



PUCRS

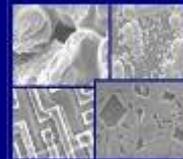
**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E
TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Faculdade de Engenharia

Faculdade de Física

Faculdade de Química



PGETEMA

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO DE SOLUÇÕES SINTÉTICAS
CONTENDO O FÁRMACO METRONIDAZOL COM PROCESSOS
AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO**

JOICINELI FAGUNDES DE OLIVEIRA BECKER

LICENCIADA EM QUÍMICA

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Porto Alegre

Agosto, 2010



PUCRS

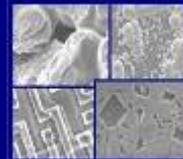
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E
TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Faculdade de Engenharia

Faculdade de Física

Faculdade de Química



PGETEMA

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO DE SOLUÇÕES SINTÉTICAS
CONTENDO O FÁRMACO METRONIDAZOL COM PROCESSOS
AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO**

JOICINELI FAGUNDES DE OLIVEIRA BECKER

LICENCIADA EM QUÍMICA

ORIENTADOR: PROF. DR. **Marçal José Rodrigues Pires**

CO-ORIENTADOR: Prof(a). Dr(a). **Carla Maria Nunes Azevedo**

Dissertação realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

**Porto Alegre
Agosto, 2010**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marçal José Rodrigues Pires
Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Alexandre Arenzon
Faculdade de Biologia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Marlise Araújo dos Santos
Faculdade de Farmácia
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Rosane Angélica Ligabue
Faculdade de Química
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Isabel Cristina Telles Silveira
Consultora na Área de Química Ambiental

***“O ignorante afirma, o sábio
duvida, o sensato reflete”
(Aristóteles)***

DEDICATÓRIA

Ao Arthur, meu filho amado; e ao Augusto companheiro de todas as vidas.

A minha mãe pelo exemplo de força e trabalho.

Aos meus sogros pela parceria incansável; em especial, ao meu sogro pelas intermináveis caronas.

À vó Íris (*in memoriam*), por me orientar e apoiar, seja de onde for...

Aos meus familiares, que torcem pelo meu sucesso.

A todos os amigos que colaboraram para a realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais-PGETEMA/PUCRS, pela oportunidade de estudo.

Ao Prof. Dr. Marçal José Rodrigues Pires agradeço a orientação, por confiar no meu trabalho, e pelas oportunidades oferecidas desde a graduação.

À Prof. Dra. Carla Azevedo pela co-orientação e pela incansável parceria.

Ao Prof. Dr. Alexandre Arenzon pelo espaço e apoio do Laboratório de Ecologia da UFRGS nos testes de toxicidade.

Ao Químico Gabriel Rübensan, pelas análises cromatográficas realizadas no Laboratório Nacional Agropecuário-LANAGRO.

Ao Laboratório de Processos Ambientais-LAPA, e a sua equipe através da profissional Fernanda A. dos Santos; pela ajuda nas análises de toxicidade.

À Bioensaios Análises e Consultoria Ambiental pelo apoio em permitir o uso de suas instalações e equipamentos do laboratório durante a parte experimental deste trabalho.

À Prof. Dra. Cleidy Walery dos Santos Andretta, pela disponibilidade e ajuda fornecida no estudo de toxicidade e análise dos subprodutos.

À Prof. Dra. Marlise A. dos Santos pelo fornecimento do fármaco usado nesse estudo.

Às colegas do Laboratório de Química Analítica e Ambiental da PUCRS, pela companhia e espírito de equipe; em especial, à colega Fernanda e Luciane pelas análises realizadas na cromatografia iônica.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	5
AGRADECIMENTOS	6
SUMÁRIO	7
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS.....	13
LISTA DE QUADROS.....	14
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	15
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivos Específicos	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
3.1. Efluentes contendo Fármacos	22
3.1.1. Metronidazol	25
3.2. Processos de Tratamento Avançados de Oxidação	26
3.2.1. Ozonização	27
3.2.2. Reações Fenton.....	29
3.2.3. Reações Foto-Fenton	30
3.2.4. Processo tipo Fenton	32
3.2.5. Tratamentos redutivos baseados no emprego de Fe ⁰	33
3.3. Toxicidade e ecotoxicidade em ambientes aquáticos	34
3.3.1. Organismos-teste.....	36
3.4. Toxicidade e ecotoxicidade do metronidazol e subprodutos	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1. Reagentes e Materiais.....	40
4.2. Processos de Tratamento.....	40
4.2.1. Preparo da solução-estoque de metronidazol.....	42

4.2.2. Avaliação espectrofotométrica do fármaco para diferentes pHs	42
4.2.3. Avaliação espectrofotométrica do meio reacional Fenton	43
4.2.4. Peroxidação e foto-peroxidação do fármaco	43
4.2.5. Reações Fenton e Foto-Fenton clássicas	44
4.2.6. Reações tipo Fenton, e tipo foto-Fenton	44
4.2.7. Reação entre o fármaco e Fe^0 e Fe^{+2}	45
4.3. Métodos Analíticos	45
4.3.1. Espectrofotometria de ultravioleta-visível	45
4.3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência	45
4.3.3. Espectrometria de absorção atômica-FAAS	47
4.3.4. Cromatografia Iônica	48
4.4. Ecotoxicidade do metronidazol e dos subprodutos	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
5.1. Estudos preliminares do espectro do metronidazol	49
5.1.1. Espectros do meio reacional Fenton	51
5.2. Estudo das reações de degradação do fármaco	53
5.2.1. Peroxidação e foto-peroxidação do metronidazol	53
5.2.2. Reações Fenton e foto-Fenton clássicas	60
5.2.2.1. Degradação do metronidazol na reação Fenton	62
5.2.3. Reações tipo Fenton e tipo Foto-Fenton	64
5.2.4. Reações degradativas usando Fe^0 e Fe^{+2}	68
5.3. Análise da decomposição do metronidazol por CLAE-UV	72
5.3.1. Reação de foto-peroxidação	72
5.3.2. Reação tipo Fenton	73
5.3.3. Reação de redução	76
5.4. Influência do teor de ferro livre total na degradação do metronidazol	78
5.5. Análise dos subprodutos	82
5.5.1. Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção DAD	82
5.5.2. Cromatografia Iônica	86
5.6. Ensaios de toxicidade com os subprodutos	88
6. CONCLUSÕES	91
7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	93
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

ANEXO A.....101

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Possíveis rotas de disposição dos fármacos no ambiente.....	24
Figura 3.2. Fórmula estrutural plana do metronidazol.....	25
Figura 3.3. Representação das possíveis vias reacionais viabilizadas pelo uso de ferro metálico.	33
Figura 3.4. Aspecto ilustrativo de <i>Daphnia similis</i>	37
Figura 4.1. Esquema da montagem do reator para os processos de tratamento. Para as reações foto foi utilizada fonte UVA.....	41
Figura 4.2: Curva analítica para o fármaco metronidazol em meio natural, pH 6,0, faixa de calibração de 0,1 a 10 mg L ⁻¹ , CLAE em 317 nm.....	46
Figura 4.3: Curva analítica para determinação de Fe total por FAAS, faixa de concentração de 0,5 a 10 mg L ⁻¹	47
Figura 5.1. Espectros de absorção da solução de metronidazol em concentração de 10,31 mg L ⁻¹ , em diferentes valores de pH.....	49
Figura 5.2. Espectros de absorção da solução de metronidazol 10,31 mg L ⁻¹ em pH de 10,0 (linha grossa) e da base usada para alcalinizar (linha fina) na concentração de 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	50
Figura 5.3: Espectros das soluções contendo (A) 10,20 mg L ⁻¹ em H ₂ O ₂ e 6,70 mg L ⁻¹ em Fe ⁺² , (B) 10,20 mg L ⁻¹ em H ₂ O ₂ , (C) 6,70 mg L ⁻¹ em Fe ⁺² , pH de 3,5±0,2.	51
Figura 5.4: Espectros de absorção da solução (A)10,31 mg L ⁻¹ em metronidazol, (B) 6,70 mg L ⁻¹ em FeCl ₃ , (C) solução 10,20 mg L ⁻¹ em H ₂ O ₂ e 6,70 mg L ⁻¹ em Fe ⁺² , e (D) HCl 0,1 mol L ⁻¹	52
Figura 5.5. Espectros de absorção da solução de metronidazol 10,31 mg L ⁻¹ e 10,20 mg L ⁻¹ em H ₂ O ₂ ., pH de 3,5±0,2, em diferentes tempos reacionais para a peroxidação.....	53
Figura 5.6. Espectros de absorção de solução de metronidazol 10,31 mg L ⁻¹ e 10,20 mg L ⁻¹ em H ₂ O ₂ , pH de 3,5±0,2, em diferentes tempos reacionais para a foto-peroxidação.....	54
Figura 5.7. Espectros de absorção de solução de metronidazol 10,31 mg L ⁻¹ , pH de 3,5±0,2, em diferentes tempos reacionais para a fotólise.	55

- Figura 5.8. Espectros de absorção de solução 255 mg L⁻¹ em H₂O₂, e 1031 mg L⁻¹ em H₂O₂, pH de 3,5±0,2.....56
- Figura 5.9. Espectros de absorção de solução de metronidazol 10,31 mg L⁻¹, peroxidação com 255 mg L⁻¹ em H₂O₂, e foto- peroxidação com 255 mg L⁻¹ em H₂O₂, pH de 3,5±0,2.....57
- Figura 5.10. Espectros de absorção de solução de metronidazol 10,31 mg L⁻¹, foto- peroxidação com 1031 mg L⁻¹ em H₂O₂, pH de 3,5±0,2.....58
- Figura 5.11. Espectros de absorção de solução de metronidazol 10,31 mg L⁻¹, foto- peroxidação com 1031 mg L⁻¹ em H₂O₂, pH de 3,5±0,2, em diferentes tempos reacionais.59
- Figura 5.12: Espectros da amostra sintética de metronidazol 10,31 mg L⁻¹, 6,70 mg L⁻¹ em Fe⁺², 10,20 mg L⁻¹ em H₂O₂, pH de 3,5±0,2, em diferentes tempos reacionais, reação Fenton.....60
- Figura 5.13: Espectros da amostra sintética de metronidazol 10,31 mg L⁻¹, 6,70 mg L⁻¹ em Fe⁺², 10,20 mg L⁻¹ em H₂O₂, pH de 3,5±0,2, em diferentes tempos reacionais, reação Foto-Fenton.....61
- Figura 5.14: Cromatograma do padrão de metronidazol, concentração de 10 mg L⁻¹, em 317 nm.62
- Figura 5.15: Cromatograma de amostra de subproduto da reação de Fenton clássico, mesma amostra da Fig. 5.12, em 317 nm.63
- Figura 5.16: Cromatograma de amostra de subproduto da reação de Foto- Fenton clássico, mesma amostra da Fig. 5.14, em 317 nm.64
- Figura 5.17. Espectros de absorção de metronidazol 10,31 mg L⁻¹ com 10,20 mg L⁻¹ em H₂O₂ e 2,8 mg de ferro, pH de 3,5±0,2, em diferentes tempos reacionais, reação tipo Fenton.65
- Figura 5.18. Espectros de absorção de metronidazol 10,31 mg L⁻¹ com 10,20 mg L⁻¹ em H₂O₂ e 2,8 mg de ferro, pH de 3,5±0,2, em diferentes tempos reacionais, reação tipo foto-Fenton.66
- Figura 5.19: Remoção percentual de metronidazol em concentração de 10,31 mg L⁻¹, 5,10(cinza), 10,20(preto) e 20,40 (pontilhado) mg L⁻¹ em H₂O₂, 2,8 mg de ferro comercial, pH de 3,5, reação tipo Fenton.67
- Figura 5.20: Espectros de absorção da reação entre o metronidazol 10,31 mg L⁻¹ com 2,8 mg de ferro, pH de 3,5±0,2, em diferentes tempos reacionais.68

- Figura 5.21: Espectros de absorção da reação entre o metronidazol $10,31 \text{ mg L}^{-1}$ com $2,8 \text{ mg}$ de ferro, pH de $3,5 \pm 0,2$, reação de foto-redução. 69
- Figura 5.22: Espectros de absorção da reação entre o (A) metronidazol $10,31 \text{ mg L}^{-1}$ com $2,8 \text{ mg}$ de ferro, e (B) reação com $6,70 \text{ mg L}^{-1}$ em Fe^{+2} , pH de $3,5 \pm 0,2$ 70
- Figura 5.23: Espectros de absorção da reação entre o metronidazol $10,31 \text{ mg L}^{-1}$ com $6,70 \text{ mg L}^{-1}$ em Fe^{+2} , e reação com $13,40 \text{ mg L}^{-1}$ em Fe^{+2} , pH de $3,5 \pm 0,2$ 71
- Figura 5.24: Cromatograma do subproduto da reação de fotoperoxidação, em 317 nm 72
- Figura 5.25: Cromatogramas sobrepostos do padrão de metronidazol $10,31 \text{ mg L}^{-1}$, e dos subprodutos da reação tipo Fenton e tipo Fenton irradiada, em 317 nm 74
- Figura 5.26: Cromatogramas sobrepostos dos subprodutos da reação tipo Fenton e tipo Fenton irradiada, escala ampliada, em 317 nm 75
- Figura 5.27: Cromatogramas sobrepostos dos subprodutos da reação de redução usando $6,70 \text{ mg L}^{-1}$ em Fe^{+2} , e na presença de $2,8 \text{ mg}$ em ferro, em 317 nm 76
- Figura 5.28: Cromatogramas da reação de Foto-redução usando $6,70 \text{ mg L}^{-1}$ em Fe^{+2} , e na presença de $2,8 \text{ mg}$ em ferro, em 317 nm 77
- Figura 5.29: Ampliação de cromatogramas sobrepostos dos subprodutos da reação de foto-redução usando $6,70 \text{ mg L}^{-1}$ em Fe^{+2} , e na presença de $2,8 \text{ mg}$ em ferro, em 317 nm 78
- Figura 5.30: Influência do teor de ferro livre na decomposição do metronidazol, pH de $3,5 \pm 0,2$ 80
- Figura 5.31: Influência do tipo de ferro na decomposição do metronidazol pelo processo de redução, fonte Fe^0 (quadrado) e fonte Fe^{+2} (círculos). 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1. Influência dos teores de ferro na degradação do metronidazol.....	79
Tabela 5.2. Teores de em mg L ⁻¹ dos ânions orgânicos e inorgânicos, após as reações de degradação do metronidazol, 30 minutos de reação.....	86
Tabela 5.3. Concentração em mg L ⁻¹ de N calculado, após as reações de degradação do metronidazol.....	87
Tabela 5.4. Avaliação da toxicidade de amostras sintéticas após tratamento de decomposição do metronidazol para <i>Daphnia Similis</i> , em 48 horas.	88

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1 Termos comuns usados em ensaios de toxicidade.	35
Quadro 4.1 Reagente metronidazol usado para preparo da solução-estoque	42

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CE ₅₀	Concentração efetiva média
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
CONSEMA	Conselho Estadual de Meio Ambiente
C ₁₈	Octadecilsilano
D	Dimensões
DAD	Deteção de arranjo de diodos, do inglês “ <i>Diode array detection</i> ”
e ⁻	Elétron
E ⁰	Potencial padrão de redução
ETA	Estação de tratamento de água
ETE	Estação de tratamento de efluentes
FAAS	Espectrometria de absorção por chama, do inglês “ <i>Spectrophotometry flame atomic absorption</i> ”
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês “ <i>High performance liquid chromatography</i> ”
IC ₅₀	Concentração Inibitória em 50% dos organismos-teste
ISO	Organização Internacional de Padronização Interna, do inglês “ <i>International Organization for Standardization</i> ”
LD	Limite de deteção
MTZ	Abreviatura de metronidazol
P _v (Pa)	Pressão de vapor em Pascal
pH	Potencial hidrogeniônico
R _{red}	Reação de redução
R _{ox}	Reação de oxidação
U.S EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América
UV-VIS	Ultravioleta - Visível
V	Volts

RESUMO

BECKER, Joicyneli Fagundes de Oliveira. **Avaliação do tratamento de soluções sintéticas contendo o fármaco metronidazol com processos avançados de oxidação**. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. 2010. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

Antibióticos são amplamente utilizados, e se apresentam difundidos em águas residuais. Entre esses compostos, pode-se salientar o grupo dos nitroimidazóis, usados no tratamento de doenças sexualmente transmissíveis. Em virtude do grande uso, o composto metronidazol e seus subprodutos estão presentes em águas superficiais. Essa substância tem grande resistência aos processos convencionais de tratamento de efluentes e, assim buscam-se ferramentas mais eficientes para a degradação desse fármaco. Entre os processos capazes de degradar o metronidazol estão os Processos Oxidativos Avançados-POAs, com destaque para a reação Fenton e Foto-Fenton. O presente estudo buscou a degradação do metronidazol presente em amostras sintéticas, como forma de redução da toxicidade dessas. Organismos aquáticos (*Daphnia similis*) foram usados como forma de avaliar a eficiência dos tratamentos sobre a toxicidade.

As reações foto-Fenton clássica e tipo foto-Fenton apresentaram os maiores teores de degradação para substância, com baixos teores de ferro total livre. Os dados de toxicidade indicaram que os subprodutos após os tratamentos apresentaram CE_{50} semelhantes aos do fármaco de partida, indicando que não houve aumento da toxicidade.

Palavras-Chaves: metronidazol, Fenton, toxicidade

ABSTRACT

BECKER, Joicyneli Fagundes de Oliveira. **Evaluation of the treatment of synthetic solutions containing the drug metronidazole with advanced oxidation processes.** PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL. 2010. Master. Pos-Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

Antibiotics are widely used and presenting broadcast in wastewater. Among these compounds, one can highlight the group of nitroimidazoles, which are used in the treatment of sexually transmitted diseases. Under heavy use, the compound metronidazole and its byproducts are present in surface waters. This substance has a high resistance to traditional wastewater treatment and thus search for tools to more efficient degradation of this drug. Among the processes that can degrade metronidazole are the Advanced Oxidation Processes, POAs, with emphasis on the Fenton reaction and photo-Fenton. The present study investigates the degradation of metronidazole present in synthetic samples, as a way of reducing the toxicity of these. Aquatic organisms (*Daphnia similis*) were used as a means of evaluating the effectiveness of treatments on toxicity.

The photo-Fenton reactions classic and photo-Fenton type showed the highest levels of degradation for a substance with low levels of total iron free. The toxicity data indicated that the products after the treatments showed similar EC_{50} to starting the drug, indicating that no increase in toxicity.

Keywords: metronidazole, Fenton, toxicity.

1. INTRODUÇÃO

O crescimento da população das grandes cidades trouxe consigo a necessidade da implementação do uso de novos fármacos como forma de combater epidemias e garantir a qualidade de vida. Nesse sentido, a indústria farmacêutica tem produzido toneladas de medicamentos todos os anos para uso humano e veterinário. Fármacos são compostos biologicamente ativos e projetados para conservarem suas propriedades mesmo após passarem pelas rotas metabólicas nos tratamentos onde são empregados. Em virtude de seu grande uso, estes são emitidos para os esgotos domésticos, águas superficiais e/ou cursos de água (Hallinger – Sorensen et al, 1998).

A presença desses compostos em águas, ainda que em baixas concentrações (ng L^{-1}) pode gerar danos a saúde humana (Rodríguez-Gil *et al*, 2010). Avaliar o destino destes produtos no meio é uma tarefa complexa, pois vários fatores podem interferir na elaboração de um modelo de rota; tais como, estrutura química, temperatura, sazonalidade, entre outros.

Ternes *et al* (1999) demonstraram a presença de uma ampla variedade dessas substâncias em águas superficiais e esgotos domésticos. Esses autores encontraram carbamazepina em níveis de até $6,3 \mu\text{g L}^{-1}$ e diclofenaco até $2,1 \mu\text{g L}^{-1}$. Devido ao seu caráter hidrofílico, os fármacos permanecem na água e no solo dos rios, sendo persistentes aos tratamentos convencionais das Estações de Tratamento de Esgoto - ETEs. Dentre os compostos que merecem especial atenção encontramos os antibióticos. O uso descontrolado dessas substâncias, bem como a falta de conhecimento do efeito desses no meio ambiente são motivos de sérias preocupações por parte da comunidade científica, uma vez que, afetam a qualidade das águas usadas para abastecimento humano.

O metronidazol é um antibiótico do grupo dos nitroimidazóis usado para tratamento de infecções causadas por bactérias anaeróbias e protozoários, *Trichomonas vaginalis* e *Giardia lamblia* (Tally e Sullivan, 1981).

Esse antibiótico desempenha importante papel no tratamento de infecções devido a sua fácil absorção por via oral e amplo espectro de ação. A presença deste fármaco no meio ambiente representa risco a saúde da população devido as suas possíveis propriedades carcinogênicas e/ou mutagênicas em mamíferos (Bendesky *et al*, 2002); bem como devido a relatos da toxicidade aguda desse fármaco sobre algas, prejudicando assim toda a cadeia trófica dos ecossistemas aquáticos (Halling-Sorensen-Lanzky, 1997). A complexa estrutura química é apontada como responsável pela sua baixa biodegradabilidade, bem como fator limitante nos processos de tratamento (Sánchez-Polo *et al*, 2008). Lindeberg e colaboradores (2004) detectaram a presença dos compostos nitroimidazóis na faixa de 0,1 a 90,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ em águas residuais provenientes de hospitais. Em virtude da persistência do metronidazol em águas residuais, mesmo após tratamento convencional, é necessário o estudo de metodologias de degradação desse composto, como forma de redução do teor de toxicidade dos efluentes.

Nesse sentido, os processos oxidativos avançados-POAs, tem sido apontados como uma poderosa ferramenta no tratamento de amostras contendo fármacos Shermer *et al* (2006); Rodríguez-Gil *et al* (2010). Os POAs se baseiam em reações de oxidação e englobam vários tipos de mecanismos: ozonização, fotólise heterogênea, Fenton, foto-Fenton, entre outros (Nogueira *et al*, 2007). A reação Fenton consiste na reação entre Fe^{+2} e H_2O_2 , gerando radicais $\cdot\text{OH}$, que atacam indistintamente as espécies presentes promovendo oxidação. O uso dos radicais hidroxila, altamente reativos e pouco seletivos, combinado com o uso de radiação ultravioleta tem apresentado resultados satisfatórios na degradação de substâncias recalcitrantes (Melo *et al*, 2009).

Os nitroimidazóis são um grupo de antibióticos de difícil degradação e, muitas vezes, os subprodutos das reações são mais tóxicos que a própria molécula de origem. Outro fator importante, para essa família de compostos, é a capacidade de comportamento diferente, conforme o meio reacional seja alterado. O metronidazol pode sofrer oxidação ou redução, devido a pequenas diferenças de pH, concentração de agente oxidante, presença de radicais que sejam competidores nas

reações e de substâncias húmicas (Sánchez-Pólo *et al*, 2009). Shemer *et al* (2006) analisaram a reação Fenton na busca da total mineralização do metronidazol em águas residuais, conseguindo degradação total desse composto.

Devido a essas peculiaridades, o estudo da degradação do metronidazol pela reação Fenton e suas variações será realizado, e a toxicidade dos subprodutos finais determinada, como forma de validar uma técnica capaz de degradar completamente a CO_2 e H_2O esse fármaco (mineralizar), eliminando ou diminuindo a toxicidade para o meio ambiente e para o homem.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo é avaliar os Processos Oxidativos Avançados - POAs como forma de tratamento de soluções sintéticas contendo o fármaco metronidazol. Um estudo empregando os sistemas Fenton, Foto-Fenton, H₂O₂/UV, H₂O₂, tipo Fenton e tipo Foto-Fenton, e as reações com Fe⁰. Posteriormente, o fármaco e os subprodutos dos tratamentos foram avaliados e sua toxicidade analisada.

2.1. Objetivos Específicos

- Otimização dos sistemas Fenton, tipo Fenton, peroxidação, foto-peroxidação, e as reações de redução no tratamento de soluções sintéticas, contendo o fármaco em estudo;
- Avaliação da eficiência de degradação, acompanhada por UV-VIS.
- Avaliação dos subprodutos gerados nos processos por cromatografia iônica e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por UV e DAD;
- Avaliação da toxicidade dos subprodutos, através de testes com os organismos *Daphnia similis*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Efluentes contendo Fármacos

Em todo o mundo, os fármacos têm sido encontrados em águas superficiais, efluentes domésticos e até mesmo em águas subterrâneas (Melo *et al*, 2009). Dentre esses compostos, os mais comuns são os antibióticos, antilipênicos, hormônios, analgésicos e antiinflamatórios. Kolpin *et al* (2002), relatam a presença de uma ampla variedade de antibióticos em águas residuais nos Estados Unidos na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ ou ng L^{-1} . As principais rotas de entrada desses elementos no meio ambiente são os esgotos domésticos, hospitalares e descarte inadequado dos medicamentos não utilizados. Esses poluentes não são totalmente eliminados durante os tratamentos convencionais nas Estações de Tratamento de Esgoto - ETE e, dependendo de suas propriedades químicas podem ficar totalmente na fase aquosa, como por exemplo, compostos polares, segundo relatam Ternes *et al* (1998).

Assim, compostos farmacêuticos, seus metabólitos (estruturas provenientes da transformação do composto em organismos animais) ou subprodutos (espécies químicas resultantes do composto parental e/ou metabólitos após a excreção) de degradação/transformação podem ser carregados para a água de abastecimento humano. Melo e colaboradores (2009) relatam a presença de fármacos em águas superficiais e efluentes no Brasil. Esse estudo mostra a presença dos antiinflamatórios ibuprofeno em águas de esgoto bruto e diclofenaco em águas de superfície brasileiras com valores de 54,2 e 4,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Além desses dados, os autores mostram na Europa e América do Norte a existência de fármacos até em águas subterrâneas; na Alemanha, o antibiótico sulfametoxazol foi detectado em concentrações de até 0,41 $\mu\text{g L}^{-1}$. Nos Estados Unidos o antibiótico trimetropin foi detectado em água superficial na ordem de 0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Os fármacos se apresentam como uma classe emergente de contaminantes orgânicos e são extensivamente usados na medicina humana e veterinária (Dezotti-Bila, 2003). A ocorrência de substâncias biologicamente ativas em águas representa uma grande ameaça à saúde da população. Esses compostos são sintetizados para se conservarem suas características após as rotas metabólicas do organismo, assim a maioria das drogas é encontrada no meio ambiente sob a forma original, mesmo após tratamento convencional do efluente (Jorgensen *et al*, 2000). Deve-se ressaltar, porém, que a degradação dos fármacos originais não significa um aspecto favorável, pois na maioria dos casos os compostos gerados se apresentam mais tóxicos que o composto original (Kummerer, 2009).

A presença dessas substâncias em ambientes aquáticos depende do tipo de efluente, padrão de consumo da população, características físico-químicas das moléculas, sinergismo entre os diversos poluentes e da sazonalidade (Melo *et al*, 2009). Outro fator relevante que influencia no comportamento do fármaco em águas naturais é a interação com substâncias presentes nos rios e lagos. Os ácidos húmicos, por exemplo, interferem no mecanismo de fotodegradação, pois absorvem em uma extensa faixa de radiação. A adsorção de antibióticos é afetada pela quantidade de partículas livres em suspensão, matéria orgânica, bem como, por outras espécies químicas presentes no meio (Thiele, 2003). Em virtude de tantos fatores, o monitoramento em águas e o tratamento destes efluentes se configuram como um grande desafio.

Dados da literatura sobre a toxicidade dos fármacos livres no meio ambiente são escassos e podem subestimar os efeitos carcinogênicos e/ou mutagênicos desses produtos (Kummerer, 2009). As baixas concentrações podem levar a conclusões errôneas, uma vez que, mesmo em baixas concentrações esses compostos tem uma vazão constante em águas superficiais e efluentes, conferindo um caráter de persistência. Conforme Jorgensen *et al* (2000), efeitos tóxicos sobre o meio ambiente podem ser encontrados, mesmo na ordem de ng L^{-1} .

Os antibióticos, em particular, têm contribuído para o desenvolvimento de bactérias resistentes, sendo que a persistência de um antibiótico em águas em baixos níveis leva a uma maior incidência desse tipo de organismo. A Fig 3.1 mostra possíveis rotas dos fármacos quando dispostos no ecossistema, bem como sua possível interação com o mesmo.

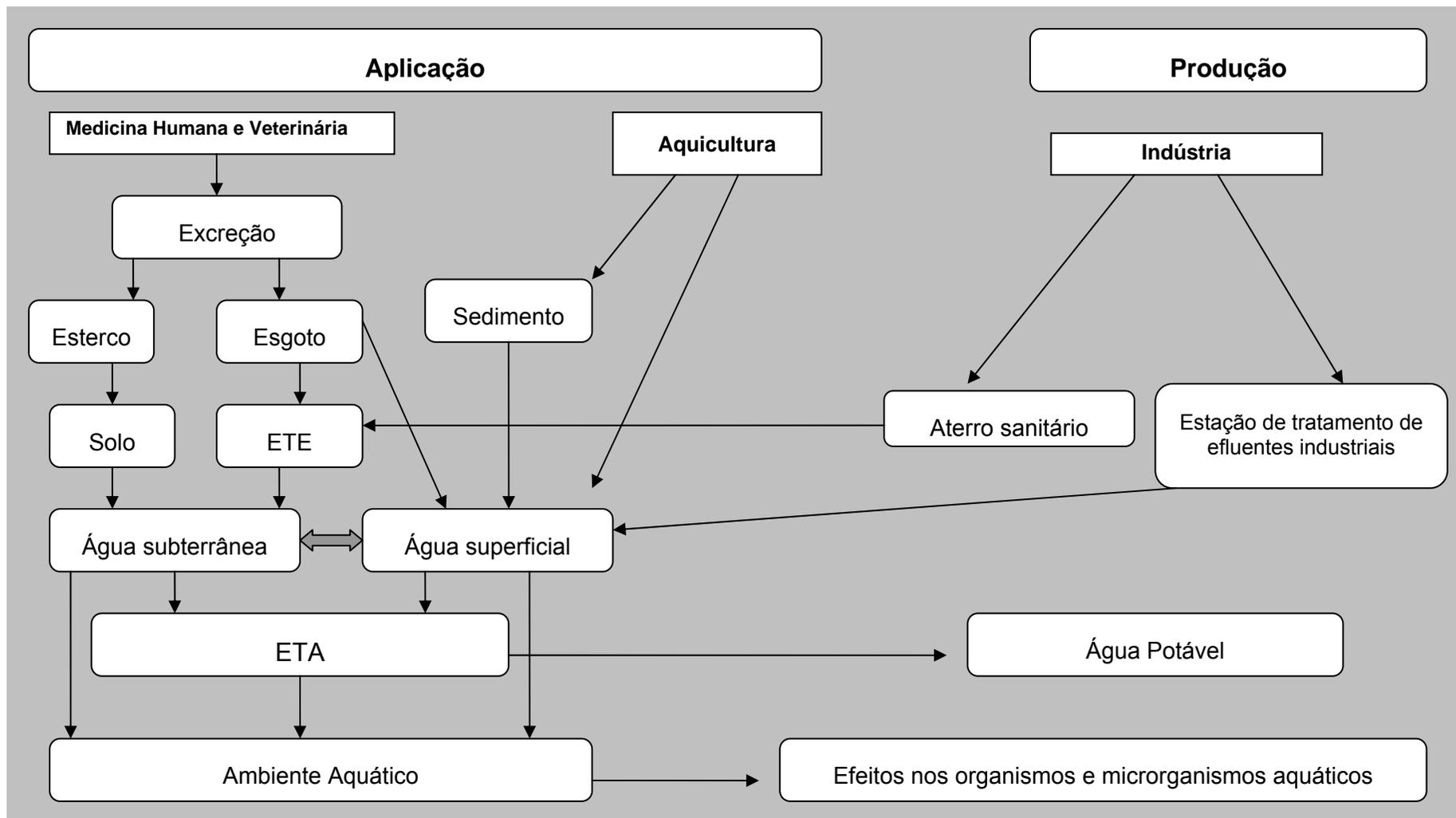


Figura 3.1. Possíveis rotas de disposição dos fármacos no ambiente. (adaptado de Dezotti-Bila, (2003)

3.1.1. Metronidazol

O metronidazol, de nome químico 1- (β - hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol (Fig. 3.2), pertence à família dos nitroimidazóis e tem propriedades antibacterianas e antiprotozoárias, sendo utilizado no tratamento contra agentes gram-negativos anaeróbios, bacilos gram-positivos e contra cocos anaeróbios. O principal uso relatado para o metronidazol é no tratamento contra *Trichomonas vaginalis* e *Giardia lamblia* (Freeman *et al*, 1994). Esse composto é o principal fármaco do grupo do nitroimidazóis, possuindo atividade tóxica contra microrganismos, atacando a molécula de DNA dos mesmos (Bendesky *et al*, 2002). Além do uso em medicina humana, metronidazol é usado também no campo veterinário.

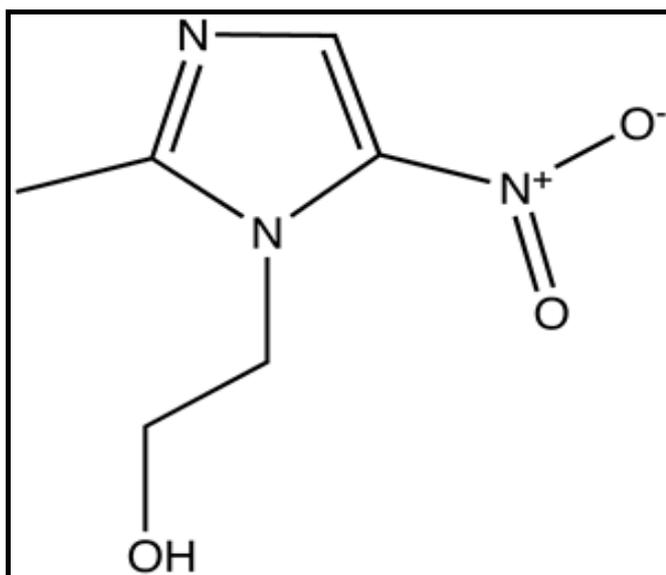


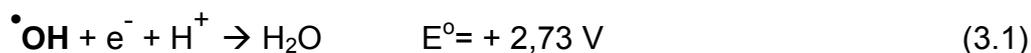
Figura 3.2. Fórmula estrutural plana do metronidazol.

Os nitroimidazóis são extensamente usados nos tratamento de doenças sexualmente transmissíveis, sendo um dos grupos de fármacos mais encontrados em águas (Lindeberg *et al*, 2004). Metronidazol é solúvel em água, e não é removido pelos processos convencionais de tratamento de efluentes, podendo ficar acumulado no meio ambiente. Efeitos tóxicos do principal nitroimidazol têm sido descritos contra algas, mesmo em níveis de mg.L^{-1} (Halling-Sorensen-Lanzky, 1997).

3.2. Processos de Tratamento Avançados de Oxidação

Os processos convencionais de tratamento de efluentes englobam os processos biológicos, físicos e químicos. No primeiro, há o emprego de grandes volumes de efluentes e remoção da matéria orgânica, mas devido ao caráter não-biodegradável dos fármacos esses processos não afetam significativamente a concentração dos mesmos na matriz aquosa. Nos tratamentos físicos (decantação, flotação, filtração, adsorção) ocorre apenas a transferência de fase dessas substâncias, mas não com caráter de decomposição (Freire *et al*, 2000). Os processos químicos, baseados no emprego de ClO_2 ou H_2O_2 , isoladamente, se mostram ineficientes no ataque aos compostos orgânicos, uma vez que não são capazes de promover total mineralização dos mesmos a CO_2 e H_2O . Outro aspecto relevante é o surgimento de subprodutos indesejáveis e altamente tóxicos, como, por exemplo, os organoclorados.

Nos últimos anos, os processos de oxidação avançados (POAs) têm recebido especial atenção, em virtude dos processos de tratamento convencionais não serem capazes de remover os fármacos de forma satisfatória (Klavarioti *et al*, 2009). Os POAs são baseados na formação de um radical altamente oxidante e não seletivo, radical hidroxila conforme Equação 3.1. Esse radical forma-se principalmente quando ocorrem reações entre agentes oxidantes, como ozônio e peróxido de hidrogênio, combinadas ou não com radiação ultravioleta (UV) e/ou visível (VIS) ou, ainda na presença de catalisadores como, por exemplo, o ferro.



Devido ao seu alto potencial de redução, esse radical tem a capacidade de oxidar uma ampla variedade de compostos orgânicos que não são afetados pelos tratamentos tradicionais. Os radicais $\cdot\text{OH}$ podem reagir com os compostos-alvo de diversas maneiras, dependendo da estrutura química do analito e do meio em questão. Pode-se salientar o mecanismo por abstração do átomo de hidrogênio, adição eletrofílica, transferência eletrônica e as reações radical-radical (Nogueira *et al*, 2007). Os POAs mais estudados são a ozonização em meio básico, Fenton,

foto-Fenton, tipo Fenton, fotocatalise-heterogênea, foto-peroxidação e a combinações destes.

3.2.1. Ozonização

Dentre os POAs, o mais amplamente estudado e abordado é a ozonização. O ozônio é a forma triatômica do oxigênio, e se constitui de um gás incolor. Quando em solução aquosa, o ozônio decompõe-se em oxigênio e em espécies radicalares. O mecanismo de reação com o ozônio pode se dar de duas formas distintas: a primeira é a reação direta com o uso do ozônio molecular que reage com a espécie orgânica via ataque eletrofilico.

O segundo mecanismo, o indireto envolve a formação de radicais $\cdot\text{OH}$, e a posterior oxidação dos compostos orgânicos. Vários fatores podem afetar a eficiência da reação na ozonização; o substrato orgânico empregado, o tempo reacional, e a dose de ozônio utilizada e principalmente o pH do meio. O pH do sistema é determinante, uma vez que, na presença de pH ácido ($\text{pH} < 3$) existe uma baixa concentração de íons hidroxila e a decomposição do ozônio molecular não é afetada de forma significativa (Kasprzyh *et al*, 2003). Em meio alcalino, existe uma grande concentração de íons hidroxila, promovendo a decomposição do ozônio e a formação do radical hidroxila, conforme Equações 3.2, 3.3 e 3.4.



As reações que ocorrem via mecanismo direto são significativamente menos efetivas que o mecanismo via radical hidroxila (Assalin *et al*, 2007). O processo com ozônio molecular, mais seletivo, promove também uma menor redução do carbono orgânico total (COT); havendo possibilidade de persistência de compostos refratários à técnica (Kasprzyh *et al*, 2003). O processo indireto apresenta maior carga energética pois o radical $\cdot\text{OH}$ apresenta elevado potencial padrão de redução ($E^\circ = +2,73 \text{ V}$), sendo agente oxidante não seletivo; entretanto as taxas de remoção do COT, nem sempre são totais. Em amostras ambientais

de alta complexidade podem surgir subprodutos de degradação que funcionam competindo com os radicais $\cdot\text{OH}$ nas reações de oxidação, promovendo baixa eficiência nos processos de tratamento. Entre as espécies competidoras mais comuns têm-se carbonatos, oxalatos e substâncias húmicas, presentes em águas subterrâneas e superficiais (Assalin *et al*, 2007).

O emprego de ozônio associado ao uso do peróxido de hidrogênio - H_2O_2 aparece como uma forma de aumentar o rendimento do processo, pois o H_2O_2 atua como fornecedor de radicais hidroxila ao sistema, retroalimentando a reação. Zwiener & Frimel (2000) concluíram que uma associação $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$, pode aumentar a eficiência no processo de remoção de fármacos em águas. Esse trabalho relatou um aumento na degradação de até 40% nos fármacos ácido clofíbrico e ibuprofeno, quando a ozonização foi combinada ao uso do peróxido de hidrogênio. As reações de ozonização podem ocorrer com ou sem a presença de radiação ultravioleta e/ou visível, porém deve-se salientar a importância do processo irradiado, uma vez que, potencializa a degradação, ativando as moléculas orgânicas e promovendo a fotólise do H_2O_2 , conforme Equação 3.5.



O emprego de ozônio pode estar associado a outras tecnologias além do O_3 /UV, O_3 / H_2O_2 , O_3 /UV/ H_2O_2 , O_3 /ultrasom, O_3 / TiO_2 . Polo *et al* (2008) compararam as diferenças no processo de degradação dos nitroimidazóis, presentes em matrizes aquosas, entre estes o metronidazol, usando O_3 e O_3 /carvão ativado. Os resultados indicaram que a presença do carvão ativado teve influência na velocidade de decomposição dos compostos em questão, uma vez que, ocorre transformação do ozônio solúvel em radicais hidroxila. Pôde-se ainda inferir que o carvão ativado reduziu em 30% a quantidade de matéria orgânica livre no sistema pela geração dos radicais hidroxila, e pela capacidade de adsorção dos subprodutos, bem como diminui a toxicidade do resíduo tratado. Silveira e colaboradores(2009) conseguiram elevada degradação do metronidazol empregando reação com ozônio, com redução da toxicidade após o tratamento.

As reações de oxidação catalítica têm-se mostrado promissoras no tratamento de matrizes ambientais complexas, principalmente em baixos valores

de pH. A presença de íons metálicos como o Fe, Mn, Ni, Co, Zn e Cr sob várias formas (sais ou metais reduzidos, óxidos ou metais suportados) são possíveis catalisadores do processo de ozonização. De maneira geral, a ozonização catalítica possibilita a otimização do processo tradicional, pois a presença dos metais proporciona uma maior taxa de degradação dos poluentes ambientais, elimina a interferência de íons competidores do radical hidroxila, e reduz o consumo de ozônio (Park *et al*, 2004). Os processos baseados no uso do ozônio apresentam algumas limitações, entre elas: instabilidade do gás em meio aquoso, custo na produção de O₃, existência de compostos refratários a técnica e geração de subprodutos tóxicos, como bromatos, por exemplo (Nogueira *et al*, 2009).

3.2.2. Reações Fenton

A oxidação catalítica do peróxido de hidrogênio, Equação 3.6, na presença de sais ferrosos, em meio aquoso, se constitui na chamada reação Fenton clássica ou homogênea, onde o radical hidroxila atua como espécie que inicia a oxidação. Os íons metálicos atuam como catalisadores (Neyens-Baeyens, 2003). A reação pode ser facilmente aplicada para o tratamento de efluentes contendo poluentes ambientais, oxidando diversos compostos orgânicos; levando à completa mineralização das amostras tratadas. A reação Fenton apresenta diversas vantagens: facilidade das condições de trabalho, podendo ser aplicada em escala industrial, no tratamento de micropoluentes presentes em águas de superfície, naturais e até mesmo solo (Nogueira *et al*, 2007); apresenta a possibilidade de reuso do catalisador empregado e necessita de reagentes de baixo custo.

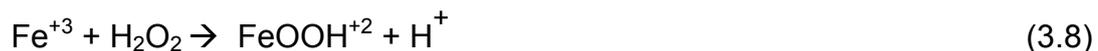


Em virtude da presença de íons ferrosos e férricos, sob forma de aqua-complexos, pode-se estabelecer o fator mais importante e também, limitante na aplicabilidade do processo Fenton e/ou Fenton irradiado é o pH. Esses íons em valores de pH acima de 4,0; normalmente precipitam sob forma de hidróxidos insolúveis, Shemer *et al* (2006). A máxima eficiência da reação ocorre na estreita

faixa de pH entre 2,5 e 3,5, em virtude de que em valores de pH abaixo de 2,0, ocorre também o seqüestro dos radicais hidroxila, conforme Eq. 3.7.



Os íons férricos formados, Eq. 3.6 podem decompor o H_2O_2 cataliticamente a H_2O e O_2 , cujos passos são dependentes do pH como mostrado nas Equações 3.8 a 3.12, formando também íons ferrosos e radicais (Nogueira *et al*, 2007).

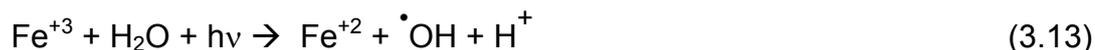


Através da análise das equações descritas em 3.8 a 3.12, verifica-se que na reação Fenton a presença de H_2O_2 em excesso pode prejudicar o processo, pois atuará como captador de radicais hidroxila($\bullet\text{OH}$), formando o radical hidroperoxila(HO_2^\bullet), espécie menos reativa que prejudica a cinética de degradação dos compostos de interesse. Paterlini *et al* (2005) demonstraram que a presença do peróxido de hidrogênio em excesso é um fator negativo nos tratamentos de efluentes contendo herbicidas via reação de Fenton irradiada.

3.2.3. Reações Foto-Fenton

A reação Fenton pode ser aplicada na presença de radiação de luz visível e ultravioleta, denominada de foto-Fenton. O processo foto-Fenton potencializa a reação Fenton, na medida, em que regenera os íons Fe^{+2} para reagirem com H_2O_2 e produz mais radicais hidroxila para a reação (Zepp *et al*, 1992). Pode-se salientar, também que na presença de luz ocorre o aumento da decomposição do peróxido de hidrogênio e fotólise dos compostos orgânicos a serem tratados. Devido à alta eficiência de degradação e facilidade de operação, o processo foto-Fenton apresenta grandes atrativos para o tratamento de várias matrizes

ambientais. Segundo Hassemer (2006), os contaminantes que absorvem entre 200-300 nm, são indicados para esse processo, uma vez que o sistema Fe/H₂O₂ absorve em 300-400 nm, melhorando a foto atividade do sistema. Para compostos que absorvem próximo a 550 nm, surge a possibilidade do tratamento Foto-Fenton usando luz solar, ao invés de lâmpadas UV. A Eq. 3.13 descreve a regeneração do Fe⁺² na presença de luz.



Diversos trabalhos têm estudado o controle do pH na aplicabilidade da reação foto-Fenton. Zepp *et al.* (1992) analisaram a influência do pH sobre produção de radicais hidroxila, estudando uma ampla gama de complexantes para os íons Fe⁺² e Fe⁺³, demonstrando a viabilidade do uso de agentes complexantes como forma de aumentar a faixa de trabalho do pH da reação foto-Fenton. A utilização de complexos orgânicos carboxilados na reação foto-Fenton para estabilizar o processo em uma faixa de pH mais ampla é uma alternativa que apresenta vantagens. Além de estabilizar o pH; o uso do ferrioxalato de potássio, por exemplo, que apresenta grande absorvidade molar na faixa de 200 a 500 nm, inibe a absorção de radiação UV-VIS por outros radicais gerados durante o processo, e que poderiam interferir na geração e reação dos radicais hidroxila com a espécie de interesse (Melo *et al.*, 2009). Deve-se, porém controlar a quantidade de carga orgânica acrescentada ao sistema em virtude de que, a existência de outras moléculas orgânicas influencia na oxidação dos compostos de interesse, podendo apresentar efeito negativo na reação.

O controle das condições reacionais é de vital importância para o sucesso da degradação via reação foto-Fenton. Estudos têm demonstrado que o controle da razão entre [H₂O₂]/[Fe⁺²], influencia na velocidade da reação, bem como na natureza dos produtos gerados (Hermosilla *et al.*, 2009; Shemer *et al.*, 2006). A presença de peróxido de hidrogênio em excesso, contribui para maior geração de bolhas gasosas (prejudicando a cinética); em contrapartida íons ferrosos em excesso aumentam significativamente a quantidade de sólidos dissolvidos em suspensão e a condutividade do efluente, causando maior toxicidade aos organismos aquáticos presentes nos mananciais receptores.

A aplicação do processo foto-Fenton para tratamento de efluentes hospitalares e de fármacos é discutida em trabalhos realizados por Kajitvichyanukul *et al* (2006) e Gonzáles *et al* (2007). Esses estudos demonstraram a possibilidade de utilizar o processo Fenton irradiado para pré e pós-tratamento de resíduos contendo fármacos, apresentando resultados significativos como a redução da toxicidade, aumento da biodegradabilidade, e redução da carga orgânica total. Shemer *et al* (2006) analisaram a influência das condições de trabalho no processo de degradação do metronidazol, encontrando relação entre as concentrações de íons ferrosos e a quantidade de peróxido de hidrogênio usado e a velocidade de degradação. Esse trabalho também demonstrou que na reação foto-Fenton houve uma eficiência de 20% na remoção do fármaco, quando comparado com o processo Fenton sem luz.

3.2.4. Processo tipo Fenton

Nas reações Fenton, chamadas de clássicas, empregam-se sais ferrosos como catalisadores na decomposição do peróxido de hidrogênio; quando Fe^{+2} é substituído por Fe^{+3} , a reação com peróxido de hidrogênio é referida como tipo-Fenton ou Fenton heterogênea. A reação tipo Fenton, em presença de Fe^{+3} , poder ser sumarizada, conforme Eq.3.14 a 3.18 (Yang *et al*, 2009).



Os processos de tratamento Fenton usando ferro metálico são também chamados de tipo Fenton ou Fenton heterogêneo; nessas reações, o agente oxidante é o peróxido de hidrogênio que promove a formação de íons ferrosos a partir de ferro metálico, iniciando um processo de decomposição dos contaminantes, predominantemente por oxidação.

3.2.5. Tratamentos redutivos baseados no emprego de Fe^0

O uso de Fe^0 em tratamento de águas contaminadas é descrito na literatura (Freire *et al*, 2005). O uso de ferro metálico aparece como alternativa de tratamento de efluentes, pois esse é de fácil remoção do meio reacional, baixo custo e facilidade de obtenção. As reações mediadas pelo ferro elementar estão baseadas na sua elevada capacidade redutora, conforme Eq. 3.19. Neste sistema, o ferro zero-valente reduz substratos orgânicos por transferência de 2 elétrons, produzindo íons ferrosos.



Nas reações usando Fe^0 , em meio ácido e presença de oxigênio, aparecem as condições favoráveis à formação de peróxido de hidrogênio (Roy *et al*, 2003). Um possível esquema das vias reacionais com uso de ferro elementar aparece na Fig 3.3.

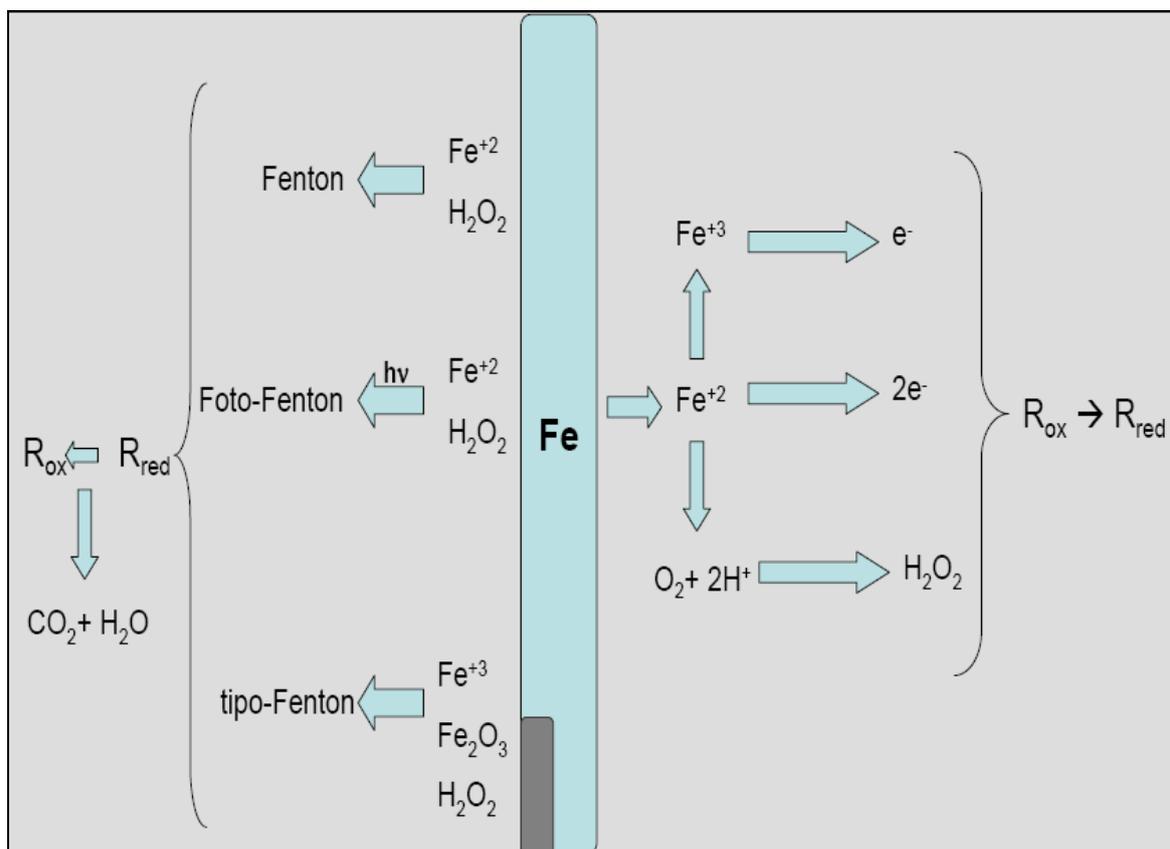


Figura 3.3. Representação das possíveis vias reacionais viabilizadas pelo uso de ferro metálico.

Adaptado de Cavalotti *et al* (2009).

Na medida em que surge o agente oxidante no meio reacional, têm-se diferentes possibilidades de degradação; pois a presença do H₂O₂ e dos íons ferrosos, gera radicais hidroxila e inicia o processo oxidativo. Nestas reações, a degradação dos contaminantes, geralmente, inicia com a via redutiva e subsequentemente os subprodutos da redução podem ser degradados pelas reações Fenton, foto-Fenton, tipo Fenton (Cavalotti *et al*, 2009).

3.3. Toxicidade e ecotoxicidade em ambientes aquáticos

A complexa composição dos efluentes trouxe a necessidade de maiores conhecimentos sobre os efeitos tóxicos dos contaminantes sobre os organismos da biota aquática. Ensaio de toxicidade são exames laboratoriais, realizados sob condições específicas e controlados, para estipular o efeito deletério de uma substância ou efluente sobre organismos vivos, podendo ser feito desde os níveis tróficos inferiores até em mamíferos.

A ecotoxicologia é um ramo do estudo da toxicologia onde são avaliados os efeitos físicos, químicos e biológicos nocivos sobre organismos em dado ecossistema. A ecotoxicologia aquática tem como objetivo avaliar, especificamente, os ecossistemas aquáticos, tais como rios, lagos, mares, entre outros. Nesses ambientes, a avaliação de toxicidade deve levar em consideração a existência de vários micro-ecossistemas dentro do corpo aquoso, sendo um meio extremamente dinâmico e influenciado por fatores bióticos e abióticos.

Os contaminantes sofrem ações de decomposição em águas, sendo a hidrólise a mais importante. Além desta os compostos sofrem: dissolução, fotólise, complexação e biodegradação. Esses processos são importantes, pois determinam a persistência e/ou a degradação dos poluentes (Costa *et al*, 2008). A avaliação ecotoxicológica tornou-se uma importante ferramenta na análise da qualidade dos efluentes, e através dessa é possível verificar se ocorre ou não redução dos efeitos tóxicos de um efluente após determinado tratamento (Jorgensen *et al*, 2000).

Na literatura, a avaliação da toxicidade e da ecotoxicidade dos fármacos é baseada em ensaios padrão, de acordo com o estabelecido pelas normas e

protocolos (U.S. EPA, ISO, ABNT, CETESB). No Brasil, conforme o capítulo IV da Resolução nº 357 de 2005 do CONAMA, e também em cumprimento a Resolução nº 129 de 2006 do CONSEMA/RS, é estabelecido que os efluentes não podem causar ou ter potencial para causar efeitos tóxicos nos organismos aquáticos e que os critérios de toxicidade devem se basear em resultados de ensaios ecotoxicológicos padronizados. Nestes ensaios, trabalha-se com organismos aquáticos invertebrados, tais como, algas, zooplâncton e também com vertebrados como os peixes. É recomendável que os efeitos tóxicos dos efluentes sejam analisados para vários tipos de espécies, procurando trabalhar com diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar. Os ensaios de toxicidade se dividem em aguda (tempos de 24 a 96 horas) e crônica (onde o estudo abrange parte do ciclo de vida do organismo-ensaio) (Costa *et al*, 2008).

Nos ensaios crônicos, pode-se conhecer o efeito do composto sobre outros processos biológicos, tais como: reprodução, crescimento, entre outros. O Quadro 3.1 traz os principais conceitos usados nos ensaios de toxicidade.

Quadro 3.1 Termos comuns usados em ensaios de toxicidade.

Parâmetro	Definição	Tempo de exposição
CE₅₀	Concentração efetiva média-concentração da amostra que causa efeito agudo em 50% dos organismos-ensaio	24 a 48 horas
CL₅₀	Concentração letal média: concentração que causa morte de 50% dos organismos-ensaio	24 a 96 horas
CEO	Concentração de efeito observado: menor concentração que causa efeito deletério, relevante estatisticamente	7 dias
CENO	Concentração de efeito não-observado: maior concentração do agente que não causa efeito deletério, relevante estatisticamente	7 dias

Fonte: (Costa *et al*, 2008)

3.3.1. Organismos-teste

Na avaliação do potencial ecotóxico os ensaios mais empregados e documentados são os de toxicidade aguda. Vários organismos podem ser usados nestes ensaios, sendo os mais comuns as algas e os microcrustáceos. As algas são extensivamente usadas, pois são os produtores primários nos ecossistemas, apresentam ciclo de vida curto e alta sensibilidade as condições do ambiente; as mais usadas são *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus subspicatus* e *Selenastrum capricornutum* (modificado para *Pseudokirchneriella subcapitata*). Bactérias também são usadas, tais como a *Vibrio fischeri*, um organismo marinho que têm a medida de sua luminescência acompanhada como forma de determinar o efeito tóxico sobre a mesma (Boluda *et al*, 2002). Os peixes representam os consumidores secundários e a toxicidade aguda é analisada pela taxa de mortalidade, sendo os mais comuns no Brasil, os ensaios com *Danio rerio* (peixe zebra) e o *Pimephales promelas*.

Nos estudos com crustáceos, é analisada a imobilidade do organismo como indicador da toxicidade aguda do meio; em virtude do reduzido tamanho desses organismos, fator que dificulta a avaliação da taxa de mortalidade. O crustáceo *Artemia salina* é empregado nos ensaios com amostras de elevada salinidade, pois esse fator é limitante para o uso de espécies de água doce. Atualmente o organismo mais testado é do gênero *Daphnia*, um microcrustáceo amplamente disperso nos ambientes aquáticos, que apresenta papel importante da cadeia alimentar e elevada sensibilidade a muitos contaminantes (Buratini *et al*, 2004).

Esses organismos apresentam diferentes espécies, *D. pulicaria*, *D. pulex*, *D. magna* e *D. similis*, que são usadas em ensaios de toxicidade aguda e crônica. *Daphnia magna* e *similis*, embora não sendo nativas no país, são empregadas devido ao fácil cultivo e manejo; bem como pela existência de normas padronizadas para os ensaios de toxicidade aguda NBR 12.713 (ABNT, 2004).

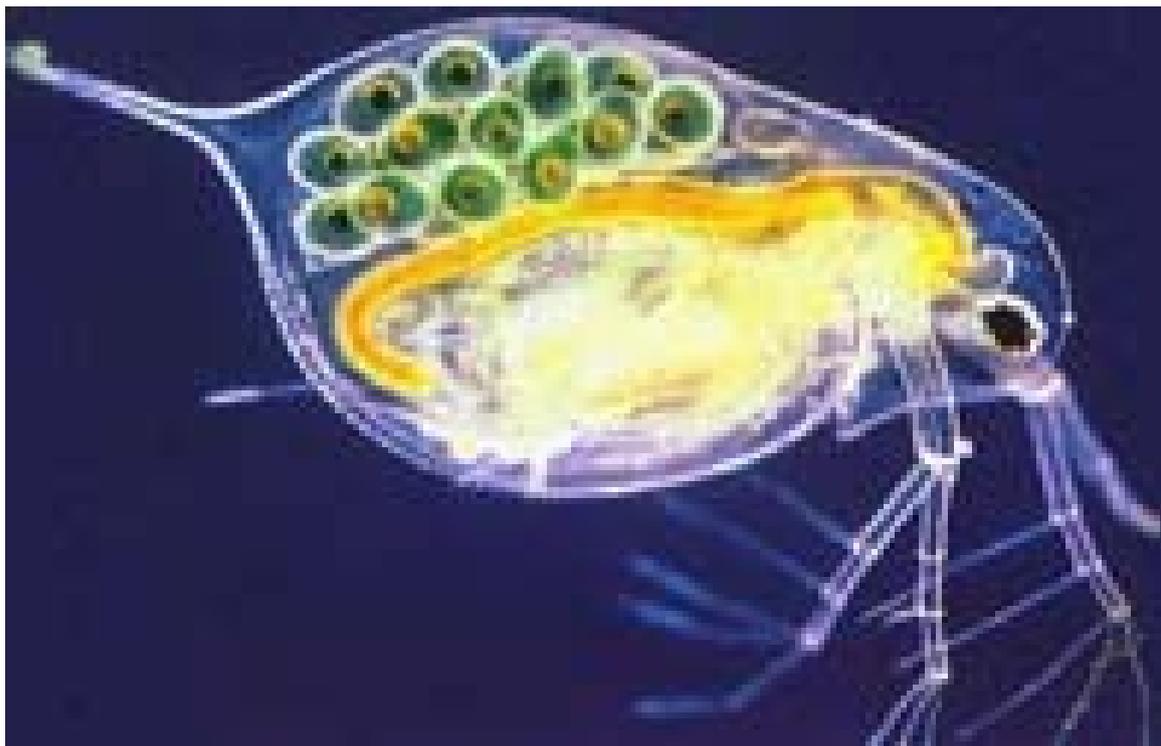


Figura 3.4. Aspecto ilustrativo de *Daphnia similis*.

fonte: www.ipen.br

Daphnia similis, popularmente conhecida como pulga d'água, é um microcrustáceo encontrado em lagos, medindo entre 0,5 e 5,0 mm, apresentada na Fig.3.2. Esses organismos possuem um curto ciclo de vida, reprodução assexuada, e se movimentam por meio de nadadeiras laterais.

3.4. Toxicidade e ecotoxicidade do metronidazol e subprodutos

O uso dos compostos nitroimidazóis representa um grande avanço no tratamento de várias enfermidades; porém um aspecto gera preocupações dentro da área ambiental. Vanelle *et al* (2009) relatam o surgimento de espécimens de *Trichomonas vaginalis* resistentes ao tratamento com metronidazol. Esse fato demonstra que grandes doses desse fármaco devem ser usadas para que o efeito terapêutico seja mantido; e assim, acarreta um grande aporte dessa substância e dos seus metabólitos para o meio ambiente.

Estudos sobre a toxicidade dos nitroimidazóis são feitos há bastante tempo, no entanto, a grande dificuldade nesses processos é a separação das

propriedades mutagênicas/carcinogênicas do próprio efeito do fármaco que reside na capacidade de causar danos à molécula de DNA das bactérias. O mecanismo de ação do metronidazol segue uma rota metabólica que pode também expressar mutagenicidade. Três rotas aparecem como as prováveis causadoras da mutagenicidade/carcinogenicidade: biotransformação aeróbia, ativação bacteriana e o mecanismo de ação nos seres humanos, a nitroredução (Bendesky *et al*, 2002).

Estudos têm demonstrado que os derivados hidroxilados do metronidazol são até dez vezes mais tóxicos no ensaio de Ames com *Salmonella typhimjrium*, quando comparados ao próprio fármaco. Menéndez *et al* (2001) demonstraram que nove entre dez pacientes tratados com metronidazol, apresentaram danos em suas moléculas de DNA, um dia após o final do tratamento, levando um tempo de até 15 dias para recuperar totalmente a estrutura genética. Metronidazol é extensivamente distribuído pelo corpo, e pode ser encontrado em tecidos placentários e excretado no leite materno (Passmore *et al*, 1988).

Mudry *et al* (2007) estudaram a capacidade de o metronidazol induzir mutações em espermatozoides de camundongos, demonstrando que este composto pode afetar a morfologia, mobilidade e capacidade fertilizadora das células reprodutoras de machos. De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, o metronidazol apresenta evidências suficientes para ser considerado carcinogênico em animais, porém insuficientes para garantir sua ação carcinogênica em humanos. Estudos sobre os efeitos da capacidade mutagênica do fármaco e seus subprodutos em humanos têm apresentado resultados contraditórios, sendo uma questão importante em virtude do extenso uso desse medicamento.

A avaliação da ecotoxicidade crônica e aguda do metronidazol sobre *Daphnia magna* foi relatada por Wollenberger *et al* (2000). Neste estudo, o composto não apresentou toxicidade crônica sobre os organismos até a concentração de 250,0 mg.L⁻¹ e aguda até 1000,0 mg.L⁻¹. Por outro lado, dados de literatura demonstram o caráter de persistência do metronidazol em soluções aquosas, mesmo após tratamentos oxidativos avançados; salientando que, muitas vezes, os subprodutos da degradação do fármaco são mais tóxicos que o composto original (Sánchez-Pólo *et al*, 2009).

Dantas *et al* (2009) avaliaram a toxicidade de soluções de metronidazol com concentração inicial de 100 mg.L^{-1} antes e após tratamento de fotólise com radiação UVC sobre o crescimento de raízes de *Allium*. Os autores demonstraram que o IC_{50} dos subprodutos ($86,7 \text{ mg.L}^{-1}$) foi inferior ao IC_{50} ($102,5 \text{ mg.L}^{-1}$) da solução de partida do composto, reforçando que, na maioria dos casos, os compostos gerados pela decomposição do metronidazol podem ser mais tóxicos que o próprio fármaco.

A principal parte do metronidazol ingerido é excretado pela urina, sendo que o uma parte pode ser excretado de forma inalterada (Halling-Sorensen, 1997). Estes autores testaram a toxicidade aguda do fármaco em espécies de algas e peixes, marinhos e de águas doces, demonstrando que o composto apresenta CE_{50} (72 horas) igual a $12,5 \text{ mg.L}^{-1}$ para algas verdes *Chlorella sp.*, e CE_{50} (72 horas) igual a $39,1 \text{ mg.L}^{-1}$ para *Selenastrum capricronutum*, alga verde de águas doces. Não foi relatada toxicidade aguda para os peixes testados até a faixa de 500 mg.L^{-1} .

Estes dados demonstram que a presença do fármaco no ambiente pode afetar o ecossistema de forma indireta; diminuindo a disponibilidade de algas no ambiente, afetando toda a cadeia alimentar, esse fato demonstra a importância do desenvolvimento de técnica para tratamentos de efluentes contendo essa molécula.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia se baseou na adaptação de dados de literatura, utilizando os processos Fenton e foto-Fenton para o tratamento de soluções contendo o fármaco metronidazol (Shemer *et al*, 2006). No estudo dessas reações, outras ferramentas foram analisadas, como o uso de outras fontes de ferro para reações Fenton, e também o uso de ferro zero como ferramenta de redução da matéria orgânica. Nesse sentido, seguiram-se ensaios de toxicidade realizados, conforme protocolos de análise, como forma de avaliar a eficiência do tratamento das soluções em estudo para as diversas reações empregadas.

4.1. Reagentes e Materiais

- Ácido Sulfúrico p.a.(Merck);
- Peróxido de Hidrogênio 30% p.a. (Merck);
- Sulfato Ferroso heptahidratado p.a. (Merck);
- Ácido fosfórico p.a.(Merck);
- Carbonato de sódio p.a (Merck)
- Cloreto férrico p.a. (Merck);
- Hidróxido de Sódio p.a. (Merck);
- Acetonitrila grau HPLC (J.T Backer);
- Água Ultrapura (Milli-Q Plus, Millipore; $< 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$);
- Princípio ativo do fármaco metronidazol-base (*Delaware*);
- Palha de aço fina comercial nº0 (Bombril);
- Cubetas de quartzo com 10 mm de caminho ótico (*Hellma*)

4.2. Processos de Tratamento

Os ensaios Fenton homogêneo e heterogêneo foram realizados em 100 mL de soluções aquosas $6,02 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($10,31 \text{ mg L}^{-1}$) em metronidazol, em reatores abertos de vidro (250 mL), sob agitação magnética constante. Para o processo Fenton as amostras foram tratadas com solução aquosa de $1 \times 10^{-2} \text{ mol}$

L^{-1} em Fe^{+2} , e solução de H_2O_2 na mesma concentração da solução ferrosa. A solução estoque de íons ferrosos foi de 0,25 M em Fe^{+2} em meio ácido (H_2SO_4 0,4M), a partir dessa, por diluição em água ultrapura, preparou-se a solução de trabalho descrita acima. A solução de trabalho de H_2O_2 foi preparada pela diluição direta do reagente concentrado em água ultrapura. As soluções aquosas foram preparadas imediatamente antes das reações como forma de evitar a degradação do peróxido e a precipitação de Fe^{+3} na solução aquosa. No processo Fenton heterogêneo foram utilizadas condições similares, porém como fonte de íons ferrosos foi usada palha de aço fina comercial. Os testes usando palha de aço foram realizados com base na adaptação de dados de literatura (Pereira e Freire, 2005), onde se falou do uso de Fe sólido para fornecer os íons ferrosos necessários na reação tipo Fenton.

Nas reações baseadas na via redutiva, foi utilizado ferro metálico como agente redutor, em quantidades otimizadas; nas mesmas condições utilizadas nas reações Fenton e tipo Fenton, porém sem o peróxido de hidrogênio. Todas as reações ocorreram em temperatura de 20 ± 2 °C. As soluções tiveram pH ajustado a $3,5 \pm 0,2$ com H_2SO_4 0,4 M e NaOH 0,4 M. O tempo total das reações Fenton e tipo Fenton foi de 30 minutos; para as vias redutivas foram empregados tempos reacionais de até 360 minutos, como forma de acompanhar a degradação do metronidazol.

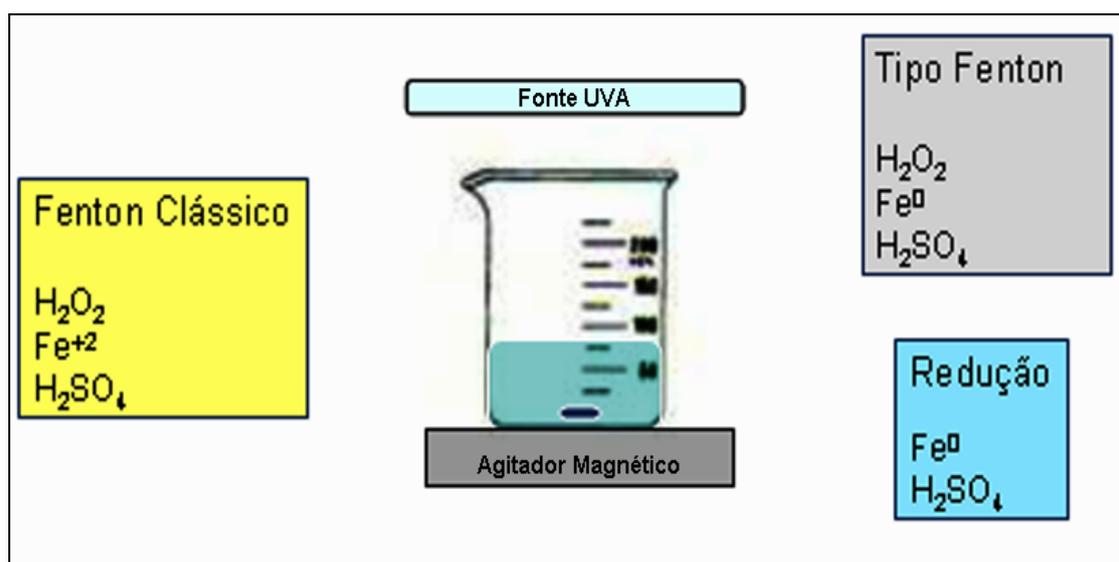


Figura 4.1. Esquema da montagem do reator para os processos de tratamento. Para as reações foto foi utilizada fonte UVA.

Nos processos conduzidos sob radiação UV, foram utilizadas 3 lâmpadas Philips R-UVA, com potência total de 180W e radiância de 77,3 W/m² a 20 cm da fonte. Nas reações sob radiação ultravioleta, teve-se o cuidado de desligar o sistema de lâmpadas, antes de manusear o reator sob a mesma. Salienta-se que a radiação UV causa queimaduras graves, além de apresentar potencial cancerígeno.

4.2.1. Preparo da solução-estoque de metronidazol

Para o preparo da solução de metronidazol foi utilizado o princípio ativo, comercialmente disponível pela empresa *Delaware*, com as seguintes especificações:

Quadro 4.1 Reagente metronidazol usado para preparo da solução-estoque

Fórmula Empírica	Peso Molecular (g mol ⁻¹)	$\lambda_{\text{máximo}}$ (nm)	Pureza (%)
C ₆ H ₉ N ₃ O ₃	171,20	320	99,58

Para a realização dos testes, pesou-se 0,107 g (massa já calculada em relação à pureza do reagente) e diluiu-se com água ultrapura em balão volumétrico de 500 mL, obtendo-se uma solução de concentração 1,24 x 10⁻³ mol L⁻¹. A solução de trabalho foi preparada, por diluição com água ultrapura da solução estoque, até concentração de 6,02 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ (10,31 mg L⁻¹).

4.2.2. Avaliação espectrofotométrica do fármaco para diferentes pHs

Na análise do espectro do fármaco em meio natural, ácido e alcalino foram utilizadas 100 mL de soluções aquosas de metronidazol na concentração de 10,31 mg L⁻¹. Para verificar o espectro em pH natural(em torno de 6,0), a solução foi preparada e não sofreu nenhum tipo de tratamento antes da leitura em

espectrofotometria UV-VIS. Para as análises em pH ácido e básico, as soluções foram tratadas com ácido (H_2SO_4 0,4 M) ou base (NaOH 0,4 M) até pH de $3,5 \pm 0,2$ e $10,0 \pm 0,2$. Como controle no meio básico foi usada solução aquosa, onde se adicionou base NaOH 0,4 M até pH de $10,0 \pm 0,2$.

4.2.3. Avaliação espectrofotométrica do meio reacional Fenton

Para avaliar o espectro do meio reacional Fenton foram preparadas quatro soluções aquosas contendo separadamente: Fe^{+2} , H_2O_2 , $\text{Fe}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ e Fe^{+3} . O volume de água ultrapura utilizado foi de 100 mL e o pH ajustado em $3,5 \pm 0,2$. Conforme descrito:

Solução 1: $6,70 \text{ mg L}^{-1}$ em Fe^{+2} .

Solução 2: $10,20 \text{ mg L}^{-1}$ em H_2O_2 .

Solução 3: $6,70 \text{ mg L}^{-1}$ em Fe^{+2} ($1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em FeSO_4), e $10,20 \text{ mg L}^{-1}$ em H_2O_2 ($3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2O_2).

Solução 4: $6,70 \text{ mg L}^{-1}$ em Fe^{+3} ($1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em FeCl_3)

4.2.4. Peroxidação e foto-peroxidação do fármaco

Para testar a reação entre o metronidazol e peróxido de hidrogênio, foram feitas soluções contendo 100 mL do fármaco na concentração de $10,31 \text{ mg L}^{-1}$, acidificadas com H_2SO_4 0,4 M, até pH de $3,5 \pm 0,2$. O estudo foi feito usando três faixas de concentração de agente oxidante como forma de avaliar o comportamento da reação para as seguintes relações molares de H_2O_2 :metronidazol (1:1, 25:1 e 100:1). Trabalhou-se com as seguintes concentrações de peróxido: $10,20 \text{ mg L}^{-1}$, 255 mg L^{-1} , 1031 mg L^{-1} , baseado em uma adaptação dos tratamentos propostos por Shemer *et al* (2006). Os espectros, em meio ácido, dessas soluções foram analisados antes das reações para

verificar o comportamento dos mesmos quando isolados do fármaco. As reações de peroxidação foram estudadas sob luz UV e ao abrigo de luz.

O perfil da degradação do metronidazol atribuído apenas à fotólise também foi estudado. A solução de trabalho foi submetida à reação de degradação sob luz UVA durante 60 minutos e o perfil do espectro acompanhado.

4.2.5. Reações Fenton e Foto-Fenton clássicas

Soluções contendo 100 mL de solução do fármaco na concentração de $10,31 \text{ mg L}^{-1}$, foram acidificadas com H_2SO_4 0,4 M até pH de $3,5 \pm 0,2$; em seguida adicionou-se $6,70 \text{ mg L}^{-1}$ em Fe^{+2} e $10,20 \text{ mg L}^{-1}$ em H_2O_2 .

4.2.6. Reações tipo Fenton, e tipo foto-Fenton

Solução 1: 100 mL de solução do fármaco na concentração de $10,31 \text{ mg L}^{-1}$ foi acidificada até pH de $3,5 \pm 0,2$; em seguida adicionou-se $2,8 \text{ mg}$ em Fe^0 e $10,20 \text{ mg L}^{-1}$ em H_2O_2 .

Solução 2: 100 mL de solução do fármaco na concentração de $10,31 \text{ mg L}^{-1}$ foi acidificada até pH de $3,5 \pm 0,2$; em seguida adicionou-se $2,8 \text{ mg}$ em Fe^0 e $5,10 \text{ mg L}^{-1}$ em H_2O_2 .

Solução 3: 100 mL de solução do fármaco na concentração de $10,31 \text{ mg L}^{-1}$ foi acidificada até pH de $3,5 \pm 0,2$; em seguida adicionou-se $2,8 \text{ mg}$ em Fe^0 e $20,40 \text{ mg L}^{-1}$ em H_2O_2 .

Solução 4: 100 mL de solução do fármaco na concentração de $10,31 \text{ mg L}^{-1}$ foi acidificada até pH de $3,5 \pm 0,2$; em seguida adicionou-se $1,4 \text{ mg}$ em Fe^0 e $10,20 \text{ mg L}^{-1}$ em H_2O_2 .

Solução 5: 100 mL de solução do fármaco na concentração de $10,31 \text{ mg L}^{-1}$ foi acidificada até pH de $3,5 \pm 0,2$; em seguida adicionou-se $5,6 \text{ mg}$ em Fe^0 e $10,20 \text{ mg L}^{-1}$ em H_2O_2 .

4.2.7. Reação entre o fármaco e Fe⁰ e Fe⁺²

Para avaliar a decomposição do metronidazol, usando o processo de redução em presença de ferro, foram preparadas soluções contendo diferentes teores de ferro. Soluções aquosas contendo 100 mL de solução do fármaco na concentração de 10,31 mg L⁻¹, foram acidificadas até pH de 3,5±0,2; em seguida adicionou-se 2,8 mg em Fe⁰, sendo que essa amostra sintética foi avaliada para três diferentes tempos de reação 30, 180 e 360 minutos.

Para a reação usando Fe⁺², foram feitas as mesmas soluções de partida, porém, trabalhou-se com duas faixas de concentração de íons ferrosos 6,70 e 13,40 mg L⁻¹; sendo que a degradação foi avaliada nos tempos de 30 e 180 minutos, respectivamente. Nessas reações, também foi avaliada a influência da radiação UVA, assim as reações foram conduzidas ao abrigo da luz e na presença de irradiação.

4.3. Métodos Analíticos

4.3.1. Espectrofotometria de ultravioleta-visível

O desenvolvimento experimental consistiu na adaptação proposta de Shemer *et al* (2006). O presente estudo buscou acompanhar a degradação do fármaco metronidazol usando a técnica de espectrofotometria de absorção no UV-VIS, nos Laboratórios de Faculdade de Química da PUCRS usando equipamento espectrofotômetro *Hewlett Packard-HP* 8453, caminho óptico de 10 mm, varredura em comprimentos de onda de 190 a 1100 nm. As análises foram realizadas a 20 ± 2 °C.

4.3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência

As amostras analisadas por CLAE, foram injetadas após 30 minutos de reação Fenton e tipo Fenton; para os processos redutivos o tempo total de

reação antes da análise foi de até 360 minutos, como forma determinar os teores residuais do fármaco, bem como o surgimento de subprodutos de decomposição.

As análises em equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência para determinar a degradação do metronidazol foram realizadas no Laboratório Nacional Agropecuário-LANAGRO. Utilizou-se cromatógrafo líquido (*Shimadzu*) com detecção por UV-DAD e coluna *Symmetry C18* (3.5 μm), 150 x 2,10 mm. Nas análises por CLAE, trabalhou-se com sistema de eluição por gradiente com fase móvel de água(A): acetonitrila(B):tampão fosfato 50 mM, pH de 2,5(C), com a seguinte programação: 0-10 minutos: 5 %B: 20%C; 10-15 minutos: 5-30%B: 20%C; 15-16 minutos: 30-5%B: 20%C; 16-20 minutos: 5%B: 20%C.

Foi adotado um fluxo de 0,15 mL min⁻¹, com volume de injeção de 5 μL , com tempo total de análise de 20 minutos, cada ponto da curva foi injetado em triplicata. A Fig 4.2 apresenta a curva de calibração do método, com tempo de retenção do metronidazol em aproximadamente 9 minutos, e detecção em 317 nm; também foram realizadas análises utilizando o sistema de detecção DAD, em iguais condições analíticas.

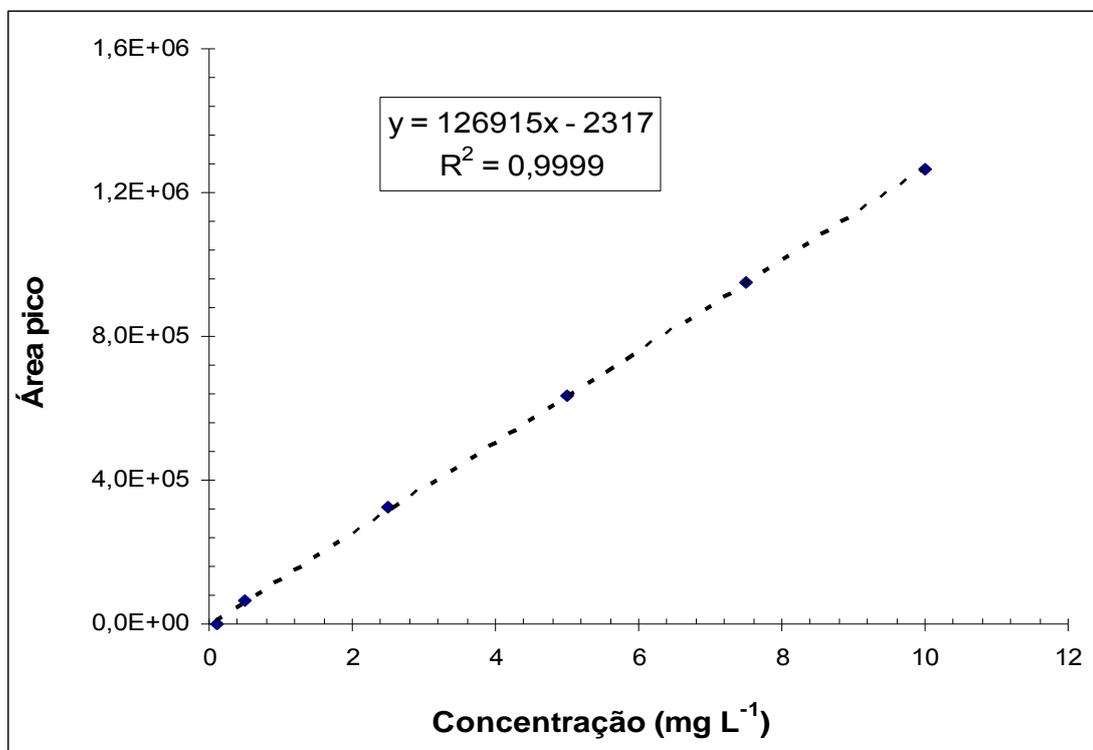


Figura 4.2: Curva analítica para o fármaco metronidazol em meio natural, pH 6,0, faixa de calibração de 0,1 a 10 mg L⁻¹, CLAE em 317 nm

4.3.3. Espectrometria de absorção atômica-FAAS

Os teores de ferro total presentes nas amostras pós-reação foram determinados por espectrometria de absorção atômica com atomização por chama - FAAS (VARIAN) na Faculdade de Química da PUCRS. As análises foram conduzidas com as seguintes condições operacionais: corrente de 5 mA, chama ar:acetileno, fenda de 0,2 nm e comprimento de onda de 248.3 nm.

A curva de trabalho usada foi preparada por diluição do padrão 1000,0 mg L⁻¹ de Fe⁺², em HCl 0,25 M. As diluições da solução estoque foram feitas também em HCl 0,25 M para o preparo dos padrões. A faixa de calibração foi de 0,5 a 10,0 mg L⁻¹. A Fig 4.3 traz a curva de trabalho usada nas quantificações de ferro total nas amostras sintéticas, cada ponto da curva foi injetado em triplicata.

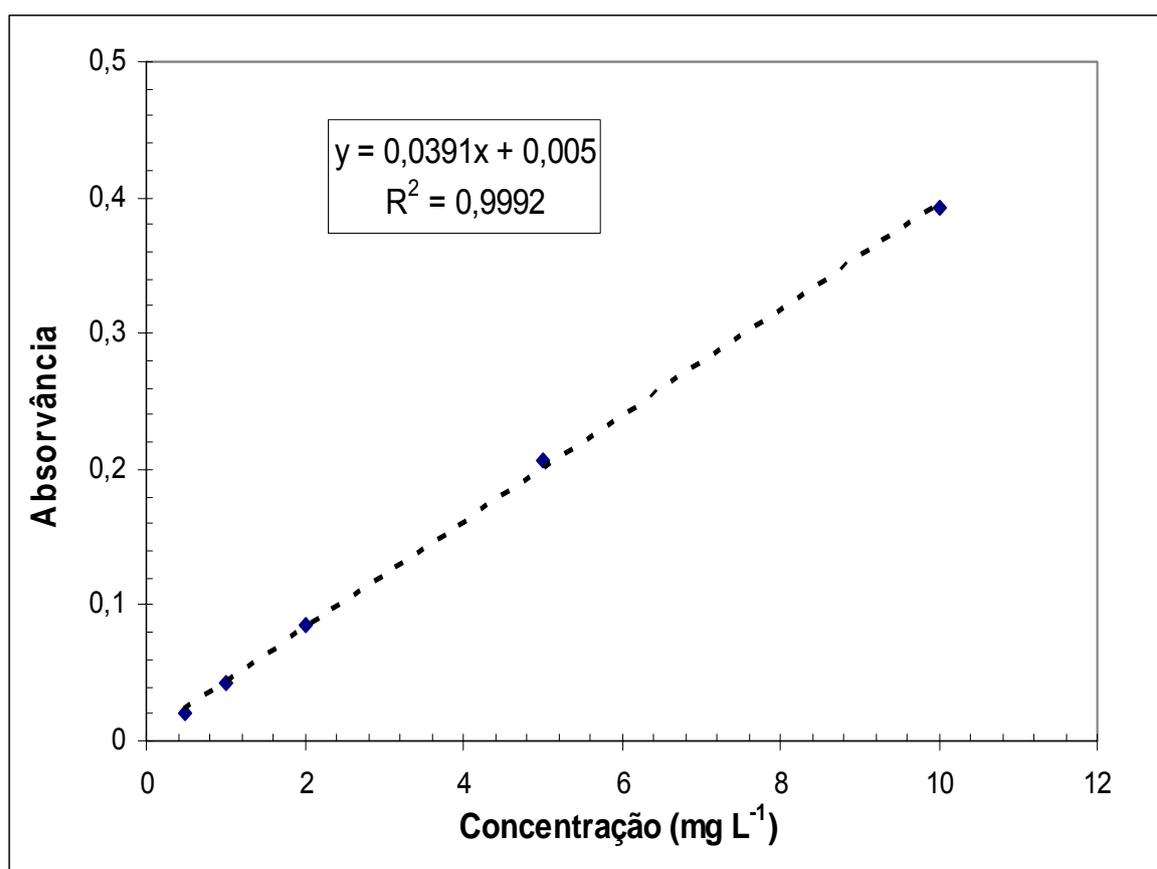


Figura 4.3: Curva analítica para determinação de Fe total por FAAS, faixa de concentração de 0,5 a 10 mg L⁻¹.

4.3.4. Cromatografia Iônica

As análises de ânions ocorreram no Laboratório de Química Analítica e Ambiental/PUCRS. Foi usado cromatógrafo Dionex DX500, com detecção por condutividade elétrica ED40 e supressão química com H₂SO₄ 50 mM. Uma coluna IonPac AS9-HC(Dionex, 250 x 4 mm), foi utilizada com sistema de eluição isocrático e Na₂CO₃ 9mM como eluente, fluxo de 1 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 25 µL. As curvas de calibração foram preparadas por diluição dos padrões 1000 mg L⁻¹ dos íons. A faixa de calibração para oxalato, formiato, acetato, fluoreto e nitrito foi de 0,5 a 10 mg L⁻¹; para os íons nitrato na faixa de 2,5 a 50 mg L⁻¹; fosfato de 0,25 a 5 mg L⁻¹, brometo de 1,25 a 25 mg L⁻¹ e sulfato de 6,3 a 12,5 mg L⁻¹. Para todos os íons as curvas analíticas foram satisfatórias com R₂ >0,99.

4.4. Ecotoxicidade do metronidazol e dos subprodutos

No processo Fenton e Foto-Fenton (Shemer *et al*, 2006), a degradação do fármaco é rápida, com tempo de degradação total de menos de cinco minutos. Os subprodutos da degradação oxidativa e/ou redutiva deste composto, ainda são desconhecidos; assim a toxicidade dos mesmos foi avaliada. Os ensaios foram feitos em parceria com o Laboratório de Ecotoxicologia da UFRGS.

Os estudos com *Daphnia similis*, foram realizados conforme Norma NBR 12.713 (ABNT, 2004). As amostras foram testadas e se determinou o CE₅₀ em 48 horas, para o fármaco na concentração inicial de 10 mg L⁻¹, para o meio e para os subprodutos das reações foto-Fenton clássica, tipo foto-Fenton, e para o meio e subprodutos das reações de foto-redução usando Fe⁰.

As faixas de diluição testadas para análise de toxicidade foram: 1,56, 3,12, 6,25, 12,5 e 25, 50 e 100% das amostras e do padrão. O único tratamento sofrido pelas amostras após as reações de decomposição do metronidazol foi o ajuste de pH para a faixa entre 7,2 a 7,8, pois em condições extremas de pH os organismos não sobrevivem. Como método estatístico para tratamento dos dados foi empregado o software *Trimmed Spearman Karber* (Hamilton *et al*, 1977).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Estudos preliminares do espectro do metronidazol

Os estudos iniciais buscaram estabelecer o perfil do espectro ultravioleta-visível do fármaco metronidazol (MTZ), em diferentes valores de pH. Os testes, Fig. 5.1 a 5.2, demonstraram que o composto apresenta máxima absorvância em 320 nm e que o espectro se modifica em meios distintos.

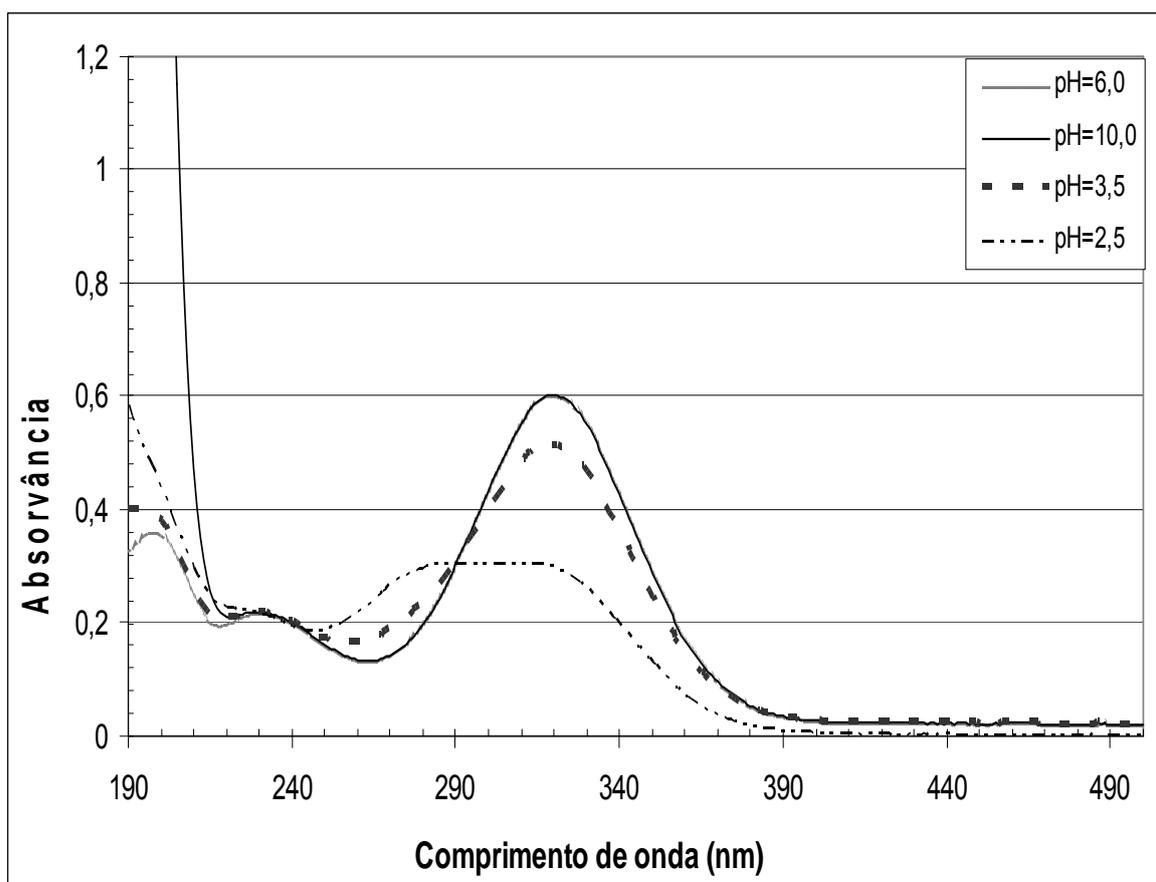


Figura 5.1. Espectros de absorção da solução de metronidazol em concentração de $10,31 \text{ mg L}^{-1}$, em diferentes valores de pH.

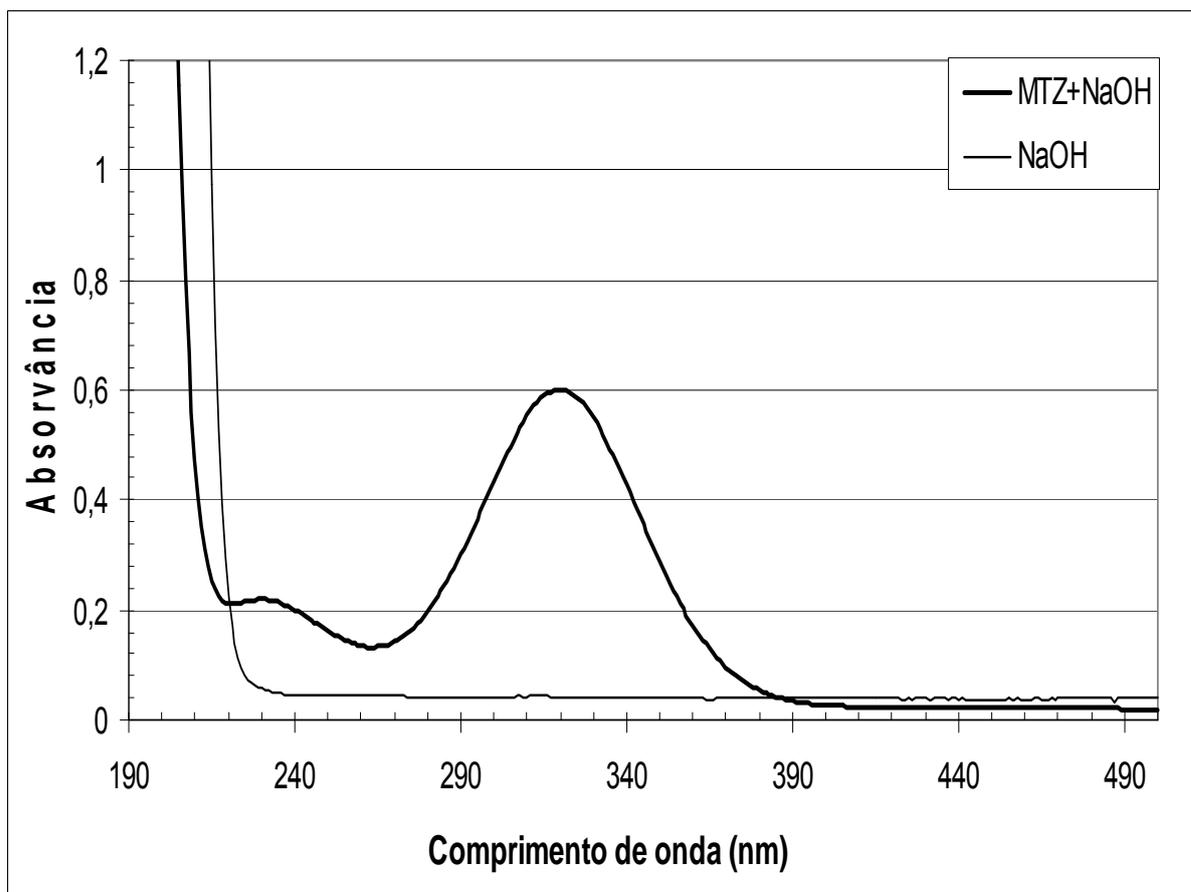


Figura 5.2. Espectros de absorção da solução de metronidazol $10,31 \text{ mg L}^{-1}$ em pH de 10,0 (linha grossa) e da base usada para alcalinizar (linha fina) na concentração de $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

O espectro do composto sofreu uma pequena diminuição da absorvância máxima, quando em pH de 3,5 (usado para as reações de tratamento), se comparado ao espectro do mesmo em meio com pH=6,0; porém, não ocorreu modificação significativa no perfil espectral que é semelhante ao metronidazol em meio natural, próximo a 6,0. Não foram observadas mudanças como o deslocamento do λ máximo, ou aumento da linha base, Fig. 5.1.

Por outro lado, o meio alcalino modificou o perfil do espectro de forma marcante, aumentando o valor da linha base em comprimentos de onda abaixo de 240 nm. Uma análise do espectro da base usada (NaOH) em água, Fig. 5.2, demonstrou a mudança de perfil causada pela presença da base, sendo que essa condição é desfavorável para análise nesta região.

O meio ácido, no qual é realizada a reação Fenton é propício para análise por espectrofotometria UV-VIS, entretanto devido à brusca mudança do espectro no pH de 2,5, Figura 5.1; este deve ser controlado rigorosamente de forma a maximizar a reação, sem comprometer a análise do espectro.

5.1.1. Espectros do meio reacional Fenton

A análise dos espectros dos reagentes usados na reação Fenton, e do perfil resultante da mistura dos mesmos trouxe um dado significativo. A Fig. 5.3 apresenta os espectros de absorvância das soluções utilizadas na reação Fenton. Observou-se que as soluções de peróxido de hidrogênio e de íons ferrosos utilizadas não apresentam absorvâncias significativas na região de 320 nm, quando isoladas. Entretanto, a mistura desses reagentes resultou em um espectro com absorvância em torno 0,25 na região de trabalho.

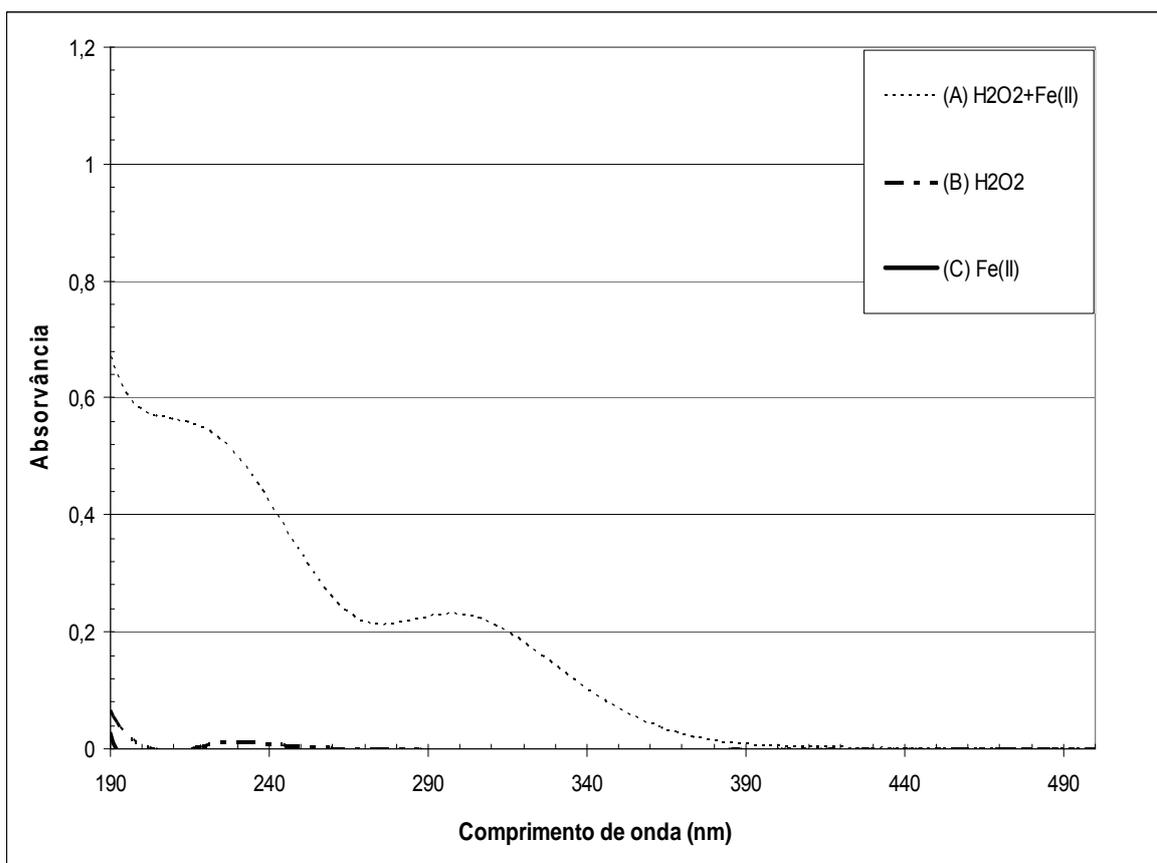


Figura 5.3: Espectros das soluções contendo (A) 10,20 mg L⁻¹ em H₂O₂ e 6,70 mg L⁻¹ em Fe⁺², (B) 10,20 mg L⁻¹ em H₂O₂, (C) 6,70 mg L⁻¹ em Fe⁺², pH de 3,5±0,2.

Para comprovar se a absorvância em 320 nm deve-se, basicamente, ao surgimento de íons férricos no meio, conforme Eq. 5.1, foi analisado o espectro de uma solução de FeCl_3 , com uma concentração Fe^{+3} semelhante às analisadas anteriormente, aproximadamente $6,70 \text{ mg L}^{-1}$.



A Fig.5.4 apresenta os espectros de absorvância do cloreto férrico e da mistura de peróxido de hidrogênio com sulfato ferroso nas mesmas concentrações usadas nos processos Fenton, além dos espectros do HCl e do fármaco.

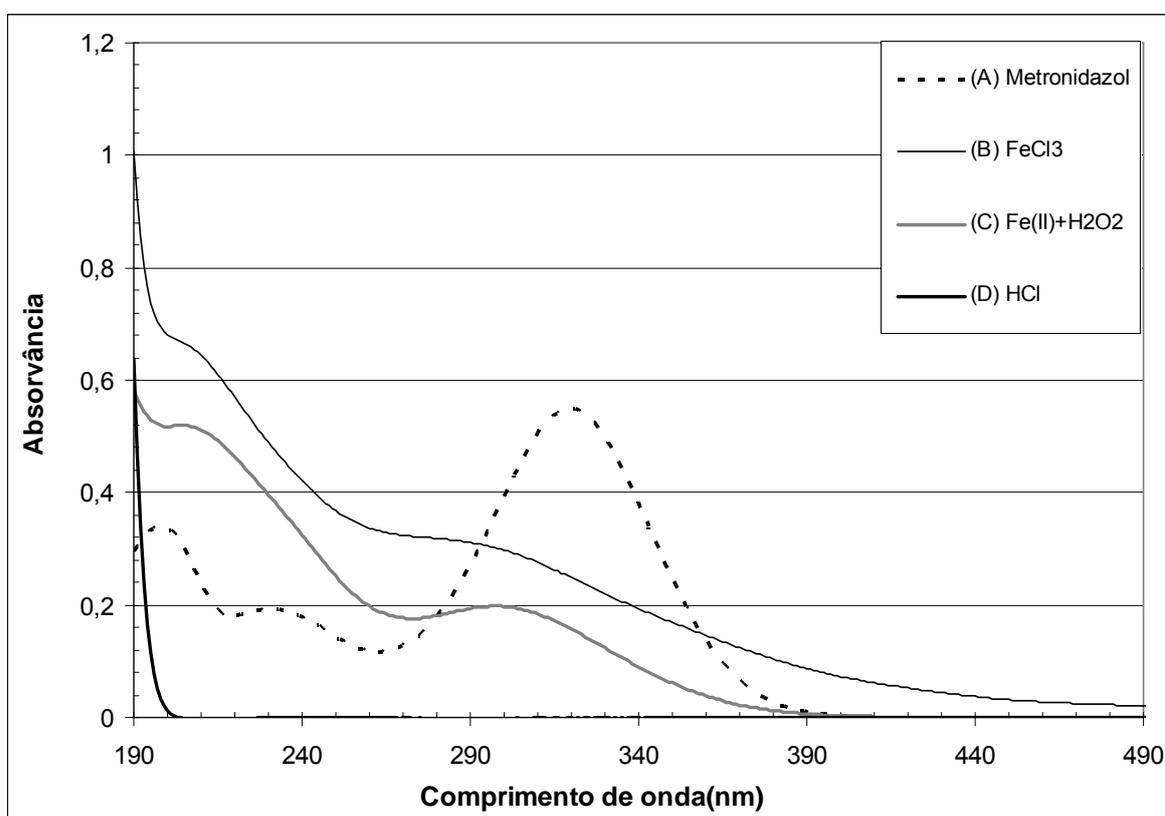


Figura 5.4: Espectros de absorção da solução (A) $10,31 \text{ mg L}^{-1}$ em metronidazol, (B) $6,70 \text{ mg L}^{-1}$ em FeCl_3 , (C) solução $10,20 \text{ mg L}^{-1}$ em H_2O_2 e $6,70 \text{ mg L}^{-1}$ em Fe^{+2} , e (D) $\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

A interpretação da Fig 5.4 revelou que o perfil do espectro da mistura dos reagentes usados na reação Fenton é compatível com solução de cloreto férrico na mesma concentração. O espectro do ácido clorídrico indicou, ainda, que o íon cloreto não absorve na região de trabalho, e, portanto, não causa interferência no

estudo por espectrofotometria de UV-VIS. O uso do cloreto férrico demonstrou ainda que a banda em 320 nm pode ser atribuída aos íons férricos que surgem no meio reacional Fenton. Esses dados demonstram que através de espectroscopia UV-VIS haverá a interferência na banda de trabalho; logo essa técnica, usada isoladamente, é insuficiente para a análise da degradação do metronidazol.

5.2. Estudo das reações de degradação do fármaco

5.2.1. Peroxidação e foto-peroxidação do metronidazol

A reação de decomposição do fármaco utilizando apenas o peróxido de hidrogênio em meio ácido foi estudada, na busca de possíveis caminhos alternativos à reação Fenton para a degradação, e como forma de estabelecer o comportamento do composto mediante um dos reagentes do meio Fenton. A Figura 5.5 traz o perfil espectral da reação de peroxidação.

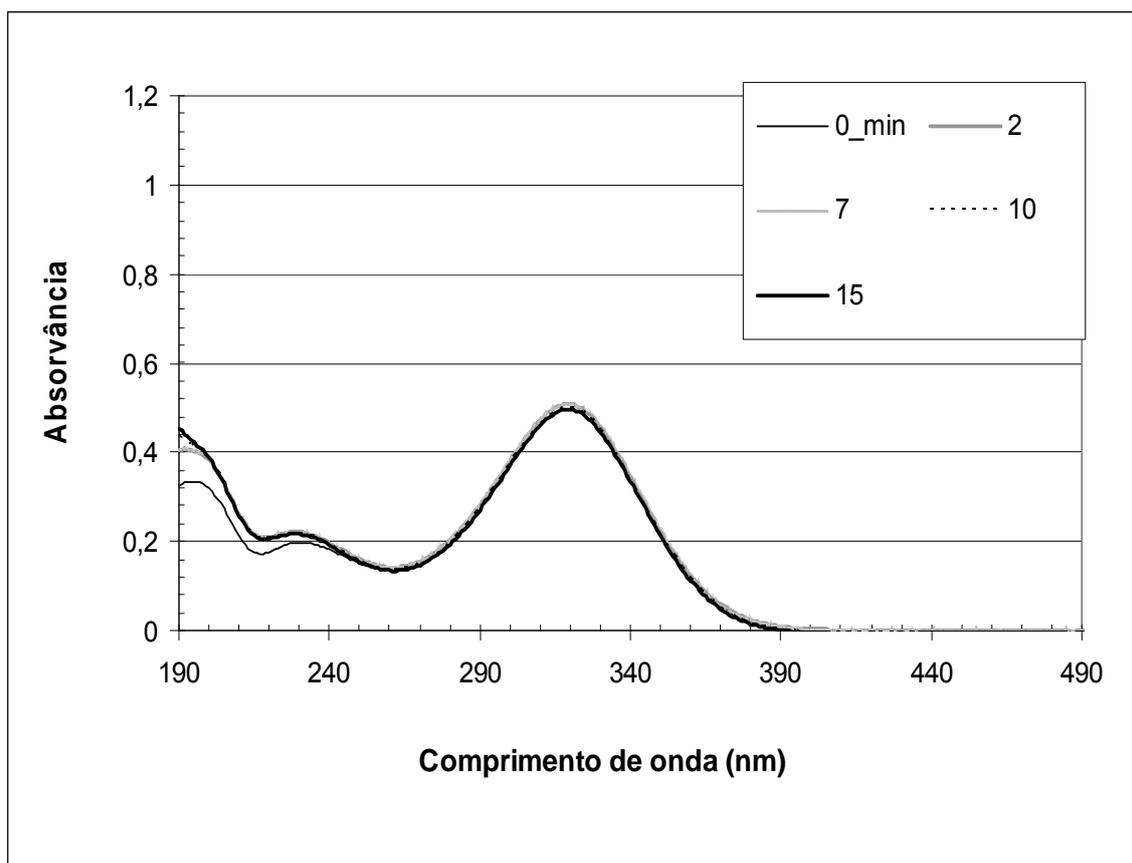


Figura 5.5. Espectros de absorção da solução de metronidazol $10,31 \text{ mg L}^{-1}$ e $10,20 \text{ mg L}^{-1}$ em H_2O_2 , pH de $3,5 \pm 0,2$, em diferentes tempos reacionais para a peroxidação.

A peroxidação em meio ácido do metronidazol foi acompanhada por espectrofotometria UV-VIS, uma vez que, não ocorre interferência na região de estudo. Na análise dos espectros presentes nas Figuras 5.5 e 5.6, percebe-se que a cinética é lenta. Outro fato que pode ser destacado é que a reação sob radiação foi ligeiramente mais rápida que o processo sem irradiação.

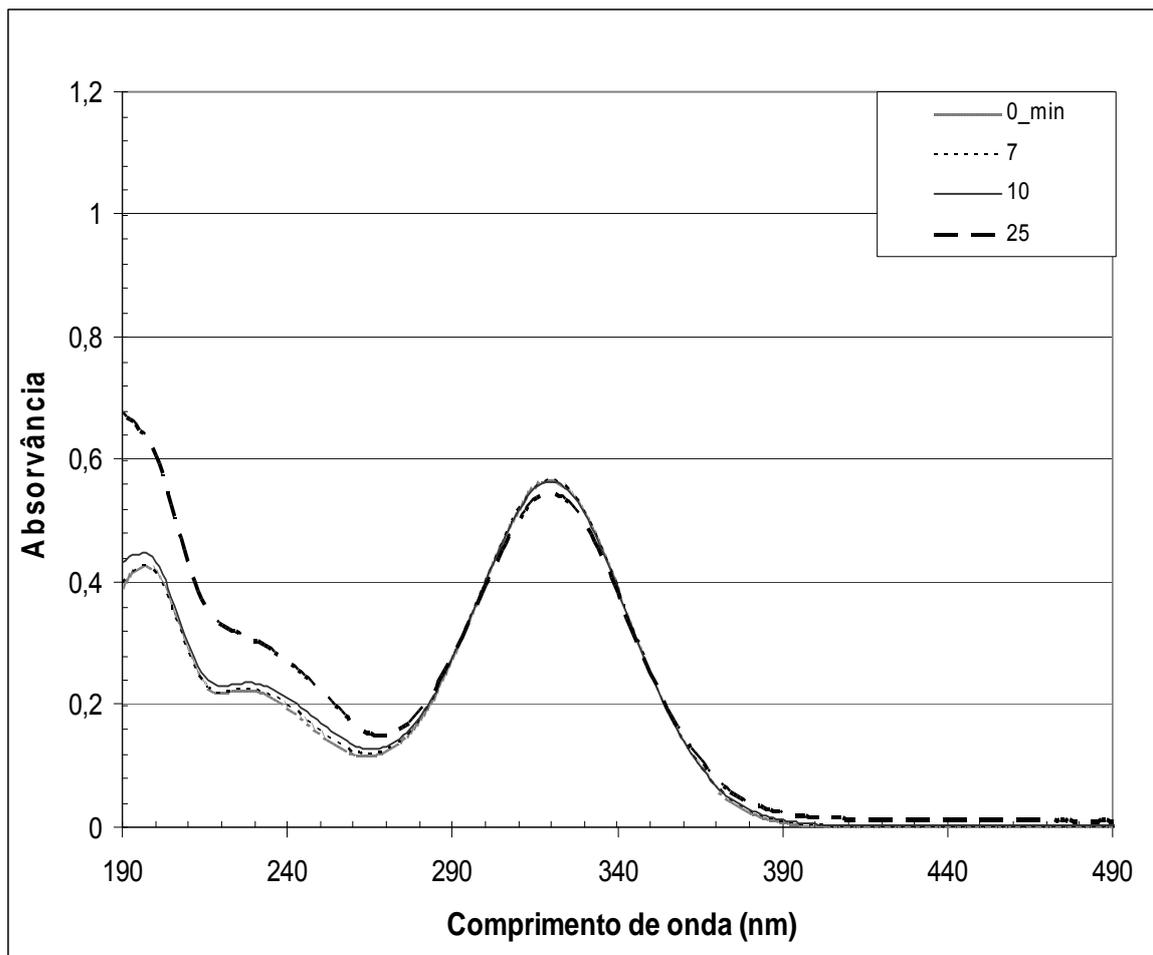


Figura 5.6. Espectros de absorção de solução de metronidazol $10,31 \text{ mg L}^{-1}$ e $10,20 \text{ mg L}^{-1}$ em H_2O_2 , pH de $3,5 \pm 0,2$, em diferentes tempos reacionais para a foto- peroxidação.

As Figuras 5.5 e 5.6 demonstraram que a cinética é lenta quando os teores de peróxido de hidrogênio e do fármaco são iguais. Como forma de comprovar que a degradação verificada na Figura 5.6 é devido ao ataque do peróxido sobre o fármaco, foi acompanhada a reação de fótólise do composto em um tempo de até 60 minutos de reação. A análise da degradação foi realizada com base na redução da queda da absorvância em 320 nm.

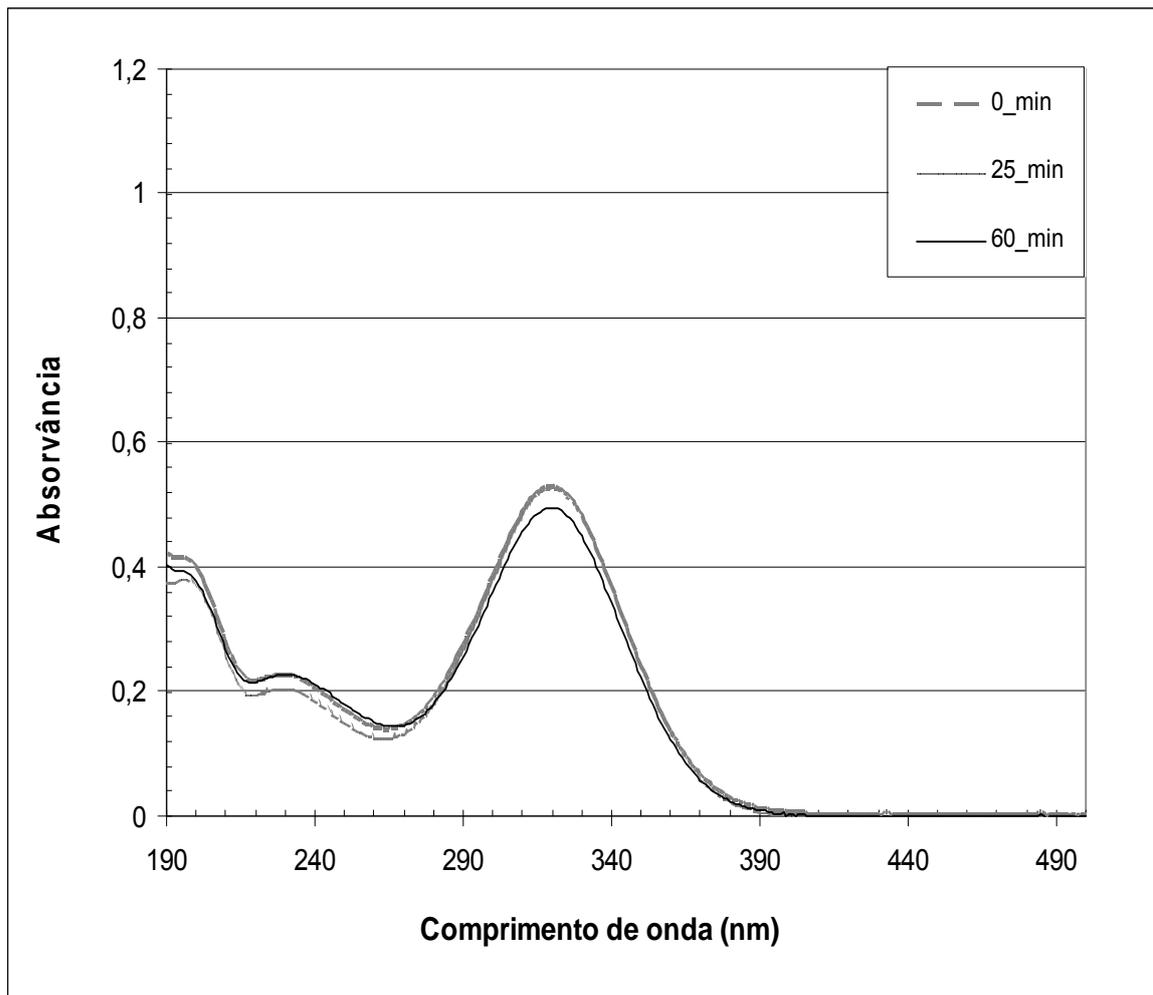


Figura 5.7. Espectros de absorção de solução de metronidazol 10,31 mg L⁻¹, pH de 3,5±0,2, em diferentes tempos reacionais para a fotólise.

Através das Figuras 5.6 e 5.7, verificou-se que somente o uso de radiação UVA não é suficiente para degradar o metronidazol como verificado na reação de foto-peroxidação. Em 25 minutos de foto-peroxidação, aproximadamente 3% do fármaco foi decomposto; para a fotólise no mesmo tempo de reacional menos de 0,5% foi eliminado. Para um tempo de 60 minutos de fotólise apenas 6% do composto foi degradado. Dantas e colaboradores (2010) avaliaram a degradação de uma solução aquosa contendo 100 mg L⁻¹ em metronidazol usando somente radiação UVA, conseguindo apenas 22% de remoção do fármaco após 8 horas de reação. Esse dado reforça o resultado apresentado na Fig. 5.7, onde mesmo para uma concentração de 10,31 mg L⁻¹, o uso de fotólise não foi suficiente para decompor o metronidazol no tempo de tratamento empregado.

No estudo da peroxidação, trabalhou-se com uma adaptação do método proposto por Shemer *et al* (2006). Esses autores indicaram uma degradação de até 67% do fármaco em uma relação de H₂O₂/metronidazol de 50:1, usando sistema sob radiação UV. Nesse sentido, a reação foi realizada com a relação 25:1 e 100:1 H₂O₂/metronidazol, como forma de otimizar as condições de ataque com peróxido, aumentando a velocidade de degradação; e na perspectiva de avaliar outras concentrações de oxidante capazes de degradar a molécula em estudo.

A análise preliminar dos espectros de soluções de peróxido com excesso de 25 e 100:1 foi realizada para acompanhar a mudança do perfil espectral em virtude dos excessos do H₂O₂, como mostrado na Figura 5.8.

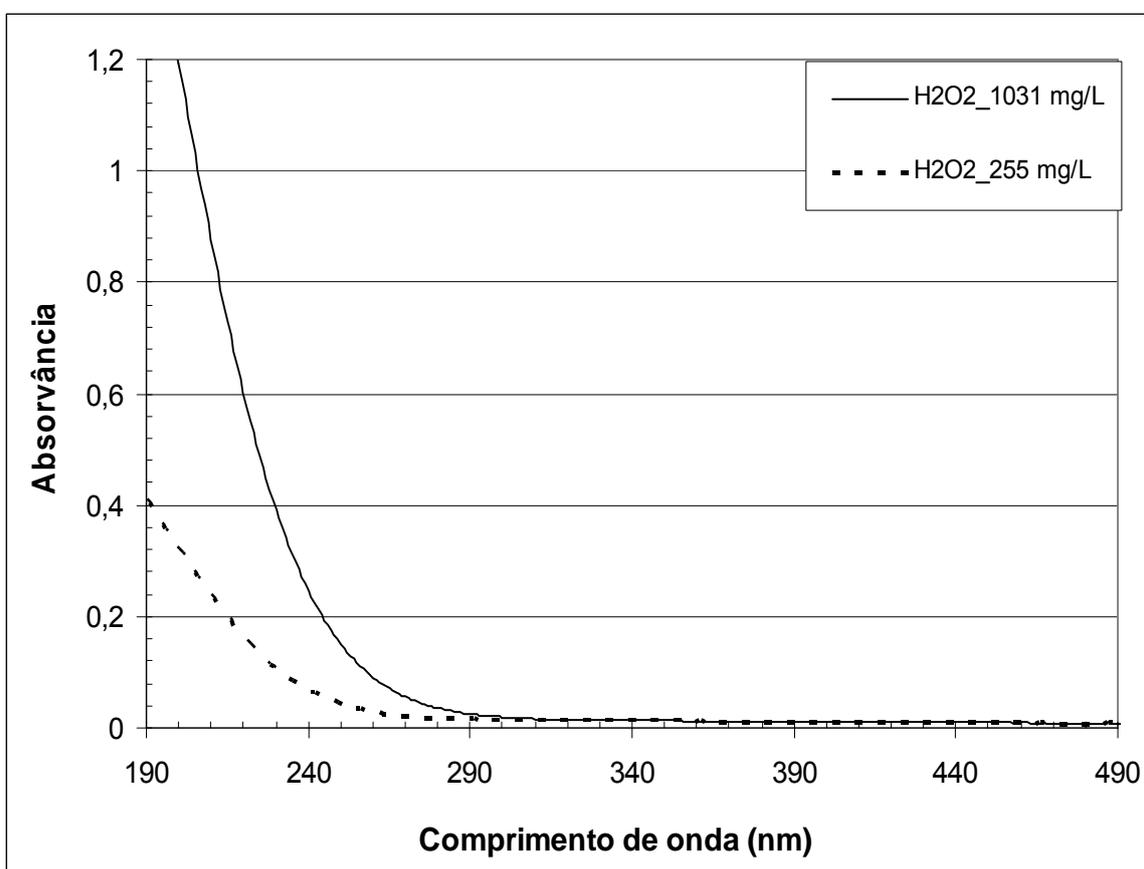


Figura 5.8. Espectros de absorção de solução 255 mg L⁻¹ em H₂O₂, e 1031 mg L⁻¹ em H₂O₂, pH de 3,5±0,2.

Como observado na Fig. 5.8, a presença de peróxido de hidrogênio em grandes concentrações promoveu o aumento da linha de base, principalmente abaixo de 290 nm; entretanto no comprimento de onda do estudo (320 nm) não foi

verificada interferência que inviabilizasse o acompanhamento da decomposição do fármaco por espectrofotometria UV-VIS, para os processos de peroxidação.

A Figura 5.9 apresenta os espectros da reação de foto-peroxidação empregando uma concentração de 255 mg L^{-1} em H_2O_2 .

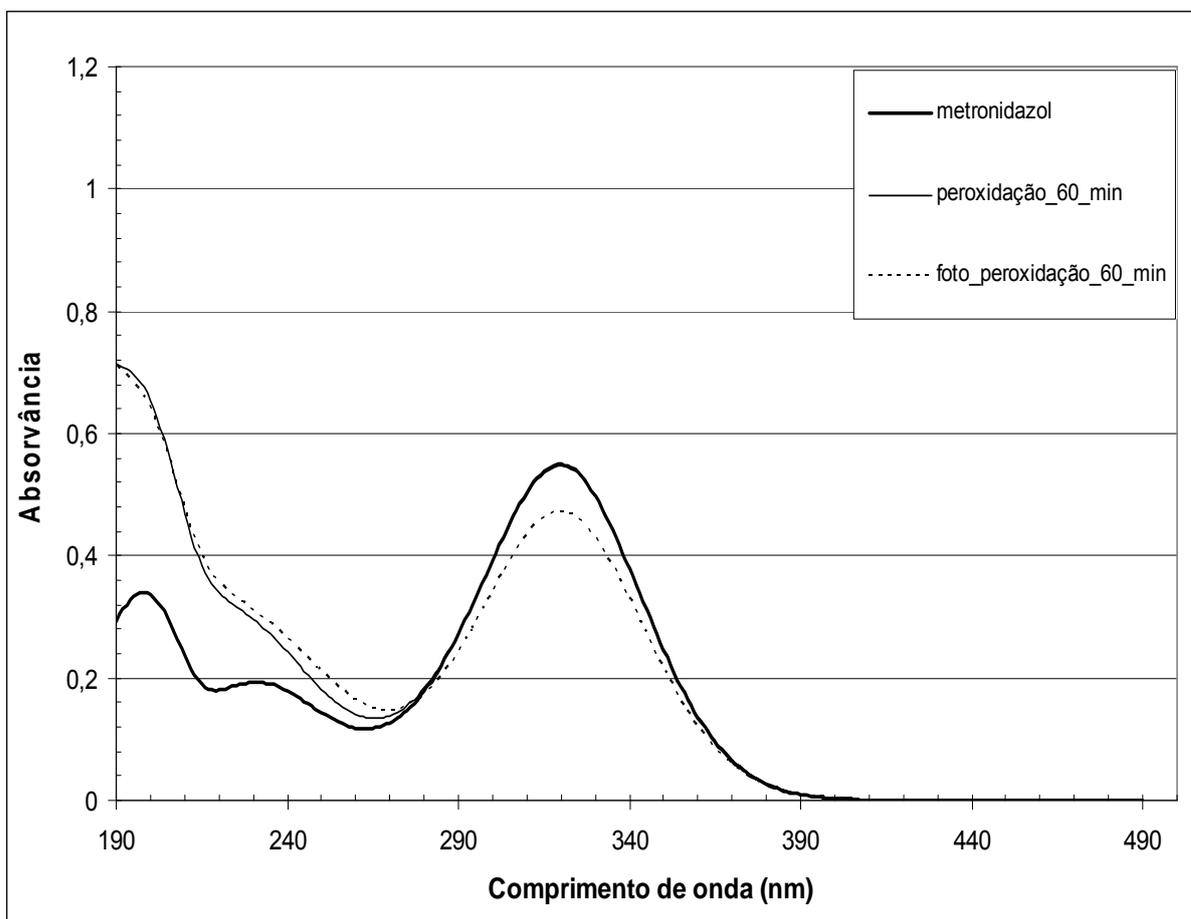


Figura 5.9. Espectros de absorção de solução de metronidazol $10,31 \text{ mg L}^{-1}$, peroxidação com 255 mg L^{-1} em H_2O_2 , e foto-peroxidação com 255 mg L^{-1} em H_2O_2 , pH de $3,5 \pm 0,2$.

Os espectros indicaram que a reação sob luz UV realmente é mais efetiva; na peroxidação simples com excesso de peróxido de 25x o teor de fármaco degradado foi de apenas 0,3%, quando a mesma reação ocorreu sob radiação, a degradação após 60 minutos foi de 13%. Salienta-se que, conforme demonstrado na Figura 5.7, a degradação atribuída exclusivamente à fotólise nesse tempo pode ser de até 6%, logo o aumento da concentração de peróxido em 25 vezes provocou um aumento para 7% na decomposição do composto em estudo. Ressalta-se também que as linhas de base dos espectros das reações da Figura

5.9 sofreram aumento, quando comparadas à do fármaco puro, em virtude do excesso de peróxido.

Um teste empregando excesso de peróxido de 100x em relação ao metronidazol foi realizado, sob luz UV para determinar se a degradação do composto seria maior, na medida em que se adicionou uma grande quantidade de agente oxidante, Figura 5.10.

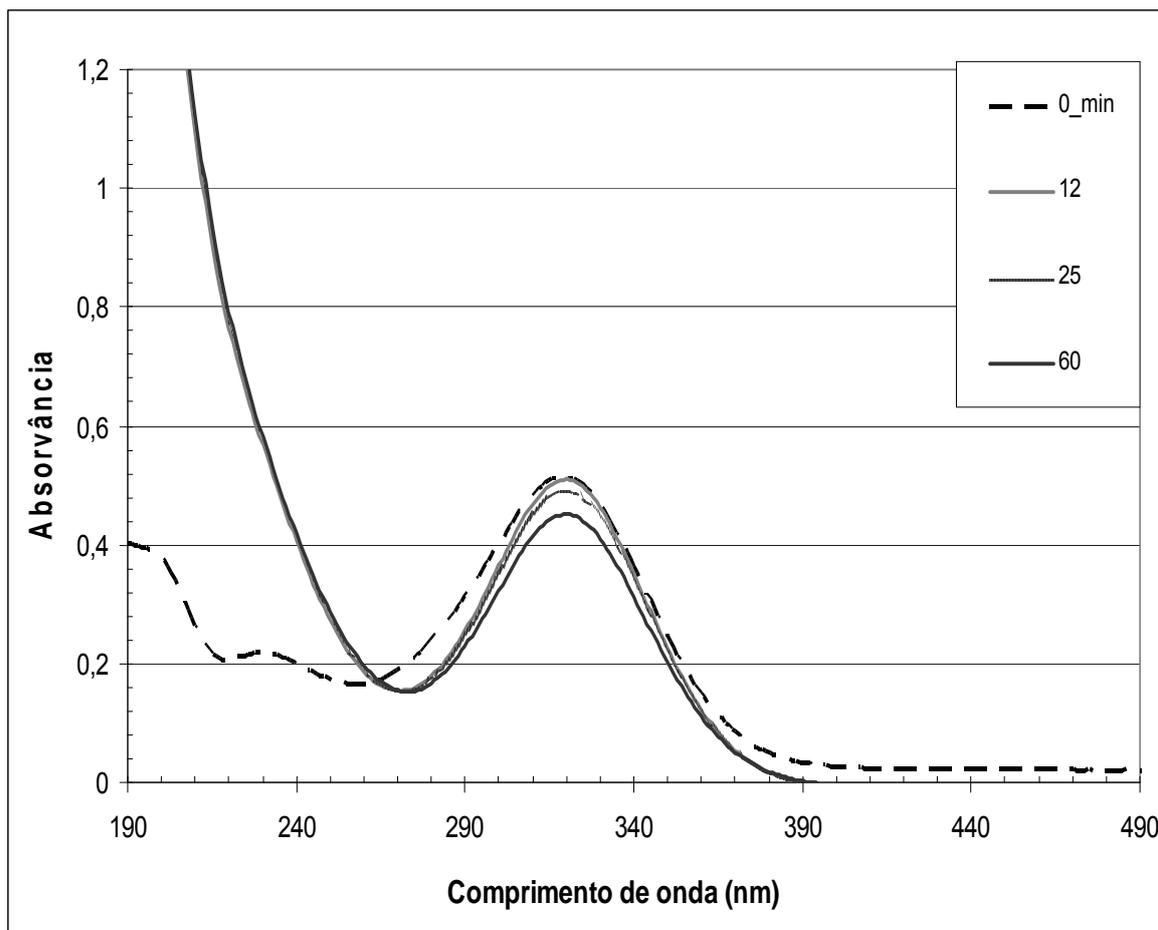


Figura 5.10. Espectros de absorção de solução de metronidazol $10,31 \text{ mg L}^{-1}$, foto-peroxidação com 1031 mg L^{-1} em H_2O_2 , pH de $3,5 \pm 0,2$.

Nas reações de foto-peroxidação, com grande excesso de H_2O_2 se observou um aumento significativo na degradação do fármaco. Utilizando uma relação de 100:1 - H_2O_2 /metronidazol a remoção foi de 46% em um tempo de 60 minutos. A reação foi acompanhada até um tempo de 180 minutos para se estabelecer o comportamento desse processo em maiores períodos reacionais, conforme observado na Figura 5.11.

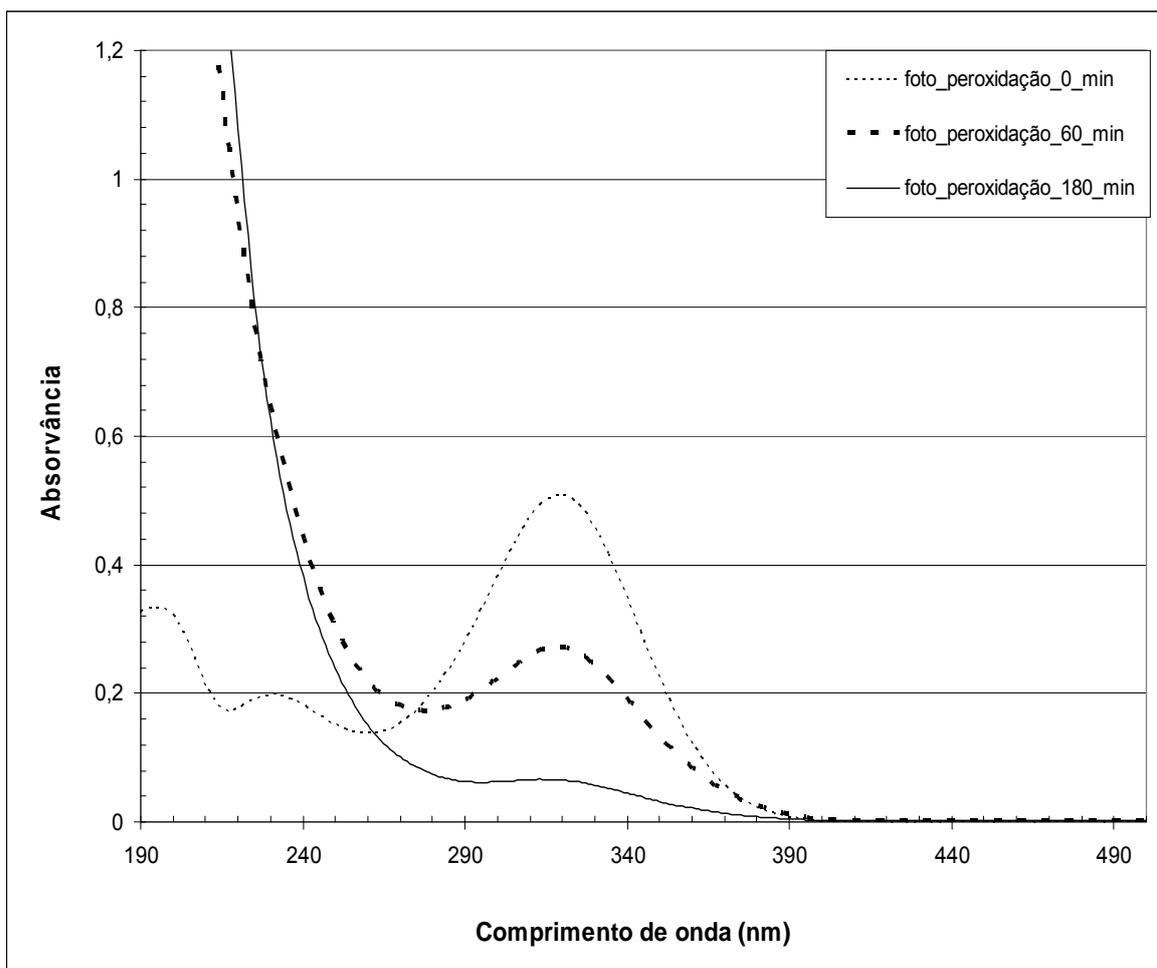


Figura 5.11. Espectros de absorção de solução de metronidazol $10,31 \text{ mg L}^{-1}$, foto-peroxidação com 1031 mg L^{-1} em H_2O_2 , pH de $3,5 \pm 0,2$, em diferentes tempos reacionais.

Na Figura 5.11, pôde-se verificar que o aumento da quantidade de H_2O_2 , alterou o perfil do espectro do fármaco, principalmente abaixo de 290 nm, conforme demonstrado, também, pela Figura 5.8. Houve alteração da linha de base, atribuída ao peróxido de hidrogênio em excesso.

Nessa reação, chegou-se a um total de 87% em remoção do metronidazol para um tempo de 180 minutos. Assim, dentre as peroxidações empregadas, a melhor condição foi com o uso de um excesso de 100 vezes do H_2O_2 em relação ao metronidazol. Com base nesses dados, outros tipos de reações foram estudadas buscando aumentar a degradação e diminuir a quantidade de agente oxidante e também o tempo de tratamento.

5.2.2. Reações Fenton e foto-Fenton clássicas

Conforme dados de literatura (Shemer *et al*, 2006), a reação Fenton e Foto-Fenton têm a capacidade de degradar o metronidazol quase totalmente (90%) em um curto espaço de tempo. Ambas as reações foram feitas nesse estudo e a decomposição acompanhada espectrofotometricamente.

O estudo da reação Fenton mostrou uma ligeira queda da absorvância no início da reação, em relação ao fármaco puro, como apresentado na Fig 5.12. Após a mistura dos reagentes ocorreu uma estabilização na absorvância e também mudança no espectro em relação ao metronidazol em meio ácido. Aparentemente a degradação não ocorreu, pois em 320 nm não houve redução significativa no valor de absorvância, mesmo após 10 minutos de reação. Porém o perfil abaixo de 240 nm, sugere a formação de subprodutos, pois se observou um aumento na absorvância.

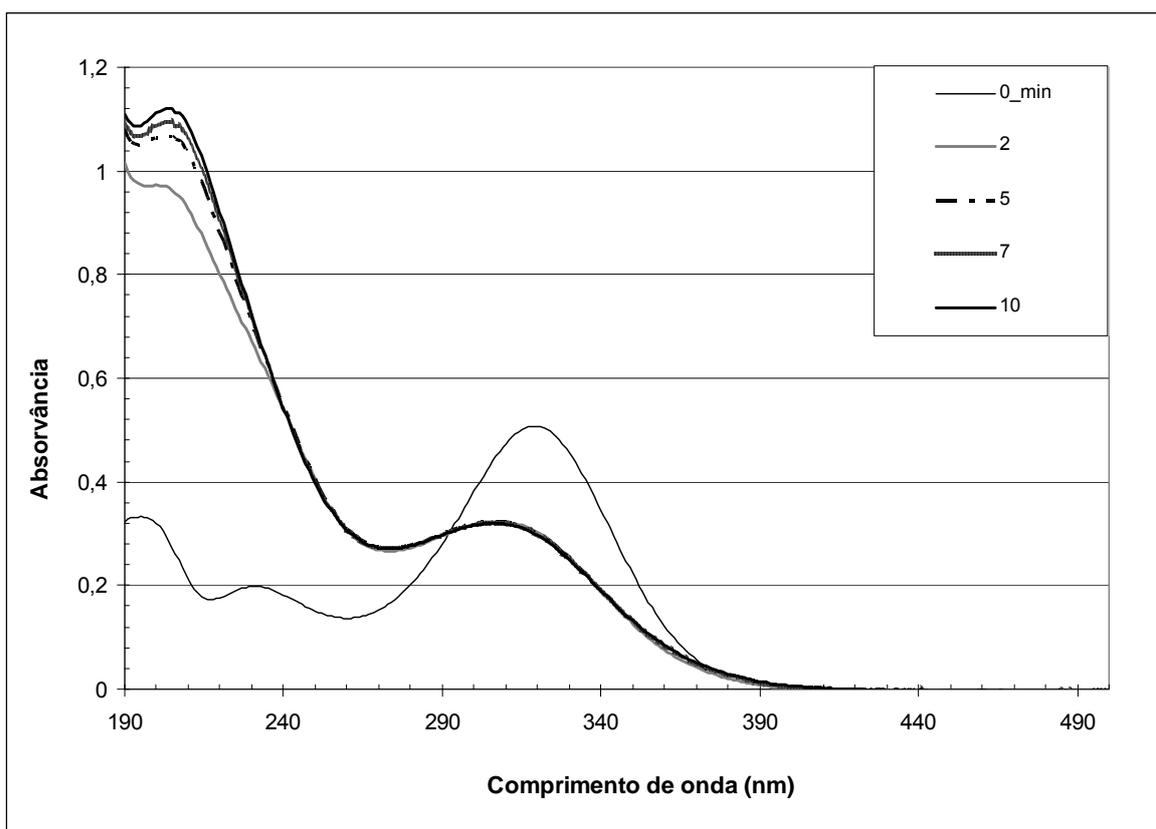


Figura 5.12: Espectros da amostra sintética de metronidazol $10,31 \text{ mg L}^{-1}$, $6,70 \text{ mg L}^{-1}$ em Fe^{+2} , $10,20 \text{ mg L}^{-1}$ em H_2O_2 , pH de $3,5 \pm 0,2$, em diferentes tempos reacionais, reação Fenton.

O processo Foto-Fenton, Fig 5.13, apresentou perfil de degradação semelhante ao observado no processo Fenton. Pôde-se verificar também que os subprodutos da reação apareceram com maior intensidade que na reação sem radiação. A reação foi acompanhada por tempo superior a 10 minutos como forma de monitorar se o perfil do espectro seria constante. O comportamento observado na reação Foto-Fenton é condizente com dados de literatura (Hermosila *et al*, 2009), onde a presença de radiação ultravioleta converte os íons férricos a ferrosos, com formação adicional de radicais hidroxila, aumentando a velocidade de reação, conforme Eq. 5.2.

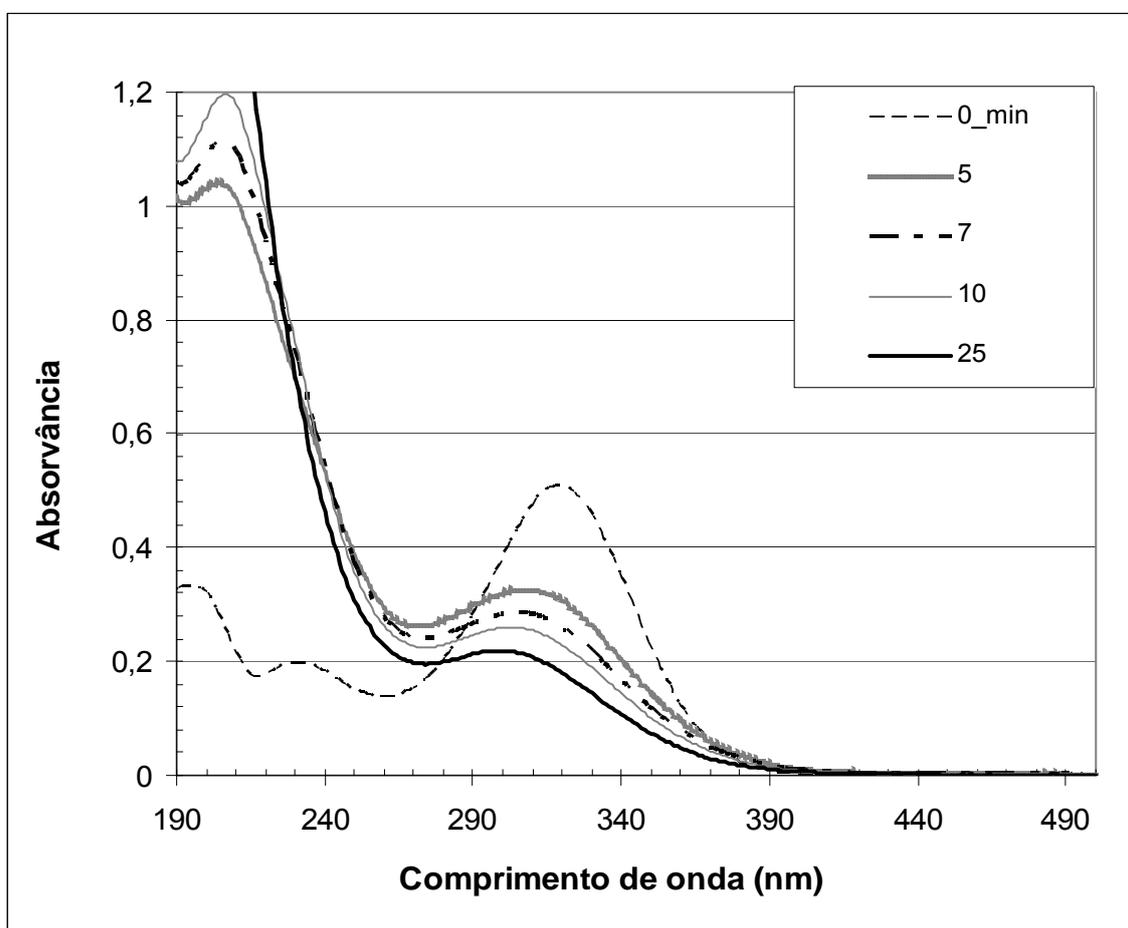
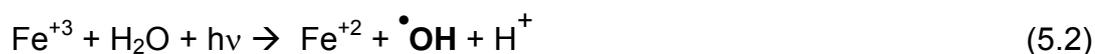


Figura 5.13: Espectros da amostra sintética de metronidazol $10,31 \text{ mg L}^{-1}$, $6,70 \text{ mg L}^{-1}$ em Fe^{+2} , $10,20 \text{ mg L}^{-1}$ em H_2O_2 , pH de $3,5 \pm 0,2$, em diferentes tempos reacionais, reação Foto-Fenton.

O estudo da reação Fenton e Foto-Fenton por espectrofotometria UV –VIS demonstrou que existem subprodutos; assim a degradação do metronidazol

ocorreu; ainda que em 320 nm a absorvância não se reduzisse de forma significativa. Devido a presença dos íons férricos que também absorveram nessa região, Fig. 5.4, o estudo da degradação somente por espectrofotometria UV-VIS se mostrou deficiente. Em virtude das limitações encontradas na análise da degradação do metronidazol por espectrofotometria no UV-VIS, foram realizadas as reações Fenton e Foto-Fenton, e os subprodutos da degradação analisados por cromatografia líquida de alta eficiência- CLAE.

5.2.2.1. Degradação do metronidazol na reação Fenton

O método usado para determinação do fármaco por CLAE foi otimizado e o tempo de retenção ficou em aproximadamente 8,6 minutos, nas condições empregadas. O cromatograma do padrão de metronidazol, na concentração de 10 mg L⁻¹ (Fig 5.14) mostrou que existe apenas um pico, e portanto não existem interferentes no sistema. O limite de detecção do método foi de 10,00 µg L⁻¹. A curva analítica foi satisfatória, pois apresentou excelente R² > 0,99.

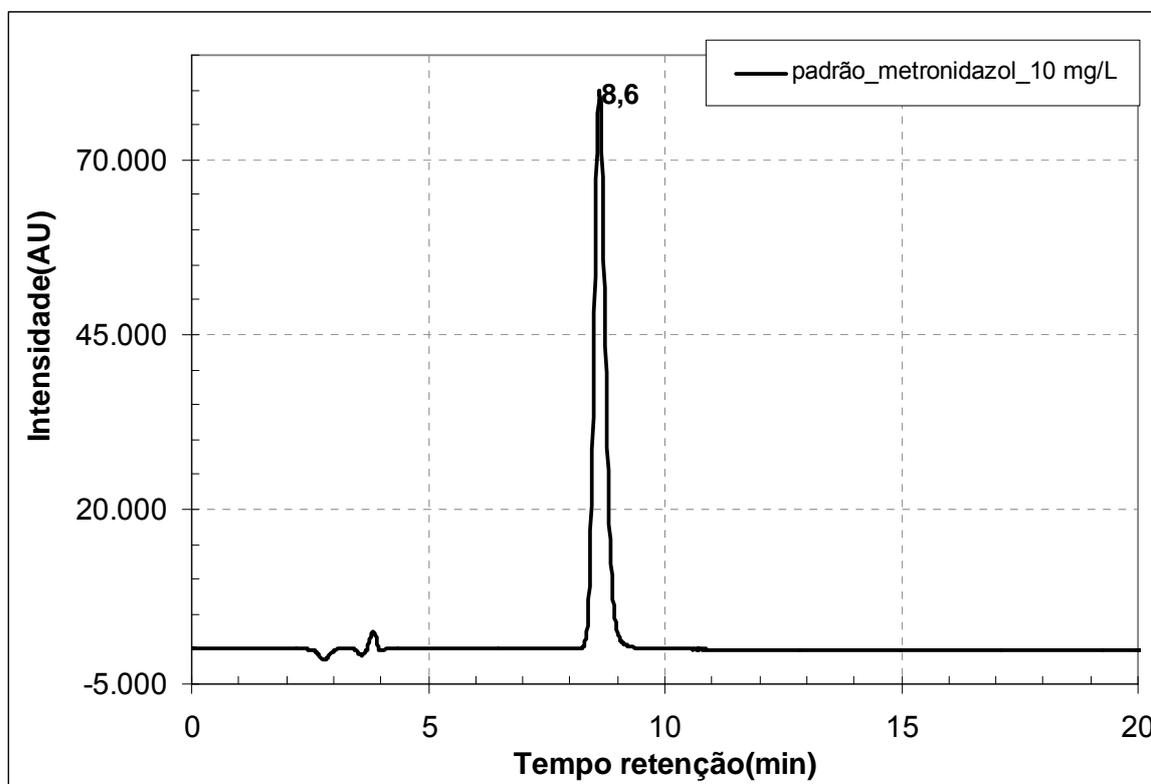


Figura 5.14: Cromatograma do padrão de metronidazol, concentração de 10 mg L⁻¹, em 317 nm.

Os cromatogramas exibidos nas Figs. 5.15 e 5.16, relativos aos espectros das Figs. 5.12 e 5.13, mostraram que não existia mais metronidazol nas amostras quando da análise. O perfil dos espectros apresentados nas Figs. 5.12 e 5.13, podem ser atribuídos à interferência de íons férricos, mas conforme demonstraram os cromatogramas não é devido ao metronidazol não degradado.

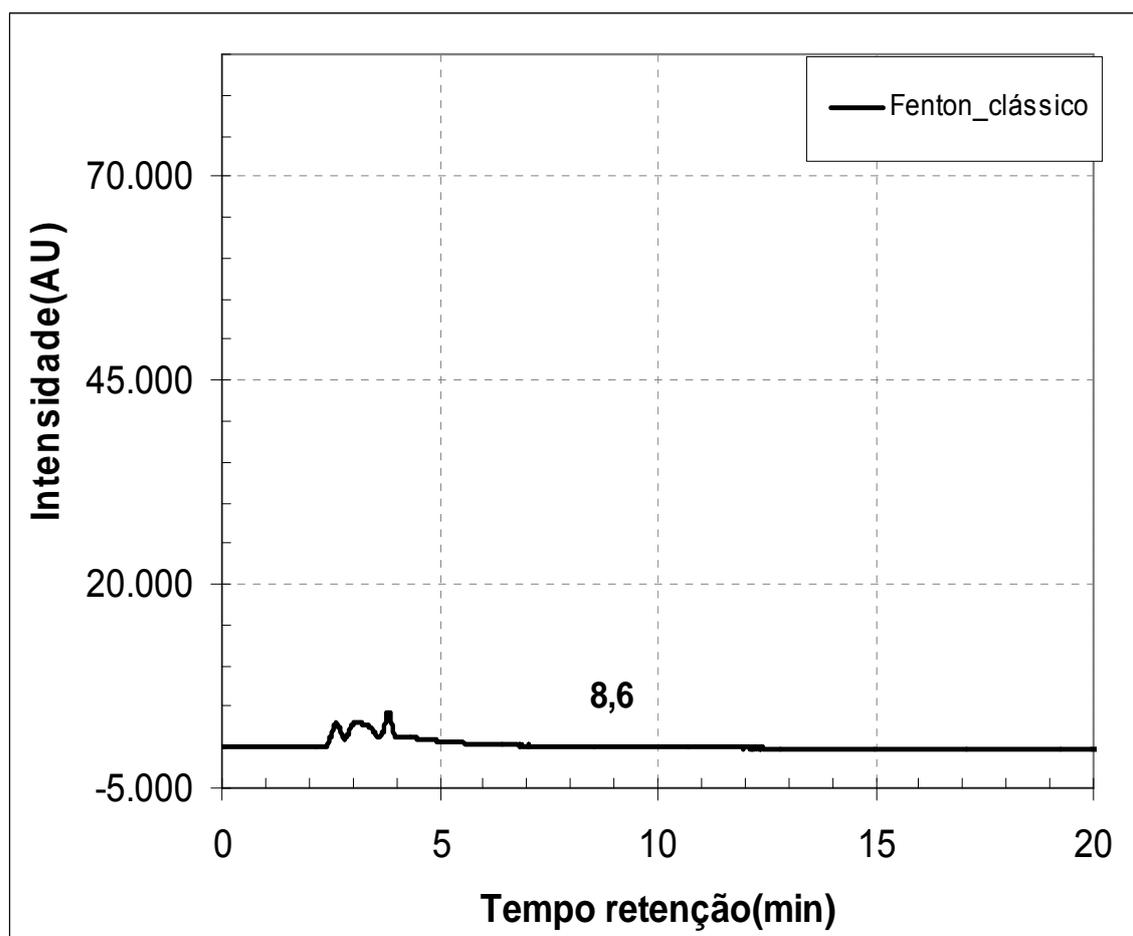


Figura 5.15: Cromatograma de amostra de subproduto da reação de Fenton clássico, mesma amostra da Fig. 5.12, em 317 nm.

Os resultados das análises em sistema CLAE demonstram que o processo Fenton e Foto-Fenton efetivamente degradaram o metronidazol completamente após 30 minutos de reação. Nas amostras analisadas os teores de fármaco ficaram abaixo dos limites de detecção do método, Figs.5.15 e 5.16.

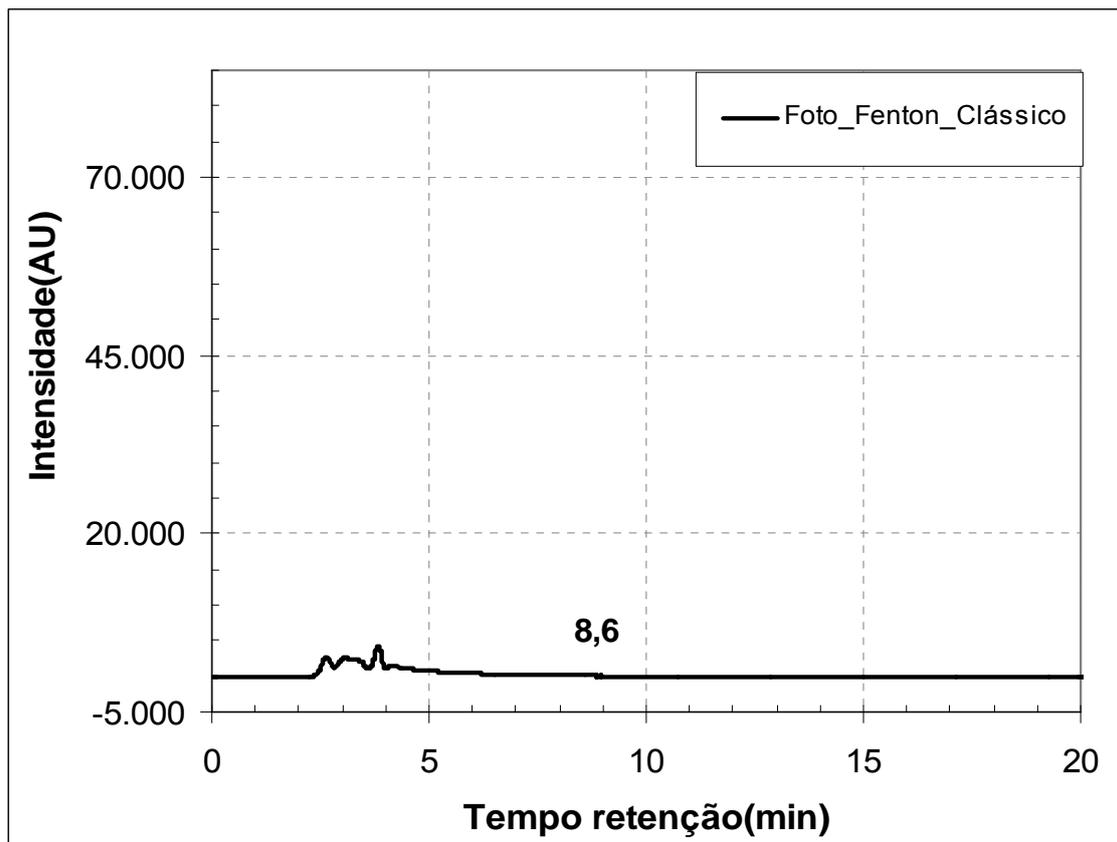


Figura 5.16: Cromatograma de amostra de subproduto da reação de Foto- Fenton clássico, mesma amostra da Fig. 5.14, em 317 nm.

O resultado observado na Fig 5.16 é condizente com dados de literatura. Rodriguez-Gil e colaboradores (2010) utilizaram a reação foto-Fenton homogênea no tratamento de águas de rios contendo metronidazol, conseguindo degradar até 97% do fármaco inicial (161 ng L^{-1}).

Os cromatogramas das Fig. 5.15 e 5.16 apresentaram no início da corrida picos que podem ser atribuídos aos subprodutos da degradação que não foram separados pela coluna analítica. O estudo por CLAE com detecção de arranjo de diodos foi realizado como forma de identificar os picos que surgiram nos cromatogramas citados.

5.2.3. Reações tipo Fenton e tipo Foto-Fenton

O uso de fontes alternativas de ferro no processo Fenton é descrito na literatura. Khan e colaboradores(2009) realizaram estudo comparativo da

degradação de compostos clorados pela reação Fenton na presença de Fe^{+2} , Fe^{+3} e Fe^0 ; encontrando melhores resultados de remoção quando do uso de Fe^{+2} solúvel. Estudos da reação Fenton, utilizando ferro sólido como fonte de íons ferrosos, para degradar metronidazol são praticamente inexistentes. Assim, a reação tipo Fenton com ferro zero foi realizada e acompanhada por espectrofotometria UV-VIS.

Os resultados, usando Fe^0 comercial como fonte de íons ferrosos, indicaram que nessa condição é possível a análise da decomposição do metronidazol durante os primeiros 15 minutos, tanto na reação tipo Fenton quanto na tipo Fenton irradiada, conforme Figuras 5.17 e 5.18.

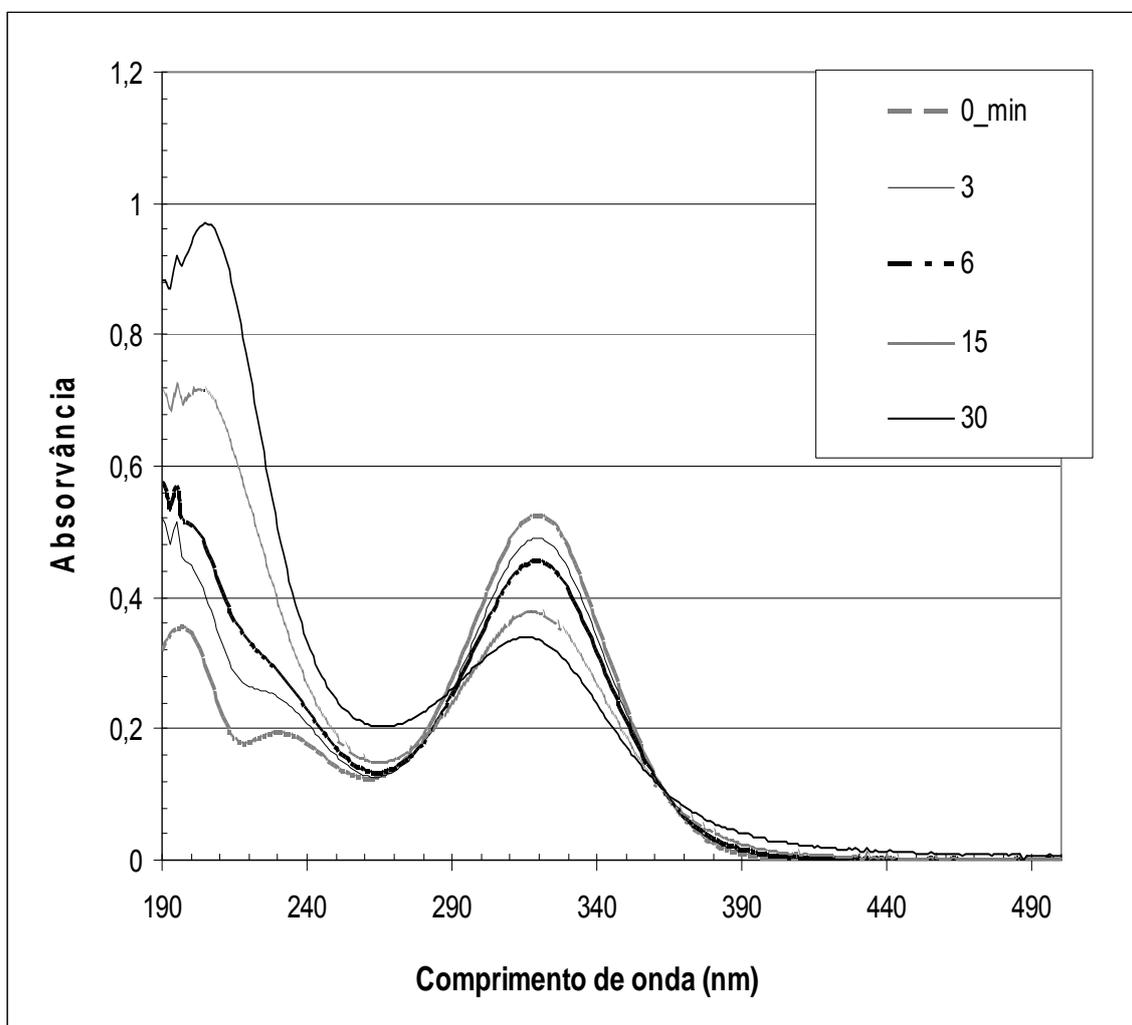


Figura 5.17. Espectros de absorção de metronidazol $10,31 \text{ mg L}^{-1}$ com $10,20 \text{ mg L}^{-1}$ em H_2O_2 e $2,8 \text{ mg}$ de ferro, pH de $3,5 \pm 0,2$, em diferentes tempos reacionais, reação tipo Fenton.

Pôde-se acompanhar o aumento da absorvância abaixo de 240 nm, onde presumidamente surgiram os subprodutos da reação de oxidação do fármaco, e o decaimento da banda em 320 nm, onde o metronidazol tem máxima absorvância.

O uso de ferro na forma mais reduzida é uma ferramenta interessante, pois não existe influência dos íons férricos, desde o início da reação, como no processo Fenton e foto-Fenton clássicos, o que se configurava em um impedimento para estabelecer a cinética de decomposição. A Figura 5.18 traz o os espectros de absorção da reação tipo foto-Fenton durante 30 minutos.

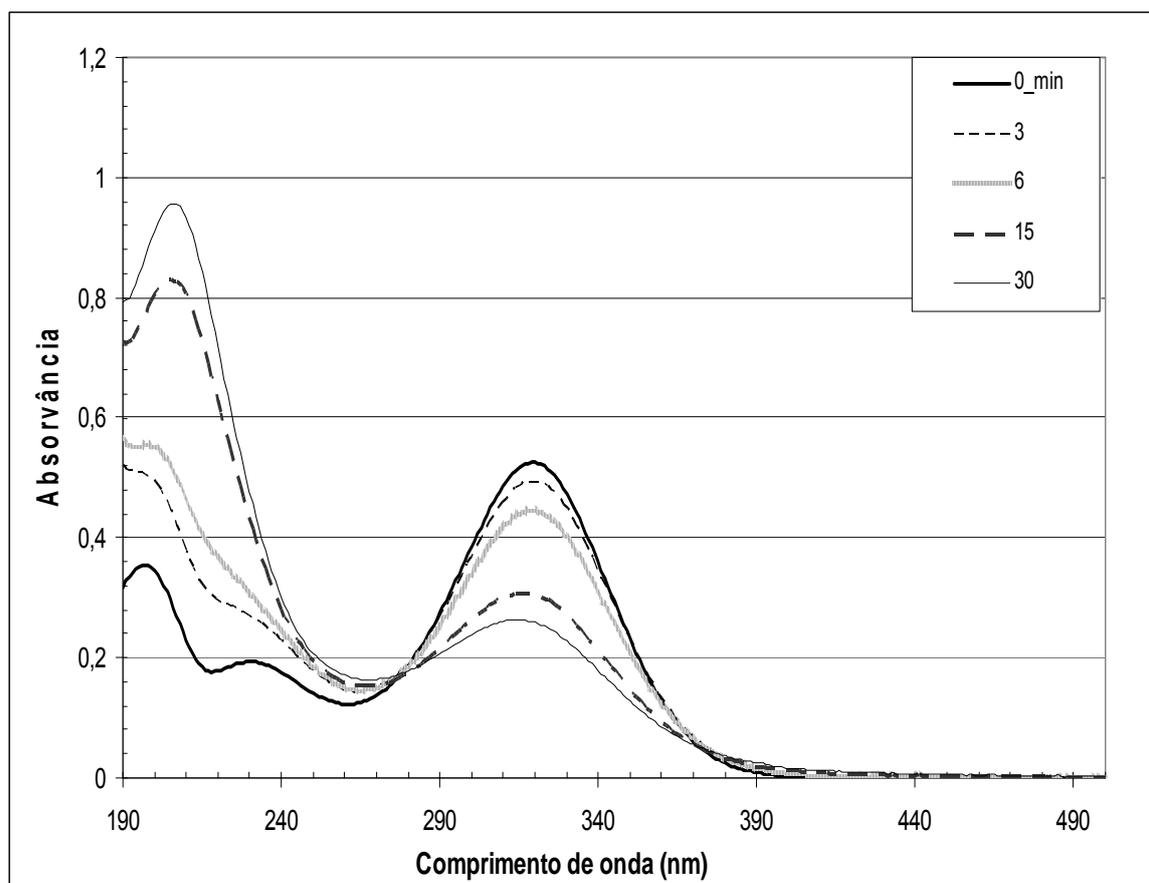


Figura 5.18. Espectros de absorção de metronidazol $10,31 \text{ mg L}^{-1}$ com $10,20 \text{ mg L}^{-1}$ em H_2O_2 e $2,8 \text{ mg}$ de ferro, pH de $3,5 \pm 0,2$, em diferentes tempos reacionais, reação tipo foto-Fenton.

Pôde-se visualizar nas Fig. 5.17 e 5.18, que a partir de 15 minutos o espectro sofreu alteração em seu perfil. Essa mudança pôde ser atribuída à conversão dos íons ferrosos para íons férricos, que nesse momento passaram a interferir na determinação da degradação.

Para avaliar o efeito da variação da concentração de peróxido de hidrogênio sobre a degradação do fármaco, foram realizados testes nas mesmas condições reacionais do processo Fenton com ferro zero; porém foi usada uma concentração de H_2O_2 na ordem de 5,10; 10,20 e 20,40 mg L^{-1} do agente oxidante, conforme apresentado na Fig. 5.19.

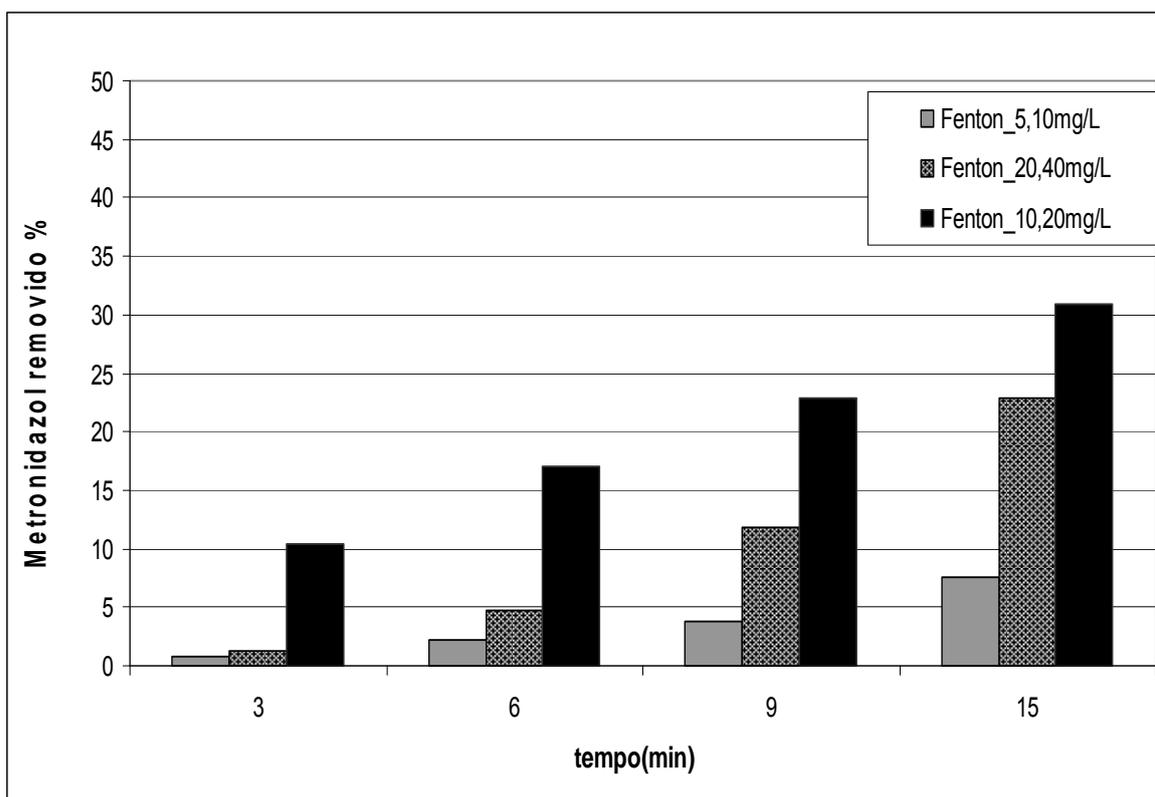


Figura 5.19: Remoção percentual de metronidazol em concentração de 10,31 mg L^{-1} , 5,10(cinza), 10,20(preto) e 20,40 (pontilhado) mg L^{-1} em H_2O_2 , 2,8 mg de ferro comercial, pH de 3,5, reação tipo Fenton.

Os dados obtidos, através da análise dos teores de metronidazol removido, nos experimentos indicaram que a concentração de peróxido usada para o estudo Fenton e tipo Fenton - 10,20 mg L^{-1} em H_2O_2 - é eficaz na degradação. O aumento da concentração de peróxido de hidrogênio tem efeito negativo sobre a velocidade de remoção do fármaco; ainda pode-se salientar que a diminuição da concentração do agente oxidante provoca menor velocidade de reação, na medida que a geração de radicais hidroxila é insuficiente para a oxidação do fármaco. O excesso de peróxido de hidrogênio atua como captador de radicais

hidroxila, formando o radical hidroperoxila, Eq 5.3, conforme dados de literatura (Paterlini *et al* (2005); Wang, (2008)).



5.2.4. Reações degradativas usando Fe^0 e Fe^{+2}

A degradação de compostos poluentes, usando Fe^0 é descrita na literatura, (Freire *et al*, 2005). O uso de ferro metálico como agente redutor de compostos orgânicos, está baseado no seu potencial padrão de redução, conforme Eq. 5.4. Nessas reações, a degradação do composto alvo ocorre basicamente pela oxidação de Fe^0 a Fe^{+2} , com transferência de $2e^-$; a reação do íon ferroso a férrico também pode reduzir a matéria orgânica.



A reação de redução entre o ferro e o fármaco, foi acompanhada por espectrofotometria ultravioleta-visível, conforme Fig. 5.20.

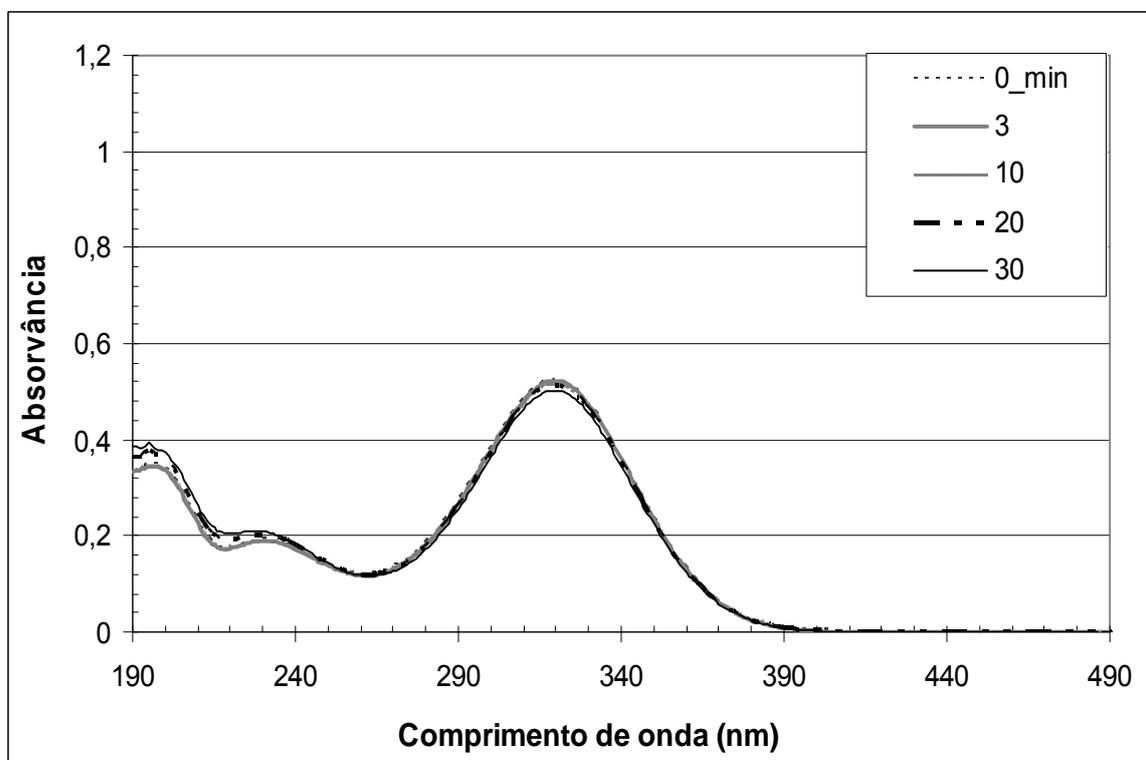


Figura 5.20: Espectros de absorção da reação entre o metronidazol $10,31 \text{ mg L}^{-1}$ com $2,8 \text{ mg}$ de ferro, pH de $3,5 \pm 0,2$, em diferentes tempos reacionais.

A degradação do metronidazol foi avaliada na presença de ferro metálico (comercial) como forma de estabelecer uma nova ferramenta para o tratamento soluções aquosas contendo este fármaco. Os espectros da Fig. 5.20 indicaram que a reação entre o composto e o Fe^0 ocorre, porém a cinética é lenta. Ao final de 30 minutos, a decomposição do fármaco foi de 4% em relação à concentração inicial.

Como forma de otimizar o sistema de redução, a reação foi conduzida sob irradiação UV; foi utilizado um tempo superior de reação para verificar a viabilidade desse processo como ferramenta de degradação do composto em estudo. Os espectros da Fig. 5.21 indicam a eficácia do processo redutivo sobre o metronidazol.

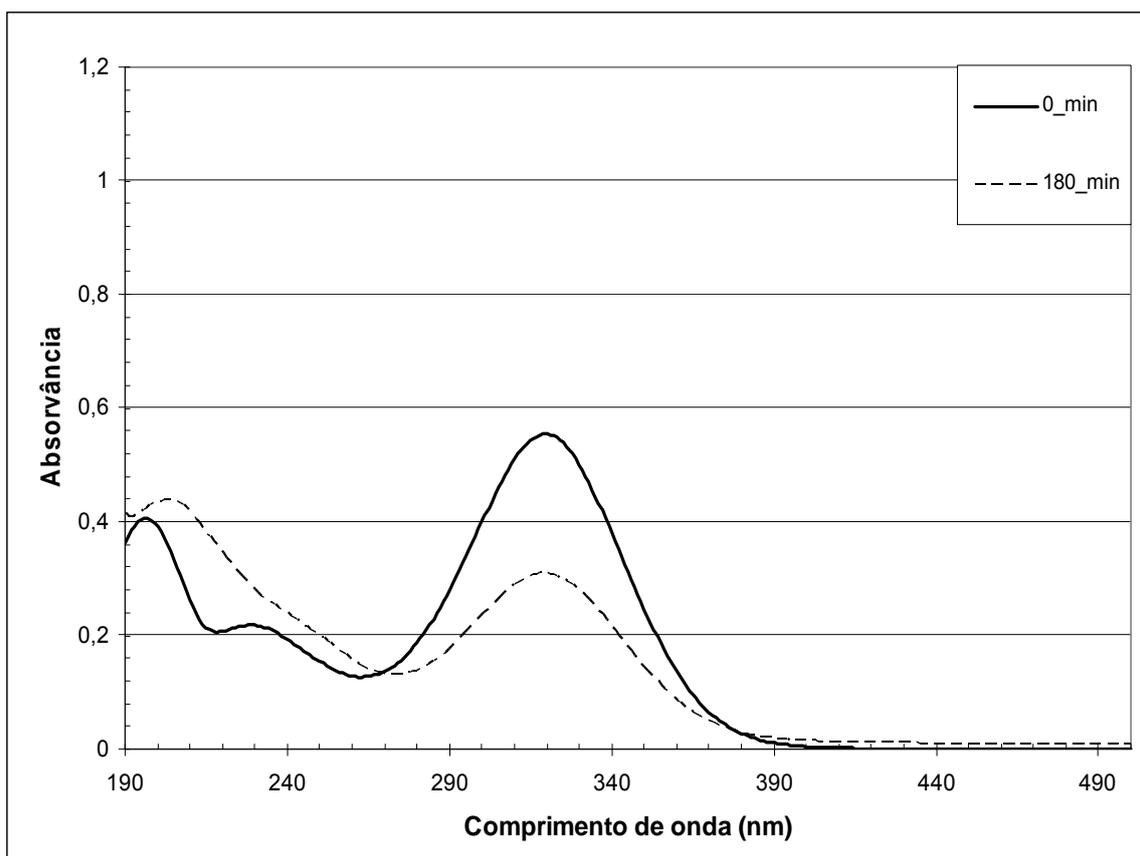


Figura 5.21: Espectros de absorção da reação entre o metronidazol $10,31 \text{ mg L}^{-1}$ com $2,8 \text{ mg}$ de ferro, pH de $3,5 \pm 0,2$, reação de foto-redução.

A presença do Fe^0 em meio ácido é uma condição suficiente para provocar a decomposição do metronidazol; porém o tempo de reação deve ser extremamente alto, pois em 180 minutos de reação apenas 44% do fármaco havia sido degradado. A redução pôde ser acompanhada por UV-VIS em um tempo superior, uma vez que a interferência de íons férricos surge lentamente.

A reação entre o metronidazol e os íons ferrosos também foi estudada, utilizando UV-VIS para avaliar a possibilidade de uso deste método para acompanhar a decomposição do fármaco. A Figura 5.22 apresenta os espectros de absorvância da reação de redução do metronidazol, utilizando Fe^{+2} e Fe^0 , com igual tempo reacional.

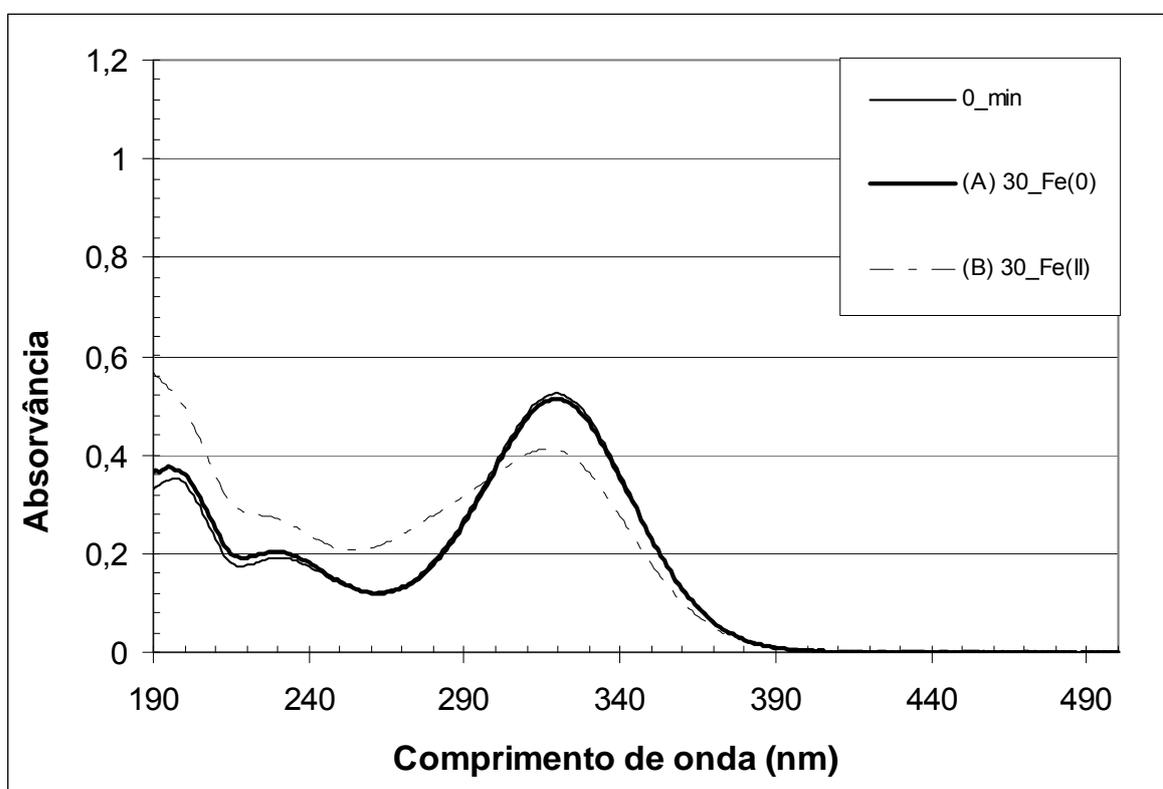


Figura 5.22: Espectros de absorção da reação entre o (A) metronidazol $10,31 \text{ mg L}^{-1}$ com $2,8 \text{ mg}$ de ferro, e (B) reação com $6,70 \text{ mg L}^{-1}$ em Fe^{+2} , pH de $3,5 \pm 0,2$.

Pela análise dos espectros da Fig. 5.22, pôde-se observar que a velocidade da reação entre o fármaco e os íons ferrosos parece superior quando comparada à reação com ferro sólido; entretanto estudos preliminares demonstraram que os íons férricos interferem no espectro, justamente na região

de 320 nm, dessa forma não é possível afirmar que a queda da absorvância seja diretamente relacionada à degradação do fármaco.

Foi realizado um teste para verificar a possível interferência desses íons no UV-VIS quando da reação de redução; utilizou-se a mesma condição reacional da Fig 5.22, porém se adotou um teor de $13,40 \text{ mg L}^{-1}$ em Fe^{+2} .

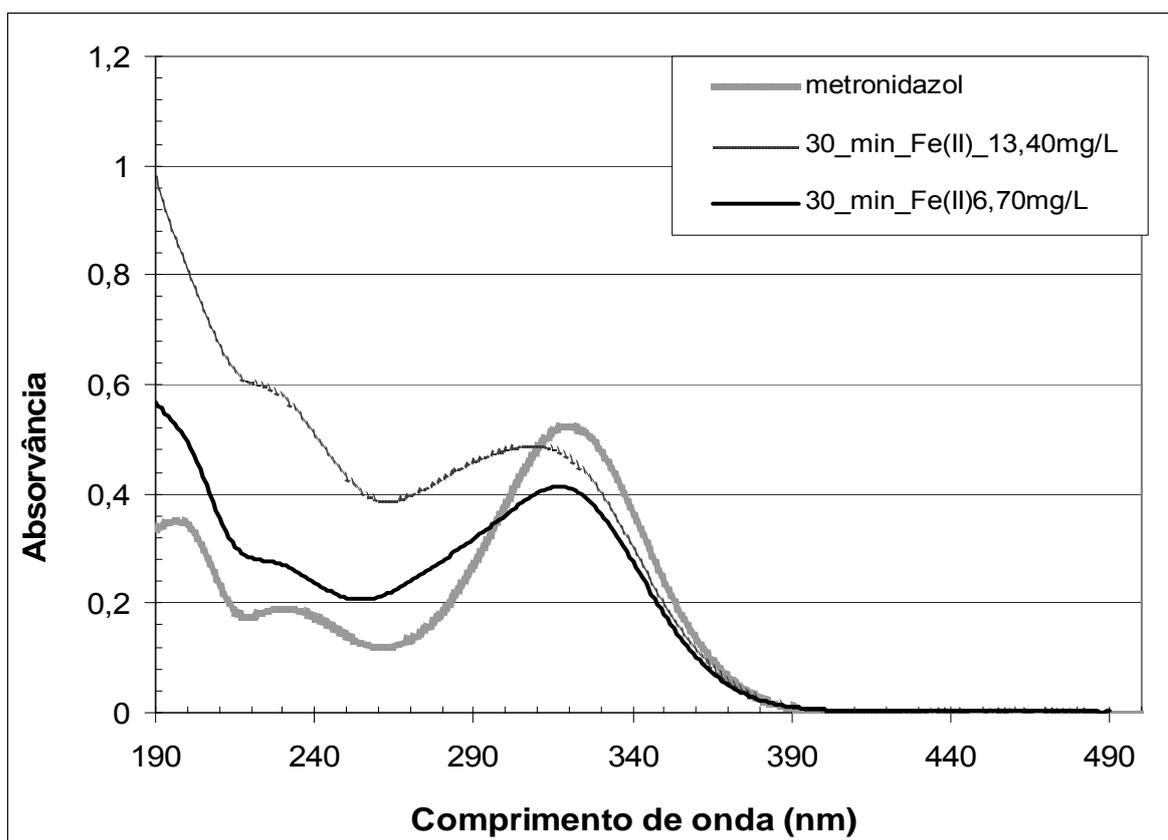


Figura 5.23: Espectros de absorção da reação entre o metronidazol $10,31 \text{ mg L}^{-1}$ com $6,70 \text{ mg L}^{-1}$ em Fe^{+2} , e reação com $13,40 \text{ mg L}^{-1}$ em Fe^{+2} , pH de $3,5 \pm 0,2$.

Através dos espectros da Fig. 5.23, pode-se visualizar que, mesmo na reação de redução, o surgimento dos íons férricos a partir dos ferrosos é muito rápido, e isso impossibilitou o acompanhamento por UV-VIS, uma vez que há interferência destes na banda de 320 nm. Quando a concentração de Fe^{+2} é elevada para $13,40 \text{ mg L}^{-1}$, o sinal sofre modificação, aumentando o valor da absorvância. Os dados preliminares indicaram esses tratamentos (Fe^0 e Fe^{+2}) como uma ferramenta de decomposição do metronidazol; sendo valiosos, pois o ferro metálico é de fácil remoção (Cao *et al*, 2009), e não há necessidade do uso

de peróxido de hidrogênio. A técnica de espectrofotometria UV-VIS se mostrou inconclusiva no estudo das reações de redução, principalmente para a forma ferrosa. Assim, análises por CLAE foram realizadas para determinar o real poder de degradação do metronidazol através destas reações.

5.3. Análise da decomposição do metronidazol por CLAE-UV

5.3.1. Reação de foto-peroxidação

O processo de peroxidação sob luz UV, com um excesso de 100 vezes na concentração de H_2O_2 em relação ao metronidazol, foi analisado por CLAE, para determinar os teores residuais de fármaco após o tratamento. Essa concentração de agente oxidante foi escolhida, em virtude de que nos estudos por espectrofotometria de UV-VIS foi o processo de peroxidação mais efetivo para decomposição do composto em estudo. Foi utilizada uma concentração de $10,31 \text{ mg L}^{-1}$ em metronidazol e $1031,00 \text{ mg L}^{-1}$ em peróxido de hidrogênio, tempo de reação de 180 minutos.

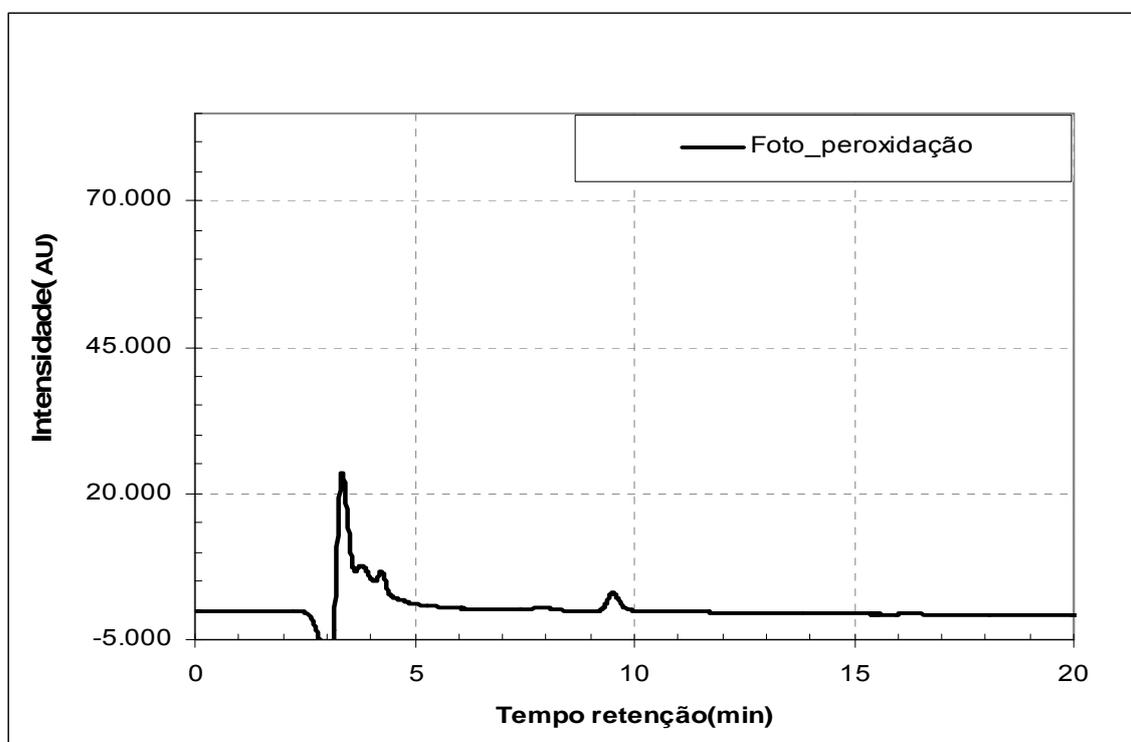


Figura 5.24: Cromatograma do subproduto da reação de fotoperoxidação, em 317 nm.

Pela observação da Fig. 5.24, pôde-se confirmar a eficiência da fotoperoxidação, com grande excesso de agente oxidante. Esse dado pode ser comparado ao obtido por Shemer *et al* (2006), onde o metronidazol foi degradado de forma mais efetiva na presença de H₂O₂ e luz UV, do que em relação ao peróxido isoladamente. Isso fica evidenciado pela equação 5.5, onde ocorre fotólise do peróxido de hidrogênio.



O pico pertencente ao metronidazol, sofreu grande diminuição em relação à solução sintética de trabalho, ver Fig 5.14, e não se observaram picos referentes ao surgimento de subprodutos em 317 nm.

5.3.2. Reação tipo Fenton

A grande dificuldade encontrada nas análises das degradações do metronidazol por espectrofotometria UV-VIS, atribuída a presença de íons férricos, determinou que se realizassem estudos por cromatografia líquida de alta eficiência, nas mesmas condições analíticas já otimizadas na análise da reação Fenton Clássica. O tempo total de reação antes da análise por CLAE foi de 30 minutos.

A análise dos cromatogramas dos subprodutos das reações tipo Fenton, confirmaram a maior decomposição do fármaco na presença de luz, conforme Figuras 5.25 e 5.26.

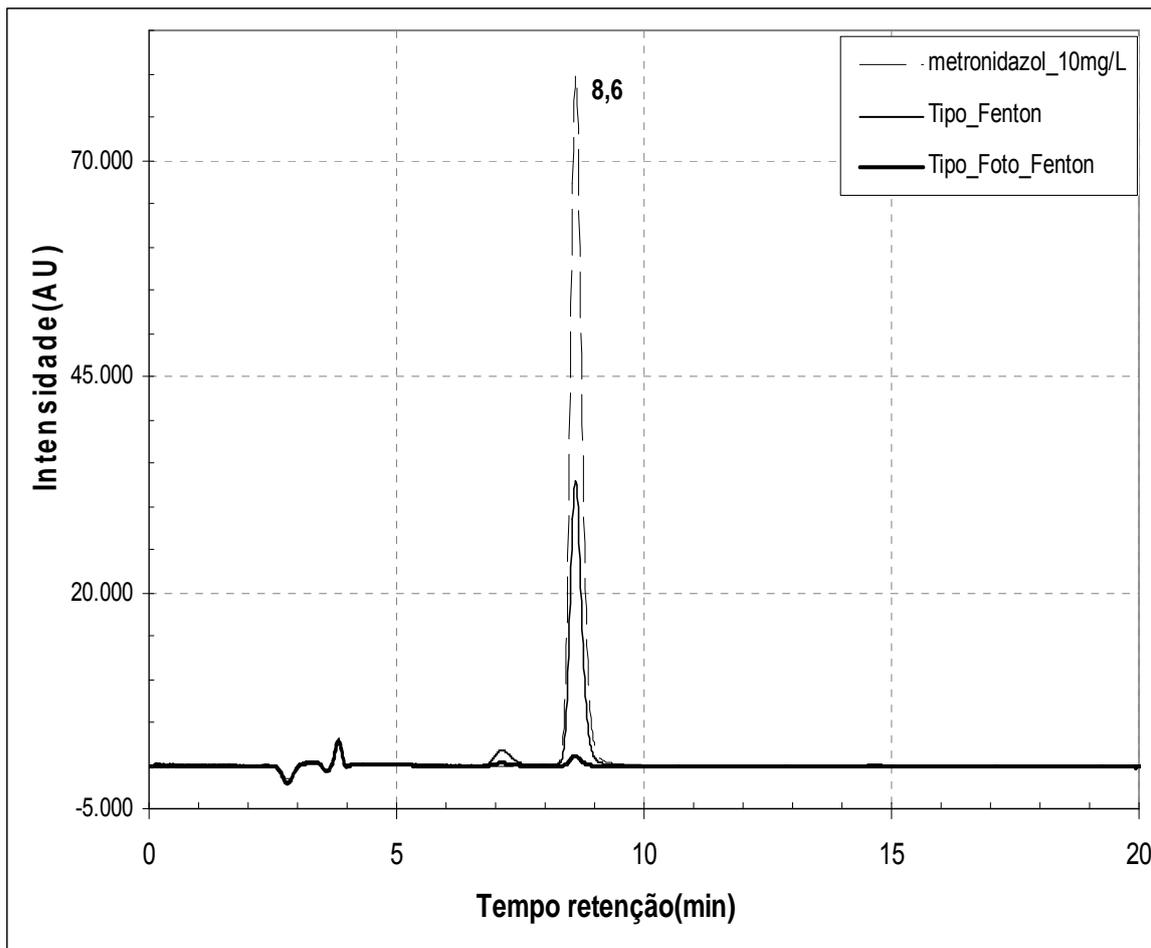


Figura 5.25: Cromatogramas sobrepostos do padrão de metronidazol $10,31 \text{ mg L}^{-1}$, e dos subprodutos da reação tipo Fenton e tipo Fenton irradiada, em 317 nm.

A Fig. 5.25 também evidenciou o surgimento de subprodutos da degradação incompleta do metronidazol em quantidades relativamente baixas. A Fig 5.26 traz a ampliação dos cromatogramas apresentados na Fig.5.25, evidenciando outros picos.

Os picos dos subprodutos podem ser visualizados antes e após o pico referente ao fármaco residual detectado em um tempo de retenção de 8,6 minutos. Cabe ressaltar, ainda, que na reação tipo Fenton irradiada a degradação do fármaco foi de aproximadamente 100%, resultado similar ao obtido na reação foto-Fenton homogênea.

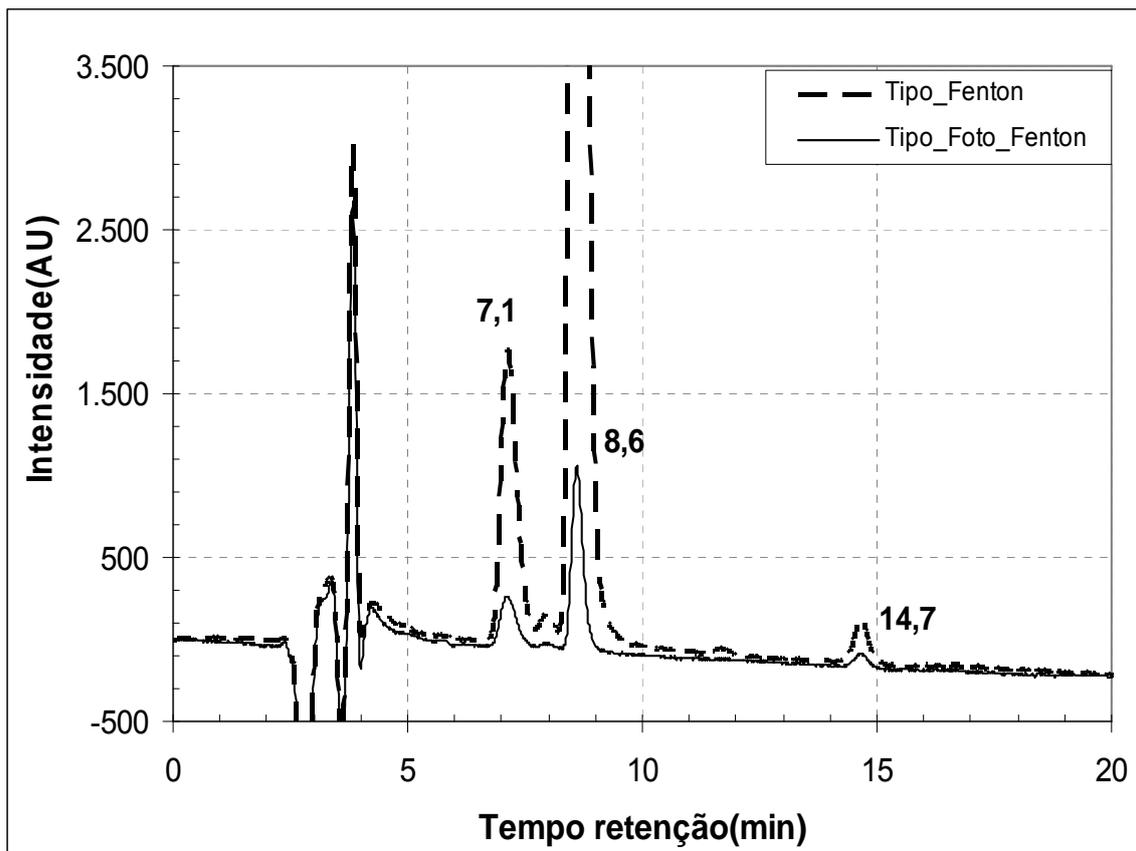


Figura 5.26: Cromatogramas sobrepostos dos subprodutos da reação tipo Fenton e tipo Fenton irradiada, escala ampliada, em 317 nm.

O primeiro subproduto foi eluído em aproximadamente 7,1 minutos, indicando ser um composto com característica mais polar que o próprio fármaco, sendo esse um comportamento típico dos produtos hidroxilados de oxidação. Em 14,7 minutos foi detectado um composto de polaridade inferior ao do próprio composto de partida, uma vez que apresentou um maior tempo de retenção. Outro fato relevante é que a área do pico em 7,1 minutos foi efetivamente superior à área do segundo pico de subproduto em 14,7 minutos, isto sugere que na reação tipo-Fenton predomina a decomposição por oxidação.

A reação tipo-Fenton usando ferro metálico é uma alternativa de tratamento com grandes vantagens. O ferro pode ser removido facilmente, mediante precipitação e/ou filtragem; isso facilita o descarte dos resíduos, obedecendo a Legislação para Emissão de Efluentes- Resolução Consema nº 128 de 2006(10 mg L⁻¹).

5.3.3. Reação de redução

Os estudos por espectrofotometria UV-VIS da degradação do metronidazol, apresentaram um impedimento, quando as reações aconteceram na presença de ferro, seja na forma de Fe^0 ou Fe^{+2} , pois durante o processo de degradação inevitavelmente surgiram os íons férricos, grandes interferentes na banda de estudo. Assim, a eficiência de degradação do processo redutivo foi verificada também por CLAE. A Figura 5.27 mostra os cromatogramas referentes à degradação do fármaco após 30 minutos de reação, usando ferro comercial e solução ferrosa.

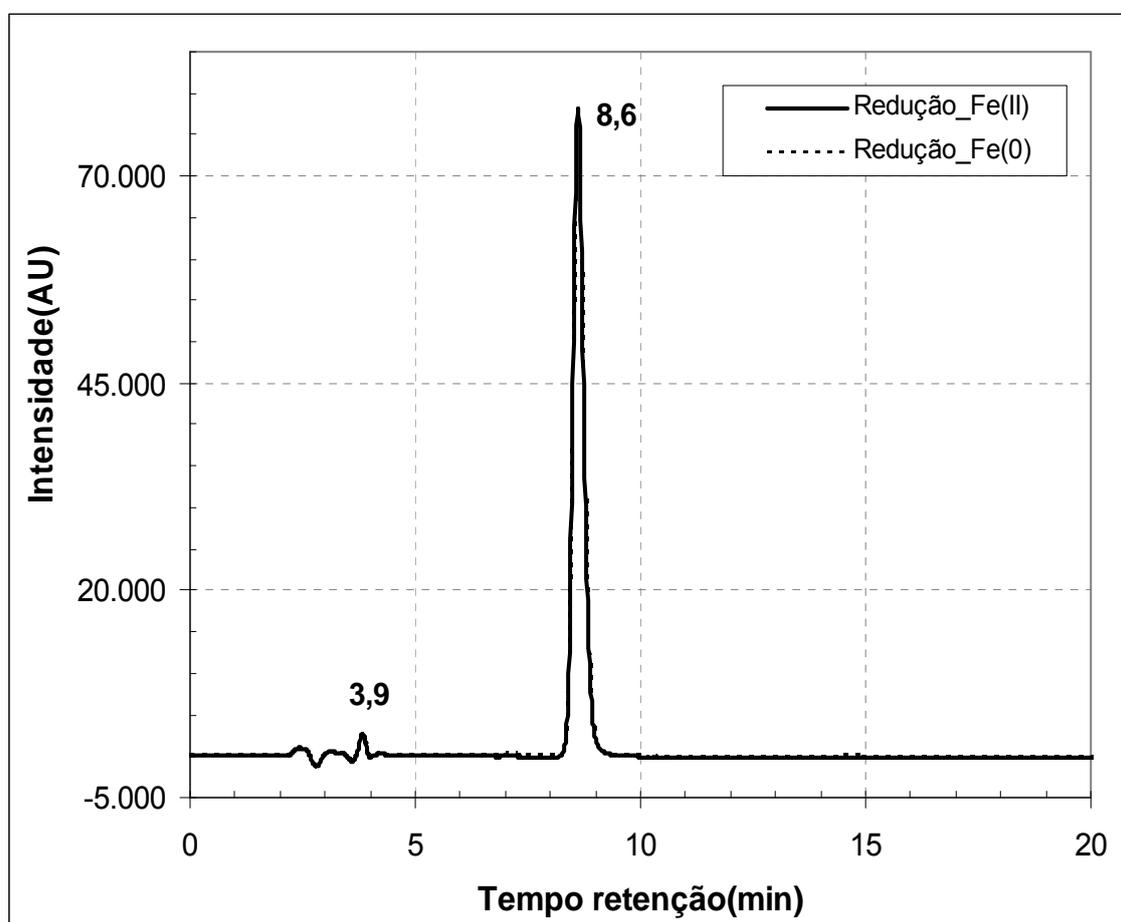


Figura 5.27: Cromatogramas sobrepostos dos subprodutos da reação de redução usando 6,70 mg L^{-1} em Fe^{+2} , e na presença de 2,8 mg em ferro, em 317 nm.

Na análise da Figura 5.27, ficou demonstrado que, nas condições empregadas, não ocorre degradação efetiva do fármaco para as duas fontes de ferro estudadas. As reações apresentadas na Figura 5.27 foram realizadas também na presença de radiação UVA, conforme Figura 5.28.

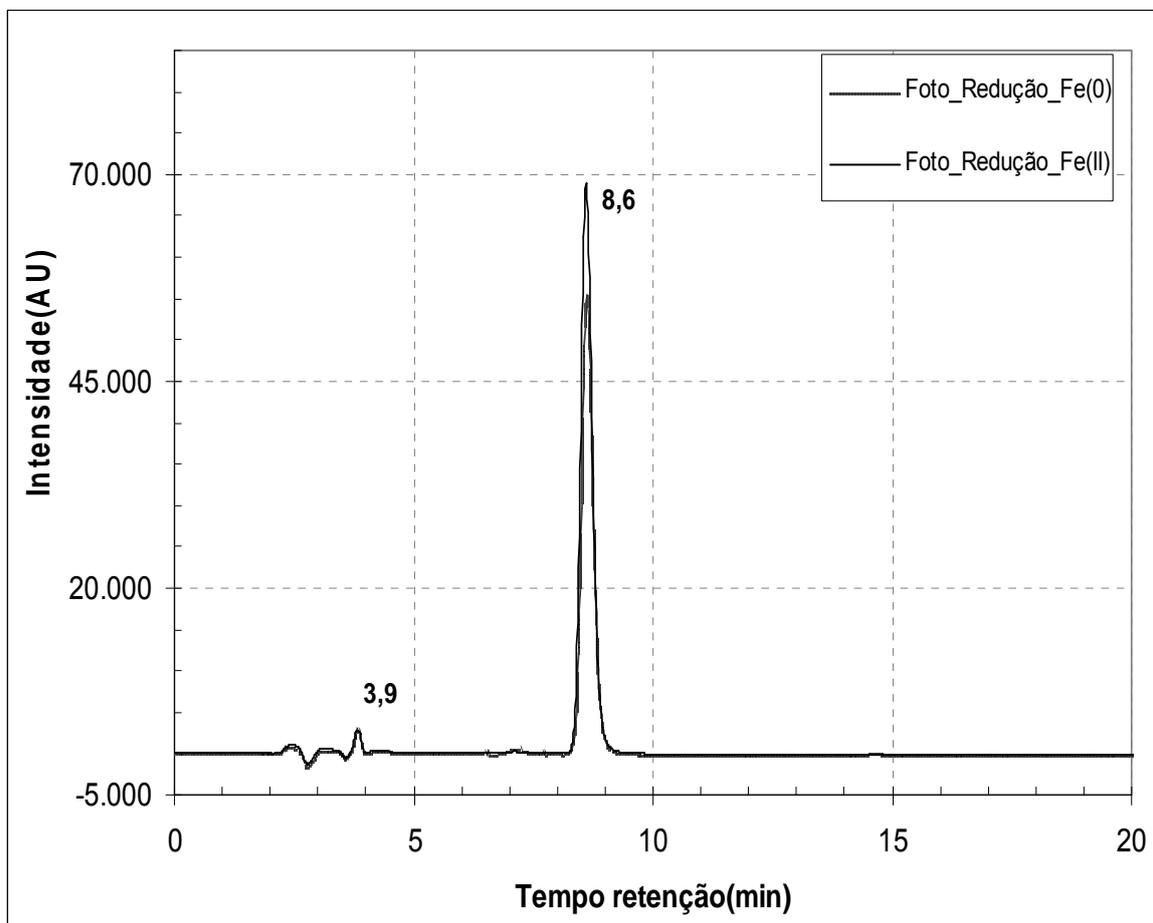
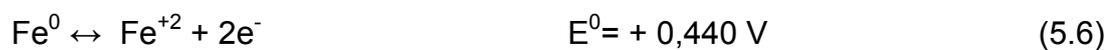


Figura 5.28: Cromatogramas da reação de Foto-redução usando $6,70 \text{ mg L}^{-1}$ em Fe^{+2} , e na presença de $2,8 \text{ mg}$ em ferro, em 317 nm .

Na interpretação das Figs.5.28 e 5.29, observou-se a maior eficiência no processo redutivo quando do uso de ferro elementar. Isto pode ser explicado pela maior potencial de oxidação deste, conforme Eqs. 5.6 e 5.7, nas semi-reações de oxidação.



Nas Figuras. 5.28 e 5.29, observou-se também que o processo redutivo na presença de luz ultravioleta é mais eficiente, uma vez que a área do pico referente ao metronidazol foi menor nos cromatogramas de pós-reações fotos assistidas.

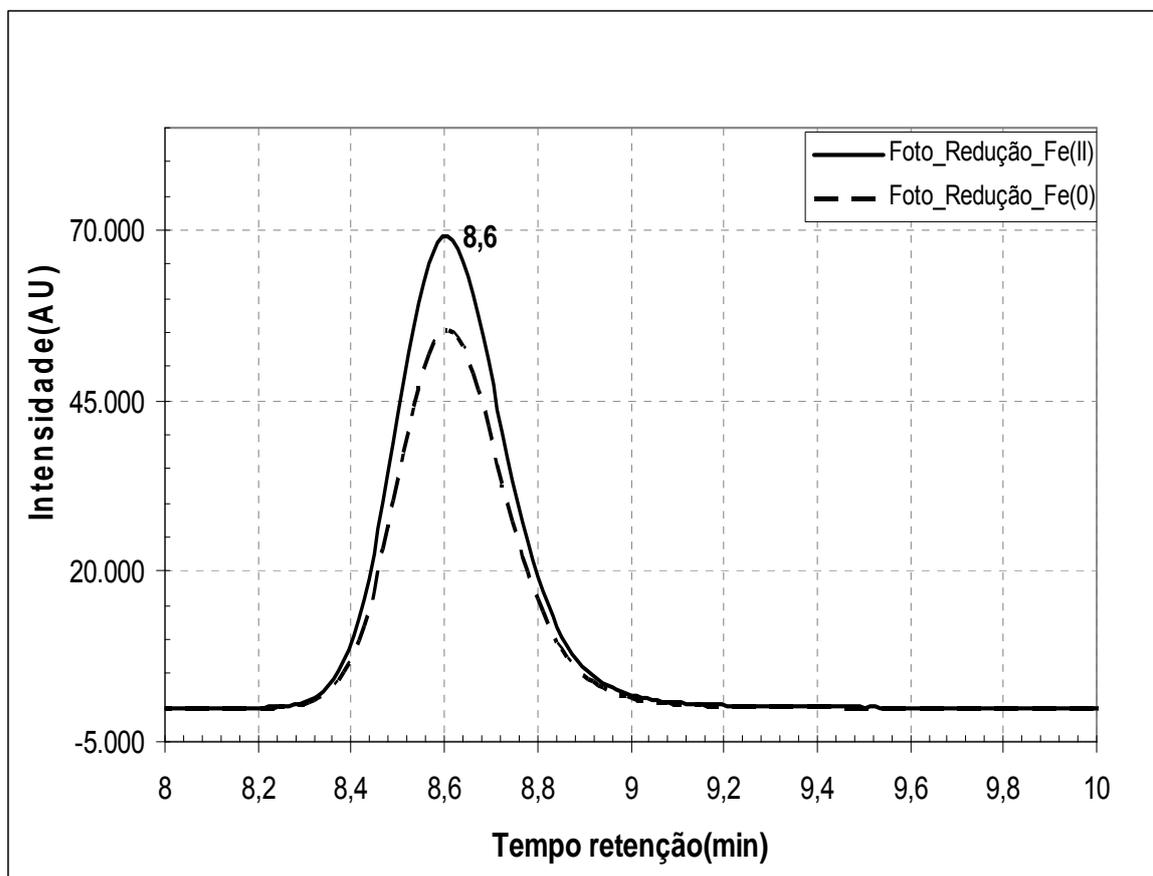


Figura 5.29: Ampliação de cromatogramas sobrepostos dos subprodutos da reação de foto-redução usando 6,70 mg L⁻¹ em Fe²⁺, e na presença de 2,8 mg em ferro, em 317 nm.

Nas reações redutivas, não foram observados os picos que surgiram nas reações onde o ferro metálico foi utilizado como fonte de íons ferrosos para a reação Fenton, vide Figura 5.26. Dessa forma, pôde-se concluir que os subprodutos de degradação por redução são diferentes dos compostos gerados pelo processo tipo-Fenton.

5.4. Influência do teor de ferro livre total na degradação do metronidazol

Nas reações Fenton, os íons ferrosos participam como catalisadores do processo de decomposição do peróxido de hidrogênio, gerando radicais hidroxila.

Shemer *et al* (2006) realizaram testes de decomposição do metronidazol usando diversas faixas de concentração de ferro, sob forma de Fe^{+2} . As melhores taxas de degradação foram encontradas para maiores razões Fe^{+2} /metronidazol. Um estudo dos teores de ferro em solução foi realizado como forma de entender o efeito da variação desse elemento sobre a degradação do fármaco pelas reações Fenton e tipo Fenton.

Os dados obtidos na análise por FAAS e CLAE, Tab. 5.1, indicaram que nas reações onde o ferro é adicionado sob forma de solução ferrosa, obtêm-se taxas de remoção de metronidazol de 100%. Quando a solução foi substituída trocada pela adição de Fe^0 comercial, as taxas de remoção foram ligeiramente inferiores.

Tabela 5.1. Influência dos teores de ferro na degradação do metronidazol.

Reação	Fonte de Ferro	Tempo de reação (min)	Fe total (mg L^{-1})	Metronidazol % degradação
Fenton Clássico	Fe^{+2}	30	6,07	100,0
Foto-Fenton Clássico	Fe^{+2}	30	6,00	100,0
Tipo Fenton	Fe^0 (1,4mg)	30	1,31	66,5
Tipo Fenton	Fe^0 (2,8mg)	30	2,25	74,3
Tipo Fenton	Fe^0 (5,6mg)	30	3,80	84,9
Tipo Foto-Fenton	Fe^0 (2,8mg)	30	4,20	98,2
Redução	Fe^0 (2,8mg)	30	2,44	8,3
Redução	Fe^{+2}	30	6,30	0,9
Foto-Redução	Fe^0 (2,8mg)	30	4,68	30,7
Foto-Redução	Fe^{+2}	30	6,04	12,6
Foto-Redução	Fe^0 (2,8mg)	180	7,50	92,0
Foto-Redução	Fe^0 (2,8mg)	360	17,00	98,7

* concentração de Fe^{+2} de $6,70 \text{ mg L}^{-1}$

A reação tipo Fenton com 2,8 mg Fe^0 apresentou degradação de 74,3% , o que pode ser atribuído às menores concentrações de ferro total livre em solução, esse dado é coerente com a literatura. Nos processos tipo Fenton, pôde-se evidenciar que um aumento na quantidade de ferro inicial adicionado influencia na eficiência da reação. A remoção de fármaco foi proporcional ao aumento do ferro

adicionado, de 1,4 mg a 5,6 mg em Fe^0 o aumento foi 66,5% para 84,9%, no mesmo tempo reacional, conforme Tabela 5.1 e Fig. 5.30.

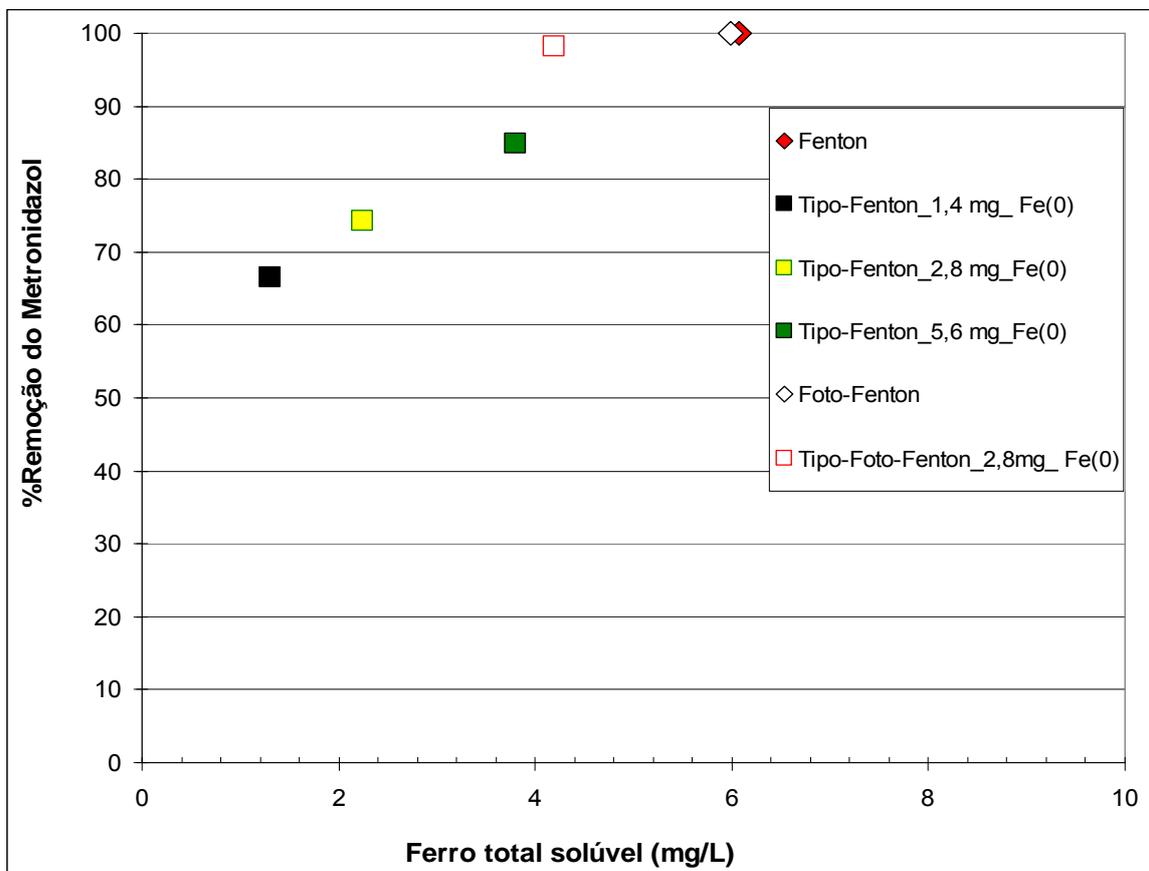


Figura 5.30: Influência do teor de ferro livre na decomposição do metronidazol, pH de $3,5 \pm 0,2$.

Na análise da Fig.5.30, pôde-se determinar ainda que o tratamento tipo Foto-Fenton pode degradar totalmente o fármaco, bem como apresenta os menores teores de ferro livre. Além disso, todos os tratamentos empregaram teores de ferro inferiores ao determinado pela Resolução n° 128/06 do Consema para águas residuais (10 mg.L^{-1} em Fe), exceto a reação de foto-redução com 360 minutos de duração, onde a quantidade de Fe total liberado foi de 17 mg.L^{-1} , vide Tab.5.1.

Os teores de fármaco degradado foram menores nas reduções, como apresentado na Tab 5.1; além disso, esse processo empregou os maiores teores de ferro livre, sendo que a presença de luz UVA melhorou o desempenho do tratamento. Nesse sentido, a melhor condição de redução foi com Fe^0 e irradiação, com teores de degradação de 30,7% em 30 minutos de reação.

Sendo que após 360 minutos- 98,7% do metronidazol se degradou. As reações Fenton e tipo Fenton que ocorreram sob radiação UVA foram mais promissoras, o que corresponde a estudos de literatura que indicam que a presença de luz UV regenera os íons ferrosos, conforme Eq. 5.8, potencializando a reação Fenton.



Outro aspecto importante é a possibilidade de degradação do metronidazol, usando um outro caminho de reação através de redução. A Figura 5.31 apresenta um gráfico comparativo entre os processos redutivos, usando como fonte de ferro o Fe^{+2} (inicial adicionado $6,70 \text{ mg.L}^{-1}$) e Fe^0 (inicial de $2,8 \text{ mg}$ de sólido adicionado), todas as reações tiveram tempo total de 30 minutos.

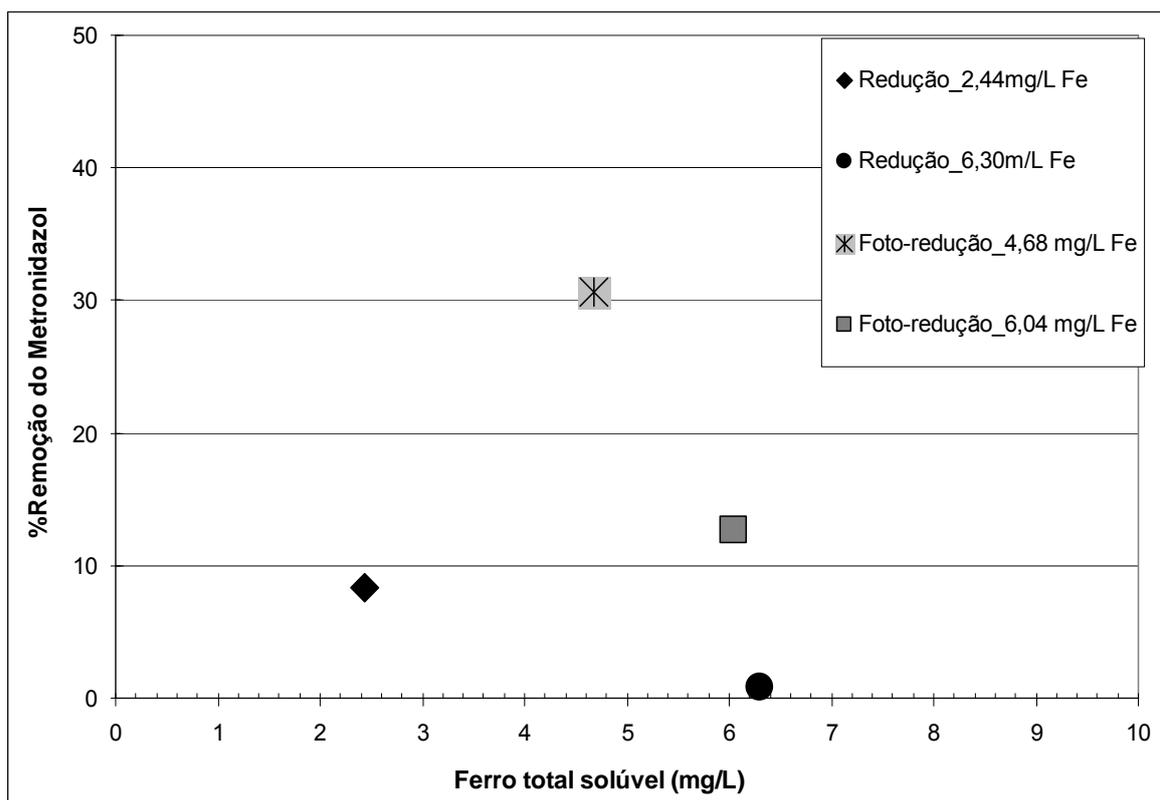


Figura 5.31: Influência do tipo de ferro na decomposição do metronidazol pelo processo de redução, fonte Fe^0 (quadrado) e fonte Fe^{+2} (círculos).

A interpretação da Figura 5.31 demonstra a maior eficiência na degradação por redução do metronidazol quando do uso do Fe^0 . Ainda que a concentração de

ferro livre fosse superior quando Fe^{+2} foi adicionado (6,04 e 6,30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), essas reações tiveram desempenho inferior para a remoção do fármaco, em relação aos processos com Fe^0 (2,44 e 4,68 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

5.5. Análise dos subprodutos

5.5.1. Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção DAD

A degradação do metronidazol nos processos Fenton e Foto-Fenton; bem como na reação tipo Fenton irradiada foi eficiente, conforme valores de remoção percentual apresentados na Tabela 5.1. Em virtude dos picos que surgiram nos cromatogramas das Fig. 5.14 e 5.15, foi realizada a análise dos subprodutos das reações Fenton e tipo Fenton após um tempo de 30 minutos em sistema HPLC-DAD, buscando identificar esses compostos. A Figura 5.32 traz o espectro tridimensional do padrão de metronidazol na concentração de 10,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

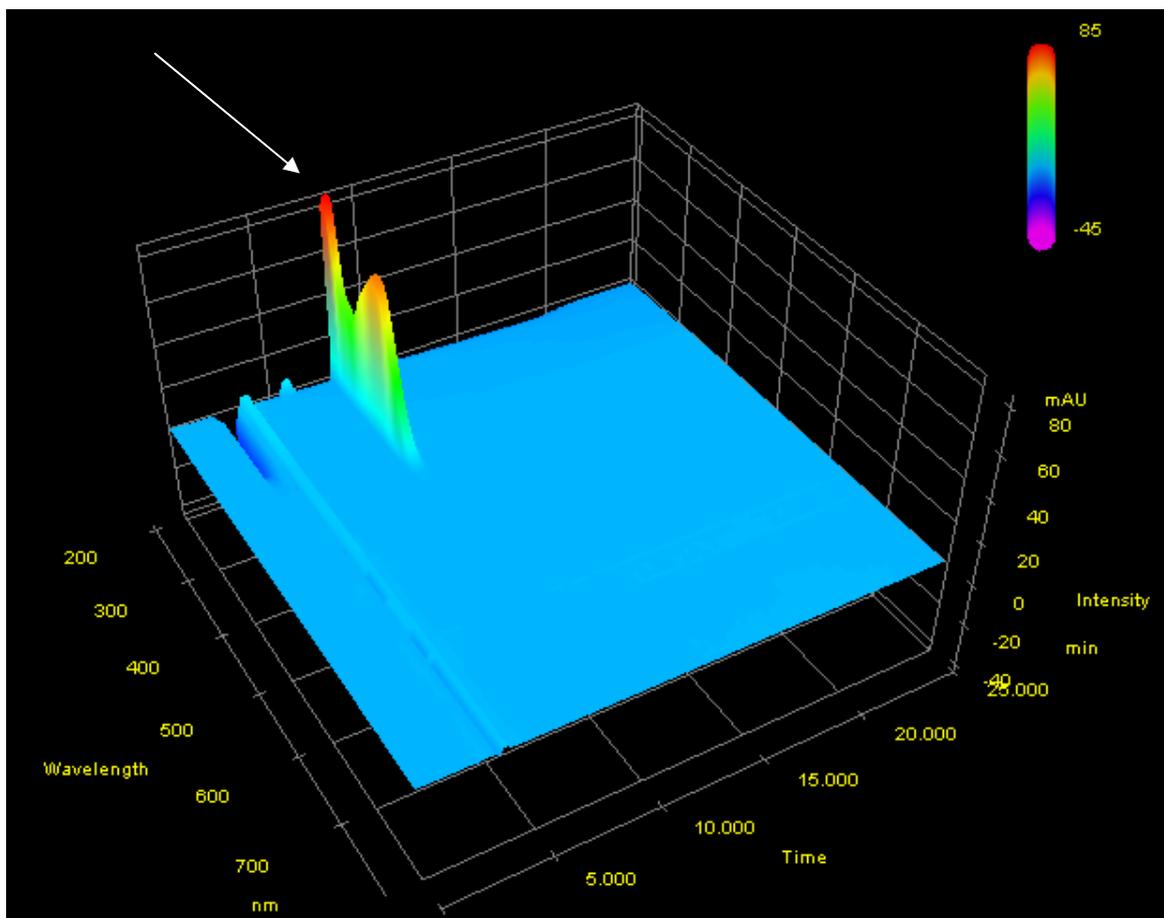


Figura 5.32: Espectro tridimensional do padrão de metronidazol, concentração de 10,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Na Fig. 5.32, pôde-se compreender que o fármaco apresentou tempo de retenção de aproximadamente 9 minutos, sendo que não existiram outros picos interferentes nesse espectro.

O espectro da Figura 5.33 pertence aos subprodutos de degradação do metronidazol, após a reação Fenton clássica. Nesse espectro ficou evidente a inexistência do fármaco, porém se observou a presença de uma mistura de compostos.

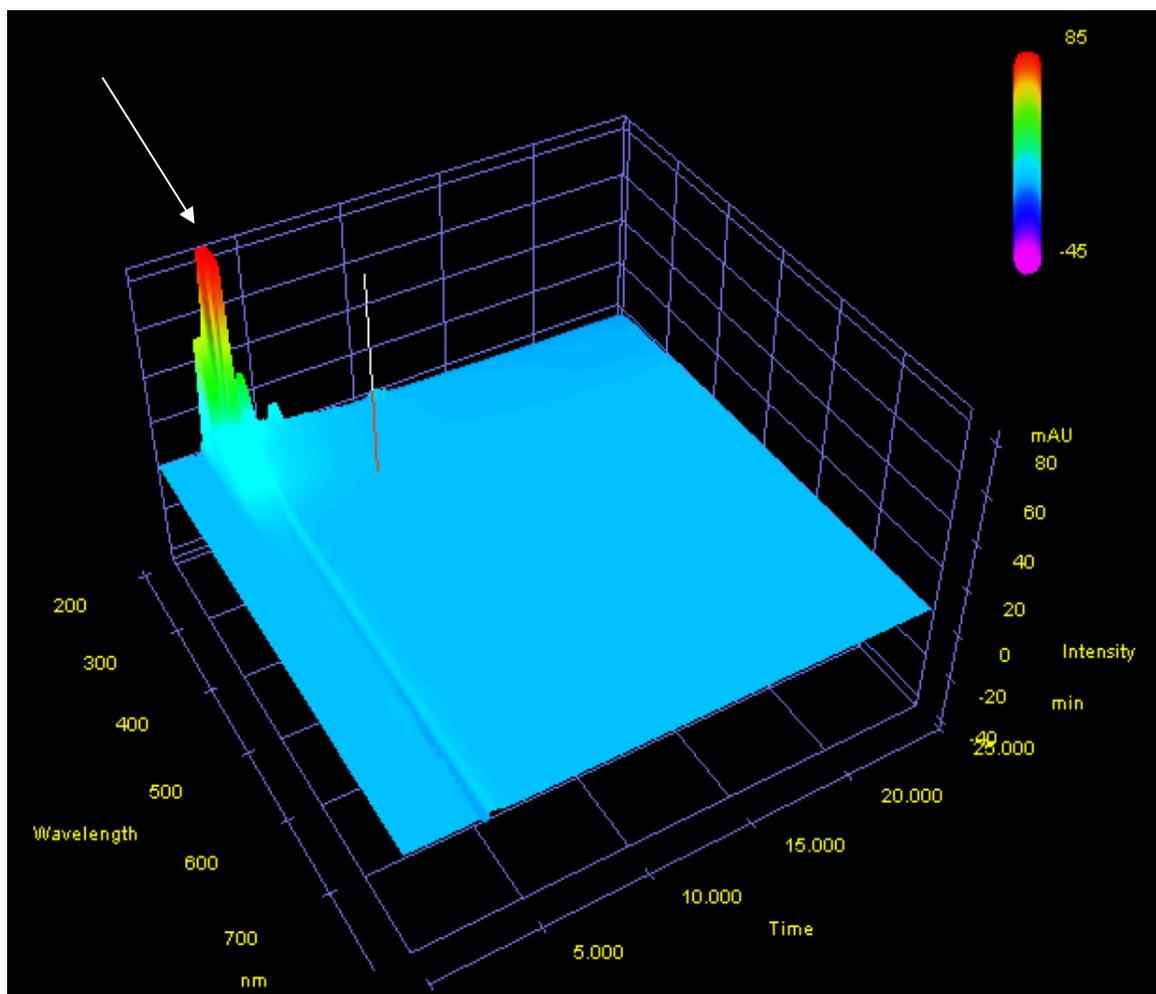


Figura 5.33: Espectro tridimensional dos subprodutos da reação Fenton clássica.

Esses subprodutos foram eluídos rapidamente, o que demonstrou suas características predominantemente polares. Outro fator relevante foi a inexistência de subprodutos apolares em relação ao metronidazol, pois acima de 10 minutos

não apareceram outros picos. Na Figura 5.34 é retratado o espectro 3D dos subprodutos resultantes da reação tipo foto-Fenton.

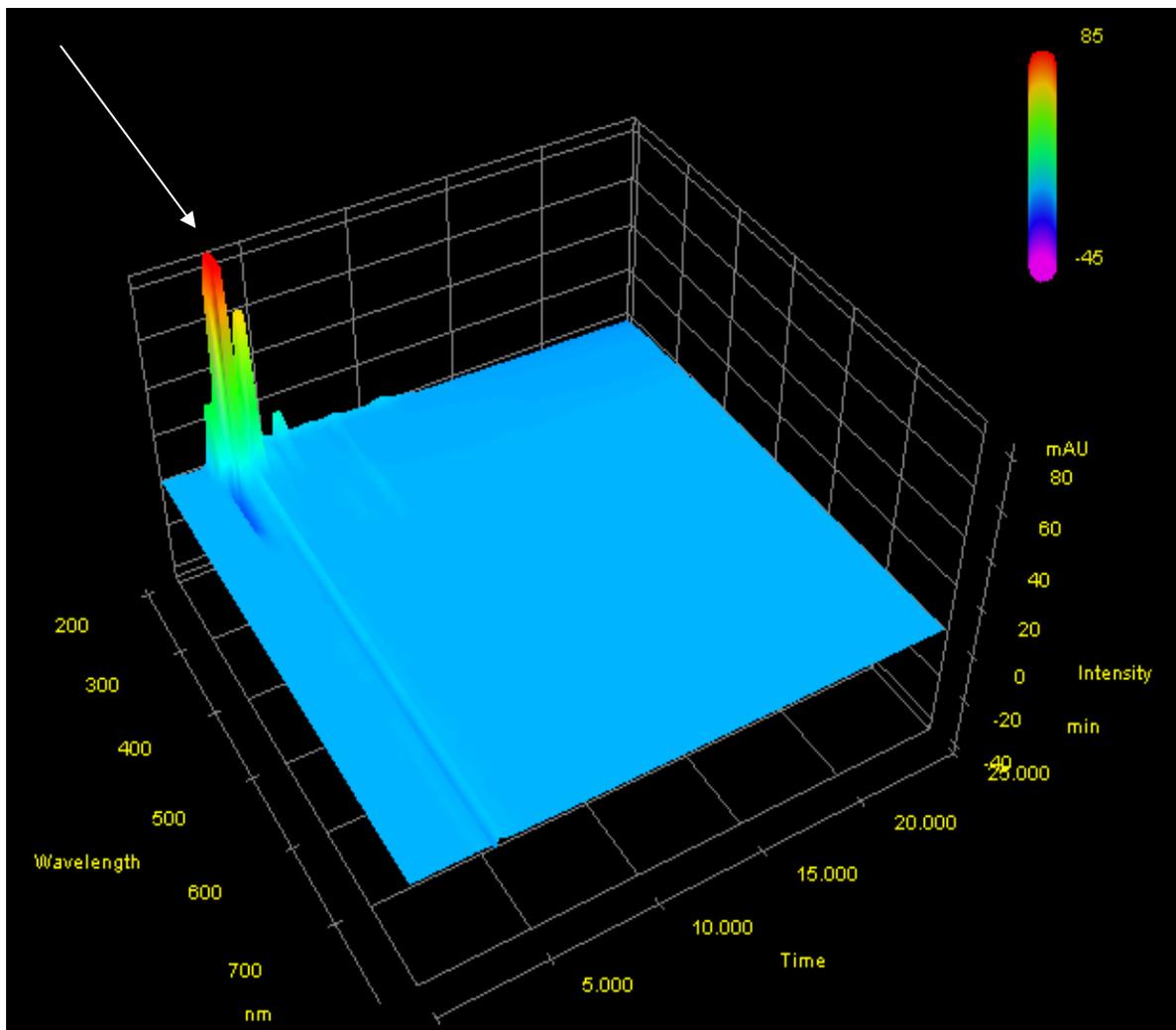


Figura 5.34 Espectro tridimensional dos subprodutos da reação tipo foto-Fenton.

Os dados demonstrados pelos espectros revelaram que os subprodutos da reação Fenton clássica e tipo Foto-Fenton são semelhantes, sendo que ambos absorveram no UV baixo, apresentando características polares; além disso, estas moléculas formam uma mistura complexa e de difícil separação. Outro aspecto relevante observado nas análises foi a presença de subprodutos diferentes quando a degradação do fármaco é incompleta e comparando as duas vias reacionais distintas: tipo Fenton (30 minutos de reação) e foto-redução(180 minutos de reação), conforme Figura 5.35.

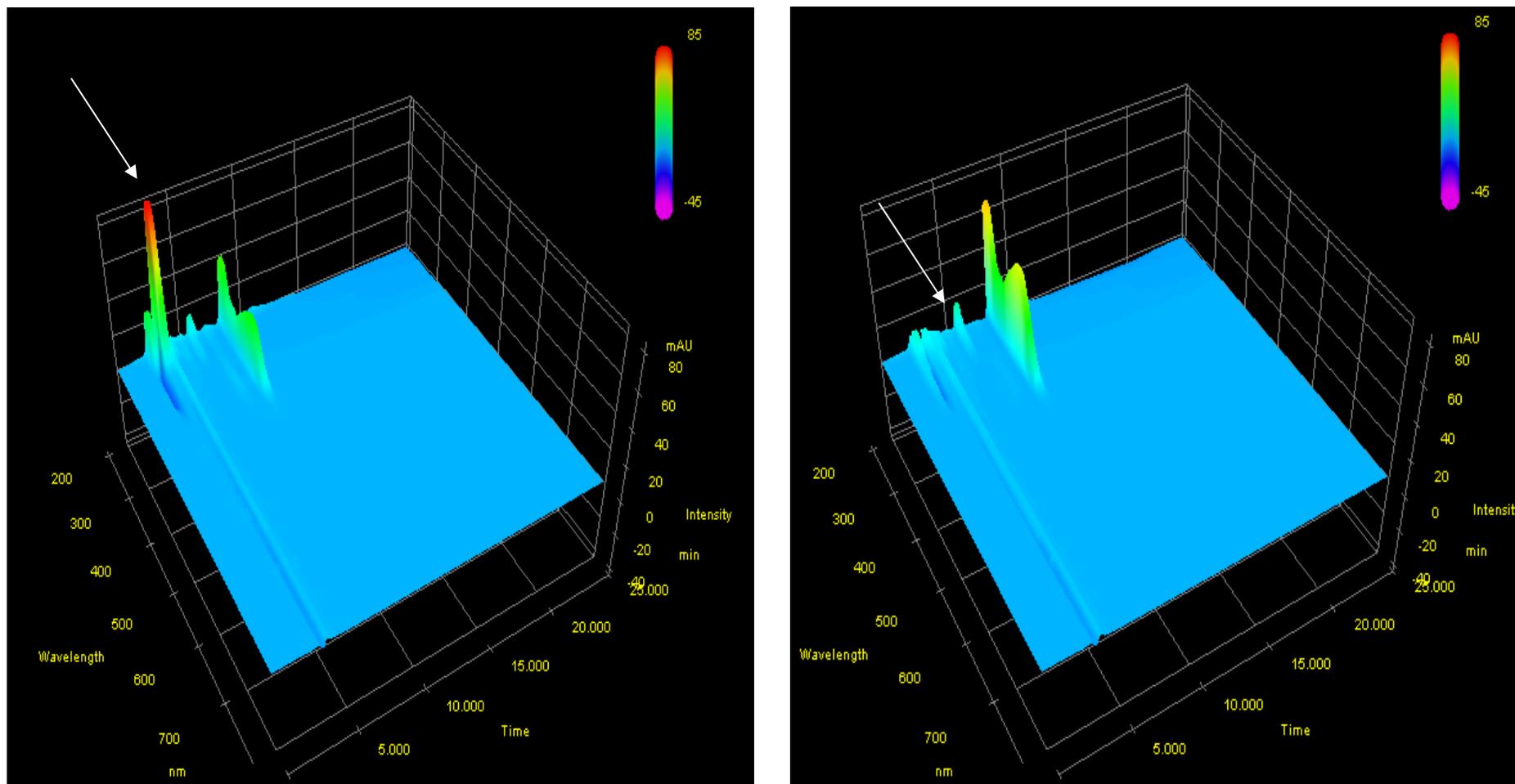


Figura 5.35: Espectro tridimensional dos subprodutos da reação tipo Fenton (esquerda), e dos subprodutos para a reação de foto-redução com Fe^0 (direita).

Através da interpretação dos espectros da Fig. 5.35, pôde-se avaliar que os subprodutos da redução e da reação tipo-Fenton foram bastante diferentes. No espectro à esquerda, se observou a presença dos compostos típicos de oxidação, como os derivados hidroxilados com baixo tempo de retenção na fase reversa; para o espectro da direita isto não foi verificado. Conforme dado de literatura Roy *et al* (2003), o meio ácido em presença de oxigênio e Fe^0 favorecem a formação de peróxido de hidrogênio, iniciando o processo Fenton.

Nesse sentido, esperava-se que os subprodutos das reações Fenton e tipo Fenton fossem semelhantes aos dos processos redutivos; entretanto isto não foi verificado. Conforme Figs. 5.34 e 5.35, os subprodutos desses processos são diferentes, isso sugere que nas reduções predominou o ataque do ferro sobre a matéria orgânica reduzindo a mesma. Pôde-se salientar ainda, que a reação de redução é menos eficiente para a degradação, uma vez que a área do metronidazol foi maior para esses espectros, apesar o tempo reacional ser superior ao do processo Fenton.

5.5.2. Cromatografia Iônica

O estudo dos subprodutos por cromatografia iônica foi realizado como ferramenta de identificação dos íons resultantes da decomposição do fármaco. A Tabela 5.2 expressa a concentração dos principais ânions orgânicos e inorgânicos resultantes na decomposição do metronidazol.

Tabela 5.2. Teores de em mg L^{-1} dos ânions orgânicos e inorgânicos, após as reações de degradação do metronidazol, 30 minutos de reação.

Amostra	Concentração em mg L^{-1}					% Remoção de metronidazol
	Fonte ferro	Nitrato	Nitrito	Acetato	Formiato	
Fenton clássica	Fe^{+2}	6,18	< LD	0,71	0,65	100,0
Foto-Fenton clássica	Fe^{+2}	5,13	< LD	< LD	0,56	100,0
Tipo Fenton	Fe^0	4,61	0,14	2,18	0,29	74,3
Tipo Foto-Fenton	Fe^0	5,07	< LD	1,79	1,05	98,2
Foto-Redução	Fe^{+2}	2,46	0,23	1,51	0,41	12,6
Foto-Redução	Fe^0	1,84	0,43	1,78	0,33	30,7

Na Tabela 5.2, pôde-se observar que após as reações foram liberados ânions orgânicos, com destaque para o formiato que esteve presente em todos os subprodutos analisados. A presença de íons oxalato não foi relatada em nenhuma das amostras. Os teores de nitrato liberados foram proporcionais ao aumento da remoção do metronidazol.

Com base em cálculos estimou-se a concentração final de nitrogênio nos subprodutos, caso toda a molécula de metronidazol fosse rompida, promovendo a mineralização total em relação ao nitrogênio, ver Figura 3.2. O valor calculado para a liberação total dos nitrogênios da molécula sob forma de nitrato e nitrito foi de 2,53 mg L⁻¹ em N, em uma concentração inicial de 10,0 mg L⁻¹ em metronidazol. A Tabela 5.3 destaca os valores calculados das quantidades em N, obtidas a partir cromatografia iônica.

Tabela 5.3. Concentração em mg L⁻¹ de N calculado, após as reações de degradação do metronidazol.

Reação	Fonte de Ferro	N total em solução (mg L ⁻¹) ^a	% Remoção metronidazol
Fenton clássica	Fe ⁺²	1,62	100,0
Foto-Fenton clássica	Fe ⁺²	1,16	100,0
Tipo Fenton	Fe ⁰	1,08	74,3
Tipo Foto-Fenton	Fe ⁰	1,14	98,2
Foto-Redução	Fe ⁰	0,57	30,7
Foto-Redução	Fe ⁺²	0,62	12,4

a : valores calculados com base na concentração de NO₃⁻ e NO₂⁻ indicada na CI

A análise das Tabelas. 5.2 e 5.3, demonstra que nas reações Fenton e tipo Fenton o ataque à molécula foi mais efetivo, pois os valores em nitrogênio total foram superiores aos obtidos nas reduções; entretanto nenhuma das reações listadas promoveu a mineralização total dos nitrogênios presentes na molécula, com a conversão total a 2,53 mg L⁻¹ em nitrito e nitrato. Na reação Fenton, em

torno de 64% do nitrogênio proveniente do metronidazol foi convertido a nitrato e nitrito; sendo essa condição a mais favorável em termos de mineralização dos N.

5.6. Ensaio de toxicidade com os subprodutos

Os ensaios de toxicidade foram realizados com as amostras onde se verificou a degradação completa do fármaco. Esse procedimento foi feito com o intuito de analisar a toxicidade dos meios reacionais e dos subprodutos de reação, sem a possível interferência de fármaco residual. As análises foram realizadas como forma de determinar a faixa média do CE₅₀. Os organismos foram colocados em contato com várias faixas de diluição dos subprodutos da reação Fenton clássica, tipo Fenton e reação de redução. Todas as amostras reagiram sob luz UV, sendo os processos fotos irradiados. Salienta-se que tempo total dos tratamentos Fenton foi de 30 minutos e das reações de redução com total de 360 minutos. A tabela 5.4 apresenta os resultados dos ensaios de toxicidade realizados.

Tabela 5.4. Avaliação da toxicidade de amostras sintéticas após tratamento de decomposição do metronidazol para *Daphnia Similis*, em 48 horas.

Amostra	Elementos presentes	faixa CE ₅₀
Metronidazol 10 mg L ⁻¹	-----	48 – 73%
Meio reacional Fenton	H ₂ O ₂ , Fe ⁺² e Fe ⁺³	64 – 81%
Subprodutos reação Fenton	H ₂ O ₂ , Fe ⁺² e Fe ⁺³ , subprodutos ^b	64 – 79%
Meio reacional tipo Fenton	H ₂ O ₂ , Fe ⁺² e Fe ⁺³	95% ^a
Subprodutos reação tipo Fenton	H ₂ O ₂ , Fe ⁺² e Fe ⁺³ , subprodutos ^b	65% ^a
Meio reacional redução	Fe ⁺² e Fe ⁺³	68% ^a
Subprodutos reação redução	Fe ⁺² e Fe ⁺³ , subprodutos ^c	64% ^a

^a : valor de uma medida ; ^b: subprodutos Fenton e tipo Fenton; ^c: subprodutos de redução

Os valores do CE_{50} mostraram que, após os processos de tratamento, as toxicidades foram semelhantes. Os produtos das reações Fenton, tipo Fenton e reações de redução tiveram valores de CE_{50} muito próximos.

As faixas de CE_{50} indicaram que os tratamentos não produzem subprodutos mais tóxicos que o próprio metronidazol, pois não houve diminuição no valor do CE_{50} , indicativo de que a toxicidade aumentou. Esses resultados são relevantes, na medida em que dados de literatura relatam que após processos de degradação, os compostos resultantes do fármaco são mais nocivos que o mesmo, Sánchez-Pólo (2009); Sánchez-Pólo (2008).

Os meios reacionais utilizados nos processos Fenton não apresentaram toxicidade significativa, uma vez que, também ficaram próximos aos valores do CE_{50} das amostras após tratamento. A limitação desse estudo foi a interpretação dos dados, pois os valores de toxicidade encontrados para as amostras são relativamente semelhantes aos do meios reacionais e, assim a toxicidade resultante poderia ser atribuída ao próprio meio inerente a cada tratamento.

Conforme dados da Agência de Proteção Ambiental Americana-EPA, ferro e peróxido de hidrogênio apresentaram toxicidade para *Daphnids*, mesmo em baixos níveis. Foi relatada toxicidade aguda de Fe^{+2} na forma de sulfato para *Daphnia magna* com CE_{50} de $7,2 \text{ mg L}^{-1}$; para Fe^{+3} na forma de cloreto CE_{50} de $5,9 \text{ mg L}^{-1}$. Cabe ressaltar ainda que o peróxido de hidrogênio também apresentou toxicidade para *Daphnia magna* com CE_{50} de $2,3 \text{ mg L}^{-1}$. Esses dados reforçam que os valores de CE_{50} encontrados após os processos de tratamento não podem ser relacionados exclusivamente aos subprodutos de degradação do fármaco.

Nas amostras da Tabela 5.4, o ferro total livre não foi precipitado ou eliminado. Esse procedimento foi adotado para que a amostra resultante dos tratamentos fosse o mais próxima de um efluente logo após reação de degradação. Portanto a toxicidade apresentada pelas amostras também tem a contribuição do sinergismo entre os subprodutos com o ferro livre, além do peróxido de hidrogênio residual nas reações Fenton e tipo Fenton.

Para o composto em estudo a faixa de toxicidade foi de 4,8 a 7,5 mg L⁻¹. Esses teores estão acima dos valores encontrados em amostras ambientais; normalmente na faixa de ng L⁻¹ (Rosal *et al*, 2009); entretanto, estudos da ecotoxicidade do metronidazol são escassos, e ensaios específicos com *Daphnia similis*, praticamente inexistentes. Nesse sentido, os dados apresentados demonstraram que o composto apresenta toxicidade sobre estes organismos, o que reforça a importância do estudo desse parâmetro sobre os processos de tratamentos envolvendo o fármaco metronidazol.

Com base na Resolução Consema n°129/2006, legislação estadual vigente que define padrões de emissão para toxicidade de efluentes líquidos, os padrões são definidos caso a caso, baseados na vazão do efluente e do corpo receptor. Nessa norma é enfatizada a necessidade de ensaios agudos com organismos de, pelo menos, três níveis tróficos para se estabelecer o padrão de emissão. Nesse sentido, o conhecimento do efeito dos efluentes contendo metronidazol ganha importância, principalmente para efluentes hospitalares, na medida em que a legislação estabelece prazos para a adequação das instituições, sendo que alguns tipos de empreendimento têm prazo até novembro de 2010 para se adequar à legislação.

6. CONCLUSÕES

Na análise das reações Fenton clássicas, verificou-se que a degradação do metronidazol ocorre nas condições adotadas. A reação Fenton na presença de radiação UVA apresentou comportamento semelhante ao da reação sem radiação. Uma nova ferramenta de degradação do metronidazol foi viabilizada, usando como fonte de íons ferrosos, uma pequena quantidade de Fe^0 comercial, de baixo custo e fácil remoção, conseguindo degradação de praticamente 100% no processo tipo foto-Fenton, com tempo total de 30 minutos de reação.

Nas reações de redução do composto, em presença de Fe^0 , os tempos reacionais para a remoção completa do metronidazol foram superiores aos processos oxidativos, com total de 360 minutos. Para esses tratamentos houve uma grande liberação de ferro para a solução, em virtude do longo tempo para degradação; com concentração final de Fe livre de aproximadamente 17 mg L^{-1} . Esse valor é superior ao padrão de emissão para efluentes estabelecidos pela legislação vigente; assim os processos oxidativos apresentaram as melhores degradações, usando concentrações de ferro inferiores à estabelecida na legislação.

A degradação do metronidazol foi avaliada em amostras sintéticas, e se verificou que a técnica de espectrofotometria de UV-VIS é insuficiente para acompanhar as reações quando na presença de ferro. Assim, técnicas analíticas complementares e seletivas, como a cromatografia líquida de alta eficiência, devem ser adotadas para verificação da remoção do fármaco. A avaliação da toxicidade realizada com *Daphnia similis* revelou que os processos de decomposição geram subprodutos com toxicidade semelhante ou inferior ao do fármaco.

Os dados analíticos, concomitantemente, com testes de toxicidade indicam que os processos aqui propostos foram eficazes no tratamento desse fármaco,

pois os dados de literatura indicam que, geralmente, os subprodutos dos tratamentos são mais tóxicos que o próprio metronidazol.

7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- A proposta deste trabalho foi avaliação da capacidade das reações Fenton homogênea e heterogênea na degradação do metronidazol. Concluiu-se que os processos são eficientes; entretanto não houve tempo hábil para o emprego desses processos em amostras reais de efluentes, sobretudo de águas residuais provenientes de hospitais, grandes emissores desses compostos. Assim, propõe-se o uso dessas reações como ferramenta de tratamento desses efluentes.

- Outra indicação seria o estudo do comportamento de soluções contendo o fármaco metronidazol sob forma de comprimido, mediante os POAS abordados neste trabalho.

- A otimização de técnicas analíticas para a determinação dos subprodutos se configura em uma nova perspectiva de pesquisa; uma vez que, em virtude da complexidade da mistura de moléculas, não foi possível, até este momento identificar todos os compostos oriundos da decomposição do fármaco.

- Em virtude das propriedades mutagênicas do fármaco, estudos futuros devem incluir análises de toxicidade, como forma de conhecer o comportamento dos subprodutos no meio ambiente. A realização de ensaios de toxicidade com organismos de outros níveis tróficos além dos crustáceos, como peixes e algas, é necessária.

- Realização de estudos de genotoxicidade também deve ser considerada para esse fármaco e seus subprodutos de tratamento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSALIN, M.R.; Durán, N. Novas tendências para aplicação de ozônio no tratamento de resíduos: ozonização catalítica. **Revista Analytica**, 76-86 , 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (*Crustacea, Cladocera*): NBR-12.713. São Paulo, 2004. 16 p.

BENDESKY, A.; Menéndez, D.; Ostrosky-Wegman, P, Is metronidazole carcinogenic? **Mutation Research** , 511, 133-144, 2002.

BOLUDA. R.; *et alli*. Application of the Microtox[®] test and pollution indices to the study of water toxicity in the Albufera Natural Park (Valencia, Spain). **Chemosphere**, 46, 355-369, 2002.

BURATINI, S.V.; Bertoletti, E.; Zagatto, P.A. Evaluation of *Daphnia similis* as a test species in ecotoxicological assays . **Bull. Environ. Contam.Toxicol**, 73, 878-882, 2004.

CAO. G.M.; *et alli*. Regeneration and reuse of iron catalyst for Fenton-like reactions. **J. Hazardous Materials**, 172, 1446-1449, 2009.

CAVALOTTI. L.F.R.; *et alli*. Degradação de espécies nitroaromáticas e remediação de efluentes da indústria de explosivos, utilizando-se processos redutivos-oxidativos fundamentados no uso de ferro metálicos. **Química Nova**, v. 32, 6, 1504-1508, 2009.

CONAMA. Resolução n° 357. Brasília/DF, 2005. 23 páginas.

CONSEMA. Resolução n° 128. Porto Alegre/RS, 2006. 9 páginas.

CONSEMA. Resolução n° 129. Porto Alegre/RS, 2006. 8 páginas.

COSTA. C. R.; *et alli*. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, 7, 1820-1830, 2008.

DANTAS. R. F.; *et alli*. Direct UV photolysis of propanolol and metronidazole in aqueous solution. **Chemical Engineering Journal**, 158, 2, 143-147, 2009.

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

EPA. U.S. Environmental Protection Agency: ECOTOX:Aquatic Report. Disponível em: <<http://cfpub.epa.gov/ecotox/report.cfm>>. Acesso em: 25 setembro 2010.

FREEMAN, C. D.; Klutman, N. E.; Lamp, K. C. Metronidazole: a therapeutic review and update. **Drugs**, 54, 679, 1994.

FREIRE, R.S.; Pelegrini, S.; Kubota, L. T.; Durán, N.; Peralta-Zamorra, P. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. **Química Nova**, v. 23, 504, 2000.

GONZALÉZ, O.; Sans, C.; Esplugas, S. Sulfamethoxazole abatement by photo-Fenton Toxicity, inhibition and biodegradability assessment of intermediates. **J. Hazardous Materials**, 146, 459-464, 2007.

HALLING-SORENSEN, B.; Lanzky, P. F. The toxic effect of the antibiotic metronidazole on aquatic organisms. **Chemosphere**, 35, 11, 2553-2561, 1997.

HAMILTON, M.A.; Russo, R.C.; Thurston, R. V. Trimmed Spearman-Kärber for

Estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environment, Science & Technology**, 11, 7, 714-719, 1977.

HASSEMER, M. E. N., **Oxidação Fotoquímica- UV/H₂O₂- para a degradação de poluentes em efluentes da indústria têxtil**. Florianópolis. 2006. 162p. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental). Departamento de Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil.

HERMOSILLA, D.; Cortijo, M.; Huang, C. P. Optimizing the treatment of landfill leachate by conventional Fenton and photo-Fenton processes. **Science of the Total Environment** , 407, 3473-3481 , 2009.

IPEN. Centro de Química e Meio Ambiente. Disponível em:<: <https://www.ipen.br/sitio/?idc=388>>. Acesso em: 10 junho 2010.

JORGENSEN, S. E.; Halling-Sorensen, B. Drugs in the environment. **Chemosphere** , 40, 691-699, 2000.

KAJITVICHYANUKUL, P.; Suntronvipart, N. Evaluation of biodegradability and oxidation degree of hospital wastewater using photo-Fenton process as the pretreatment method. **J. Hazardous Materials**, B 138, 384-391 , 2006.

KASPRZYH-HORDERN, B.; Ziótek, M.; Nawrocki, J. P. Catalytic ozonation and methods of enhancing molecular ozone reactions in water treatment. **Appl. Catal.**, B, 46, 639, 2003.

KHAN, E.; Wirojanagud, W.; Sermsai, N. Effects of iron type Fenton reaction on mineralization and biodegradability enhancement of hazardous organic compounds. **J. Hazardous Materials**. 161, 1024-1034, 2009.

KLAVARIOTI, M; Mantzavinos, D; Kassinos, Removal of residual pharmaceutical from aqueous systems by advanced oxidation process. **Environment International**, 35,402-417, 2009

KOLPIN, D. W.; Furlog, E. T.; Meyer, M. T.; Thurman, E. M.; Zaugg, S. D.; Barber, L. B.; Buxton, H. T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: a national reconnaissance. **Environ. Sci. Technol** , issue. 36, 1202, 2002.

Kummerer, K. The presence of pharmaceutical in the environment due to human use- present knowledge and future challenge. **Journal of Environmental Management** , 90, 8, 2354-2366, 2009.

LINDEBERG, R.; Jarnheimer, P.; Olsen, B.; Johansson, M.; Tysklind, M. Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. **Chemosphere** , 57, 1479-1488, 2004.

MELO. S. A. S.; *et alli*. Degradação de fármacos residuais por Processos Oxidativos Avançados. **Química Nova**, v. 32, 1, 188-197, 2009.

MENÉNDEZ, D; *et alli*. DNA breakage due to metronidazole treatment. **Mutat Res.**, 478, 153-158 , 2001.

MUDRY, M.D; *et alli*. Metronidazole-induced alterations in murine spermatozoa morphology. **Reproductive Toxicology.**, 23, 246-252 , 2007.

NEYENS. E.; Baeyens, J. A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. **Journal of Hazardous Materials**, v. B98, 33-50, 2003.

NOGUEIRA, R. F. P.; Trovó, A. G.; Silva, M. R. A.; Villa, R. D. Fundamentos e Aplicações Ambientais dos Processos Fenton e Foto-Fenton. **Química Nova**, v. 30, 2, 400-408, 2007.

PARK, J. S.; Choi, H.; Cho, J. Kinetic decomposition of ozone and para-

chlorobenzoic acid (*p*CBA) during catalytic ozonation. **Water Research**, 28, 2285-2292, 2004.

PATERLINI, W. C.; Nogueira, R. F. P. Multivariate analysis of photo-Fenton degradation of the herbicides tebuthiuron, diuron and 2,4 D, **Chemosphere**, 58, 1107-1116, 2005.

PASSMORE, C. M; et alli. Metronidazole excretion in human milk and its effects on the suckling neonate. **Br.J.Clin.Pharmacol.**, 26, 45-51 , 1988.

PEREIRA, W. S.; Freire, R.S. Ferro Zero: Uma nova abordagem para o tratamento de águas contaminadas com compostos orgânicos poluentes, **Química Nova** , 28, 1, 130-136, 2005.

POLO, M. S.; Utrilla, J. R.; Joya, G. P.; Ferro- García, M. A.; Bautista-Toledo, I. Removal of pharmaceutical compounds, nitroimidazoles, from waters by using the ozone/carbon system, **Water Research** , 42, 4163-4171, 2008.

Rodríguez-Gil, J.L.; et alli. Heterogeneous photo-Fenton treatment for the reduction of pharmaceutical contamination in Madrid rivers and ecotoxicological evaluation by a miniaturized fern spores bioassay. **Chemosphere**, 80, 381-388, 2010.

Roy, G; et alli. Study of trapaeolin degradation by iron- proposition of a reaction mechanism. **Water Research**, 37, 4954-4964, 2003.

ROSAL, R.; et alli. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonization. **Water Research**, 44, 2, 578-588 , 2009.

SÀNCHEZ-POLO, M.; et alli. Combination of ozone with activated carbon as an alternative to conventional advanced oxidation processes. **Ozone Sci.Engineer**, 28, 237-245 , 2009.

SÀNCHEZ-POLO, M.; et alli. Gamma irradiation of pharmaceutical compounds, nitroimidazoles, as a new alternative for water treatment. **Water Research**, 43,161-4028-4036 , 2009.

SHEMER, H.; Kunukcu, Y. K.; Linden, K. G. Degradation of the pharmaceutical Metronidazole via UV, Fenton and photo-Fenton processes. **Chemosphere**, 63, 269-276 , 2006.

SILVEIRA, I.C.T; et alli. Degradation of Metronidazole by Ozonation Process In. 10th IOA-EA3G Berlin Conference, 2009, Berlim. **Proc. paper PC197**. Berlim:Int. Water Assoc., 2009.

TALLY, F. P.; Sullivan, C.E. Metronidazole: in vitro activity. **Pharmacotherapy**, 1, 28-38, 1981.

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

TERNES, T. A. Stumpf M. Simultaneous determination of antiseptics and acidic drugs in sewage and river water. **Vom Wasser** , 90, 295-309, 1998.

THIELE, B. Pharmaceutcal antibiotic compounds in soil- a review. **J. Plant Nutr. Soil Sc** , 166, 145-167, 2003.

YANG, Y.; et alli. Microwave enhanced Fenton-like process for the treatment of high concentration pharmaceutical wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, 168, 238-245 , 2009.

VANELLE, P.; et alli. Lowering of 5-nitroimidazole´s mutagenicity: Towards optimal antiparasitic pharmacophore. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 44, 653-659 , 2009.

WANG, S. A comparative study of Fenton and Fenton-like reactions kinetics in

decolourisation of wastewater. **Dyes and Pigments** , 76, 714-720, 2008.

WOLLENBERGER, L.; Halling-Sorensen, B.; Kusk, J. O. Acute and Chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia Magna*. **Chemosphere**, 40, 723-730 , 2000.

ZEPP, R. G.; Faust, B. C.; Hoigne, J. Hydroxyl radical formation in aqueous reactions (pH 3-8) of Iron (II) with hydrogen peroxide: the photo-Fenton reaction. **Environmental Science e Technology**, 26, 2, 313-319 , 1992.

ZWIENER, C.; Frimmel, F. H. Oxidative treatment of pharmaceutical in water. **Water Research**, 34, 1881-1885 , 2000.

ANEXO A

Carta de aprovação do Comitê de Ética para Uso de Animais da PUCRS-CEUA para os ensaios de toxicidade realizados com *Daphnia similis*.