

## I-025 - FOTÓLISE, PEROXIDAÇÃO E PEROXIDAÇÃO ASSISTIDA POR RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA NA DEGRADAÇÃO DA DOXICICLINA: MONITORAMENTO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

**Mylena Spina Cruz<sup>(1)</sup>**

Química pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Campus Araraquara (IQ-CAr). Mestranda em Saneamento e Ambiente na Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

**Milena Guedes Maniero<sup>(2)</sup>**

Engenheira Química pela Universidade Federal de São Carlos, mestre em Engenharia Química pela Universidade Federal de São Carlos e doutora em Engenharia Química pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (COPPE/UFRJ). Pesquisadora colaboradora na Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo da Unicamp, no Departamento de Saneamento e Ambiente

**José Roberto Guimarães<sup>(3)</sup>**

Químico pela Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Professor Titular na Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Rua Saturnino de Brito, 224 Cidade Universitária “Zeferino Vaz” - Campinas - SP - CEP: 13083-889 - Brasil - Tel: (19) 35212307 - e-mail: [mylenaspina@yahoo.com.br](mailto:mylenaspina@yahoo.com.br)

### RESUMO

Contaminantes emergentes, como fármacos de uso veterinário, são considerados compostos persistentes e sua presença no meio ambiente pode contribuir para o desenvolvimento de bactérias resistentes, causando um desequilíbrio no meio aquático. Neste estudo foi avaliada a eficiência dos processos de fotólise, peroxidação e peroxidação assistida por radiação UV (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para a remoção da doxiciclina em meio aquoso, avaliando a atividade antimicrobiana. Índices de 99,6% de degradação da DOX foram observados quando se utilizou o processo oxidativo avançado UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Além da avaliação da degradação, foram realizados ensaios de atividade antimicrobiana utilizando as bactérias *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*, bactérias Gram negativa e Gram positiva, respectivamente. A capacidade antimicrobiana das soluções submetidas aos processos UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi diminuída ao longo dos ensaios para ambas as bactérias de forma proporcional ao aumento de degradação do fármaco.

**PALAVRAS-CHAVE:** POA, Contaminantes Emergentes, Fármacos Veterinários

### INTRODUÇÃO

Contaminantes emergentes (CE) são compostos de origem antrópica ou origem natural e podem apresentar riscos ao meio ambiente. Estes contaminantes não são regulamentados e portanto não há um monitoramento para controlar e avaliar sua ocorrência e seus impactos no ecossistema (RAIMUNDO, 2011). Estudos sobre concentrações e quantidades encontradas no meio ambiente, além de ecotoxicidade, efeitos à saúde humana e animal, potencial de bioacumulação, transporte e destino no ambiente podem ocasionar futuras regulamentações (PETROVIC; BARCELÓ, 2006)

Fármacos de uso veterinário são considerados contaminantes emergentes. Uma vez administrados, a maioria desses medicamentos não é totalmente metabolizada devido à baixa taxa de absorção no trato digestivo dos animais. Dessa forma, esses fármacos podem atingir o solo e rios receptores, uma vez que há a possibilidade de serem excretados *in natura* pelas fezes e urina na sua forma não metabolizada ou por meio de seus metabólitos ativos (JEMBA, 2006)

Os antimicrobianos destinados a uso veterinário se enquadram na descrição de produtos veterinários e devem receber especial atenção, devido aos riscos que estes contaminantes podem causar ao meio ambiente. Porém, apenas recentemente uma investigação detalhada sobre antibióticos com a intenção de permitir uma avaliação dos riscos à natureza vem sendo realizada (KÜMMERER, 2009)

Os processos oxidativos avançados (POA) têm demonstrado ser eficientes na remoção de medicamentos veterinários recalcitrantes presentes em efluentes aquosos, como tratamento terciário em estações de tratamento de águas em geral (PALOMINOS et al., 2008). É importante salientar que o peróxido de hidrogênio irradiado como luz ultravioleta (UV-C) resulta na formação do radical hidroxila (HO•), que é altamente oxidativo ( $E = 2,80V$ ) e não seletivo, que pode desencadear um série de reações de óxido-redução no meio provocando a degradação dos compostos presente na matriz (FERREIRA; MANIERO; GUIMARÃES, 2015).

Neste trabalho foi avaliada a eficiência da remoção da doxiciclina, antimicrobiano de uso veterinário pertencente à família das tetraciclina, e da atividade antimicrobiana da solução pelos processos de fotólise, peroxidação e peroxidação assistida por radiação ultravioleta.

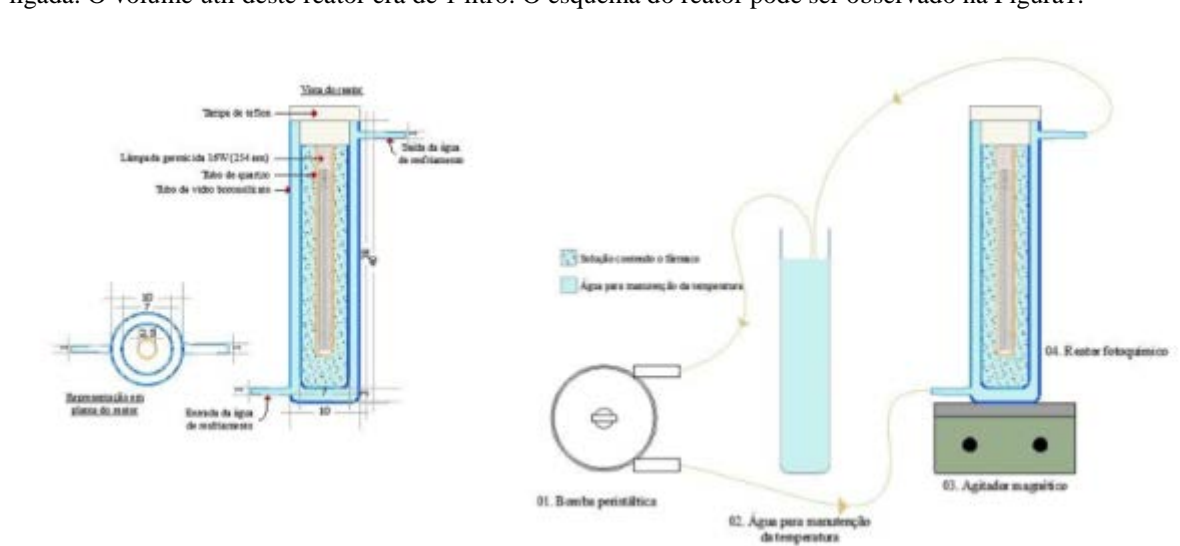
## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Preparo de Soluções

Primeiramente foi preparada uma solução estoque do fármaco em metanol, utilizando Hiclato de Doxiciclina ( $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl \cdot \frac{1}{2} H_2O \cdot \frac{1}{2} C_2H_6O$ , 512,9554 g.mol<sup>-1</sup>, pureza > 98%, Sigma – Aldrich) na concentração de 500 mg L<sup>-1</sup>, a qual foi armazenada sob temperatura de 4°C e em frasco âmbar. A solução de trabalho foi preparada no momento do ensaio, na concentração de 500 µg L<sup>-1</sup>, por meio de diluição da solução estoque em água deionizada, obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore).

### 2. Ensaios de Degradação

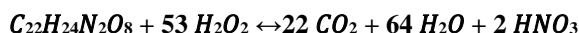
Os ensaios de degradação por UV, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram realizados em um reator composto por duas partes. A parte interna era composta por um tubo de quartzo de 2,5 cm de diâmetro e 35 cm de comprimento. Dentro desse tubo fechado em uma das extremidades colocava-se uma lâmpada germicida ultravioleta de 16 W (254 nm). A parte externa era composta por um tubo de borossilicato com parede dupla com uma entrada e saída, que permitia a recirculação de água no sistema para controlar a temperatura quando a lâmpada UV estava ligada. O volume útil deste reator era de 1 litro. O esquema do reator pode ser observado na Figura 1.



**Figura 1: Representação do sistema de degradação**

#### 2.1 – Condições experimentais para os processos de UV, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Os processos de fotólise, peroxidação (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e peroxidação assistida por radiação ultravioleta (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foram realizados em pH original da solução de doxiciclina, que é em torno de 5,4. Os ensaios foram realizados em batelada variando-se o tempo de 0 a 20 minutos. A quantidade de peróxido de hidrogênio utilizada nas degradações obedeceu a estequiometria ideal da reação para completa mineralização, apresentada na Equação 1.



Equação 1

Seguindo a estequiometria da reação, são necessários 53 mol de peróxido de hidrogênio para reagir com 1 mol de doxiciclina. As proporções entre a doxiciclina e o peróxido de hidrogênio que foram testadas nos ensaios de peroxidação e peroxidação assistida por radiação ultravioleta foram: DOX:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 e 1:110, o que corresponde a 0,630, 1,126, 2,52, 5,04 e 6,93 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente.

**Tabela 1: Proporções entre a doxiciclina e o peróxido de hidrogênio que foram testadas nos ensaios de peroxidação e peroxidação assistida por radiação ultravioleta.**

Proporção DOX: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Relação estequiométrica (mol:mol)	Concentração H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mmol L <sup>-1</sup> )
1:10	1:6,3x10 <sup>-4</sup>	0,630
1:20	1:1,26x10 <sup>-3</sup>	0,126
1:40	1:2,52x10 <sup>-3</sup>	2,52
1:80	1:5,04x10 <sup>-3</sup>	5,04
1:110	1:6,93x10 <sup>-3</sup>	6,93

### 3. Extração em Fase Sólida (EFS)

A extração em fase sólida (SPE, do inglês “*solid phase extraction*”) foi a técnica utilizada para concentrar a amostra, uma vez que a concentração do analito presente na solução pode ser muito baixa após os processos de degradação, a ponto de não ser quantificado, ou até mesmo, detectado pelo HPLC. Durante o processo de extração, um litro da solução percolou pelo recheio do cartucho, a uma vazão de 10 mL min<sup>-1</sup> e o analito presente na solução ficou retido no cartucho. Para recuperá-lo, fez-se uma eluição com pequeno volume de solvente.

A extração foi realizada utilizando o cartucho Oasis HLB (500mg 6 mL<sup>-1</sup>) com adsorvente polimérico, da marca Waters, em dois valores de pH: 3 e 7, uma vez que o pH pode influenciar a eficiência da técnica de EFS, principalmente quando a molécula é ionizável (Rodrigues-Silva et al., 2013). Para o ajuste ácido do pH, foi utilizada uma solução de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 10% (v/v) e para o ajuste do pH próximo ao neutro foi utilizado uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,2 mol L<sup>-1</sup>. O condicionamento do cartucho foi feito com 6 mL de metanol filtrado e posteriormente 6 mL de água deionizada. Após a extração, a eluição dos analitos do cartucho foi realizada com 4 mL de metanol filtrado. A melhor recuperação foi obtida em pH 3 e foi na faixa de 80 a 100% para concentrações de doxiciclina variando de 10 a 500 µg L<sup>-1</sup>.

### 4. Quantificação da doxiciclina: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Para detectar e quantificar a doxiciclina em soluções aquosas, durante a aplicação dos processos de degradação, foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. O equipamento era composto por uma bomba binária, modelo 1525, um injetor automático modelo 2707 e um detector DAD (diode array detector) modelo 2996, da marca Waters. O volume de amostra injetado foi de 10 µL. A separação do analito da fase móvel foi feita por uma coluna Zorbax XDB C<sub>18</sub> (4,6 x 150 mm, 5 µm) da marca Agilent em um comprimento de onda de 355 nm. A aquisição de dados foi realizada pelo programa EmpowerTM3. A fase móvel definida foi composta de ácido oxálico 0,01 mol L<sup>-1</sup> a pH 4,0 como fase aquosa e uma mistura de acetonitrila e metanol como fase orgânica. A proporção definida foi de 72% de solução aquosa de ácido oxálico, 10% de metanol e 18% de acetonitrila. Como a doxiciclina apresentou maior absorção em 355 nm, esse comprimento de onda foi utilizado para o monitoramento do fármaco por HPLC-DAD.

O LOD foi igual a 0,2 mg L<sup>-1</sup>, concentração em que o pico cromatográfico apresentou altura equivalente a 3 vezes ao do sinal do ruído da linha de base do cromatograma. O LOQ, determinado pela relação sinal-ruído 10:1, foi igual a 0,5 mg L<sup>-1</sup>. Considerando que a amostra foi concentrada 250 vezes durante a extração em fase sólida, o LOD e LOQ do método foram 0,8 µg L<sup>-1</sup> e 2,0 µg L<sup>-1</sup>.

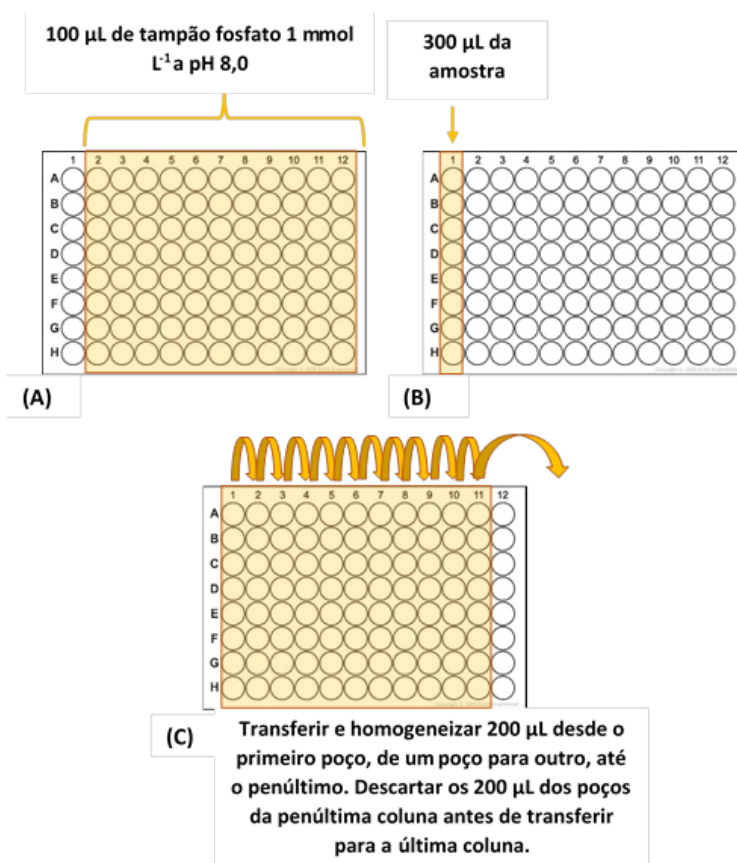
### 5. Ensaios de Atividade Antimicrobiana (AAM)

O teste de atividade antimicrobiana (AAM) foi realizado segundo RODRIGUES-SILVA et al. (2013), com adaptações. Nos ensaios, foram utilizadas as bactérias *Escherichia coli* K12 (ATCC 23716) e *Bacillus subtilis* (ATCC 168) como organismos teste. Estas bactérias foram cultivadas em meios líquidos e sólidos. Para isso, foi utilizado meio de cultura Mueller-Hinton-agar (meio sólido) e caldo de cultura Mueller-Hinton Broth

(meio líquido). Os ensaios de atividade antimicrobiana das soluções de DOX submetidas aos processos de degradação foram realizados com uma população de bactérias *E. coli* e *B. subtilis* de  $1,0 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>. Para atingir essa densidade, foi realizado o repique das bactérias em meio sólido e líquido durante quatro dias antes do teste, sendo a última replicação do cultivo feita 24 horas antes do início.

As soluções de doxiciclina submetidas aos processos de degradação foram concentradas por extração em fase sólida (SPE) e diluídas 50 vezes em solução tamponada de fosfato de potássio 1 mmol L<sup>-1</sup> a pH 8.

Nos ensaios foram utilizadas placas de 96 poços, e nessas foram adicionados 100 µL de solução tampão fosfato de potássio em todos os poços, exceto no primeiro poço de cada fileira. Nestes, foram adicionados 300 µL da solução submetida ao processo de degradação, nos diferentes tempos de radiação UV. Em seguida, foi realizada uma diluição serial da amostra, apresentada na Figura 2, transferindo e homogeneizando 200 µL da solução desde o primeiro poço, de um poço para o outro, até o penúltimo poço, permanecendo assim o último (12º poço) somente com tampão fosfato. Por último, foram adicionados 100 µL da suspensão da cultura da bactéria, *E. coli* ou *B. subtilis*, em todos os poços. Deste modo, foi possível avaliar o comportamento da bactéria em um meio onde há maior concentração da solução degradada até sua concentração zero. A placa foi tampada e colocada em um *shaker* com temperatura controlada em 37°C por 8 horas.



**Figura 2: Esquema de diluição serial realizada nos ensaios de AAM.**

Para a análise de dados, foram obtidas as absorvâncias de cada poço, em comprimento de onda de 620 nm, e estas foram convertidas em inibição do crescimento bacteriano (I), de acordo com a Equação 2.

$$I (\%) = [(A_{\text{controle}} - A) / A_{\text{controle}}] \times 100$$

Equação 2

sendo,  $A_{\text{controle}}$  corresponde a absorvância do último poço, que continha o tampão fosfato e a cultura de bactéria e  $A$  corresponde a absorvância dos demais poços, contendo a amostra submetida ao processo de degradação, o tampão fosfato e a cultura da bactéria.

Para o tratamento de dados, foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0 e com ele foi possível obter as curvas de concentração-resposta.

## RESULTADOS

### 1. Degradação por fotólise (UV), peroxidação ( $H_2O_2$ ) e peroxidação assistida por radiação ultravioleta (UV/ $H_2O_2$ )

Os processos de fotólise e peroxidação foram avaliados separadamente utilizando o reator fotoquímico em batelada, com o objetivo de estabelecer qual a contribuição de cada um dos processos na degradação da doxiciclina e quando são utilizados em sua forma combinada (processo oxidativo avançado).

No processo de degradação por fotólise, que consiste na degradação somente por radiação ultravioleta (UV-C), obteve-se um máximo de degradação de 26,4% da doxiciclina em 20 minutos de exposição à radiação UV. Observou-se um aumento na eficiência de degradação quando foi adicionado o peróxido de hidrogênio, processo conhecido por UV/ $H_2O_2$ . Quando adicionados 0,630 mmol L<sup>-1</sup> de  $H_2O_2$  (proporção estequiométrica DOX: $H_2O_2$  de 1:10), 28,8% da doxiciclina foi degradada com 2 minutos de radiação UV, atingindo índices de remoção de 50,7% com 10 minutos de radiação UV. Uma degradação máxima foi atingida com 20 minutos de radiação, chegando a 96,8%.

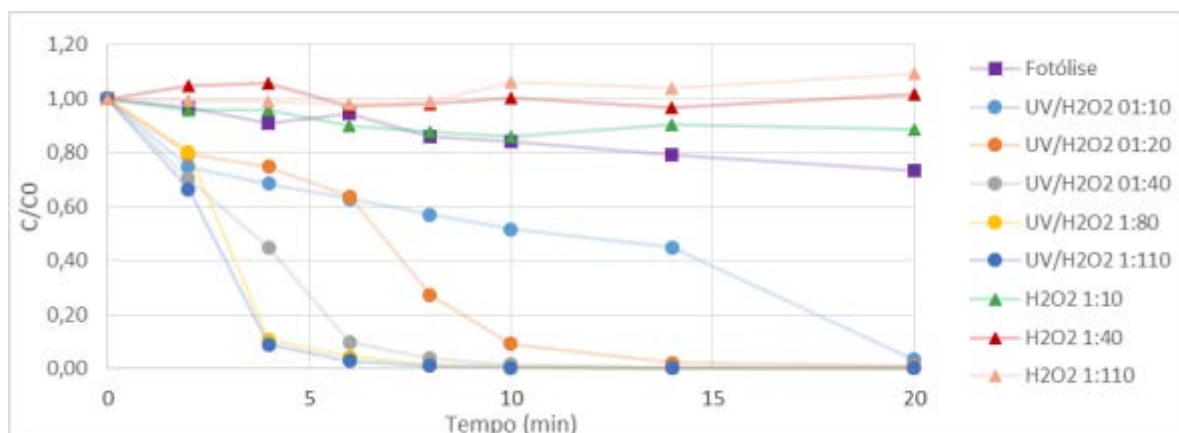
Quando se adicionou o dobro da concentração de  $H_2O_2$ , ou seja, 1,26 mmol L<sup>-1</sup> de  $H_2O_2$  (DOX: $H_2O_2$  1:20), alcançou índices mínimos de degradação de 27,4% com 2 minutos de radiação UV. Sob 10 minutos de irradiação, a remoção do fármaco foi de 90,8%, enquanto que mais de 98,9% foi degradado com 20 minutos de radiação. Em comparação com a proporção DOX: $H_2O_2$  1:10, nota-se que nos primeiros tempos de radiação não há uma diferença muito expressiva na degradação da doxiciclina mas, com tempos de radiação UV mais elevados, uma considerável diferença foi observada.

Adicionando 2,52 mmol L<sup>-1</sup> de  $H_2O_2$  (DOX:  $H_2O_2$  1:40), sob 4 minutos de irradiação, alcançou-se 64,3% de degradação do fármaco e, em 20 minutos, restava somente 0,6% da doxiciclina adicionada inicialmente na solução.

Em apenas 2 minutos de exposição à radiação UV, foi atingido 22% de degradação quando adicionado 6,30 mmol L<sup>-1</sup> de  $H_2O_2$  (DOX:  $H_2O_2$  1:110) e mais de 99,6% foram degradados com 20 minutos de radiação. Em comparação com a proporção DOX:  $H_2O_2$  de 1:80, não foram observadas mudanças consideráveis nos índices de degradação da doxiciclina. Deve-se salientar que uma concentração superior de peróxido de hidrogênio poderia diminuir a eficiência da reação por conta das reações competitivas causadas pelo excesso de  $H_2O_2$ . Dessa forma, em termos de degradação, os melhores resultados foram obtidos utilizando-se uma concentração de oxidante de 5,0 mmol L<sup>-1</sup>.

O processo de peroxidação, o qual foi utilizado para avaliar a degradação do fármaco somente com a adição do oxidante, não foi capaz de reduzir mais do que 5% da concentração inicial do fármaco, mesmo quando adicionado a maior concentração de  $H_2O_2$  (6,93 mmol L<sup>-1</sup>). O monitoramento das concentrações do composto alvo durante os ensaios obtidas em todas as condições podem ser observadas na Figura 3.

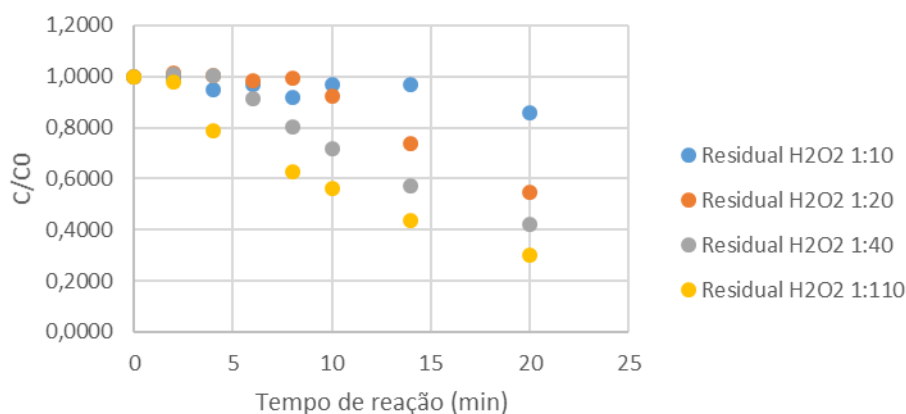




**Figura 3: Degradação da doxiciclina em função do tempo de ensaio pelos processos de fotólise, peroxidação e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

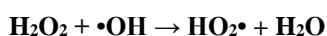
A fim de entender melhor o comportamento cinético da degradação da doxiciclina por UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foram calculadas as constantes de velocidade reação de pseudo-primeira ordem, sendo  $k = 1,38 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  para a relação estequiométrica DOX:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1:10;  $k = 2,57 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  para relação DOX:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1:20;  $k = 3,05 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  para relação DOX:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1:40;  $k = 3,37 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  para relação DOX:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1:80 e  $k = 3,28 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  para relação DOX:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1:110. Através do cálculo da cinética da reação, foi possível verificar que a velocidade da degradação do fármaco aumentou proporcionalmente com o aumento da concentração do oxidante no meio.

A avaliação da concentração de peróxido residual foi realizada para as condições UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas proporções DOX: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1:10, 1:20, 1:40 e 1:110, a fim de avaliar o consumo desse oxidante durante a reação (Figura 4). Para o POA UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pode-se observar um consumo de peróxido de 14%, 45%, 58% e 70% para as proporções DOX: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1:10, 1:20, 1:40 e 1:110 respectivamente. Desta forma, verificou-se que em nenhuma das reações o peróxido de hidrogênio era o reagente limitante da reação.



**Figura 4: Consumo de peróxido de hidrogênio nos processos de UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

É importante salientar que o peróxido de hidrogênio em excesso e grandes concentrações do radical hidroxila (HO•) podem desencadear reações competitivas, desacelerando as reações de degradação do fármaco (FERREIRA; MANIERO; GUIMARÃES, 2015). O excesso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode agir como um sequestrador de radical hidroxila favorecendo a formação do radical hidroperoxila (HO<sub>2</sub>•) que possui menor poder de oxidação, afetando diretamente a eficiência da reação (NOGUEIRA; OLIVEIRA; PATERLINI, 2005), como pode ser observado na Equação 4. Podem também ocorrer reações entre dois radicais hidroxila e formar novamente o peróxido de hidrogênio (Equação 5), desfavorecendo a degradação da DOX.



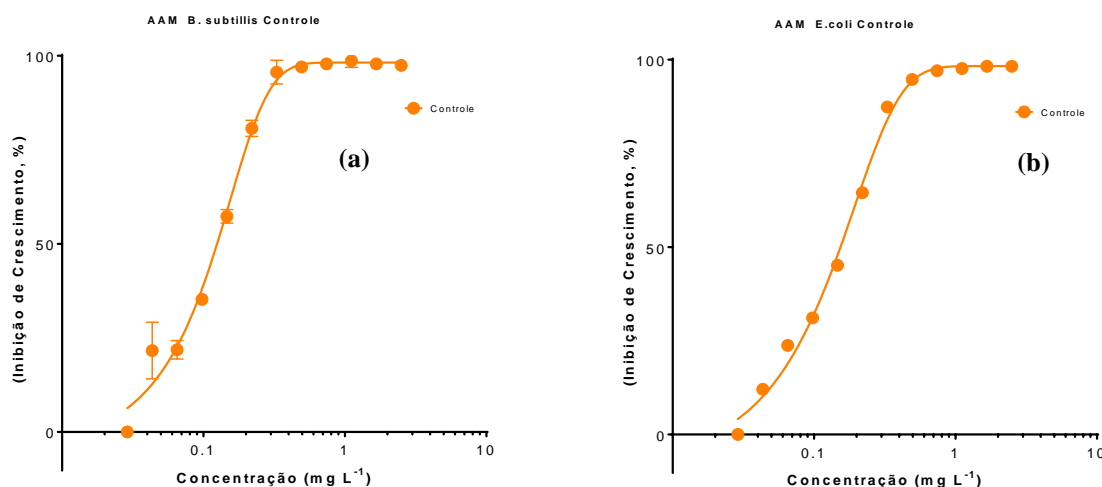
Equação 4



Equação 5

## 2. Atividade antimicrobiana

Primeiramente, foi avaliada a atividade antimicrobiana apenas da doxíciclina utilizando as bactérias *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. A curva dose resposta foi obtida na faixa de  $2,9 \times 10^{-2}$  a  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ . As  $\text{CE}_{50}$  (concentração efetiva de fármaco responsável pela inibição de 50% da atividade das bactérias) da doxíciclina obtidas foram de  $0,128 \text{ mg L}^{-1}$  quando utilizada a bactéria *B. subtilis*  $0,152 \text{ mg L}^{-1}$  com a *E. coli*, podendo-se concluir que a sensibilidade de ambas as bactérias a solução de doxíciclina é praticamente a mesma (Figuras 5a e 5b).



**Figura 5: Curvas dose resposta das soluções de doxíciclina (a) com a bactéria *B. subtilis* e (b) com a bactéria *E. coli*.**

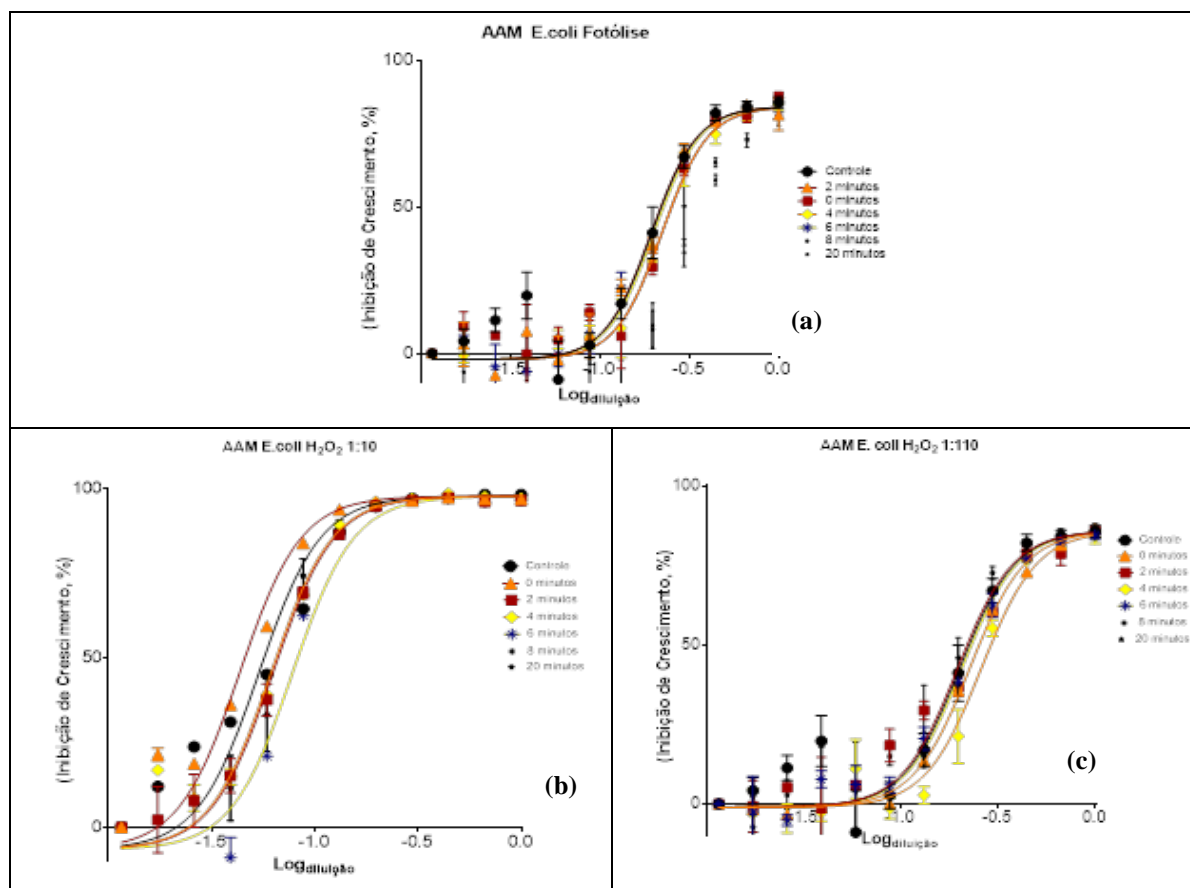
Em seguida, foi estudada a atividade antimicrobiana das soluções de doxíciclina ao longo do tempo nas quais foram submetidas aos processos de fotólise, peroxidação (nas proporções DOX:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1:10 e 1:110) e peroxidação assistida por UV (nas proporções DOX:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1:10, 1:40 e 1:110). Também foram avaliadas com as bactérias *Escherichia coli*, Gram negativa, e *Bacillus subtilis*, Gram positiva. Deve-se destacar que, devido às baixas concentrações iniciais do fármaco nessas amostras, as mesmas foram concentradas utilizando-se extração em fase sólida, os analitos foram eluídos em metanol e o extrato foi diluído 50 vezes em tampão fosfato.

Pelos resultados obtidos pode-se observar que nos processos onde não houve degradação, como na peroxidação, e nos processos onde a degradação atingiu índices baixos, como na fotólise, não houve alteração na atividade antimicrobiana tanto quando utilizada a *E. coli*, como pode se observar nas Figuras 6a, 6b e 6c, como quando utilizada a *B. subtilis* (dados não apresentados).

Quando os dois processos foram aliados (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ocorreu a uma perda da atividade antimicrobiana quando utilizada as duas bactérias apenas quando a solução foi submetida a 20 minutos de irradiação UV (dados não apresentados) na concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de  $0,630 \text{ mmol L}^{-1}$  (DOX:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1:10). Esse resultado pode ser atribuído ao maior índice de degradação da DOX neste tempo, pois em menores tempos de radiação, degradações da DOX inferiores a 55% foram observadas, restando ainda quantidades suficientes para inibir o crescimento das bactérias em questão.

Já na concentração intermediária de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  $2,52 \text{ mmol L}^{-1}$  (DOX: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1:40), ocorreu a diminuição da atividade antimicrobiana das soluções em 8 e 20 minutos (dados não apresentados). Nesses dois tempos de radiação UV, foram removidos 96,1% e 99,4% da DOX inicialmente presente na solução, respectivamente. Quando utilizada a concentração mais alta de oxidante, ou seja,  $6,93 \text{ mmol L}^{-1}$  (DOX: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1:110), ocorreu

a inibição da atividade de ambas as bactérias a partir de 4 minutos de radiação UV (dados não apresentados); nessas condições, 90,1% da DOX foi removida da solução.



**Figura 6: Atividade antimicrobiana das soluções de doxiciclina submetidas aos processos de (a) fotólise com a bactéria *E. coli*, (b) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DOX:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1:10) com a bactéria *B. subtilis* e (c) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DOX:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1:10) com a bactéria *E. coli*.**

## CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, é possível verificar que o processo oxidativo avançado UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi eficiente para a degradação da doxiciclina em matriz aquosa e possui um alto potencial de ser utilizado para o polimento de matrizes aquosas contendo esse fármaco.

Também, em estudo dessa natureza deve ser levado em consideração, juntamente com a eficiência da degradação, a atividade antimicrobiana, utilizando bactérias que pertencem ao espectro de atuação do fármaco, que no caso são as bactérias Gram positivas e Gram negativas. Nesse estudo, utilizando-se as bactérias *E. coli* e *B. subtilis* como organismos teste, observou-se um aumento na remoção da atividade antimicrobiana com o aumento da degradação do fármaco.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fapesp (2013/04656-8 e 2013/09543-7) pelo apoio financeiro. Mylena Spina agradece a CNPq e, Milena Maniero a Fapesp (2013/07817-2), pela concessão das bolsas.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE\\_899\\_2003\\_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?M OD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?M OD=AJPERES)>. Acesso em: 30 março. 2016.
2. FERREIRA, G. F.; MANIERO, M. G.; GUIMARÃES, J. R. Degradation of Sucralose by Peroxidation Assisted with Ultraviolet Radiation and Photo-Fenton. **International Journal of Engineering and Technology**, v. 7, n. 5, p. 438–444, 2015.
3. JJEMBA, P. K. Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 63, n. 1, p. 113–30, jan. 2006.
4. KIM, I.; YAMASHITA, N.; TANAKA, H. Performance of UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> processes for the removal of pharmaceuticals detected in secondary effluent of a sewage treatment plant in Japan. **Journal of hazardous materials**, v. 166, n. 2-3, p. 1134–40, 30 jul. 2009.
5. KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 417–434, 2009.
6. NOGUEIRA, R. F.; OLIVEIRA, M. C.; PATERLINI, W. C. Simple and fast spectrophotometric determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in photo-Fenton reactions using metavanadate. **Talanta**, v. 66, n. 1, p. 86–91, 2005.
7. PALOMINOS, R. et al. Evidence for hole participation during the photocatalytic oxidation of the antibiotic flumequine. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 193, n. 2-3, p. 139–145, jan. 2008.
8. PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Liquid chromatography–mass spectrometry in the analysis of emerging environmental contaminants. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 385, n. 3, p. 422–424, 6 maio 2006.
9. RAIMUNDO, C. C. M. **Contaminantes emergentes em água tratada e seus mananciais: sazonalidade, remoção e atividade estrogênica**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2011.
10. RODRIGUES-SILVA, C. et al. Degradation of flumequine by the Fenton and photo-Fenton processes: Evaluation of residual antimicrobial activity. **Science of the Total Environment**, v. 445-446, p. 337–346, 2013.