

Deteção e degradação do antibiótico minociclina em águas residuais

Miguel Martins Lamúria

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Química

Orientadores:

Prof. Ana Clara Lopes Marques

Prof. Susete Maria Martins Dias

Júri

Presidente: Prof. Cristina Fernandes

Orientador: Prof. Susete Martins Dias

Vogal: Prof. José Madeira Lopes

junho de 2022

Declaração

Declaro que o presente documento é um trabalho original da minha autoria e que cumpre todos os requisitos do Código de Conduta e Boas Práticas da Universidade de Lisboa.

Agradecimentos

Começo por expressar a minha gratidão para com as Professoras Ana Clara Lopes Marques e Susete Martins Dias, cuja mentoria, dedicação e sinceridade foram fundamentais para concretizar este percurso. Agradeço também à Renata, que me guiou nos laboratórios, e à Sofia, por estar sempre disposta a ajudar.

Aos meus companheiros da equipa de futebol do Instituto pelas lições de amizade, disciplina e união; aos meus colegas de curso, pelas boas memórias e explicações gratuitas.

Aos meus amigos de longa data, por me fazerem querer ser sempre melhor.

À minha namorada, que não me deixou falhar.

Aos meus pais, a quem dedico este trabalho.

Resumo

O facto de serem antibióticos de baixo custo e largo espectro de atividade fazem das tetraciclina o terceiro grupo de antibióticos mais consumido globalmente. Estas circunstâncias, aliadas à pequena taxa de metabolização, que no caso da minociclina (MC) se fica pelos 40% da toma, levam à excreção diária de elevadas quantidades destes compostos para efluentes urbanos e rurais. Nas ETAR convencionais estes micropoluentes não são removidos, sendo libertados no meio recetor com a água tratada e contaminando-a com resíduos de antibióticos. Assim, urge desenvolver métodos de tratamento terciário que permitam a sua eliminação antes da descarga. Nesta categoria, processos que envolvem fotocatalise revelam-se promissores.

Começou-se por caracterizar a MC por espectrofotometria UV-Vis, TGA e FTIR, e a estabilidade de soluções aquosas à temperatura ambiente e a -20 °C. Posteriormente, determinou-se o tempo de meia vida da MC quando exposta à radiação solar em linhas de água. Para o efeito avaliou-se, inicialmente, a influência do tempo de exposição à radiação solar na degradação de MC em soluções a 10mg/L, usando um simulador solar acoplado a um reactor batch com recirculação. Introduziram-se, em dois momentos distintos, um filtro na fonte de luz original e um colimador no percurso ótico para se aferir o efeito da radiação na degradação. A quantificação da MC e eventuais sub-produtos da fotodegradação foi realizada por análise comparativa dos espectros UV-Vis (absorvância a 274 e 347 nm) e em HPLC-DAD.

Os resultados obtidos mostram que a fotodegradação da MC em solução aquosa, com pH inicial entre 5,4 e 5,7, ocorre com uma cinética que varia entre 0,03 e 0,115 min⁻¹ e o tempo de meia vida entre 21,9 e 6,1 minutos, para os ensaios de volume inicial de 100 mL com radiação filtrada e colimada, respetivamente. A análise por díodo array permitiu verificar que, no ensaio de 192 horas com recurso a luz colimada e com uma exposição real da solução de 10mg/L de 18 min, o pico correspondente à MC desapareceu na totalidade e a MC sofreu uma alteração total do seu espectro evidenciando a ocorrência de mineralização da MC.

Palavras-chave: minociclina, fotodegradação, métodos de tratamento terciário, simulador solar, fotólise, processos avançados de oxidação

Abstract

The tetracyclines constitute the third most consumed antibiotic group. Their low cost and broad spectrum of activity make them an attractive choice for people, especially in poor countries. However, the low metabolization rate - for instance, around 60% of the minocycline (MC) intake is excreted - of these compounds lead to of large quantities being discharged in urban and rural effluents. This represents a problem, given the fact that conventional WWTPs can't remove these micropollutants. Therefore, it is urgent to develop tertiary treatment methods that allow their elimination before discharge, with photocatalytic processes showing great promise in this regard.

UV-Vis, TGA and FTIR spectrophotometry were used to characterize the MC, besides studying the stability of aqueous solutions at room temperature and at -20 °C. Subsequently, the half-life of MC when exposed to solar radiation in water lines was determined. The influence of the exposure time to solar radiation on the degradation of MC in 10 mg/L solutions was initially evaluated using a solar simulator coupled to a batch reactor with recirculation. The effect of radiation was measured in two different ways: via the introduction of a filter in the original light source and through the placement of a collimator in the optical path of the light. The quantification of MC and possible sub-products of the photodegradation was performed by comparative analysis of UV-Vis spectra (absorbance at 274 and 347 nm) and in HPLC-DAD.

The results obtained show that the photodegradation of MC in aqueous solution, with an initial pH between 5,4 and 5,7, occurs with kinetics varying between 0,03 and 0,115 min⁻¹ and the half-life time between 21,9 and 6,1 minutes, for the 100 mL initial volume solution with filtrated and collimated light tests, respectively. The diode-array analysis showed that, in the 192-hour test using collimated light and with a real exposure time of the 10 mg/L solution of 18 min, the peak corresponding to the MC disappeared completely and the MC suffered a total change of its spectrum evidencing the occurrence of MC mineralization.

Keywords: minocycline, photodegradation, tertiary treatment methods, solar simulator, photolysis, advanced oxidation processes

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| DECLARAÇÃO | 3 |
| AGRADECIMENTOS | 4 |
| RESUMO | 5 |
| ABSTRACT | 6 |
| ÍNDICE DE TABELAS | 9 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 10 |
| LISTA DE ABREVIÇÕES | 13 |
| I. INTRODUÇÃO | 14 |
| I.1 OBJETIVOS..... | 15 |
| I.2 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO | 16 |
| II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 17 |
| II.1 A MINOCICLINA | 17 |
| II.1.1 A família das tetraciclinas, composição e características | 17 |
| II.1.2 O composto na medicina | 20 |
| II.1.2.1 Aplicações..... | 20 |
| II.1.2.2 Farmacocinética..... | 22 |
| II.1.3 Síntese..... | 23 |
| II.1.3.1 Mecanismo | 23 |
| II.1.3.2 Produção industrial..... | 24 |
| II.1.4 Mecanismos de ação e resistência..... | 25 |
| II.1.4.1 Mecanismo de ação..... | 25 |
| II.1.4.2 Mecanismo de resistência | 26 |
| II.2 TECNOLOGIAS DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS..... | 26 |
| II.2.1 Pré-tratamento | 27 |
| II.2.2 Tratamento primário | 27 |
| II.2.3 Tratamento secundário..... | 27 |
| II.2.4 Tratamento terciário..... | 28 |
| II.2.5 Remoção por Processos Avançados de Oxidação | 29 |
| II.2.5.1 Processos Fotoquímicos | 31 |
| II.2.5.1.1 O ₃ /UV | 31 |
| II.2.5.1.2 UV/H ₂ O ₂ | 32 |
| II.2.5.1.3 UV/H ₂ O ₂ /O ₃ | 32 |
| II.2.5.2 Processos Fotocatalíticos..... | 33 |
| II.2.5.2.1 TiO ₂ / UV..... | 33 |
| II.2.5.2.2 Foto-Fenton..... | 35 |
| II.2.5.3. Processos de Oxidação Química | 36 |
| II.2.5.3.1 O ₃ | 36 |
| II.2.5.3.2 O ₃ /H ₂ O ₂ | 36 |
| II.2.5.3.3 H ₂ O ₂ /Fe ²⁺ | 38 |
| II.2.5.4 Apreciação global dos PAO | 38 |
| II.3 FOTÓLISE..... | 38 |
| II.4 FOTODECOMPOSIÇÃO DE TETRACICLINAS | 40 |
| III. MATERIAIS E MÉTODOS | 44 |
| III.1 AMOSTRA..... | 44 |
| III.2 QUÍMICOS E REAGENTES | 44 |
| III.3 UNIDADE EXPERIMENTAL – SIMULADOR SOLAR | 44 |
| III.3.1 Descrição..... | 44 |
| III.3.2 Procedimento Experimental..... | 45 |
| III.4 MÉTODOS ANALÍTICOS..... | 47 |
| III.4.1 Espectroscopia UV-Vis..... | 47 |

| | |
|--|-----------|
| III.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência – diode array detection (HPLC - DAD)..... | 48 |
| III.4.3 Análise termogravimétrica (TGA) | 49 |
| III.4.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) | 50 |
| III.5 MODELAÇÃO CINÉTICA | 51 |
| II.6 SOLUÇÕES DE CALIBRAÇÃO..... | 52 |
| IV RESULTADOS E DISCUSSÃO | 53 |
| IV.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA | 53 |
| IV.1.1 Espectro UV-Vis da minociclina em pó..... | 53 |
| IV.1.2 Análise termogravimétrica (TGA/ DTG)..... | 54 |
| IV.1.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)..... | 55 |
| IV.2 CURVAS DE CALIBRAÇÃO..... | 56 |
| IV.2.1 Concentração vs. absorvância | 56 |
| IV.2.2 Concentração vs. área do pico..... | 60 |
| IV.3 ESTABILIDADE DA MINOCICLINA EM SOLUÇÃO AQUOSA | 61 |
| IV.4 INFLUÊNCIA DO VOLUME DE SOLUÇÃO INICIAL..... | 63 |
| IV.4.1 Sem exposição solar..... | 63 |
| IV.4.2 Com exposição solar | 67 |
| IV.5 INFLUÊNCIA DO SETUP | 71 |
| IV.6 CASO DE ESTUDO | 77 |
| V. CONCLUSÃO E TRABALHO FUTURO | 79 |
| VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 81 |
| VII. ANEXOS | 85 |
| ANEXO 1 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-VIS DAS SOLUÇÕES DE CALIBRAÇÃO..... | 85 |
| ANEXO 2 – CROMATOGRAMAS DAS SOLUÇÕES DE CALIBRAÇÃO | 86 |
| ANEXO 3 – CROMATGORAMAS 3D | 87 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Solubilidade do cloridrato de minociclina di-hidratado em vários solventes a 25 °C (adaptado de [14]) | 19 |
| Tabela 2. Solubilidade aquosa da minociclina a 25 °C [17]. | 20 |
| Tabela 3. Efeitos secundários reportados pelos pacientes do estudo (adaptado de [24])..... | 22 |
| Tabela 4. Principais membros da classe das tetraciclinas (adaptado de [13]) | 23 |
| Tabela 5. Concentração residual de tetraciclina em várias matrizes aquosas por país (adaptado de [45]) | 30 |
| Tabela 6. Propriedades do sistema..... | 46 |
| Tabela 7. Número de ciclos e tempo efetivo de exposição numa experiência de 8 horas | 47 |
| Tabela 8. Grupos característicos do espectro infravermelho do cloridrato de minociclina di-hidratado (adaptado de [14])..... | 56 |
| Tabela 9. Dados da curva de calibração no comprimento de onda 274,2 nm | 58 |
| Tabela 10. Dados da curva de calibração no comprimento de onda 347,4 nm | 59 |
| Tabela 11. Dados das curvas de calibração nos comprimentos de onda 274 e 347 nm..... | 61 |
| Tabela 12. Principais dados do estudo da estabilidade da minociclina a partir dos espectros UV-Vis. | 63 |
| Tabela 13. Principais dados do estudo da estabilidade da minociclina a partir dos cromatogramas HPLC..... | 63 |
| Tabela 14. Principais dados de análise das experiências sem exposição solar e dos espectros | 66 |
| Tabela 15. Principais dados de análise das experiências sem exposição solar e dos cromatogramas | 66 |
| Tabela 16. Principais dados de análise das experiências de variação de volume inicial e dos espectros..... | 70 |
| Tabela 17. Principais dados de análise das experiências de variação do volume inicial e dos cromatogramas | 71 |
| Tabela 18. Principais dados de análise das experiências de variação do setup e dos espectros | 76 |
| Tabela 19. Principais dados de análise das experiências de variação do setup e dos cromatogramas | 76 |
| Tabela 20. Dados relevantes do sistema | 77 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Origem e principais caminhos de contaminação de antibióticos de origem humana e animal. Adaptado de [8]. | 15 |
| Figura 2. Esquema das atividades experimentais realizadas | 16 |
| Figura 3. Tetraciclina (adaptado de [13]) | 17 |
| Figura 4. 6-desoxi-6-desmetiltetraciclina (adaptado de [13]) | 18 |
| Figura 5. Minociclina (adaptado de [16]) | 19 |
| Figura 6. Mecanismo da reação de formação da minociclina a partir de 6-desmetil-tetraciclina. Adaptado de [22]. | 24 |
| Figura 7. Reação da tetraciclina em metanol com irradiação (adaptado de [64]) | 41 |
| Figura 8. Estrutura molecular da tetraciclina com as diferentes constantes de dissociação (adaptado de [66]. Os valores de pK_a são $pK_{a1} = 3,3$; $pK_{a2} = 7,68$; $pK_{a3} = 9,7$ de acordo com Stephens et al. (1956) [67]. | 42 |
| Figura 9. Frasco de armazenamento da minociclina | 44 |
| Figura 10. À esquerda e ao centro, o simulador solar da Newport. À direita, o colimador instalado a posteriori. | 45 |
| Figura 11. Medições da intensidade da irradiação. | 45 |
| Figura 12. Esquema da unidade experimental. | 46 |
| Figura 13. À esquerda, espectrofotômetro Jasco V-750. À direita, suportes de células (ao fundo a célula de referência e à frente a célula da amostra) | 48 |
| Figura 14. À esquerda, sistema HPLC-DAD Agilent 1200 series. À direita, compartimento das amostras. | 49 |
| Figura 15. À esquerda e ao centro, TGA Hitachi STA7200RV. À direita, especificações da botija de azoto comprimido usada na análise. | 50 |
| Figura 16. Espectrofotômetro FTIR da Perkin Elmer. | 51 |
| Figura 17. Espectro UV-Vis do pó de minociclina na gama de comprimentos de onda 190-900 nm. | 53 |
| Figura 18. Fotografia do pó de minociclina após 24 horas de exposição a radiação solar. | 54 |
| Figura 19. Termogravimetria derivativa na gama de temperaturas 22-100 °C. | 54 |
| Figura 20. Análise termogravimétrica do pó de minociclina na gama de temperaturas 22-100 °C | 55 |
| Figura 21. Espectro FTIR: α -minociclina | 56 |
| Figura 22. Espectro de absorção característico da minociclina ($c = 10$ mg/L). | 57 |
| Figura 23. Curva de calibração a 274,2 nm. | 57 |
| Figura 24. Curva de calibração (347,4 nm) | 58 |
| Figura 25. Curva de calibração na gama de concentrações 0-3 mg/L e desvios padrão das medições (274,2 nm). | 59 |
| Figura 26. Curva de calibração na gama de concentrações 0-1,25 mg/L e desvios padrão das medições (347,4 nm). | 60 |

| | |
|---|----|
| Figura 27. Curva de calibração a 274 nm | 60 |
| Figura 28. Curva de calibração a 347 nm | 61 |
| Figura 29. Espectro UV-Vis na gama de comprimentos de onda 190-490 nm da solução inicial de 10 mg/L imediatamente após a preparação e 24 horas depois a duas temperaturas distintas. | 62 |
| Figura 30. Cromatograma (347 nm) da solução inicial de 10 mg/L imediatamente após a preparação e 24 horas depois a duas temperaturas distintas. | 62 |
| Figura 31. Espectro UV-Vis na gama de comprimentos de onda 190-490 nm. $V_0 = 10 \text{ mL}$ $c_0 = 10 \text{ mg/L}$ sem exposição a radiação..... | 64 |
| Figura 32. Cromatograma (347 nm) da 1ª e última amostras retiradas da solução com $V_0 = 10 \text{ mL}$ $c_0 = 10 \text{ mg/L}$ sem exposição à radiação..... | 64 |
| Figura 33. Espectro UV-Vis na gama de comprimentos de onda 190-490 nm. $V_0 = 50 \text{ mL}$ $c_0 = 10 \text{ mg/L}$ sem exposição a radiação..... | 64 |
| Figura 34. Cromatograma (347 nm) da 1ª e última amostras retiradas da solução com $V_0 = 50 \text{ mL}$ $c_0 = 10 \text{ mg/L}$ sem exposição à radiação..... | 65 |
| Figura 35. Espectro UV-Vis na gama de comprimentos de onda 190-490 nm. $V_0 = 100 \text{ mL}$ $c_0 = 10 \text{ mg/L}$ sem exposição à radiação..... | 65 |
| Figura 36. Cromatograma (347 nm) da 1ª e última amostras retiradas da solução com $V_0 = 100 \text{ mL}$ $c_0 = 10 \text{ mg/L}$ sem exposição à radiação..... | 65 |
| Figura 37. Espectro UV-Vis na gama de comprimentos de onda 190-490 nm. $V_0 = 10 \text{ mL}$ $c_0 = 10 \text{ mg/L}$ | 67 |
| Figura 38. Cromatograma (347 nm) da 1ª e última amostras retiradas da solução com $V_0 = 10 \text{ mL}$ $c_0 = 10 \text{ mg/L}$ | 67 |
| Figura 39. Espectro UV-Vis na gama de comprimentos de onda 190-490 nm. $V_0 = 50 \text{ mL}$ $c_0 = 10 \text{ mg/L}$ | 68 |
| Figura 40. Cromatograma (347 nm) da 1ª e última amostras retiradas da solução com $V_0 = 50 \text{ mL}$ $c_0 = 10 \text{ mg/L}$ | 68 |
| Figura 41. Espectro UV-Vis na gama de comprimentos de onda 190-490nm. $V_0 = 100 \text{ mL}$ $c_0 = 10 \text{ mg/L}$ | 68 |
| Figura 42. Cromatograma (347 nm) das amostras retiradas da solução com $V_0 = 100 \text{ mL}$ $c_0 = 10 \text{ mg/L}$ | 69 |
| Figura 43. Variação da concentração de minociclina sob diferentes volumes de solução inicial, calculada a partir das absorvâncias dos espectros..... | 69 |
| Figura 44. Variação da concentração de minociclina sob diferentes volumes de solução inicial, calculada a partir das áreas dos picos do cromatograma..... | 70 |
| Figura 45. Espectro de absorção UV-Vis do filtro | 72 |
| Figura 46. Espectro UV-Vis na gama de comprimentos de onda 190-490 nm. $V_0 = 100 \text{ mL}$ $c_0 = 10 \text{ mg/L}$ com filtro | 72 |
| Figura 47. Cromatograma (347 nm) das amostras retiradas da solução com $V_0 = 100 \text{ mL}$ $c_0 = 10 \text{ mg/L}$ com filtro. | 73 |

| | |
|--|----|
| Figura 48. Espectro UV-Vis na gama de comprimentos de onda 190-490 nm. $V_0 = 100 \text{ mL}$ $c_0 = 10 \text{ mg/L}$ com colimador | 73 |
| Figura 49. Cromatograma (347 nm) das amostras retiradas da solução com $V_0 = 100 \text{ mL}$ $c_0 = 10 \text{ mg/L}$ com colimador | 74 |
| Figura 50. Variação da concentração de minociclina sob diferentes variações de setup, calculada a partir das absorvâncias dos espectros..... | 75 |
| Figura 51. Variação da concentração de minociclina sob diferentes volumes de solução inicial, calculada a partir das absorvâncias dos espectros..... | 75 |
| Figura 52. Espectros de absorção das soluções de calibração – replicado 1. | 85 |
| Figura 53. Espectros de absorção das soluções de calibração – replicado 2. | 86 |
| Figura 54. Cromatograma das soluções de calibração (347 nm) | 86 |
| Figura 55. Cromatograma das soluções de calibração (347 nm) | 87 |
| Figura 56. $V_0 = 10 \text{ mL}$, $t = 0 \text{ hr}$ | 87 |
| Figura 57. $V_0 = 10 \text{ mL}$ $t = 5 \text{ h}$ | 88 |
| Figura 58. $V_0 = 50 \text{ mL}$ $t = 0 \text{ hr}$ | 88 |
| Figura 59. $V_0 = 50 \text{ mL}$ $t = 18,4 \text{ hr}$ | 89 |
| Figura 60. $V_0 = 100 \text{ mL}$ $t = 0 \text{ hr}$ | 89 |
| Figura 61. $V_0 = 100 \text{ mL}$ $t = 22,1 \text{ hr}$ | 90 |
| Figura 62. $V_0 = 100 \text{ mL}$ (com filtro) $t = 0 \text{ hr}$ | 90 |
| Figura 63. $V_0 = 100 \text{ mL}$ (com filtro) $t = 22 \text{ hr}$ | 90 |
| Figura 64. $V_0 = 100 \text{ mL}$ (com colimador) $t = 0 \text{ hr}$ | 91 |
| Figura 65. $V_0 = 100 \text{ mL}$ (com colimador) $t = 192 \text{ hr}$ | 91 |

LISTA DE ABREVIações

PAO - Processos avançados de oxidação

IV - Infravermelho

TGA - Análise termogravimétrica

DTG - Termogravimetria derivativa

FTIR - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

ETAR - Estação de tratamento de águas residuais

CBO - Carência bioquímica de oxigênio

RNA_m - Ácido ribonucleico mensageiro

RNA_t - Ácido ribonucleico de transferência

LUMO - Orbital molecular não ocupada mais baixa

DAD - Diode-array detector

MC - minociclina

WWTP - Wastewater Treatment Plants

DWTP - Drinking water Treatment Plants

I. INTRODUÇÃO

Os antimicrobianos são substâncias utilizadas para prevenir e curar infecções em humanos, animais e plantas. Aqueles funcionam como agentes que matam ou impedem o crescimento de microrganismos e podem ser agrupados consoante o tipo de microrganismos contra os quais atuam ou pela função que desempenham [1].

Um dos tipos de antimicrobianos são os antibióticos. Estes compostos são produzidos por bactérias ou fungos e são capazes de matar, inibir ou competir com outras espécies microbianas. Ao longo de milhares de anos, os antibióticos têm sido aplicados em tratamentos – já os egípcios costumavam colocar uma pasta de pão bolorento em feridas infetadas – no entanto, só no fim do século XIX os cientistas documentaram os efeitos de químicos antibacterianos. Paul Ehrlich, um médico alemão, foi o primeiro a concluir que determinadas substâncias poderiam matar certas células bacterianas sem afetar outras, revelando o seu carácter seletivo. Em 1928, Alexander Fleming descobriu a penicilina, o primeiro verdadeiro antibiótico. Posteriormente, Howard Florey e Ernst Chain foram determinantes para o desenvolvimento do processo de produção em massa daquela substância, tendo dividido com Fleming, em 1945, o Prémio Nobel da Medicina. A descoberta dos antibióticos é considerada um dos grandes marcos científicos do último século, tendo salvo milhões de vidas [2] [3].

A minociclina é uma tetraciclina semissintética de segunda geração usada com fins medicinais, desde os anos 60 do século passado, devido às suas propriedades antibióticas contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. É utilizada principalmente no tratamento da acne vulgaris e de algumas doenças sexualmente transmissíveis, contudo têm sido descobertas outras potencialidades terapêuticas deste composto. Entre estas, destacam-se o tratamento de doenças auto-imunes, neurodegenerativas, como Alzheimer ou Parkinson, e capacidade de inibição de células malignas. A isto, acresce uma biodisponibilidade longa e a sua rápida absorção e penetração nos tecidos [4]. Assim, a versatilidade das propriedades da minociclina, fazem deste composto um fármaco de elevado potencial.

Porém, a utilização crescente de antibióticos (entre 2000 e 2018 o consumo global de antibióticos aumentou 46% [5]), muitas vezes de forma inapropriada, gera uma quantidade significativa de resíduos que são introduzidos direta e indiretamente em ambientes aquáticos e terrestres e resulta na proliferação de agentes patogénicos resistentes aos fármacos [6]. Existem essencialmente três caminhos principais para os antibióticos até às reservas de água doce: através dos efluentes das Estações de Águas Residuais, das fábricas de produção de químicos, e da criação de gado e aquacultura. Estima-se que o consumo global de antibióticos se situe entre 100000 e 200000 toneladas anuais, sendo que 50% são alocados à medicina veterinária e a promotores de crescimento. Por norma, entre 50 e 80% dos compostos de origem são excretados via urina ou fezes, pelo que se verifica um grande fluxo de antibióticos nos Sistemas de Tratamento de Águas Residuais, onde, por vezes, a decomposição destes compostos é incompleta e os antibióticos e os seus metabolitos acabam por chegar ao ambiente [7]. Estes dados reforçam a necessidade de desenvolver mecanismos e tecnologias que permitam a

purificação de águas residuais, nomeadamente a eliminação de antibióticos, como a minociclina, produzida e comercializada por empresas farmacêuticas. É neste capítulo que esta tese se insere, através do estudo da biodegradabilidade e toxicidade da minociclina e da aplicação de técnicas para a sua análise em soluções puras e em águas residuais.

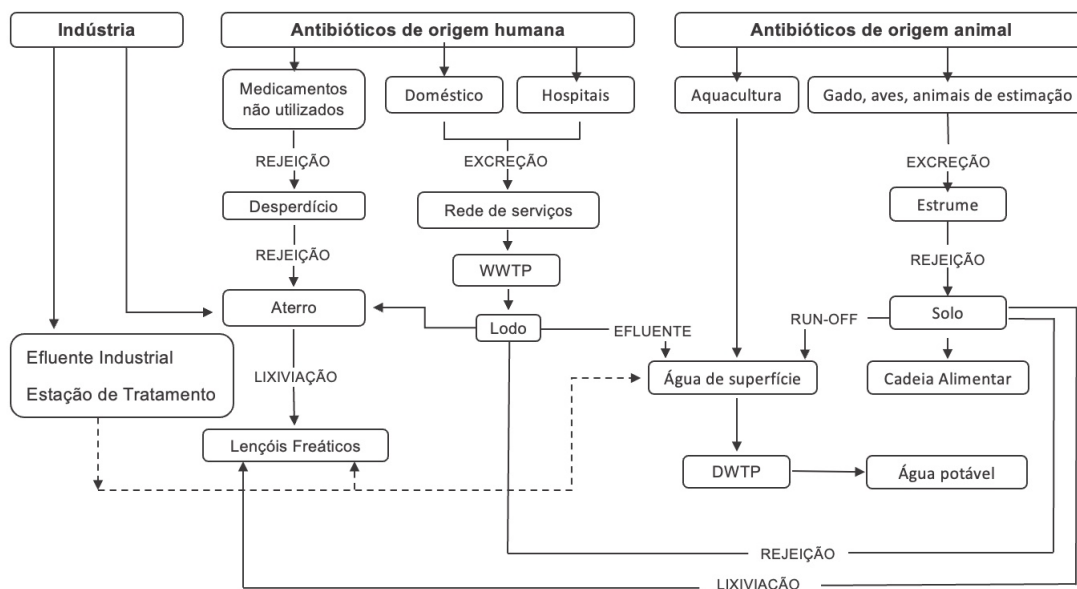


Figura 1. Origem e principais caminhos de contaminação de antibióticos de origem humana e animal. Adaptado de [8].

A necessidade crescente de tecnologia que dê resposta aos desafios supracitados tem-se manifestado sob a forma de mercados em expansão, que vêm aqui uma oportunidade de presente e futuro. Em 2020, o mercado global equipamento de tratamento de águas residuais foi avaliado em 28 mil milhões de dólares, com perspectivas de uma taxa anual de crescimento composta de 4,2% até 2030, altura em que valerá próximo de 42 mil milhões de dólares [9]. Quanto às transações relacionadas com os Processos Avançados de Oxidação (PAO), estas beneficiaram de uma taxa anual de crescimento composto de 8%, entre 2016 e 2021, passando a valer 6,5 mil milhões de dólares face aos 4,4 mil milhões iniciais [10]. Estima-se que este crescimento se acentue, prevendo-se uma valorização anual próxima dos 10% até 2025, altura em que este negócio valerá 9,7 mil milhões de dólares [11]. Perspetiva-se assim um acentuar da importância dos PAO no total das tecnologias de tratamento de águas residuais.

I.1 Objetivos

O propósito deste estudo reside na avaliação da capacidade de degradação da minociclina via radiação solar, mediante diferentes condições experimentais que permitam tirar conclusões sobre a aplicabilidade real do método.

Numa primeira fase, caracterizou-se o composto através da obtenção dos seus espectros UV-Vis e IV, e do estudo da variação de massa em função da temperatura. Avaliou-se, também, a sua estabilidade em condições de temperatura distintas.

Posteriormente, foi objeto de investigação a capacidade do simulador solar em degradar a minociclina presente nas soluções aquosas, sujeitando o sistema a variações quer no volume inicial de solução, quer na fonte de radiação. Determinaram-se os tempos de meia vida e as constantes cinéticas, que permitiram aferir a eficácia de cada uma das variações no sistema.

O esquema abaixo sumaria as atividades realizadas:

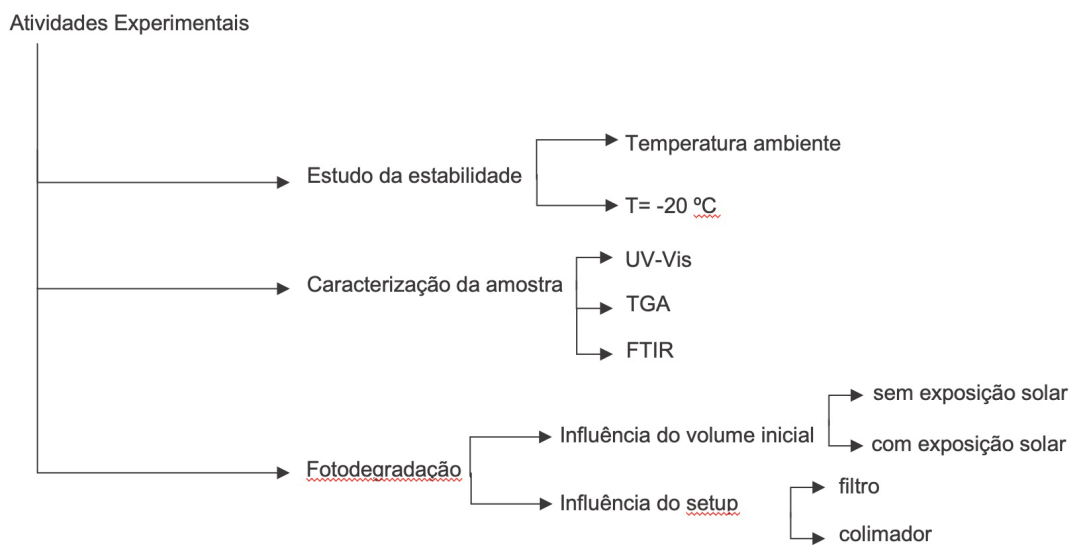


Figura 2. Esquema das atividades experimentais realizadas

I.2 Estrutura da Dissertação

A tese está dividida em cinco capítulos. No capítulo 1 enquadra-se o tema do ponto de vista histórico, releva-se a sua importância no paradigma da atualidade, justificando o seu estudo, e explica-se de forma breve os estudos que se conduziram.

O capítulo 2 contém uma revisão da literatura que se divide em 3 temas distintos. Inicia-se com o aprofundar dos tópicos relacionados com as propriedades químicas e farmacológicas, a utilidade na medicina e o processo de síntese do composto em estudo. Exploram-se as tecnologias já estabelecidas e as emergentes no tratamento das águas residuais. Termina-se com o estudo dos mecanismos de degradação de tetraciclinas propostos por outros autores,

O capítulo 3 remete para a descrição dos materiais e métodos implementados, apresentando-se uma breve descrição de cada um deles.

O capítulo 4 menciona os resultados obtidos, justificando-se as atividades experimentais realizadas e discutindo os efeitos das alterações operadas.

O capítulo 5 conclui o trabalho, onde se destacam as principais inferências e se apontam os próximos passos.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1 A minociclina

II.1.1 A família das tetraciclina, composição e características

A minociclina é um antibiótico da família das tetraciclina. As tetraciclina são um grupo de antibióticos de largo espectro com uma estrutura básica comum e podem ser obtidas diretamente através do isolamento de várias espécies de bactérias *Streptomyces* ou produzidas semi-sinteticamente a partir dos compostos que formam essa estrutura de forma isolada. As tetraciclina interferem com a capacidade de uma bactéria em produzir certas proteínas vitais, pelo que são inibidoras da capacidade de multiplicação do agente infeccioso (bacteriostáticas), mas não o matam (bactericidas) [12]. As propriedades antimicrobianas favoráveis destes agentes e a ausência de efeitos secundários significativos levou a que fossem utilizados de forma extensiva em terapias de infeções em humanos e animais. As moléculas de tetraciclina consistem num núcleo tetracíclico linear (cada núcleo está identificado por uma letra, A, B, C e D na Figura 3) aos quais se ligam diferentes grupos funcionais, nomeadamente os grupos cloreto, metilo e hidroxilo. Estas modificações não alteram os seus atributos antibacterianos, contudo afetam propriedades farmacológicas, como o tempo de meia-vida ou a ligação a proteínas no plasma sanguíneo. A tetraciclina mais simples cujas propriedades antibacterianas foram detetadas é a 6-desoxi-6-desmetiltetraciclina pelo que esta estrutura pode ser considerada o farmacóforo mínimo [13].

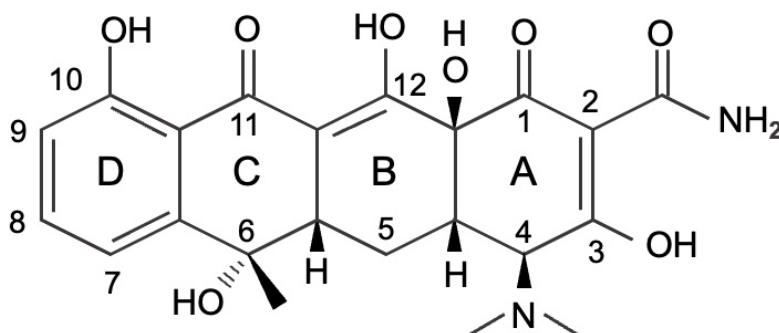


Figura 3. Tetraciclina (adaptado de [13])

Existem características importantes para a atividade antibacteriana transversal às tetraciclina, nomeadamente, a manutenção da estrutura tetracíclica linear; as configurações estereoquímicas que ocorrem na junção dos anéis A e B (4a e 12a) e na posição 4 (o grupo dimetilamino), e a conservação do sistema ceto-enol (posições 11, 12 e 12a) em proximidade ao anel fenólico D. As tetraciclina são agentes quelantes fortes, isto é, reagem com iões metálicos para formar complexos metálicos estáveis e solúveis em água, e as suas propriedades

antimicrobiais e farmacocinéticas são ambas influenciadas pela quelação de íons metálicos. A quelação pode dar-se no sistema β -dicetona (posições 11 e 12) e nos grupos enol (posições 1 e 3) e carboxamida (posição 2) do anel A. Substituições nas posições 1, 3, 4a, 10, 11 ou 12 são prejudiciais para a atividade antibacteriana. Ainda assim, existem uma série de tetraciclinas utilizadas com fins clínicos que resultam de substituições em diferentes posições nos anéis B, C e D. A minociclina reage de forma ácida em solução aquosa [13].

Os antibióticos tetraciclínicos são rapidamente submetidos a 4-epimerização, sendo que a taxa de epimerização difere de análogo para análogo. O sistema tricarbonilo do anel A dos antibióticos de tetraciclina permite a enolização que resulta na perda do hidrogênio C-4. A reprotonação da molécula pode ocorrer a partir do topo do enol, regenerando a tetraciclina. Contudo, a reprotonação pode também ocorrer na parte inferior da molécula, redundando na formação de uma 4-epitetraciclina inativa. A manutenção do pH a valores superiores a 6,0 durante o processamento; evitar o contato com conjugados de ácidos fracos, com reagentes húmidos e soluções de base aquosa, e trabalhar a baixas temperaturas reduz a formação de epímeros em tetraciclinas [14].

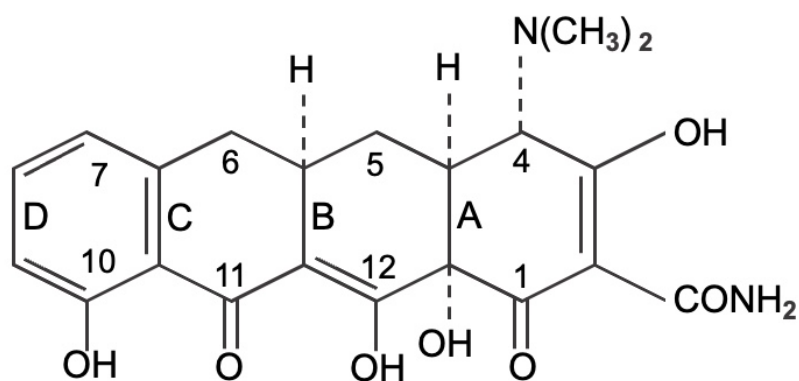


Figura 4. 6-desoxi-6-desmetiltetraciclina (adaptado de [13])

A minociclina (7-dimetilamino-6-desmetil-6-desoxitetraciclina) é uma tetraciclina semissintética de segunda geração que tem sido usada com fins terapêuticos nos últimos 40 anos devido às suas propriedades antibióticas contra as bactérias gram-positivas e gram-negativas [4]. A sua fórmula química é $C_{23}H_{27}N_3O_7$ e a sua massa molecular é 457,5 g/mol. O fato de incluir um grupo dimetilamino na posição 4 sem os grupos metil e hidroxilo na posição 6 (figura 5) confere à substância mais lipofilicidade do que outras tetraciclinas, apresentando, por isso, maior capacidade de penetração nos tecidos [15]. Isto deve-se à possibilidade do grupo dimetilamino poder ser ionizado, resultando numa molécula com um ponto isoelétrico mais elevado do que outras substâncias da mesma família. Como o ponto isoelétrico da minociclina ao qual a forma de zwitteriônica é neutra coincide com pH fisiológico e a minociclina apresenta uma maior lipofilicidade a pH fisiológico, então este composto vai penetrar mais facilmente nas células, aumentando o seu espectro de atividade [14].

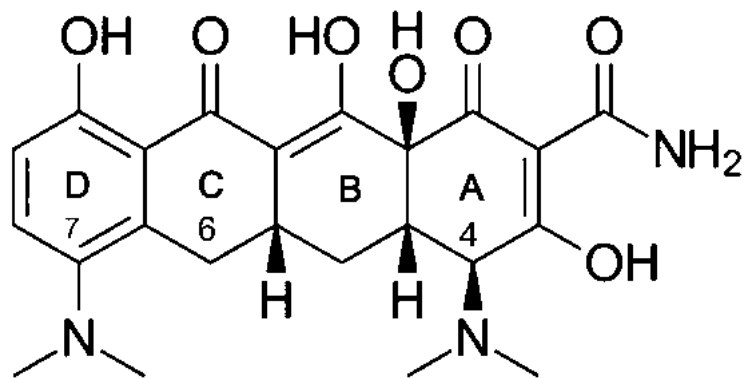


Figura 5. Minociclina (adaptado de [16])

O medicamento é usado na forma de cloridrato de minociclina di-hidratado, o qual apresenta baixa solubilidade em água, ligeira solubilidade em etanol e é praticamente insolúvel em clorofórmio e éter [14]. Uma lista das solubilidades do composto em diferentes solventes é demonstrada na tabela 1.

Tabela 1. Solubilidade do cloridrato de minociclina di-hidratado em vários solventes a 25 °C (adaptado de [14])

| Solvente | Solubilidade (mg/mL) | Solubilidade (% m/v) |
|------------------|----------------------|----------------------|
| Hexano | 0,004 | 0,0004 |
| Benzeno | 0,02 | 0,002 |
| Clorofórmio | 0,13 | 0,013 |
| Acetato de etilo | 0,3 | 0,03 |
| Butanona | 0,4 | 0,04 |
| 1-Octanol | 0,5 | 0,05 |
| Acetona | 0,6 | 0,06 |
| Dioxano | 0,7 | 0,07 |
| 1-Butanol | 4,4 | 0,44 |
| 2-Propanol | 7 | 0,7 |
| Metanol | 14 | 1,4 |
| Água | 16 | 1,6 |
| Etanol | 42 | 4,2 |

Existem 16 microestruturas iônicas possíveis para a minociclina. Assim, a solubilidade observada, geralmente, não é a de uma única entidade, antes uma representação do total da soma de duas espécies ou mais numa solução a um dado valor de pH. A minociclina, ao contrário de outros antibióticos, contém dois grupos amino (posições 4 e 7) que são responsáveis por uma solubilidade cem vezes superior à da tetraciclina [17]. Na tabela 2 são dadas as solubilidades da minociclina em soluções aquosas:

Tabela 2. Solubilidade aquosa da minociclina a 25 °C [17].

| Forma | pH | Solubilidade (mg/mL) |
|-------------------------|-----|----------------------|
| Neutra | 6,7 | 52 |
| Cloridrato | 3,9 | 15 |
| Cloridrato di-hidratado | 0,8 | >500 |

Segundo Zbinovski (1977), soluções de minociclina a pH 4,2 e 5,2 retiveram 90% da sua potência inicial durante 1 semana à temperatura ambiente. Estas soluções eram mais estáveis do que qualquer outra solução antibiótica de tetraciclina estudada. Uma solução de 1% (m/v) cloridrato de minociclina em água tem um pH entre 3,5 e 4,5.

A minociclina é estável no estado seco em pó durante um período de três a quatro anos, quando armazenada a 25 °C [18]. No entanto, na forma hidratada, o composto em estudo pode representar inconvenientes em relação à estabilidade do produto, em particular sempre que o produto tenha pouca cristalinidade. Na maioria dos casos, um maior teor de água está associado a uma maior taxa de degradação química, pelo que o controlo da forma cristalina é crucial para o desenvolvimento de processos de síntese farmacêutica. Assim, o comportamento polimórfico deve ser identificado numa fase inicial do desenvolvimento como forma de assegurar processos fiáveis e robustos e em conformidade com as boas práticas de fabrico. Para além do sal di-hidratado de cloridrato comercializado, a literatura apresenta outras cinco formas cristalinas de minociclina com temperaturas de fusão mais baixas [19].

Mendes et al. [20] relatam três formas polimórficas cristalinas deste antibiótico por dissolução e/ou suspensão da base amorfa de minociclina em solventes orgânicos (éteres, ésteres ou álcoois), seguidas de cristalização da mistura. Os três polimorfos caracterizavam-se por padrões distintos de difração de raios X e espectros de infravermelhos.

Duas outras formas estáveis de cloridrato de minociclina foram descritas por Xiurong et al. [21]. Estas foram obtidas através de etapas consecutivas de dissolução, cristalização e secagem do cloridrato de minociclina numa mistura binária de álcool e água. Ambos os polimorfos foram diferenciados por padrões de difração e termogramas característicos.

A escolha dos polimorfos mais atrativos enfrenta, geralmente, a oposição entre estabilidade e a atratividade das propriedades. Se os mais estáveis são preferíveis numa ótica de controlo de processo, pelo contrário, os polimorfos metaestáveis apresentam propriedades físico-químicas mais interessantes, como o ponto de fusão, a velocidade de dissolução e a solubilidade aparente. Desta forma, para um fabrico fiável em termos do processo de cristalização é exigida uma avaliação cuidadosa dos parâmetros termodinâmicos e cinéticos, visando um compromisso entre as propriedades terapêuticas ótimas e o melhor controlo do processo e estabilidade de armazenamento [19].

II.1.2 O composto na medicina

II.1.2.1 Aplicações

A minociclina é predominantemente aplicada no tratamento de acne e de algumas doenças sexualmente transmissíveis. Recentemente, tem sido reportado que as tetraciclinas demonstram uma variedade de características biológicas independentes da sua atividade antimicrobiana, incluindo propriedades anti-inflamatórias e anti-apoptóticas, para além da capacidade inibidora da proteólise, da angiogénese e da metastização de tumores. À luz destas descobertas, o composto em estudo ganhou relevo e têm sido documentados efeitos positivos nos modelos experimentais elaborados no que toca a patologias de base inflamatória, como, por exemplo, dermatite, periodontite e arteriosclerose, e doenças autoimunes, tais como, artrite reumatóide e doença inflamatória intestinal. É de registar que a minociclina também se destaca como sendo o derivado de tetraciclina mais eficaz na neuroprotecção, o que tem sido comprovado através de modelos experimentais de doenças neurodegenerativas (doença de Parkinson, doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica, Alzheimer, esclerose múltipla e lesões da medula espinhal). Outros estudos pré-clínicos apontam ainda para a hipótese da minociclina ter a capacidade de inibir o crescimento de células malignas, a ativação e replicação do vírus da imunodeficiência humana e prevenir a reabsorção óssea [4].

O composto é prescrito para tratar patologias que também podem ser tratadas por outras tetraciclinas, todavia poderá não ser tão bem tolerado quanto outras tetraciclinas, em particular devido às implicações no sistema vestibular. A minociclina pode ser comercializada sob a forma de *clinocin*, *minocyn*, *vectrin*, entre outros [22].

Adicionalmente, a minociclina tem demonstrado diversas características atrativas: é considerada, de forma geral, um fármaco seguro para humanos, com efeitos secundários conhecidos; é relativamente barata, embora apresente custos de síntese superiores a tetraciclinas que sejam sintetizadas de uma forma meramente microbiológica, tornando-a apropriada para tratamentos de longa duração; por fim, apresenta níveis elevados de absorção no organismo (superiores a 95%), chegando à maioria das zonas do corpo, inclusivamente ao sistema nervoso central. Ainda existem, porém, mecanismos por apurar associados à minociclina, no entanto, a informação disponível é encorajadora quanto à capacidade deste fármaco em dar resposta a uma vasta gama de doenças [4].

Os efeitos adversos da minociclina podem envolver dores de estômago; diarreia; tonturas; perda de equilíbrio; inflamações na superfície da cavidade bucal e vômitos. Provoca aumento da sensibilidade à luz solar, pode afetar a qualidade do sono e, em casos raros, causar distúrbios de sono [23]. Também foram registados casos de lúpus. O uso prolongado de minociclina pode levar a manchas na pele e unhas, que, não sendo permanentes, podem levar muito tempo a desaparecer. De forma a mitigar a incidência ou a severidade destes efeitos adversos e de otimizar as terapias, em particular as de longa duração, como, por exemplo, a do acne, estão a ser estudadas novas formas de dosagem e a ser testados os limites de estabilidade (a temperaturas elevadas ou pH extremos) da substância ativa dos medicamentos. De notar que doses até 200 mg/dia são consideradas seguras para tratamentos a longo prazo de acne [24].

Segundo um estudo por Goulden et al. (1996) [24], foi prescrita a setecentos pacientes, dos quais 398 homens e 302 mulheres, minociclina como tratamento para a acne vulgaris. A

idade média foi de 21,6 anos (intervalo entre 13 e 48 anos), e a duração média da terapia foi de 10,5 meses (intervalo entre 2 semanas e 4 anos). Os regimes de tratamento consistiam na administração de 100 mg. 100/200 mg em dias alternados e 200 mg de minociclina diariamente. A dose inicial de minociclina para cada paciente foi decidida após avaliação clínica da gravidade da acne, do grau de seborreia e da resposta a qualquer tratamento anterior com minociclina. Os pacientes eram vistos de 3 em 3 meses e, caso fosse necessário, a dose era alterada de acordo com a resposta clínica. De forma a controlar a sua acne, 203 (29%) doentes necessitaram de uma dose de minociclina de 100 mg diários, 196 doentes (28%) uma dose de 100/200mg em dias alternados, e 301 doentes (43%) uma dose de 200 mg diários. No entanto, como a resposta clínica de alguns pacientes exigia que a sua dose fosse alterada, 451 pacientes receberam 100 mg diariamente. 356 pacientes 100/200mg em dias alternados, e 301 pacientes 200 mg diários ao longo do estudo. Cerca de 95 doentes (13,6%) reportaram efeitos secundários. Estes ocorreram em 8,4% dos que tomavam 100 mg de minociclina diariamente, em comparação com 6,9% dos que tomavam 100/200mg em dias alternados e 10,9% dos que tomavam 200 mg diariamente. Os resultados discriminados relativos aos efeitos secundários estão sumariados na tabela 3:

Tabela 3. Efeitos secundários reportados pelos pacientes do estudo (adaptado de [24]).

| Efeitos secundários | Minociclina (100 mg) | Minociclina (100/200 mg) | Minociclina (200 mg) |
|--|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| Sintomas gastrointestinais | 11 (2,4%) | 4 (1,1%) | 7 (2,3%) |
| Disfunção vestibular | 10 (2,2%) | 8 (2,2%) | 6 (2%) |
| Dores de cabeça e problemas de visão | 6 (1,3%) | 5 (1,4%) | 3 (1%) |
| Distúrbios de memória e dificuldades de concentração | 2 (0,4%) | 0 | 1 (0,3%) |
| Sintomas cutâneos | 3 (0,6%) | 2 (0,6%) | 2 (0,6%) |
| Candidíase vaginal | 6 (1,3%) | 1 (0,3%) | 2 (0,6%) |
| Pigmentação | 2 (0,4%) | 4 (1,1%) | 11 (4%) |

II.1.2.2 Farmacocinética

A minociclina é absorvida praticamente na totalidade e de forma rápida na parte superior do intestino delgado, contudo a taxa de absorção está dependente da presença de certos alimentos, em particular aqueles que contêm catiões divalentes, como o cálcio, que reagem com a minociclina e outras tetraciclina e funcionam como agentes quelantes, tornando estes antibióticos inabsorvíveis [15]. Aquele atinge o pico da concentração no plasma sanguíneo uma ou duas horas após a toma e tem uma afinidade com as proteínas do plasma de 70 a 75%. A substância penetra em praticamente todos os tecidos, sendo que concentrações elevadas costumam ser detetadas na vesícula biliar e no fígado. Atravessa a barreira hematoencefálica (estrutura de permeabilidade altamente seletiva que protege o sistema nervoso central de substâncias potencialmente neurotóxicas presentes no sangue [25]) com maior facilidade do que

a doxiciclina e outras tetraciclinas, atingindo concentrações terapêuticamente relevantes no líquido cefalorraquidiano e também em meninges inflamadas. A minociclina é desativada por metabolização no fígado até 50%, sendo que o restante é majoritariamente excretado pelo trato gastrointestinal e pelos rins (10-15%) [26]. O tempo de meia vida biológico varia entre 11 e 26 horas em pessoas saudáveis, podendo atingir as 30 horas nas pessoas com insuficiência renal e períodos ainda mais longos em pessoas com doenças de fígado, pelo que a administração cuidada neste tipo de paciente é aconselhada [27]. Para além da via oral, a minociclina também pode ser administrada intravenosamente, sobretudo nos casos de pneumonia, infeções na corrente sanguínea e infeções na pele [15].

Tabela 4. Principais membros da classe das tetraciclinas (adaptado de [13])

| Designação química | Designação genérica | Designação comercial | Ano de descoberta | Status | Modo de administração |
|--|----------------------------------|----------------------|-------------------|-----------------|-----------------------|
| 7-Clorotetraciclina | Clorotetraciclina | <i>Aureomycin</i> | 1948 | Comercializado | Oral |
| 5-Hidroxitetraciclina | Oxitetraciclina | <i>Terramycin</i> | 1948 | Comercializado | Oral e parenteral |
| Tetraciclina | Tetraciclina | <i>Achromycin</i> | 1953 | Comercializado | Oral |
| 6-Desmetil-7-clorotetraciclina | Dimetilclortetraciclina | <i>Declomycin</i> | 1957 | Comercializado | Oral |
| 2-N-Pirrolidinamiltetraciclina | Rolitetraciclina | <i>Reverin</i> | 1958 | Comercializado | Oral |
| 2-N-Lisinometiltetraciclina | Limeciclina | <i>Tetralysal</i> | 1961 | Comercializado | Oral e parenteral |
| N-Metilol-7-clorotetraciclina | Clomociclina | <i>Megaclor</i> | 1963 | Comercializado | Oral |
| 6-Metileno-5-hidroxitetraciclina | Metaciclina | <i>Randomycin</i> | 1965 | Comercializado | Oral |
| 6-Desoxi-5-hidroxitetraciclina | Doxiciclina | <i>Vibramycin</i> | 1967 | Comercializado | Oral e parenteral |
| 7-dimetilamino-6-desmetil-6-desoxitetraciclina | Minociclina | <i>Minocin</i> | 1972 | Comercializado | Oral e parenteral |
| 9-(t-butilglicilamido)-minociclina | Terc-butilglicilamidominociclina | <i>Tigilcycline</i> | 1993 | Testes clínicos | |

II.1.3 Síntese

II.1.3.1 Mecanismo

A síntese da minociclina (VII), representada na figura 6, dá-se a partir da 6-dimetiltetraciclina (I), que por sua vez resulta da atividade vital de *Streptomyces aureofaciens*. A hidrogenólise do último composto com Hidrogénio e utilizando Paládio num catalisador de carbono dá 4-dimetilamino-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-3,10,12,12a-tetrahidroxi-1,11-dioxo-

2-naftacenocarboxamida (II), que sofre nitração na posição 9 pelo nitrato de potássio em solução aquosa de ácido hidrofúorídrico, o que forma o grupo -NO₂ (III). Este grupo nitro é reduzido a amina por Hidrogénio com dióxido de platina. O grupo aminofenil resultante (IV) é nitrado posteriormente com ácido nítrico na presença de ácido sulfúrico para dar 7-nitro-9-amino-4-naftacenocarboxamida (V). Esta forma é sujeita a uma diazotização quando reage com nitrito de butil em ácido sulfúrico. O derivado diazo (VI) que resulta é reduzido com Hidrogénio através de um catalisador de Paládio suportado em carvão. Assim, o produto é diazotizado, enquanto o grupo nitro é simultaneamente reduzido a um grupo amina, que passa por uma metilação exaustiva via formaldeído, originando minociclina [22] [28].

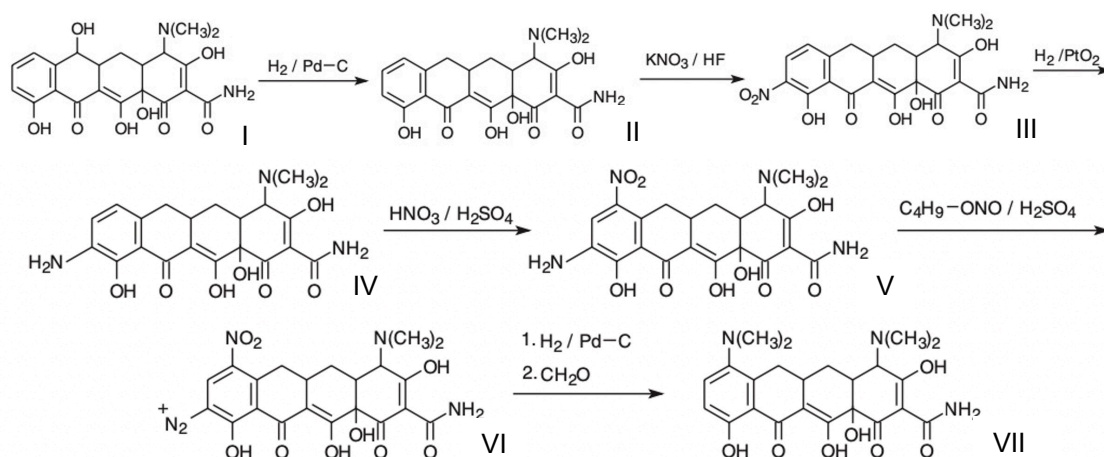


Figura 6. Mecanismo da reação de formação da minociclina a partir de 6-desmetil-tetraciclina. Adaptado de [22].

II.1.3.2 Produção industrial

Em termos industriais, os antibióticos são produzidos por fermentação, em que o micro-organismo fonte é desenvolvido num meio líquido de volume elevado (pode ir de 100000 a 400000 litros no caso da penicilina-G ou -V [29]). A concentração de oxigénio, a temperatura, o pH e os níveis de nutrientes têm de ser otimizados, monitorizados e ajustados, se necessário, de forma a controlar a dimensão da população e garantir o máximo rendimento antes das células morrerem, visto que os antibióticos são metabolitos secundários. Uma vez completo o processo, o antibiótico deve ser extraído e purificado, resultando numa forma cristalina. O fato do antibiótico ser solúvel num solvente orgânico poderá facilitar o processo, caso contrário, terá de ser removido via permuta iónica, adsorção ou precipitação. Os micro-organismos utilizados na fermentação raramente são idênticos àqueles encontrados na natureza, uma vez que os primeiros sofrem frequentemente alterações genéticas para permitir um rendimento máximo de antibióticos. As mutações são provocadas pelo uso de radiação ultravioleta, raios X ou químicos. A seleção e posterior reprodução das estirpes mais produtivas que tem sido levada a cabo ao longo de gerações permitiu aumentar rendimentos até 20 vezes. Outra técnica a que se recorre para aumentar o rendimento das reações é a amplificação de genes, em que cópias de genes

que codificam enzimas envolvidas na produção de antibióticos podem ser reinseridas na célula, via plasmídeos.

Apesar do conhecimento abrangente de antibióticos, menos de 1% dos agentes antimicrobianos têm valor terapêutico ou comercial. Os antibióticos com utilidade médica são descobertos frequentemente com recurso a um de processo triagem, em que se isolam diferentes micro-organismos, analisam-se os seus produtos e verifica-se se inibem o crescimento de organismos de teste. Este método acaba por gerar maioritariamente antibióticos com propriedades já conhecidas e, nesse caso, são descartados. Porém, quando surgem potenciais novos antibióticos, estes devem ser testados quanto à sua toxicidade e atividades terapêuticas. Os fármacos mais promissores poderão posteriormente vir a ser modificados [30]. Uma versão mais moderna desta abordagem é o *Rational Design*. Esta estratégia de engenharia de proteínas consiste na tentativa de criação de moléculas de proteínas aperfeiçoadas, com base na sua estrutura tridimensional e função [31].

A patente US 3432394 de 1969, cujo inventor foi Ivan Villax, e que sucede à original AT257037B de 1961, descreve um processo de produção de tetraciclina recorrendo a fermentação. O ponto de partida é a espécie bacteriana *Streptomyces lusitanus*, que é cultivada num meio de cultura contendo licor de milho (um concentrado viscoso de milho solúvel que compreende aminoácidos, vitaminas e minerais [32]), CaCO_3 , amido, sais de amónio, farinha de amendoim (produto que resulta do esmagamento dos amendoins para obter óleo [33]), óleo de banha e elementos químicos essenciais a um pH entre 6,7 e 6,8, durante 140 horas a 26-28 °C com aeração para obter tetraciclina com elevados rendimentos. Não há produção de clorotetraciclina. Assim, um pré-fermentador contendo 150 litros de meio de cultura inoculados com cultura-mãe e fermentados a 26 °C são agitados durante 24 horas. Em seguida, um vaso fermentador com capacidade para 6000 litros recebe um meio com a seguinte composição em massa por litro de água corrente: 28 g de licor de milho, 14 g de CaCO_3 , 38 g de amido, 5,7 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,5 g de NH_4Cl , 0,05 g de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,002 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g de ZnSO_4 , 25 g de farinha de amendoim e 35 g de óleo de banha. Este meio é inoculado com a cultura de 24 horas e fermentado a 30°C por mais 24 horas, com uma aeração de 1,5 L/min./L de caldo de fermentação. Depois, a temperatura é reduzida para 26°C e a aeração aumentada para 4 L/min./L de caldo. Após 140 horas de fermentação, 11,1 g de tetraciclina/ L foram obtidas [34].

II.1.4 Mecanismos de ação e resistência

II.1.4.1 Mecanismo de ação

O principal mecanismo de ação da minociclina é similar a outros da família das tetraciclinas. A síntese proteica ocorre através dos ribossomas tanto nas células eucarióticas como nas procarióticas, os quais traduzem os codões do RNA mensageiro (RNAm) em

proteínas. As células procarióticas utilizam as subunidades 30S e 50S dos ribossomas, ao passo que as células eucarióticas usam as subunidades 40S e 60S. Em ambos os tipos de organismo as duas subunidades ribossomais combinam no RNAm para permitir que o RNA transferência (RNAt) transporte um aminoácido e forme proteínas celulares através da elongação das cadeias de aminoácidos. As tetraciclinas, e por inerência a minociclina, ligam-se à subunidade ribossomal 30 S, prevenindo que o RNAt acrescente um aminoácido à cadeia e a alongue para formar uma proteína celular. Parar este processo resulta num efeito bacteriostático na célula, impedindo o organismo de crescer e de se replicar [13].

II.1.4.2 Mecanismo de resistência

Há uma variedade de mecanismos, incluindo a bomba de efluxo (proteínas de transporte envolvidas na extrusão de substâncias tóxicas [35]) e modificação ou proteção dos locais alvo dos antibióticos, que estão envolvidos na resistência às tetraciclinas. Os genes de efluxo *tet* codificam proteínas membranares que transportam as tetraciclinas para fora das bactérias, causando uma descida na concentração inibidora mínima do fármaco no interior da célula que, conseqüentemente, protege os ribossomas. As proteínas Tet, como as Tet(B), Tet (A), Tet(K), Tet(M) e Tet(S) têm, portanto, potencial para reduzir a suscetibilidade ou a resistência à minociclina [15].

Um estudo de Mathers *et al.* (2011) mostrou que apenas 20% da *Escherichia coli* presente no intestino humano era resistente à tetraciclina antes do tratamento de acne. No mesmo estudo, foi demonstrado que a resistência aumentou para 96% ao fim de 10 semanas de uso de antibiótico (500 a 1000 mg por dia) [36].

II.2 Tecnologias de tratamento de águas residuais

Tratamento de águas residuais é a designação dada a um vasto número de técnicas, geralmente implementadas em Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR), que envolvem a integração de sistemas e tecnologias necessárias com o fito de adequar as águas residuais à qualidade necessária para a descarga no meio recetor. Existem quatro níveis de tratamento: pré-tratamento, tratamento primário, tratamento secundário e tratamento terciário.

Neste subcapítulo abordam-se de forma resumida os tipos de tratamentos aplicados e as suas limitações, e exploram-se de forma mais aprofundada os Processos Avançados de Oxidação (PAO), discriminando os vários processos, explicando o porquê de serem uma mais-valia e quais os seus mecanismos, de forma a estabelecer uma comparação com o método abordado neste trabalho.

II.2.1 Pré-tratamento

O tratamento preliminar envolve a remoção de materiais flutuantes, tais como folhas, papéis ou pedaços de madeira, e outros sólidos inorgânicos pesados sedimentáveis tais como areia e grãos [37]. As águas residuais produzidas entram nas ETAR por intermédio de coletores principais que passam por um canal de chegada que, através de grades de limpeza automática e/ou manual, são filtrados e retirados os sólidos de maior dimensão. De seguida, a água residual pode passar um sistema de gradagem mais fina, por exemplo, tamisadores, onde são retirados os resíduos sólidos de menor dimensão, podendo também existir, nesta etapa, sistemas de desarenamento e desengorduramento – para remoção de areias e gorduras [38].

II.2.2 Tratamento primário

O tratamento primário é realizado, principalmente, para remover a matéria inorgânica de pequenas dimensões e a matéria orgânica sedimentável volumosa. É realizado principalmente para remover a matéria inorgânica de pequeno tamanho e a matéria orgânica sedimentária de grande tamanho, 60 a 65% dos sólidos em suspensão, e 30 a 35% de CBO. É um processo físico que inclui essencialmente a sedimentação e a coagulação [37].

II.2.3 Tratamento secundário

O tratamento secundário, também designado por convencional, é um método de tratamento biológico amplamente utilizado nas ETAR. No processo recorre-se a vários microrganismos (fungos, bactérias, leveduras e algas) para efetuar a decomposição da matéria orgânica. É um método que combina processos aeróbicos e anaeróbicos. Todavia, requer uma grande área de terreno, exige tempos longos para o seu funcionamento e é diurno. É pouco flexível no que toca ao design e operação [39]. Este tratamento é útil para remoção de 95% dos sólidos suspensos e para decompor matéria orgânica. Divide-se, de forma abrangente, em processos aeróbios, anaeróbicos e lagoas de estabilização [37].

Os métodos convencionais de tratamento de águas estão a tornar-se inadequados para cumprir o rigor dos atuais limites regulamentares de efluentes ou estão a aumentar os custos o fazer. Há estudos que mostram que muitas das substâncias que chegam às ETAR acabam por não ser biodegradáveis e que é esperado que certos antibióticos persistam nas condições de tratamento em que estas estações operam [40]. Estas circunstâncias têm gerado uma preocupação crescente com o risco de potenciais efeitos ecotoxicológicos e de propagação de resistência bacteriana. Neste sentido, têm sido exploradas técnicas para remover antibióticos de soluções aquosas. Os tratamentos terciários complementam o processo de tratamento das

águas e apresentam alguma eficiência na remoção de antibióticos em solução aquosa, ainda que a maioria deles possua alguns obstáculos [41].

II.2.4 Tratamento terciário

O tratamento terciário remove os sólidos totais em suspensão, os sólidos totais dissolvidos, e a matéria orgânica e inorgânica presentes no efluente secundário. Pode remover ainda constituintes orgânicos e inorgânicos específicos, nutrientes e matar os agentes patogênicos. Os tratamentos terciários podem ser divididos em cinco tipos e incluem a permuta iônica, as técnicas de separação por membranas, os processos eletroquímicos, a adsorção e os processos avançados de oxidação [37].

Na permuta iônica um ou mais contaminantes iônicos indesejáveis são removidos da água por troca com outras substâncias iônicas, com a resina no interior da instalação a atuar como meio para a permuta. Em estações de tratamento de águas residuais, é sobretudo utilizada para amaciar e remover azoto, metais pesados e sólidos dissolvidos totais [37]. O fato de existirem diferentes tipos de resina permite uma boa seletividade, por outro lado, os permutadores ficam rapidamente poluídos e os custos operacionais são elevados [42].

Um processo de membrana é qualquer método que dependa de uma barreira de membrana para filtrar ou remover partículas. O fluido é passado através da membrana devido à diferença de pressão entre um lado da membrana e o outro, sendo que os contaminantes ficam retidos de um lado. Embora muitos tipos de meios filtrantes sejam utilizados para tratamento de água - por exemplo, argila, lodo e areia - uma das propriedades que distingue as membranas é a sua capacidade de separar substâncias mais pequenas, tais como sais e íões. A separação física é um dos benefícios do processo de separação de membranas com químicos sem mudança de fase e sem requerer adição no fluxo de alimentação. Estas características conferem destaque a esta tecnologia, que é considerada uma solução importante para a purificação de águas através da separação poluentes de fontes contaminadas [43].

Existem 4 processos de membrana ativados por pressão que permitem a separação na fase líquida: a microfiltração (MF), a ultrafiltração (UF), a nanofiltração (NF) e a osmose inversa (RO). As membranas têm diferentes graus de permeabilidade, conferida pela dimensão dos poros. As membranas MF têm o maior tamanho de poro (0,1 a 10 microns), seguidas pelo UF (0,1-0,01 microns), NF (0,01-0,035 microns) e as membranas RO que em termos efetivos são não porosas (0,0001 microns) [44].

No caso dos tratamentos com recurso a membranas, a incorporação de sistemas de fotocatalise ou PAO pode trazer benefícios para a eficiência do tratamento de águas residuais [43].

Os processos eletroquímicos podem ser realizados através de reações de oxidação e de redução diretas, libertando substâncias químicas que removem fisicamente os poluentes das águas residuais ou através da produção de espécies químicas reativas. As técnicas eletroquímicas são de dois tipos: eletrodiálise e eletrocoagulação. Na primeira, ocorre transporte de iões de sais através de membranas de troca iónica numa diferença de potencial eléctrico aplicada. Este processo dá-se numa célula de electrodiálise, que tem geralmente uma secção diluente e uma parte em salmoura formada por uma membrana de troca de aniões, e uma membrana catiónica entre dois eléctrodos. A electrodiálise resulta no aumento da concentração de iões no compartimento da salmoura e a redução dos iões no compartimento diluído. Quanto à eletrocoagulação, esta envolve a aplicação de uma carga eléctrica na água e a coagulação diz respeito ao processo de alteração da carga superficial das partículas, permitindo que a matéria em suspensão forme uma aglomeração.

A adsorção é o processo de acumulação de matéria quer gasosa ou líquida à superfície de um adsorvente por ligação física ou química. Este processo apresenta benefícios no tratamento de poluentes, uma vez que é um processo simples, fácil de operar, ecológico e eficiente em comparação com a fotodegradação e outras tecnologias baseadas em membranas. A eficácia da adsorção para remoção de antibióticos depende principalmente do tipo de adsorvente, e as suas propriedades incluem, por exemplo, a porosidade ou o diâmetro dos poros. Os materiais amplamente utilizados para a remoção de tetraciclinas incluem adsorventes à base de carbono, metais e óxidos metálicos, estruturas metal-orgânicas (MOF), argila e minerais, materiais mesoporosos, resinas poliméricas, adsorventes derivados de lamas e compósitos metálicos suportados por biopolímeros. Atualmente, a adsorção continua a ser um desafio e tem alguns inconvenientes, sobretudo devido à deterioração progressiva da capacidade após uma série de ciclos de tratamento. Outro inconveniente é a formação de resíduos secundários, tais como os compostos orgânicos recuperados sem utilidade e o adsorvente gasto. Acresce o fato de exigir a eliminação especializada ou o tratamento de resíduos secundários fora do local [45].

Por fim, abordam-se os processos avançados de oxidação, que por integrarem a componente fotocatalítica estudada neste documento, merecem uma análise mais atenta. Assim, optou-se por agrupá-los e discriminá-los no subcapítulo que se segue.

II.2.5 Remoção por Processos Avançados de Oxidação

Os sistemas de tratamento avançado acima descritos são atualmente os mais utilizados utilizados em estações de tratamento de águas residuais. No entanto, nas últimas décadas, os avanços nos métodos analíticos permitiram a deteção de concentrações muito baixas (na ordem de ng/L) de vários compostos em águas que não foram analisadas até agora. Embora estes compostos ditos emergentes nem sempre estejam sujeitos aos regulamentos existentes sobre a

qualidade da água, os seus efeitos na saúde humana e no ambiente tornam a sua eliminação conveniente. O risco associado à presença destes poluentes no ambiente deve-se não só à sua toxicidade aguda, mas também à sua genotoxicidade, à sua capacidade de desenvolver resistência em agentes patogénicos, e ao risco de alterações endócrinas devido à exposição contínua dos organismos aquáticos a estes contaminantes. Além disso, estes produtos concebidos para serem biologicamente ativos podem afetar significativamente os peixes e as plantas aquáticas, mesmo em concentrações muito baixas. Na tabela 5 estão os dados da concentração residual de tetraciclina em diferentes matrizes aquosas:

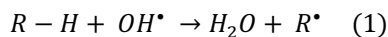
Tabela 5. Concentração residual de tetraciclina em várias matrizes aquosas por país (adaptado de [45])

| País | Matriz aquosa | Concentração média |
|-------------|----------------------------------|---------------------------|
| Portugal | Afluente de ETAR | 0 - 32,3 ng/L |
| | Efluente de ETAR | 0 - 22,8 ng/L |
| China | Água de superfície | 263,60 ng/L |
| | Água do rio Shan Pui | 2,01 ng/L |
| EUA | Efluente de ETAR | 0,07 - 0,37 µg/L |
| | Água de superfície | 0,11 µg/L |
| | Água subterrânea | >0,5 µg/L |
| Reino Unido | Água de superfície | <0,11 µg/L |
| Alemanha | Água de superfície | 1,2 - 4,2 µg/L |
| Nigéria | Água de rio | 0,1 µg/L |
| Zimbabué | Água de superfície | 150 µg/L |
| Tailândia | Água de aquacultura | 180 ng/L |
| Irão | Água de superfície e subterrânea | 5,4 - 8,1 ng/L |

Nenhum destes métodos de tratamento é suficientemente eficaz para produzir água com níveis aceitáveis destes poluentes, pelo que uma fase de tratamento adicional é frequentemente necessária para atingir este objetivo [46]. Por outro lado, entre as razões que levaram à utilização de métodos de tratamento modernos, tais como processos avançados de oxidação, estão igualmente os problemas operacionais e os elevados custos da utilização de métodos tradicionais [47]. Assim, a integração com PAO é recomendada.

Os PAO são um grupo de métodos de tratamento químico com elevado potencial de aplicabilidade. Devido à sua elevada capacidade de remover compostos orgânicos, incluindo antibióticos, têm sido sugeridos como uma solução de tratamento válida para remover estes poluentes das águas residuais. O princípio fundamental dos processos avançados de oxidação é a produção de OH[•], que resulta a partir de H₂O₂, O₃, fotocatalise ou oxidantes usando UV ou luz solar. Os radicais hidroxilo são conhecidos agentes oxidantes fortes e não selectivos. Após a sua produção, estes começam a atacar os compostos orgânicos, o que leva ao colapso

completo destes compostos orgânicos [48]. Os radicais hidroxilo atacam o composto orgânico e capturam um átomo de hidrogénio (R - H), o que leva à formação de um radical orgânico (R[•]), como se mostra na equação de reação 1. Para formar muitos produtos e produtos secundários, este radical passará por uma série de reações químicas [46].



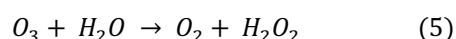
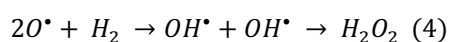
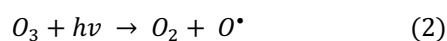
Além disso, os PAO podem ser utilizados no tratamento simultâneo de vários poluentes porque têm uma reacção rápida e uma oxidação não selectiva. Existem diversas formas de categorização dos PAO, tendo-se optado por classificá-los como fotoquímicos (UV/O₃, UV/H₂O₂, UV/H₂O₂/O₃), fotocatalíticos (TiO₂/UV, Foto-Fenton) ou processos de oxidação química (O₃, O₃/H₂O₂, H₂O₂/Fe²⁺) [45] [49].

II.2.5.1 Processos Fotoquímicos

As tecnologias que envolvem processos fotoquímicos são simples, limpas, rentáveis em muitas aplicações e, muitas vezes, dão ao utilizador final o duplo benefício tanto do tratamento de contaminantes ambientais como da desinfeção [50].

II.2.5.1.1 O₃/UV

A ozonação combinada com a radiação UV (O₃/UV) constitui um sistema catalítico eficiente para a degradação de compostos refratários (alcanos, cloroalcanos, hidrocarbonetos aromáticos e olefinas [51]) nas águas residuais. O processo é iniciado pela fotólise do ozono e seguido pela produção de radicais OH[•] através da reação de O[•] com a água. O efeito sinérgico provocado pela reação do O₃ com radiação UV promove a decomposição do ozono através da produção direta (equações 2, 3 e 4) e indireta (equações 5 e 6) de radicais hidroxilo [52].

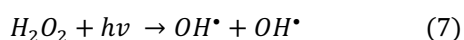


Num estudo piloto levado a cabo em águas residuais de estações de tratamento de águas residuais de parques industriais foi reportado que os principais contributores para a operação do processo UV/O₃ ser economicamente viável foram a eficiência da distribuição de

O₃, o controlo da pressão relativa dentro do reator, o rácio de adição de ozono e a intensidade da radiação UV [52].

II.2.5.1.2 UV/H₂O₂

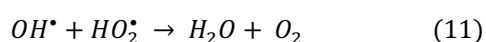
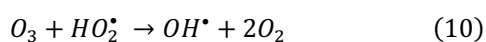
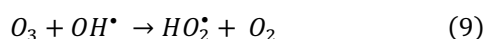
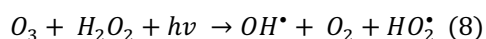
O método mais direto para a gerar radicais hidroxilo é através da clivagem de H₂O₂. A fotólise de H₂O₂ produz radicais hidroxilo através de um processo direto que resulta na formação de dois radicais hidroxilo por cada cada fóton absorvido a 254 nm (equação 7).



Como o coeficiente de extinção molar, isto é, a capacidade de uma substância absorver a radiação de uma determinada frequência, do H₂O₂ a 254 nm é significativamente inferior à do ozono (19,6 M⁻¹s⁻¹ e 3300 M⁻¹s⁻¹, respetivamente), para que aquele gere um nível suficientemente elevado de radicais OH[•] numa solução a concentração de H₂O₂ tem de ser bastante elevada. De forma a ultrapassar esta limitação, podem ser usadas lâmpadas UV de alta intensidade, média pressão e banda larga. Outra opção é o recurso a lâmpadas de Xénon de alta intensidade, cujo output pode ser ajustado para corresponder às características de absorção do H₂O₂, cuja absorvância máxima ocorre a 220 nm [50].

II.2.5.1.3 UV/H₂O₂/O₃

O ozono molecular é necessário para a oxidação direta de poluentes orgânicos em processos de ozonização. Os poluentes orgânicos são foto-oxidados e mineralizados por radicais OH formados no processo UV/O₃/H₂O₂ (equação 8). Na presença de radiação UV, a decomposição do ozono pode ser iniciada por H₂O₂ e os radicais OH, que reagem rapidamente com substâncias orgânicas, são produzidos a partir da reação do O₃ e do H₂O₂. A fotólise UV, o pH, a concentração de ozono, a força iónica e a concentração de radicais são fatores que afetam a estabilidade do ozono. A seguir, sumariam-se as reações em cadeia que explicam a decomposição do ozono [53]:





Dependendo das exigências de tratamento de água e do equipamento instalado, a prática comum é aplicar os métodos UV/H₂O₂ ou baseados em ozono, pelo que combinação destas duas tecnologias (UV/H₂O₂ e PAO à base de ozono) raramente é considerada. Num sistema O₃/UV/H₂O₂, a adição de UV pode reduzir a quantidade de ozono utilizada, diminuindo assim o custo da degradação e melhorando a capacidade de oxidação deste sistema para compostos orgânicos. O método de O₃/UV/H₂O₂ também mostra uma capacidade oxidante forte sobre a degradação de compostos orgânicos de difícil decomposição por tratamentos biológicos. Assim, com vista à melhoria da eficiência da degradação e redução dos custos inerentes, o O₃/H₂O₂/UV pode ser um método de degradação adicional [54].

II.2.5.2 Processos Fotocatalíticos

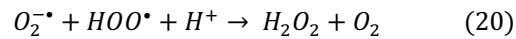
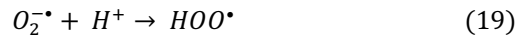
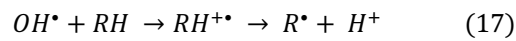
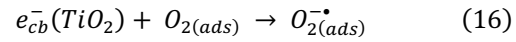
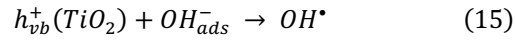
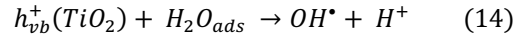
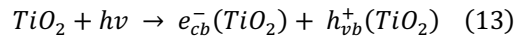
Devido aos elevados custos energéticos associados à implementação de tratamentos de águas residuais baseados em lâmpadas UV, os PAO que as substituem por irradiação solar, tais como a fotocatalise mediada por TiO₂/UV e a reação Foto-Fenton, representam uma alternativa promissora e ambientalmente responsável [49].

II.2.5.2.1 TiO₂/UV

O TiO₂ apresenta-se como uma opção de especial interesse graças à estabilidade química do fotocatalisador, ao seu baixo custo e à capacidade de utilizar a pequena percentagem da radiação ultravioleta proveniente do sol. Além disso, pode transformar os antibióticos em compostos facilmente biodegradáveis ou moléculas orgânicas menos tóxicas, reduzindo ou eliminando assim a sua atividade [41].

A absorção pelo semicondutor (TiO₂) de fótons incidentes de energia $h\nu$ que correspondam ou que excedam a energia da banda de semicondutores produz elétrons de banda de condução e_{cb}^{-} (TiO₂) e lacunas na banda de valência h_{vb}^{+} (TiO₂), ou seja, falta de um elétron numa posição onde poderia existir (equação 13). Uma vez à superfície do semicondutor, a presença de um aceitador adequado (para e_{cb}^{-}) e doador (para h_{vb}^{+}) evitará a quase instantânea e indesejável recombinação. Os aniões hidroxilo e as moléculas de água adsorvidas na superfície de TiO₂ atuam como doadores de elétrons, enquanto o oxigénio molecular se comporta como aceitador de elétrons, levando à formação de radicais hidroxilo (OH[•]) e superóxido (O₂^{•-}) (equações 14 a 16). Quando uma molécula orgânica (RH) é adsorvida à superfície semicondutora, a reação com os radicais hidroxilo ocorre, seguida de decomposição estrutural em vários intermediários até, eventualmente, à mineralização total (equação 17). Devido ao seu elevado potencial de oxidação, as lacunas resultantes da ação dos fótons podem também participar na oxidação direta dos poluentes orgânicos (eq. 18). Um radical peróxido (HOO[•])

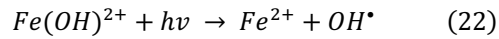
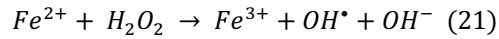
também pode ser gerado a partir da protonação de O_2 e, conseqüentemente, levar à formação de peróxido de hidrogénio (equações 19 e 20) [49].



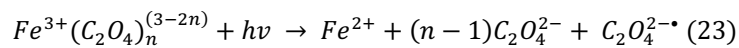
Em termos de parâmetros fotocatalíticos fundamentais e da sua influência na velocidade de reação, destacam-se seis itens. Quanto à concentração inicial de poluente, a maioria das reações segue uma cinética de primeira ordem e a eficiência máxima seria atingida no ponto de saturação da superfície do catalisador. Este, por sua vez, influenciará positivamente a reação de forma proporcional à sua quantidade. Porém, chegado a um dado ponto, que depende da geometria e das condições experimentais, as partículas de catalisador em excesso passam bloquear a penetração da radiação UV incidente. O pH tem efeito na adsorção do poluente à superfície do catalisador e na agregação das suas partículas. Por outro lado, no intervalo entre 20 e 80 °C o fator temperatura revelou-se irrelevante. No que à irradiação diz respeito, apenas comprimentos de onda até 390 nm são úteis (aproximadamente 5% do espectro solar). A velocidade de reação é proporcional ao fluxo radiante, contudo valores elevados devem ser evitados, dado o favorecimento do mecanismo de recombinação em que o eletrão excitado para a banda de condução regressa à posição na banda de valência. Por fim, a concentração de O_2 assume um papel preponderante, visto que a mineralização não ocorre sem a presença de O_2 e a velocidade de reação aumenta com a concentração de oxigénio dissolvido, ainda que apenas até certo ponto [49].

II.2.5.2.2 Foto-Fenton

O processo Foto-Fenton compreende a combinação de ferro (Fe^{2+}) com peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e radiação UV-Vis (solar) resultando na produção de dois moles de OH^\bullet por mole de peróxido de hidrogénio (equações 21 e 22) [49].



O valor ótimo para o pH operacional do processo (foto-) Fenton é cerca de 3, o que se deve, em primeiro lugar, à solubilidade dos complexos Fe^{3+} -hidroxi, que diminui para valores de pH acima de 3. Depois, o $[Fe(OH)]^{2+}$, a espécie mais fotoactiva (com bandas de absorção entre 290 e 400 nm), atinge a sua fracção molar máxima em torno do pH anteriormente mencionado. Consequentemente, estas questões vão limitar a aplicação deste processo em escala industrial devido aos custos associados às correcções de pH (acidificação inicial e neutralização final). A formação de complexos entre os iões Fe (III) e carboxilato é apontada como a forma mais viável de ultrapassar este obstáculo. Assim, o processo Foto-Fenton é melhorado através da extensão da solubilidade do ferro a valores de pH mais elevados e práticos, apresentando uma absorção de radiação mais forte nos comprimentos de onda até 580 nm e aumentando o rendimento quântico da produção de Fe^{2+} de acordo com a equação 23 [49].



À semelhança do que se verifica na opção TiO_2/UV , também neste processo existem alguns parâmetros chave que importa controlar. O pH vai ter impacto na distribuição de espécies de hidróxido de ferro dissolvido e de Fe^{2+} , que possuem diferentes coeficientes de absorção molar. O pH ideal (aproximadamente 2,8) evita a precipitação e maximiza os rendimentos quânticos. O aumento da concentração de ferro vai ter um efeito positivo nas taxas de reação, contudo, devido à atenuação da radiação incidente associada, a relação não é proporcional. A otimização precisa de ter em conta a geometria do reator e os efeitos do filtro interno (efeito que resulta da absorção da radiação incidente por uma espécie diferente do absorvedor primário pretendido durante uma experiência de irradiação de luz [55]). Quanto ao efeito da concentração de oxidante, encontrar o equilíbrio da concentração de H_2O_2 deve ser tido em conta. Concentrações mais baixas levam a uma redução da taxa de reação do processo, enquanto concentrações mais elevadas geram concorrência desfavorável para os radicais OH^\bullet . Por norma, o aumento da temperatura aumenta as taxas de reação, até ao ponto em que o peróxido de hidrogénio é consumido de forma ineficaz. O excesso de radiação favorece a ocorrência paralela de reações térmicas. A melhoria do percurso ótico reduz de forma acentuada a quantidade de fótons necessários. Finalmente, concentrações mais elevadas requerem tempos de tratamento

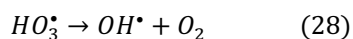
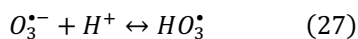
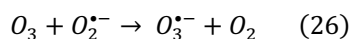
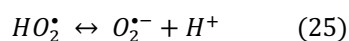
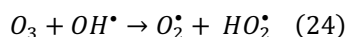
mais longos e são propensas a causar efeitos de filtro interno. Os iões inorgânicos libertados podem interferir com o processo de degradação (por exemplo: precipitação de ferro por fosfato) [49].

II.2.5.3. Processos de Oxidação Química

II.2.5.3.1 O₃

O ozono (em condições ácidas $E(O_3/O_2) = 2,07 \text{ V}$ [56]) é um bom agente oxidante e é o principal componente do processo de ozonização. Durante a ozonização, existem 2 mecanismos envolvidos na degradação de poluentes. O primeiro é a oxidação direta do ozono, que é uma reação lenta com um processo altamente seletivo. As reações do ozono molecular são predominantes a pH mais baixo, onde o ataque electrófilo ocorre em compostos orgânicos que se decompõem em ácidos gordos. As reações do ozono molecular são seletivas para os compostos que têm regiões nucleófilas, como ligações duplas de carbono; grupos -OCH₃, -CH₃, -OH; e outros grupos funcionais com enxofre, fósforo, oxigénio e azoto.

No segundo mecanismo consiste numa reação indireta do ozono molecular com o radical hidroxilo (equação 24) para formar o radical hidroperóxido. Este permanece em equilíbrio (equação 25). O O₂^{•-} (radical superóxido) e o O₃ reagem e forma-se O₃^{•-} (radical ozónido) (equação 26), que se decompõe em O₂ e OH[•] (equação 28). O balanço global resulta na formação de 2 radicais hidroxilo por cada 3 moléculas de ozono.

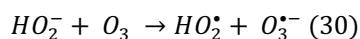
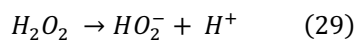


Para evitar a formação de subprodutos, é importante fazer a otimização tanto do processo de oxidação como da desinfecção da ozonização [43].

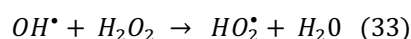
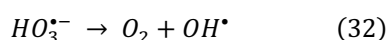
II.2.5.3.2 O₃/H₂O₂

A ozonização combinada com H₂O₂ é um sistema catalítico eficiente para a degradação de poluentes refratários presentes em águas residuais. O método O₃/H₂O₂, vulgarmente

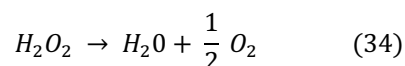
conhecido como PAO peroxona, envolve um mecanismo de radicais em cadeia assente na decomposição do ozono iniciada pelo anião hidroperóxido (HO_2^-). O efeito agregado da junção de O_2 com H_2O_2 promove a produção de radicais OH^\bullet .



Depois, o excesso de HO_2^- formado na equação 29 reage com O_3 segundo a equação 30 e gera radicais OH^\bullet de acordo com as equações que se seguem (31, 32 e 33):



Contudo, o excesso de H_2O_2 reage indesejadamente com OH^\bullet e provoca a formação de iões hidroperóxido (HO_2^\bullet), como demonstrado na equação 34. Por outro lado, não é recomendável uma concentração demasiado baixa, porque o H_2O_2 compete com sucesso pelos radicais hidroxilo e decompõe-se sem oxidar os poluentes, como demonstrado na equação (29).

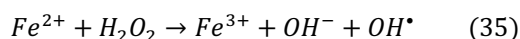


Existe um patamar limite na dose de ozono abaixo do qual a adição de H_2O_2 não afeta de forma apreciável a taxa de produção de OH^\bullet . O H_2O_2 reage com o ozono até deixar de ter impacto na degradação deste. Acima desse patamar a adição de H_2O_2 aumenta a taxa de produção de HO^\bullet . Assim, verifica-se que independentemente da adição de H_2O_2 , a ozonização tem pouco impacto na exposição ao OH^\bullet até que sejam aplicadas doses maiores do que as doses limite de ozono.

Em termos de escolha de reator para o processo, um reator homogéneo permite uma produção rápida e elevada das espécies radicais diretamente no líquido e sem limitações de transporte e de transferência em massa, em comparação com um reator gás-líquido tradicional em que a oxidação dos poluentes pelos radicais hidroxilo pode ser limitada pelo seu transporte do líquido até à interface, visto que estes radicais são muito reativos e não se difundem em solução [52].

II.2.5.3.3 H_2O_2/Fe^{2+}

Este tipo de reacção partilha semelhanças àquela que ocorre nos processos Foto-Fenton, mas neste caso, a taxa de formação de radicais OH é menor, uma vez que a radiação UV não intervém no processo:



Este tipo de método pode ser aplicado de forma eficaz como pré-tratamento, mas tem desvantagens, tais como a geração de lamas de hidróxido de ferro e a necessidade de um pH muito baixo, o que dificulta a operação [57].

II.2.5.4 Apreciação global dos PAO

A predominância dos tratamentos baseados em ozono entre os PAO deve-se à facilidade e velocidade a que se produzem radicais OH^{*} resultantes da desagregação de O₃, à estabilidade dos produtos secundários e por ser um pré-tratamento eficaz para a purificação de água. Pelo contrário, a formação de produtos genotóxicos e a baixa solubilidade em água apresentam-se como desvantagens à sua aplicação.

Os processos que juntam radiação UV e peróxido de hidrogénio beneficiam do baixo custo, da pouca dispersão de luz e da dupla função da radiação UV como desinfetante. Por outro lado, revelam-se ineficientes face a correntes muito poluídas ou de caudal elevados e são caras.

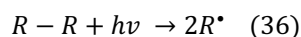
As tecnologias Fenton exploram a versatilidade dos iões Fe para reagir com os poluentes, tornando-se muito ativa em condições de pH ácido. Os pontos negativos são a baixa velocidade de reacção, a contaminação das lamas produzidas com elementos metálicos, o custo de preparação do reagente Fenton e a formação de clorato em soluções alcalinas [58].

Os mecanismos de fotocatalise, com ênfase nos que envolvem TiO₂, são estáveis, baratos e pouco tóxicos, para além de eficazes e amigos do ambiente (os produtos secundários têm uma carga poluente reduzida). A seleção do catalisador e o fato dos comprimentos de onda da radiação requererem elevados custos operacionais são desafios a serem superados [59].

II.3 Fotólise

A fotólise baseia-se no fornecimento de energia aos compostos químicos sob a forma de radiação, que é absorvida por diferentes moléculas para atingir estados de excitação durante o tempo necessário para sofrerem reacções químicas. As moléculas absorvem energia radiante através dos fotões, energia essa necessária para excitar eletrões específicos e formar radicais livres que são submetidos a uma sucessão de reacções em cadeia para dar os produtos de

reação. Estes radicais livres podem ser gerados por homólise (processo que consiste rutura de uma ligação química numa molécula em que cada átomo participante na ligação retém um eletrão do par que constituía a união original, formando-se radical) de ligações fracas; por transferência eletrónica do estado excitado da molécula orgânica para o oxigénio molecular, resultando no radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) ou noutros reagentes químicos, tais como ozono ou peróxido de hidrogénio, para que sejam produzidos radicais hidroxilo [46]. Segue-se o mecanismo de rutura homolítica [60]:



Estes métodos fotolíticos utilizam a radiação UV devido à maior energia dos seus fotões, tal como indicado pela equação de Planck:

$$E_\lambda = \frac{hc}{\lambda} \quad (37)$$

onde E_λ designa a energia de um fotão associada ao comprimento de onda (λ) da radiação, h é a constante de Planck e c é a velocidade da luz.

Assim, a fotólise direta envolve interação da luz com as moléculas com o fito de provocar a sua dissociação em fragmentos mais simples. Por esta razão, em qualquer processo em que a radiação UV seja utilizada, pode ocorrer fotólise. A intensidade, o comprimento de onda da radiação ou o rendimento quântico (rácio entre o número de fotões emitidos e o número de fotões absorvidos) dos compostos a eliminar são fatores que influenciam a performance do processo.

A fotodegradação indireta deve-se à oxidação mediada por radicais que são gerados quando a luz excita algumas moléculas, vulgarmente conhecidas como fotossensibilizadoras. A matéria orgânica dissolvida - particularmente ácidos húmicos e fúlvicos - e os iões de nitrato são dois exemplos de fotossensibilizadores geralmente encontrados em ambientes aquáticos. De notar que a geração de radicais pelos fotossensibilizadores é um processo mediado pela luz UV e, portanto, a fotodegradação indireta desfavorece a fotólise direta [50].

A fotólise é aplicada frequentemente em águas superficiais, desempenhando um papel importante na gestão das águas superficiais ou das águas residuais como uma etapa adicional de eliminação (Boreen et al., 2004) [61], destacando-se por ser um tratamento rápido e sem produtos químicos que requer uma manutenção e custos operacionais relativamente baixos. Ademais, os UV provaram a sua versatilidade e capacidade para promover a quebra das ligações químicas de uma grande variedade de compostos refratários.

No entanto, a utilização de tratamentos isolados por UV tem algumas limitações importantes. A fotólise direta remove os poluentes de forma limitada e, se por um lado, a existência de partículas fotossensibilizadoras facilita a geração de radicais, por outro também podem causar um aumento da turbidez dos meios aquosos, impedindo assim a penetração da radiação UV no meio poluído e dificultando a contribuição da fotólise indireta para a eficiência do processo. Estas questões fazem com que a fotólise por si só não seja normalmente aplicada.

A utilização da irradiação UV, juntamente com outros oxidantes, pode contribuir para a degradação dos poluentes parentais, bem como dos subprodutos potencialmente nocivos. Acresce que a maioria das lâmpadas UV de baixa pressão que estão comercialmente disponíveis emite aproximadamente 5% da radiação num comprimento de onda próximo de 185 nm, o que produz ozono no reator. Assim, os UV têm sido principalmente combinados com agentes oxidantes como o ozono ou peróxido de hidrogénio para melhorar a geração de radicais hidroxilo. Em geral, a fotólise direta é menos eficaz na degradação dos produtos farmacêuticos presentes nas águas residuais e também requer mais energia do que, por exemplo, a ozonização [50].

A luz solar como força motriz para reações de fotólise também é uma hipótese para tratamento de águas residuais [41], à semelhança do que se estuda neste documento. A radiação solar é composta por 4 tipos de radiação. A radiação infravermelha corresponde a 49% da radiação solar, a radiação visível a 43%, a radiação ultravioleta a 7% e os restantes 1% dizem respeito a outros tipos de radiação [62].

A oxidação via luz solar pode ocorrer através da oxidação direta do poluente (oxidação fotolítica) ou na presença de outros oxidantes ou fotocatalisadores (por exemplo, óxidos semicondutores), o que aumenta ainda mais a eficácia do processo. O mecanismo do processo baseia-se na formação de radicais altamente reativos e não seletivos (geralmente radicais hidroxilo) que contribuem para a oxidação dos contaminantes. A fotocatalise é de grande interesse devido à sua capacidade de utilizar diretamente a luz solar, o que pode, em última análise, levar à degradação de compostos orgânicos persistentes, incluindo compostos de farmacêuticos, bem como à desativação de microrganismos. Entre os diferentes tipos de fotocatalisadores conhecidos, o dióxido de titânio (TiO_2) é o mais utilizado, que apesar das suas limitações na aplicação tem múltiplas vantagens, como se verá a seguir.

Por fim, a fotólise via radiação solar, ainda que possa funcionar como um tratamento de finalização ou em conjunto com catalisadores para uma performance melhorada, demonstra indicadores promissores quanto à sua capacidade para degradar tetraciclinas [63]. Naturalmente, a disponibilidade alargada de luz solar na maioria das geografias do planeta faz deste processo uma alternativa atrativa tanto do ponto de vista da execução como dos custos.

Este método demonstrou ser eficaz na decomposição de tetraciclina, tendo sido registada uma degradação de 80% após irradiação (500 W/m^2) durante 3 horas de 500 mL de uma solução de concentração inicial de 15 ng/L [63].

II.4 Fotodecomposição de tetraciclinas

A decomposição das tetraciclinas tem sido documentada extensamente na literatura, porém os estudos tendem a incidir mais no antibiótico mais consumido da classe, a tetraciclina, e não tanto no composto em estudo, a minociclina.

A minociclina é mais susceptível à degradação oxidativa quando comparada com outros antibióticos de tetraciclina, pois o anel D da minociclina contém um p-amino-fenol substituído (figura 5) [14].

Hlavka e Bitha (1966) [64] relataram uma reação fotoquímica na tetraciclina, tendo descoberto que a irradiação de uma solução de tetraciclina e de um sensibilizador (foram usadas acetofenona e benzofenona) em metanol, através de um vidro de quartzo com duas lâmpadas de mercúrio de 100 watts, resulta numa cisão seletiva da ligação carbono-nitrogénio para produzir 4-dedimetilaminotetraciclina. Também concluíram que a reação se daria alternativamente sem um sensibilizador, mas recorrendo a uma lâmpada de 430 watts.

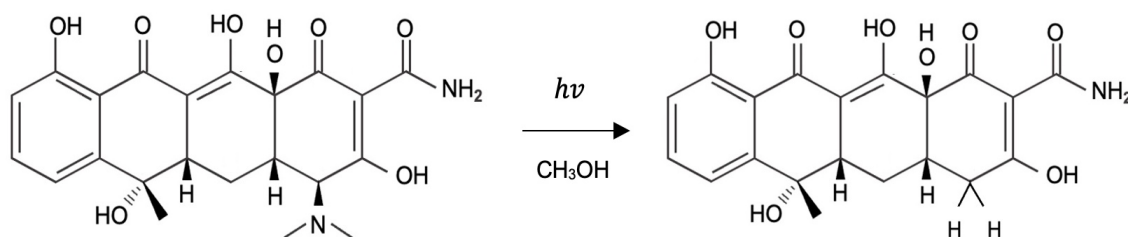


Figura 7. Reação da tetraciclina em metanol com irradiação (adaptado de [64])

Foram consideradas duas vias para esta reação. Numa delas, o sistema excitado fotoquimicamente seria submetido à desaminação com a formação de dois radicais que poderiam recombinar ou remover o hidrogénio do solvente para produzir 4-dedimetilaminotetraciclina e dimetilamina. Na outra via reacional, seria removido um hidrogénio da cadeia lateral $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ de uma forma concertada para produzir 4-dedimetilaminotetraciclina e a base de Schiff, cujo work-up daria metilamina. Yuanling Liang, M. Bonner Denton e Robert B. Bates (1998), também através de estudos de estabilidade da tetraciclina após a dissolução em metanol, verificaram que a tetraciclina se decompõe rapidamente sob a influência da luz e do oxigénio atmosférico, formando mais de catorze produtos de degradação diferentes. Adicionalmente, propuseram uma sequência de reações químicas para a degradação da tetraciclina em solução de metanol e reportaram que o metanol desempenha um papel muito importante na degradação das tetraciclinas através da adição e substituição dos grupos funcionais em TC.

Noutro estudo, conduzido por Wiebe e Moore (1977) [65], investigou-se a foto-oxidação de sete tetraciclinas (tetraciclina, clorotetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina, demeclociclina, metaciclina e minociclina) prescritas naquela altura, juntamente com algumas experiências que indicaram que as tetraciclinas poderiam atuar como fotossensibilizadores para a oxidação de moléculas aceitadoras adequadas. Os autores concluíram que embora fosse difícil estabelecer uma relação entre as diferenças de estrutura e as diferenças de reatividade foto-oxidativa, a variação da taxa com o pH estava claramente relacionada com o estado de ionização das tetraciclinas em solução ligeiramente alcalina. Relataram, igualmente, que a reação de foto-

oxidação é acompanhada por uma perda do pico de absorção a cerca de 370 nm, que se deve ao agrupamento de cromóforos no anel BCD (figura 8) conter o sistema ionizável correspondente a pK_{a3} .

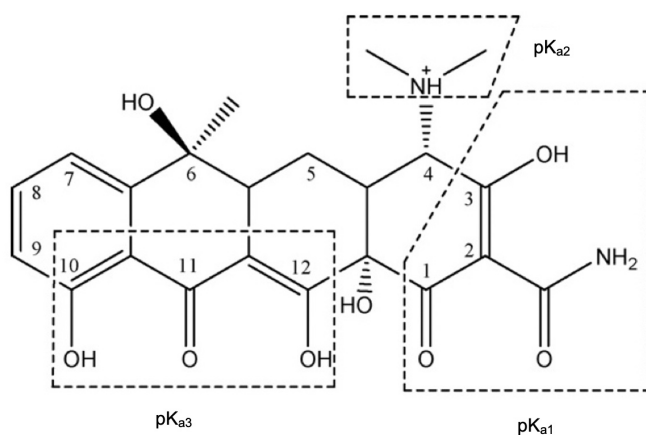


Figura 8. Estrutura molecular da tetraciclina com as diferentes constantes de dissociação (adaptado de [66]. Os valores de pK_a são $pK_{a1} = 3,3$; $pK_{a2} = 7,68$; $pK_{a3} = 9,7$ de acordo com Stephens et al. (1956) [67].

Chen et al (2008) [66] investigaram a cinética fotoquímica e o mecanismo da tetraciclina em solução aquosa sob irradiação solar simulada. O estudo da ressonância do spin dos elétrons revelou que houve geração de oxigênio singleto (1O_2) e a sua velocidade de formação diminuiu com o incremento do pH na solução de tetraciclina iluminada. Adicionalmente, foi confirmado que, para além da possibilidade de formação de espécies reativas de oxigênio, a tetraciclina poderia ser excitada pela luz solar. Na continuação deste estudo, Chen et al. (2011) [68] determinaram os produtos de oxidação auto-sensibilizada da tetraciclina e oxitetraciclina e investigaram os efeitos de Ca^{2+} e Mg^{2+} na degradação auto-sensibilizada. A degradação dos compostos ocorreu em soluções aquosas sob a luz solar simulada. O 1O_2 resultante do processo de auto-sensibilização oxidou a região dimetilamino do átomo C4 das tetraciclinas no grupo N-metilformamida. A presença de Ca^{2+} na solução facilitou a geração de produtos de oxidação auto-sensibilizados a pH 7,3, mas foi observada uma inibição vincada a pH 9,0, ao passo que a presença de Mg^{2+} foi desfavorável para a geração dos produtos foto-sensibilizados a ambos os valores de pH.

S. Wu, et al. (2020) [41] reportaram pela primeira vez a fotodegradação da tetraciclina com recurso ao catalisador TiO_2 sob irradiação de luz visível. Estes resultados foram atribuídos a um processo que se inicia com a formação de um complexo entre a tetraciclina e a superfície do TiO_2 . Este é excitado pela luz visível, resultando na transferência de um elétron de uma orbital LUMO da tetraciclina para a banda de condução do TiO_2 . Por fim, o elétron transfere-se para uma molécula de O_2 adsorvido e forma $O_2^{\cdot-}$. A espécie $O_2^{\cdot-}$ gerada desempenha um papel crítico durante a degradação fotocatalítica via luz visível. Provaram também que a dopagem com Nitrogénio (N- TiO_2) aumenta a absorção de luz visível de TiO_2 , gerando assim mais elétrons e lacunas para participar nas reações redox de superfície. Foram detetados vários produtos intermediários na fotodegradação da tetraciclina com TiO_2 e propostos diferentes mecanismos

para as degradações fotocatalíticas sob UV e luz visível. De notar que, no caso do N-TiO₂ foi proposto um mecanismo diferente. Este método obteve resultados de grande relevância ao transformar os antibióticos em compostos facilmente biodegradáveis ou moléculas orgânicas menos tóxicas, provando eficiência processos avançados de oxidação.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 Amostra

A minociclina foi cedida por uma empresa farmacêutica proveniente de uma etapa intermédia do processo de produção. As amostras foram recolhidas em frascos de vidro e refrigeradas a 2°C.



Figura 9. Frasco de armazenamento da minociclina

III.2 Químicos e Reagentes

Foram utilizados reagentes de grau HPLC e água destilada para a preparação das soluções. O acetonitrilo foi obtido da Fisher Chemical, o ácido ortofosfórico da Merck e a trietilamina da Scharlau.

III.3 Unidade Experimental – Simulador Solar

III.3.1 Descrição

A fotodegradação da minociclina ocorreu sob radiação solar simulada, cuja fonte foi um simulador solar da Newport, modelo LCS-100 e classe ABB (classificação que avalia a capacidade do simulador em aproximar-se à luz do sol com base nos critérios de correspondência espectral, variação da irradiância numa dada área e instabilidade temporal), com uma lâmpada de Xénon de 100 W [69]. A célula de referência e medidor utilizados são da marca Newport, modelo 91150V, com um erro de 0,0001 Sol na gama de irradiâncias utilizada [70].



Figura 10. À esquerda e ao centro, o simulador solar da Newport. À direita, o colimador instalado a posteriori.

III.3.2 Procedimento Experimental

A preparação do procedimento começou com a determinação da distância a que o reator deveria estar da lâmpada, de forma que a irradiância fosse equivalente a 1 Sol (1360 W/m^2).



Figura 11. Medições da intensidade da irradiação.

Um balão de Erlenmeyer de 100 mL enrolado em papel de alumínio foi preenchido com volumes de 10, 50 ou 100 mL de solução de minociclina de concentração 10 mg/L. O recipiente com a solução tinha conectados a si 2 tubos: um que levava a solução até ao reator e outro que a trazia. A circulação da solução pelo sistema era efetuada através de uma bomba da Hirschmann (Rotarus® Standard 50) a operar a 24 rotações por minuto (figura 12).

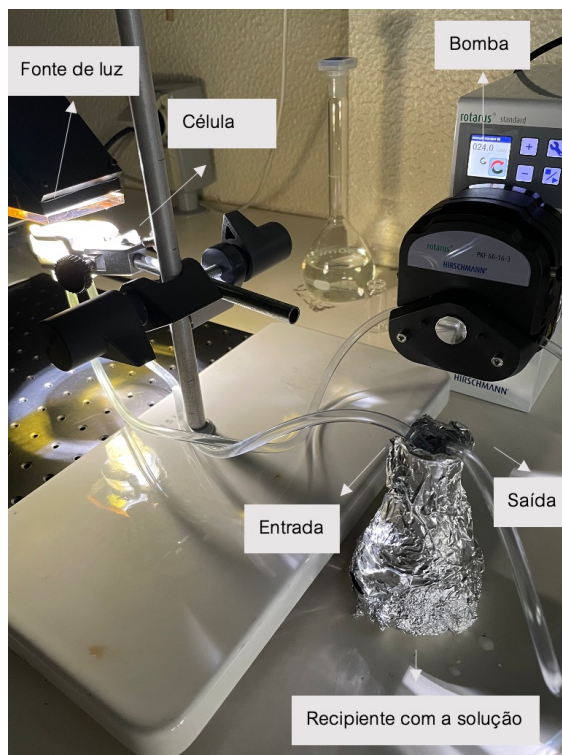


Figura 12. Esquema da unidade experimental

Considerou-se como o início da reação o momento em que se liga o simulador e a luz incide no reator. Periodicamente foram retiradas alíquotas de 3 mL e monitorizada a temperatura, que oscilou entre os 20 e 22 °C no decurso das experiências. A tabela 6 discrimina as propriedades mais relevantes do sistema num ensaio típico:

Tabela 6. Propriedades do sistema e variáveis de operação

| Característica (unidades) | Valor |
|---------------------------|-------|
| Irradiância (W/m^2) | 1360 |
| $C_{solução}$ (mg/L) | 10 |
| $D_{i\ tubos}$ (mm) | 3,2 |
| $L_{i\ tubos}$ (m) | 1,57 |
| Q_{bomba} (mL/s) | 0,36 |
| V_{reator} (mL) | 0,16 |

Para o caudal de bomba selecionado, determinou-se que o tempo de residência de 0,16 mL de solução no reator seria de 0,43 segundos e que seriam necessários 275 segundos para que 100 mL de solução passassem na pelo reator. A tabela seguinte ilustra um caso hipotético de uma experiência de 8 horas e o tempo de exposição real de um volume inicial de solução de 100 mL a luz solar.

Tabela 7. Número de ciclos e tempo efetivo de exposição numa experiência de 8 horas

| Característica (unidades) | Valor |
|---------------------------|-------|
| t_{exp} (h) | 8 |
| nº ciclos | 105 |
| t_{cel} (s) | 0,43 |
| t_r (s) | 45 |

Designa-se por t_{exp} o tempo total da experiência, por nº de ciclos o número de vezes que 100 mL passam na célula durante esse período, por t_{cel} o tempo que um volume de solução igual ao volume do reator permanece neste, e por t_r o tempo de exposição efetivo de um volume de solução equivalente ao volume do reator durante toda a experiência.

III.4 Métodos Analíticos

III.4.1 Espectroscopia UV-Vis

A espectroscopia UV-Vis é uma técnica analítica que explora a natureza ondulatória dos elétrões e as suas interações com a radiação eletromagnética, de forma a poder identificar e quantificar diferentes compostos. Essa caracterização é feita através da medição da quantidade de comprimentos de onda discretos de UV ou luz visível que são absorvidos ou transmitidos através de uma amostra em comparação com uma amostra de referência ou em branco. O equipamento possui uma ou duas lâmpadas que funcionam como fonte de luz. Esta fonte gera uma banda larga de radiação eletromagnética em todo o espectro UV-Vis, que passa por um dispositivo de dispersão e a separa em comprimentos de onda. Na área da amostra a radiação interage com a matéria, podendo ser absorvida, refletida ou transmitida. A transmitância (T) é a fração da luz incidente com um comprimento de onda específico, que atravessa uma amostra de matéria e é dada por:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (38)$$

Em que a radiação incidente é representada por I_0 e a radiação transmitida por I . Porém, para a maioria das aplicações, recorre-se à absorvância, uma vez que a relação entre a absorvância e a concentração, tal como a relação entre a absorvância e o comprimento do percurso são normalmente lineares. A absorvância (A_λ) pode ser obtida através da transmitância recorrendo à seguinte equação:

$$A_\lambda = -\log T = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) \quad (39)$$

Por fim, a intensidade da radiação reflectida ou transmitida é medida por um ou mais detetores.

Os espectros de absorção UV-Vis das soluções de minociclina foram recolhidos a partir do espectrofotómetro UV-Vis Jasco V-750 de feixe duplo, equipado com um monocromador único e fotomultiplicador. A fonte de luz consistiu numa lâmpada de halogénio e outra de deutério. O software de aquisição de dados e controlo do sistema a que se recorreu foi o Spectra Manager™ II. As medições foram executadas com recurso à ferramenta *Baseline* e foram utilizadas duas células de quartzo com percurso ótico de 1 cm. No que diz respeito aos parâmetros instrumentais, a faixa de comprimentos de onda medida foi 190-600 nm e o intervalo de aquisição de dados 0,2 nm. Para quantificação da minociclina foram usados os comprimentos de 274 e 347 nm por corresponderem a máximos de absorvância na gama 190-600 nm e com base em literatura [65] [71].

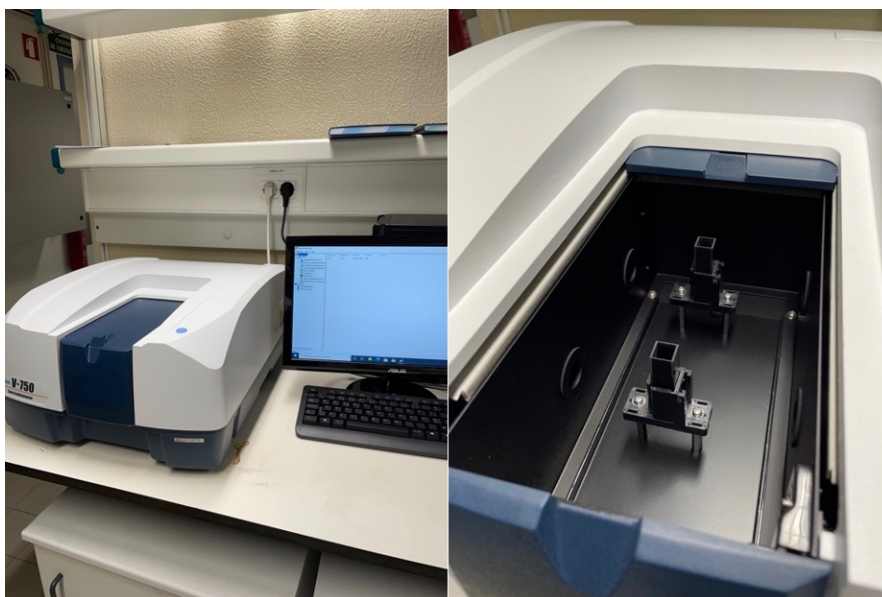


Figura 13. À esquerda, espectrofotómetro Jasco V-750. À direita, suportes de células (ao fundo a célula de referência e à frente a célula da amostra)

III.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência – diode array detection (HPLC - DAD)

Um DAD deteta a absorção na região UV-visível, sendo que, enquanto um detector UV-Vis tem apenas uma secção de receção de luz do lado da amostra, um DAD tem múltiplas matrizes de fotodíodos que permitem a aquisição simultânea de informação numa gama de comprimentos de onda. A ideia é que os espectros sejam medidos em intervalos de 1 segundo ou menos durante a separação por HPLC com passagem contínua de eluato (mistura entre a fase móvel e o analito). A identificação dos componentes é feita a partir do seu tempo de retenção, num dado comprimento de onda fixo. Caso existam pequenos desvios no tempo de retenção que dificultem a identificação dos componentes, o DAD pode ser utilizado para os definir através da comparação do espectro.

O método analítico foi executado num sistema HPLC-DAD (Agilent 1200 System, Agilent Technologies) equipado com um desgaseificador a vácuo, uma bomba quaternária, um amostrador automático, um compartimento de coluna termostaticado, um detetor *diode-array* e um computador. As condições cromatográficas foram definidas com base em (Matos et al., 2017) [71]. A coluna utilizada foi a Purospher 120 Star RP-18 (125x4mm 5µm, Lichrocart, Merck, Darmstadt, Alemanha) e o eluente foi composto por uma mistura de acetonitrilo e água numa proporção volumétrica de 15:85, respetivamente, e 0,6% (V/V) trietilamina (TEA), com posterior ajuste a pH 3 com ácido ortofosfórico (85%). A composição da fase móvel manteve-se constante e o caudal de fluido que passa pela coluna foi de 1,2 mL/min durante todo o processo. A temperatura da coluna foi de 25 °C. Foi programado que o volume de amostra retirado seria de 20 µL e o tempo de passagem na coluna de 8 minutos, com um *post-time* de 2 minutos entre sucção de amostras. A seleção dos comprimentos de onda de absorção máxima foi baseada nos espectros de absorção UV-Vis e nos trabalhos prévios de (Prasad, A.; Rao, V., 2010) [72] e (Matos et al., 2017) [71], assim consideraram-se os comprimentos de onda 274 e 347 nm para a quantificação da minociclina.

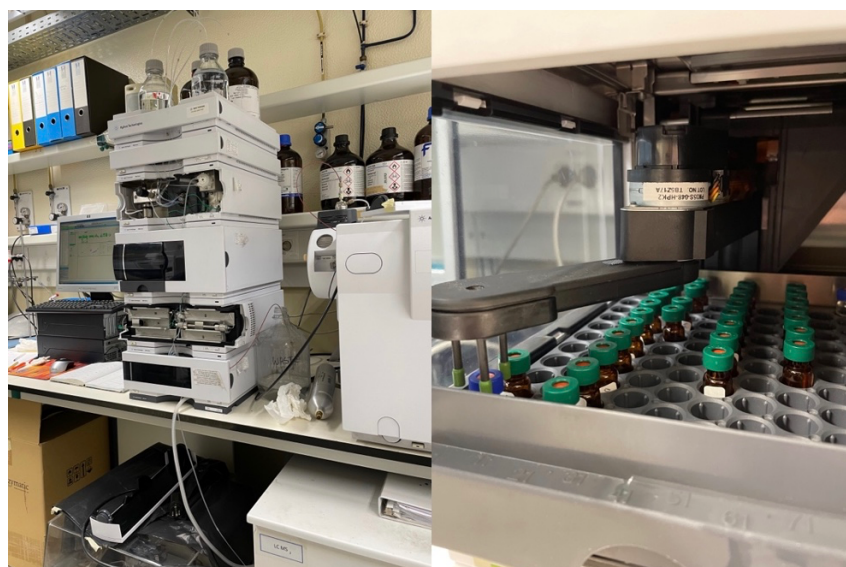


Figura 14. À esquerda, sistema HPLC-DAD Agilent 1200 series. À direita, compartimento das amostras.

III.4.3 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica mede as alterações de peso de um material em função da temperatura (ou tempo) sob uma atmosfera controlada. Os seus principais usos incluem a medição da estabilidade térmica de um material, a determinação do teor de carga em polímeros, o quantidade de humidade e de solvente, e a composição percentual dos elementos de um composto. Uma análise TGA é realizada através do aumento gradual da temperatura de uma amostra num forno, à medida que o seu peso é determinado numa balança analítica que

permanece fora do forno. Nesta técnica verifica-se perda de massa se um evento térmico envolver a perda de um componente volátil. O peso da amostra é traçado em função da temperatura ou do tempo para ilustrar as transições térmicas no material - tais como perda de solvente em polímeros ou água de hidratação em materiais inorgânicos, ou a decomposição do material.

A análise TGA/DTG foi levada a cabo no aparelho de modelo STA7200RV (Hitachi High-Tech Science Corporation), utilizando um porta-amostras de α -alumina. A massa de amostra medida foi 4,756 mg. Os parâmetros experimentais para as curvas de TGA foram: taxa de aquecimento de 10 °C/min, sob um caudal de 200 mL/min de N₂, desde a temperatura ambiente até 600 °C.

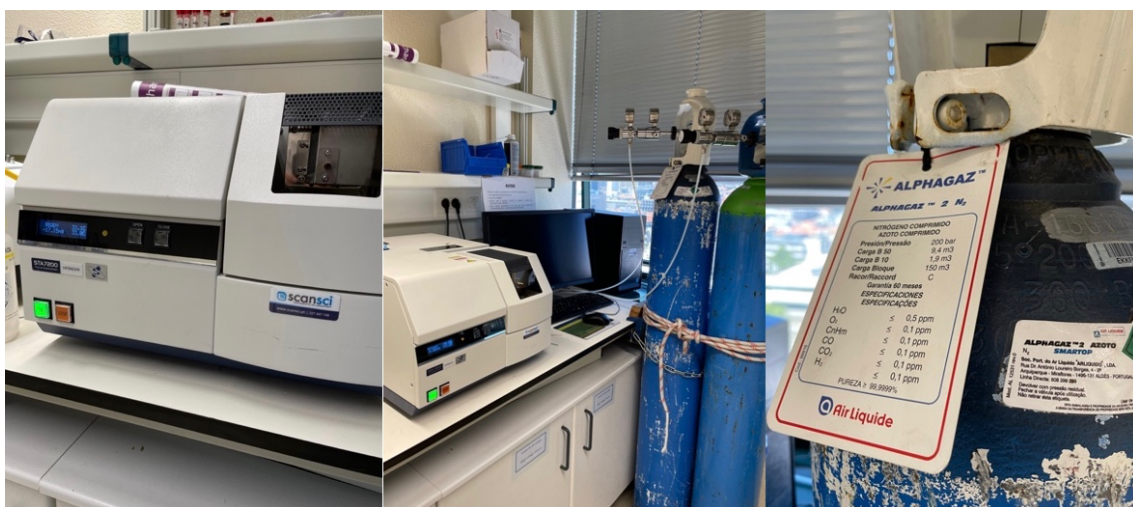


Figura 15. À esquerda e ao centro, TGA Hitachi STA7200RV. À direita, especificações da botija de azoto comprimido usada na análise

III.4.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

O espectrómetro de infravermelhos com transformada de Fourier (FTIR) é um dos instrumentos que se baseia em espectroscopia de infravermelhos. O cerne da tecnologia espectroscópica de infravermelhos está nas vibrações atômicas de uma molécula que absorve apenas frequências e energias específicas de radiação infravermelha. Isto permite a deteção e classificação de moléculas pelo FTIR, uma vez que moléculas diferentes terão espectro infravermelho diferente. O espectrómetro FTIR utiliza um interferómetro para medir a energia que está a ser transmitida à amostra. A radiação infravermelha emitida pelo corpo negro chega ao interferómetro onde a codificação espectral dos sinais acontece. O sinal interferométrico resultante é transmitido através ou resalta na superfície da amostra, onde comprimentos de onda específicos de energia são absorvidos. O feixe acaba por passar através do detetor e passa posteriormente para o computador de processamento para transformação de sinais de energia

de Fourier. Importa referir que o interferograma é um gráfico de intensidade versus tempo, no entanto o que se pretende é um gráfico de intensidade versus frequência. Para haver esta transformação é necessário aplicar uma operação matemática conhecida como Transformada de Fourier.

O espectro FTIR do pó de minociclina foi obtido através da operação de um espectrómetro da Perkin Elmer, modelo Spectrum Two™, na gama de número de onda 400-4000 cm^{-1} e resolução de 1 cm^{-1} .

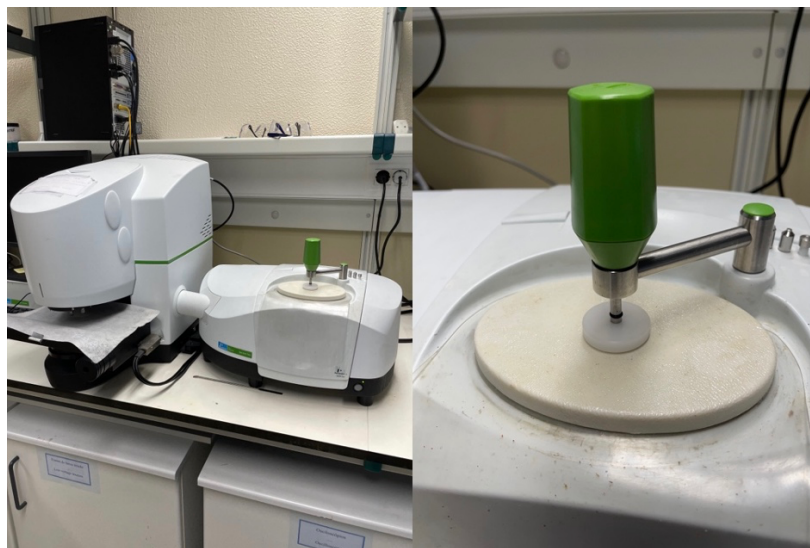


Figura 16. Espectrofotómetro FTIR da Perkin Elmer.

III.5 Modelação Cinética

A cinética da fotodegradação da minociclina com recurso a radiação solar testada teve por base as premissas de que se estaria na presença de uma reação de primeira ordem e a variação de volume provocada pela tiragem de amostras seria desprezável (S. Wu et al., 2020). Considerou-se também que o sistema comportar-se-ia de forma semelhante a um reator batch com recirculação. Assim, a equação 40 traduz a cinética da reação dada por:

$$\ln\left(\frac{C}{C_0}\right) = -kt_r \quad (40)$$

em que C_0 é a concentração inicial de minociclina em mg/L , C é a concentração de minociclina em mg/L após um dado tempo t_r em minutos e k é a constante cinética de pseudo primeira ordem.

II.6 Soluções de calibração

Para a quantificação da minociclina através da espectrofotometria UV-Vis foram usadas soluções de concentração 0,02 – 40 mg/L (n=12). Replicou-se este procedimento para melhorar a precisão da calibração.

Quanto à quantificação da minociclina através do HPLC-DAD recorreu-se a soluções de calibração de concentração 0,08 – 10 mg/L (n=5).

As curvas de calibração foram obtidas através de regressão direta linear. No caso do caso da espectrofotometria UV-Vis relacionou-se a absorvância nos comprimentos de onda definidos com a concentração das soluções standard. Para o método cromatográfico, a relação foi estabelecida entre a área dos picos e a concentração das soluções standard.

IV RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1 Caracterização da amostra

Sujeitou-se a minociclina a 3 técnicas de laboratório diferentes: espectrofotometria UV-Vis, análise termogravimétrica e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.

IV.1.1 Espectro UV-Vis da minociclina em pó

A figura 16 demonstra o espectro de absorção da minociclina antes e após ser sujeita a radiação solar simulada durante 24 horas. Verifica-se que não existem alterações significativas entre dois espectros, sendo que ambos se caracterizam por um aumento substancial da absorvância a partir dos 550 nm (0,4) até aos 400 nm (1,5).

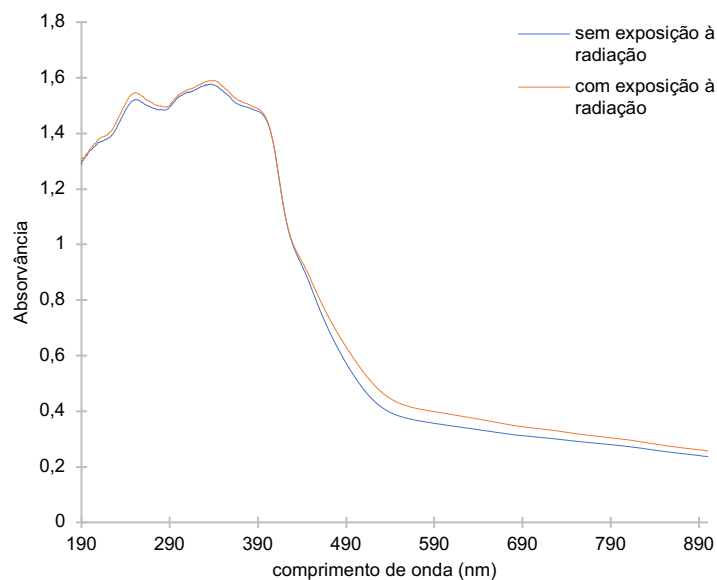


Figura 17. Espectro UV-Vis do pó de minociclina na gama de comprimentos de onda 190-900 nm.

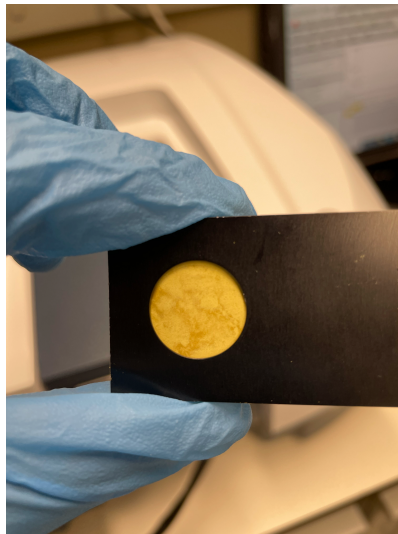


Figura 18. Fotografia do pó de minociclina após 24 horas de exposição a radiação solar.

Na figura 17, é possível ver na figura 10 dois tons de amarelo na amostra de minociclina. O tom mais claro aproxima-se da cor pré-exposição e as partes mais escuras surgiram após a irradiação.

IV.1.2 Análise termogravimétrica (TGA/ DTG)

Os resultados do TGA/ DTG permitem estudar a estabilidade do composto em função da temperatura. Aqueles estão apresentados nas figuras 18 e 19, no intervalo de temperaturas 22 a 100 °C.

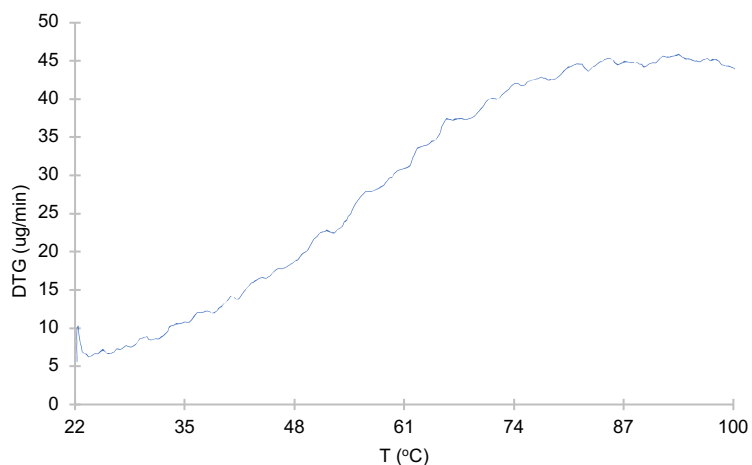


Figura 19. Termogravimetria derivativa na gama de temperaturas 22-100 °C.

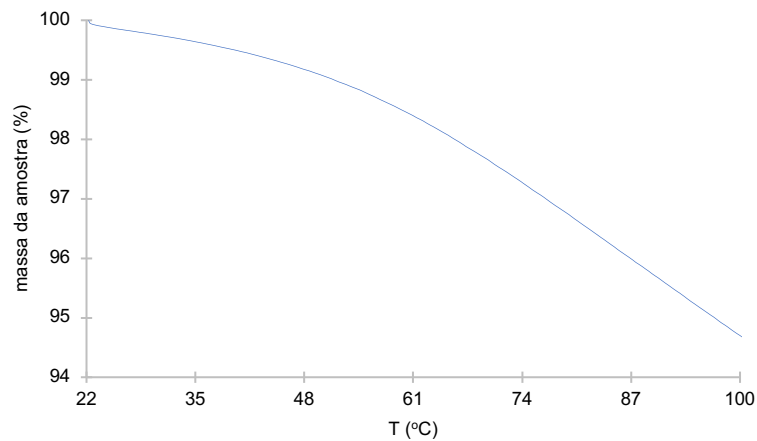


Figura 20. Análise termogravimétrica do pó de minociclina na gama de temperaturas 22-100 °C

O composto revela um ligeiro decréscimo de massa neste intervalo de temperaturas (cerca de 5%), com uma incidência mais pronunciada a partir de 61 °C, o que poderá ser indicativo da perda de hidratação da amostra [17].

IV.1.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Na figura 20 está representado o espectro FTIR da amostra de minociclina. Rodrigues et al. [19] caracterizam uma nova estrutura cristalina da minociclina (β -minociclina) com um espectro FTIR e estabelecem comparações face ao cloridrato de minociclina bruto. As pequenas diferenças podem ser notadas nas bandas de absorção associadas às ligações O-H e N-H: no caso do composto bruto, os picos são mais pronunciados e pontiagudos ($3480-3355\text{ cm}^{-1}$), enquanto na β -minociclina estas bandas de absorção ($3,434-3,253\text{ cm}^{-1}$) são mais largas. Neste estudo, também foi concluído que a estequiometria do cloridrato de minociclina comum (α -minociclina) corresponde aproximadamente a 2 moléculas de água por molécula de minociclina.

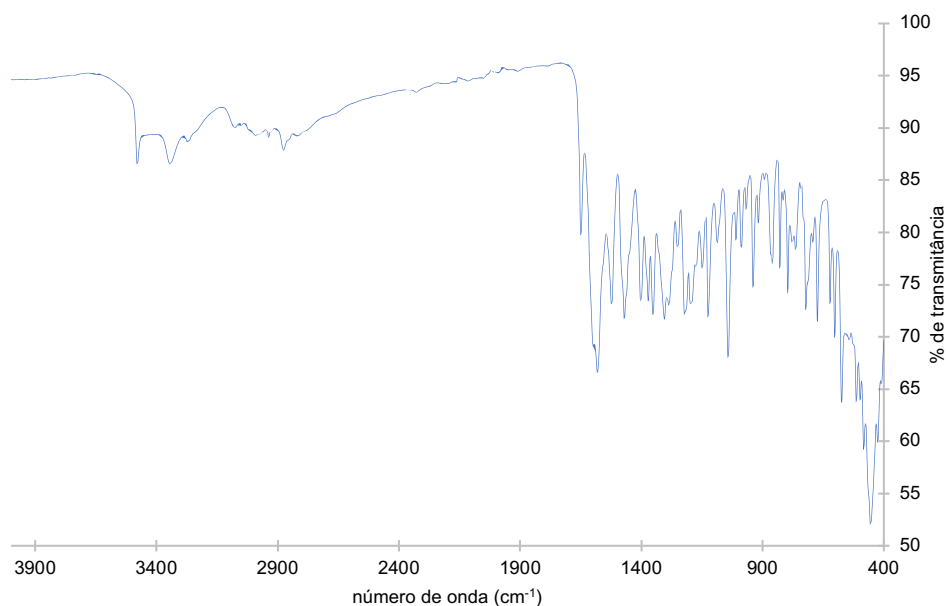


Figura 21. Espectro FTIR: α -minociclina

Na tabela 8 estão indicados os principais grupos característicos:

Tabela 8. Grupos característicos do espectro infravermelho do cloridrato de minociclina di-hidratado (adaptado de [14])

| Número de onda (cm^{-1}) | Grupo característico |
|-------------------------------------|--|
| 3479 | Estiramento do NH_2 do 2-carboxamido e 12-hidroxi |
| >3479 - 2000 | Grupos fenólicos e enólicos hidroxílicos ligados ao Hidrogénio e átomo de Hidrogénio no grupo dimetilamino protonado |
| 1617 | Carbonilo do grupo 2-carboxamido |
| 1580 | Cetonas conjugadas ligadas ao Hidrogénio e sistemas de dupla ligação conjugada |

À luz do que foi referido anteriormente, é possível concluir que a amostra disponível é de α -minociclina.

IV.2 Curvas de calibração

IV.2.1 Concentração vs. absorvância

Com vista à obtenção de informação quantitativa sobre a minociclina, nomeadamente sobre o estudo da fotodegradação, foi necessário calibrar a minociclina utilizando concentrações conhecidas do composto em questão numa solução com o mesmo solvente que a amostra de concentração desconhecida. Consideraram-se, tal como anteriormente referido, dois comprimentos de onda de referência (274,2 e 347,4 nm), que correspondem a máximos de absorvância na gama.

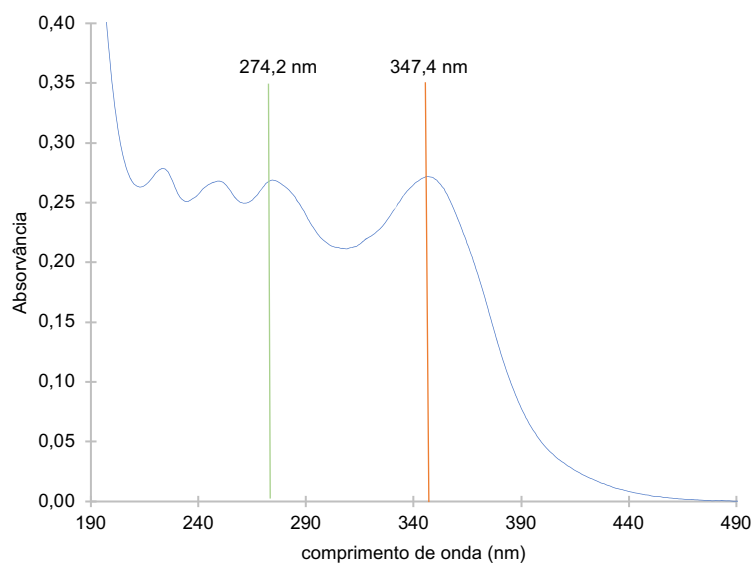


Figura 22. Espectro de absorção característico da minociclina ($c = 10 \text{ mg/L}$)

A partir da absorvância medida experimentalmente e recorrendo à curva de calibração é possível determinar a concentração das diferentes amostras. Essa relação é dada pela Lei de Lambert-Beer (41):

$$A = \varepsilon l c \quad (41)$$

Em seguida apresentam-se as curvas de calibração obtidas para cada um dos comprimentos de onda selecionados:

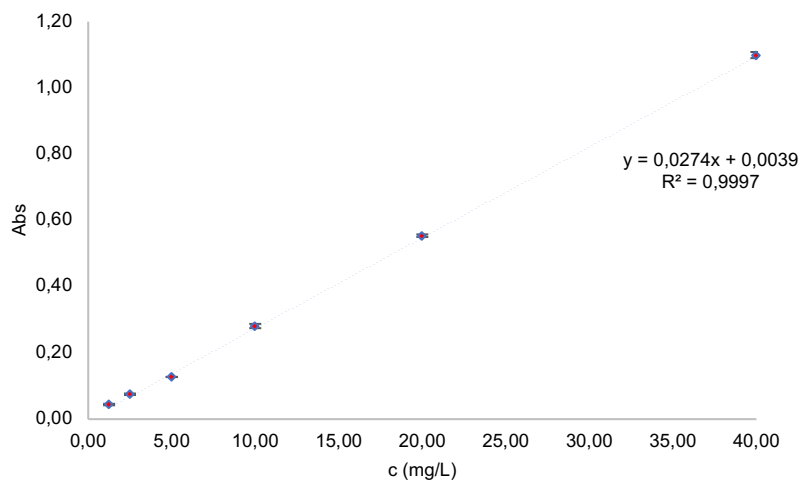


Figura 23. Curva de calibração a 274,2 nm.

Tabela 9. Dados da curva de calibração no comprimento de onda 274,2 nm

| Amostra | c (mg/L) | Abs (replicado 1) | Abs (replicado 2) | Média das absorvâncias | Desvio padrão |
|---------|----------|----------------------|----------------------|---------------------------|------------------|
| 12 | 0,02 | 0,008 | 0,005 | 0,006 | 0,002 |
| 11 | 0,04 | 0,009 | 0,012 | 0,011 | 0,002 |
| 10 | 0,08 | 0,012 | 0,012 | 0,012 | 0,000 |
| 9 | 0,16 | 0,022 | 0,012 | 0,017 | 0,006 |
| 8 | 0,31 | 0,022 | 0,017 | 0,019 | 0,004 |
| 7 | 0,63 | 0,046 | 0,033 | 0,039 | 0,009 |
| 6 | 1,25 | 0,045 | 0,043 | 0,044 | 0,001 |
| 5 | 2,50 | 0,073 | 0,077 | 0,075 | 0,003 |
| 4 | 5,00 | 0,143 | 0,112 | 0,127 | 0,022 |
| 3 | 10,00 | 0,277 | 0,285 | 0,281 | 0,006 |
| 2 | 20,00 | 0,556 | 0,552 | 0,554 | 0,002 |
| 1 | 40,00 | 1,098 | 1,101 | 1,099 | 0,002 |

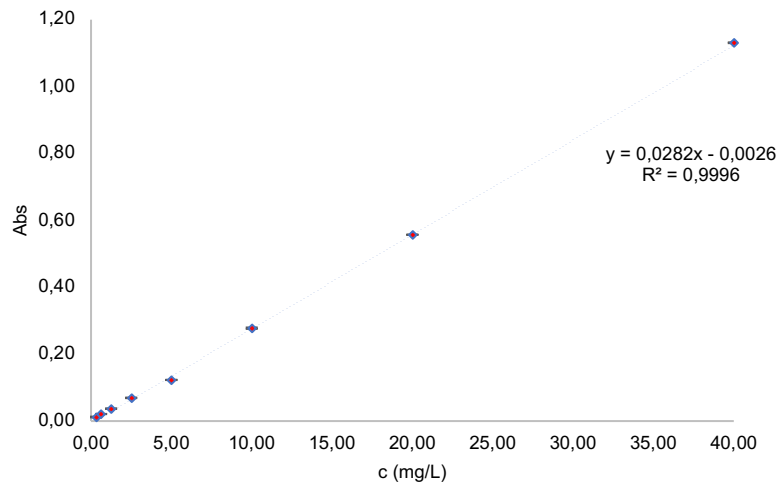


Figura 24. Curva de calibração (347,4 nm)

Tabela 10. Dados da curva de calibração no comprimento de onda 347,4 nm

| Amostra | c (mg/L) | Abs (replicado 1) | Abs (replicado 2) | Média das absorvâncias | Desvio padrão |
|---------|-------------|----------------------|----------------------|---------------------------|------------------|
| 12 | 0,02 | 0,004 | 0,003 | 0,004 | 0,001 |
| 11 | 0,04 | 0,005 | 0,005 | 0,005 | 0,000 |
| 10 | 0,08 | 0,005 | 0,004 | 0,005 | 0,001 |
| 9 | 0,16 | 0,008 | 0,007 | 0,008 | 0,001 |
| 8 | 0,31 | 0,012 | 0,012 | 0,012 | 0,000 |
| 7 | 0,63 | 0,023 | 0,020 | 0,021 | 0,002 |
| 6 | 1,25 | 0,038 | 0,037 | 0,037 | 0,001 |
| 5 | 2,50 | 0,070 | 0,069 | 0,069 | 0,001 |
| 4 | 5,00 | 0,137 | 0,109 | 0,123 | 0,020 |
| 3 | 10,00 | 0,277 | 0,278 | 0,278 | 0,001 |
| 2 | 20,00 | 0,554 | 0,560 | 0,557 | 0,004 |
| 1 | 40,00 | 1,133 | 1,129 | 1,131 | 0,003 |

Verificou-se que a gama de linearidade da curva de calibração a 274,2 nm foi 1,25 - 40 mg/L, e que para o comprimento de onda 347,4 nm foi 0,31 – 40 mg/L. Os gráficos que se seguem ilustram o comportamento das curvas de calibração para as concentrações mais baixas:

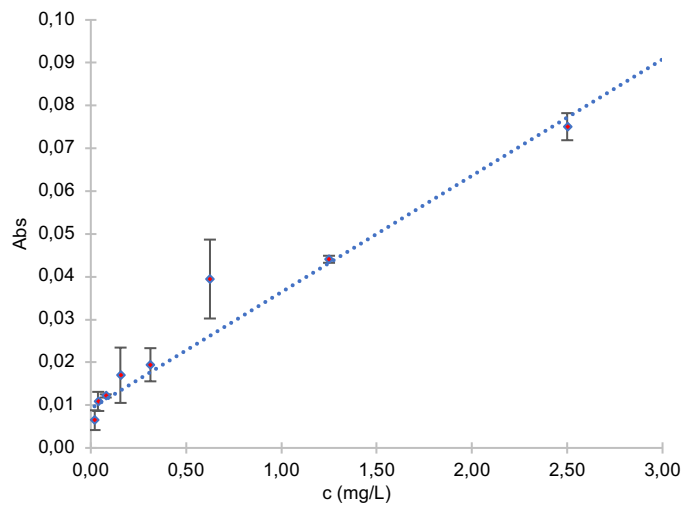


Figura 25. Desvio à curva de calibração na gama de concentrações 0-3 mg/L e desvios padrão das medições (274,2 nm)

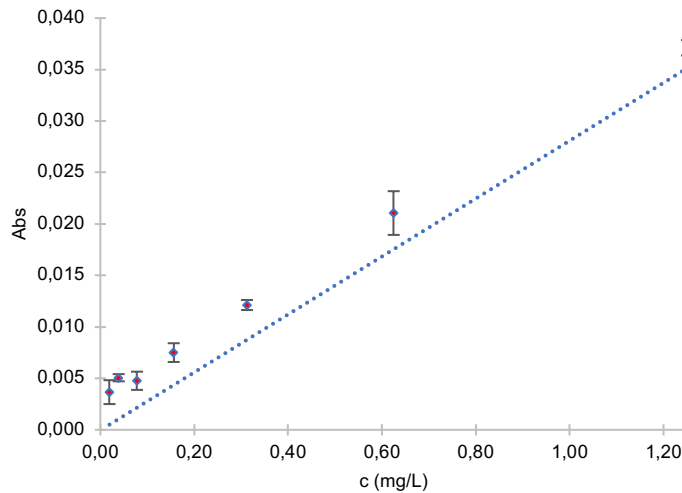


Figura 26. Desvio à curva de calibração na gama de concentrações 0-1,25 mg/L e desvios padrão das medições (347,4 nm)

Assim, se as soluções utilizadas nas experiências de fotodegradação tiverem uma concentração inicial de 10 mg/L, caso a degradação do composto ultrapasse os 88%, isto é, a concentração de minociclina em solução é inferior a 1,25 mg/L, o método de cálculo de concentrações no comprimento de onda de 274,2 nm perde a sensibilidade. O mesmo não se verifica a 347,4 nm, em que o limite de deteção é inferior e, por isso, o método mais sensível. Neste caso, o método é válido para uma degradação do composto até 97% (concentração final da solução de 0,31 mg/L).

IV.2.2 Concentração vs. área do pico

A quantificação da minociclina através do LC fez-se relacionando as áreas dos picos com concentrações conhecidas. Seguem-se as curvas de calibração da minociclina a 274 nm e a 347 nm nas figuras 26 e 27:

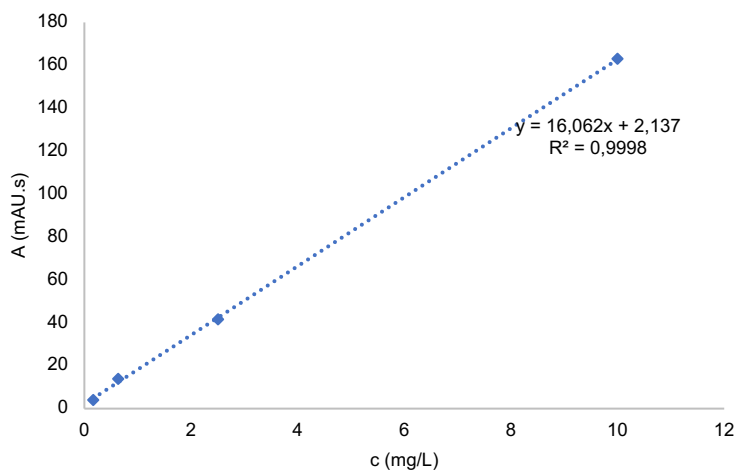


Figura 27. Curva de calibração a 274 nm

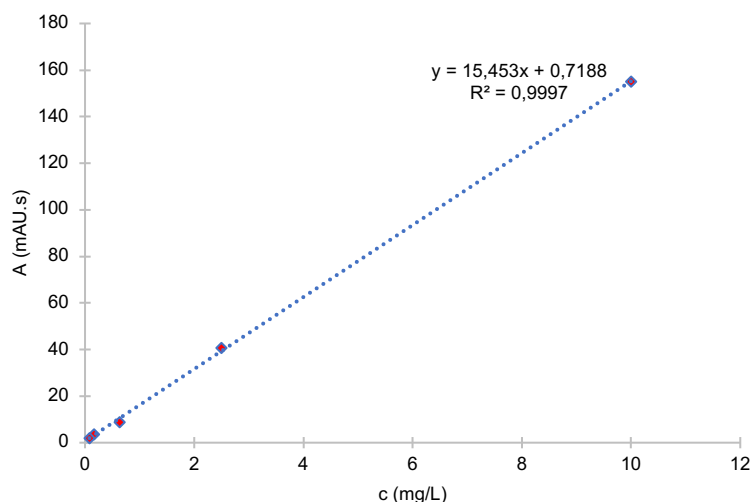


Figura 28. Curva de calibração a 347 nm

Tabela 11. Dados das curvas de calibração nos comprimentos de onda 274 e 347 nm.

| c mg/L | Área (mAU.s) 274 nm | Área (mAU.s) 347 nm |
|--------|---------------------|---------------------|
| 10 | 162,86 | 154,99 |
| 2,5 | 41,54 | 40,78 |
| 0,63 | 13,81 | 8,75 |
| 0,16 | 3,8 | 3,72 |
| 0,08 | 8,16 | 1,96 |

A 274 nm, a amostra de concentração 0,08 mg/L apresentou um valor discrepante face regressão linear, pelo não foi incluída na reta de calibração. Considera-se, portanto, que o intervalo de linearidade da curva de calibração foi 0,16 - 10 mg/L para 274 nm e 0,08 - 40 mg/L para 347 nm. À concentração de 0,04 mg/L, o equipamento não detetou qualquer pico em ambos os comprimentos de onda.

Conclui-se que, para tanto na espectroscopia UV-Vis como na cromatografia líquida, as curvas de calibração obtidas relativas ao comprimento de onda 347 nm apresentam limites de deteção inferiores aos obtidos via comprimento de onda 274 nm. Assim, de forma a quantificar a degradação da minociclina nas experiências que seguem, optou-se por recorrer às curvas de calibração obtidas a 347 nm.

IV.3 Estabilidade da minociclina em solução aquosa

A estabilidade da MC foi avaliada em água durante 24 horas em ambiente de bancada (20 °C) e no congelador (-20 °C). A solução tinha uma concentração inicial de 10 mg/L, preparada a partir de uma solução-mãe fresca. Aquela foi analisada no espectrofotómetro UV-Vis e no

HPLC-DAD e posteriormente comparada com as soluções armazenadas a 20 e -20 °C, também elas analisadas nos mesmos equipamentos, como se demonstra nas figuras 28 e 29.

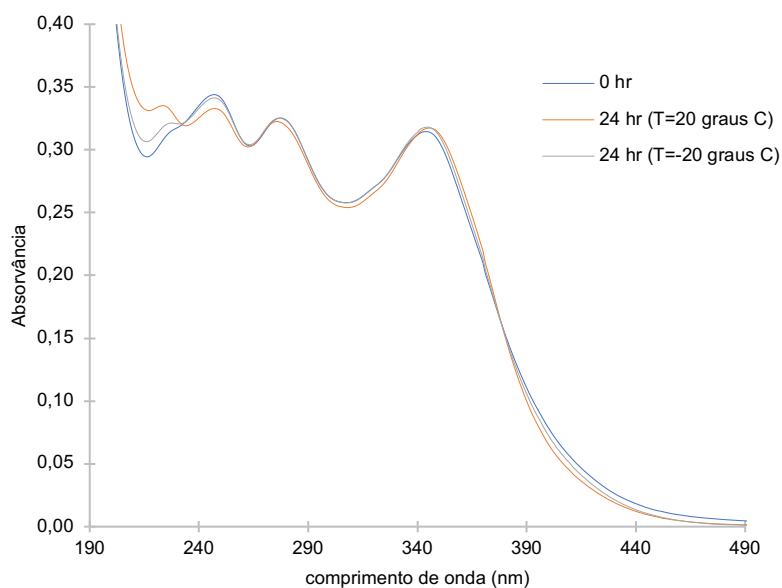


Figura 29. Espectro UV-Vis na gama de comprimentos de onda 190-490 nm da solução inicial de 10 mg/L imediatamente após a preparação e 24 horas depois a duas temperaturas distintas.

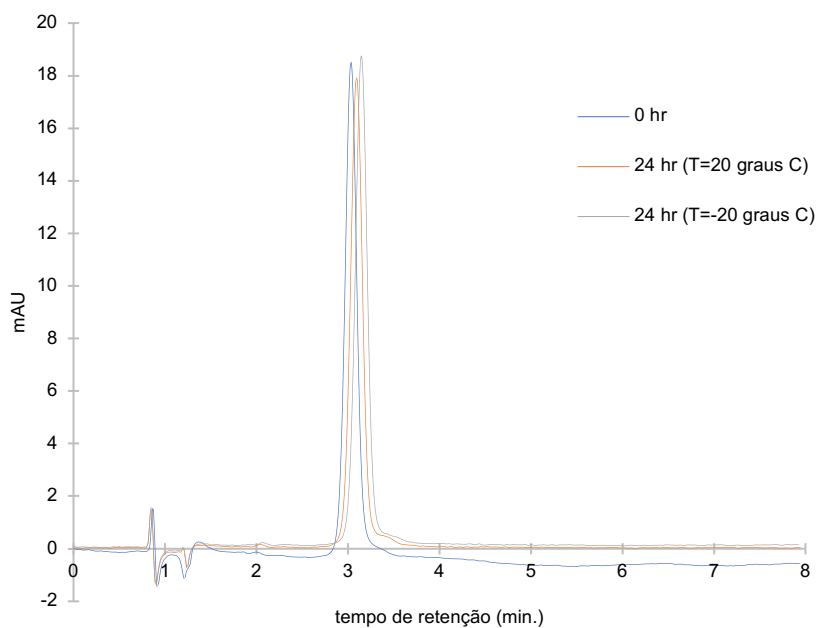


Figura 30. Cromatograma (347 nm) da solução inicial de 10 mg/L imediatamente após a preparação e 24 horas depois a duas temperaturas distintas.

Os espectros UV-Vis estão praticamente sobrepostos, no entanto, à medida que se avança para comprimentos de onda menores, essa sobreposição deixa de se verificar. No caso do cromatograma HPLC, a intensidade dos picos oscila em torno dos 18 mAU, mais uma vez sem variações importantes entre amostras, ainda que os tempos de retenção sejam ligeiramente

diferentes. As tabelas 12 e 13 contêm os resultados dos espectros e cromatogramas, respectivamente:

Tabela 12. Principais dados do estudo da estabilidade da minociclina a partir dos espectros UV-Vis.

| T (°C) | Tempo da experiência (h) | Abs (274 nm) | Abs 347 (nm) | rácio entre Abs de picos | c/c ₀ (347 nm) |
|--------|--------------------------|--------------|--------------|--------------------------|---------------------------|
| 20 | 0 | 0,323 | 0,313 | 1,03 | - |
| 20 | 24 | 0,322 | 0,317 | 1,02 | 1,01 |
| -20 | 24 | 0,324 | 0,317 | 1,02 | 1,01 |

Tabela 13. Principais dados do estudo da estabilidade da minociclina a partir dos cromatogramas HPLC

| T (°C) | Tempo da experiência (h) | Área (mAU.s) | c (mg/L) | c/c ₀ (347 nm) |
|--------|--------------------------|--------------|----------|---------------------------|
| 20 | 0 | 181,74 | 11,71 | - |
| 20 | 24 | 178,28 | 11,49 | 0,98 |
| -20 | 24 | 184,69 | 11,91 | 1,02 |

Com base nas tabelas, não se verificam diferenças significativas entre os dois tipos de armazenamento ao fim de 24 horas. O rácio entre a concentração final e a inicial de 1,01 obtido através dos espectros aponta para a estabilidade da solução em ambas as formas de armazenamento. Os resultados dos cromatogramas na tabela 13 denunciam uma ligeira diminuição da concentração na solução que ficou na bancada, porém, este método não é isento de erro, uma vez que a base dos picos é difícil de definir manualmente, recorrendo-se ao programa para a traçar automaticamente. Assim, as áreas poderão sofrer discrepâncias que não correspondam a uma alteração real das concentrações. Apesar da questão referida, os resultados sugerem que a minociclina em solução 10 mg/L é estável.

Foi reportado que durante 6 horas e à temperatura de 20 °C uma solução minociclina de 12 mg/L sofreria uma degradação na ordem dos 15% na bancada e 5% no congelador [71], pelo resultados obtidos nesta experiência contrariam este estudo prévio.

IV.4 Influência do volume de solução inicial

IV.4.1 Sem exposição solar

Os ensaios traduziram-se na preparação de três soluções de minociclina de igual concentração (10 mg/L) e diferentes volumes: 10, 50 e 100 mL. Cada um dos volumes foi colocado a circular no sistema durante 24 horas, mas sem exposição a radiação solar. Desta forma, foi possível avaliar o comportamento da MC sem interferência externa. Apresentam-se os espectros de absorção e cromatogramas das diferentes soluções (figuras 30 a 35):

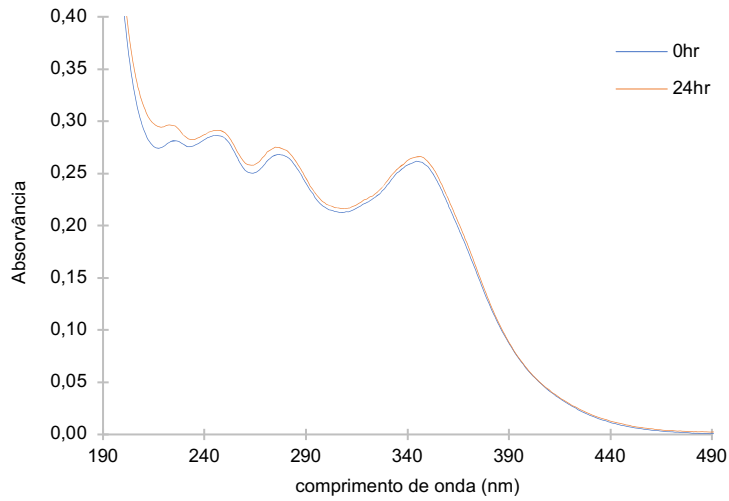


Figura 31. Espectro UV-Vis na gama de comprimentos de onda 190-490 nm. $V_0 = 10 \text{ mL}$ / $c_0 = 10 \text{ mg/L}$ / sem exposição a radiação

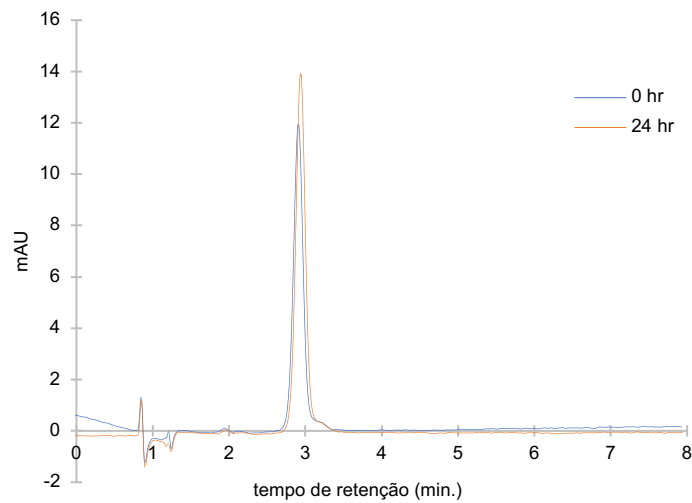


Figura 32. Cromatograma (347 nm) da 1ª e última amostras retiradas da solução com $V_0 = 10 \text{ mL}$ / $c_0 = 10 \text{ mg/L}$ / sem exposição à radiação

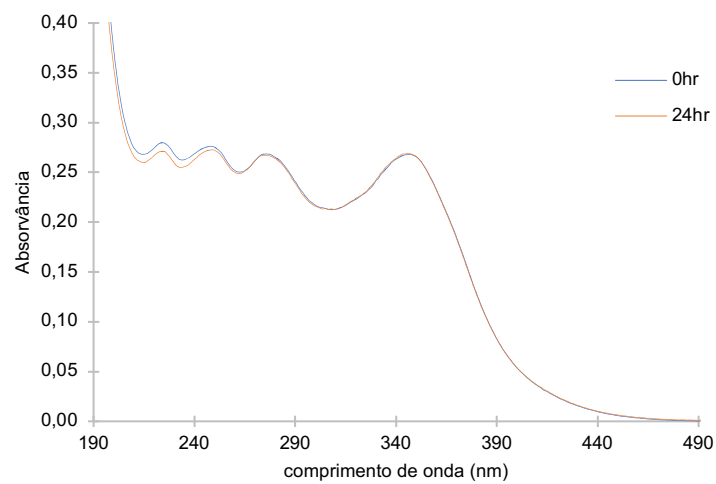


Figura 33. Espectro UV-Vis na gama de comprimentos de onda 190-490 nm. $V_0 = 50 \text{ mL}$ / $c_0 = 10 \text{ mg/L}$ / sem exposição a radiação

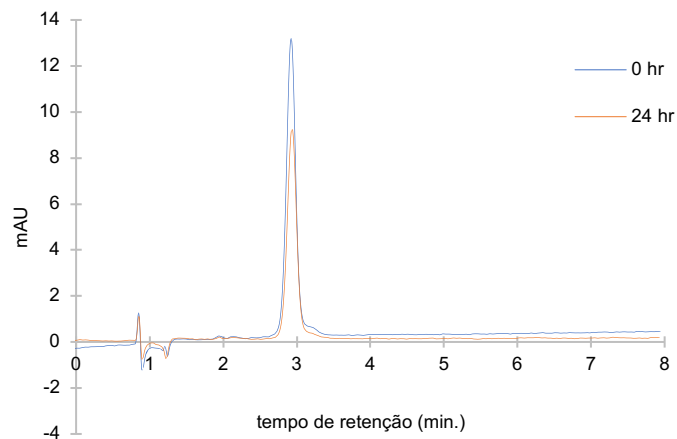


Figura 34. Cromatograma (347 nm) da 1ª e última amostras retiradas da solução com $V_0 = 50 \text{ mL}$ / $c_0 = 10 \text{ mg/L}$ / sem exposição à radiação

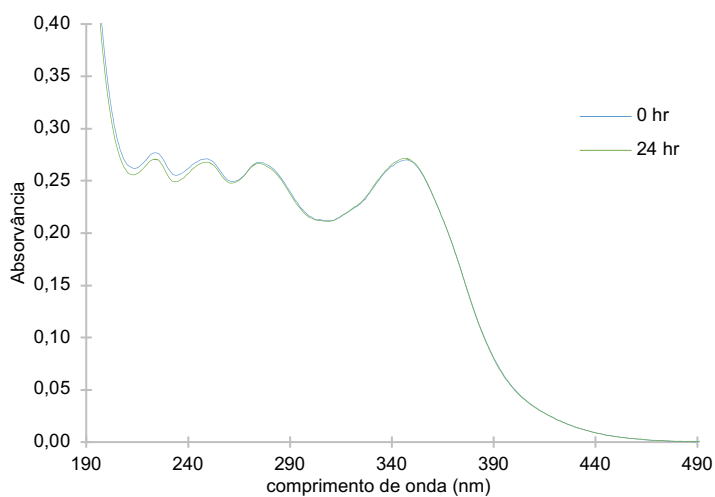


Figura 35. Espectro UV-Vis na gama de comprimentos de onda 190-490 nm. $V_0 = 100 \text{ mL}$ / $c_0 = 10 \text{ mg/L}$ / sem exposição à radiação

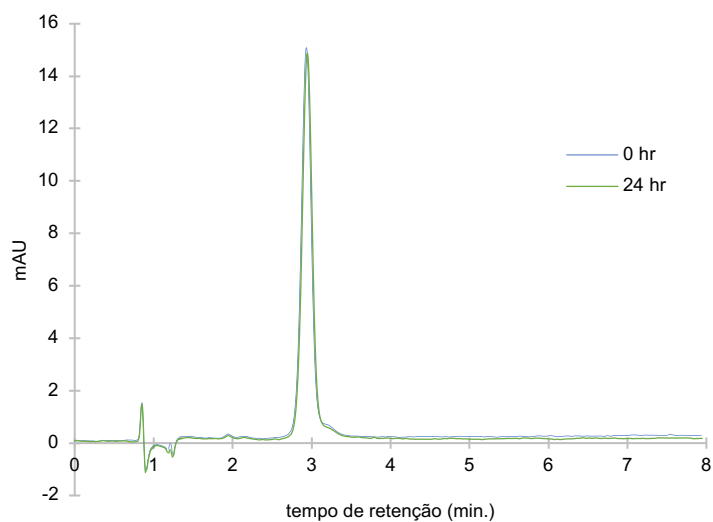


Figura 36. Cromatograma (347 nm) da 1ª e última amostras retiradas da solução com $V_0 = 100 \text{ mL}$ / $c_0 = 10 \text{ mg/L}$ / sem exposição à radiação

Atentando nos espectros de absorção, nos ensaios de 50 e 100 mL não se verificaram alterações e a concentração manteve-se constante. No entanto, no ensaio de 10 mL, é notória uma ligeira discrepância entre o espectro medido no início da experiência e o final, o que se traduz num rácio entre concentração final e inicial superior a 1. Este fato poderá ser explicado por uma eventual evaporação de solução, que naturalmente tem maior impacto quando o volume é menor. Os cromatogramas das amostras das soluções de 100 mL e 10 mL confirmam o que foi referido, porém, no cromatograma das amostras de 50 mL, é evidente uma diminuição da área do pico da primeira para a segunda amostra, sugerindo que ficou menos concentrada.

Seguem-se as tabelas 14 e 15 com os dados quantitativos da experiências:

Tabela 14. Principais dados de análise das experiências sem exposição solar e dos espectros

| Volume inicial (mL) | tempo da experiência (h) | Abs (274,2 nm) | Abs (347,4 nm) | Rácio entre Abs de picos | c/c₀ (347,4 nm) |
|----------------------------|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| 100 | 0 | 0,267 | 0,270 | 0,99 | 1,00 |
| | 24,6 | 0,267 | 0,271 | 0,98 | |
| 50 | 0 | 0,268 | 0,268 | 1,00 | 1,00 |
| | 24,5 | 0,268 | 0,269 | 0,99 | |
| 10 | 0 | 0,267 | 0,261 | 1,02 | 1,02 |
| | 24,4 | 0,274 | 0,265 | 1,04 | |

Tabela 15. Principais dados de análise das experiências sem exposição solar e dos cromatogramas

| Volume inicial (mL) | Tempo da experiência (h) | Área (mAU.s) | c (mg/L) 347 nm | c/c₀ (347 nm) |
|----------------------------|---------------------------------|---------------------|------------------------|---------------------------------|
| 100 | 0 | 144,29 | 9,3 | 0,99 |
| | 24,6 | 143,11 | 9,2 | |
| 50 | 0 | 124,06 | 8,0 | 0,71 |
| | 24,5 | 87,72 | 5,6 | |
| 10 | 0 | 115,50 | 7,4 | 1,17 |
| | 24,4 | 134,75 | 8,7 | |

A tabela 14, referente aos espectros, aponta, mais uma vez, para um cenário de possível evaporação da solução de 10 mg/L durante a experiência, uma vez que c/c_0 apresenta um valor superior à unidade. Ainda assim, é possível inferir que a concentração da minociclina em solução se manteve. Contudo, no caso da tabela 15, verificamos que as áreas dos picos dos cromatogramas não permitem uma interpretação clara. Se por um lado, o cromatograma da solução de volume inicial 100 mL apresenta áreas idênticas no início e no fim da experiência, por outro as soluções de 50 mL e 10 mL são díspares nas conclusões que se podem tirar. A solução de 50 mL apresenta um grau de degradação da minociclina considerável no período analisado, contrariamente aos dados fornecidos pelos espectros. Os espectros das amostras inicial e final da solução de 10 mL indicaram que a concentração se manteve, o que não se verificou nos cromatogramas, com um aumento substancial da área da amostra final face à inicial.

Ainda que os resultados desta experiência e dos estudos de estabilidade efetuados em IV.3 não sejam totalmente congruentes, as evidências apontam para a manutenção da concentração da MC em solução aquosa durante 24 horas, realçando a importância de se estudarem mecanismos que permitam a sua degradação em linhas de água.

IV.4.2 Com exposição solar

Repetiu-se o procedimento da experiência acima descrita, mas desta vez expondo as soluções a radiação solar. As figuras 36 a 41 ilustram os espectros e cromatogramas obtidos:

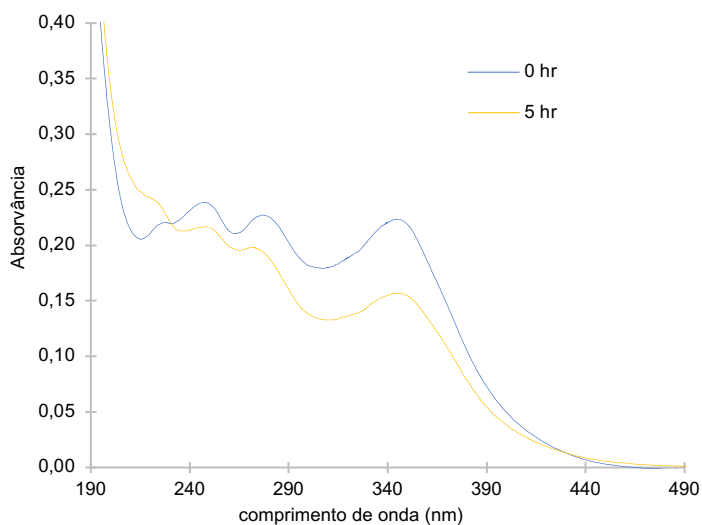


Figura 37. Espectro UV-Vis na gama de comprimentos de onda 190-490 nm. $V_0 = 10 \text{ mL}$ / $c_0 = 10 \text{ mg/L}$

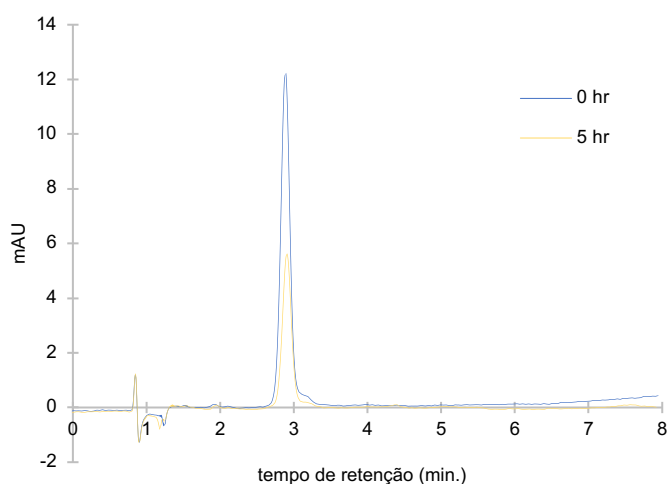


Figura 38. Cromatograma (347 nm) da 1ª e última amostras retiradas da solução com $V_0 = 10 \text{ mL}$ / $c_0 = 10 \text{ mg/L}$

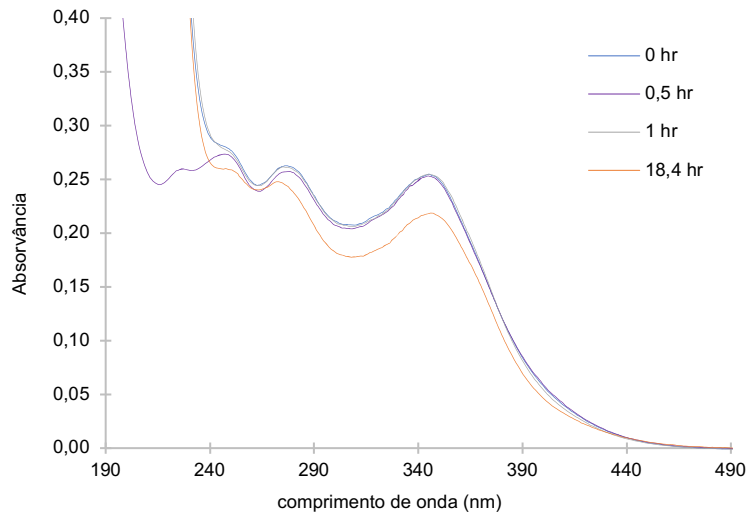


Figura 39. Espectro UV-Vis na gama de comprimentos de onda 190-490 nm. $V_0 = 50 \text{ mL} / c_0 = 10 \text{ mg/L}$

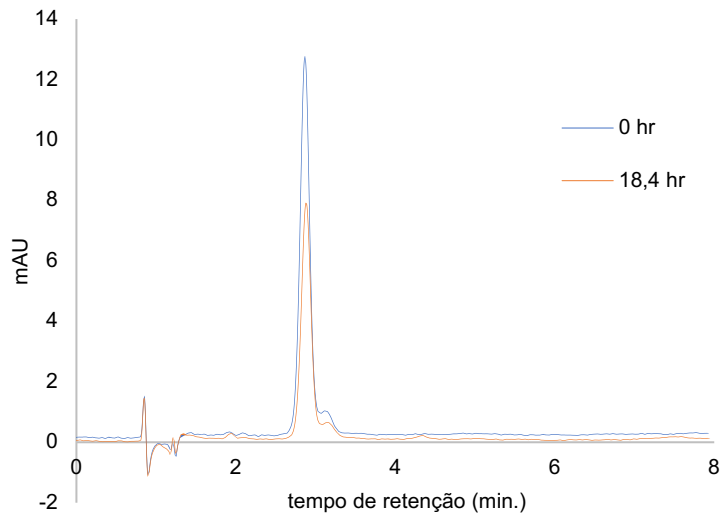


Figura 40. Cromatograma (347 nm) da 1ª e última amostras retiradas da solução com $V_0 = 50 \text{ mL} / c_0 = 10 \text{ mg/L}$

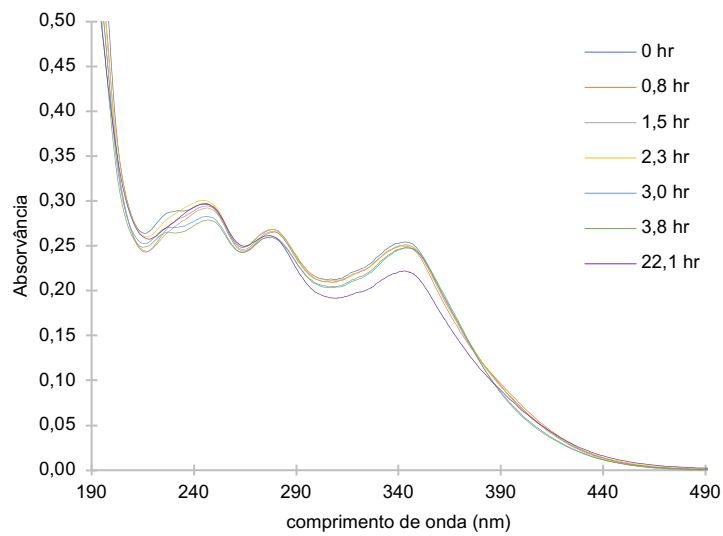


Figura 41. Espectro UV-Vis na gama de comprimentos de onda 190-490nm. $V_0 = 100 \text{ mL} / c_0 = 10 \text{ mg/L}$

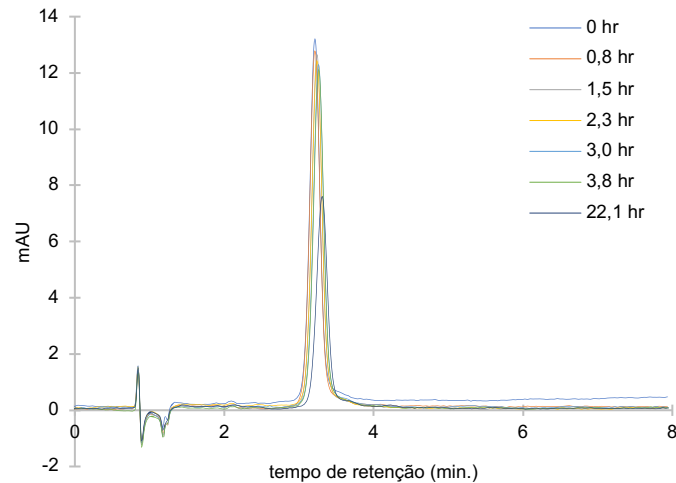


Figura 42. Cromatograma (347 nm) das amostras retiradas da solução com $V_0 = 100 \text{ mL} / c_0 = 10 \text{ mg/L}$

Tanto para os espectros, como para os cromatogramas, pode-se estabelecer uma relação positiva entre o tempo de exposição à luz solar simulada e a diminuição da concentração de MC. No caso da solução de 10 mL, ao fim de 5 horas de tempo de experiência é evidente o decréscimo da absorvância nos comprimentos de onda de referência 274,2 nm e 347,4 nm, bem como uma diminuição da área do pico no cromatograma. Para os volumes iniciais de 50 e 100 mL, o decremento das variáveis acima mencionadas não é tão óbvio nas primeiras amostras, todavia, à medida que a experiência se prolonga, passa a ser visível a diminuição da absorvância nos espectros e das áreas nos cromatogramas, à semelhança do verificado na solução de 10 mL. A variação da concentração de MC em função do tempo de irradiação real e do volume do solução inicial é dado pelas figuras 42 e 43:

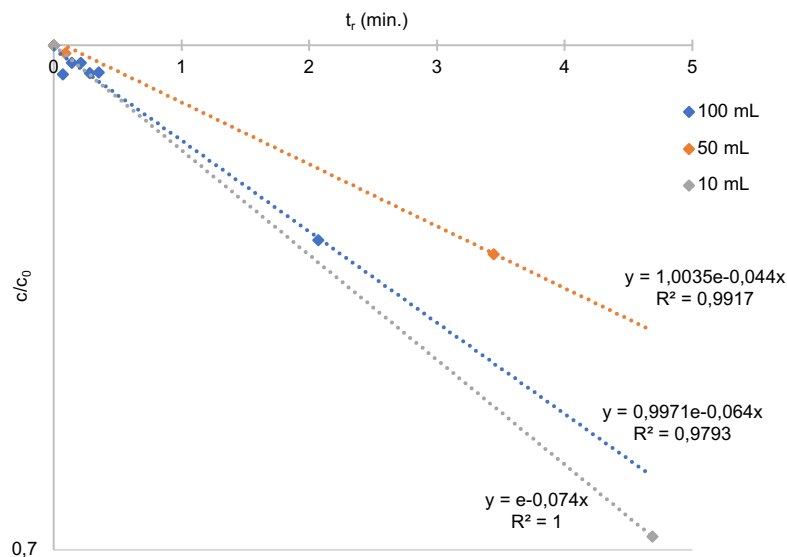


Figura 43. Variação da concentração de minociclina sob diferentes volumes de solução inicial, calculada a partir das absorvâncias dos espectros

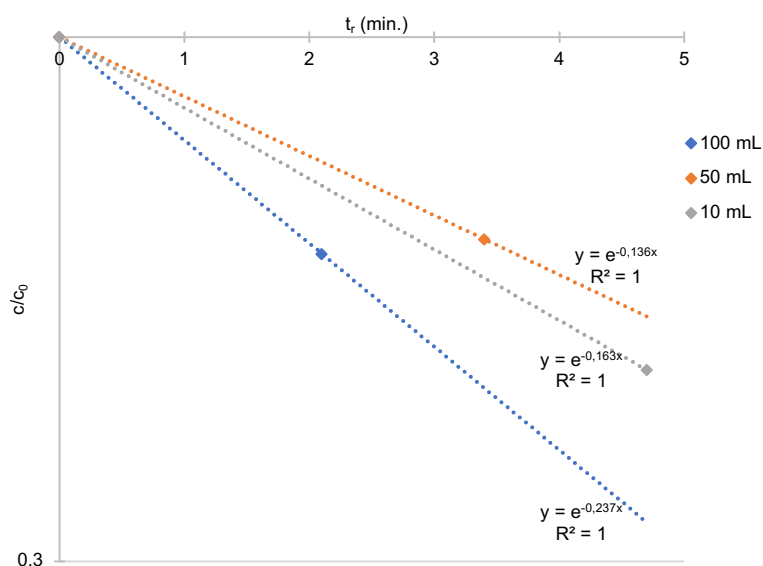


Figura 44. Variação da concentração de minociclina sob diferentes volumes de solução inicial, calculada a partir das áreas dos picos do cromatograma

Extrapolaram-se graficamente os tempos de exposição real no caso das soluções de 50 e 100 mL, de forma que igualassem o tempo de exposição real da solução de 10 mL. O R^2 foi superior 0,97 em todos os casos, o que valida a correlação. Uma vez que o volume de solução inicial vai determinar o número de ciclos que esse volume cumpre no sistema e, conseqüentemente, o tempo de exposição a radiação, seria de esperar que a solução de 10 mL fosse aquela que apresentasse a reta de declive mais acentuada nos dois gráficos, indicando uma constante cinética mais elevada. Esta premissa verificou-se no caso dos dados obtidos a partir dos espectros, no entanto, no caso dos cromatogramas, a solução de 100 mL exibiu a maior taxa de degradação. Em ambos os casos, a solução de 50 mL apresentou a menor taxa de degradação. Nas tabelas 16 e 17 compilam-se os dados da experiência, bem como os tempos de meia vida do composto em solução.

Tabela 16. Principais dados de análise das experiências de variação de volume inicial e dos espectros

| Volume inicial (mL) | tempo da experiência (h) | tempo de exposição real, t_r (min) | Abs (274,2 nm) | Abs (347,4 nm) | Rácio entre Abs de picos | c/c0 (347,4 nm) | k (min ⁻¹) | $t_{1/2}$ (min.) |
|---------------------|--------------------------|--------------------------------------|----------------|----------------|--------------------------|-----------------|------------------------|------------------|
| 100 | 0,0 | 0,0 | 0,27 | 0,25 | 1,06 | | | |
| | 22,1 | 2,1 | 0,26 | 0,22 | 1,19 | 0,87 | 0,064 | 10,8 |
| 50 | 0,0 | 0,0 | 0,26 | 0,25 | 1,03 | | | |
| | 18,4 | 3,4 | 0,25 | 0,22 | 1,13 | 0,86 | 0,044 | 15,8 |
| 10 | 0 | 0 | 0,23 | 0,22 | 1,02 | | | |
| | 5 | 4,7 | 0,20 | 0,16 | 1,26 | 0,71 | 0,074 | 9,4 |

Tabela 17. Principais dados de análise das experiências de variação do volume inicial e dos cromatogramas

| Volume inicial (mL) | Tempo da experiência (h) | Tempo de exposição real, t_r (min.) | Área (mAU.s) | c (mg/L) | c/c ₀ (347 mn) | k (min ⁻¹) | t _{1/2} (min.) |
|---------------------|--------------------------|---------------------------------------|--------------|----------|---------------------------|------------------------|-------------------------|
| 100 | 0 | 0 | 137,47 | 8,85 | 0,61 | 0,237 | 2,9 |
| | 22,1 | 2,1 | 83,85 | 5,38 | | | |
| 50 | 0 | 0 | 110,56 | 7,11 | 0,63 | 0,136 | 5,1 |
| | 18,4 | 3,4 | 69,79 | 4,47 | | | |
| 10 | 0 | 0 | 115,37 | 7,42 | 0,47 | 0,163 | 4,3 |
| | 5 | 4,7 | 54,11 | 3,46 | | | |

Na tabela 16, o rácio inicial entre o primeiro comprimento de onda e o segundo, à concentração de 10 mg/L, é de aproximadamente 1. Todavia, em todos os ensaios ocorreu um decréscimo mais acentuado na absorvância a 347,4 nm do que a 274,2 nm, o que poderá sugerir degradação numa zona específica da molécula, alterando-a. Este fenómeno foi documentado por Wiebe e Moore [65], que atribuíram ao facto do agrupamento de cromóforos no anel BCD conter o sistema ionizável correspondente ao pK_{a3} a justificação para esta variação no rácio entre picos de absorvância.

Verifica-se uma grande discrepância entre os valores das constantes cinéticas determinadas a partir de cada um dos métodos, com as constantes cinéticas calculadas a partir das áreas dos cromatogramas a apresentarem valores duas a três vezes superiores. De notar que as constantes de velocidade foram calculadas em função do tempo de exposição real.

Para as soluções de 10, 50 e 100 mL, os tempos de meia vida determinados via espectros são 9,4, 15,8 e 10,8 minutos, que correspondem, no sistema em causa, a um tempo de experiência de 100, 169 e 115 horas, respetivamente. Para as mesmas soluções de 10, 50 e 100 mL, os tempos de meia vida calculados a partir das áreas dos picos são 4,3, 5,1 e 2,9 minutos, que, na mesma ordem, equivalem a 46, 54 e 31 horas no sistema.

Dependendo do método, a eficiência do sistema na degradação da MC oscilou de forma apreciável. O mesmo também se pode concluir com a variação dos volumes iniciais. No entanto, verificou-se sempre degradação do composto.

IV.5 Influência do Setup

Neste subcapítulo apreciou-se o impacto que alterações na fonte de luz solar poderiam ter na degradação da MC no sistema. Para tal, realizaram-se duas experiências: na primeira, colocou-se um filtro à saída da luz e, na segunda, instalou-se um colimador no percurso ótico entre a lâmpada e a saída de luz.

O filtro reduziu a intensidade da irradiação em cerca de 30%, passando a ser de 0,7 Sol. Obteve-se o espectro de absorção UV-Vis, representado na figura 44.

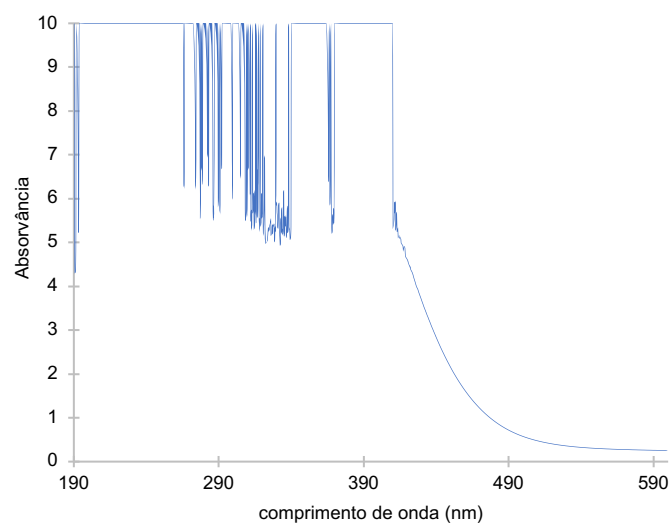


Figura 45. Espectro de absorção UV-Vis do filtro

Nos comprimentos de onda de referência para a absorção da MC, 274,2 e 347,4 nm, o espectro de absorção do filtro apresenta os valores máximos de absorvância lidos pelo equipamento.

Relativamente ao colimador, este vai atuar sobre o feixe de luz divergente emitido pela fonte, tornando-o num feixe colimado, isto é, um feixe em que a luz se propaga essencialmente numa direção. Em termos teóricos, um feixe perfeitamente colimado não dispersa com distância.

As figuras 45 a 48 ilustram os espectros e cromatogramas das amostras retiradas da atividades experimentais:

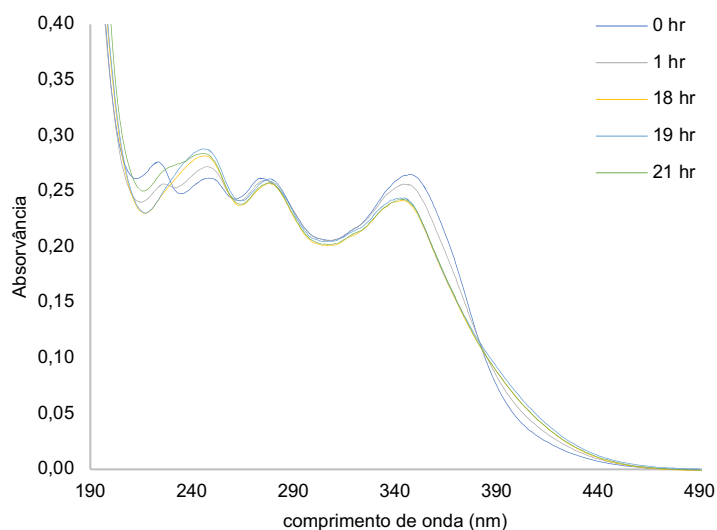


Figura 46. Espectro UV-Vis na gama de comprimentos de onda 190-490 nm. $V_0 = 100 \text{ mL}$ / $c_0 = 10 \text{ mg/L}$ / com filtro

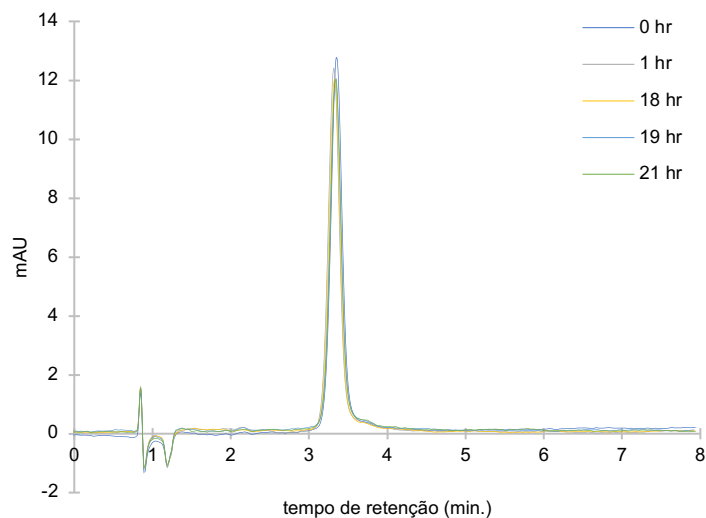


Figura 47. Cromatograma (347 nm) das amostras retiradas da solução com $V_0 = 100 \text{ mL}$ / $c_0 = 10 \text{ mg/L}$ / com filtro.

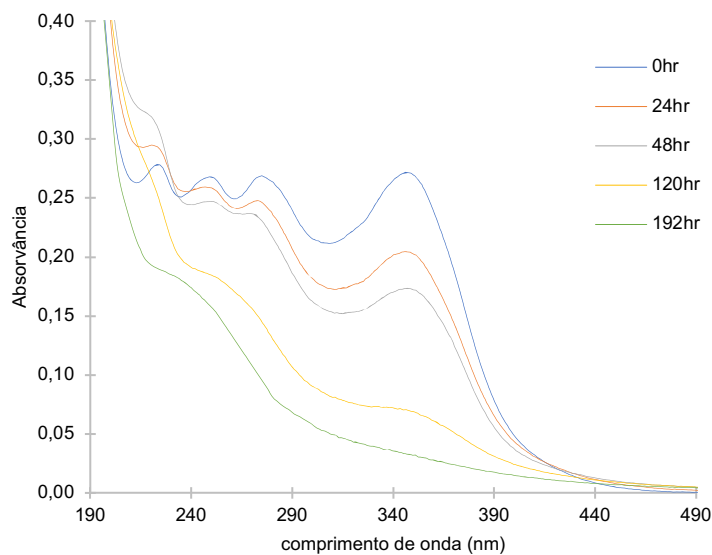


Figura 48. Espectro UV-Vis na gama de comprimentos de onda 190-490 nm. $V_0 = 100 \text{ mL}$ / $c_0 = 10 \text{ mg/L}$ / com colimador

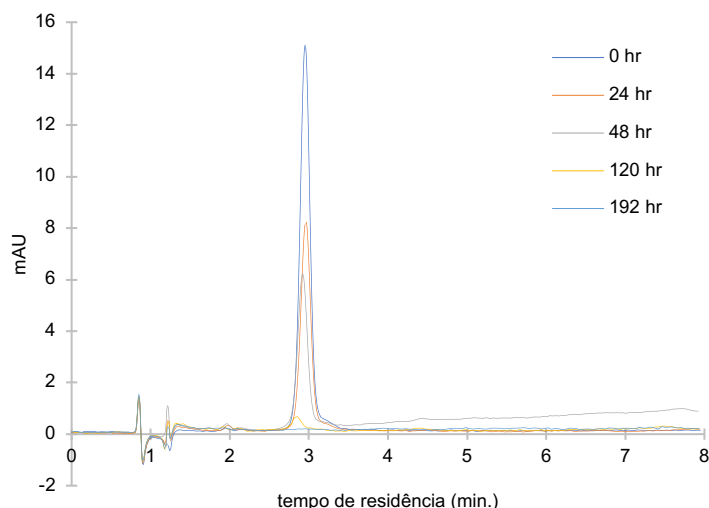


Figura 49. Cromatograma (347 nm) das amostras retiradas da solução com $V_0 = 100 \text{ mL}$ / $c_0 = 10 \text{ mg/L}$ / com colimador

O espectro das amostras irradiadas pelo luz solar simulada filtrada indica uma redução da absorvância no comprimento de onda 347,4 nm e a manutenção a 274,2 nm dos valores da absorvância - comportamento característico das tetraciclina quando irradiadas com luz solar, como discutido anteriormente. O cromatograma reflete uma ligeira diminuição na área dos picos ao longo do tempo. Quanto à experiência com luz colimada, procurou-se estudar a evolução do espectro das amostras até ao ponto em que a MC já não fosse detetada em solução. Nos espectros das amostras retiradas ao fim de 0, 24 e 48 horas é possível identificar as características do espectro-tipo da MC, contudo, as amostras obtidas ao fim de 120 e 192 horas revelam um espectro atípico, o que sugere que, apesar de ser possível atribuir um valor de absorvância nos comprimentos de onda 247,2 e 347,4 nm, o composto poderá já não estar em solução. A análise HPLC vem confirmar essa possibilidade. Atentando na figura 48, respeitante ao cromatograma das amostras retiradas da solução irradiada por luz colimada, pode-se verificar que os picos vão progressivamente diminuindo à medida que se retiram amostras da solução, sendo que ao fim de 120 horas o pico é pouco perceptível e no término da experiência, passadas 192 horas, o pico não é detetado.

Os cálculos da variação da concentração de MC em função do tempo de irradiação real e do volume do solução inicial segundo os espectros e os cromatogramas são dados pelas figuras 49 e 50, respetivamente:

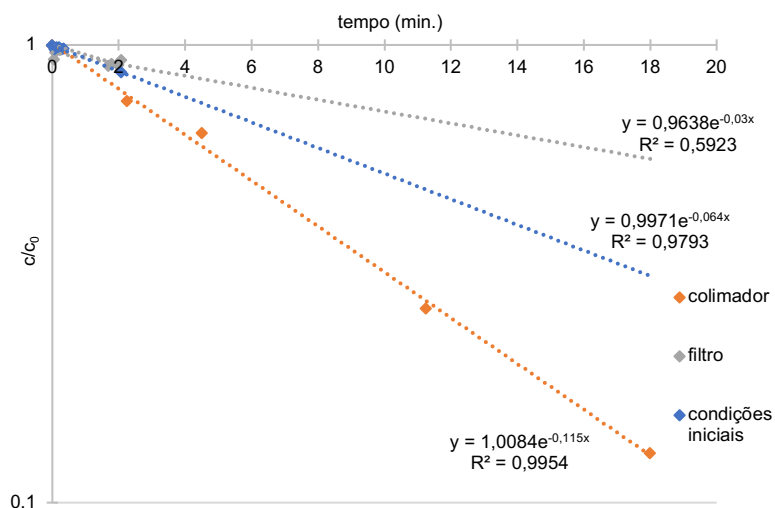


Figura 50. Variação da concentração de minociclina sob diferentes variações de setup, calculada a partir das absorvâncias dos espectros

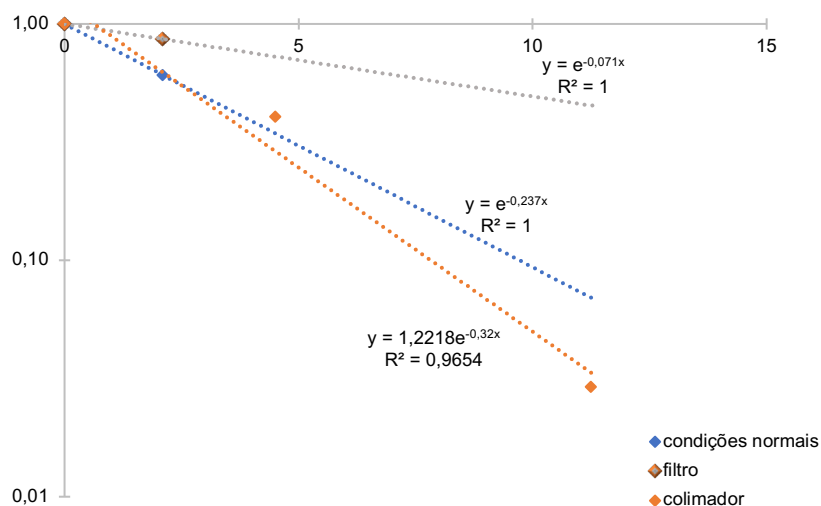


Figura 51. Variação da concentração de minociclina sob diferentes volumes de solução inicial, calculada a partir das absorvâncias dos espectros

Em ambos os gráficos, onde também se incluíram os resultados da irradiação “padrão”, ou seja, sem filtro nem colimador, o sistema com luz colimada apresenta uma taxa de degradação superior aos outros dois. Pelo contrário, o sistema com filtro tem a menor taxa de degradação, ainda que o R^2 da linha de tendência tenha um valor baixo no caso do método baseado nos espectros, pondo em causa a validade deste resultado. Mais uma vez, o gráfico de variação da concentração em função do tempo de irradiação referente ao cromatograma revela constantes cinéticas superiores ao obtido através dos espectros.

Tabela 18. Principais dados de análise das experiências de variação do setup e dos espectros

| Volume inicial (mL) | Intensidade de irradiação (Sol) | tempo da experiência (h) | Tempo de exposição real, t_r (min.) | Abs (274,2 nm) | Abs (347,4 nm) | peak ratio | c/c0 (347,4 nm) | k (min ⁻¹) | $t_{1/2}$ (min.) |
|---------------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------------------|----------------|----------------|------------|-----------------|------------------------|------------------|
| 100 | 1,00 | 0,0 | 0,0 | 0,27 | 0,25 | 1,06 | | | |
| | | 22,1 | 2,1 | 0,26 | 0,22 | 1,19 | 0,87 | 0,064 | 10,8 |
| 100 (colimador) | 1,00 | 0,0 | 0,0 | 0,27 | 0,27 | 0,99 | | | |
| | | 192,0 | 18,0 | 0,10 | 0,03 | 2,99 | 0,13 | 0,115 | 6,1 |
| 100 (filtro) | 0,70 | 0,0 | 0,0 | 0,26 | 0,27 | 0,99 | | | |
| | | 22,2 | 2,1 | 0,26 | 0,25 | 1,05 | 0,93 | 0,030 | 21,9 |

Tabela 19. Principais dados de análise das experiências de variação do setup e dos cromatogramas

| Volume inicial (mL) | tempo da experiência (h) | Tempo de exposição real, t_r (min.) | Área (mAU.s) | c (mg/L) | c/c0 | k (min. ⁻¹) | $t_{1/2}$ (min.) |
|---------------------|--------------------------|---------------------------------------|--------------|----------|------|-------------------------|------------------|
| 100 (filtro) | 0 | 0 | 138,29 | 8,90 | | | |
| | 22,2 | 2,1 | 119,34 | 7,68 | 0,86 | 0,071 | 9,8 |
| 100 (colimador) | 0 | 0 | 142,16 | 9,15 | | | |
| | 120 | 11,3 | 4,86 | 0,27 | 0,03 | 0,32 | 2,8 |
| 100 | 0 | 0 | 137,47 | 8,85 | | | |
| | 22,1 | 2,1 | 83,85 | 5,38 | 0,61 | 0,237 | 2,9 |

Segundo a tabela 18, a constante cinética do sistema com colimador é aproximadamente o dobro da constante cinética do sistema sem colimador. Esta, por sua vez, duplica a do sistema com filtro. Analisando a tabela 19, é possível constatar que, apesar de haver uma diferença substancial entre as constantes cinéticas do sistema com e sem colimador, os tempos de semivida são semelhantes.

Importa referir que, em termos formais, as constantes cinéticas obtidas nas experiências realizadas são relativas ao sistema e não à reação, uma vez que as constantes variam com as condições do sistema, isto é, com o volume inicial de solução e as diferenças no Setup.

Com base nos valores das constantes cinéticas demonstradas nas tabelas, conclui-se que a taxa de fotodegradação é proporcional à intensidade da luz solar e que a luz colimada é mais eficiente a degradar o composto que a luz dispersa, pelo que a introdução do colimador constitui uma otimização do processo. Esta melhoria é mais evidente nos resultados obtidos pelo método de cálculo via espectros. A colocação de um filtro, que representa um cenário de irradiação com menor intensidade, afetou a performance do sistema de forma negativa na degradação da minociclina. Neste caso, a introdução de um catalisador (por exemplo, TiO₂ [41]) poderá ser uma alternativa para melhorar a eficiência do sistema.

IV.6 Caso de estudo

Transportando os estudos acima descritos para uma situação real, em que se estima a presença da MC em águas portuguesas e, com base nos dados disponíveis acerca dos limites máximos permitidos por lei, faz-se uma previsão a aplicabilidade do método proposto. O cenário que se interpreta envolve a avaliação da capacidade da luz solar em degradar a minociclina presente em cursos de água. Desta forma, das experiências que se realizaram, aquela que parece aproximar-se mais das condições reais é a realizada com uma solução de volume inicial de 100 mL que, por ter um volume superior ao outros casos estudados, está menos suscetível a variações de volume provocadas pela evaporação que pudessem condicionar os resultados iniciais. Será também considerada que a luz é dispersa e sem filtro, com uma irradiância de 1 Sol, intensidade aproximadamente igual à que se experiencia na superfície terrestre. A constante cinética considerada será a obtida através do método que se baseia na absorvância dos espectros, uma vez que este apresenta valores para as constantes cinética inferiores e, como tal, minoriza-se o risco de simular cenários excessivamente otimistas.

Segundo Pena et al. (2010) [73], foram relatados níveis de MC de 0,318-0,532 mg/L em quatro efluentes hospitalares e 0,350-0,915 mg/L em afluentes de estações de tratamento de águas residuais municipais, em Coimbra. Por não haverem dados relativos à zona de Lisboa, para efeitos de cálculo considerar-se-á a concentração mais elevada de MC, 0,915 mg/L, nas águas a tratar, uma vez que Lisboa é uma zona mais populosa que Coimbra e, como tal, é esperado um maior consumo do composto.

Os limites de concentração de MC são inexistentes na maioria das legislações dos países. A Agência Europeia do Medicamento definiu o risco ambiental através da concentração mínima previsível sem efeitos [74]. Não tendo sido possível obter informação relativamente a essa concentração para a MC, considerou-se a concentração mínima previsível sem efeitos da tetraciclina em crianças, $4,3 \times 10^5$ ng/L [75], como objetivo de concentração a atingir com o método de fotodegradação.

Quanto à disponibilidade de luz solar, estima-se que Lisboa disponha de 3045 horas de sol anualmente, o que dá uma média diária de cerca de 8 horas.

Os dados relevantes para a estimativa do tempo que demora a degradar a MC presente nas águas residuais até valores seguros encontram-se na tabela 20.

Tabela 20. Dados relevantes do sistema

| Característica | Valor |
|---|-------|
| Concentração de MC nas águas (mg/L), c_0 | 0,915 |
| Concentração segura de MC (mg/L), c | 0,430 |
| c/c_0 | 0,47 |
| k (min^{-1}) | 0,064 |
| Tempo de exposição solar necessário para ocorrer a degradação (horas) | 126 |
| Horas de sol diárias | 8 |
| Tempo necessário para efetuar a degradação (dias) | 15 |

A redução de concentração necessária foi de 53% e, segundo os cálculos, demoraria 15 dias a ocorrer.

Este modelo de previsão possui limitações. A constante cinética utilizada nos cálculos foi obtida em ambiente experimental e de temperatura monitorizada (20-22 °C), contrariamente ao cenário simulado em que haveria oscilações de temperatura acentuadas. Como referido anteriormente, nas atividades experimentais, do tempo total de duração da experiência, apenas uma pequena fração correspondia a tempo de radiação efetiva. Este princípio também foi aplicado neste modelo, considerando-se que, do tempo de exposição solar necessário para ocorrer a degradação até à concentração pretendida, apenas uma parte corresponderia a exposição solar efetiva. Há que ter em conta que a turbidez das águas e o gradiente de intensidade da luz solar com a profundidade não foram quantificados.

Consoante a sazonalidade dos consumos de MC, o tempo de degradação poderá variar [73].

V. Conclusão e trabalho futuro

No presente trabalho estudou-se fotodegradação do antibiótico minociclina em solução aquosa com recurso a radiação solar.

Foram efetuadas a caracterização do composto, análises à sua estabilidade em solução a diferentes temperaturas e testados diferentes sistemas de degradação, nomeadamente com variações no volume inicial de solução e alterações no setup.

Através da caracterização da MC com recurso ao TGA foi possível constatar que o pó da amostra estaria na sua forma hidratada, ao passo que o FTIR permitiu saber que se tratava de α -minociclina.

Com vista à quantificação da minociclina em solução, recorreu-se a dois métodos analíticos complementares: a espectrofotometria UV-Vis e o HPLC com diode-array detector acoplado. Nos comprimentos de onda de referência, 274 e 347 nm, a gama de linearidade das curvas de calibração foi 1,25 - 40 mg/L e 0,31 - 40 mg/L, na mesma ordem, para a espectrofotometria UV-Vis, e de 0,16 - 10 mg/L e 0,08 - 40 mg/L para o HPLC-DAD.

Os estudos de estabilidade revelaram que o composto é estável em soluções aquosas de 10 mg/L a -20 °C e 20 °C. Verificou-se que a diminuição do volume inicial de solução se traduz num aumento da degradação da MC, segundo a quantificação baseada nos espectros, no entanto, a quantificação com base no HPLC-DAD não confirmou essa hipótese. As variações no setup, consistiram na introdução de um filtro e na adição de um colimador. Os tempos de meia vida, de acordo com quantificação baseada no UV-Vis e no HPLC-DAD, foram de 21,9 e 9,8 minutos para o sistema com filtro, respetivamente, e 6,1 e 2,8 minutos para o sistema com o colimador. Os tempos de meia vida calculados para o sistema sem filtro e sem colimador foram 10,8 e 2,9 minutos. No ensaio de 192 horas, em que se utilizou luz colimada, foi possível degradar a totalidade da minociclina. Estes dados sustentam que a introdução do colimador melhora a performance do sistema, representando uma oportunidade de otimização de sistemas de tratamento de águas que envolvem luz solar simulada.

Realizou-se um caso de estudo em que se estimou a concentração de MC em águas residuais na região de Lisboa e avaliou-se os resultados do método estudado quando aplicado a uma situação real. O método revelou-se eficaz, reduzindo a concentração do composto em estudo até ao limite pretendido ao fim de 15 dias. Importa, contudo, determinar o impacto ambiental que a permanência da MC teria na vida animal e na saúde pública durante esse período. De forma a apurar esta estimativa, determinar a influência da turbidez das águas e do gradiente de intensidade da luz solar com a profundidade na degradação do composto poderá ser um estudo futuro. Investigar os produtos de fotodegradação e a sua toxicidade também é da máxima relevância.

Este método revela-se promissor, não só da perspetiva da conceção prática e da aplicação do sistema, como também do potencial da otimização dos parâmetros de degradação de forma a assegurar um atividade sustentável. Numa região como a de Lisboa e vale do Tejo, que conta com mais de 3000 horas de sol anuais, o recurso à fotólise, por si só ou acoplada a

outros mecanismos, para a degradação de antibióticos afigura-se como uma hipótese potencialmente viável, mediante a avaliação do impacto dos seus produtos de fotodegradação e da sua permanência no sistema por um tempo determinado.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] “Antimicrobial resistance,” 17 11 2021. [Online]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> .
- [2] “Discovery and Development of Penicillin,” American Chemical Society, 2015. [Online]. Available: <https://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/flemingpenicillin.html>. [Acedido em 25 3 2022].
- [3] “The History of Antibiotics,” Microbiology Society, 2012. [Online]. Available: <https://microbiologysociety.org/members-outreach-resources/outreach-resources/antibiotics-uneearthed/antibiotics-and-antibiotic-resistance/the-history-of-antibiotics.html>. [Acedido em 25 3 2022].
- [4] “Minocycline: far beyond an antibiotic,” *British Journal of Pharmacology*, vol. 169, pp. 337-352, 2013.
- [5] University of Oxford, 16 11 2021. [Online]. Available: <https://www.ox.ac.uk/news/2021-11-16-global-antibiotic-consumption-rates-increased-46-percent-2000>. [Acedido em 3 25 2022].
- [6] M. B. Ahmed, J. L. Zhou, H. H. Ngo e W. Guo, “Adsorptive removal of antibiotics from water and wastewater: Progress and challenges,” *Science of the Total Environment*, vol. 532, pp. 112-126, 2015.
- [7] M.-C. Danner, A. Robertson, V. Behrends e J. Reiss, “Antibiotic pollution in surface fresh waters: Occurrence and effects,” *Science of the Total Environment*, vol. 664, pp. 793-804, 2019.
- [8] V. Homem e L. Santos, “Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices-a review,” *Journal of Environmental Management*, vol. 92(10), pp. 2304-2347, 2011.
- [9] “Wastewater Treatment Equipment Market Outlook 2021-2030,” Allied Market Research, 8 2021. [Online]. Available: <https://www.alliedmarketresearch.com/wastewater-treatment-equipment-market-A13123>. [Acedido em 5 27 2022].
- [10] “Advanced Oxidation Technologies: Global Markets - Research and Markets,” Business Wire, 30 9 2016. [Online]. Available: <https://www.businesswire.com/news/home/20160930005875/en/Advanced-Oxidation-Technologies-Global-Markets---Research-and-Markets>. [Acedido em 27 5 2022].
- [11] “Global Advanced Oxidation Technologies Market Analysis & Trends-Technology (Wet Oxidation, Ozone, Photolysis Oxidation, Hydrogen Peroxide), Application - Forecast to 2025,” PR Newswire, 18 12 2016. [Online]. Available: <https://www.prnewswire.com/news-releases/global-advanced-oxidation-technologies-market-analysis--trends-technology-wet-oxidation-ozone-photolysis-oxidation-hydrogen-peroxide-application---forecast-to-2025-300380755.html>. [Acedido em 27 5 2022].
- [12] L. Hleba, I. Charousova, M. Cisarova, A. Kovacik, J. Kormanec, J. Medo, M. Bozik e S. Javorekova, “Rapid identification of Streptomyces tetracycline producers by MALDI-TOF mass spectrometry,” *Journal of Environmental Science and Health*, n° Part A, pp. 1-11, 2018.
- [13] I. Chopra e M. Roberts, “Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance,” *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 65, pp. 232-260, 2001.
- [14] T. C. V. Sachikonye, “Development and assessment of minocycline sustained release capsule formulations,” Grahamstown, 2010.
- [15] “Minocycline, focus on mechanisms of resistance, antibacterial activity, and clinical effectiveness: Back to the future,” *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, vol. 22, pp. 161-174, 2020.
- [16] “Minocycline - compound summary,” 28 5 2022. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Minocycline>. [Acedido em 30 5 2022].

- [17] V. Zbinovsky e G. P. Chrekian, "Minocycline," em *Analytical Profiles of Drug Substances*, 1977, pp. 323-339.
- [18] Martindale: The Complete Drug Reference, London: Pharmaceutical Press, 2009.
- [19] M. A. Rodrigues, J. M. Tiago, L. Padrela, H. A. Matos, T. G. Nunes, L. Pinheiro, A. J. Almeida e E. Gomes de Azevedo, "New Thermoresistant Polymorph from CO₂ Recrystallization of Minocycline Hydrochloride," *Pharmaceutical research*, vol. 31, pp. 3136-3149, 2014.
- [20] Z. Mendes, J. R. Antunes, S. Marto e W. Heggie, "Crystalline minocycline base and processes for its preparation". Patente US20130030195A1, 31 1 2013.
- [21] H. Xiurong, G. Jianming e C. Linschen, "Minocycline hydrochloride hydrate crystal forms and preparation method thereof". Patente CN101693669A, 8 8 2012.
- [22] R. Vardanyan e V. Hruby, *Synthesis of Essential Drugs*, Amsterdam: Elsevier, 2006.
- [23] K. Nonaka, Y. Nakazawa e T. Kotorii, "Effects of antibiotics, minocycline and ampicillin, on human sleep," *Brain Research*, vol. 288, pp. 253-259, 1983.
- [24] V. Goulden, D. Glass e W. Cunliffe, "Safety of long-term high-dose minocycline in the treatment of acne," *British Journal of Dermatology*, vol. 134, pp. 693-695, 1996.
- [25] P. Ballabh, A. Braun e M. Nedergaard, "The blood-brain barrier: an overview Structure, regulation, and clinical implications," *Neurobiology of Disease*, vol. 16, pp. 1-13, 2004.
- [26] A. Asadi, M. Abdi, E. Kouhsari, P. Panahi, M. Sholeh, N. Sadeghifard, T. Amariani, A. Ahmadi, A. Maleki e M. Gholami, "Minocycline, Focused on mechanisms of resistance, antibacterial activity, and clinical effectiveness; Back to Future," *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2020.
- [27] "Minocycline (Systemic)," 21 6 2021. [Online]. Available: <https://www.drugs.com/monograph/minocycline-systemic.html>. [Acedido em 2022 3 28].
- [28] F. Liu e A. G. Myers, "Development of a platform for the discovery and practical synthesis of new tetracycline antibiotics," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 32, pp. 48-57, 2016.
- [29] R. Elander, "Industrial production of b-lactam antibiotics," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 61, pp. 385-392, 2003.
- [30] L. Library, "Industrial Production of Antibiotics," [Online]. Available: [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A_Microbiology_\(Boundless\)/17%3A_Industrial_Microbiology/17.2%3A_Microbial_Products_in_the_Health_Industry/17.2A%3A_Industrial_Production_of_Antibiotics](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A_Microbiology_(Boundless)/17%3A_Industrial_Microbiology/17.2%3A_Microbial_Products_in_the_Health_Industry/17.2A%3A_Industrial_Production_of_Antibiotics). [Acedido em 15 5 2022].
- [31] D. N. Rubingh e R. A. Grayling, "Protein Engineering," em *Biotechnology – Vol. III: Fundamentals in Biotechnology*, United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization / EOLSS Publications, 2009, pp. 120-146.
- [32] R. Winston Liggett e H. Koffler, "Corn steep liquor in microbiology," *Bacteriology Reviews*, vol. 12, pp. 297-311, 1948.
- [33] J. K. Bernard, "Oilseed and Oilseed Meals," em *Encyclopedia of Dairy Sciences (III Edition)*, Academic Press, 2022, pp. 614-619.
- [34] "Fermentation production of tetracycline," Hovione, [Online]. Available: <https://www.hovione.com/knowledge-center/patent/fermentation-production-tetracycline>. [Acedido em 16 5 2022].
- [35] M. A. Webber e L. J. V. Piddock, "The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 51, pp. 9-11, 2003.
- [36] A. Leelaporn, R. S. T. Littlejohn, I. Paulsen e J. M. Tennent, "Multidrug resistance to antiseptics and disinfectants in coagulase-negative staphylococci," *Journal of Medical Biology*, vol. 40 (3), pp. 214-220, 1994.
- [37] P. Ranjit, V. Jhansi e K. Venkateswar Reddy, "Conventional Wastewater Treatment Processes," em *Advances in the Domain of Environmental Biotechnology*, Springer, 2021, pp. 455-479.
- [38] "ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais," Penafiel Verde, [Online]. Available: <https://www.penafielverde.pt/etar-estacao-de-tratamento-de-aguas-residuais/>. [Acedido em 11 6 2022].

- [39] M. Roy e R. Saha, "Dyes and their removal technologies from wastewater: A critical review," em *Intelligent Environmental Data Monitoring for Pollution Management*, Academi Press.
- [40] K. Kümmerer, A. Al-Ahmad e V. Mersch-Sundermann, "Biodegradability of Some Antibiotics, Elimination of the Genotoxicity and Affection of Wastewater Bacteria in a Simple Test," *Chemosphere*, vol. 40, pp. 701-710, 2000.
- [41] S. Wu, H. Hu, Y. Lin, J. Zhan e Y. Hang Hu, "Visible light photocatalytic degradation of tetracycline over TiO₂," *Chemical Engineering Journal*, vol. 382, 2020.
- [42] "Ion-exchange," The Flemish Knowledge Centre for Best Available Techniques, [Online]. Available: <https://emis.vito.be/en/bat/tools-overview/sheets/ion-exchange>. [Acedido em 6 11 2022].
- [43] B. L. Phoon, C. Ong, M. Saheed, P.-L. Show, J.-S. Chang, T. Ling, S. S. Lam e J. C. Juan, "Conventional and emerging technologies for removal of antibiotics from wastewater," *Journal of Hazardous Materials*, 2020.
- [44] "Water Treatment Membranes and Their Processes," Flunce Corp, 11 9 2019. [Online]. Available: <https://www.fluencecorp.com/water-treatment-membranes/>. [Acedido em 25 5 2022].
- [45] G. Gopal, S. Ann Alex, N. Chandrasekaran e A. Mukherjee, "A review on tetracycline removal from aqueous systems by advanced treatment techniques".
- [46] E. M. Cuerda-Correa, M. Alexandre-Franco e C. Fernandez-Gonzalez, "Advanced Oxidation Processes for the Removal of Antibiotics from Water. An Overview," *Water*, vol. 12(1), p. 102, 2020.
- [47] M. H. Mahdi, T. J. Mohammed e J. A. Al-Najar, "Advanced Oxidation Processes (AOPs) for treatment of antibiotics in wastewater: A review," em *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2021.
- [48] A. Kurt, B. Mert, N. Özençin, O. Sivrioglu e T. Yonar, "Treatment of Antibiotics in Wastewater Using Advanced Oxidation Processes (AOPs)," em *Physico-Chemical Wastewater Treatment and Resource Recovery*, IntechOpen, 2017, pp. 176-198.
- [49] J. H. d. O. d. S. Pereira, "Solar Photocatalytic Degradation of Antibiotics: Chemical, Ecotoxicological and Biodegradability Assessment," Porto, 2014.
- [50] M. I. S. Simon Parsons, "UV photolysis: background," em *Advanced Oxidation Processes for Water and Wastewater Treatment*, IWA Publishing, 2005, pp. 7-43.
- [51] S. Liu, B. Wang, J. Wang e Y. Zhang, "Advanced treatment of refractory organic pollutants in petrochemical industrial wastewater by bioactive enhanced ponds and wetland system," *Ecotoxicology*, vol. 23(4), pp. 689-698, 2014.
- [52] C. V. Rekhate e J. Srivastava, "Recent advances in ozone-based advanced oxidation processes for treatment of wastewater- A review," *Chemical Engineering Journal Advances*, vol. 3, p. 100031, 2020.
- [53] A. Arslan, E. Topkaya, B. Özbay e S. Veli, "Application of O₃/UV/H₂O₂ oxidation and process optimization for treatment of potato chips manufacturing wastewater," *Water and Environmental Journal*, vol. 31(1), pp. 64-71, 2016.
- [54] Z. Liu, S. Hosseinzadeh, N. Wardenier, Y. Verheust, M. Chys e S. Van Hulle, "Combining ozone with UV and H₂O₂ for the degradation of micropollutants from different origins: lab-scale analysis and optimization," *Environmental Technology*, vol. 40(28), pp. 3773-3782, 2018.
- [55] S. Braslavsky e K. Houk, "Glossary of Therms used in Photochemistry," em *Photochromism*, 2003.
- [56] D. Ghernaout, "Advanced Oxidation Phenomena in Electrocoagulation Process: A Myth or a Reality?," *Desalination and Water Treatment*, vol. 51, pp. 7536-7554, 2013.
- [57] J. M. Poyatos, M. Muño, M. Almécija e J. Torres, "Advanced Oxidation Processes for Wastewater Treatment: State of the Art," *Water, air and soil pollution*, vol. 205(1), pp. 187-204, 2009.
- [58] R. Ameta, A. K. C. A. Jain e P. B. Punjabi, "Chapter 3 - Fenton and Photo-Fenton Processes," em *Advanced Oxidation Processes for Wastewater Treatment*, Academic Press, 2018, pp. 49-87.

- [59] P. K. Pandis, C. Kalogirou, E. Kanellou, C. Vaitis, M. G. Savvidou, G. Sourkoni, A. A. Zorpas e C. Argiris, "Key Points of Advanced Oxidation Processes (AOPs) for Wastewater, Organic Pollutants and Pharmaceutical Waste Treatment: A Mini Review," *ChemEngineering*, vol. 6(1), 2022.
- [60] P. Boule, D. Bahnemann e P. Robertson, "Introduction to Photochemical Advanced Oxidation Processes for Water Treatment," em *The Handbook of Environmental Chemistry*, pp. 325-366.
- [61] A. L. Boreen, W. A. Arnold e K. McNeill, "Photochemical Fate of Sulfa Drugs in the Aquatic Environment: Sulfa Drugs Containing Five-Membered Heterocyclic Groups," *Environmental Science and Technology*, vol. 38(14), pp. 3933-3940, 2004.
- [62] O. Planas, "What Is Solar Radiation? Definition, Types, and Characteristics," Solar Energy, 8 7 2021. [Online]. Available: <https://solar-energy.technology/what-is-solar-energy/solar-radiation>. [Acedido em 26 5 2022].
- [63] E. Felis, M. Buta-Hubeny, W. Zielinski, J. Hubeny, M. Harnisz, S. Bajkacz e E. Korzeniewska, "Solar-light driven photodegradation of antimicrobials, their transformation by-products and antibiotic resistance determinants in treated wastewater," *Science of the Total Environment*, vol. 836, 2022.
- [64] J. J. Hlavka e P. Bitha, "Photochemistry IV: A Photodeamination," *Tetrahedron Letters*, vol. 32, pp. 3843-3846, 1966.
- [65] J. A. Wiebe e D. E. Moore, "Oxidation Photosensitized by Tetracyclines," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1977.
- [66] Y. Chen, C. Hu, J. Qu e M. Yang, "Photodegradation of tetracycline and formation of reactive oxygen species in aqueous tetracycline solution under simulated sunlight irradiation," *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 197, pp. 81-87, 2008.
- [67] C. Stephens, K. Murai, J. Brunings e R. Woodward, "Acidity Constants of the Tetracycline Antibiotics," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 78(16), pp. 4155-4158, 1965.
- [68] Y. Chen, H. Li, Z. Wang, T. Tao e C. Hu, "Photoproducts of tetracycline and oxytetracycline involving self-sensitized oxidation in aqueous solutions: Effects of Ca²⁺ and Mg²⁺," *Journal of Environmental Sciences*, vol. 23(10), pp. 1634-1639, 2011.
- [69] "Solar Simulator, Manual and Electronic Safety Shutter, LCS-100," [Online]. Available: https://www.newport.com/medias/sys_master/software/software/h18/h2a/9762949103646/LCS-100-DS-021821.pdf.
- [70] "Class ABB Small Area Solar Simulators," Newport, [Online]. Available: <https://www.newport.com/f/small-area-solar-simulators>. [Acedido em 2 4 2022].
- [71] A. C. Matos, R. V. Pinto e A. F. Bettencourt, "Easy-Assessment of Levofloxacin and Minocycline in Relevant Biomimetic Media by HPLC–UV Analysis," *Journal of Chromatographic Science*, vol. 55(7), pp. 757-765, 2017.
- [72] A. Raghavendra Guru Prasad e V. Suryanarayana Rao, "First Derivative Spectrophotometric Determination of Demeclocycline and Minocycline in Clinical Samples, Urine and Honey," *Scientific World*, vol. 8(8), pp. 34-38, 2010.
- [73] A. Pena, M. Paulo, L. Silva, M. Seifrtová, C. Lino e P. Solich, "Tetracycline antibiotics in hospital and municipal wastewaters: a pilot study in Portugal," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 396, pp. 2929-2936, 2010.
- [74] K. Saldaña, E. Angulo, I. Mercado, G. Castellar e N. Cubillán, "Removal of minocycline from high concentrated aqueous medium by nonliving and lipid-free *Chlorella* sp. biomass," *Bioresource Technology Reports*, vol. 17, 2022.
- [75] M. Patel, R. Kumar, K. Kishor, T. Misra, C. Pittman, Jr e D. Mohan, "Pharmaceuticals of Emerging Concern in Aquatic Systems: Chemistry, Occurrence, Effects, and Removal Methods," *Chemical Reviews*, vol. 119, pp. 3510-3673, 2019.

VII. Anexos

Anexo 1 – Espectros de absorção UV-Vis das soluções de calibração

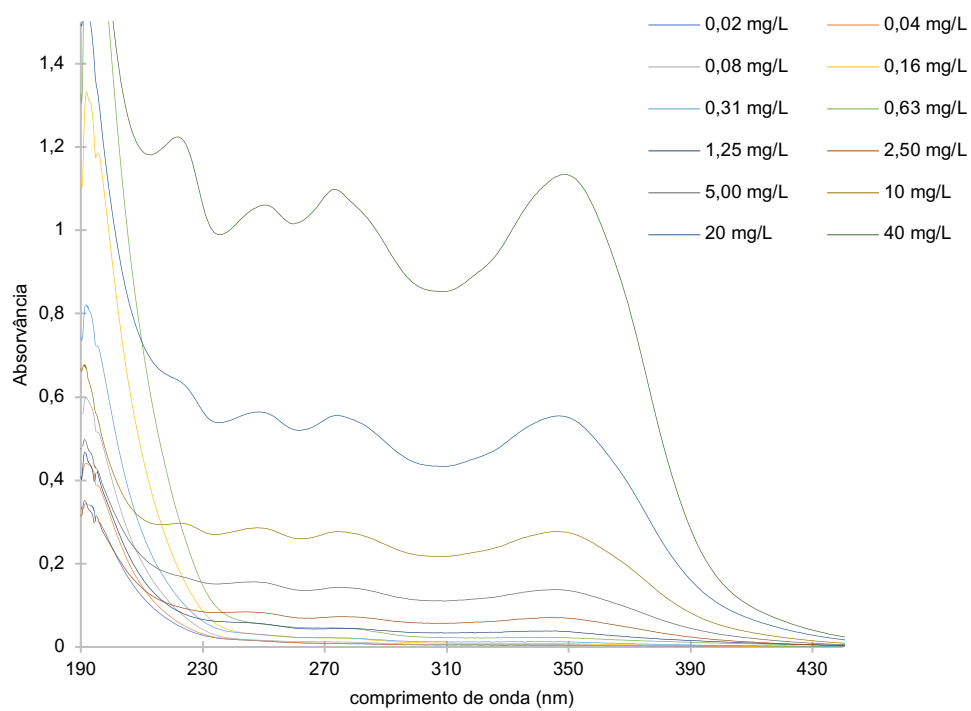


Figura 52. Espectros de absorção das soluções de calibração – replicado 1.

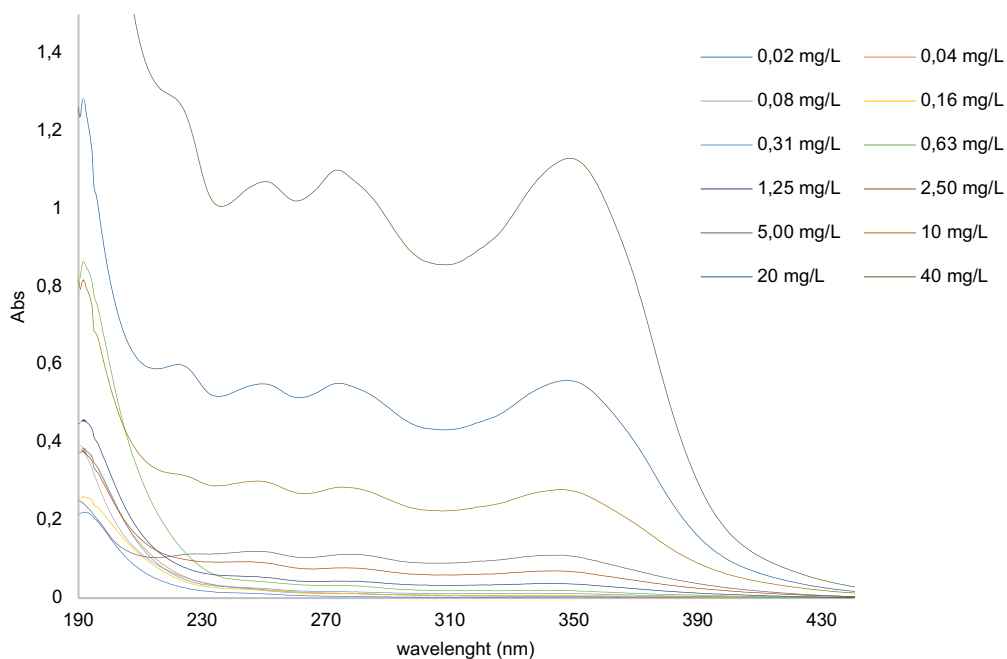


Figura 53. Espectros de absorção das soluções de calibração – replicado 2.

Anexo 2 – Cromatogramas das soluções de calibração

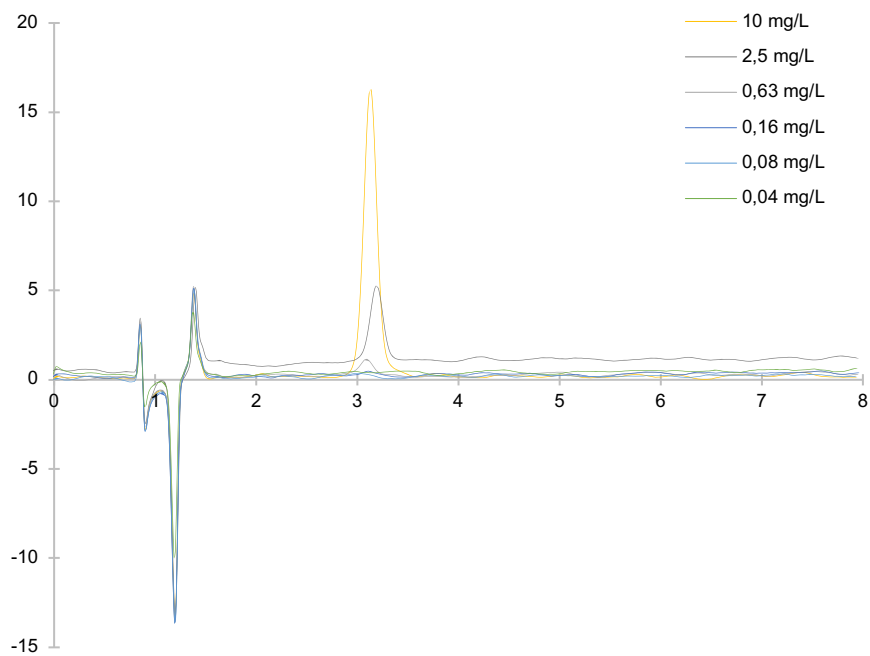


Figura 54. Cromatograma das soluções de calibração (347 nm)

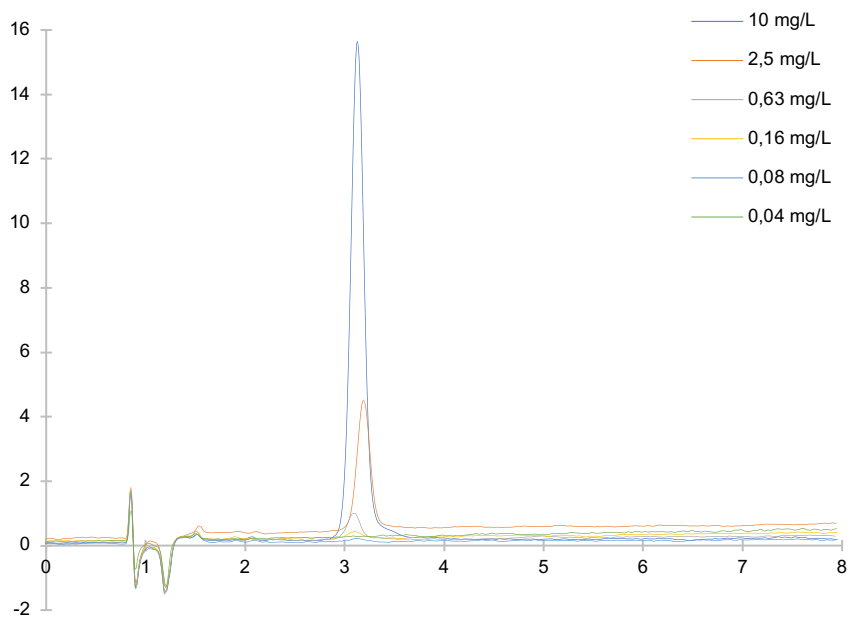


Figura 55. Cromatograma das soluções de calibração (347 nm)

Anexo 3 – Cromatogramas 3D

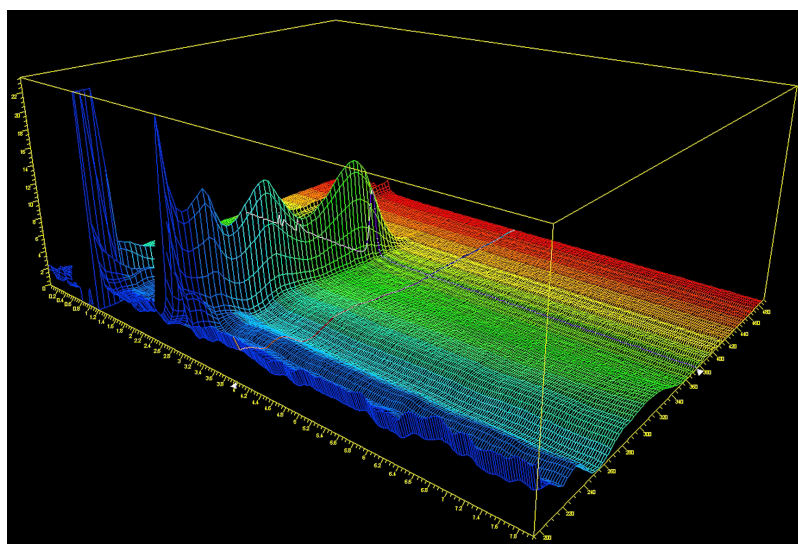


Figura 56. $V_0 = 10\text{ml}$, $t = 0\text{ hr}$

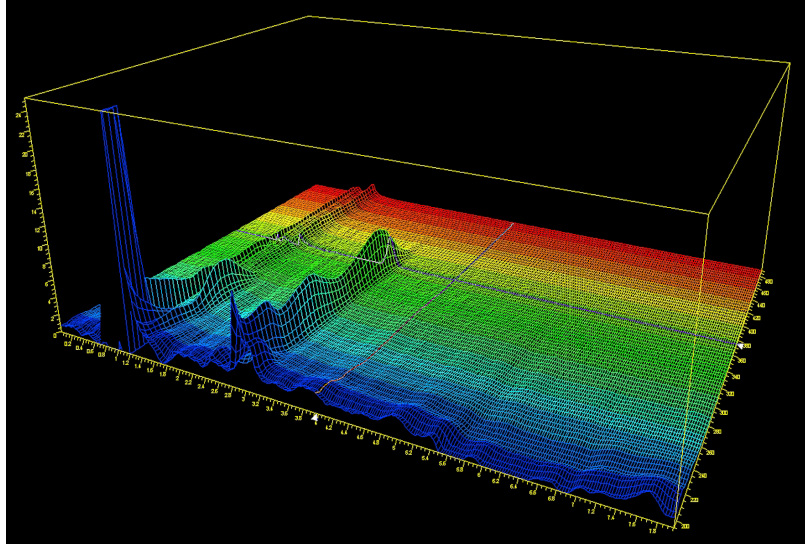


Figura 57. $V_0 = 10 \text{ mL}$ $t = 5h$

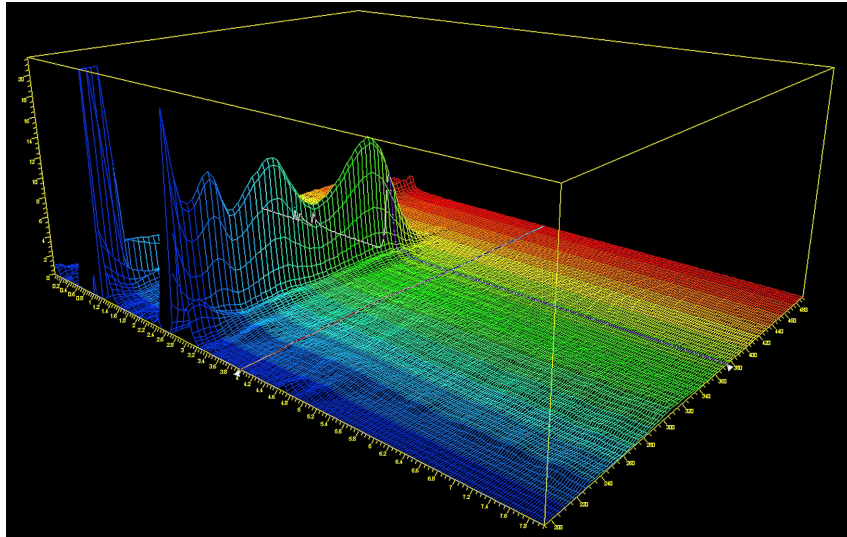


Figura 58. $V_0 = 50 \text{ mL}$ $t = 0hr$

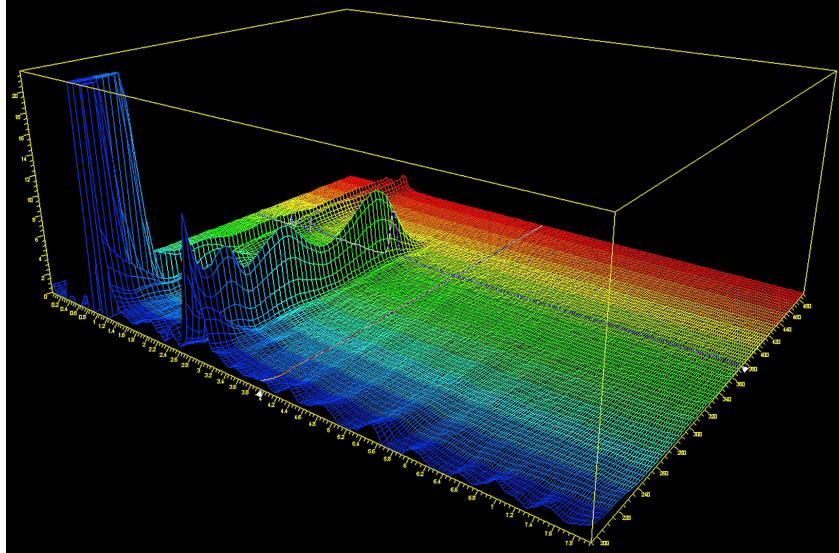


Figura 59. $V_0 = 50 \text{ mL}$ $t = 18,4 \text{ hr}$

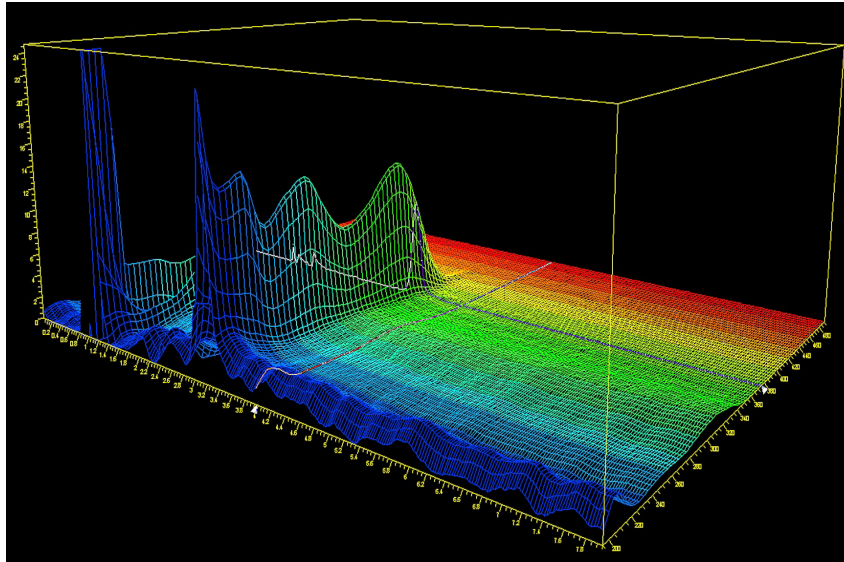


Figura 60. $V_0 = 100 \text{ mL}$ $t = 0 \text{ hr}$

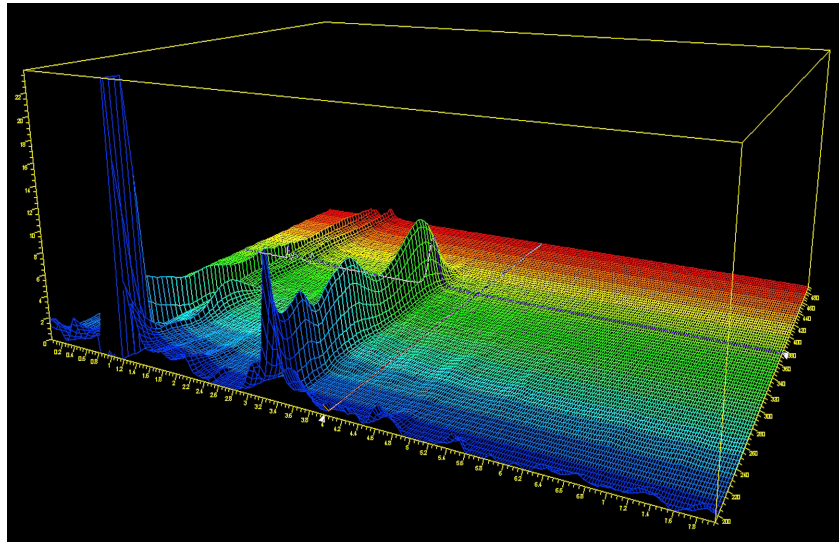


Figura 61. $V_0 = 100 \text{ mL}$ $t = 22,1 \text{ hr}$

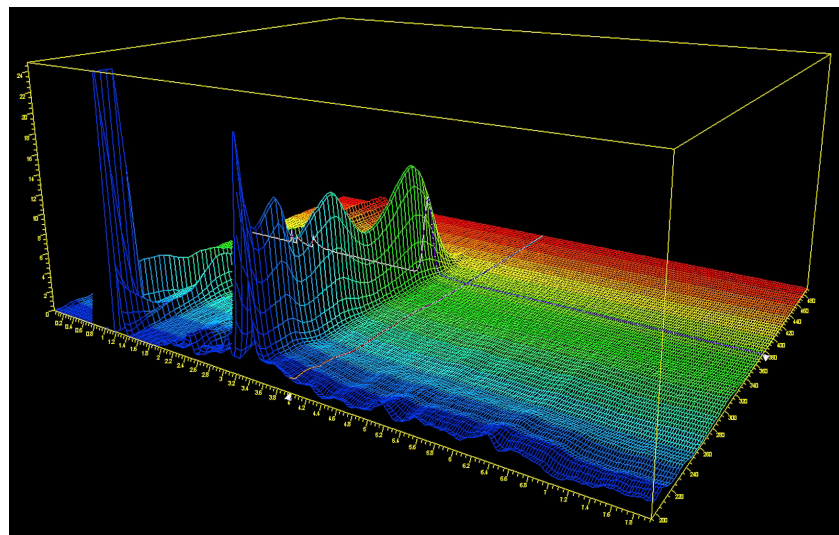


Figura 62. $V_0 = 100 \text{ mL}$ (com filtro) $t = 0 \text{ hr}$

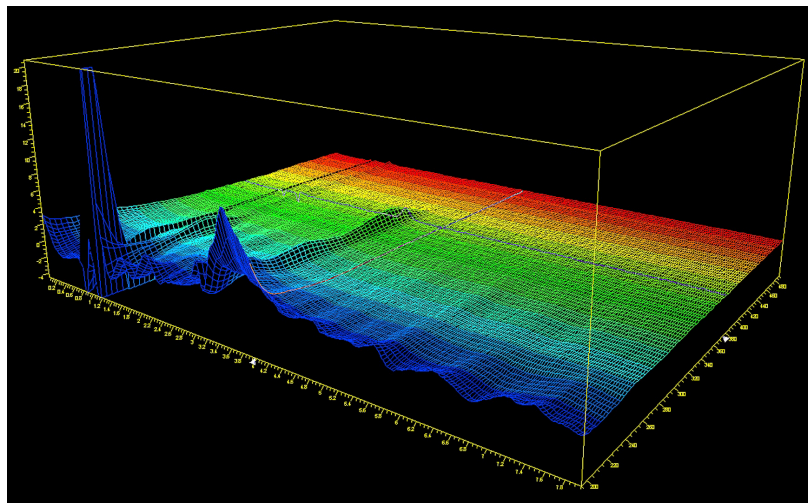


Figura 63. $V_0 = 100 \text{ mL}$ (com filtro) $t = 22 \text{ hr}$

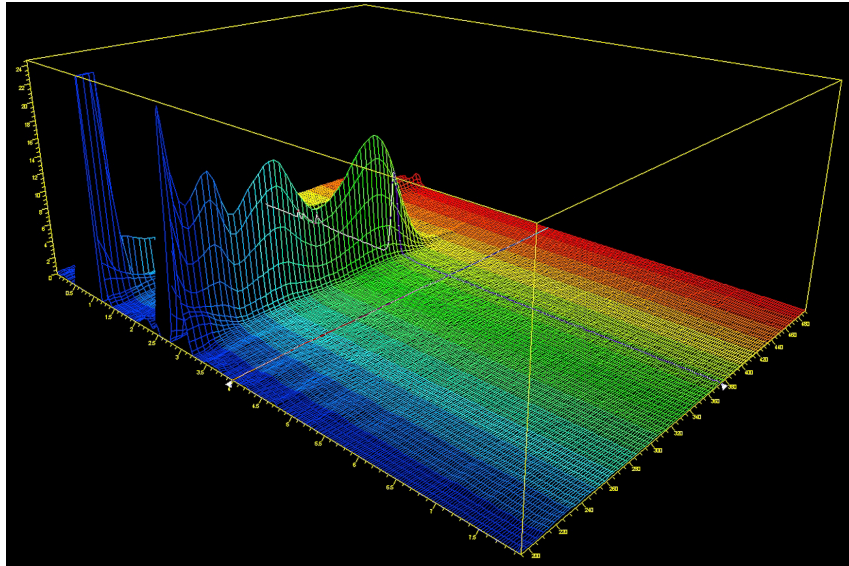


Figura 64. $V_0 = 100$ mL (com colimador) $t = 0$ hr

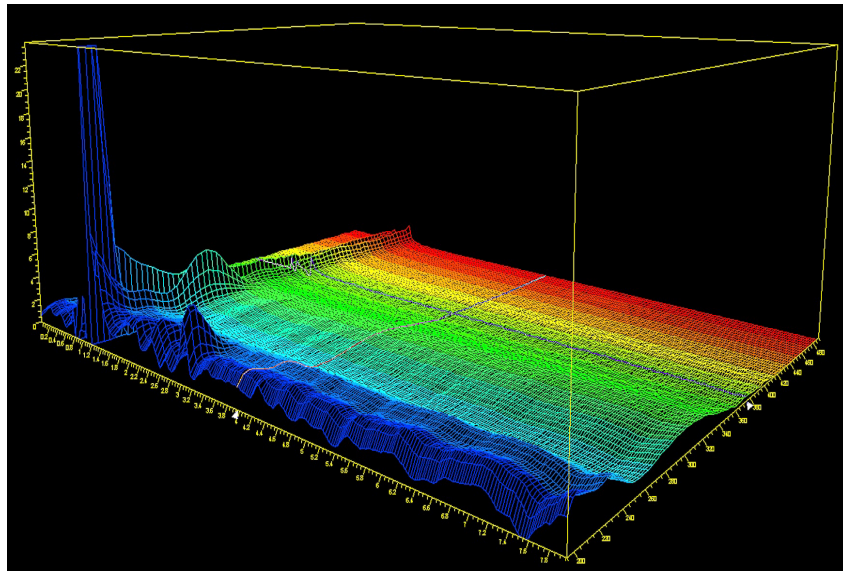


Figura 65. $V_0 = 100$ mL (com colimador) $t = 192$ hr

