram a presença de antibióticos em água de rio dos Estados Unidos. A concentração máxima medida foi de 1,5 μgL^{-1} para AZI e 0,2 μgL^{-1} ERI. ROXI não foi detectada.

As concentrações encontradas no sistema de esgotos do HUSM estão correlacionadas com outros estudos de exposição ambiental em países desenvolvidos. Porém, em países desenvolvidos, os efluentes lançados pelos hospitais se conectam a rede de esgotos e, conseqüentemente, são tratados em ETÉs. Por outro lado, o esgoto do HUSM passa apenas

por sistema de tratamento por fossa séptica e filtro anaeróbio. Posteriormente é lançado em um corpo receptor, contaminando assim o meio ambiente diretamente.

O quociente de risco de cada fármaco foi calculado dividindo PEC por PNEC. Os valores de PEC foram estimados segundo as equações 4 e 5. Os valores de PNEC usados foram retirados da literatura (Zheng et al., 2012). A Tabela 16 apresenta os dados para a avaliação de risco dos macrolídeos mais usados no HUSM. Como pode ser observado todos apresentaram valor de $PEC_{Efl.}$ maior do que $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$, mesmo para o córrego ($PEC_{Córr.}$) onde o esgoto do HUSM é lançado. Isso mostra a problemática e a relevância do estudo de tais compostos.

Tabela 16. Concentração ambiental predita (PEC) e o quociente de risco (QR) dos antibióticos macrolídeos.

Composto	Excreção como composto ativo (%)	Consumo Anual (g ano^{-1})	$PEC_{Efl.}$ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$PEC_{Córr.}$ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	PNEC ($\mu\text{g L}^{-1}$)	QR_{Efl} (PEC/PNEC)	$QR_{Córr}$ (PEC/PNEC)
Azi	72	1500	1	0,1	0,12	8,3	0,8
Clari	40	900	0,5	0,05	0,02	25	2,5
Eri	5	600	0,004	0,0004	0,02	0,2	0,02
Roxi	74	-	-	-	0,1	-	-

Pode-se observar que os valores obtidos com os cálculos de PEC são próximos a concentração do efluente determinada pela análise cromatográfica.

Após a quantificação dos antibióticos macrolídeos no efluente hospitalar, uma avaliação de risco foi feita usando como parâmetro o QR real, ou seja, com a MEC, para a razão entre MEC/PNEC. O QR de cada antibiótico para cada ponto de efluente é amostrado na Tabela 17, juntamente com os valores médios de MEC. Para ROXI não foi calculado, pois esta não foi encontrada no efluente hospitalar. Os valores de PNEC utilizados para os cálculos se referem ao crustáceo *Daphnia magna* para AZI e para a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* para ERI, CLARI e ROXI (Zheng et al., 2012).

Tabela 17. Concentração ambiental medida (MEC) e o quociente de risco (QR) dos antibióticos macrolídeos.

Composto	MEC _{En.} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	MEC _{Córr.} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	PNEC ($\mu\text{g L}^{-1}$)	QR _{En} (MEC/PNEC)	QR _{Córr} (MEC/PNEC)
Azi	1,32	1,12	0,12	11	9,3
Clari	0,22	0,20	0,02	11	10
Eri	-	0,01	0,02	-	0,5
Roxi	-	-	0,1	-	-

Como pode ser observado, todos os antibióticos apresentaram valor de MEC maior do que $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$, no efluente do PA e do córrego onde o esgoto do HUSM é lançado. Isso confirma os dados anteriores obtidos através da relação MEC/PNEC, e o QR maior de MEC/PNEC reforça a relevância do estudo de tais compostos.

AZI e CLARI apresentaram $\text{QR} \geq 1$ para os dois pontos de coleta, o que caracteriza risco alto, ou seja, podem causar danos ao ambiente. Para a ERI, o quociente de risco ficou entre $0,1 \leq \text{QR} < 1$, o que caracteriza como risco médio. Os valores de QR reportados até então na literatura foram menores para este composto, entretanto nenhum dos dados é para efluente hospitalar, confirmando, assim, o risco que este causa ao meio ambiente sem um tratamento preliminar (Zheng et al., 2012; Leung, 2012; Gros et al., 2010).

Estudos realizados por Xue et al. (2013), o QR obtido de amostras de afluentes foi de $1,5 \times 10^{-3}$ para AZI, 8,9 para CLARI, 8,7 para ERI e de 0,19 para ROXI. QR de risco médio e alto, exceto pra AZI. Pode-se verificar que o risco obtido para CLARI é semelhante ao encontrado no presente estudo.

Devido à alta complexidade da ação de fármacos no meio ambiente, o QR muitas vezes pode não ser tão relevante para demonstrar a realidade. Outro fator que deve ser levantado ainda é que, na maioria das vezes, essas substâncias não se encontram isoladas no meio ambiente e sim combinadas. Escher et al. (2010) demonstraram que o QR para misturas, de acordo com o conceito de adição de concentração, apresenta um efeito igual à soma das concentrações preditas de cada espécie como uma fração de sua própria toxicidade individual. Desta forma o QR combinado pode apresentar um maior impacto ambiental destes antibióticos. Assim, necessita-se uma atenção aos riscos destes, pois ainda não se conhece sua ação crônica em longo prazo.

4.6. Identificação de metabólitos

O experimento foi conduzido por LC-MS/MS operando no modo de ion trap, com a aquisição de informações dependente (EMS-IDA), seguido de íons precursor (EPI), com colisão de energia (CE) 30, 45 e 60 V. Após foi feita uma seleção dos possíveis metabólitos.

O metabólito de m/z 591,5 foi encontrado no efluente do PA-HUSM e no corpo receptor. Com tempo de retenção de 6,9 min. Este composto, segundo Hunter et al.(2003), é oriundo da metabolização da AZI, sendo o metabólito descladinose. Propondo a fragmentação deste composto (Figura 20) pode-se sugerir que o fragmento de m/z 574,5 remete a perda de 18 Da referente uma água do ligante desosamina. O fragmento m/z 448,5 representa a ruptura do ligante desosamina, e a saída do grupamento ficando o oxigênio protonado inserção de uma hidroxila no fragmento. Os fragmentos 336,6; 291,4; 149,3 e 133,1 pode se supor que não provenientes da quebra da lactona, não sendo propostas as fórmulas moleculares deste no presente trabalho.

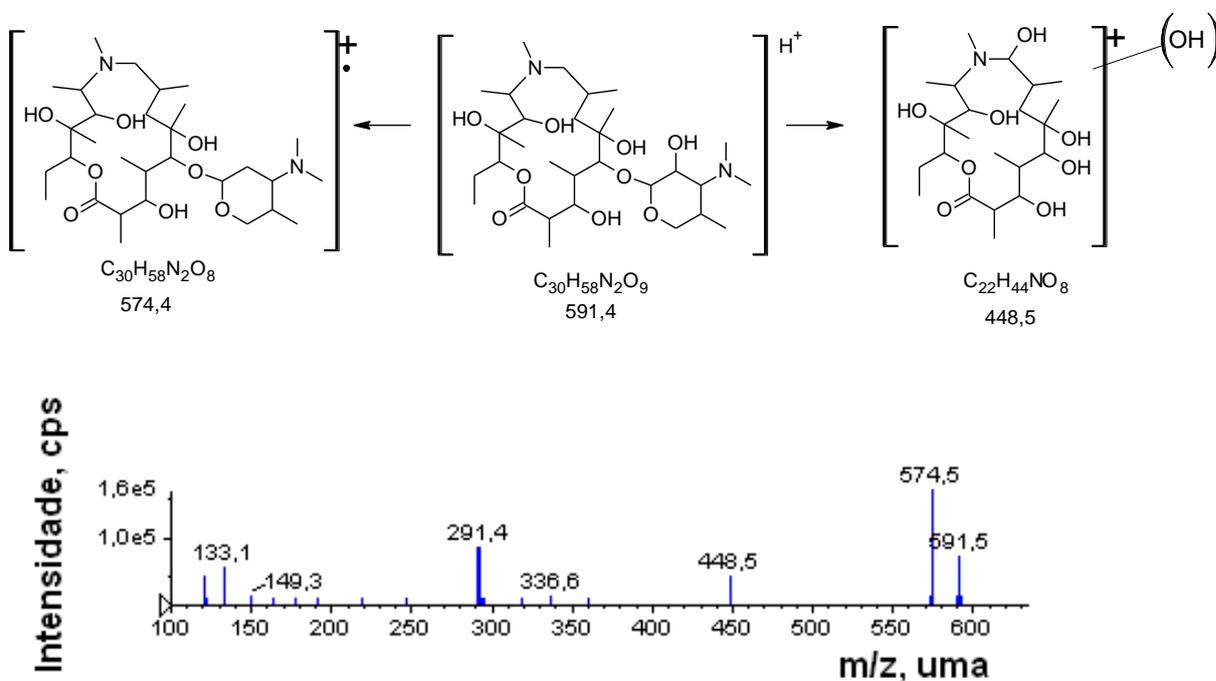


Figura 20. Espectro de MS² e rota de fragmentação proposta para o metabólito 591 encontrado no efluente hospitalar.

O metabólito de m/z 546,1 (Figura 21) foi encontrado apenas no efluente do PA-HUSM, o qual é descrito na literatura como produto da metabolização da AZI, chamado de 3'-desamino-3-ene descladinose. Este composto é originado da perda da cladinose e do grupo amino com as duas metilas do ligante desosamina (Hunter et al., 2003). Propondo a fragmentação deste metabólito a partir do espectro de MS^2 atribui-se que é formado o fragmento de m/z 529,3 proveniente da perda de 18 Da de uma hidroxila da desosamina formando um cátion radicalar. O fragmento de m/z 403,5 é proveniente da perda de moléculas de água e abertura do anel no grupo carboxila formando um carbocátion.

Pode-se verificar que os demais fragmentos são semelhantes aos fragmentos do espectro da Figura 20, oriundo da abertura do anel da lactona, como os íons de m/z 133, 291, o que corrobora a presença destes metabólitos oriundos da AZI.

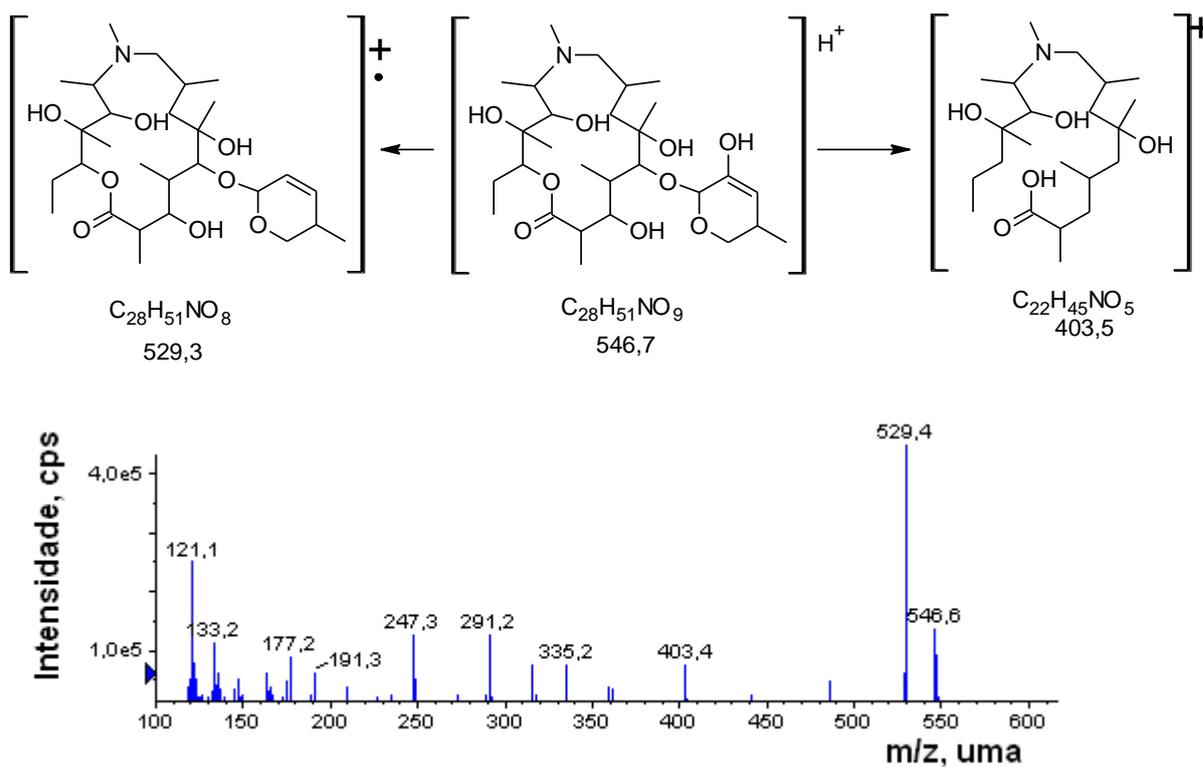


Figura 21. Espectro de MS^2 e rota de fragmentação proposta para o metabólito 546 encontrado no efluente hospitalar.

O produto de m/z 764 encontrado nos dois pontos de amostragem foi proposto como sendo o principal metabólito ativo da CLARI, o 14-OH-claritromicina (Velde et al., 2009). Este elui no tempo de retenção de 5,9 min. Conforme o espectro de MS^2 (Figura 22) pode-se

verificar que o composto é fragmentado com formação do cátion radicalar de m/z 700,4, propõem-se que ocorra a saída do grupo amino do açúcar desosamina e de uma molécula de água da lactona. Em seguida é formado o fragmento de m/z 684,5 sugerido como a perda de água do ligante desosamina. Com a ruptura dos dois açúcares e abertura do anel da lactona forma-se o íon de m/z 419,5.

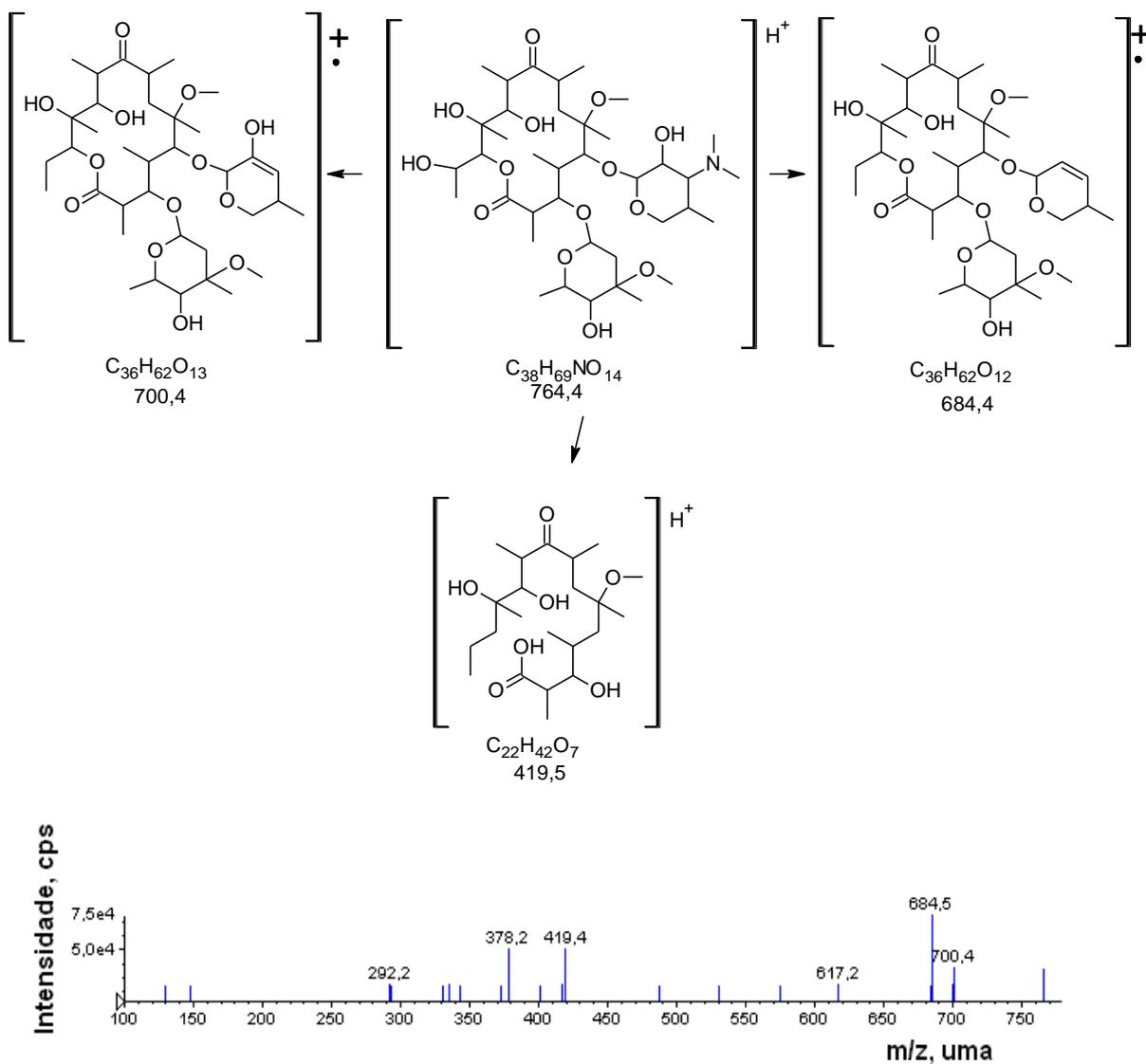


Figura 22. Espectro de MS^2 e rota de fragmentação proposta para o metabólito 764 encontrado no efluente hospitalar.

4.7. Experimento de fotólise em solução aquosa

Pode-se verificar que o perfil de degradação se assemelha para todos os compostos, com exceção da ERI em pH 3, a qual é convertida imediatamente no PD 717, e AZI em pH 3 e 5. Isto é explicado pela estabilidade deste composto em meio ácido. A Tabela 18 mostra a porcentagem após 60 min de tratamento com fotólise.

Tabela 18. Porcentagem de degradação dos macrolídeos após 60 min de tratamento.

pH	Degradação (%)			
	AZI	CLARI	ERI	ROXI
3	21,6	82,1	*	87,6
5	58,8	90,6	99,3	95,7
7	87,0	91,3	81,6	95,5
9	79,3	88,3	85,1	96,5
11	77,2	89,4	86,4	97,0

*degrada imediatamente neste pH

Tong et al. (2011) obtiveram em torno de 70% de degradação de AZI em diferentes matrizes de água sob radiação artificial e solar. Vione et al. (2009) estudaram a fotodegradação de CLARI e ROXI em água de superfície e observaram 75% de degradação destes compostos.

4.7.1. Cinética de degradação

Na Figura 23 pode ser observado o decaimento para a fotodegradação dos antibióticos macrolídeos nas condições de 500 mL solução, com temperatura de 27 ± 2 °C e os antibióticos na concentração 2 mg L^{-1} . Cada fármaco foi avaliado em experimento separado para poder identificar com precisão os produtos formados. Os dados de ERI para pH 3 não são apresentados, pois esta é degradada imediatamente neste pH. Os demais compostos apresentam perfil semelhante, exceto para AZI em pH 3, o que se deve ao fato de sua estabilidade em meio ácido.

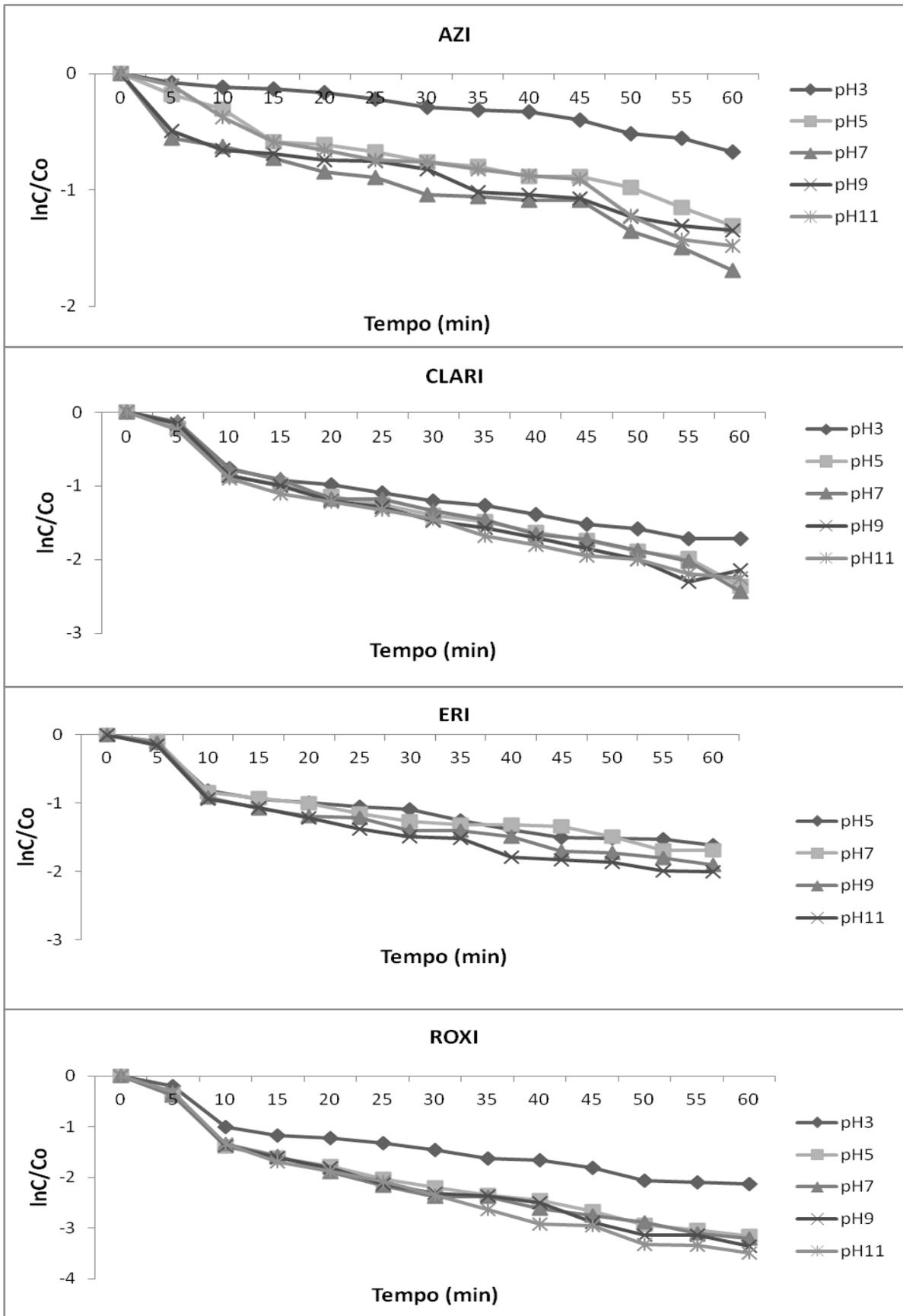


Figura 23. Decaimento de primeira ordem para o fotoprocesso de degradação dos antibióticos macrolídeos. Condições: 500 mL; 27 ± 2 °C; 2 mg L^{-1} .

Como pode ser observado (Figura 24) para a degradação em solução aquosa o k para ERI é maior em pH 5, sofrendo um decaimento em pH 7 e aumentando levemente em pH 9 e 11, sucessivamente. Para AZI o k aumenta gradativamente do pH 3 ao 7, onde é maior, voltando a cair em pH 9 e tendo um leve acréscimo em pH 11, o mesmo perfil é observado para CLARI, entretanto, com k maiores. Para ROXI o k aumenta gradativamente até pH 11, onde apresenta maior valor.

Pode também ser observado que as k foram aproximadamente iguais, este comportamento pode estar relacionado à estrutura semelhante destes compostos. A exceção de um aumento significativo na k para a ERI em pH 3 é explicado pelo fato de sua instabilidade em meio ácido.

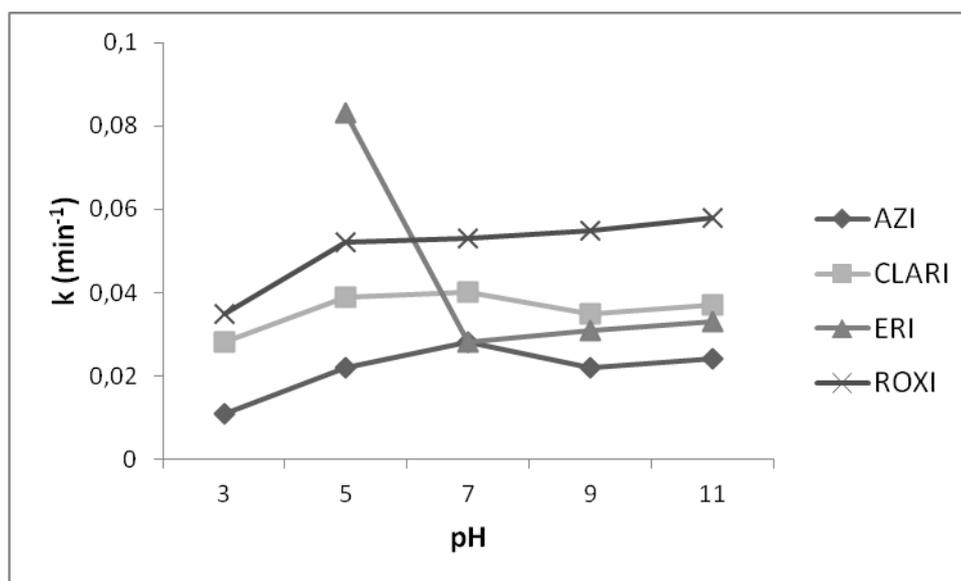


Figura 24. Constantes cinética de primeira ordem para a degradação de antibióticos macrolídeos em solução aquosa em função do pH.

Os resultados da Tabela 19 mostram a cinética da fotodegradação com luz ultravioleta para os compostos, em solução aquosa foram calculados de acordo com primeira ordem de reação. Este modelo cinético também foi verificado por Vione et al.(2009) em seu estudo sobre a fototransformação de ROXI e CLARI em águas superficiais. Kim et al.(2004) estudaram o perfil cinético de degradação de ERI em meio ácido e obtiveram o mesmo modelo cinético observado neste estudo, assim como Tong et al. (2011) no estudo da fotodegradação de AZI em cinco diferentes matrizes de água.

O $t_{1/2}$ segue o mesmo comportamento da k . Analisando por pH, o tempo de meia vida é de AZI>CLARI>ROXI em pH 3. Para pH 5 AZI>CLARI>ROXI>ERI. Em pH 7 o $t_{1/2}$ corresponde a AZI=ERI>CLARI>ROXI. Para pH 9 AZI>ERI>CLARI>ROXI, em pH 11 AZI>ERI>CLARI>ROXI. Deste modo, verifica-se que a AZI apresenta carácter recalcitrante maior, e, ROXI é degradada com maior facilidade que os outros antibióticos.

Tabela 19. Constante cinética de primeira ordem (k), $t_{1/2}$, e ajuste do modelo da degradação de macrolídeos por fotodegradação.

Antibiótico	pH	k (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	r^2
AZI	3	$1,1 \times 10^{-2}$	61,4	0,964
	5	$2,1 \times 10^{-2}$	31,7	0,946
	7	$2,8 \times 10^{-2}$	24,5	0,910
	9	$2,2 \times 10^{-2}$	30,9	0,903
	11	$2,4 \times 10^{-2}$	28,1	0,944
CLARI	3	$2,8 \times 10^{-2}$	24,1	0,900
	5	$3,9 \times 10^{-2}$	17,5	0,939
	7	$4,0 \times 10^{-2}$	17,0	0,948
	9	$3,5 \times 10^{-2}$	19,3	0,932
	11	$3,7 \times 10^{-2}$	18,4	0,930
ERI	3	-	-	-
	5	$8,3 \times 10^{-2}$	8,2	0,871
	7	$2,8 \times 10^{-2}$	24,5	0,848
	9	$3,1 \times 10^{-2}$	21,8	0,857
	11	$3,3 \times 10^{-2}$	20,8	0,876
ROXI	3	$3,5 \times 10^{-2}$	19,5	0,892
	5	$5,2 \times 10^{-2}$	13,2	0,909
	7	$5,3 \times 10^{-2}$	12,9	0,900
	9	$5,5 \times 10^{-2}$	12,3	0,920
	11	$5,8 \times 10^{-2}$	11,9	0,929

4.8. Experimento de fotólise em efluente hospitalar

Após o estudo da degradação de antibióticos macrolídeos em solução aquosa, com diferentes pH, foi verificado que todos os compostos têm uma degradação satisfatória em pH 7, além de não ocorrer formação de diferentes PD em função do pH. Assim, como o pH do efluente hospitalar varia entre 6-7, foi escolhido o pH 7 para os testes de degradação dos antibióticos macrolídeos nesta matriz. O efluente usado para os experimentos foi o do ponto B (corpo receptor). O efluente foi fortificado com 2 mg L^{-1} de solução padrão. Para cada antibiótico foi feito um experimento em separado, e as condições foram as mesmas utilizada para solução aquosa. Pode-se verificar (Figura 25) que os antibióticos têm o mesmo comportamento que em solução aquosa, onde AZI apresenta uma menor degradação em relação aos outros e ROXI tem maior degradação. Em efluente hospitalar, além da fotólise direta, a fotólise indireta pode ser responsável pela degradação em virtude da diversidade de compostos presentes, como nitratos e ácidos húmicos que colaboram na formação de espécies altamente reativas (Tong et al., 2011).

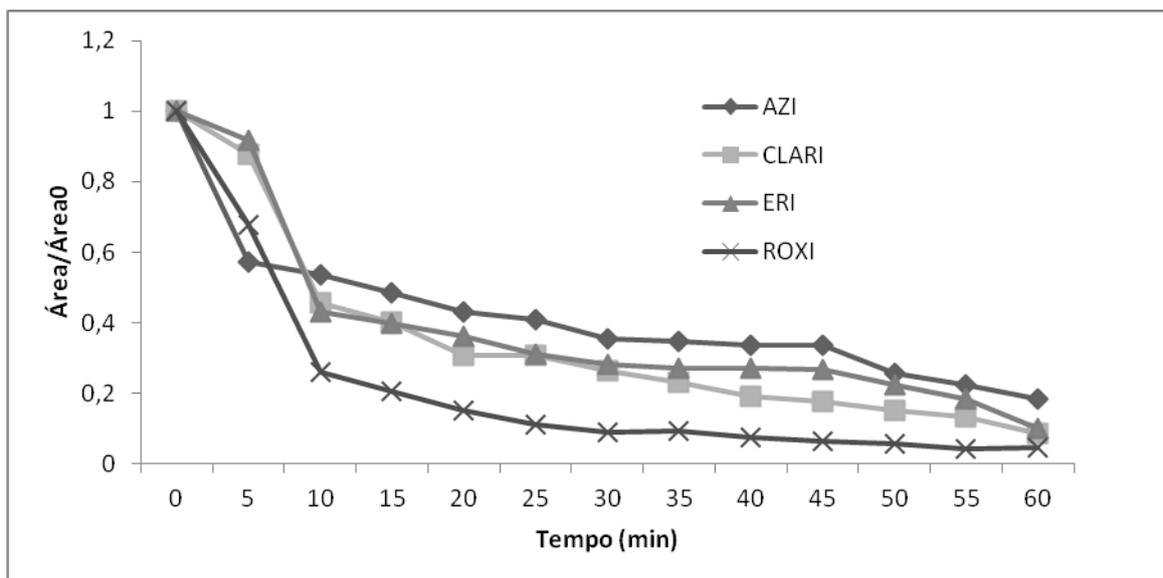


Figura 25. Degradação dos antibióticos macrolídeos em efluente hospitalar. Condições: 500 mL; $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$; 2 mg L^{-1} .

4.9. Produtos de degradação

Utilizou-se análise por LC-MS/MS com experimentos de IDA, e auxílio do *Software* LightSight 2.3, na investigação dos subprodutos formados na fotodegradação dos antibióticos macrolídeos. Para verificação foi utilizado o espectro de fragmentação, de cada composto, para a dedução dos produtos transformados. A discussão e proposição de possíveis rotas reacionais envolvidas neste processo foram feitas confrontando-se os dados obtidos através da análise por LC-MS/MS da solução inicial de cada composto e os dados das alíquotas amostradas em diferentes tempos do processo e diferentes pH, com estudos encontrados na literatura.

Os experimentos de degradação foram feitos em pH 3, 5, 7, 9, 11, e na concentração de 2 mg L^{-1} para poder verificar a formação dos produtos de degradação. Pode-se observar que os produtos de degradação formados, para cada antibiótico, apareceram em todos os pH. A maioria dos compostos formados durante o processo apresentou polaridade similar ao de cada composto estudado e, em todos os pH. Por este motivo, não foi empregado nenhum tratamento diferenciado nas amostras que foram fotodegradadas e considerou-se que o procedimento utilizado na determinação dos antibióticos macrolídeos é adequado para a identificação dos produtos de degradação. Os experimentos para degradação dos antibióticos macrolídeos em efluente hospitalar foram feitos em pH 7 por não se verificar a diferença de produtos formados entre os pH estudados apenas em solução.

4.9.1. Produtos de degradação propostos para AZI em solução aquosa

A primeira etapa na elucidação das estruturas dos PDs consiste em determinar o padrão de fragmentação da AZI que elui em 5,2 min e apresenta $[\text{M}+\text{H}]^+$ de 750,5 Da. Essa m/z foi usada como Íon Precursor para fragmentação (MS^2) (Figura 26).

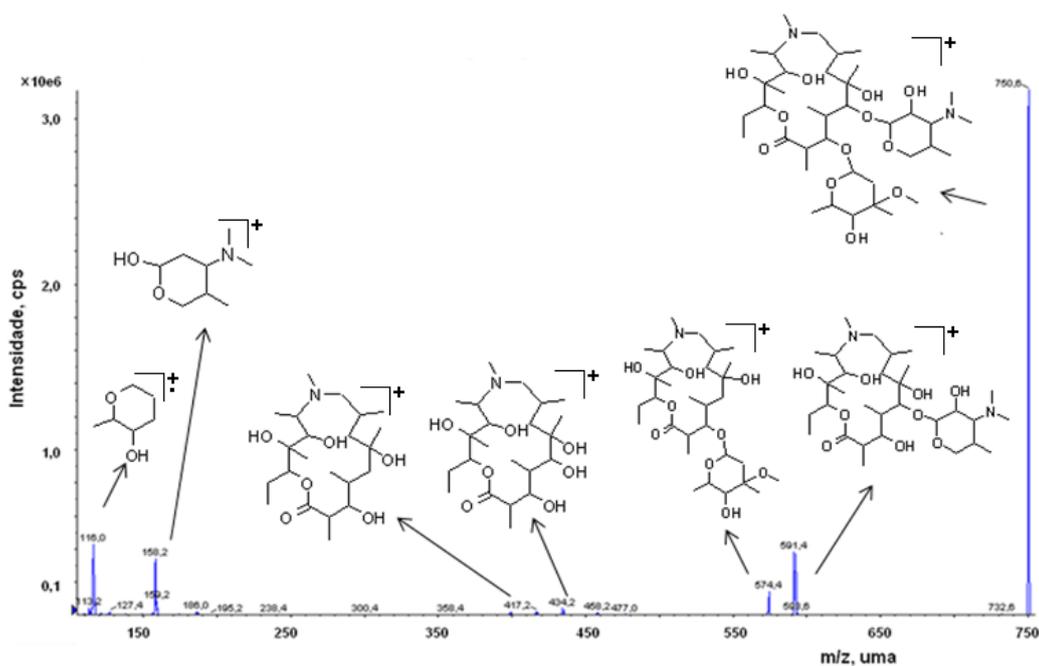


Figura 26. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e fragmentos propostos para a AZI (m/z 750,5 MS^2).

O fragmento de m/z 591 formado pela perda de 158 Da pode ser oriundo da perda da cladinose. O íon m/z 574 sugerem a perda da desosamina e uma molécula de água ligada a lactona. O fragmento de m/z 434 é formado pela perda dos dois açúcares, ficando apenas o anel da lactona, que por sua vez perde uma hidroxila e forma o fragmento de m/z 417. Os fragmentos 158 e 116, característicos dos macrolídeos, são formados a partir da cladinose e da desosamina, o que os diferencia são o tipo de íon que formam, podendo ser íon distônicos, cátions radicalares ou carbocátions (Figura 27) (Nollet & Gelder, 2007; Abuin et al., 2006).

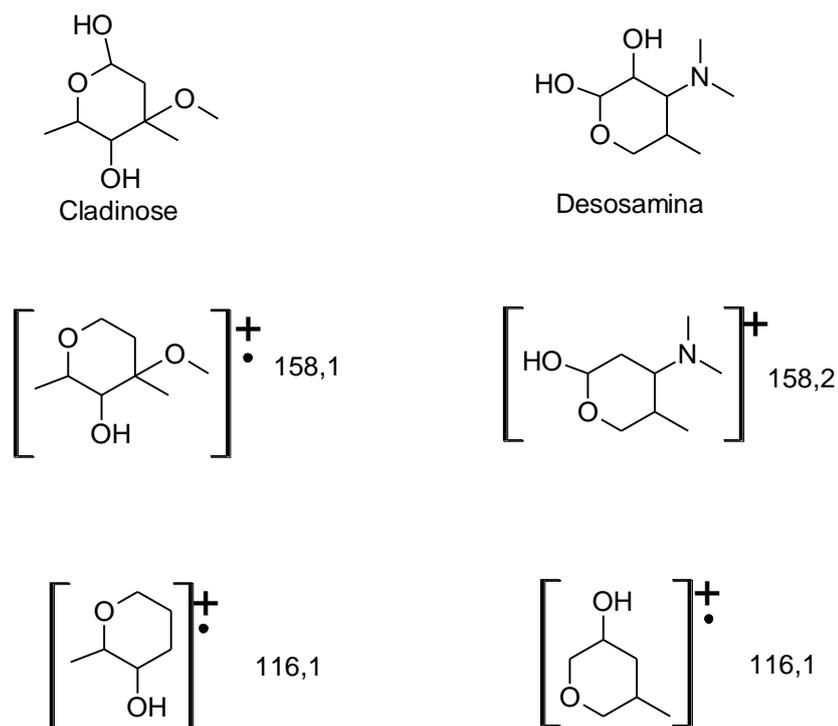


Figura 27. Fragmentos de m/z 116 e 158 obtidos da cladinose e desosamina.

Na literatura, até o presente momento, apenas dois artigos (Zhang et al., 2009; Tong et al., 2011) foram encontrados com dados de produtos de degradação da AZI, os quais foram usados para comparação e discussão dos dados encontrados neste estudo.

Foram identificados 8 PDs neste trabalho (Tabela 20 e Figura 28). Todos os produtos identificados tiveram seus espectros de MS^2 extraídos do experimento com CE de 30 V.

Tabela 20. Produtos de degradação identificados por LC-MS/MS para AZI.

PD $[M+H]^+$	tr (min)	Fórmula Molecular	MS^2 m/z
733	5,6	$C_{37}H_{68}N_2O_{12}$	574; 418
592	5,3	$C_{30}H_{59}NO_{10}$	574; 433; 416; 158; 116
735	4,8	$C_{37}H_{70}N_2O_{12}$	591; 577; 433
765	5,4	$C_{38}H_{73}N_2O_{13}$	704; 606; 591; 546; 433; 417
721	5,1	$C_{36}H_{68}N_2O_{12}$	592; 562; 433
752	5,2	$C_{38}H_{74}N_2O_{12}$	594; 576; 434
578	4,7	$C_{30}H_{59}NO_9$	477; 434; 417
705	6,0	$C_{36}H_{68}N_2O_{11}$	575; 158

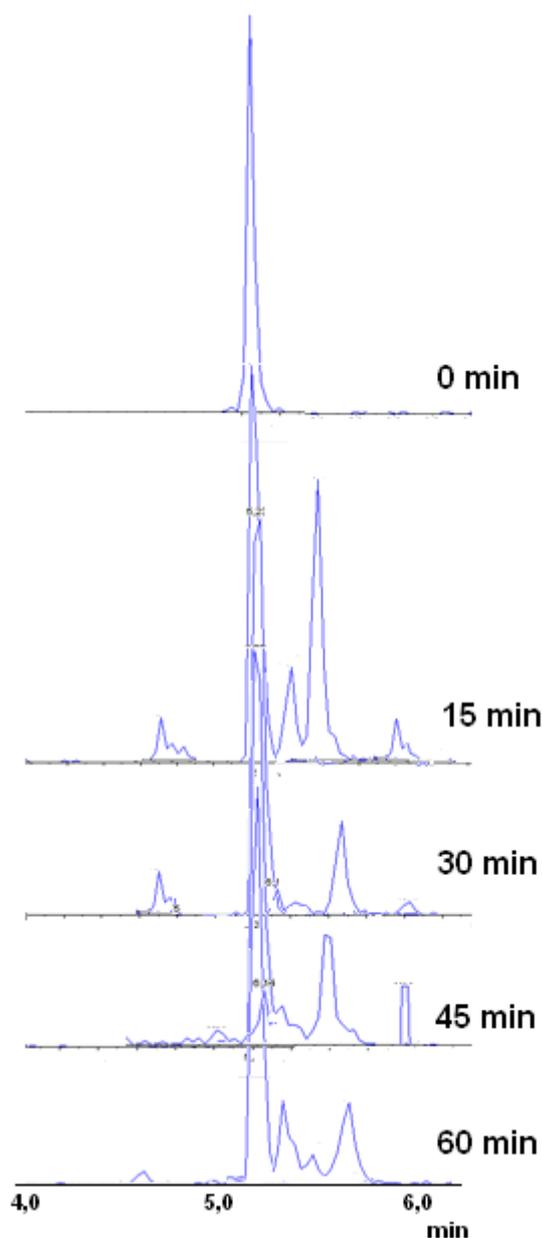


Figura 28. Cromatograma de íons totais durante o processo de degradação e formação dos PDs de AZI.

As estruturas propostas para os PD estão representadas na Figura 29. O PD 733 é gerado pela perda de uma metila, provavelmente do açúcar desosamina, onde ocorre uma dupla ligação entre o nitrogênio e o carbono do açúcar. O PD m/z 735 formado pela perda de uma metila, proposto como sendo do açúcar desosamina, e sem a ocorrência da dupla ligação entre carbono e nitrogênio. Estes dois compostos apresentam semelhanças em seus MS^2 . A partir destes pode-se sugerir que é formado o PD m/z 721 por uma Bi-N-desmetilação na

desosamina. E em seguida propõe-se que seja formado o PD 592, que é proveniente da eliminação do aminoaçúcar (Zhang et al., 2009; Tong et al., 2011).

O PD m/z 765 é oriundo da hidroxilação da molécula da AZI. Entretanto não foi possível prever em que carbono ocorre esta adição. O composto PD 752 é formado pela ruptura do anel da lactona no grupamento carboxílico. O PD 578 é obtido pela eliminação da desosamina e do oxigênio da dupla ligação da carboxila. Ele pode ter sido formado após o PD752. Para o PD 705 propõem-se a perda do grupamento $-(CH_3)_2$ da cladinose.

Neste estudo com fotólise foram obtidos cinco novos PD de degradação, os quais ainda não foram citados na literatura (Zhang et al., 2009; Tong et al., 2011). Os compostos são o PD 765, PD 752, PD 705, PD 733 e PD 578.

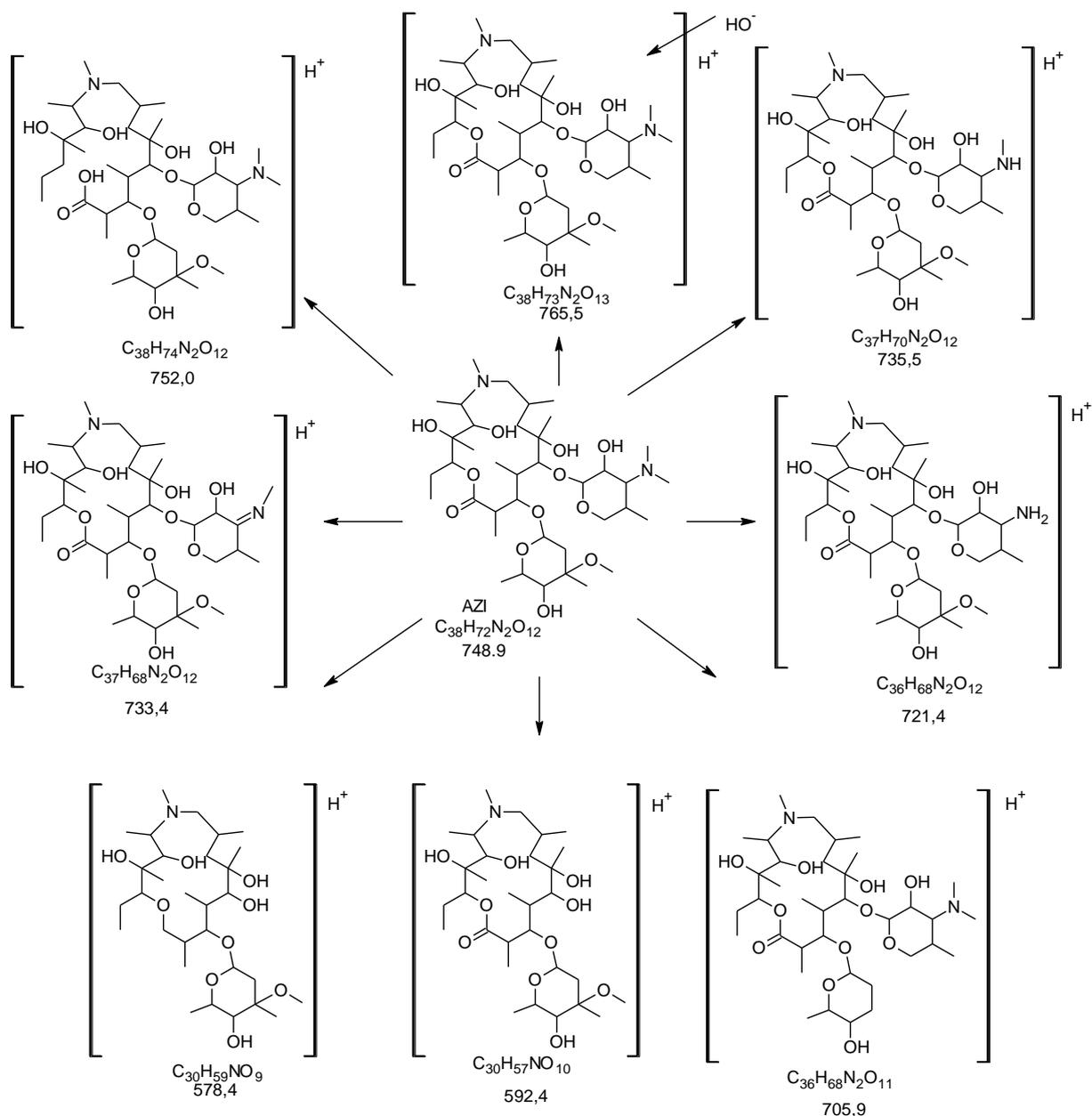


Figura 29 . Estruturas químicas propostas para os produtos de fotodegradação de AZI.

A elucidação e identificação dos PD formados foram possíveis analisando os espectros de MS^2 obtidos nos experimentos, que mostram perfis de fragmentação semelhantes, sendo proposto a partir destes a rota de fragmentação de cada produto.

O PD 733 (Figura 30) é gerado pela perda de uma metila, provavelmente do açúcar desosamina, onde ocorre uma dupla ligação entre o nitrogênio e o carbono do ciclo. O espectro, com CE de 30 eV, mostra o fragmento de m/z 575,4 proveniente da perda de 158 Da, molécula da cladinose e o fragmento m/z 418,4 relativa a perda de 143 Da do

aminoaçúcar. Este produto foi encontrado após 10 min de tratamento persistindo até o final de 60 min.

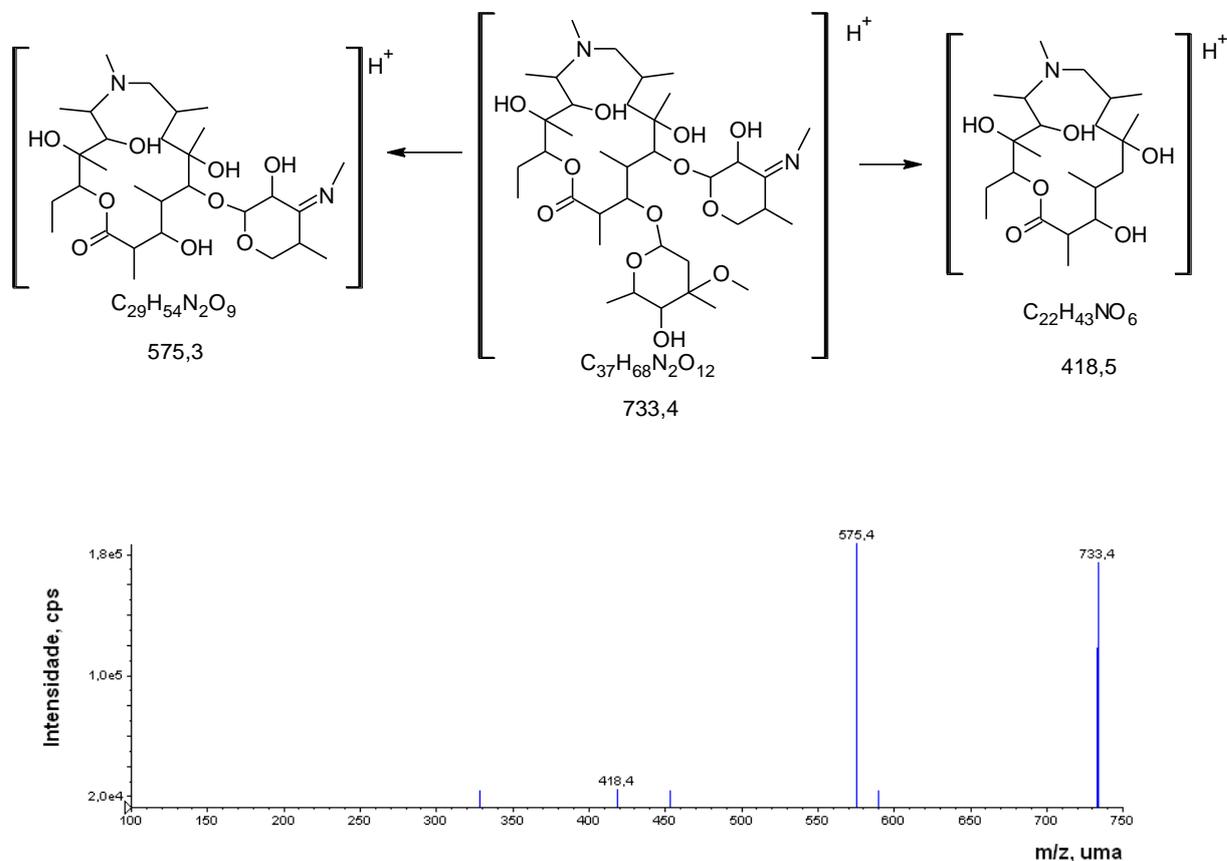


Figura 30. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 733.

O PD 592 (Figura 31) é encontrado apenas após 5 min de tratamento. Segundo Tong et al. (2011) ocorre a eliminação do aminoaçúcar, pois se ocorresse a eliminação da cladinose formaria íon molecular de m/z 591 e para ele se tornar com m/z 592 teria que ocorrer a formação de íon radicalar na fonte de ionização, o que seria um tanto improvável (Schafer et al., 2007).

O espectro de massa MS^2 mostra a formação do carbocátion de m/z 574,3 que é característico da perda de uma molécula de água. O fragmento de m/z 434,5 corresponde ao anel macrolídeo protonado. Com a perda de uma molécula de água deste anel formará o fragmento de m/z 416,3, também um carbocátion. Os fragmentos m/z 116,1 e 158,2 são

formados a partir da cladinosose presente no PD 592. Este PD foi encontrado em todos os pH, a partir de 5 min de tratamento.

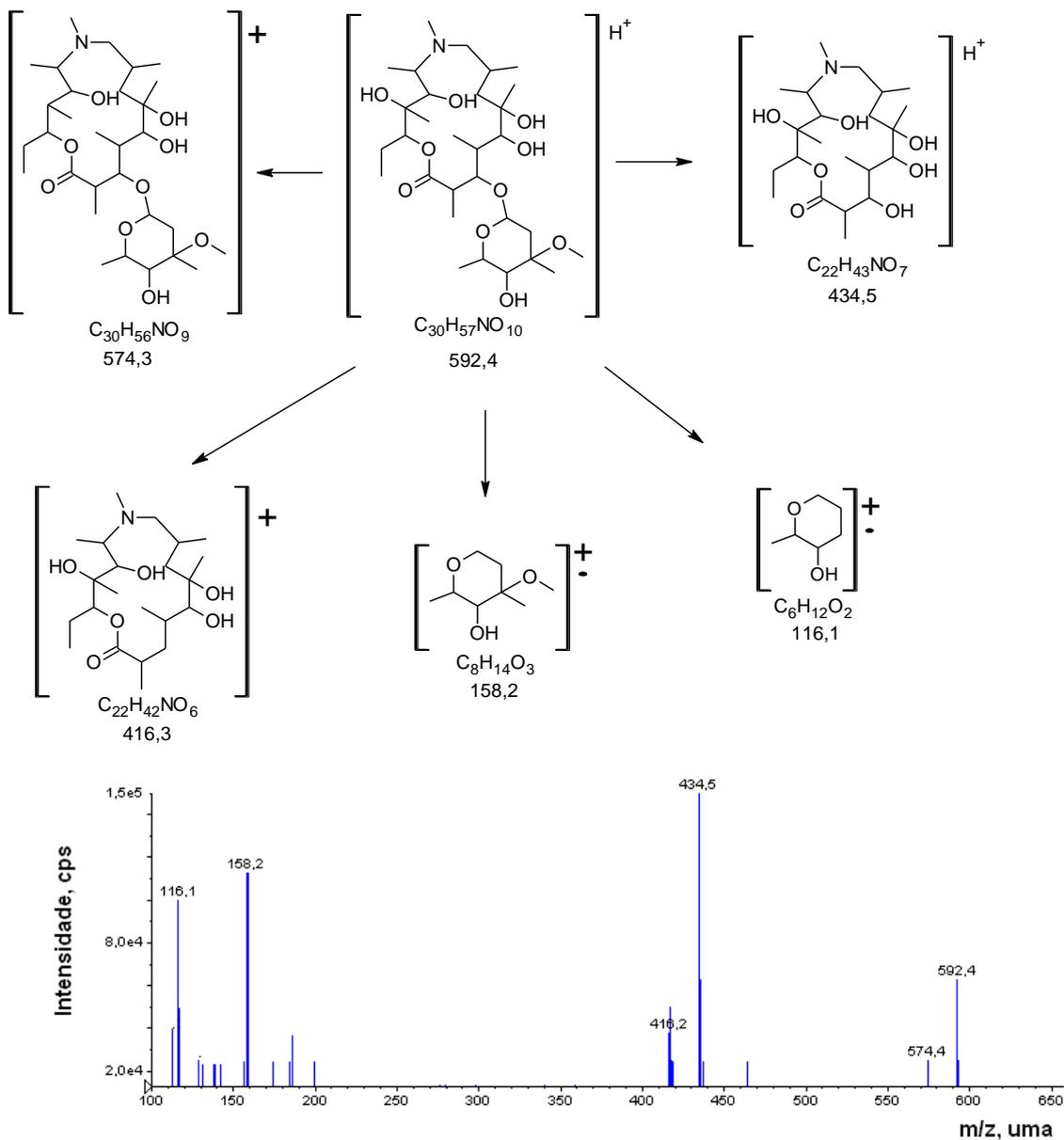


Figura 31 . Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 592.

O PD m/z 735 (Figura 32) formado pela perda de uma metila, proposto como sendo do açúcar desosamina, e sem a ocorrência da dupla ligação entre carbono e nitrogênio. O espectro mostra o fragmento de m/z 592,4 proveniente da perda da desosamina. Para a formação do fragmento m/z 577,4 sugere-se que ocorre a ruptura da lactona no grupo

carboxílico gerando um cátion radicalar. O íon m/z 559,3 é formado pela saída da cladinose. Com a saída dos açúcares forma-se o fragmento m/z 434, que é a massa característica do anel da lactona. E com a eliminação de uma molécula de água do fragmento anterior forma-se o carbocátion m/z 416,3 (Zhang et al., 2009). O PD 735 é formado a partir de 5 min de fotodegradação, principalmente nos pH 7 e 9.

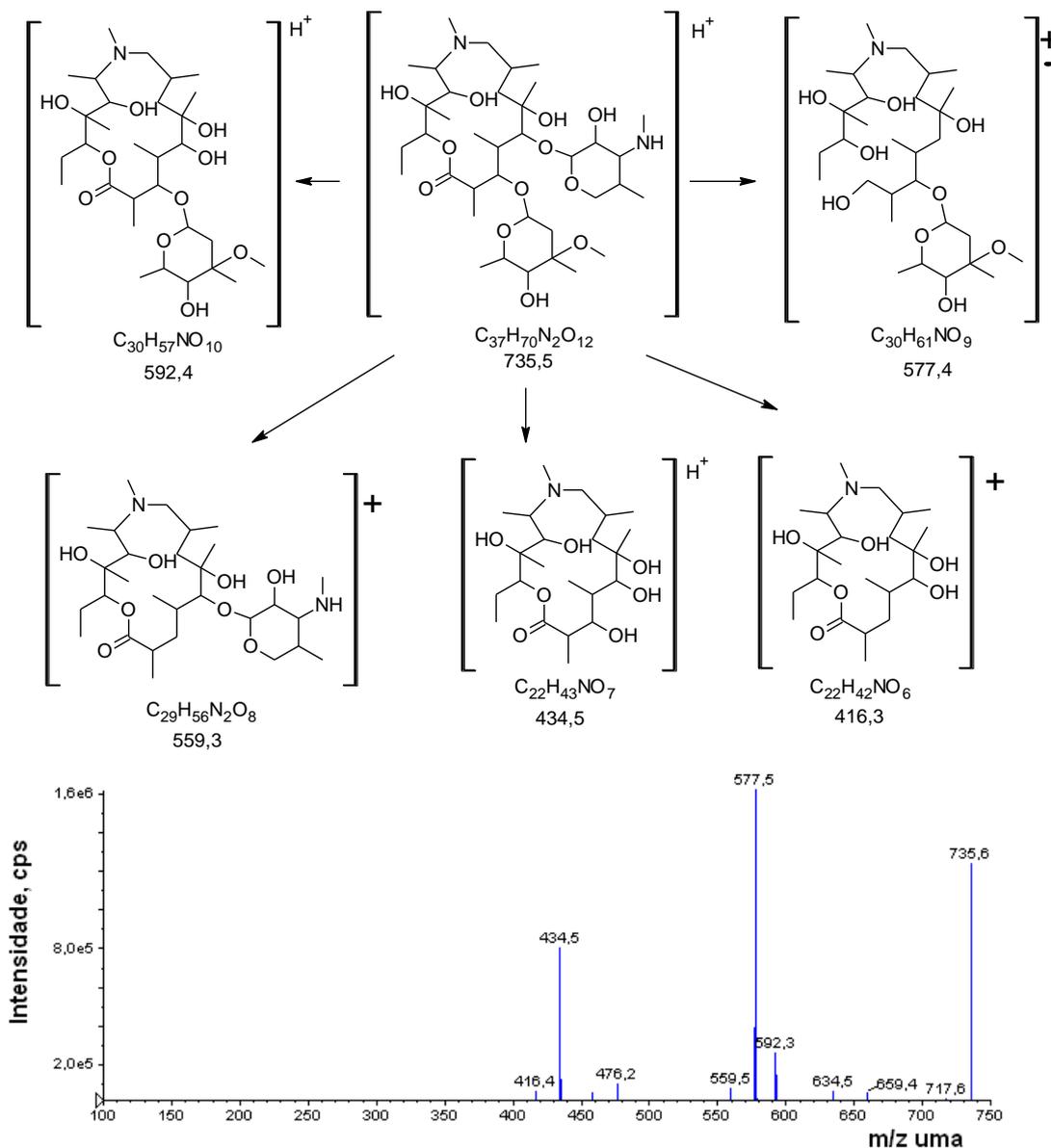


Figura 32. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 735.

O PD m/z 765 (Figura 33) é oriundo da hidroxilação da molécula da AZI. Este produto é fragmentado com formação do íon radicalar m/z 704,4 pela oriundo da perda de uma

molécula de água, seguida do grupamento $-\text{O}(\text{CH}_3)_2$ da cladinose. A ruptura da desosamina forma o cátion radicalar m/z 607,3. A eliminação da desosamina e uma molécula de água leva ao fragmento de m/z 592,4. A partir deste, com a perda 46 Da relativo ao grupamento $-\text{O}(\text{CH}_3)_2$ da cladinose forma-se o cation m/z 546,3. O fragmento de m/z 434,5 característico da lactona sem a desosamina e a cladinose. E com a eliminação de uma molécula de água do fragmento anterior forma-se o carbocátion m/z 416,3. Formado em todos os pH. Este PD não foi mais identificado após 30 min de tratamento.

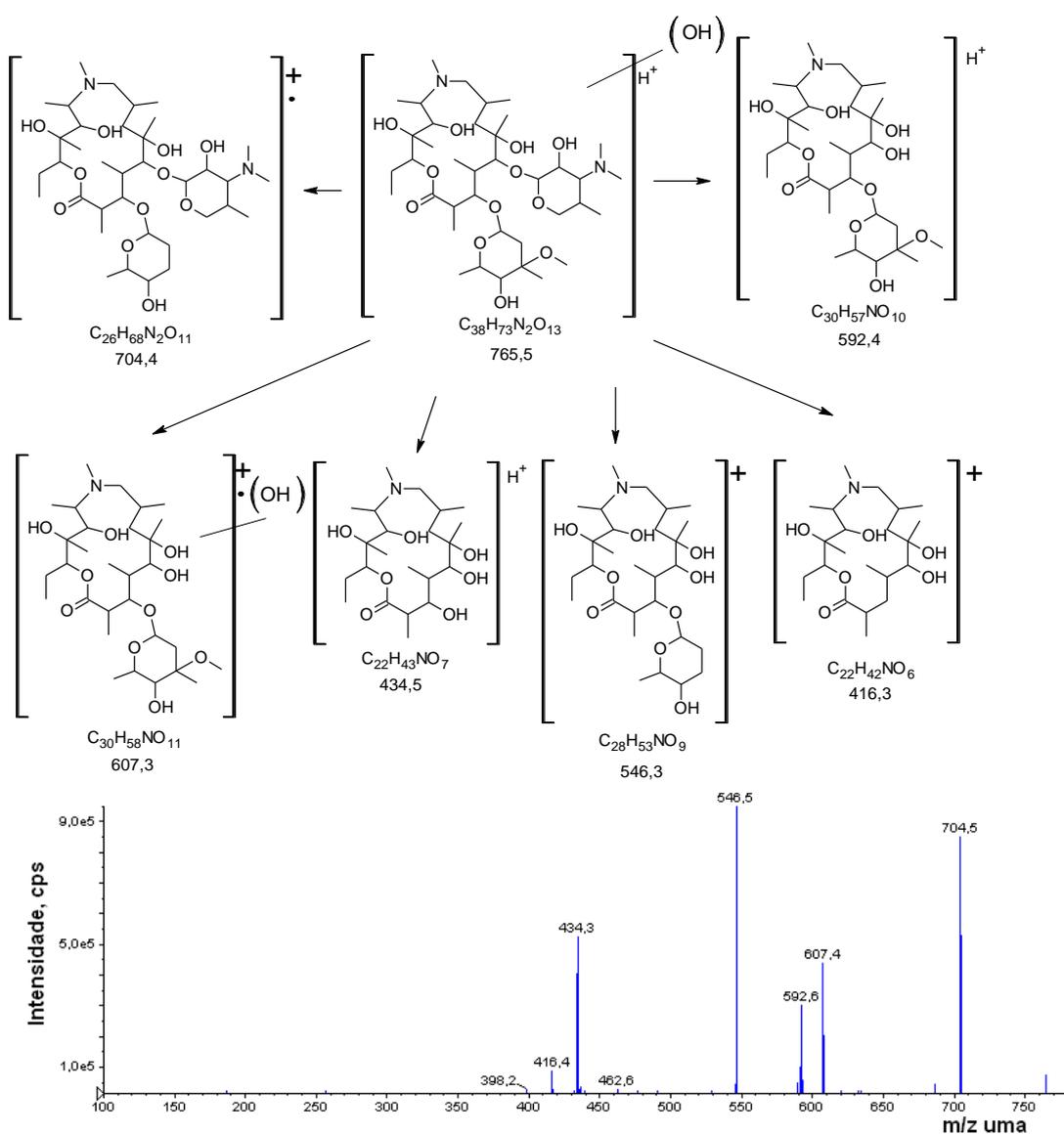


Figura 33. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 765.

O PD m/z 721 (Figura 34) é formado por uma Bi-N-desmetilação na desosamina segundo Tong et al. (2011). Os fragmentos gerados são o m/z 592,4 com a perda do amino açúcar. A partir do PD 721 com a eliminação da cladinose forma-se o fragmento de m/z 563,3. O íon 434,5 é formado pela perda dos açúcares ligados a lactona. Aparece em todos os pH, sendo identificado após 10 min de tratamento.

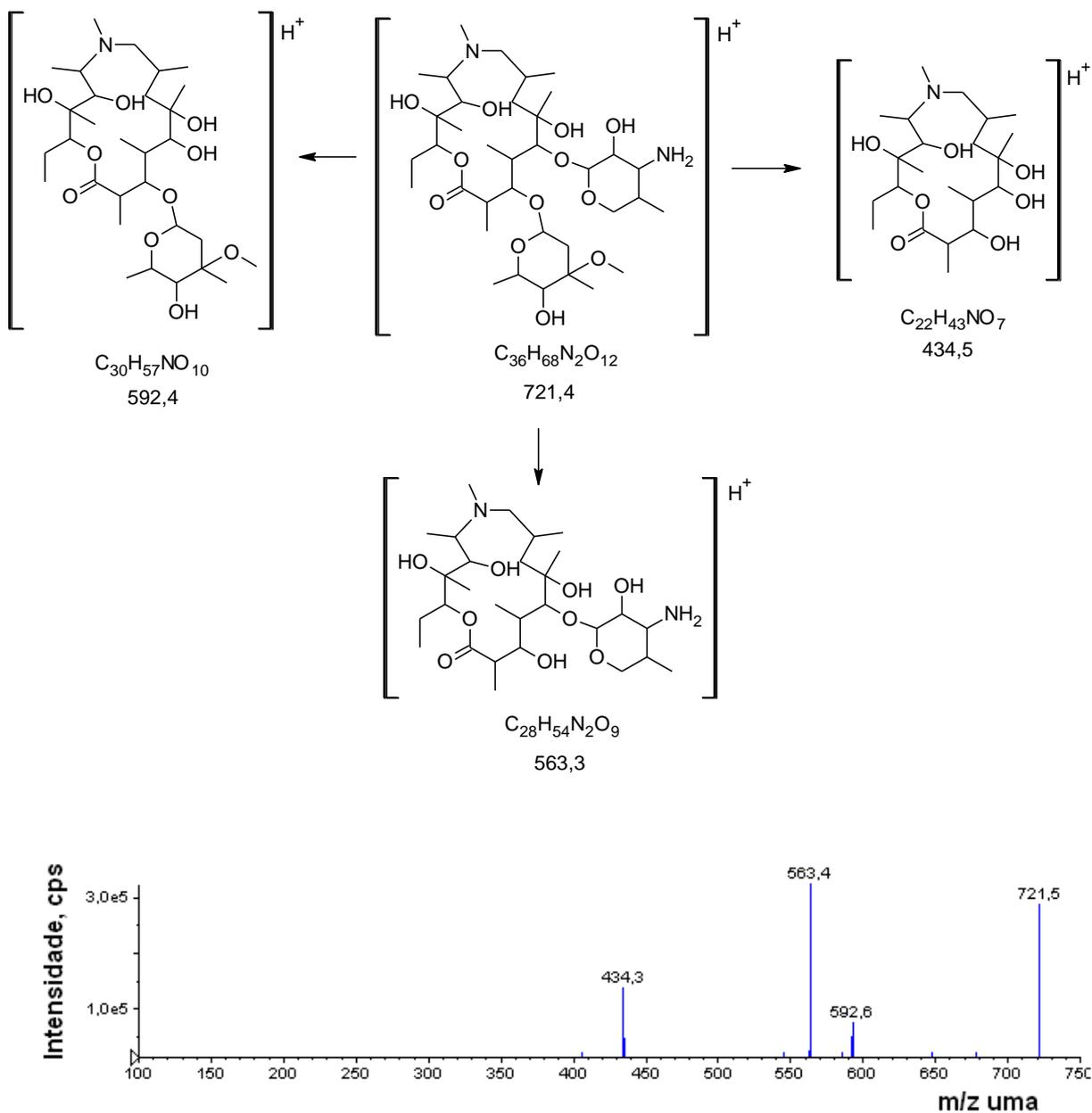


Figura 34. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 721.

O composto PD 752 é formado pela ruptura do anel da lactona no grupamento carboxílico. Este é fragmentado formando o íon de m/z 594,4 relativo à eliminação da desosamina. Com perda da desosamina e, posteriormente, de uma molécula de água forma-se o cátion radicalar m/z 575,7. O fragmento de m/z 436,3 é sugerido pela ruptura dos açúcares ligantes (Figura 35). Formou-se principalmente em pH 3 e 5, e foi detectado até 15 min de tratamento.

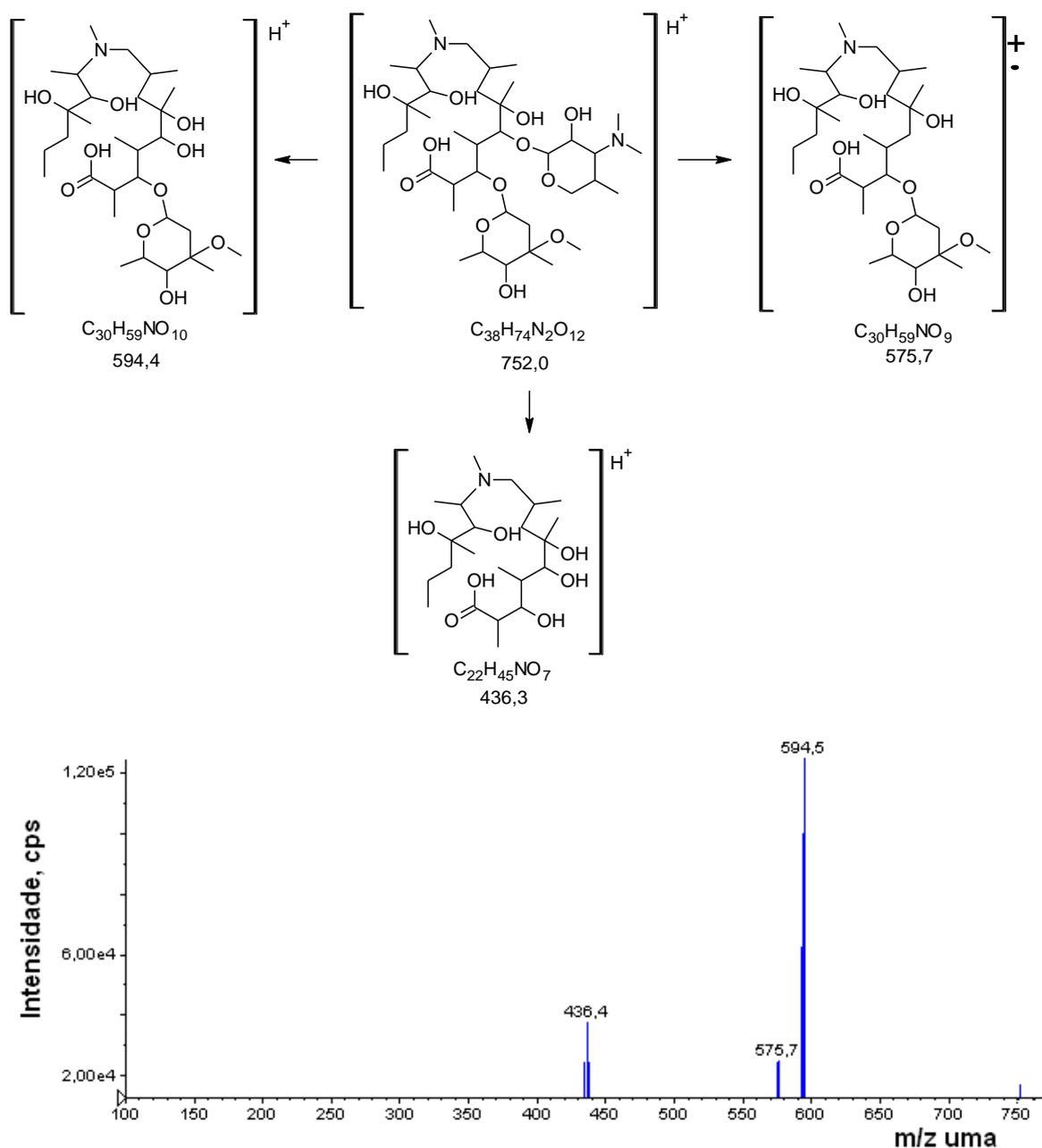


Figura 35. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 752.

O PD 578 (Figura 36) obtido pela eliminação da desosamina e do oxigênio da dupla ligação da carboxila. O fragmento m/z 477,3 é formado pela perda de 101 Da, propõem-se que seja resultante da quebra da lactona formando um íon radicalar. O fragmento de m/z 435,3, um íon radicalar, é formado pela quebra a lactona. O cátion radicalar de m/z 417,3 é formado pela eliminação da cladinose. Este PD foi identificado em todos os pH, a partir de 5 min até o fim do tratamento, 60 min.

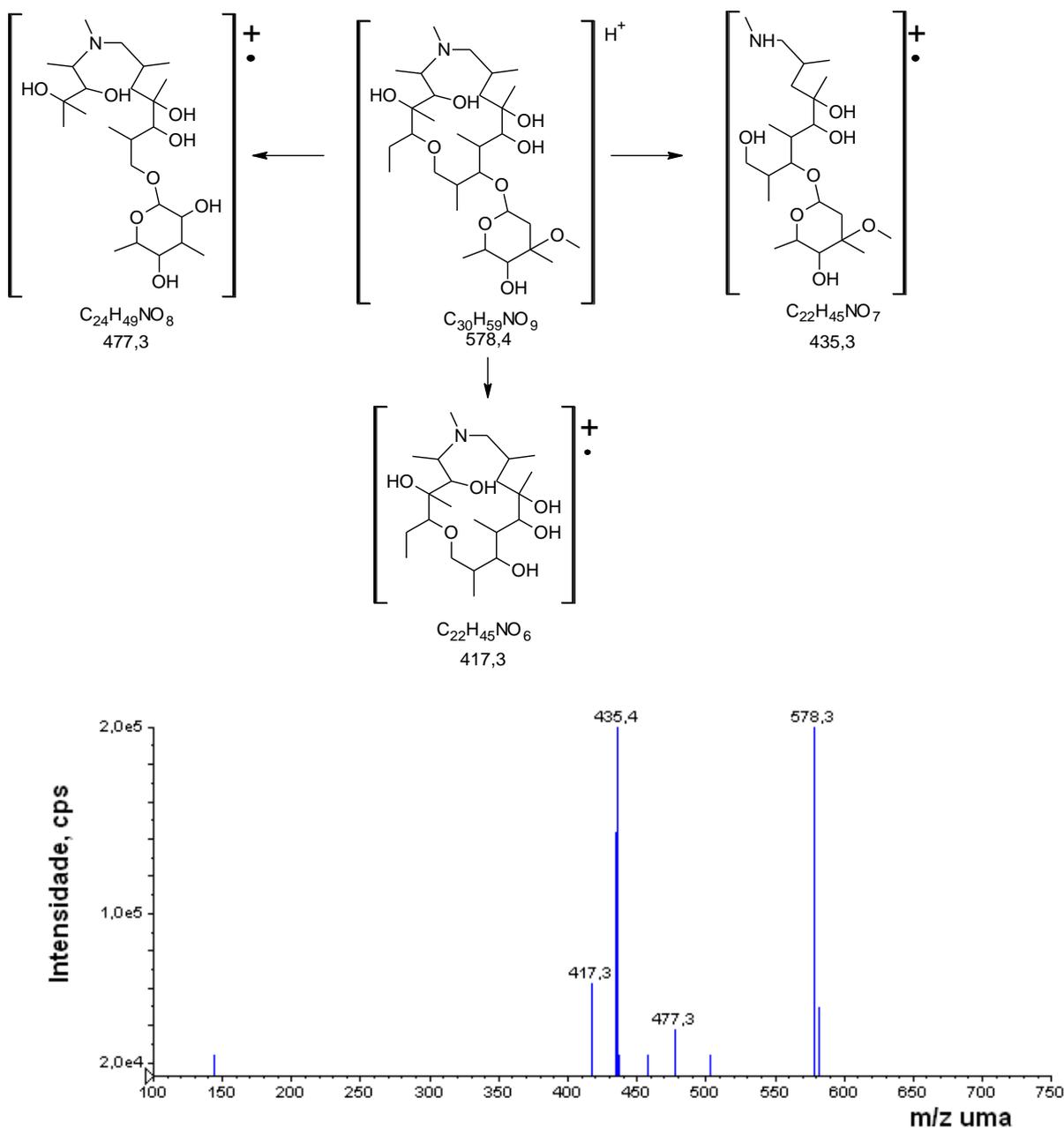


Figura 36. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 578.

Para o PD 705,9 propõem-se a perda do grupamento $-\text{O}(\text{CH}_3)_2$ da cladinose. Os fragmentos mais intensos gerados no espectro de MS^2 destes produtos são m/z 575,3 referente a eliminação da cladinose e saída de uma metila da desosamina. O íon m/z 158,0 é proposto como sendo formado a partir da perda da desosamina. Este composto foi identificado em todos os pH, em todos os tempos de amostragem durante o tratamento (Figura 37).

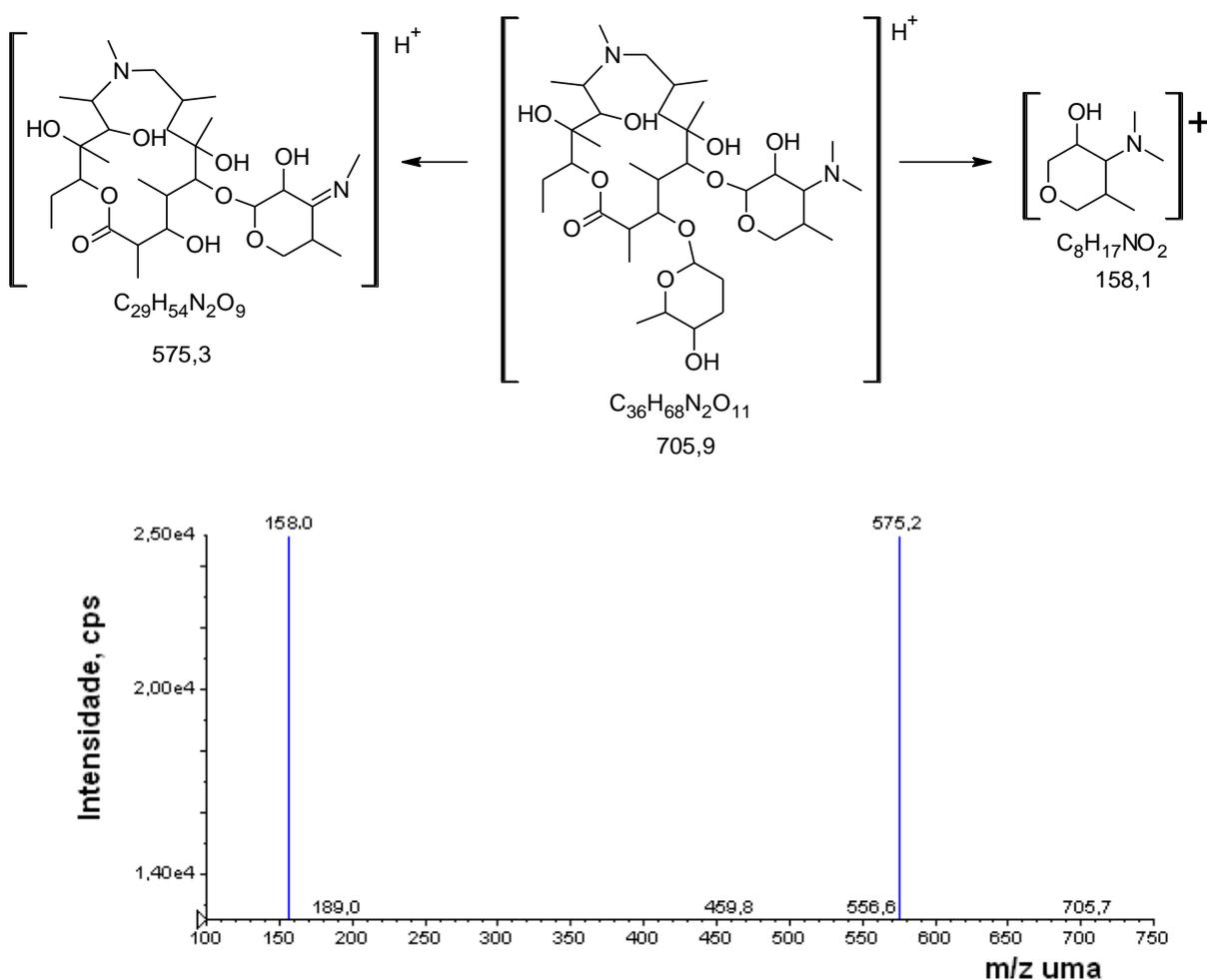


Figura 37. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 705.

4.9.2. Produtos de degradação da AZI em efluente hospitalar

Foram encontrados 3 PDs de AZI em efluente hospitalar (Figura 38). O PD m/z 765 é oriundo da hidroxilação da molécula da AZI. Entretanto não foi possível prever em que

carbono ocorre esta adição. O espectro apresenta fragmentos semelhantes ao encontrado na fotólise de solução aquosa, como os íons de m/z 546, 434 e 416. O PD m/z 721 é formado por uma Bi-N-desmetilação na desosamina e o espectro está de acordo com o encontrado em solução aquosa, com os mesmos fragmentos m/z 563 e 434. O PD de m/z 737 encontrado no efluente hospitalar apresenta fragmentos que estão de acordo com os encontrados nos espectros dos produtos de degradação da AZI, como 721, 607, 434. Propõe-se que este é formado pela perda de uma metila do açúcar desosamina, e a abertura do anel da lactona com formação de carboxila.

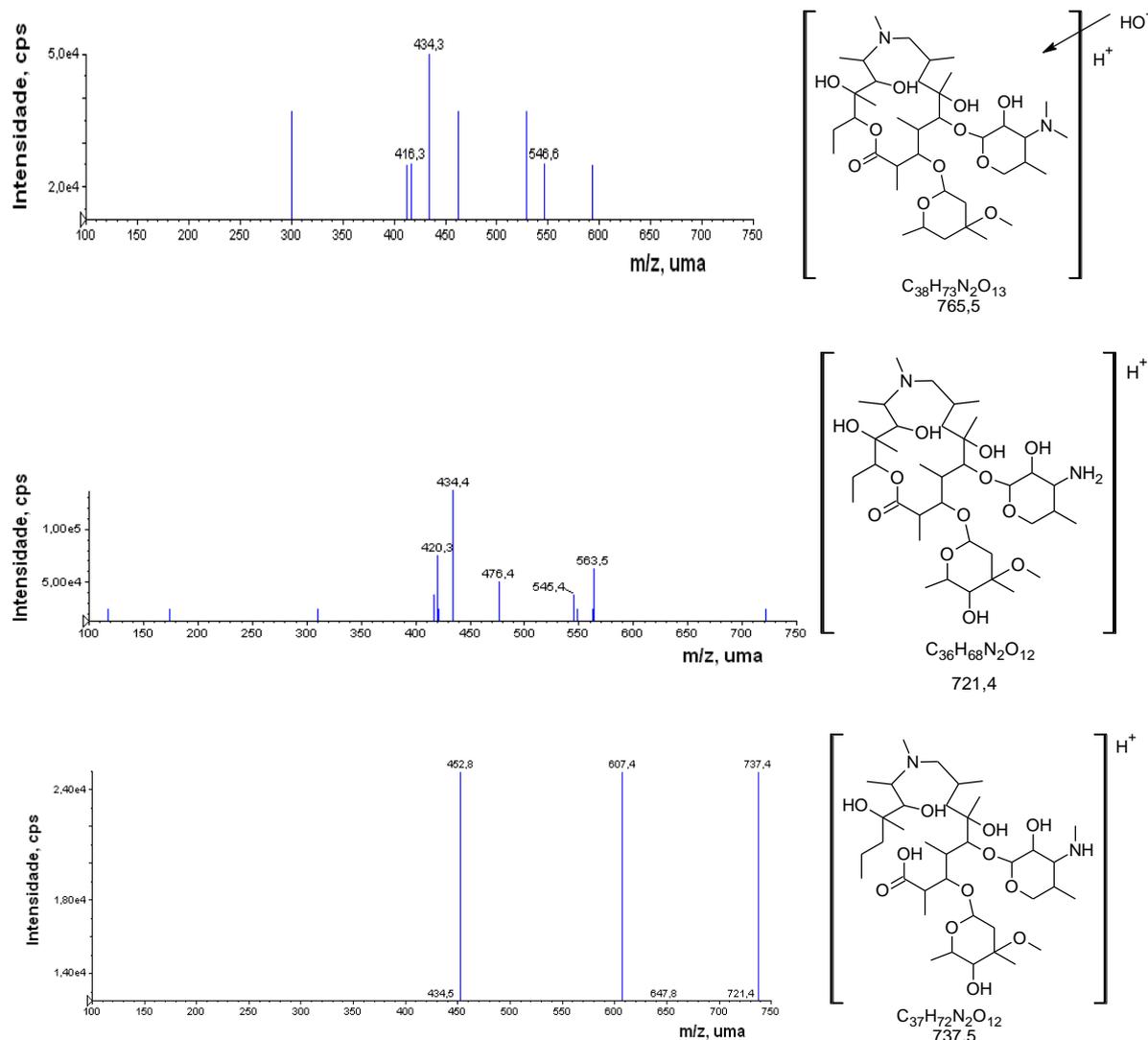


Figura 38. Estruturas químicas propostas para os produtos de fotodegradação de AZI em efluente hospitalar.

4.9.3. Produtos de degradação propostos para ERI solução aquosa

A primeira etapa na elucidação das estruturas dos PDs consiste em determinar o padrão de fragmentação do composto de partida da ERI que elui em 5,8 min e exibe m/z $[M+H]^+$ de 735,4. Essa m/z foi usada como IP para fragmentação (MS^2), que pode ser observada na Figura 39.

A ERI perde uma molécula de água formando o fragmento de m/z 717. Este passa por uma desidratação proposto na desosamina formando o íon m/z 699. Com a perda da desosamina forma-se o íon m/z 577. Este perde uma molécula de água formando o fragmento de m/z 559, estes resultados estão de acordo com El-Bondkly et al. (2008). Os fragmentos 158 e 116 são característicos dos antibióticos macrolídeos.

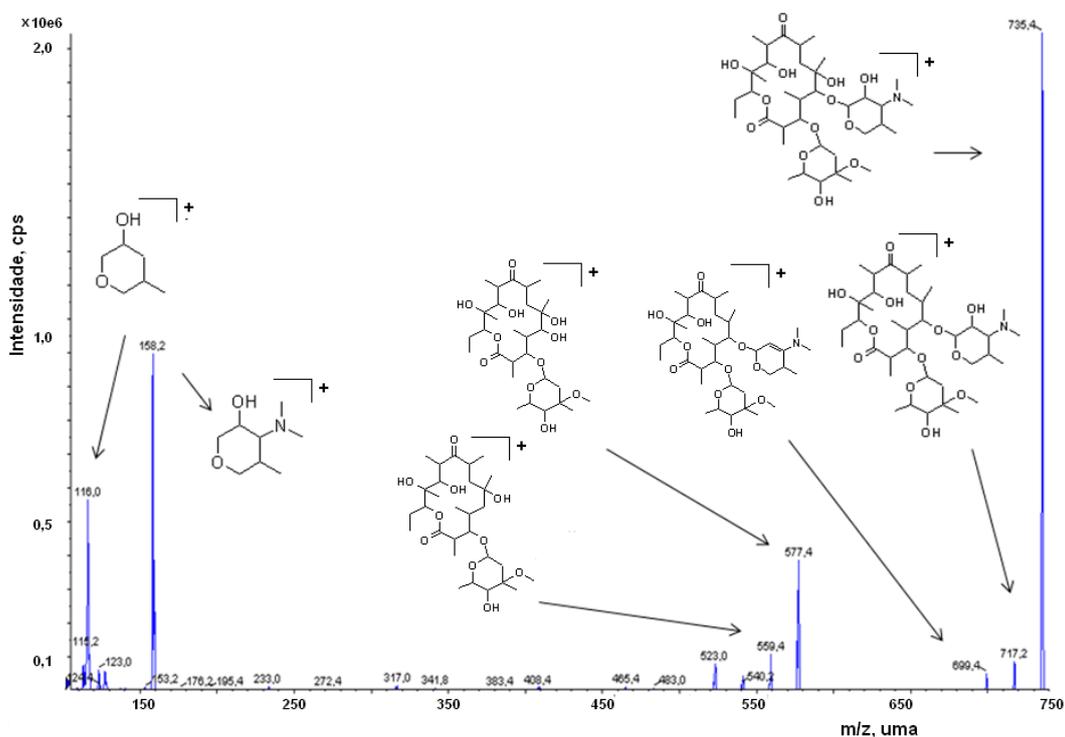


Figura 39. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação proposto para a ERI (m/z 735,5 MS^2).

Foram identificados 6 PDs no estudo de fotodegradação da ERI (Tabela 21 e Figura 40). O PD 717 foi formado em CE de 45 V, os demais em CE de 30 V. Para o PD 673 não foi possível a identificação do espectro de MS². Todavia, este composto foi encontrado em todos os pH e está de acordo com o proposto por Pendela et al. (2011) que identificaram este composto de degradação em formulações contendo ERI.

Tabela 21. Produtos de degradação identificados por LC-MS/MS para ERI.

PD [M+H]⁺	tr (min)	Fórmula Molecular	MS² m/z
717	6,3	C ₃₇ H ₆₆ NO ₁₂	559; 541; 523; 483; 464; 409; 342; 158; 116
577	6,0	C ₂₉ H ₅₂ O ₁₂	559; 158; 116
559	6,4	C ₂₉ H ₅₀ O ₁₀	541; 523; 483; 464; 409; 342; 158; 116
721	5,8	C ₃₆ H ₆₆ NO ₁₃	685; 563; 527; 509; 450; 365; 290; 144
369	7,8	C ₂₁ H ₃₈ O ₅	234; 152; 116
673	6,1	C ₃₅ H ₆₀ O ₁₂	NI

NI: não identificado.

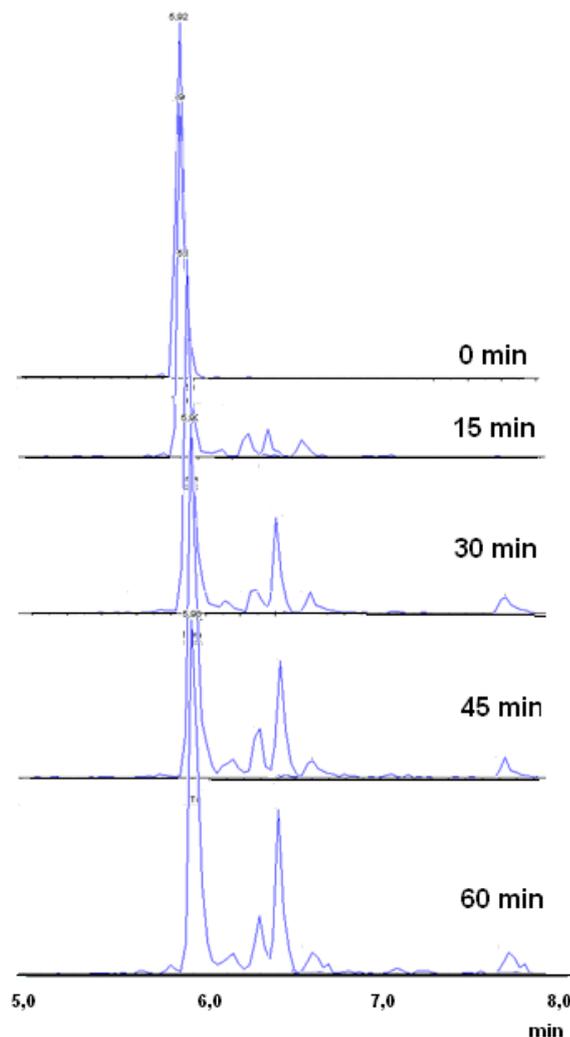


Figura 40. Cromatograma de íons totais durante o processo de degradação e formação dos PDs de ERI.

Os PD da ERI por fotodegradação em solução aquosa que foram propostos estão representados na Figura 41. O PD 717 é oriundo da perda de uma molécula de água da lactona, no carbono 9 segundo Crowe et al. (2002). O PD 577 é formado pela perda da desosamina. O PD 559 é formado pela perda da desosamina e uma molécula de água. Para a formação do PD 721 é proposto uma N-desmetilação. O PD 673 surge da perda da amina da desosamina e de uma molécula de água. O PD 369 é oriundo da ruptura dos açúcares ligantes na lactona e de uma molécula de água.

Os produtos gerados assim como seus espectros de MS^2 estão de acordo com estudos de fragmentação e compostos encontrado na degradação de formulações farmacêuticas reportados na literatura (Bondkly et al., 2008; Pendela et al., 2011; Crowe et al., 2002; Kearney et al., 1999; Gates et al., 1999; Hassanzadeh et al., 2007). Todavia, não foi

encontrado nenhum estudo relata a degradação de ERI por fotólise, sendo estes propostos neste estudo.

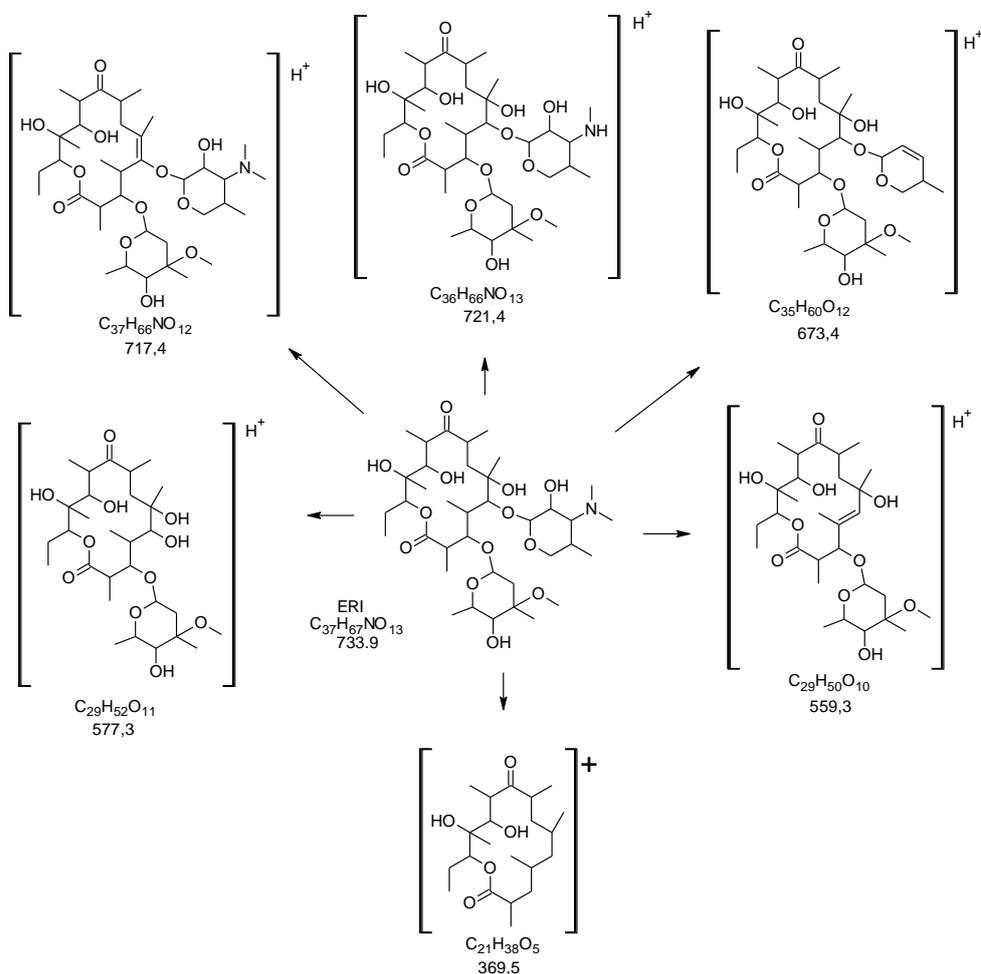


Figura 41 . Estruturas químicas propostas para os produtos de fotodegradação de ERI.

A elucidação e identificação dos PD formados foi possível analisando os espectros de MS^2 obtidos nos experimentos, que mostram perfis de fragmentação semelhantes, sendo proposto a partir destes a rota de fragmentação de cada produto.

O PD 717 é oriundo da perda de uma molécula de água da lactona, no carbono 9 segundo Crowe et al. (2002) (Figura 42). O íon de m/z 559 é formado pela perda de 158 Da o que corresponde a saída da desosamina. Em seguida é formado o fragmento m/z 541 e 523 corresponde a sucessíveis desidratações, com a formação de carbocátion e cátion radicalar. Os

fragmentos de m/z 158 e 116 são oriundos da cladinose. Para os demais fragmentos demonstrados no espectro não foi possível a elucidação estrutural (Bondkly et al., 2008).

O PD 717 é formado em todos os pH, principalmente em pH ácido que favorece a desidratação da molécula de ERI. Este PD é citado por todos os estudos (Bondkly et al., 2008; Pendela et al., 2011; Crowe et al., 2002).

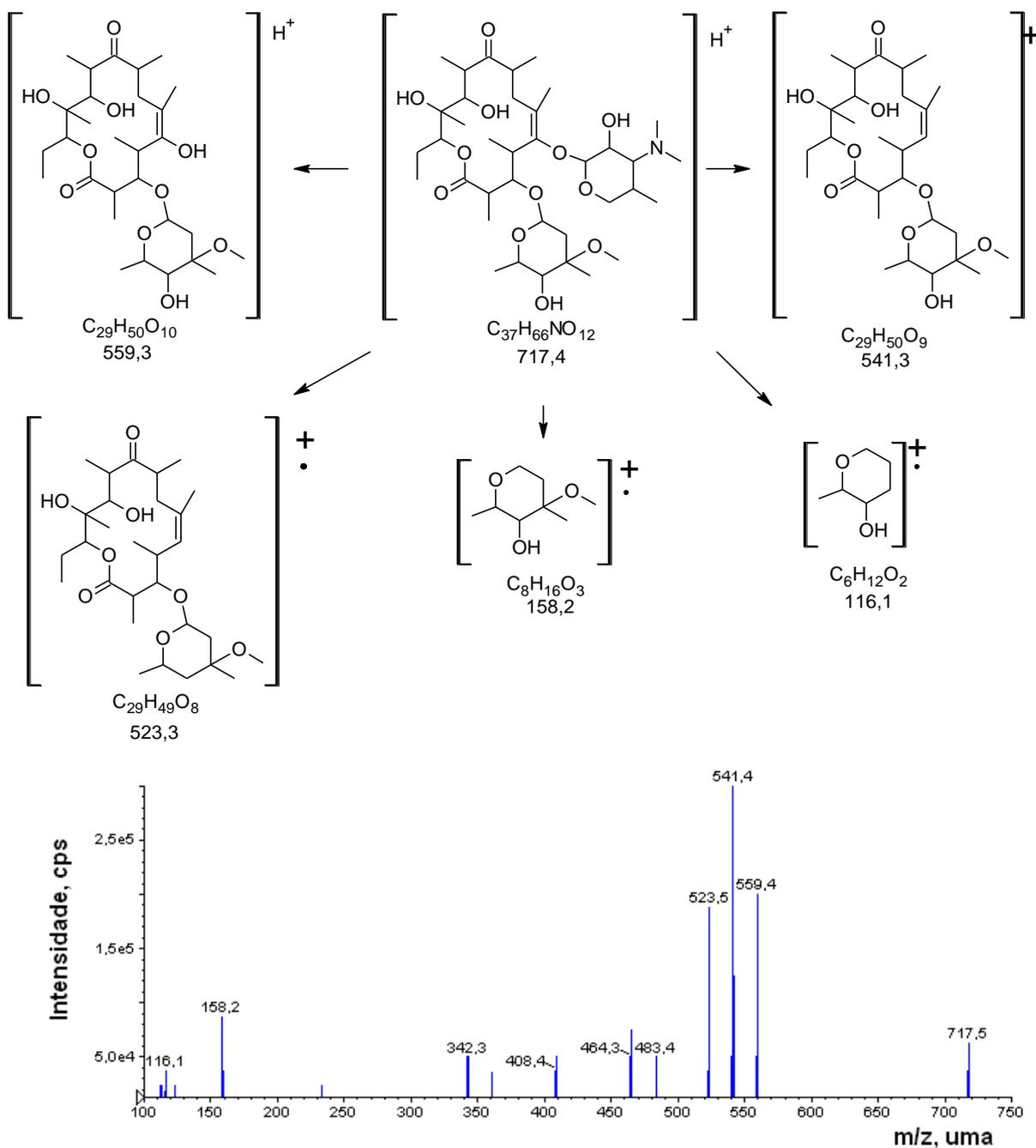


Figura 42. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 717.

O PD 577 é formado pela perda da desosamina. Este composto é fragmentado no carbocátion m/z 559 referente a perda de uma água. Os demais fragmentos mostrados no espectro de MS^2 são o m/z 158 e 116, confirmando ser este um PD da ERI (Figura 43) (Kearney et al., 1999). Formado em todos os pH, a partir de 5 min de fotodegradação.

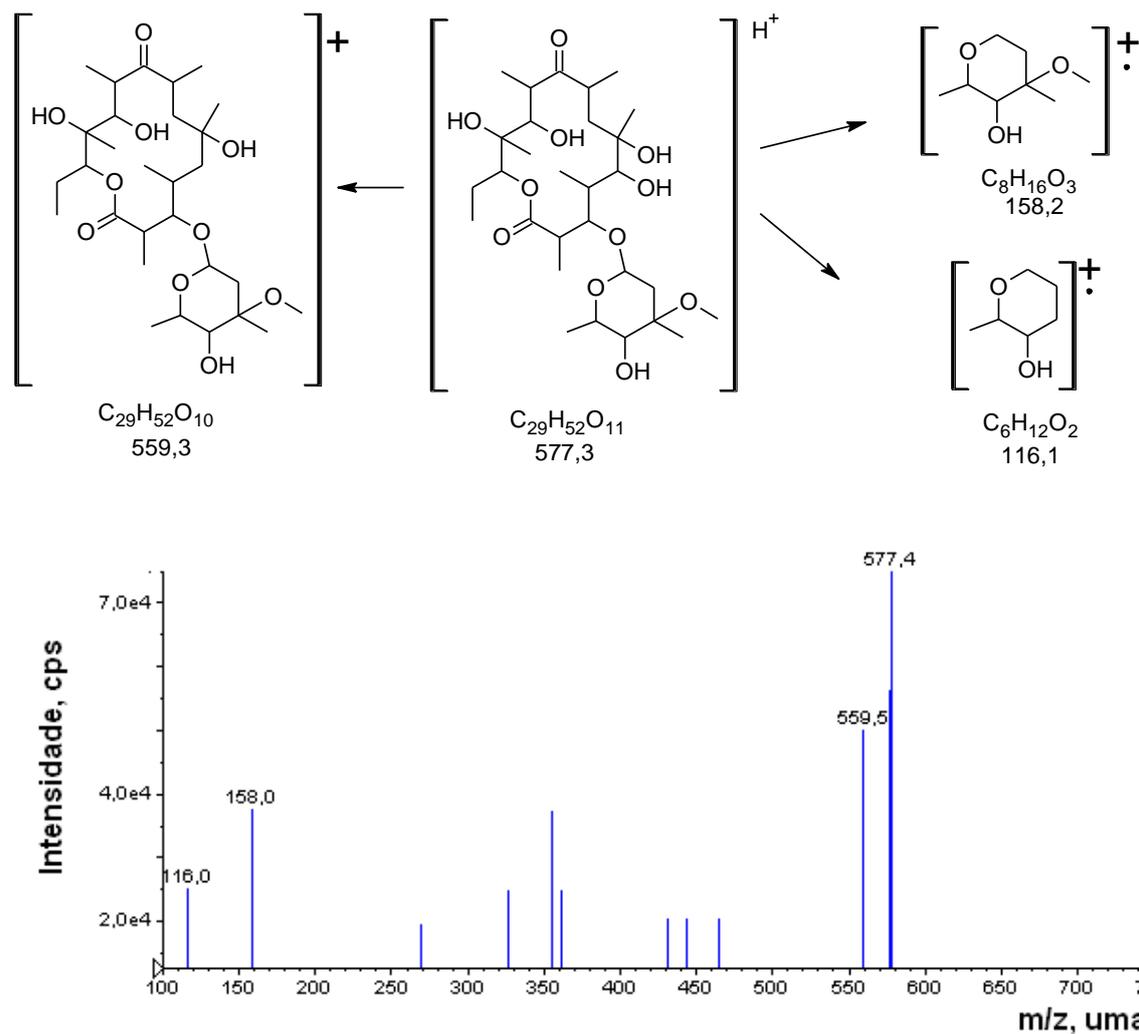


Figura 43. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 577.

O PD 559 é formado pela perda da desosamina (Figura 44). Este é fragmentado com formação do íon de m/z 541,3 devido a perda de 18 Da. O cátion radicalar m/z 523 é formado pela perda de uma molécula de água. Os fragmentos de m/z 158 e 116 característicos dos

macrolídeos também são formados (Bondkly et al. 2008). Este PD é formado em todos os pH, sendo detectado após 10 min de tratamento.

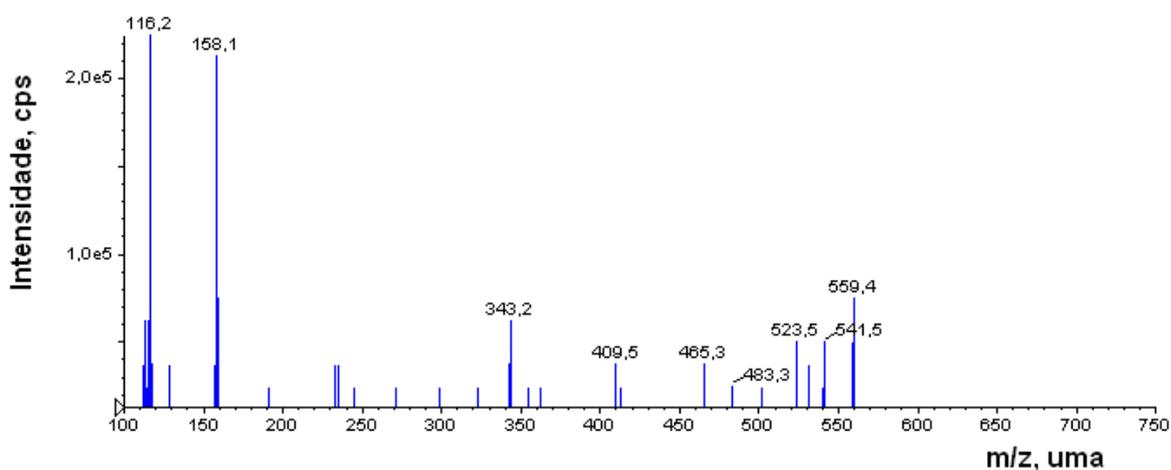
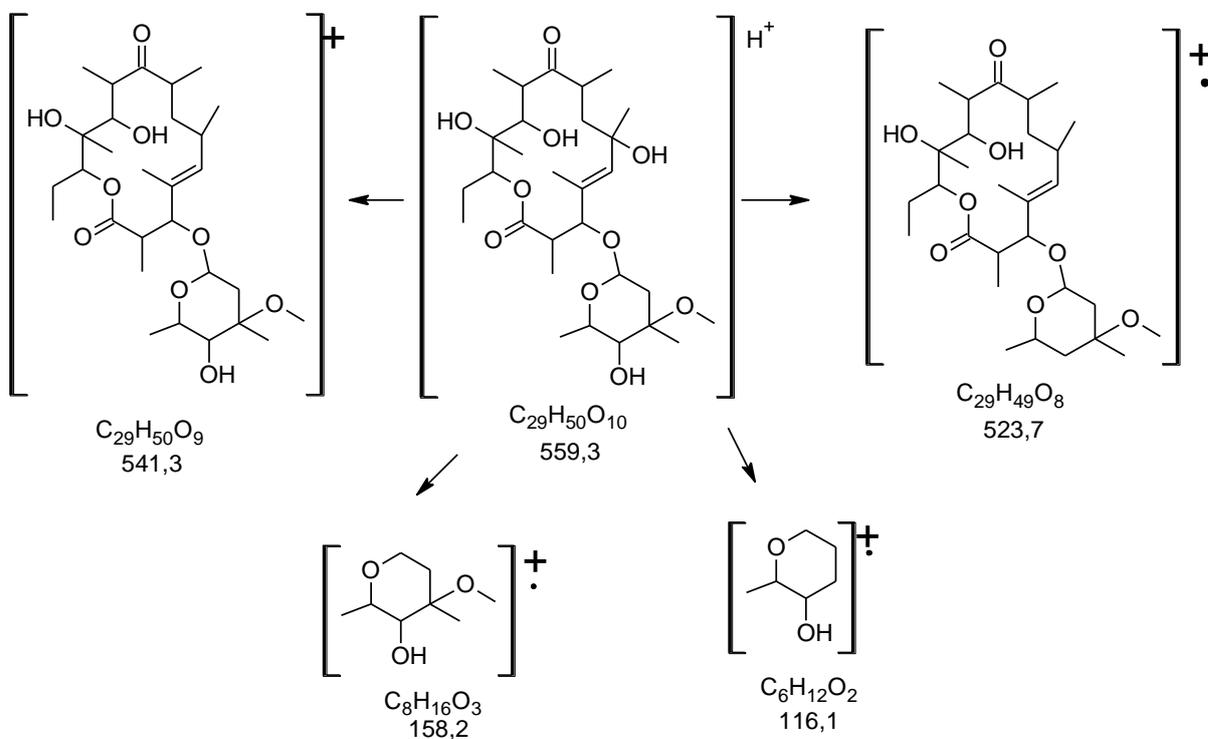


Figura 44. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 559.

Para a formação do PD 721 (Figura 45) é proposto uma N-desmetilação. O fragmento de m/z 685,4 é relativo perda de duas moléculas de água. Seguido pela ruptura da desosamina

forma-se o íon de m/z 563,3. Em seguida é formado fragmento m/z 527 pela perda duas águas. Com a quebra do grupamento $-O(CH_3)_2$ da cladinose forma-se e água da lactona forma-se o íon 451,3. Os demais fragmentos são relativos a abertura da lactona segundo a literatura. (Pendela et al., 2011; Crowe et al., 2002). Encontrado em todos os pH após 5 min de tratamento.

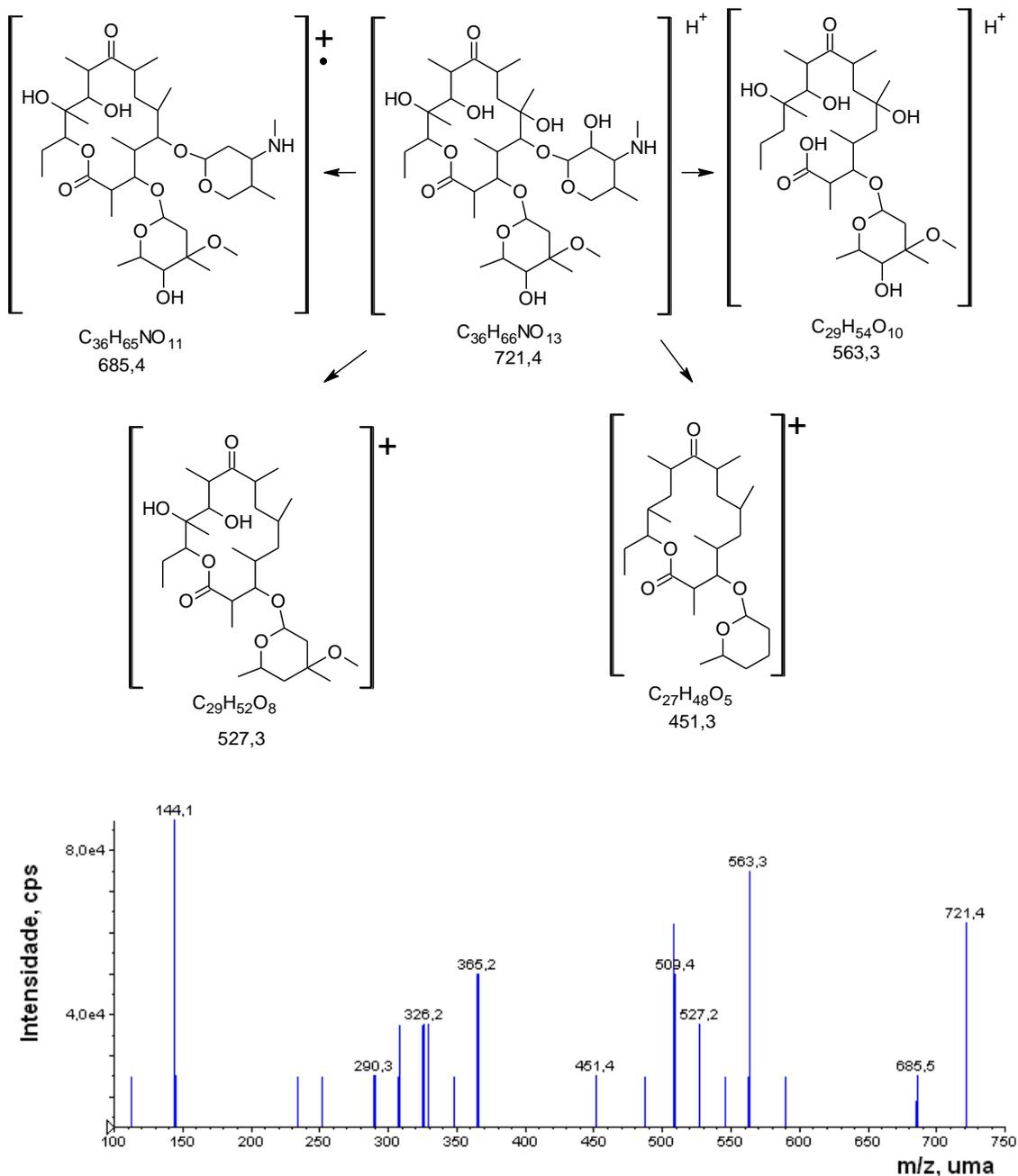


Figura 45. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 721.

O PD 369 (Figura 46) é oriundo da ruptura dos açúcares ligantes na lactona e de uma molécula de água. Pelo espectro de massas MS^2 forma-se o íon de m/z 233, 152 e 116 por sucessivas reações de quebra da lactona (Pendela et al., 2011; Kearney et al., 1999; Gates et al., 1999). Este composto é encontrado em todos os pH após 30 min de tratamento.

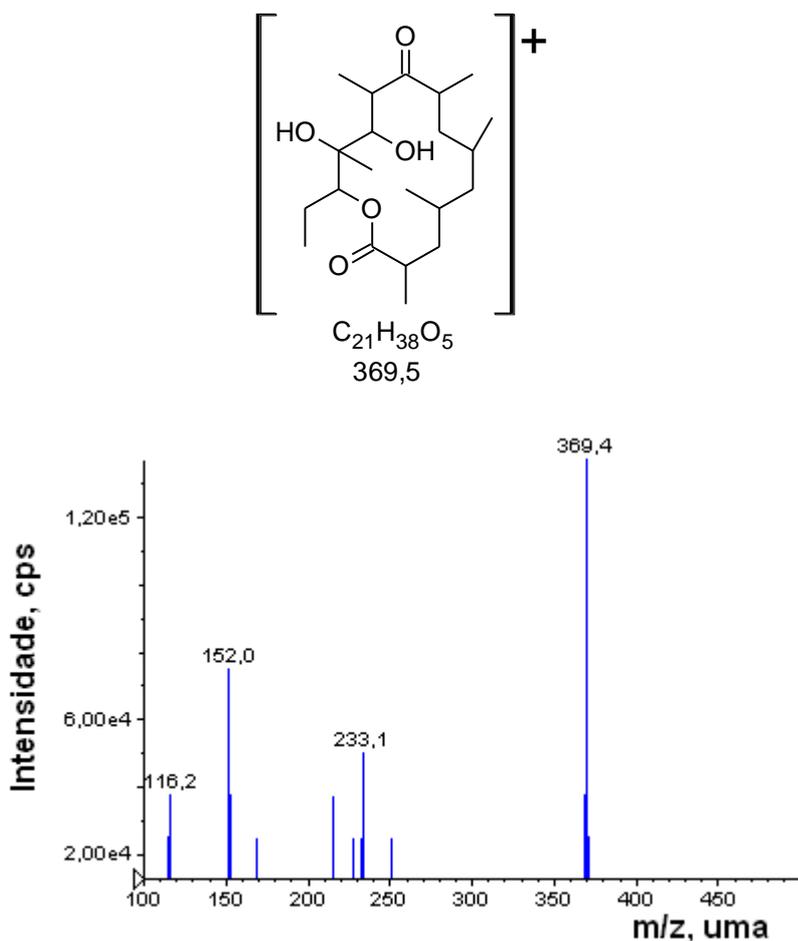


Figura 46. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 369.

4.9.4. Produtos de degradação da ERI em efluente hospitalar

Para os experimentos de fotólise no efluente hospitalar foi possível identificar apenas o PD 717 que é oriundo da perda de uma molécula de água da lactona (Figura 47). Este composto é amplamente citado na literatura (Bondkly et al., 2008; Pendela et al., 2011; Crowe et al., 2002; Kearney et al., 1999; Gates et al., 1999; Hassanzadeh et al., 2007). Comparando o

espectro de fragmentação do PD identificado em solução aquosa com o espectro do experimento em efluente hospitalar verifica-se a presença de um número menor de fragmentos, possivelmente devido à interferências da matriz que pode interferir no processo de fotólise, como na identificação no momento da análise.

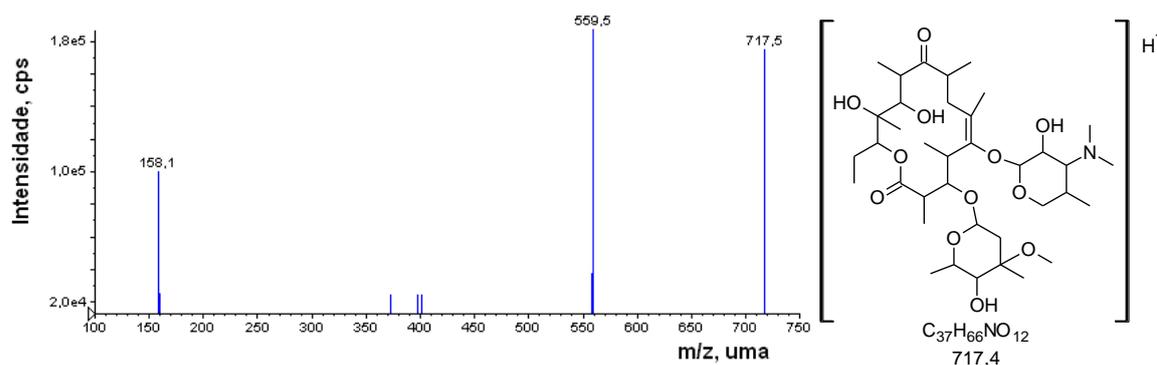


Figura 47 . Estrutura química proposta para o produto de fotodegradação de ERI em efluente hospitalar.

4.9.5. Produtos de degradação propostos para CLARI em solução aquosa

A primeira etapa na elucidação das estruturas dos PDs consiste em determinar o padrão de fragmentação do composto de partida da CLARI que elui em 6,4 min e exibe m/z $[M+H]^+$ de 748.5. Essa m/z foi usada como Íon Precursor para fragmentação (MS^2), que pode ser observada na Figura 48.

Com a perda de 158 Da, correspondente a cladinose, da molécula de CLARI é formado o fragmento de m/z de 590. Após ocorre uma Bi-N-desmetilação na desosamina formando o fragmento de m/z de 558 (Leonard et al., 2006). Os fragmentos m/z 158 e 116 característicos deste grupo de antibióticos é formado pela molécula de desosamina e cladinose.

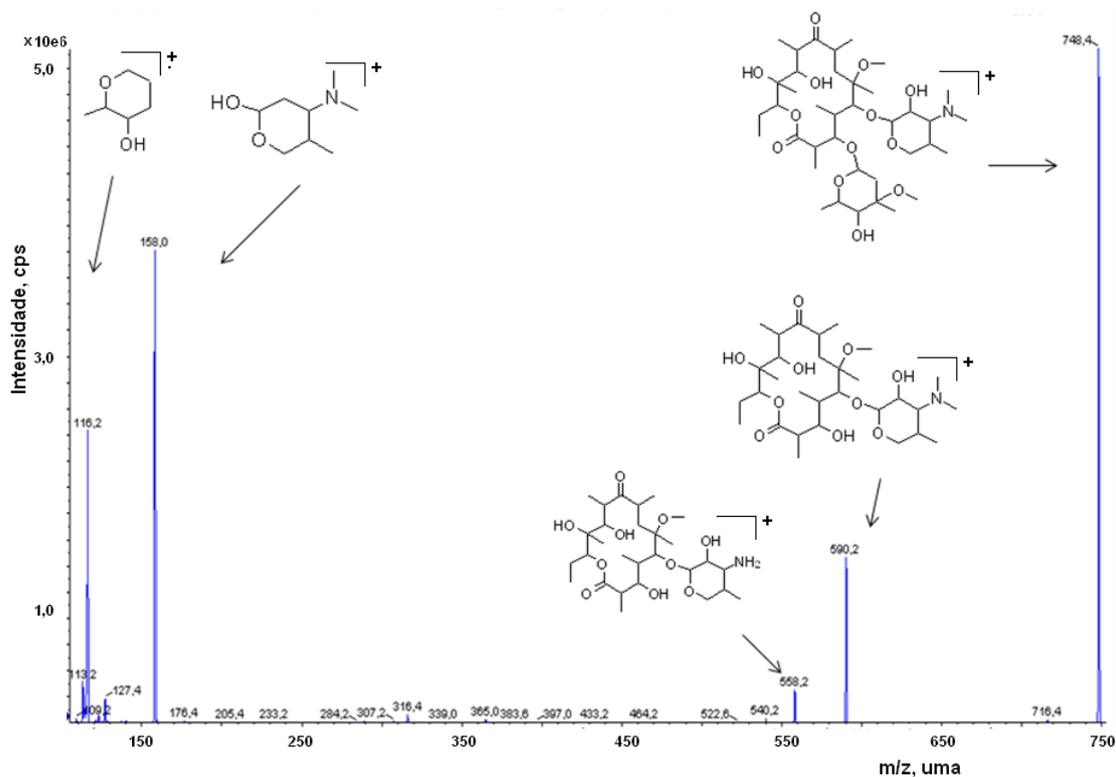


Figura 48. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação proposto para a CLARI (m/z 748.4 MS^2).

Foram identificados 7 PDs no estudo de fotodegradação da CLARI (Tabela 22 e Figura 49). Os PDs 737, 381 e 369 foram formados em CE de 45 V, os demais em CE de 30 V.

Para os PDs 764, 607 não foi possível a identificação do espectro de MS^2 . Entretanto esses compostos são relatados na literatura como produtos de degradação da CLARI (Leonard et al., 2006; Lange et al., 2006; Calza et al., 2012; Vione et al., 2009).

Tabela 22. Produtos de degradação identificados por LC-MS/MS para CLARI.

PD [M+H] ⁺	tr (min)	Fórmula Molecular	MS ² m/z
623	5,2	C ₃₀ H ₅₆ O ₁₃	548; 465; 433; 158
591	6,4	C ₃₀ H ₅₄ O ₁₁	559; 158; 116
737	5,8	C ₃₇ H ₇₀ NO ₁₃	581; 547; 379; 158
381	7,8	C ₂₂ H ₃₈ O ₃	280; 116
369	8,3	C ₁₉ H ₄₃ O ₆	327; 251; 232; 214; 153; 116
764	5,4	C ₃₈ H ₆₉ NO ₁₄	NI
607	6,0	C ₃₁ H ₆₀ NO ₁₀	NI

NI: não identificado

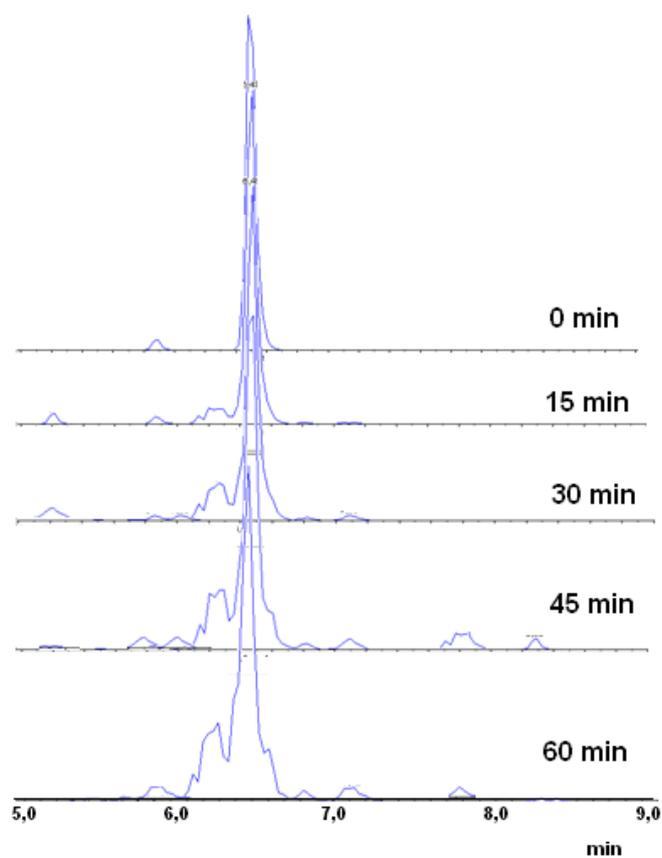


Figura 49. Cromatograma de íons totais durante o processo de degradação e formação dos PDs de CLARI.

Os PDs identificados para a degradação de CLARI por fotodegradação em solução aquosa estão representado na Figura 50. O PD 765 é oriundo da oxidação da CLARI. O PD 607 é formado pela ruptura da desosamina. Para o PD 623 propõe-se que este é formado pela ruptura da desosamina e pela adição de dois grupos hidroxila na lactona. Para a formação do PD 591 ocorre a perda de 158 Da da molécula de CLARI, o que corresponde a perda da desosamina. O PD 737 é formado pela perda de uma metila, proposto sendo esta do grupamento amina. O PD 381 é formado pela perda dos dois açúcares da molécula de CLARI e três moléculas de água. A ruptura dos açúcares ligantes, juntamente com moléculas de água da lactona e um grupamento $-OCH_3$ forma o PD 369.

Foram encontrados três trabalhos com compostos de degradação e impurezas formadas a partir de CLARI. Destes, dois trabalhos são utilizados fotólise na presença de catalisadores (Calza et al., 2012; Leonard et al., 2006) e, um utilizando ozonização (Lange et al., 2006). Os resultados propostos são baseados nestes trabalhos, entretanto nem todos os compostos encontrados no presente estudo foram mencionados por estes autores, o que se verificou foi a semelhança dos espectros apresentados.

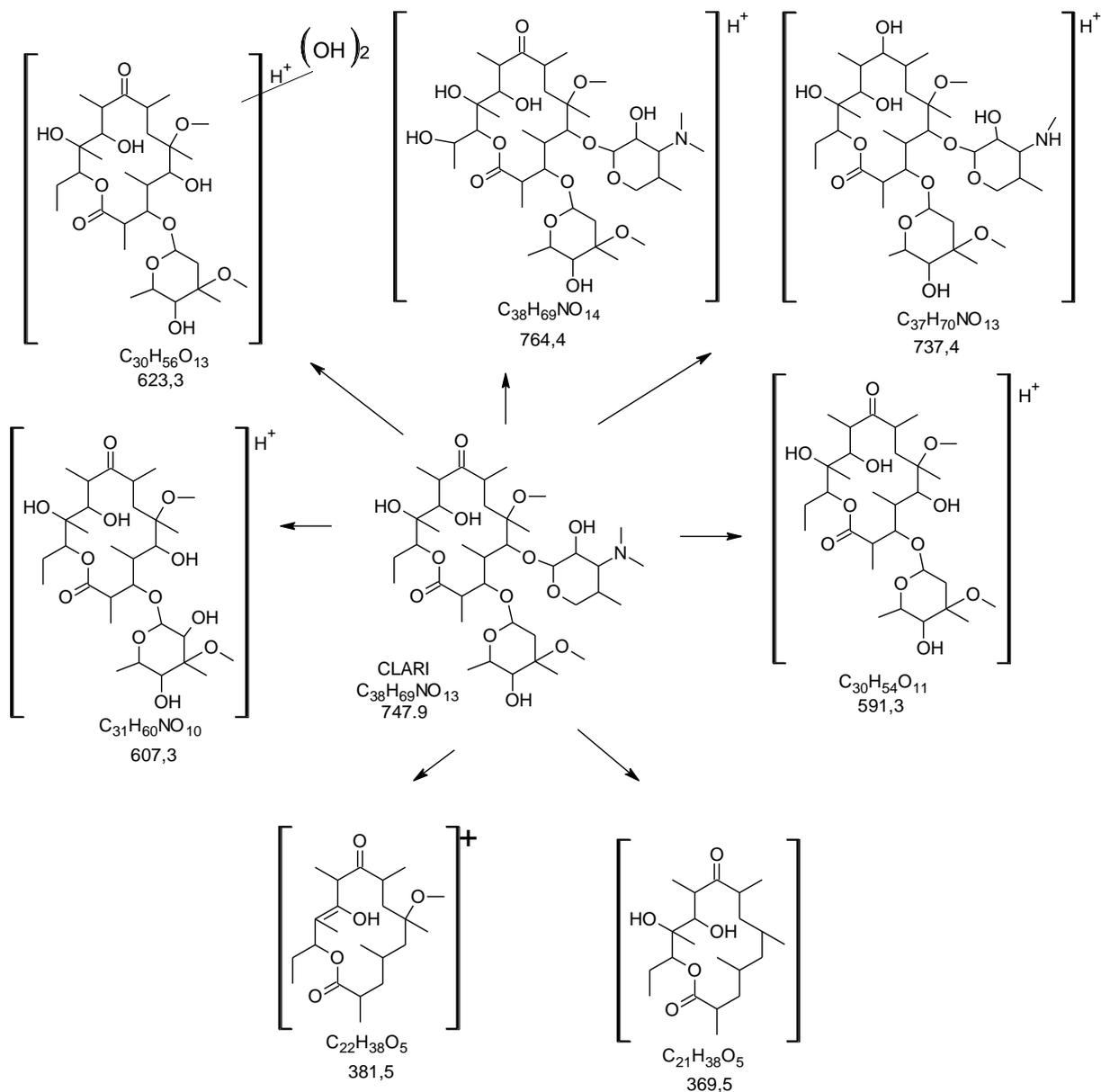


Figura 50 . Estruturas químicas propostas para os produtos de fotodegradação de CLARI.

A elucidação e identificação dos PD formados foi possível analisando os espectros de MS^2 obtidos nos experimentos, que mostram perfis de fragmentação semelhantes, sendo proposto a partir destes a rota de fragmentação de cada produto.

Para o PD 623 (Figura 51) propõe-se que este é formado pela ruptura da desosamina e pela adição de dois grupos hidroxila na lactona. Este PD é fragmentado na m/z 465,5 onde sugere-se a perda da cladinose e permanência das hidroxilas do íon molecular. Com a perda de duas águas forma-se o íon m/z 433,2. Os fragmentos m/z 158 e 116 são formados neste

caso a partir da cladinose. Este composto é formado em todos os pH, após 15 min de tratamento.

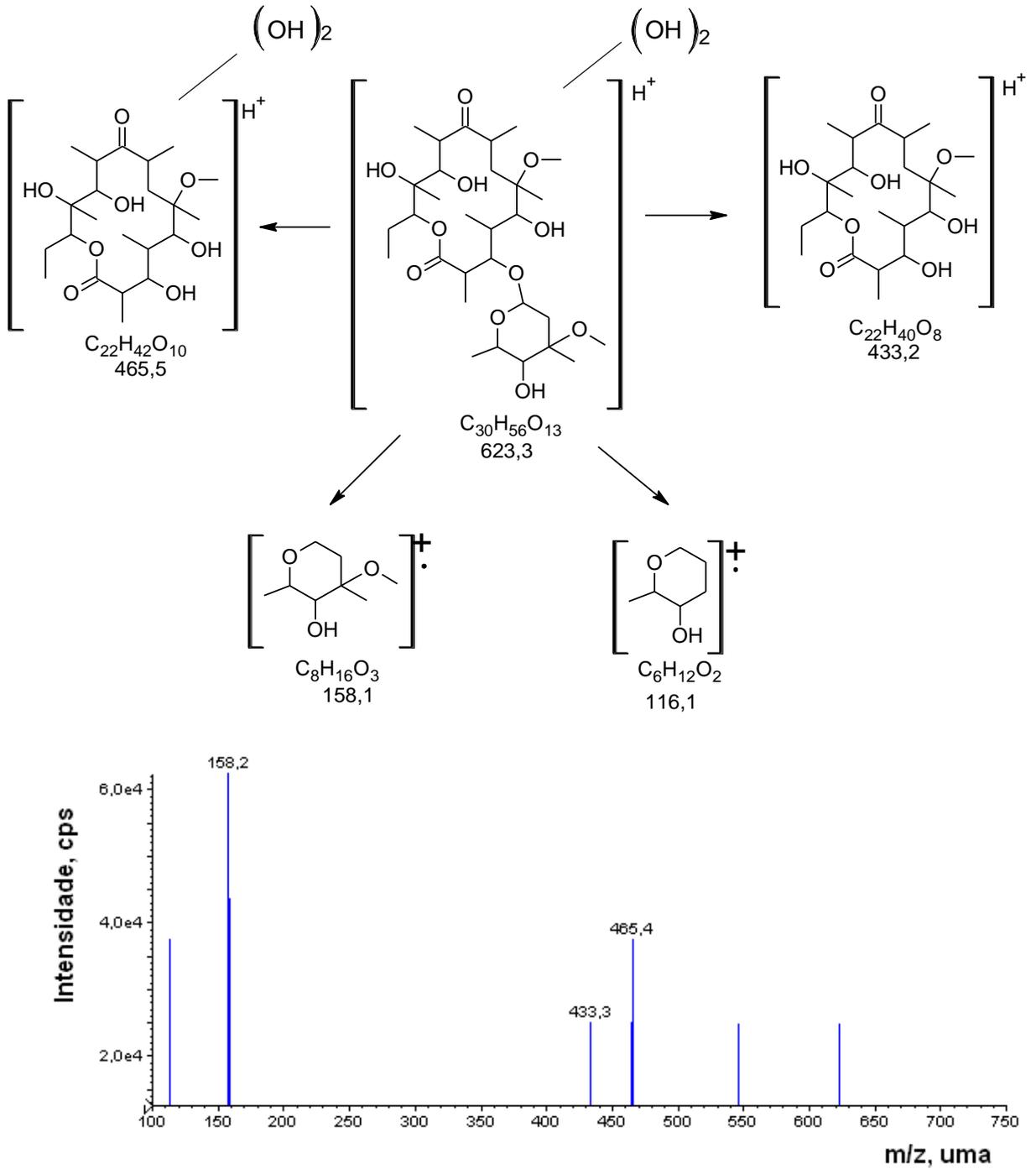


Figura 51. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 623.

Para a formação do PD 591 ocorre a perda de 158 Da da molécula de CLARI, o que corresponde a perda da desosamina. Em seguida com a perda de duas águas forma-se o fragmento de m/z 559,3. Os cátions radicalares de m/z 158 e 116 são formados a partir da cladinosse (Figura 52). Foi identificado após 20 min de fotólise, em todos os pH estudados.

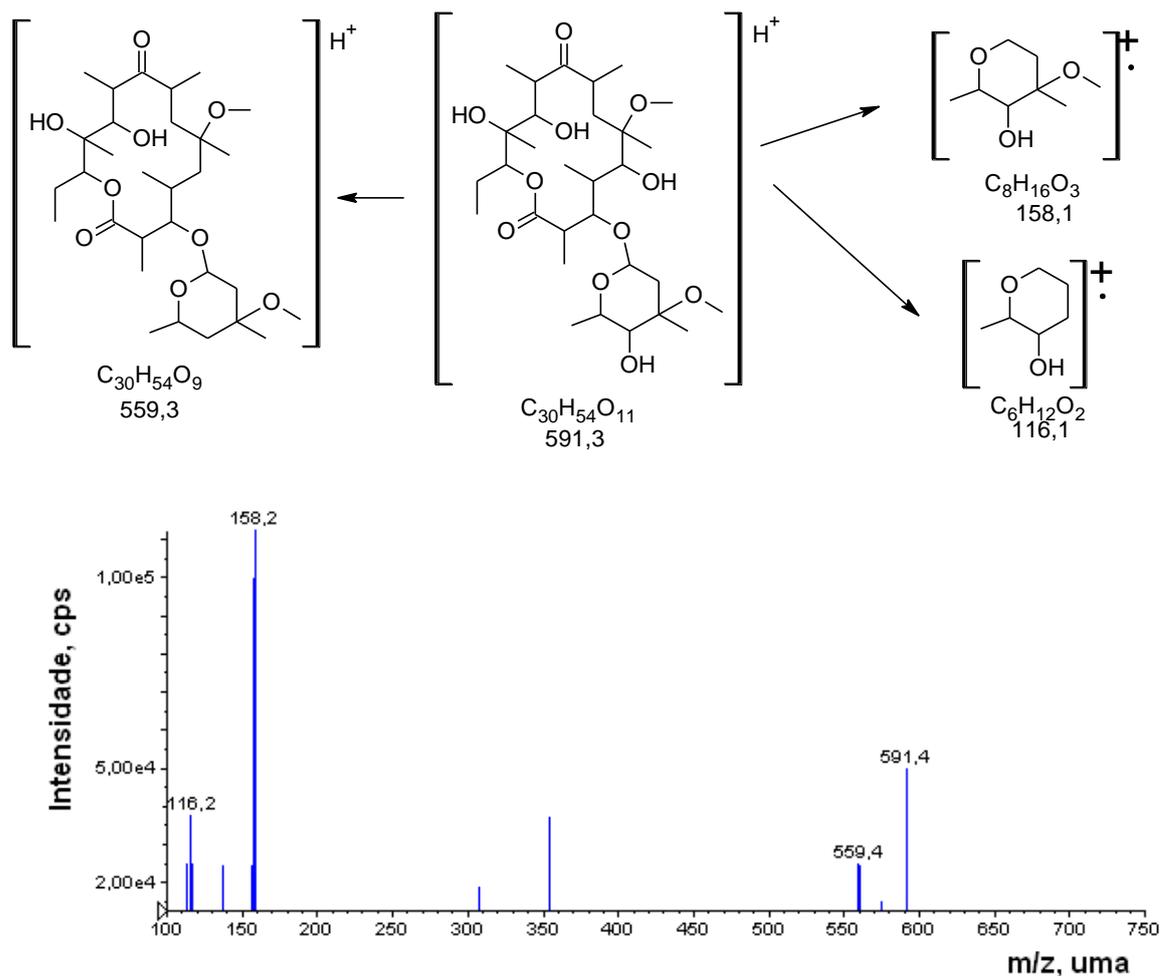


Figura 52. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 591.

O PD 737 é formado pela perda de uma metila, proposto sendo do grupamento amina. O espectro de MS^2 (Figura 53) mostra que este PD é fragmentado em m/z 581,8 com a ruptura do ligante desosamina. Após com a quebra de uma água e um grupamento $-OCH_3$ é formado o fragmento de m/z 547,3. O fragmento de m/z 379,3 é proveniente da perda da cladinosse e abertura do anel da lactona com quebra no grupo carboxila. O íon m/z 158 representado como

proveniente da desosamina, mas neste PD também pode ser proveniente da cladinose Calza et al. (2012). Formado após 5 min de tratamento em todos os experimentos.

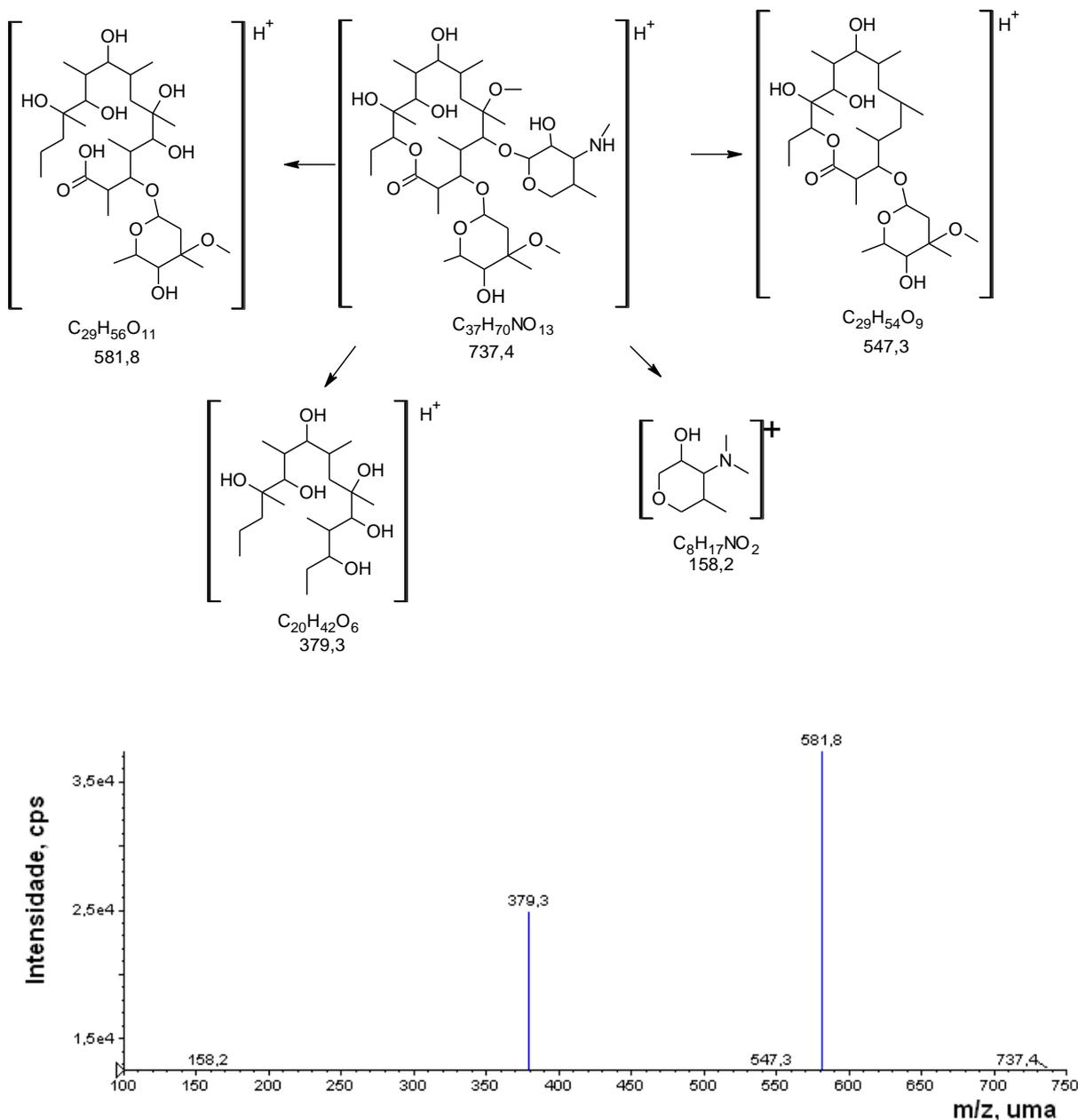


Figura 53. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 737.

O PD 381 é formado pela perda dos dois açúcares da molécula de CLARI e três moléculas de água. Com a quebra da lactona a formação dos fragmentos m/z 281 e 116 para

os quais não foi possível a elucidação estrutural (Figura 54). O fragmento de m/z 381 também foi explanado em estudos de Leonard et al. (2006). Este PD é verificado após 35 min de tratamento em todos os experimentos.

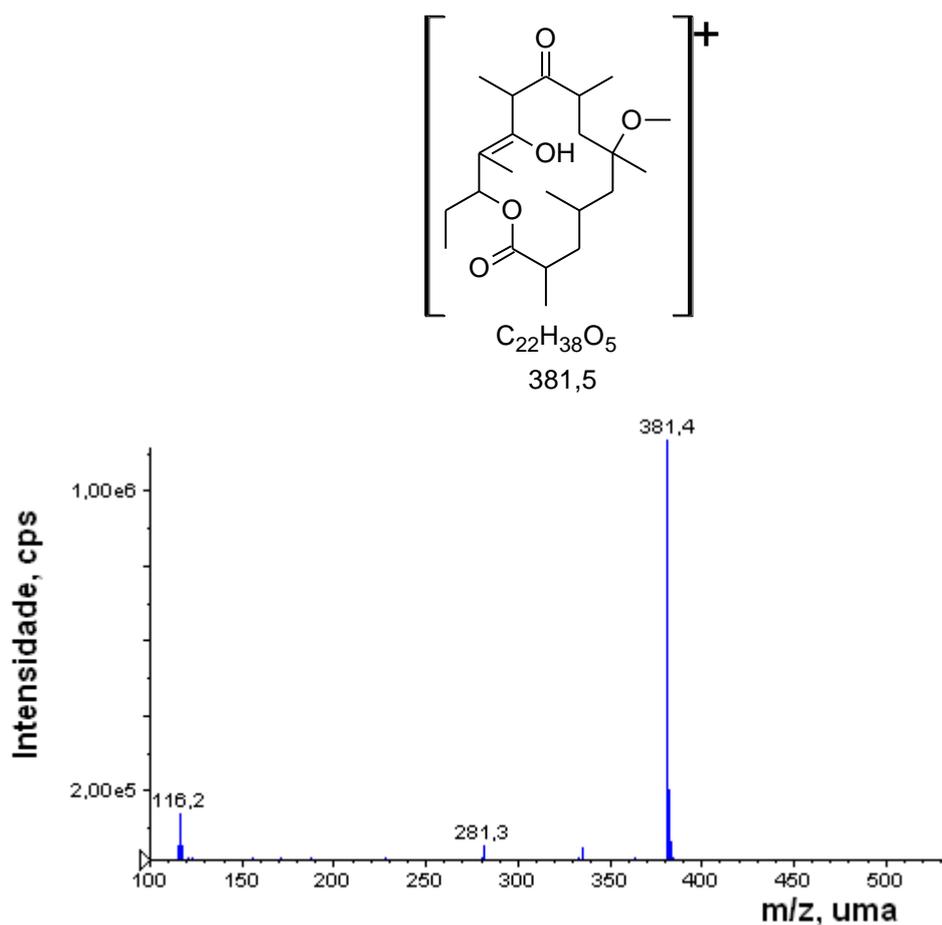


Figura 54. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 381.

A ruptura dos açúcares ligantes, juntamente com moléculas de água da lactona e um grupamento $-OCH_3$ forma o PD 369 (Figura 55). Este é fragmentado em m/z 327 proposto como abertura da lactona e quebra do grupo carboxila desta. Para os demais fragmentos presentes no espectro não foram propostas estruturas, mas supõe-se que sejam oriundas de quebras sucessivas da lactona. Espectros de MS^2 semelhantes, com estas m/z , são apresentados por Leonard et al. (2006). Formado em todos os pH após 45 min de fotólise.

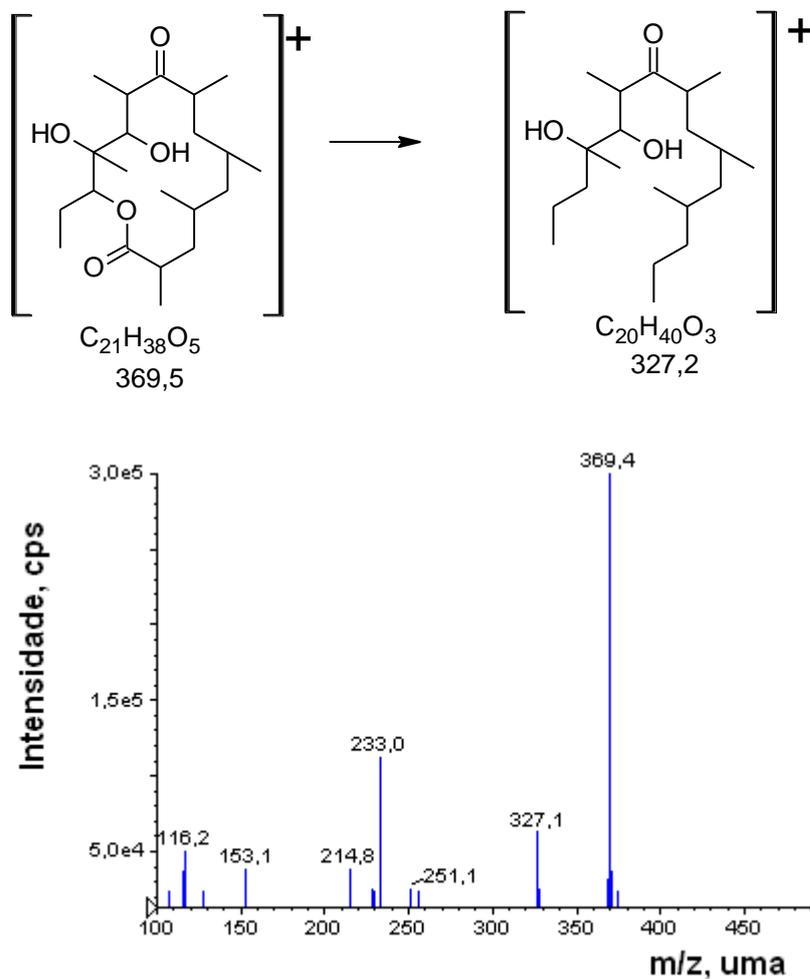


Figura 55. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 369.

4.9.6. Produtos de degradação da CLARI em efluente hospitalar

Foram identificados apenas 2 PDs de CLARI nos experimentos de fotólise em efluente hospitalar (Figura 56). O produto 591 formado pela perda de 158 Da da molécula de CLARI, sendo esta perda referente a desosamina o que corresponde a perda de um dos açúcares. O espectro adquirido em solução aquosa é semelhante ao obtido no experimento com efluente hospitalar, os quais apresentam os mesmos fragmentos de m/z 559 e 158.

O PD 737 é formado pela perda de uma metila, proposto sendo este do grupamento amina. Os espectros adquiridos dos experimentos em solução aquosa e efluente hospitalar

apresentam fragmentos diferentes exceto pelo fragmento m/z 158. Pode-se supor que seja o mesmo composto, mas que fragmento de forma diferente, em virtude de interferentes da matriz, ou, se tratar de um novo produto.

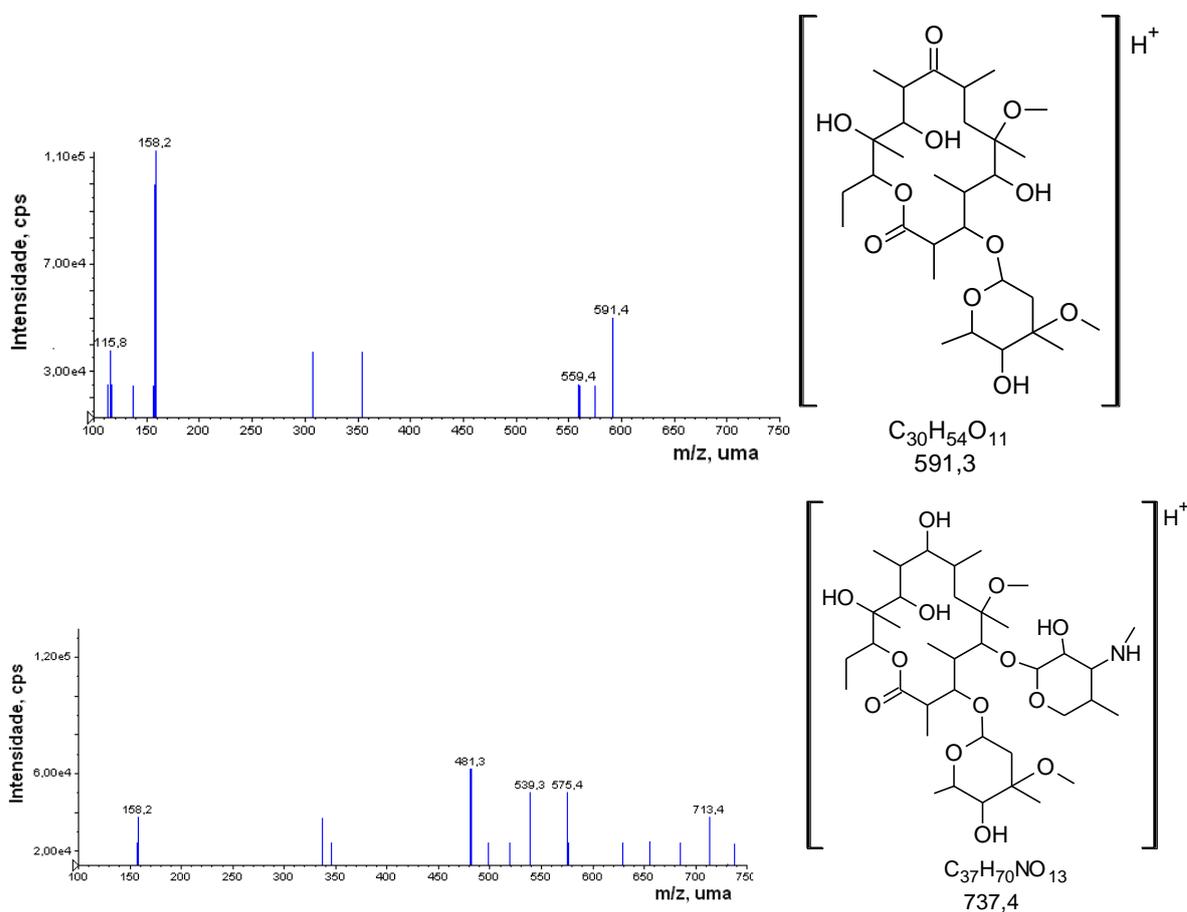


Figura 56 . Estruturas químicas propostas para os produtos de fotodegradação de CLARI em efluente hospitalar.

4.9.7. Produtos de degradação propostos para ROXI em solução aquosa

A primeira etapa na elucidação das estruturas dos PDs consiste em determinar o padrão de fragmentação do composto de partida da ROXI que elui em 6,7 min e exibe m/z $[M+H]^+$ de 837,6. Essa m/z foi usada como Íon Precursor para fragmentação (MS^2) (Figura 57).

O fragmento m/z 716 é formado pela perda da cadeia lateral do N-oxime e por uma molécula de água. O fragmento de m/z 679 é formado pela perda da cladinose na molécula da ROXI. A partir deste é formado, com a quebra da cadeia lateral o íon de m/z 558 e com a perda da desosamina o fragmento m/z 522. Os fragmentos m/z 158 e 116 são provenientes da quebra dos açúcares desosamina e cladinose (Petrovic et al., 2009).

Na literatura apenas dois trabalhos relatam produtos de degradação da ROXI. Estes foram obtidos por fotocatalise e ozonização (Petrovic et al., 2009; Lange et al., 2006). Os dados apresentados têm como referência estes artigos e um artigo de identificação de metabólitos (Zhong et al., 2000).

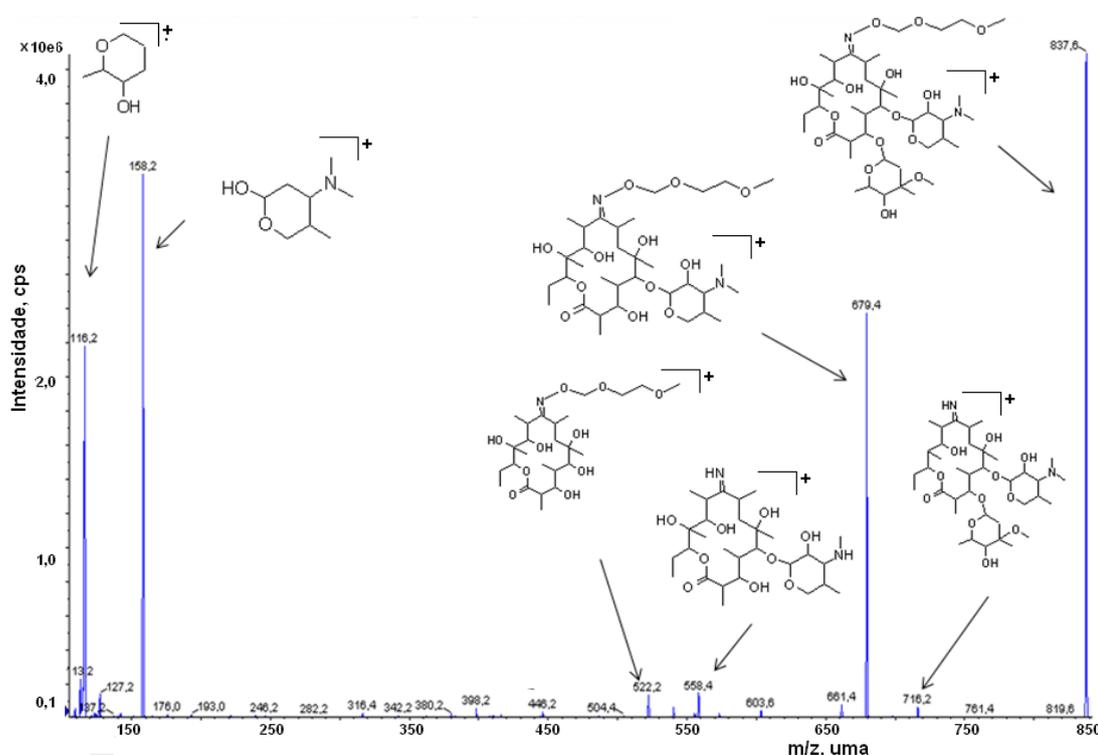


Figura 57. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação proposto para a ROXI (m/z 837.6 MS^2).

No estudo de fotodegradação da ROXI foram identificados 8 PDs (Tabela 23 e Figura 61). O PD 402 foi encontrado em CE de 45 V, o demais PDs tiveram seus espectros de MS^2 em CE de 30 V. Foram detectados 3 PDs onde o compostos de fragmentação do MS^2 não forma identificados.

Tabela 23. Produtos de degradação identificados por LC-MS/MS para ROXI.

PD [M+H] ⁺	tr (min)	Fórmula Molecular	MS ² m/z
735	5,9	C ₃₇ H ₇₀ N ₂ O ₁₂	717; 576; 559; 521; 406; 341; 158; 116
717	6,2	C ₃₇ H ₆₈ N ₂ O ₁₁	560; 542; 521; 464; 406; 346; 290; 158
680	6,6	C ₃₃ H ₆₁ NO ₁₃	662; 541; 522; 446; 327; 158
577	5,9	C ₂₉ H ₅₆ N ₂ O ₉	477; 158; 116
559	6,3	C ₂₉ H ₅₄ N ₂ O ₈	542; 521; 346; 290; 232; 158; 116
522	6,0	C ₂₅ H ₄₇ NO ₁₀	NI
753	6,2	C ₃₇ H ₇₂ N ₂ O ₁₃	NI
402	7,0	C ₂₁ H ₃₉ NO ₆	NI

NI: não identificado.

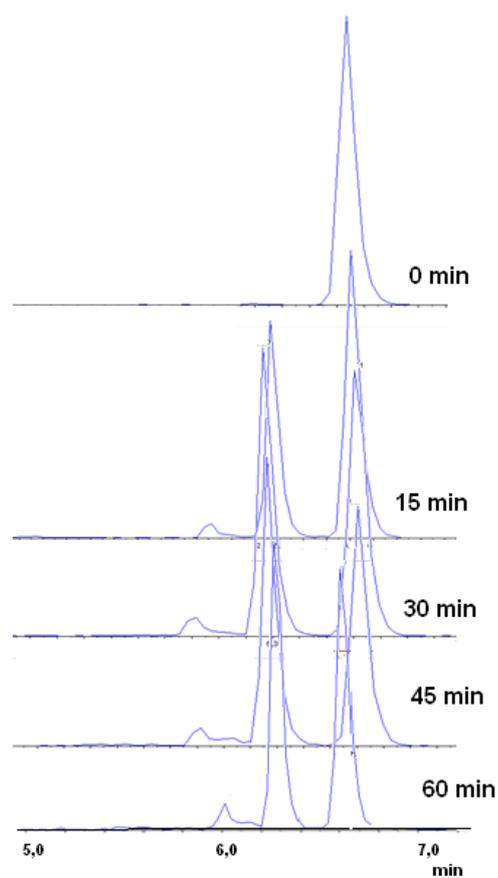


Figura 58. Cromatograma de íons totais durante o processo de degradação e formação dos PDs de ROXI.

Foram propostos, os seguintes PDs identificados para a degradação de ROXI por fotodegradação em solução aquosa (Figura 59). O PD 735 é formado pela quebra da cadeia lateral de oxime. O PD 717 é formado pela perda da cadeia lateral oxime seguida da quebra de uma molécula de água. O PD 680 é formado pela perda da cladinose da molécula da ROXI. Propõe-se que o PD 577 seja formado pela perda da cladinose e da cadeia lateral oxime. O PD 560 é formado pelas sucessivas quebra da cladinose, da cadeia lateral da oxime e de uma desmetilação da desosamina. O PD 358 é formado pela perda dos grupamentos ligantes na lactona, metilas e água. O PD 522 é formado pela quebra da cladinose e desosamina. O PD 753 é formado pela perda da cadeia lateral oxime e o acréscimo de uma hidroxila ligada ao N que faz ligação com a lactona. O PD 401 é derivado da perda do N-oxime, cladinose e desosamina ligadas a lactona.

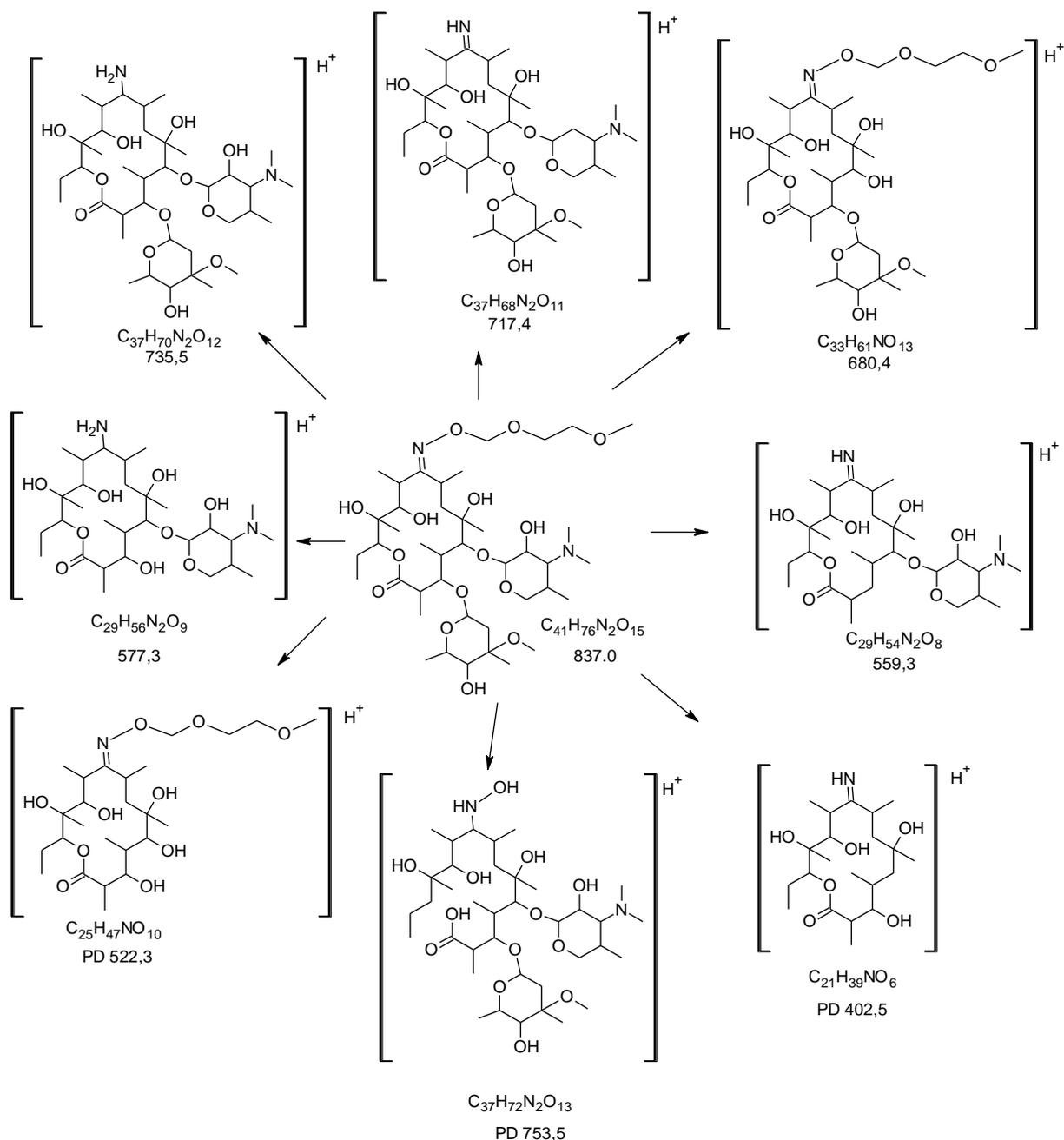


Figura 59 . Estruturas químicas propostas para os produtos de fotodegradação de ROXI.

O PD 735 (Figura 60) é formado pela quebra da cadeia lateral de oxime. O fragmento de m/z 717,4 é formado pela perda de uma molécula de água. Com a perda de água é formado o carbocátion 699,4 O fragmento de m/z 577,4 é formado pela ruptura da cladinose ligada a lactona. Com sucessivas perdas de 18 Da formam-se os fragmentos de m/z 559,4; 541,3; 523,3. O íon de m/z 464,5 propõe-se que seja formado pela abertura da lactona e perda do grupo amina da desosamina. Os fragmentos m/z 158 e 116 comprovam que este composto é derivado de um macrolídeo. Foi detectado em todos os pH após 5 min de tratamento.

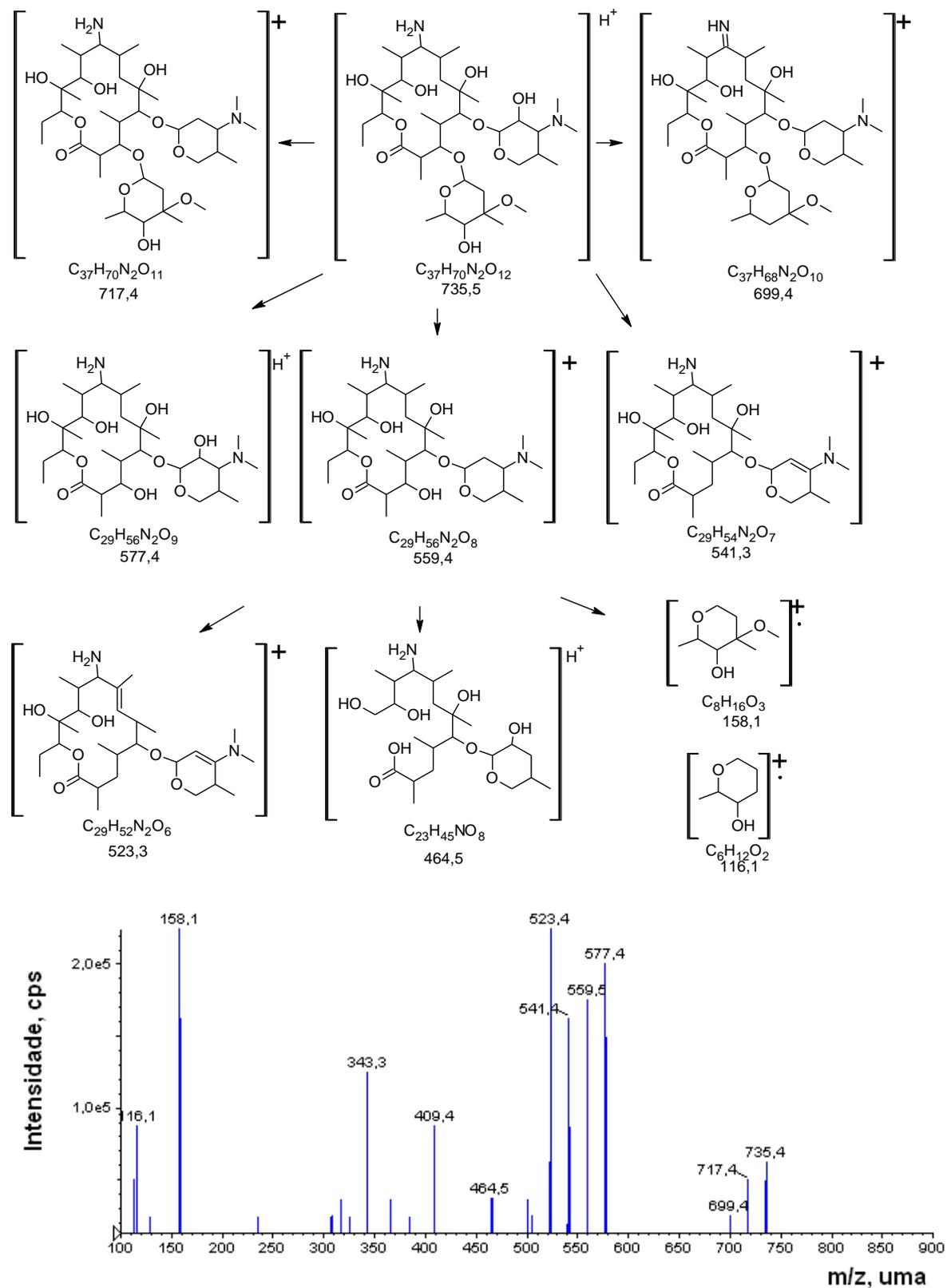


Figura 60. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 735.

O PD 717 é formado pela perda da cadeia lateral oxime seguida da quebra de uma molécula de água (Figura 61). Os fragmentos formados são similares ao PD 735. O fragmento de m/z 559,3 é formado pela perda da cladinosose mais 18 Da de uma molécula de água. Com sucessivas perdas de 18 Da formam-se os íons de m/z 541,3 e 523,3. Com a quebra da amina da desosamina e abertura da lactona o íon 465,3 é formado. E o cátion radicalar de m/z 158 proposto como sendo proveniente da cladinosose. Formado após 5 min de tratamento em todos os pH.

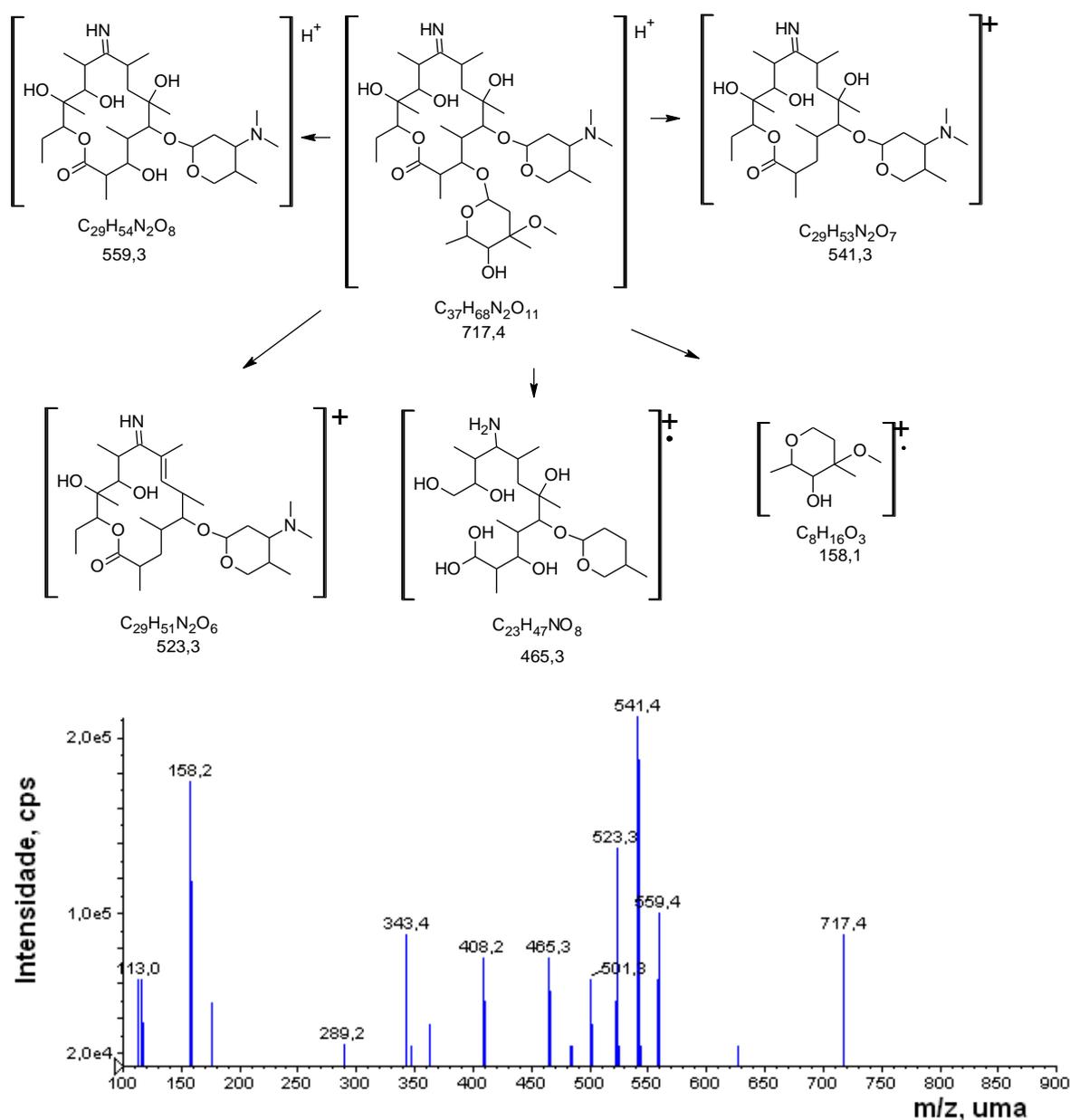


Figura 61. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 717.

O PD 680 é formado pela ruptura do ligante desosamina da molécula da ROXI. O espectro de MS² representa a fragmentação desta molécula (Figura 62). O fragmento de m/z 662,4 é formado pela perda de 18 Da, referente a uma molécula de água da lactona. O íon m/z 558,3 é formado pela quebra da oxime. Com a perda sucessivas moléculas de água são formados os cátions radiculares de m/z 541,3 e 523,3. E o fragmento m/z 158 é formado pela quebra da cladinose. Este produto é formado após 15 min de fotólise.

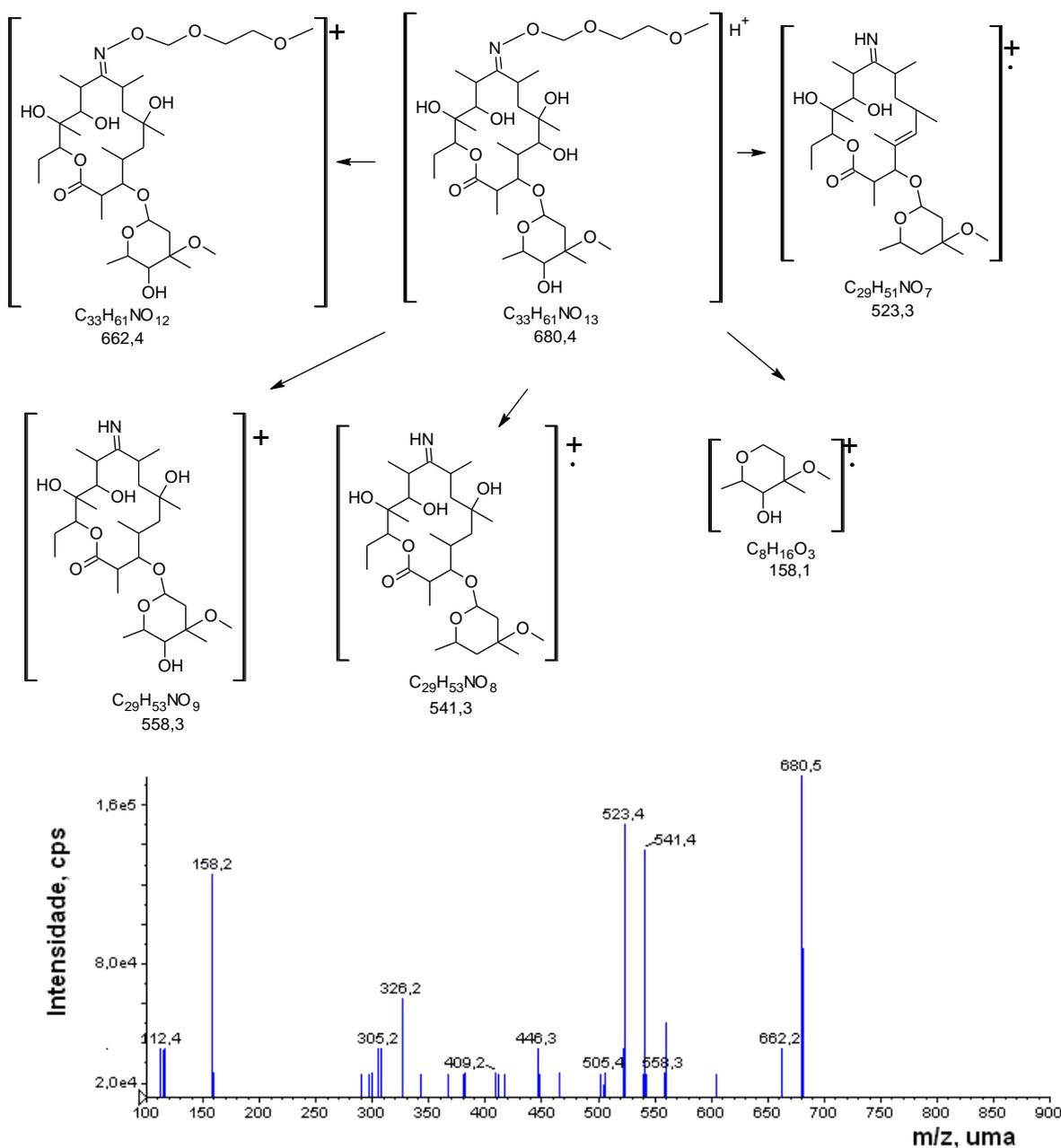


Figura 62. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 680.

Propõe-se que o PD 577 seja formado pela perda da cladinose e da cadeia lateral oxime. Este composto se fragmenta em nos íon m/z 158 e 116, referentes a desosamina (Figura 63). Identificado após 25 min de tratamento em todos os experimentos.

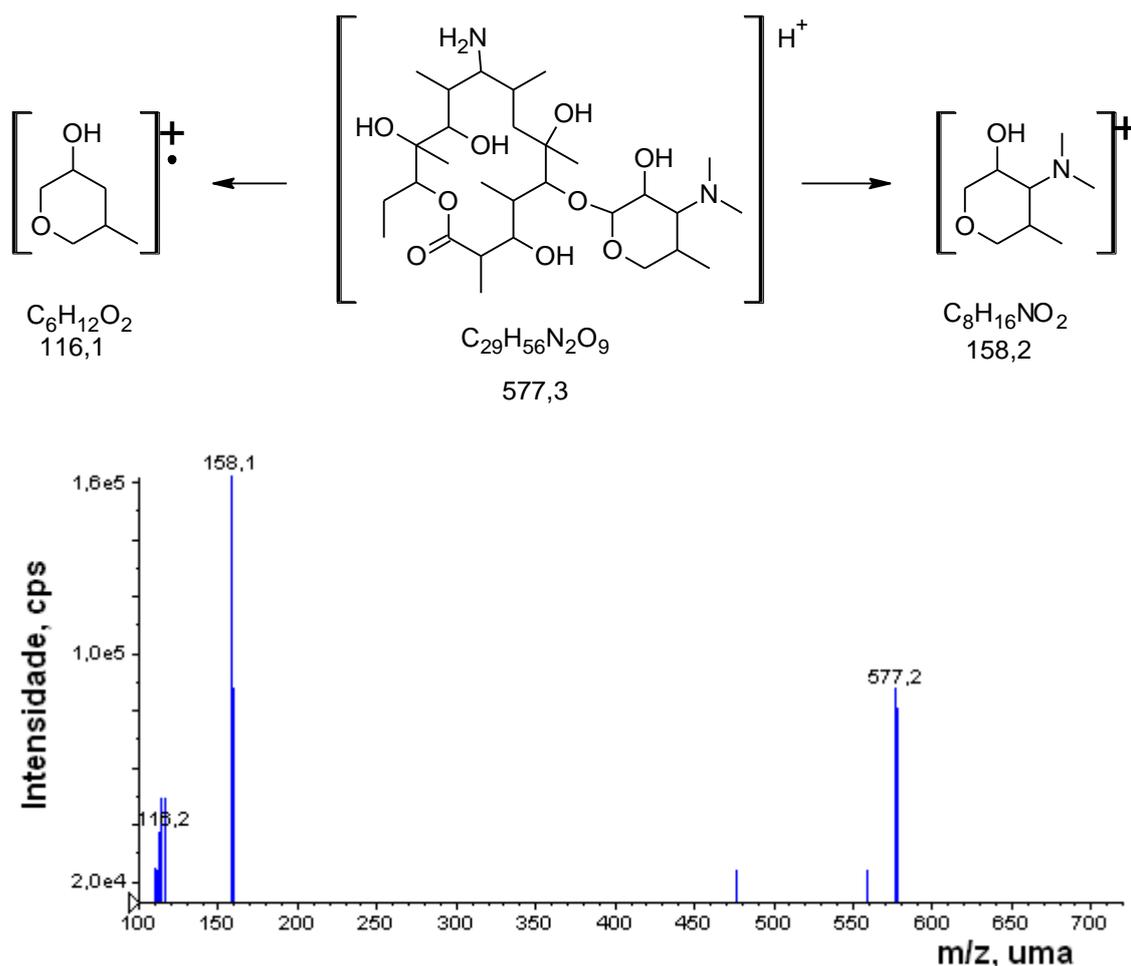


Figura 63. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 577.

O PD 559,3 é formado pela ruptura da cladinose e da cadeia lateral da oxime (Figura 64). O íon m/z 541,3 oriundo da perda de uma molécula de água, assim como o fragmento de m/z 523,3. Com a perda da amina da desosamina forma-se o íon m/z 483,2. Os fragmentos m/z 158 e 116 característicos do grupo também são formados. Detectado após 30 min de tratamento.

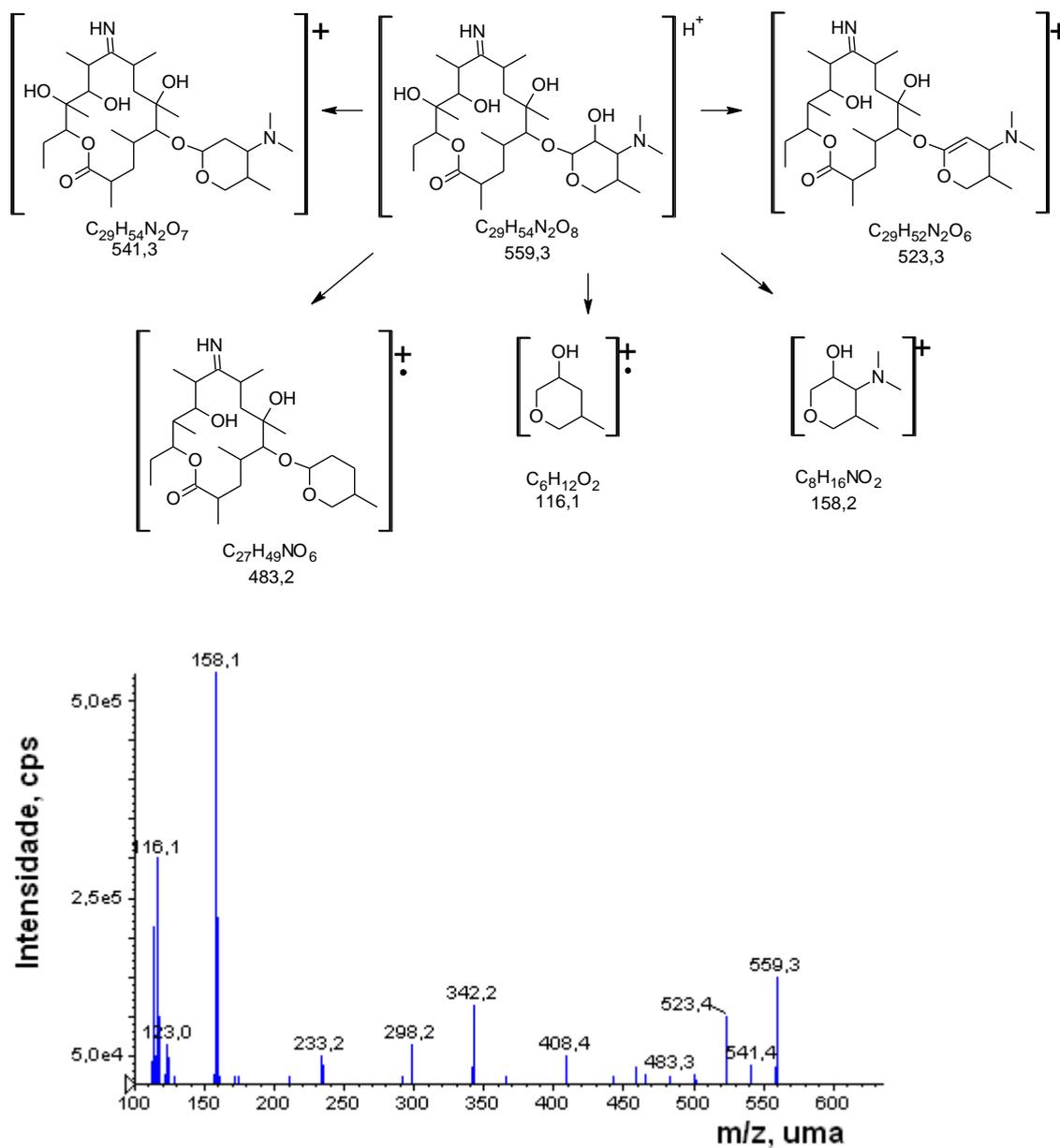


Figura 64. Espectro de massas obtido por LC-MS/MS e caminho de fragmentação para o PD 560.

4.9.8. Produtos de degradação da ROXI em efluente hospitalar

Para ROXI foi verificado a presença de 3 PD formados na fotodegradação do efluente hospitalar (Figura 65). O PD 735 é formado pela quebra da cadeia lateral de oxime.

Comparando o espectro obtido em solução aquosa pode-se verificar que o espectro deste produto em efluente apresenta os mesmos fragmentos como o íon m/z 717, 577 e 559.

O PD 717 é formado pela perda da cadeia lateral oxime seguida da quebra de uma molécula de água. O espectro obtido no experimento com efluente mostra o fragmento obtido em solução aquosa, como o íon m/z 559 e também o fragmento 116, característicos dos macrolídeos. Para o PD 680, formado pela perda da cladinose da molécula da ROXI o espectro mostra poucos fragmentos, possivelmente a matriz possa ter interferido.

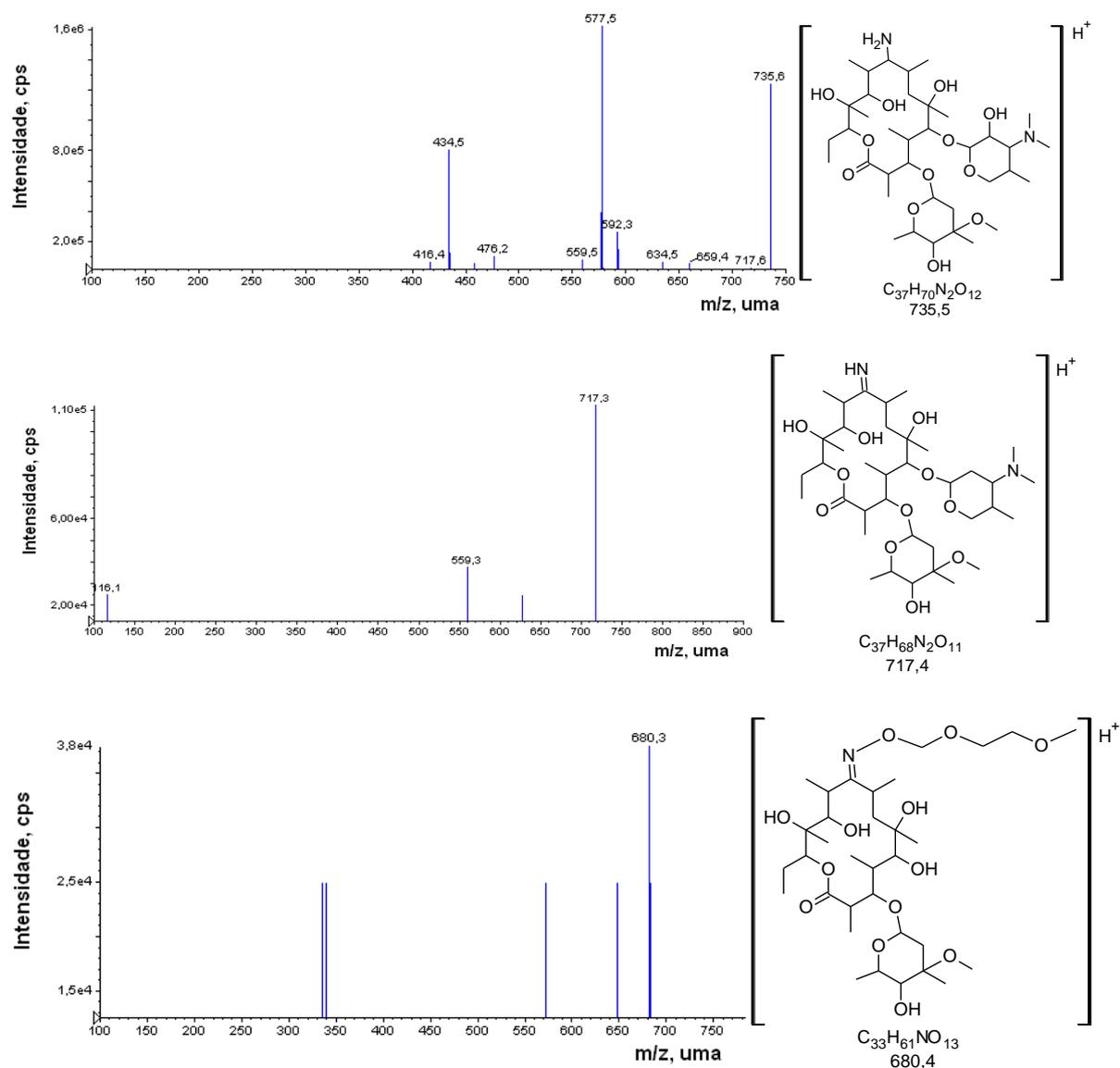


Figura 65 . Estruturas químicas propostas para os produtos de fotodegradação de ROXI em efluente hospitalar.

4.10. Investigação de produtos de degradação no efluente hospitalar.

Foram aplicados os experimentos de IDA para investigar possíveis produtos de degradação, via degradação natural, dos antibióticos macrolídeos no efluente hospitalar, entretanto, em nenhuma das amostras coletadas, estes foram encontrados. Pode-se supor que estes estejam em concentrações muito baixas não sendo possível a sua detecção. Ou mesmo compostos presentes no efluente hospitalar possam interferir na identificação.

5. CONCLUSÕES

O método validado para a determinação por LC-MS/MS e *clean-up*/pré-concentração de AZI, CLARI, ERI e ROXI em efluente hospitalar mostrou-se adequado e satisfatório. A validação mostrou que as faixas de recuperação variaram entre 80 a 94 %.

A análise de AZI, CLARI, ERI e ROXI em amostras de efluente lançado pelo HUSM evidenciou a ocorrência desta classe de fármacos no efluente e no córrego na faixa de 0,01 à 2,81 de $\mu\text{g L}^{-1}$ num total de 124 amostras analisadas. Não foi determinada a ocorrência para ROXI, que não é utilizada no HUSM. Também foi possível verificar a ausência de variação das concentrações entre as medidas, realizadas durante o dia e a noite. A avaliação do risco de exposição aos antibióticos macrolídeos (MEC/PNEC) mostrou que para AZI, CLARI, o QR representa grau de risco alto para o meio ambiente e de risco médio para a ERI. Através destes valores fica evidenciada a necessidade de um tratamento mais adequado para o efluente do HUSM.

Três metabólitos foram encontrados no efluente hospitalar. Por se tratar de uma matriz complexa, e estes compostos estarem presentes em concentrações-traço, não foi possível a determinação de mais compostos (metabólitos), provavelmente, ocorrentes.

A aplicação de fotólise mostrou-se adequada para o propósito de degradação dos antibióticos macrolídeos em solução aquosa e em efluente hospitalar. O pH, aqui, exerce influência na degradação da AZI; no entanto, a formação dos produtos de degradação ocorre em todos os pH.

Foram identificados e propostos rotas de fragmentação para 8 PDs de AZI, 7 PDs de CLARI, 6 PDs de ERI e 8 PDs de ROXI. Ao ser aplicado o mesmo processo de fotodegradação em amostras de efluente hospitalar verificou-se a presença de 3 PDs de AZI, 2 PDs de CLARI, 1 PD de ERI e 3 PDs de ROXI. Provavelmente, a matriz do efluente interfere na determinação de mais PDs.

O lançamento de antibióticos macrolídeos no ambiente, por meio do efluente hospitalar, deve considerada uma questão de relevância ambiental e ecotoxicológica; soluções de remediação devem ser tomadas no menor prazo possível pelos os órgãos competentes.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar diferentes PAOs para a degradação de antibióticos macrolídeos em solução aquosa e efluente hospitalar (ozonização, fotocatalise).
- Estudar os efeitos ecotoxicológicos dos antibióticos macrolídeos e dos produtos formados pela degradação destes antibióticos (testes bioanalíticos).
- Determinar a concentração dos metabólitos encontrados no efluente hospitalar (a dificuldade é a disponibilidade de padrões).
- Estudar macrolídeos usados em medicina veterinária.
- Investigar mais profundamente a avaliação de risco de fármacos lançados não apenas para o HUSM, mas também para a cidade de Santa Maria.
- Avaliar a combinação dos processos estudados com processo microbiológico no sentido de potencial aplicação da degradação em escala piloto

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUIN, S. Analysis of macrolide antibiotics in river water by solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1114 73–81, 2006.

AGUSTINA, T. E.; ANG, H. M.; VAREEK, V. K. A review of synergistic effect of photocatalysis and ozonation on wastewater treatment. *Journal Photochemical Photobiologic C: Photochemical Review*, 6, 264–273, 2005.

ALIGHARDASHI, D. et al. Acute sensitivity of activated sludge bacteria to erythromycin A. *Journal of Hazardous Materials*, 172, 685–692, 2009.

AMORIM et al. Macrolídeos: Uma Atualização. *NewsLab* - edição 85 – 2007

AUGUSTINHO, L.; FERREIRA, A. R. Impactos ambientais dos efluentes líquidos no rio Paraguai, Cáceres, MT, SIMPAN 2004, VI Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal, Corumbá/MS, 23 a 26 Nov 2004.

BARROS, C. B. Validação de Métodos Analíticos. *Biológico* 2002, 64, 175-177.

BAYARRI, B. et al. Study of the wavelenght effect in the photolysis and heterogeneous photocatalysis. *Catalysis Today*, 129, 231-239, 2007.

BERGER-BÄCHI, B.; MCCALLUM, N. State of the knowledge of bacterial resistance. *Injury International Journal Care injured*, 37, S20-S25, 2006.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. *Química Nova*, 26, n. 4, 523-530, 2003.

BOILLOT, C. et al., Daily physicochemical, microbiological and ecotoxicological fluctuations of a hospital effluent according to technical and care activities. *The Science of the Total Environment*, 403, 113-29, 2008.

BONDKLY A. M. et al., The Electrospray Ionization - Mass Spectra of Erythromycin A Obtained from a Marine *Streptomyces* sp. Mutant. *Indian Journal Pharmaceuticals Science*, 70, 310–319, 2008.

BRENNER, C. G. B. et al., Determination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim and Their Metabolites in Hospital Effluent. *CLEAN - Soil, Air, Water*, 39, 28-34, 2011.

CALZA, P. et al., Identification of the unknown transformation products derived from clarithromycin and carbamazepine using liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrometry* 26, 1687–1704, 2012.

CARLSSON, C. et al., Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. *The Science of the total environment*, 364, 67-87, 2006.

CARRERA et al. Multiresidue method for the determination of 32 human and veterinary pharmaceuticals in soil and sediment by pressurized-liquid extraction and LC-MS/MS. *Anal Bioanalytical Chemistry*, 398, 1173–1184, 2010.

CASTIGLIONI, S. et al., 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 wastewaters. *Journal of Chromatography A*, 1092, 206–215, 2005.

CHANG, X. et al., Determination of antibiotics in sewage from hospitals, nursery and slaughter house, wastewater treatment plant and source water in Chongqing region of Three Gorge Reservoir in China. *Environmental Pollution*, 158, 1444–1450, 2010.

CHENXI, W.; SPONGBERG, A. L.; WITTER, J. D. Determination of the persistence of pharmaceuticals in biosolids using liquid-chromatography tandem mass spectrometry. *Chemosphere*, 73, 511–518, 2008.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução N° 430, de 13 de maio de 2011.

CONSEMA - Conselho Estadual de Meio Ambiente. Resolução N° 128, de 7 de dezembro de 2006.

COSTA, C. R. et al. Toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, 31, 1820-1830, 2008.

CROTTI, A. E. M. Espectrometria de massas com ionização por electrospray: processos químicos envolvido na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. *Química Nova*, 29, 287-292, 2006.

CROWE, M. C. et al., Characterization of Erythromycin Analogs by Collisional Activated Dissociation and Infrared Multiphoton Dissociation in a Quadrupole Ion Trap. *Journal American Society Mass Spectrometry*, 13, 630–649, 2002.

DOLL, T. E.; FRIMMEL, F. H.; Fate of pharmaceuticals-photodegradation by simulated solar UV-light. *Chemosphere*, 52, 1757-1769, 2003.

DOMENE, X. *et al.* Ecological risk assessment of organic waste amendments using the species sensitivity distribution from a soil organisms test battery. *Environmental Pollution*, 155, 227–236, 2008.

EMA & European Medicines Agency, 2006. Committee for medicinal products for human use (CHMP). *Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/4447/00.* Available at: www.emea.europa.eu/pdfs/human/swp/444700en.pdf.

ESCHER, B. I. *et al.*, Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. *Water Research*, 45, 75-92, 2010.

FEITOSA-FELIZZOLA, J.; HANNA, K.; CHIRON, S. Adsorption and transformation of selected human-used macrolídeo antibacterial agents with iron(III) and manganese(IV) oxides. *Environmental Pollution*, 157, 1317–1322, 2009.

FERRER, I.; ZWEIGENBAUM, J. A.; THURMAN, E. M. Analysis of 70 Environmental Protection Agency priority pharmaceuticals in water by EPA Method 1694. *Journal of Chromatography A*, 1217, 5674–5686, 2010.

GATES, P. J. *et al.*, Structural Elucidation Studies of Erythromycins by Electrospray Tandem Mass Spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrometric*. 13, 242–246, 1999.

GLAZE, W. H., Drinking-water treatment with ozone, *Environmental Science and Technology*, 21, 224-230, 1987.

GOGATE, P. R.; PANDIT, A. B. A review of imperative technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions. *Adv. Environmental Res.*, 8, 501–551, 2004a.

GOGATE, P. R.; PANDIT, A. B. A review of imperative technologies for wastewater treatment II: hybrid methods. *Adv. Environmental Res.*, 8, 553–597, 2004b.

GROS, M. *et al.* Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environment International*, 36, 15–26, 2010.

GROSS, J. H. Mass spectrometry: a textbook. Heidelberg, Germany: Springer Verlag, 2004.

GRUNG, M. *et al.* Environmental assessment of Norwegian priority pharmaceuticals based on the EMEA guideline. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 71, 328-340, 2008.

GUPTA, P. *et al.*, Genotoxicity evaluation of hospital wastewaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 1925-1932, 2009.

HASSANZADEH, A. *et al.*, Mechanism for the Degradation of Erythromycin A and Erythromycin A 2-Ethyl Succinate in Acidic Aqueous Solution, *Journal Physical Chemical. A* 111, 10098-10104, 2007

HERNANDO, M. D. *et al.*, Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta*, 69, 334-342, 2006.

HIJNEN, W. A. M.; BEERENDONK, E. F.; MEDEMA, G. J.; Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan cysts in water: A review. *Water Research*, 40, 3-22, 2006.

HOMEM & SANTOS. Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices - A review. *Journal of Environmental Management*, 92, 2304-2347, 2011.

HU, M.; HU, C. Q. Identification of the components of 16-membered macrolídeo antibiotics by LC/MS. *Analytica Chimica Acta*, 535, 89-99, 2005.

HUNTER, R. P. *et al.*, Azithromycin metabolite identification in plasma, bile, and tissues of the ball python (*Python regius*). *J. vet. Pharmacology Therapy* 26, 117-121, 2003.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); *Orientação sobre validação de métodos analíticos*, 4^a ed., 2011

ISIDORI, M. *et al.*, Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Science of The Total Environment*, 346, 87-98, 2005.

ISLA, A. *et al.* Determination of ceftazidime and cefepime in plasma and dialysate-ultrafiltrate from patients undergoing continuous veno-venous hemodiafiltration by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39, 996-1005, 2005.

JANSEN, W. T. M. *et al.* Bacterial resistance: A sensitive issue Complexity of the challenge and contaminant strategy in Europe. *Drug Resistance Updates*, 9, 123-133, 2006.

JELIC, A. *et al.*, Occurrence and Elimination of Pharmaceuticals During Conventional Wastewater Treatment. *The Handbook of Environmental Chemistry*, 1-23, 2012.

JENSEN, J. *et al.*, European risk assessment of LAS in agricultural soil revisited: Species sensitivity distribution and risk estimates. *Chemosphere*, 69, 880–892, 2007.

JIANG, J. Q.; ZHOU, Z.; SHARMA, V.K. Occurrence, transportation, monitoring and treatment of emerging micro-pollutants in waste water — A review from global views. *Microchemical Journal*, 110, 292–300, 2013.

JONES, O. A.; LESTER, J. N.; VOULVOULIS, N. Pharmaceuticals: a threat to drinking water? *Trends in Biotechnology*, 23, 4, 163-167, 2005.

KASSINOS, D. F.; VASQUEZ, M. I.; KÜMMERER, K. Review-Transformation products of pharmaceuticals in surface waters and wastewater formed during photolysis and advanced oxidation processes – Degradation, elucidation of byproducts and assessment of their biological potency. *Chemosphere*, 85, 693–709, 2011.

KANFER, I. *et al.*, Review Analysis of macrolide antibiotics. *Journal of Chromatography A*, 812, 255–286, 1998.

KEARNEY, G. C. *et al.*, Structural Elucidation Studies of Erythromycins by Electrospray Tandem Mass Spectrometry II. *Rapid Commun. Mass Spectrometric*. 13, 1650–1656, 1999.

KEMPER, N. *et al.*, Analysis of antibiotic residues in liquid manure and leachate of dairy farms in Northern Germany. *Agricultural water management*, 95, 1288 – 1292, 2008.

KHETAN, S. K.; COLLINS, T. J., Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to green chemistry. *Chemical Review*, 107, 2319-2364, 2007.

KIM, Y. H. *et al.* A kinetic study on the degradation of erythromycin A in aqueous solution. *Int J Pharm.*, 271, 63-76, 2004.

KLAVARIOTI, M.; MANTZAVINOS, D.; KASSINOS, D.; Removal of residual pharmaceuticals from aqueous system by advanced oxidation processes. *Environment International*, 35, 402-417, 2009.

KNAPP, C. W. *et al.* Differential fate of erythromycin and beta-lactam resistance genes from swine lagoon waste under different aquatic conditions, *Environmental Pollution*, 158, 1506–1512, 2010

KOCH, D. E. *et al.*, Azithromycin extraction from municipal wastewater and quantitation using liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1074, 17–22, 2005.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. Química farmacêutica, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1988.

KÜMMERER, K. Pharmaceuticals in the environment. Alemanha: Springer, Alemanha, 2001a.

KÜMMERER, K. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. *Chemosphere*, 45, 957-969, 2001b.

LAM, M. W.; MABURY, S. A.; Photodegradation of the pharmaceutical atovarstatin, carmabazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole in natural waters, *Aquatic Sciences*, 67, 177-188, 2005a.

LAM, M. W.; YOUNG, C. J.; MABURY, S. A., Aqueous Photochemical Reaction Kinetics and Transformations of Fluoxetine. *Environmental Science and Technology*, 39, 513-522, 2005b.

LANGE F. et al., Degradation of macrolide antibiotics by ozone: A mechanistic case study with clarithromycin. *Chemosphere*, 65, 17–23, 2006.

LATCH, D. E. et al. Photochemical Fate of Pharmaceuticals in the Environment: Cimetidine and Ranitidine. *Environmental Science and Technology*, 37, 3342-3350, 2003.

LEONARD, S. et al., Application of liquid chromatography/ion trap mass spectrometry to the characterization of the related substances of clarithromycin. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 3101–3110, 2006.

LEUNG, H. W. Distribution, fate and risk assessment of antibiotics in sewage treatment plants in Hong Kong, South China. *Environment International*, 42, 1–9, 2012.

LI et al. Liquid chromatographic-electrospray tandem mass spectrometric determination of clarithromycin in human plasma. *Biomed Chromatography*, 20, 1242–1251, 2006.

LI et al. Occurrence of antibiotics in water, sediments, aquatic plants, and animals from Baiyangdian Lake in North China. *Chemosphere*, 89, 1307–1315, 2012.

LIM & FOX. Prediction of the potential fates of future pharmaceutical compounds in indirect potable reuse systems. *Science of the Total Environment*, 444, 417–422, 2013.

LIU, Q. T.; WILLIAMS, H. E. Kinetics and Degradation Products for Direct Photolysis of β -Blockers in Water. *Environment Science and Technology*, 41, 803-810, 2007.

LOUVET, J. N. et al., Adverse effects of erythromycin on the structure and chemistry of activated sludge. *Environmental Pollution*, 158, 688–693, 2010.

MALATO & PEREZ. Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination—A review. *Science of The Total Environment*, 409, 4141–4166, 2011.

MARTINS, A. F. et al., A Study of Photocatalytic Processes Involving the Degradation of the Organic Load and Amoxicillin in Hospital Wastewater. *CLEAN - Soil, Air, Water*, 37, 365-371, 2009.

MARTINS, A. F. et al., Concentration of Ciprofloxacin in Brazilian Hospital Effluent and Preliminary Risk Assessment: A Case Study. *CLEAN – Soil, Air, Water*, 36, 264-269, 2008.

MARTINS, A. F. et al., Occurrence of the Antimicrobials Sulfamethoxazole and Trimethoprim in Hospital Effluent and Study of Their Degradation Products after Electrocoagulation. *CLEAN - Soil, Air, Water*, 39, 21-27, 2011.

MASSEY, L. B. et al., Antibiotic fate and transport in three effluent-dominated Ozark streams. *Ecological Engineering* 36, 930-938, 2010.

MINETTO, L et al., Quantification of Diclofenac in Hospital Effluent and Identification of Metabolites and Degradation Products. *Clean – Soil, Air, Water*, 40, 950–957, 2012.

MORENO, A. H. et al., Stability study of azithromycin in ophthalmic preparations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45, 219- 226, 2009.

NÖDLER et al., Development of a multi-residue analytical method, based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry, for the simultaneous determination of 46 micro-contaminants in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*, 1217, 6511–6521, 2010.

NOLLET, L. M. L. Handbook of Water Analysis. 2ed. CRC press. Taylor e Francis group. New York, 2007.

OPPENLÄNDER, T., Photochemical Purification of Water and Air, Wiley-VCH, 368, 2003.

PEDROSO, R. C. R. Desenvolvimento de métodos por CLAE-UV para os antimicrobianos tetraciclina, sulfametoxazol e trimetoprima utilizando materiais à base de sílica e poliméricos como sistemas de pré concentração. 2007. 122 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2007.

PENDELA, M. et al., Combined use of liquid chromatography with mass spectrometry and nuclear magnetic resonance for the identification of degradation compounds in an erythromycin formulation. *Anal Bioanal Chem*, 402, 781–790, 2012.

PETROVIĆ, M. et al., Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: review. *Journal Chromatography A*, 1067, 1-14, 2005.

PLEITER et al. Toxicity of five antibiotics and their mixture towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. *Water Research*, 47, 2050 - 2064, 2013.

PRESTES et al. O estado da arte na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal empregando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas. *Química Nova*, 36, 697-710, 2013

POMATI et al., Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis* sp. and *Lemna minor*. *Aquatic toxicology Amsterdam Netherlands*, 67, 387-396, 2004.

RADJENOVIC, J. et al., Evidencing Generation of Persistent Ozonation Products of Antibiotics Roxithromycin and Trimethoprim. *Environmental Science Technology* 43, 6808–6815, 2009.

RIBANI, M. et al., Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova* 2004, 27, 771-780.

SAHAR, E. et al., Fate of antibiotics in activated sludge followed by ultrafiltration (CAS-UF) and in a membrane bioreactor (MBR). *Water research*, 45, 4827-4836, 2011.

SCHÄFER, M. et al. Radical Cations in Electrospray Mass Spectrometry: Formation of Open-Shell Species, Examination of the Fragmentation Behaviour in ESI-MSn and Reaction Mechanism Studies by Detection of Transient Radical Cations. *Eur. J. Org. Chem.* 5162–5174, 2007.

SCHLUSENER, M. P.; BESTER, K. Persistence of antibiotics such as macrolides, tiamulin and salinomycin in soil. *Environmental Pollution*, 143, 565-571, 2006.

SEGURA, P. A et al. Determination of six anti-infectives in wastewater using tandem solidphase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Environ. Monit.*, 9, 307–313, 2007.

SEIFRTOVA, M. et al., An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. *Anal Chim Acta*. 649, 158-179, 2009.

SERNA, R. L. et al. Direct analysis of pharmaceuticals, their metabolites and transformation products in environmental waters using on-line TurboFlow™ chromatography–liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1252, 115– 129, 2012.

SKOOG, D. A.; LEARY, J. J. Princípios de análise instrumental. 4 ed. Orlando. Saunders College Publishing, 1992.

SOTIRO, K. R. Estudo da estabilidade química, física e liberação *in vitro* da eritromicina veiculada em sistemas líquido-cristalinos para tratamento da *acne vulgaris*. Dissertação. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho". Araraquara-SP, 2007.

SOUTO, C. R. O. Síntese Total e Enantiosseletiva da Aglicona do Antibiótico (+)-10-esoximetimicina. Tese de doutorado em Química. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil 1998.

STUMPF, M. et al., Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Science Total Environmental*, 225, 135-141, 1999.

SUAREZ, S.; LEMA, J. M.; OMIL, F. Pre-treatment of hospital wastewater by coagulation–flocculation and flotation. *Bioresource Technology*, 100, 2138–2146, 2009.

TAVARES W. Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos. 2a ed. São Paulo: Editora Atheneu;1996.

TERNES, T. A. Occurrence of drugs in german sewage treatment plants and rivers. *Water Research*., 32, 3245-3260, 1998.

TERNES, T. A. et al., Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Science Total Environmental*, 225, 81-90, 1999.

TERNES, T. A., JOSS, A., Human Pharmaceuticals, Hormones and Fragrances: the Challenge of Micropollutants in Urban Water Management. IWA, London. 2006

TIXIER, C. et al., Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen and naproxen in surface waters. *Environmental Science Technology*, 37, 1061-1068, 2003.

TONG, L. et al. Photodegradation of azithromycin in various aqueous systems under simulated and natural solar radiation: Kinetics and identification of photoproducts. *Chemosphere*, 83, 340–348, 2011.

TRIGUEROS, N. C. et al. Macrólidos y cetólidos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, 27, 412–418, 2009.

VASCONCELOS, T. G. et al., Ciprofloxacin in hospital effluent: degradation by ozone and photoprocesses. *Journal of Hazardous Materials*, 169, 1154-1158, 2009.

VASCONCELOS, T. G. Antimicrobial ciprofloxacina em efluente hospitalar: exposição ambiental, avaliação de risco e degradação através de processos avançados de oxidação. Tese de doutorado em química. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brasil, 2006.

VELDE, F. et al., Simultaneous determination of clarithromycin, rifampicin and their main metabolites in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 877, 1771–1777, 2009.

VIENO, N. M., TUHKANEN, T.; KRONBERG, L., Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography. A*, 1134, 101-111, 2006.

VIONE, D. et al., Phototransformation of selected human-used macrolídeos in surface water: Kinetics, model predictions and degradation pathways. *Water research*, 43, 1959 – 1967, 2009.

WANG, J. Analysis of macrolide antibiotics using liquid chromatography-mass spectrometry, in food, biological and environmental matrices. *Mass Spectrometry Reviews*, 28, 50–92, 2009.

WEAST, R. C.; ASTLE, M. J.; BEYER, W. H. CRC Handbook of chemistry and physics (CRC Handbook), 1985, CRC Press, inc. Boca Raton, Florida.

WILDE, M. L; KÜMMERER, K.; MARTINS, A. F. Multivariate Optimization of Analytical Methodology and a First Attempt to an Environmental Risk Assessment of β -Blockers in Hospital Wastewater. *Journal Brazilian Chemical Society*, 23, 1732-1740, 2012.

YAMASHITA et al., Effects of antibacterial agents, levofloxacin and clarithromycin, on aquatic organisms. *Water Science Technology*, 53, 65-72, 2006.

YANG, S.; CARLSON, K. H. Solid-phase extraction–high-performance liquid chromatography–ion trap mass spectrometry for analysis of trace concentrations of macrolídeo antibiotics in natural and waste water matrices. *Journal of Chromatography A*, 1038, 141–155, 2004.

XUE, B. et al., Antibiotic contamination in a typical developing city in south China: Occurrence and ecological risk sinter Yongjiang Riveri mpacted by tributary discharge andanthropogenic activities. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 92, 229–236, 2013.

ZHANG, Y. et al., Aspects of Degradatíon Kinetic of Azithromycin in Aqueous Solution *Chromatographia*, 70, 67-73, 2009.

ZHENG, Q. et al. Occurrence and distribution of antibiot cs in the Beibu Gulf, China: Impacts of river discharge and aquaculture activities. *Marine Environmental Research*, 78, 26-33, 2012.

ZHONG, D. et al. Identification of the metabolites of roxithromycin in humans. *Drug metabolism and disposition.*, 28, 552-559, 2000.

ZUCKERMAN, J. M. Macrolides and ketolides: azithromycin, clarithromycin, telithromycin. *Infect Dis Clin N Am*, 18, 621–649, 2004.