

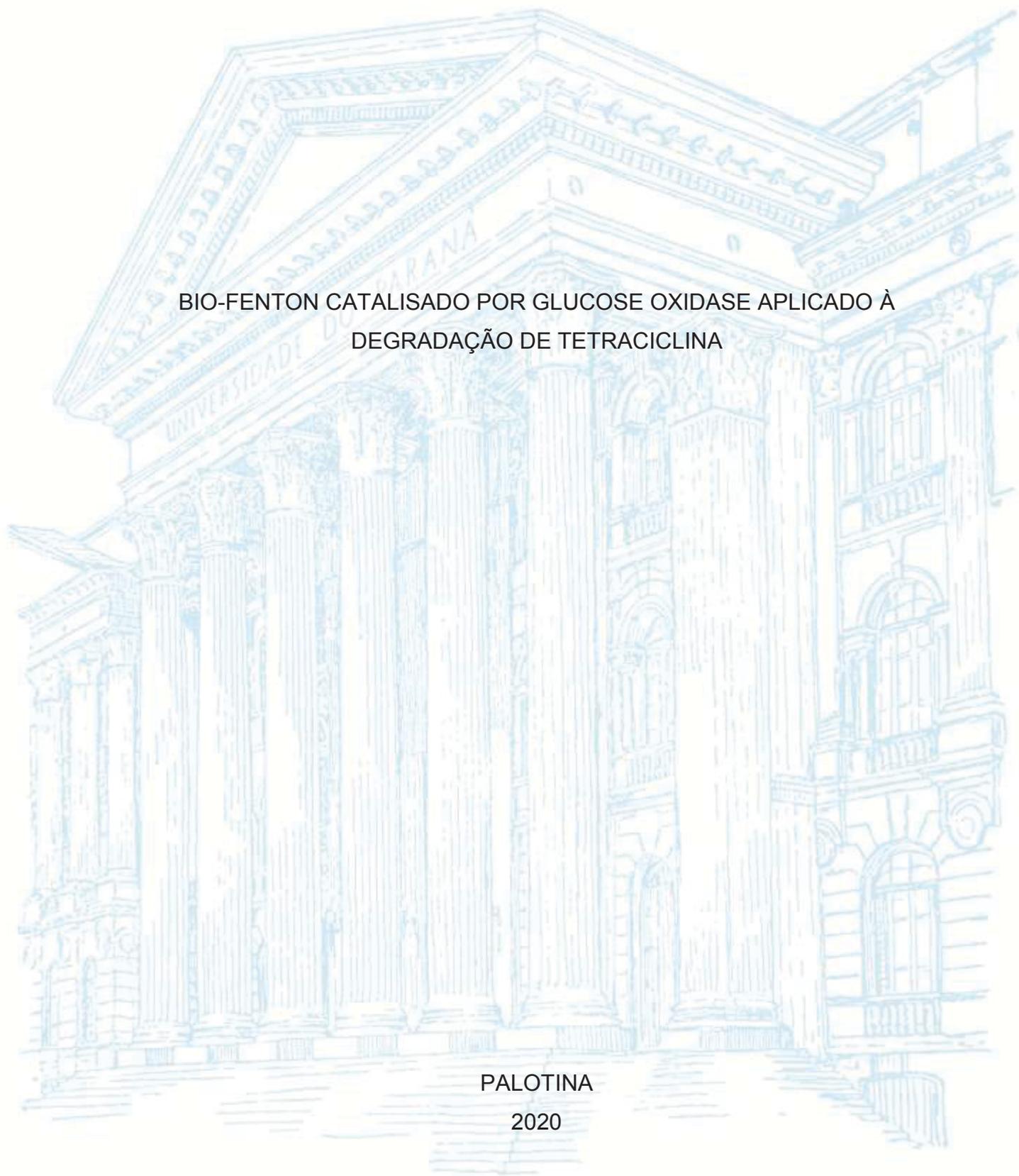
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

STELAMARIS SCHWARZER SPIES

BIO-FENTON CATALISADO POR GLUCOSE OXIDASE APLICADO À  
DEGRADAÇÃO DE TETRACICLINA

PALOTINA

2020



STELAMARIS SCHWARZER SPIES

BIO-FENTON CATALISADO POR GLUCOSE OXIDASE APLICADO À  
DEGRADAÇÃO DE TETRACICLINA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Setor de Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivonete Rossi Bautitz

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel Stroher

PALOTINA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S755 Spies, Stelamaris Schwarzer  
Bio-fenton catalisado por glucose oxidase aplicado à degradação de tetraciclina / Stelamaris Schwarzer Spies – Palotina, 2020.  
86f.

Orientadora: Ivonete Rossi Bautitz  
Coorientadora: Raquel Stroher  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

1.Contaminantes emergentes. 2. Enzima. 3.Processos oxidativos avançados. 4.Antibióticos. 5.CLAE. I. Bautitz, Ivonete Rossi. II. Stroher, Raquel. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 602



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR PALOTINA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOTECNOLOGIA -  
40001016083P6

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **STELAMARIS SCHWARZER SPIES** intitulada: **Bio-Fenton catalisado por glucose oxidase aplicado à degradação de tetraciclina**, sob orientação da Profa. Dra. IVONETE ROSSI BAUTITZ, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 15 de Dezembro de 2020.

Assinatura Eletrônica

16/12/2020 15:01:24.0

IVONETE ROSSI BAUTITZ

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

17/12/2020 15:42:33.0

RODRIGO SEQUINEL

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

16/12/2020 15:33:01.0

RAQUEL FERNANDES PUPO NOGUEIRA

Avaliador Externo (UNESP)

RUA PIONEIRO, 2153 - PALOTINA - Paraná - Brasil

CEP 85950-000 - Tel: (44) 3211-8500 - E-mail: [mestradiototecufpr@gmail.com](mailto:mestradiototecufpr@gmail.com)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 66076

**Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 66076**

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha filha, companheira de todas as etapas desde a barriga participando das aulas, até durante longo processo de escrita ao meu lado ou no colo.

Ao meu marido, pelo seu companheirismo e apoio emocional necessário para eu seguir com o trabalho, mesmo após nossa jornada de trabalho diária.

Aos meus pais que, mesmo distantes, participaram de cada conquista desta trajetória e que proporcionaram no passado minha inserção na vida acadêmica.

A minha sogra por ter me acolhido como filha.

A minha cunhada por cuidar da minha filha proporcionando momentos para me dedicar aos estudos.

As minhas irmãs, tão diferentes e tão iguais a mim. Em especial a *baby* por contribuir com a correção dos meus textos.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus pela saúde, oportunidade, coragem e força de vontade para almejar e alcançar mais essa conquista.

A família em que nasci e a que construí pelo total apoio, respeito a minha concentração e ausência em alguns momentos.

Sou grata a minha orientadora Ivonete Rossi Bautitz e coorientadora Raquel Stroher pela confiança, disponibilidade, conhecimento, amizade, humildade e leveza com que levaram nosso trabalho. A maneira como lidaram com os problemas do percurso e sua liderança participativa proporcionaram meu crescimento pessoal.

As alunas de Iniciação Científica Adriá e Simone pela rica contribuição na realização dos experimentos no laboratório. Em especial a Simone com quem pude compartilhar mais tempo e, principalmente pelos ensinamentos relacionados ao equipamento HPLC.

A todos os professores da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, que contribuíram para o meu crescimento acadêmico/profissional.

Ao Guilherme Lenz, técnico do Laboratório, que sempre esteve disponível para auxiliar com as dúvidas relacionadas à cromatografia e atividades no laboratório.

E, a todos que de uma forma ou outra acompanharam minha jornada e através de simples gestos, palavras ou olhares puderam me indicar que estavam comigo, me dando força para seguir. Essa vitória também é sua.

A solução dos problemas apenas restaura a normalidade. Para encontrar oportunidades é preciso explorar novos caminhos. (PETER DRUCKER)

## RESUMO

Estudos relacionados à qualidade de águas superficiais especialmente àqueles voltados a presença de contaminantes têm aumentado a fim de conhecer potenciais riscos a vida aquática e a saúde humana. Com o desenvolvimento e melhoria de técnicas analíticas é possível identificar compostos orgânicos em baixas concentrações (nano a microgramas por litro), os quais não são degradados pelos sistemas convencionais de tratamento de esgoto, efluentes e água. Há uma parte desses compostos que ainda se desconhece potenciais impactos ecotoxicológicos, os quais são denominados Contaminantes Emergentes. Dentre eles, os fármacos têm se destacado, sendo a tetraciclina (TC) um dos tipos de antibióticos mais utilizados pela medicina humana e veterinária. Como uma possível alternativa frente a essa dificuldade, estão os Processos Oxidativos Avançados (POA), os quais tem demonstrado eficiência na mineralização destes tipos de compostos. Um desses processos é o Bio-Fenton, que se trata de uma melhoria do processo de Fenton clássico no qual se utiliza enzimas, como a glucose oxidase, para geração de peróxido *in situ*. Por se tratar de um processo misto (químico e enzimático) se faz necessário o entendimento de seu mecanismo na degradação da TC avaliando fatores como pH, temperatura, concentração de ferro, substrato e enzima. O monitoramento da concentração de TC foi feito por análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) onde se alcançou em 8 minutos percentuais de degradação satisfatórios que variaram de 66,4% a 84,9%. Já após 64 minutos obteve-se uma melhoria dos resultados atingindo 85,9% a 92,4% de degradação. Nas reações em que não houve ajuste de pH e também nos ensaios em que o pH inicial foi ajustado para 6, obteve-se maiores valores de degradação, que as reações com pH ajustado para 3. A condição de temperatura 31 °C foi considerada a mais indicada para a reação. Em relação ao efeito da concentração de ferro sobre a reação, observou-se uma tendência de aumento da degradação à medida que mais ferro foi disponibilizado até a concentração de 0,25 mM. Quanto à influência da concentração da enzima e do substrato demonstrou-se que a proporção entre os reagentes da reação foi adequada nas concentrações testadas, atingindo valores finais de degradação de 88,8 a 91,7%. Assim, avaliando-se separadamente as variáveis, considerou-se que as seguintes condições de operação do Bio-Fenton levaram às melhores condições de degradação da TC: Temperatura 31 °C; pH natural (4,2), [FeSO<sub>4</sub>] = 0,25 mM, [dextrose anidra] = 75 mg L<sup>-1</sup>, [GOx] = 40 mg L<sup>-1</sup>, [tampão fosfato] = 5 mM. Desta forma, o processo de Bio-Fenton utilizando a enzima glucose oxidase como catalisadora da reação de degradação da TC pode ser considerada uma alternativa aos processos convencionais existentes.

Palavras-chave: Contaminantes Emergentes. Enzima. Processos Oxidativos Avançados. Antibióticos. CLAE.

## ABSTRACT

Studies related to the quality of surface water, especially those aimed at the presence of contaminants, have increased in order to discover potential risks to aquatic life and human health. With the development and improvement of analytical techniques, it is possible to identify organic compounds in low concentrations (nano to micrograms per liter), which are not degraded by conventional sewage, effluent and water treatment systems. There is a part of these compounds that is still unaware of the potential ecotoxicological impacts, which are called Emerging Contaminants. Among them, the drugs have stood out, being tetracycline (CT) one of the types of antibiotics most used by human and veterinary medicine. As a possible alternative in the face of this difficulty, there are Advanced Oxidative Processes (POA), which have shown efficiency in the mineralization of these types of compounds. One of these processes is Bio-Fenton, which is an improvement on the classic Fenton process in which enzymes, such as glucose oxidase, are used to generate peroxide in situ. Whereas it is a mixed process (chemical and enzymatic), it is necessary to understand its mechanism in the degradation of CT by evaluating factors such as pH, temperature, iron concentration, substrate and enzyme. The monitoring of the TC concentration was made by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis, where it was achieved, in 8 minutes, satisfactory percentage of degradation, that varied from 66.4% a 84.9%. After 64 minutes, an improvement in results was achieved, reaching 85.9% a 92.4% of degradation. In reactions in which there was no pH adjustment and also in tests in which the initial pH was adjusted to 6, higher values of degradation were obtained compared to the reactions with pH adjusted to 3. The temperature condition 31 °C was considered the most suitable for the reaction. Regarding the effect of iron concentration on the reaction, there was a tendency to increase the degradation as more iron was made available up to a concentration of 0.25 mM. In relation to the influence of the enzyme and substrate concentration, it was demonstrated that the ratio of these reagents was adequate in the tested concentrations, reaching final degradation values of 88.8 to 91.7%. Thus, by evaluating the variables separately, it was considered that the following operating conditions of the Bio-Fenton led to the best degradation conditions of the CT: Temperature 31 °C; natural pH (4.2), [FeSO<sub>4</sub>] = 0.25 mM, [anhydrous dextrose] = 75 mg L<sup>-1</sup>, [GOx] = 40 mg L<sup>-1</sup>, [phosphate buffer] = 5 mM. Therefore, the Bio-Fenton process using the glucose oxidase enzyme as a catalyst for the TC degradation reaction can be considered an alternative to the existing conventional processes.

Keywords: Emerging Contaminants. Enzyme. Advanced Oxidation Processes. Antibiotics. HPLC.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1– MACRO VISÃO DA ROTA DOS CONTAMINANTES EMERGENTES ..	20
FIGURA 2 – TECNOLOGIA APLICADA A DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS FARMACÊUTICOS .....	22
FIGURA 3 - ESTUDOS SOBRE A OCORRÊNCIA DE RESÍDUOS DE FÁRMACOS EM ÁGUAS NO BRASIL .....	26
FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DA TETRACICLINA.....	27
FIGURA 5 - A) ESTRUTURA DA TETRACICLINA COM INDICAÇÃO DO LOCAL DA PROTONAÇÃO. B) DISTRIBUIÇÃO DO PERCENTUAL DAS MOLÉCULAS EM DIFERENTES pH. ....	28
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DAS REAÇÕES DE OXI-REDUÇÃO DA GLUCOSE OXIDASE .....	38
FIGURA 7 - RECONSTRUÇÃO DE IMAGEM DE UMA GOx OBTIDA POR <i>A. NIGER</i> .....	38
FIGURA 8 - AÇÃO CATALÍTICA DA ENZIMA GLUCOSE OXIDASE EM DIFERENTES TEMPERATURAS E PH.....	39
FIGURA 9 - FOTOGRAFIA DO SISTEMA DE BIODEGRADAÇÃO DA TETRACICLINA. ....	43
FIGURA 10 - CURVA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE TETRACICLINA. ..	45
FIGURA 11 - EXPERIMENTOS CONTROLES DA REAÇÃO .....	46
FIGURA 12 - CROMATOGRAMA DA DEGRADAÇÃO DE TETRACICLINA POR BIO-FENTON.....	47
FIGURA 13 - EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GOX DE <i>Aspergillus niger</i> .....	48
FIGURA 14 - EFEITO DO pH NA DEGRADAÇÃO DE TC.....	49
FIGURA 15 - PERCENTUAL DE DEGRADAÇÃO DE TETRACICLINA VARIANDO O pH DO MEIO. ....	50
FIGURA 16 -MONITORAMENTO DO pH DURANTE A DEGRADAÇÃO DE TC.....	51
FIGURA 17 - INATIVAÇÃO TÉRMICA DA GOx DE <i>Aspergillus niger</i> . ....	52
FIGURA 18 - EFEITO DA TEMPERATURA NA DEGRADAÇÃO DE TC.....	53
FIGURA 19 - CONSTANTE CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE PRIMEIRA ORDEM EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....	54

FIGURA 20 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE FERRO NA DEGRADAÇÃO DE TC. ....	56
FIGURA 21 -CROMATOGRAMA COM INTERMEDIÁRIOS DA DEGRADAÇÃO DA TETRACICLINA .....	58
FIGURA 22 - MONITORAMENTO DO pH DURANTE A VARIAÇÃO DO FERRO....	59
FIGURA 23 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA NA DEGRADAÇÃO DE TC. ....	60
FIGURA 24 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO COMPORTAMENTO DE UMA ENZIMA QUE OBEDECE ÀS LEIS DE MICHAELIS-MENTEN .....	61
FIGURA 25 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DEXTROSE ANIDRA NA DEGRADAÇÃO DE TC .....	62
FIGURA 26 - EFEITO DO AUMENTO DA PROPORÇÃO FIXA DE ENZIMA:SUBSTRATO SOBRE A REAÇÃO .....	64

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - CONTAMINANTES EMERGENTES E SEUS EFEITOS ASSOCIADOS .....	24
QUADRO 2 - CONCENTRAÇÃO DE TETRACICLINA PRESENTE EM ÁGUAS SUPERFICIAIS EM DIFERENTES PAÍSES .....	29
QUADRO 3 - POTENCIAIS PADRÕES DE REDUÇÃO DE ALGUMAS ESPÉCIES <i>VERSUS</i> ELETRODO NORMAL DE HIDROGÊNIO (ENH).....	31
QUADRO 4 - PRINCIPAIS PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS .....	31

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 OBJETIVOS .....	17
1.1.1 Objetivo geral .....	17
1.1.2 Objetivos específicos.....	17
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
2.1 CONTAMINANTES EMERGENTES (CE) .....	18
2.1.1 Definição e classificação .....	18
2.1.2 Legislação .....	19
2.1.3 Fontes, rotas e degradação no ambiente .....	20
2.1.4 Efeitos ecotoxicológicos .....	22
2.1.5 Ocorrência de CE no ambiente .....	25
2.2 COMPOSTO-ALVO: TETRACICLINA.....	26
2.3 PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS (POAS) .....	30
2.3.1 Fenton .....	32
2.3.2 Foto-Fenton.....	33
2.3.3 Eletro-Fenton.....	34
2.3.4 Foto-Eletro-Fenton .....	35
2.3.5 Sono-Fenton.....	36
2.3.6 Bio-Fenton.....	36
2.4 GLUCOSE OXIDASE (GO <sub>x</sub> ) (B-D-GLUCOSE:OXYGEN 1-OXIDOREDUTASE).....	37
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>41</b>
3.1 REAGENTES .....	41
3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES.....	41
3.3 EQUIPAMENTOS E SOFTWARE.....	42
3.4 SISTEMA DE BIODEGRADAÇÃO .....	42
3.5 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO COMPOSTO-ALVO .....	44
3.5.1 Curva analítica .....	44
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
4.1 DEGRADAÇÃO DE TC POR BIO-FENTON: EXPERIMENTOS CONTROLE ....	46
4.2 EFEITO DO PH SOBRE A REAÇÃO .....	47
4.3 EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A REAÇÃO .....	52
4.4 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE FERRO SOBRE A REAÇÃO.....	56

4.5 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA SOBRE A REAÇÃO.....	60
4.6 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO DA ENZIMA SOBRE A REAÇÃO .....	61
4.7 EFEITO DO AUMENTO DA PROPORÇÃO FIXA DE ENZIMA:SUBSTRATO SOBRE A REAÇÃO .....	63
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>66</b>
5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	67
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO 1 – CERTIFICADO DE ANÁLISE DA TETRACICLINA.....</b>	<b>85</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A mudança no estilo de vida das pessoas, a industrialização e os avanços para expansão da produção agrícola são alguns fatores que tem aumentado a geração de resíduos que contaminam ar, água e solos. Dentre eles, os compostos orgânicos se destacam, pois apesar da degradação natural no ambiente, alguns ainda precisam passar por processos de tratamento. E, mesmo após essa etapa, algumas substâncias não são degradadas totalmente, permanecendo em águas superficiais, e, conseqüentemente na água potável.

Uma parte destes compostos forma um grupo conhecido como contaminantes emergentes (CE) que, geralmente, apresentam-se em pequenas concentrações na ordem de nano a microgramas por litro. Podem ser definidos como qualquer produto químico sintético ou natural, ou micro-organismo que não são comumente monitorados, porém possuem potencial de entrar no ambiente e causar alterações ecológicas e/ou efeitos nocivos à saúde humana. Medicamentos e fármacos, pesticidas e herbicidas, combustíveis, metais pesados, nanomateriais, microplásticos, micro-organismos, corantes têxteis, produtos de limpeza e de higiene pessoal, são alguns exemplos.

Dentre eles, os resíduos de fármacos destacam-se, pois, quando ingeridos, mesmo atendendo às orientações e limites de uso indicados, são absorvidos e metabolizados pelo organismo e/ou excretados, fazendo com que substâncias com atividade biológica sejam lançadas e acumuladas no ambiente. Os hormônios podem potencializar doenças, como câncer, e atuar como desreguladores endócrinos em animais, humanos e plantas. Já os antibióticos, por causar resistência bacteriana, podem influenciar, além de processos biológicos naturais, também os industriais, como a redução do rendimento em fabricação de iogurtes e queijos, quando utilizado leite que contém resíduos desses compostos.

Os antibióticos, especialmente os hidrossolúveis, como a tetraciclina, sulfametoxazol e eritromicina, são de grande preocupação ambiental devido ao alto consumo humano e veterinário, sendo assim encontrados em águas superficiais em todos os continentes. A tetraciclina foi encontrada em diferentes concentrações que variaram de nano a microgramas por litro em diversas regiões do planeta.

Considerando que os tratamentos convencionais de efluentes e água não são eficazes para eliminação desses contaminantes, os processos oxidativos avançados

surgem como uma alternativa. Estes têm se mostrado promissores pelo mecanismo simples de atuação sobre diversos compostos orgânicos ricos em elétrons, através da geração de radicais livres hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) altamente reativos e não seletivos.

Variações do processo Fenton clássico têm trazido vantagens, pois eliminam a necessidade de alimentação contínua de algum reagente químico ao sistema, bem como podem atuar em condições menos críticas de pH. Quando catalisado por enzimas, como por exemplo a glucose oxidase, ou micro-organismos é chamado de Bio-Fenton.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Estudar a degradação de tetraciclina em água pelo processo Bio-Fenton utilizando como biocatalisador a enzima glucose oxidase.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Verificar a influência do pH e temperatura no meio reacional;
- Investigar o efeito da concentração de ferro sobre a reação;
- Avaliar a influência da concentração de enzima e substrato;
- Verificar a relação substrato/enzima.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CONTAMINANTES EMERGENTES (CE)

#### 2.1.1 Definição e classificação

A temática dos Contaminantes Emergentes tem ganhado especial atenção nos últimos 25 anos pelo alto potencial de migração desses resíduos para os corpos d'água e possíveis impactos ecológicos (BARRIOS-ESTRADA et al., 2018). Trata-se de compostos que têm sido detectados também no solo e no ar, e que são enquadrados como emergentes, não necessariamente porque são novos, pois alguns deles se encontram no ambiente há décadas, mas porque somente há pouco tempo estão sendo detectados e quantificados graças a significativos avanços relacionados à sensibilidade das técnicas analíticas (SIDDIQUE; KUBWABO; HARRIS, 2016; AHMED; IQBAL; DHAMA, 2017). De acordo com Klaper e Welch (2011) o contaminante também pode ser chamado de emergente quando uma nova fonte deste é descoberta, ou uma nova rota de exposição aos humanos é demonstrada. Assim, diversas são as definições existentes para os CEs, e, uma das mais aceitas é a da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) que os considera como substâncias químicas ou não, que tem sido recentemente detectadas no ambiente cujo impacto ao meio aquático ou humanos é potencial mas ainda desconhecido, e que não possuem regulamentação definida (EPA, 2008).

Caracterizam-se por apresentarem-se em concentrações muito baixas em águas superficiais, na faixa de nanogramas ou microgramas por litro (SUTHERLAND e RALPH, 2019). Apesar de algumas substâncias já serem encontradas em concentrações preocupantes de miligramas e gramas por litro (NAKAYAMA et al., 2019; KELLY e BROOKS, 2018).

Klaper e Welch (2011) classificam os compostos emergentes de acordo com a sua utilização, origem ou seus efeitos. As categorias típicas são a dos pesticidas e herbicidas, nanomateriais, aditivos plásticos (Bisfenol A), produtos de cuidados pessoais e cosméticos (xampu, creme dental, sabonete, desodorante, hidratantes, maquiagem, repelente e protetor solar), estimulantes (cafeína), hormônios e fármacos (antibióticos, analgésicos, anticoncepcionais) (GAGO-FERRERO; DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2011; BOUR et al., 2015; BILAL et al., 2019; SUBEDI et al., 2014). Mas as drogas ilícitas, os corantes têxteis e os adoçantes artificiais (sucralose

e acesulfame) também se enquadram nesta classificação (PETRIE; BARDEN; KASPRZYK-HORDERN, 2015; NORVILL; SHILTON; GUIEYSSE, 2016; TRAN; REINHARD; GIN, 2018).

### 2.1.2 Legislação

A inclusão desses contaminantes em programas de monitoramento dos órgãos ambientais e de saúde, ou em normativas e legislações ainda é um desafio. A insuficiência de estudos para comprovar seus efeitos, e, a carência de técnicas analíticas disponíveis e capazes de quantificar os níveis de concentração dos contaminantes nas diversas matrizes existentes, são alguns dos motivos que levam a este quadro atual. A vista disto, buscando entender os impactos e contribuir com futuras regulamentações nesta área, diversos são os trabalhos relacionados aos efeitos à saúde humana, ecotoxicidade, rotas de degradação e bioacumulação, concentração em ambientes diversos, metodologias analíticas e de preparo das amostras. Assim, baseado no levantamento científico e por meio da criação de listas de priorização de ações, os países têm buscado trabalhar na construção de suas políticas governamentais voltadas aos contaminantes emergentes (MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017).

Na União Europeia (UE) e nos Estados Unidos (EUA) a aprovação de cada novo medicamento para uso humano, requer uma avaliação dos potenciais riscos ambientais associados à sua utilização bem como comprovação dos aspectos inerentes ao fármaco como segurança, estabilidade e eficácia. Enquanto que no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) não determina avaliação obrigatória de riscos ambientais para o registro de novos medicamentos (BRACK et al., 2017; SILVA, 2019).

Na UE a Diretiva nº 39 de 2013 compõe uma lista de 45 substâncias que devem ser controladas e priorizadas ações para redução progressiva de descarte e emissão para melhoria na qualidade da água. Já nos EUA existe a Tabela Nacional de Regulamentos para Água Potável, a qual contempla 87 contaminantes divididos em 6 categorias (micro-organismos, desinfetantes, subprodutos de desinfetantes, substâncias inorgânicas, químicos orgânicos e radiológicos) (EPA, 2020).

No Brasil, existe um déficit nesse sentido, visto que nenhum fármaco foi ainda inserido nas regulamentações, e apenas cerca de 30 pesticidas são

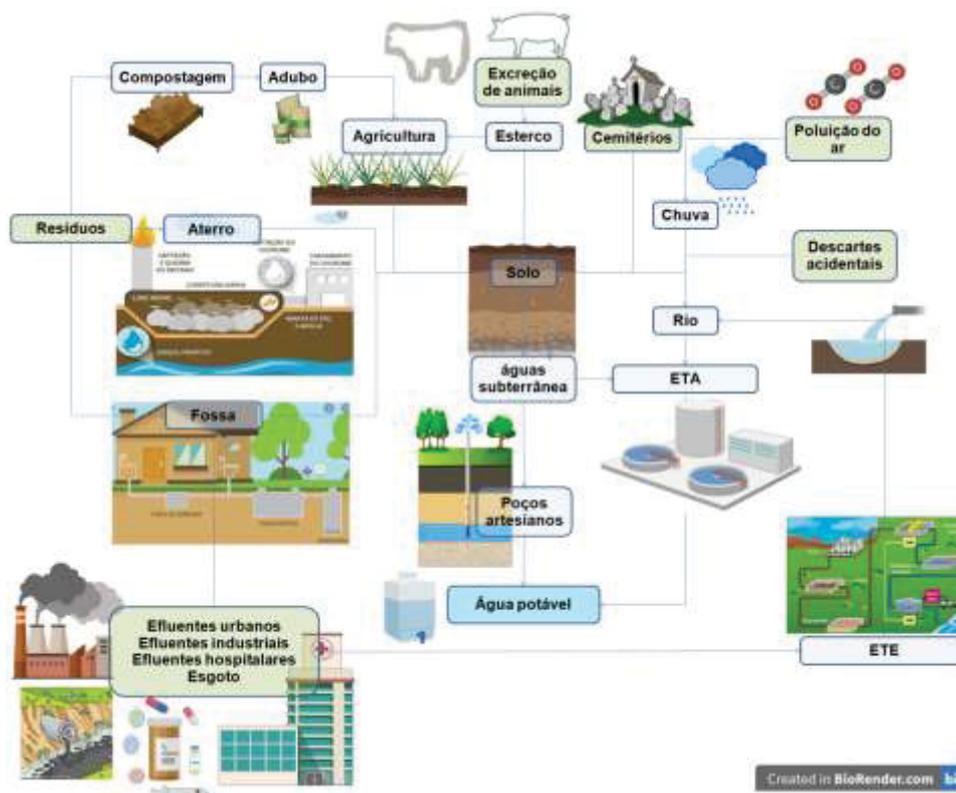
contemplados, correspondendo a apenas 7% dos pesticidas autorizados para uso no país (BRASIL, 2001; 2005; 2011; MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017)

### 2.1.3 Fontes, rotas e degradação no ambiente

Os contaminantes emergentes possuem diversas fontes, podendo ser introduzidos no ambiente de diferentes formas (rotas) (FIGURA 1):

- por meio dos resíduos sólidos urbanos, hospitalares e industriais destinados a aterros;
- por meio da precipitação da água da chuva que carrega contaminantes suspensos no ar;
- via resíduos agrícolas diretamente em contato com o solo;
- por meio de descartes acidentais sem tratamento;
- por meio de efluentes urbanos e industriais mesmo após tratamento.
- contaminação direta da excreção humana e animal que chega ao solo e água, sem passar por aterro ou tratamento (ex. fossa);
- ou ainda por contaminação direta de solos de cemitérios.

FIGURA 1– MACRO VISÃO DA ROTA DOS CONTAMINANTES EMERGENTES



FONTE: O autor (2020)

Características como topografia, clima e manejo do solo de cada região possibilitam contaminações específicas em maior ou menor grau, onde seu impacto no ambiente está diretamente relacionado com seu uso e disposição (BILAL et al., 2019).

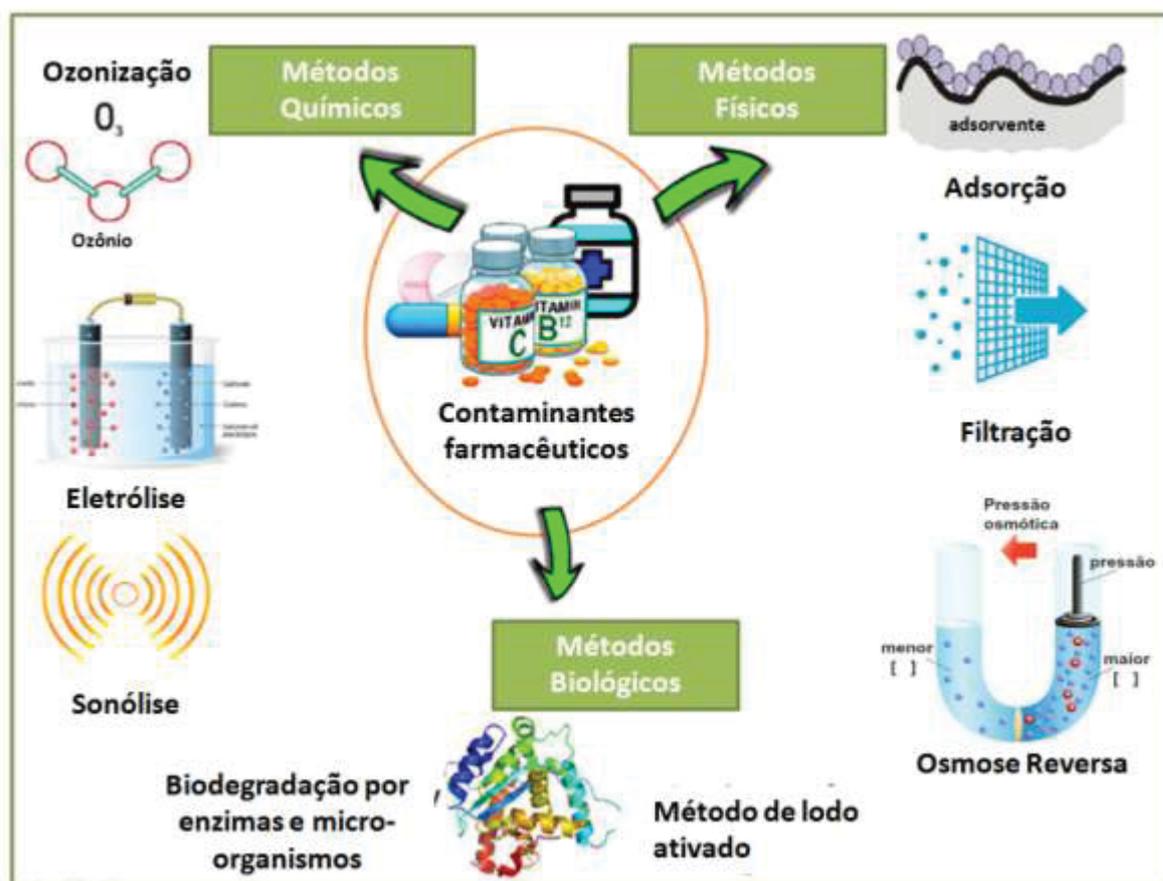
As plantas de tratamento convencionais de resíduos industriais, de esgoto e de água não são preparadas para atuar diretamente sobre os contaminantes emergentes (SUTHERLAND e RALPH, 2019). Desta forma, a permanência destes na água potável e no efluente, mesmo que em concentrações menores, permite a continuidade do ciclo de contaminação contribuindo assim para a bioacumulação. Essa característica dos contaminantes emergentes pode ser entendida, segundo Brusseau e colaboradores (2007), de acordo com suas propriedades físico-químicas. Entre elas, fatores como a solubilidade, temperatura de fusão, estrutura química, reatividade para formação de complexos com compostos inorgânicos, volatilidade e potencial de sorção afetam diretamente o destino e transporte destes compostos. Essa presença por longos períodos está relacionada à sua baixa volatilidade (constante de Henry  $<10^5$ ) e também a suas propriedades químicas vinculadas a outros fatores (WILLIAMS e COOK, 2007). Em sua maioria, possuem a capacidade de formar complexos estáveis com cátions metálicos e particulados, como é o caso dos antibióticos quinolona e tetraciclina (YI et al., 2018).

Segundo Drewes (2007), há diversos elementos que levam a degradação dos fármacos se diferenciarem da degradação de outros compostos orgânicos. Geralmente são polares com vários grupos ionizáveis e níveis de ionização gerando comportamento diferenciado dependendo do pH do meio. Apresentam tendência à formação de complexos moleculares permitindo maior estabilidade em condições diversas. Possuem capacidade de entrar e se manter nas membranas celulares com facilidade, pois são lipofílicos e alguns deles são solúveis moderadamente em meio aquoso. Uma vez administrado no corpo humano/animal, suas moléculas são distribuídas e sua estrutura pode mudar durante as reações metabólicas. Adicionalmente, Kumar e colaboradores (2019) afirmam que, em sua maioria, os medicamentos possuem longas ou aromáticas cadeias alifáticas, as quais são mais dificilmente degradadas.

Desta forma, apesar da existência de diversos métodos de degradação de compostos farmacêuticos (FIGURA 2), tem se buscado opções de tratamentos para

alcançar a degradação completa desses compostos, onde os Processos Oxidativos Avançados (POA) têm obtido destaque.

FIGURA 2 – TECNOLOGIA APLICADA A DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS FARMACÊUTICOS



FONTE: adaptado de Kumar e colaboradores (2019).

#### 2.1.4 Efeitos ecotoxicológicos

Mesmo com diversos estudos demonstrando a ocorrência de compostos emergentes no ambiente, ainda existe uma grande lacuna de dados para geração de conhecimento sobre seus efeitos e riscos potenciais (BAI et al., 2018). Entre os diversos tipos de contaminantes existentes, os mais estudados são relacionados aos medicamentos, visto que, apesar de apresentarem-se em pequenas quantidades podendo ser ou não efetivamente nocivas ao ambiente e saúde humana de imediato, sua exposição a longo prazo a baixas doses podem levar a efeitos tóxicos crônicos (BILAL et al., 2019; GÓMEZ-CANELA et al., 2019; KUMAR et al., 2019).

Entre os estudos toxicológicos encontrados na literatura, observa-se que as espécies associadas ao meio aquático são as mais impactadas diretamente, como peixes (VAN DEN BRANDHOF e MONTFORTS, 2010), anfíbios (LI et al., 2009) moluscos (MUNARI et al., 2019; CANESI et al., 2007), algas (YANG et al., 2008), crustáceos (HAAP; TRIEBSKORN; KOHLER, 2008) e cnidários (QUINN; GAGNÉ; BLAISE, 2008). No entanto, o ser humano pode consumir água contaminada com pequenas quantidades de resíduos, e, devido ao longo de tempo de exposição pode acarretar sérios riscos também (LEITE; AFONSO; AQUINO, 2010). Assim, a toxicidade varia conforme o organismo exposto, período de exposição, concentração do contaminante e janela de desenvolvimento em que ocorre (EBELE; ABDALLAH; HARRAD, 2017; HAVELKOVA et al., 2016).

Nunes e colaboradores (2015) reportaram alteração histológica das brânquias dos peixes e atividades pró-oxidativas utilizando tetraciclina. Enquanto Ghelfi (2014), detectou problemas hematológicos e renais após 96 h de exposição do peixe jundiá (*Rhamdia quelen*) ao diclofenaco. Já em duas espécies de bivalves marinhos, Munari e colaboradores (2019) submetendo a dosagens de diclofenaco por 21 dias, identificaram acidificação do meio e alterações nas células hemócitas, responsáveis pela imunidade e formação das conchas. Estudos com *Daphnia magna* demonstraram altas taxas de mortalidade utilizando concentrações de diclofenaco de 22,4 mg L<sup>-1</sup> e 39,9 mg L<sup>-1</sup> (HAAP; TRIEBSKOM; KOHLER, 2008), e Diltiazem a 8,2 mg L<sup>-1</sup> (KIM et al., 2007).

Vannini e colaboradores (2011) identificaram alteração nos cloroplastos de algas, interferindo inclusive na fotossíntese, na presença de ibuprofeno em concentrações de 92 e 920 ng L<sup>-1</sup> e Carbamazepina: 150 mg L<sup>-1</sup>. Havelkova e colaboradores (2016) reportaram inibição do crescimento 72h EC50 = 1,82 mg L<sup>-1</sup> de algas verdes (*Pseudokirchneriella subcapitata*), e a inibição da luminescência de bacilos (*Vibrio fischeri*) EC50 30 '= 6,70 mg L<sup>-1</sup>) sob efeito da tetraciclina 100 mg L<sup>-1</sup>.

Mas além disso, bactérias e fungos podem se tornar resistentes a antibióticos devido a sua exposição crônica a estes agentes, e, desta forma, mesmo indiretamente, os humanos podem ser afetados (PEREIRA-MAIA et al., 2010; BISOGNIN, WOLFF, CARISSIMI, 2018; FELIS et al., 2020). Segundo Gonzalez-Martinez e colaboradores (2014) até a eficiência de tratamento de efluentes pode ser afetada pela presença de ciprofloxacina em águas profundas pois reduz

parcialmente o processo de nitrificação proveniente da atividade microbiana destes ambientes.

Vários efeitos já foram relacionados aos CE (QUADRO 1), mas dentre eles, existe um grupo denominado desreguladores endócrinos (DEs) que afetam a produção de hormônios levando a problemas de saúde pela falta ou excesso no organismo. Essas alterações podem afetar o sistema reprodutivo feminino e masculino, promover doenças cardiovasculares, desordens neurológicas e de Parkinson, entre outras alterações metabólicas (BERGMAN et al., 2013; KABIR; RAHMAN; RAHMAN, 2015).

QUADRO 1 - CONTAMINANTES EMERGENTES E SEUS EFEITOS ASSOCIADOS

Contaminante	Risco	Referência
Bisfenol A	Câncer de próstata, doenças alérgicas, efeitos metabólicos e no fígado de homens, aumenta taxa de puberdade precoce em meninas e infertilidade em homens.	Daâssi e colaboradores (2016); Khalil e colaboradores (2014); Tse e colaboradores (2017); Wang, Chen e Bornehag (2016).
Parabenos	Câncer de mama e disfunções do sistema imune	Barr e colaboradores (2012); Dhaka e colaboradores (2017); Pollock, Weaver, Ghasemi (2017).
Triclosan	Alterações de tireoide, e respostas estrogênicas e androgênicas associadas às células de câncer de mama; Atividade androgênica em espécies aquáticas.	Foran, Bennett, Benson (2000); Gee e colaboradores, (2008); Jahangiri e colaboradores (2017); Lee e colaboradores (2012); Schnitzler e colaboradores (2016).
Ibuprofeno	Alterações no sistema reprodutivo feminino e masculino.	Marco-Urrea e colaboradores (2009); Sifakis e colaboradores (2017).
Mistura de	Inibição do crescimento de	Pomati e colaboradores

atenolol, bezafibrato, carbamazepina, ciclofosfamida, ciprofloxacina, ibuprofeno, lincomicina, ofloxacina, ranitidina, salbutamol e sulfametoxazol	células dos rins de embriões humanos (30% de diminuição na proliferação comparado aos controles)	(2006)
--	--	--------

FONTE: O Autor (2020).

### 2.1.5 Ocorrência de CE no ambiente

Alguns autores constataram que a concentração dos fármacos pode variar de acordo com a estação do ano. Segundo Bhandari, Nyachoti, Krause (2008) a ciprofloxacina é encontrada em maiores concentrações no verão do que no inverno. Já Locatelli, Sodré, Jardim (2011) identificaram maior percentual de antibióticos no inverno (88%) do que no verão (55%) nas águas do Rio Atibaia no Brasil. Segundo os mesmos autores essa diferença pode ser justificada pelo efeito da diluição dos contaminantes gerado pela precipitação da água da chuva, visto que nessa região há seca no inverno e período chuvoso no verão.

Desta forma, no Brasil já foram detectados diversos fármacos no meio aquoso (águas superficiais e ETE) com diferentes concentrações que estão na ordem de  $\text{ng L}^{-1}$  e  $\text{ug L}^{-1}$ . A ocorrência de fármacos em diferentes regiões do país entre os anos de 1999 a 2019 está apresentada na FIGURA 3. Ao total foram relatados 36 estudos em apenas 19 nos últimos 2 anos (SILVA, 2019), ressaltando a preocupação com o tema.

FIGURA 3 - ESTUDOS SOBRE A OCORRÊNCIA DE RESÍDUOS DE FÁRMACOS EM ÁGUAS NO BRASIL



FONTE: Silva (2019).

No Paraná, a região de Curitiba é mencionada em mais de um estudo, os quais relatam a presença de diferentes fármacos como diclofenaco em ETEs e no Rio Belém, a carbamazepina e diazepam nas concentrações de 0,670 a 0,856  $\mu\text{g L}^{-1}$  (COLAÇO et al., 2015; BARCELLOS, BOLLMANN, AZEVEDO, 2019; BOGER et al., 2015).

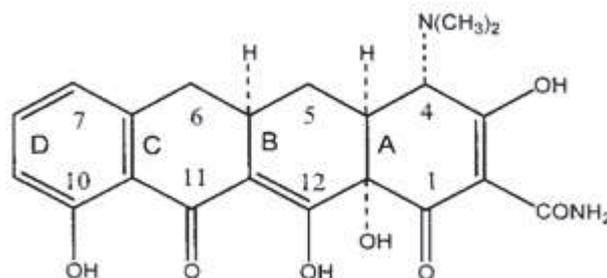
## 2.2 COMPOSTO-ALVO: TETRACICLINA

A tetraciclina faz parte de um grupo de antibióticos com propriedade antimicrobiana, utilizado pela medicina humana e veterinária para tratamento de doenças relacionadas a bactérias tanto gram-positivas quanto gram-negativas, protozoários e fungos. São administradas geralmente de forma oral, e pontualmente de forma parental para tratamento de infecções respiratórias causadas por *Mycoplasma pneumoniae*, brucelose, malária, cólera, leptospirose, conjuntivite e tracoma causado por *Chlamydia psittaci*, febre maculosa, febre tifoide, e até sífilis (CHOPRA e ROBERTS, 2001).

As tetraciclinas recebem esta denominação devido a sua estrutura química ser formada por quatro anéis (FIGURA 4), sendo que a manutenção da sua

atividade farmacológica pode ser justificada pela estrutura mínima 6-desoxi-6-desmetiltetraciclina (CHOPRA e ROBERTS, 2001).

FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DA TETRACICLINA



FONTE: Chopra e Roberts (2001).

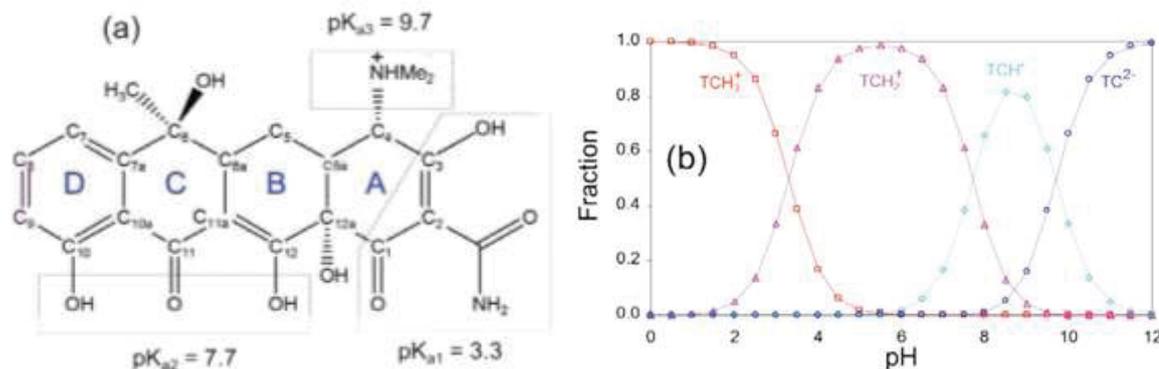
As primeiras tetraciclina descobertas foram as naturais. A clortetraciclina (aureomicina) em 1948, obtida a partir da fermentação natural do fungo *Streptomyces aureofaciens* (DUGGAR, 1948), e a oxitetraciclina (terramicina) em 1950 proveniente do *Streptomyces rimosus*, actinomicetos naturalmente presentes no solo (FINLAY et al., 1950).

Nas décadas seguintes de 50 a 70, diversos membros da família das tetraciclina foram desenvolvidos naturalmente e de forma semi-sintética. E em 1993 houve um marco importante na história das tetraciclina quando foram sintetizadas as glicilciclina demonstrando ação contra bactérias que estavam apresentando resistência às tetraciclina e demais classes de antibióticos já existentes. No entanto somente em 2005 o composto tigeciclina foi aprovado para uso clínico pela FDA que consistia em um derivado da minociclina contendo um grupo glicilamido na posição C9. Chopra e Roberts (2001) classificam as tetraciclina de acordo com o ano de descoberta em: tetraciclina de primeira geração (1948 a 1963), tetraciclina de segunda geração (1965 a 1972), e de terceira geração (após 1972, as glicilciclina).

Em relação à característica de dissociação iônica, cada molécula de tetraciclina possui três grupos ionizáveis diferenciados pelos valores de pKa (FIGURA 5a). O pKa1 é devido à protonação do oxigênio ligado na posição C3, o pKa2 protonação do oxigênio ligado em C10 e C12, enquanto o pKa3 da protonação do grupo funcional dimetilamina. Em pH < 3,3, apresenta-se na forma catiônica, enquanto que sob pH 5,5 fica quase eletricamente neutra. À medida que o pH aumenta, a proporção da carga negativa na molécula de tetraciclina aumenta, ficando como zwitterion entre 3,3 e 7,7. Assim, quando o pH atinge 7,0, 25% da

molécula está na forma aniônica, e em  $\text{pH} > 7,7$ , apresentam-se como ânions (ânion monovalente,  $+ -$ , e ânion divalente,  $0 - -$ ) (FIGURA 5b) (STEPHENS et al., 1956).

FIGURA 5 - A) ESTRUTURA DA TETRACICLINA COM INDICAÇÃO DO LOCAL DA PROTONAÇÃO. B) DISTRIBUIÇÃO DO PERCENTUAL DAS MOLÉCULAS EM DIFERENTES pH.



FONTE: Stephens et al. (1956).

O caráter lipofílico e hidrofílico das moléculas de tetraciclina é que geram o grau de atividade sobre os organismos. No geral as mais lipofílicas (hidrofóbicas) são mais ativas que as hidrofílicas, pois pela natureza lipoproteica das membranas celulares, possuem maior capacidade de transpô-las por difusão passiva e transporte ativo. As glicilciclinas, minociclina e doxiciclina são as mais ativas por apresentar caráter lipofílico. Quando disponíveis em forma de cloridratos solúveis, as tetraciclina formam soluções ácidas e estáveis. Quando livres são anfóteras, cristalinas de baixa solubilidade (TAVARES, 1986).

No entanto, já são conhecidos diversos mecanismos de resistência a ação das tetraciclina como o efluxo, a proteção ribossomial, o mecanismo enzimático e o ligado ao gene tet(U) ainda com pouca incidência (CHANG et al., 2015). Isso, tem gerado limitação de uso no tratamento de algumas infecções em humanos, e constante necessidade de estudo de novos compostos (CHOPRA e ROBERTS, 2001; PEREIRA-MAIA et al., 2010).

Assim, embora as tetraciclina sejam conhecidas como antibióticos, elas possuem outras propriedades farmacológicas no tratamento de doenças não infecciosas como a artrite reumatoide, câncer, acne, rosácea e outras doenças dermatológicas. Segundo Sagar e colaboradores (2009) a utilização de tetraciclina (análogo doxiciclina) na quimioterapia permite a redução da dose do agente principal pela sua ação sinérgica. Desta forma, tem aumentado o interesse por moléculas análogas com foco terapêutico prevenindo angiogênese e metástases, como as

CMTs (*Chemically Modified Tetracyclines*) que não possuem o grupo dimetilamino da posição C4, o qual elimina a ação antibacteriana, e potencializa efeitos secundários (ACHARYA et al., 2004).

Em relação à absorção das tetraciclinas no organismo esta varia de acordo com o tipo. A doxiciclina e minociclina são bem absorvidas quase em sua totalidade, enquanto que a clortetraciclina, oxitetraciclina e tetraciclina caracterizam-se por má absorção, variando de 60-80%, principalmente após ingestão de alimentos, sendo o restante eliminado pelas fezes e urina. Além disso, a absorção pode ser prejudicada pela quelação com cátions divalentes (KATZUNG, 1998).

Os baixos valores de absorção e metabolização das tetraciclinas tanto de humanos quanto animais, somados ao descarte indevido de itens vencidos, resíduos em frascos e equipamentos, e resíduos industriais, ocasionam a presença destas no ambiente, principalmente na água (CHANG et al., 2015). Isso pode ser observado no QUADRO 2, onde está disposto os níveis de tetraciclina encontrados em águas superficiais em diferentes países.

QUADRO 2 - CONCENTRAÇÃO DE TETRACICLINA PRESENTE EM ÁGUAS SUPERFICIAIS EM DIFERENTES PAÍSES

Localização	Concentração de tetraciclina ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Referência
Alemanha	1,2 a 4,2	Mulroy (2001)
Austrália, Rio Australiano	0,8	Watkinson e colaboradores (2009)
Brasil, Rio Atibaia	0,11	Locatelli, Sodr�, Jardim (2011)
China, Rio Hai	255	Chen e colaboradores (2018)
China, Rio Huangpu	0,543	Chen e Zhou (2014)
China, Rio Wangyang	255,38	Jiang e colaboradores (2014)
China, Rio Nanming	68	Liu e colaboradores (2009)
Cuba, Rio Almendares	1,557	Mocktar e colaboradores (2009)
Espanha, rio	<0,23	Valc�rcel e colaboradores (2011)
EUA	0,11	Kolpin e colaboradores (2002)
EUA, Rio Poudre	1027	Zeba (2005)
França	0,074	Dinh e colaboradores (2011)
Gana, Rio	0,11 a 0,30	Azanu e colaboradores (2018)
Hong Kong, rio	0,315	Deng, Li, Ying (2018)
Luxemburgo, Rio Alzette	0,01 a 0,08	Pailer e colaboradores (2009)
Polonia, Rio Drweca	0,16 a 34	Harnisz, Korzeniewska, Go�a� (2015)

FONTE: O autor (2020).

Estudos realizados em micro-organismos aquáticos demonstraram que a tetraciclina é mais tóxica para procariontes como as cianobactérias do que para eucariontes como as microalgas. E que a toxicidade para as microalgas é refletida pela inibição da síntese proteica e geração de cloroplastos inibindo seu crescimento (BACKHAUS e GRIMME, 1999; HALLING-SØRENSEN et al., 2000; LÜTZHØFT; HALLING-SØRENSEN; JØRGENSEN, 1999). Em plantas terrestres os cloroplastos também foram afetados pela tetraciclina dependendo da dose no alongamento peptídico (BRADEL; PREIL; JESKE, 2000; KASAI et al., 2004).

Já em relação aos animais aquáticos a literatura tem demonstrado dados mais impactantes, visto que as tetraciclinas são capazes de suprimir a atividade enzimática, níveis de anticorpos, reduzir linfócitos (LUNDEN et al., 1998), e afetar a reprodução de crustáceos (*Daphnia magna*, com 44,8 mg L<sup>-1</sup>) (WOLLENBERGER; HALLING-SØRENSEN; KUSK, 2000).

Considerando essas informações e a partir da observação da tendência de aumento do consumo das tetraciclinas no mundo se faz necessário buscar soluções para atenuar sua presença no ambiente. E, como os tratamentos de efluentes e de água atuais não são totalmente eficazes para degradação deste tipo de contaminante, é extremamente relevante e atual que outros processos sejam estudados, como os processos oxidativos avançados, no intuito de minimizar essa contaminação.

### 2.3 PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS (POAs)

Os POAs são empregados para eliminar contaminantes, podendo ser utilizados principalmente em estações de tratamento de água e esgoto. O processo parte do princípio de que a geração do radical hidroxila (HO<sup>•</sup>) promove a degradação e mineralização parcial ou completa de poluentes, transformando-se em espécies mais simples, tendem a reduzir sua toxicidade e possibilitam a degradação posterior por tecnologias comuns (BAZEI, 2019; BAUTITZ, 2006; GAMA, 2012; PIGNATELLO; OLIVEROS; MACKAY, 2006).

A geração dos radicais hidroxila pode ser feita através da aplicação de oxidantes fortes como o ozônio (O<sub>3</sub>) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (QUADRO 3), como também utilizando semicondutores, como dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) e óxido de zinco (ZnO) e irradiação ultravioleta (UV) (MANSILLA et al., 1997).

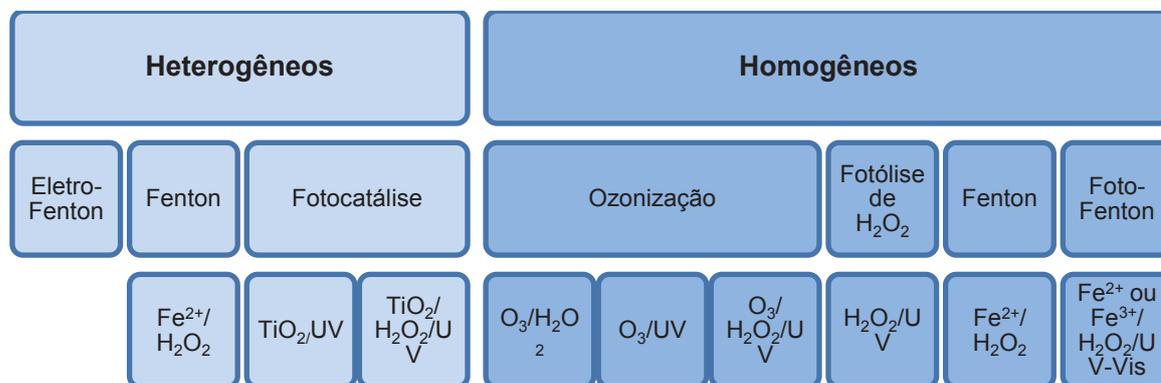
QUADRO 3 - POTENCIAIS PADRÕES DE REDUÇÃO DE ALGUMAS ESPÉCIES *VERSUS* ELETRODO NORMAL DE HIDROGÊNIO (ENH).

Reagente oxidante	Potencial redox (V) / E°(ENH)
Flúor	3,06
Radical hidroxila (HO•)	2,8
Oxigênio atômico	2,42
Ozônio	2,07
Peróxido de hidrogênio	1,78
Permanganato	1,68
Dióxido de cloro	1,57
Ácido hipocloroso	1,49
Cloro	1,36
Bromo	1,09
Iodo	0,54

FONTE: Legrini; Oliveros; Braun, 1993.

Quando o sistema conta com a utilização de catalisadores sólidos como semicondutores para possibilitar equilíbrio químico sem alteração química no meio, podem ser classificados como heterogêneos, enquanto que os demais são denominados homogêneos (QUADRO 4).

QUADRO 4 - PRINCIPAIS PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS



FONTE: O autor (2020).

Segundo Rodriguez-Narvaez e colaboradores (2017), embora todos os tipos de POAs possuem o mesmo princípio (produção de radicais hidroxila), nenhum processo ou tratamento é eficaz em degradar todos os contaminantes existentes. Isso ocorre devido a características particulares dos contaminantes, dos processos e seus meios de atuação que são distintos. Já em relação à eficiência de degradação, os POAs apresentam fatores técnicos e econômicos limitantes como o

dimensionamento no momento da aplicação em estações de tratamento e a definição da fonte de energia a ser utilizada. Desta forma, vários pesquisadores vêm buscando a união de diferentes processos para alcançar um aumento da remoção dos contaminantes.

Trabalhos recentes demonstram um interesse em processos mais sustentáveis, com o intuito de minimizar a utilização de recursos químicos ou tóxicos, a fim de reduzir a produção de resíduos e custo energético. Nesse contexto, encontram-se a aplicação de microrganismos, extratos vegetais, enzimas, nanopartículas e/ou membranas (RODRIGUEZ-NARVAEZ et al., 2017; SHAKERIAN; ZHAO; LI, 2020).

### 2.3.1 Fenton

A reação de Fenton é um dos POAs vinculado à degradação de compostos orgânicos. Ocorre quando, em meio ácido, íons ferro decompõe o peróxido de hidrogênio gerando radical livre hidroxila  $\text{HO}^\bullet$  (Equação 1), o qual é responsável por atuar sobre os compostos degradando-os (FENTON, 1984; HABER e WEISS, 1934).



Dentre as vantagens do método estão a simplicidade de operação em condições normais de pressão e temperatura, disponibilidade e atoxicidade dos reagentes utilizados, custo operacional baixo e maior velocidade do processo quando comparado a outros POAs. Além disso, tem se mostrado eficiente sobre diversas classes de compostos, incluindo aqueles de longas cadeias e as moléculas aromáticas, que possuem maior dificuldade de degradação, como os fármacos (KUMAR et al., 2019).

No entanto, a reação homogênea tradicional de Fenton apresenta algumas limitações em relação ao pH. Para evitar que, durante o processo, ocorra a precipitação de íons  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{pH} > 3$ ) ou que os radicais hidroxilas sejam sequestrados pela alta concentração de  $\text{H}^+$  ( $\text{pH} < 2,5$ ), indica-se trabalhar com o pH entre 2,5 e 3. Esta condição gera a necessidade posterior de neutralização do meio para precipitação do ferro e descarte do efluente (PIGNATELLO, 1992).

Além das condições do meio, a performance da reação também é altamente dependente da razão entre as concentrações do  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  e do composto-alvo. No geral, quanto maior a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , maior será a formação de radicais  $\text{HO}^\bullet$ , quando em condições operacionais e de concentrações adequados de  $\text{Fe}^{2+}$ . Contudo, a alta concentração do peróxido leva à formação de radicais menos ativos como o  $\text{HO}_2^\bullet$ , afetando a eficiência da reação. Assim, deve se buscar estudar ao máximo a proporção entre os reagentes das reações, visando a formação de radicais e sua disponibilização ao meio reacional de forma equilibrada. Dessa maneira, evita-se alterações súbitas de concentração de reagentes que podem ocasionar efeitos de eliminação, não promovendo a ação planejada sobre o contaminante (RAIZADA et al., 2014).

Além disso, assim como diversas outras reações químicas, a reação de Fenton também pode ser catalisada, a fim de acelerar o processo, bem como permitir redução de reagentes, maior flexibilidade de condições operacionais e eficiência de remoção dos contaminantes. Foto-Fenton, Eletro-Fenton, Sono-Fenton, Foto-eletro-Fenton e Bio-Fenton são algumas opções de melhorias já estudadas que serão abordadas em seguida.

### 2.3.2 Foto-Fenton

A reação de Fenton é catalisada por radiação UV-Vis de fonte artificial ou natural (solar). Neste processo ocorre a redução dos cátions  $\text{Fe}^{3+}$  a íons  $\text{Fe}^{2+}$ , que posteriormente reagem com o peróxido adicionado na presença da radiação UV-Vis para gerar radicais hidroxila (Equação 2) (GOGATE e PANDIT, 2004).



Quando comparada à reação de Fenton tradicional, o processo de Foto-Fenton apresenta diversas vantagens. Entre elas, está o menor custo com o reagente  $\text{Fe}^{2+}$ , devido a sua fotoregeneração a partir do  $\text{Fe}^{3+}$ , bem como a facilitação dos processos finais, uma vez que é promovida fotólise de complexos orgânicos de Fe (III) gerados durante a decomposição (HERNEY-RAMÍREZ e MADEIRA, 2010; PIGNATELLO, 1992). Ebrahiem, Al-Maghrabi, Mobarki (2013) pontuam que o Foto-Fenton acelera o processo de degradação dos compostos alvo, consequência do

aumento das hidroxilas, gerada pela maior decomposição do peróxido. Contudo, como é dependente da penetração da luz no meio, a reação pode ser afetada pela turbidez e excesso do catalisador do meio (IURASCU et al., 2009).

Segundo Zuo e Hoigne (1992) a utilização de complexos de ferro, como por exemplo, ferrioxalato de potássio, no processo foto-Fenton contribui para o aumento da eficiência da absorção da luz. Isso porque estendem a banda de absorção para a região do visível, além de permitir que as reações de Fenton aconteçam numa faixa de pH mais ampla.

### 2.3.3 Eletro-Fenton

É a reação de Fenton na qual é fornecida energia elétrica ao meio, e, utilizando eletrodos (um ânodo e um cátodo), o peróxido é gerado *in situ*. Diferente da reação anterior, primeiramente, o peróxido é eletrogerado pela redução do oxigênio dissolvido na superfície do cátodo quando fornecida energia elétrica (Equação 3). Posteriormente os íons  $\text{Fe}^{2+}$  são gerados pela redução do  $\text{Fe}^{3+}$  (Equação 4), e os radicais hidroxila são produzidos a partir da regeneração do  $\text{Fe}^{3+}$  (Equação 2) (KUMAR et al., 2019). Desta forma a geração de peróxido é altamente dependente do material do cátodo, que deve ser apropriado com alto potencial de hidrogênio, visto que o processo é favorável em meio ácido (OTURAN e OTURAN, 2018).



Nesse processo, não é necessária a adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ao meio, pois ele é gerado pelo sistema, o que traz benefícios em relação aos custos, espaço de armazenamento e riscos vinculados à estabilidade deste reagente, que tem natureza explosiva e corrosiva (XIAO et al., 2018). Além disso, o tratamento de seus resíduos é facilitado pois há menor formação de lodo de ferro e outros complexos secundários. Devido a isso, este sistema já é implementado em diversas plantas de tratamento de resíduos e funciona para degradação de produtos farmacêuticos, de higiene pessoal e outros compostos orgânicos (KUMAR et al., 2019).

Da mesma forma que a geração do peróxido é favorável ao sistema, a síntese não é controlada podendo gerar excesso ou falta deste ao processo. Isso pode ocasionar uma alteração no equilíbrio químico da reação e não gerar a degradação pretendida. Outra questão está relacionada aos custos operacionais, os quais são afetados porque o sistema utiliza energia elétrica e, periodicamente, os eletrodos precisam ser trocados, devido à corrosão gradual ao longo do tempo de uso (KUMAR et al., 2019).

Uma linha de pesquisa atual, chamada nano-eletro-Fenton, já estuda a criação de cátodos e ânodos com materiais mais efetivos, como de baixa corrosão, estabilidade em meio ácido, material inerte e com alto potencial para adsorção de oxigênio. Nanotubos de carbono e grafite (KHATAEE, et al., 2011), nanotubos de politetrafluoretileno (SIRÉS et al., 2007) e fibras de carbono ativado (YU, WANG, MA, 2019) são alguns exemplos de cátodos estudados. Já em relação a ânodos tem-se os eletrodos de boro dopado com diamante (BDD) (PANIZZA e CERISOLA, 2012) e de óxido de titânio (NIDHEESH e GANDHIMATHI, 2012). No entanto, ainda precisam ser otimizados para redução dos altos custos para implantação nos sistemas de tratamento.

#### 2.3.4 Foto-Eletro-Fenton

É uma melhoria do processo de Eletro-Fenton, em que se utiliza luz ultravioleta, visível ou solar para foto oxidação dos compostos de  $\text{Fe}^{3+}$  formados na reação de Fenton. Quando comparada com o Eletro-Fenton tradicional este processo gera maior degradação de compostos justificada pela alta regeneração do  $\text{Fe}^{2+}$ . Isso é possível, pois estando o  $\text{Fe}^{3+}$  em meio aquoso este se reduz, (Equação 5), e em contato com a luz, o  $\text{Fe}^{2+}$  é regenerado a partir da geração de radicais hidroxila (Equação 6) juntamente da foto-redução de  $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$  e  $\text{Fe}(\text{OOCR})^{2+}$  (Equação 7) (KUMAR et al., 2019).



### 2.3.5 Sono-Fenton

É o processo de Fenton combinado com a utilização de radiação ultrassom a qual promove a formação de radicais hidroxila a partir da água (Equação 8), sem a necessidade de utilização de peróxido de hidrogênio, bem como a sono-regeneração do  $\text{Fe}^{2+}$  (Equação 9) (KUMAR et al., 2019). Como principais vantagens frente ao processo tradicional, pode se citar a aceleração da conversão/mineralização do composto a ser degradado pela alta geração de radicais hidroxila, o aumento do contato entre a hidroxila e o composto-alvo, e a alta regeneração dos íons  $\text{Fe}^{2+}$  (Al et al., 2007).



### 2.3.6 Bio-Fenton

Este processo de Fenton é catalisado enzimaticamente para produção de peróxido de hidrogênio *in situ*, na presença de uma fonte de íons de ferro e do substrato da enzima.

Tem ganhado destaque por se tratar de um método com impactos ambientais reduzidos e de alta eficiência. Possui baixo consumo de energia, pois permite trabalhar em condições mais brandas de pH, reduzindo a formação de lodo e a necessidade de tratamento posterior (ALI et al., 2014; ROMO-RODRÍGUEZ et al., 2015). Por não necessitar de alimentação do sistema com o principal reagente o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , contribui tanto para os benefícios financeiros quanto àqueles relacionados aos riscos no transporte, manuseio e armazenagem associados ao peróxido (OSEGUEDA et al., 2012; XIAO et al., 2018). A indisponibilidade de substrato no meio para a reação, não pode ser considerada uma limitação ao processo, dado que eles são de baixo custo e facilmente encontrados.

No geral, este processo biotecnológico ainda é pouco estudado para muitos contaminantes quando comparado aos citados anteriormente. E, dentre os desafios, estão a otimização para reutilização das enzimas ao final do processo, aumentar a estabilidade das enzimas no meio e testar os processos em amostras reais de tratamento de efluentes para avaliar as interferências (BILAL et al., 2019).

As enzimas que possuem a característica de gerar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a partir do O<sub>2</sub> por oxidação do substrato de forma significativa são as oxidoreduases como: glicolato celobiose desidrogenase, NADPH oxidase, xantina oxidase, metanol oxidase e a glucose oxidase (GOx) (HUANG et al., 2020).

Considerando a ampla comercialização, disponibilidade de substrato e facilidade de aplicação, definiu-se para este trabalho a utilização da enzima glucose oxidase. Suas características e propriedades serão abordadas no próximo item.

#### 2.4 GLUCOSE OXIDASE (GO<sub>x</sub>) (B-D-GLUCOSE:OXYGEN 1-OXIDOREDUTASE)

A glucose oxidase (EC 1.1.3.4) é uma enzima da classe das oxireduases presente naturalmente em frutas, insetos, algas e fungos (AFSHAR et al., 2010; BEAN e HASSID, 1956; BEAN; PORTER; STEINBERG, 1961). É obtida industrialmente através de processos de fermentação dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Saccharomyces* (MANO, 2019). Dentre elas, as mais comercializadas são provenientes do *Aspergillus niger*, onde a enzima é purificada do micélio e considerada um coproduto da produção de ácido glucônico e seus sais (gluconato de sódio e de cálcio) (BANKAR et al., 2009).

Foi descoberta em 1928 (MÜLLER, 1928) a partir do *A. niger* e *P. glaucun*, identificando sua capacidade de oxidar a glicose a ácido glucônico na presença de oxigênio molecular. Porém somente 10 anos depois, Franke e Deffner (1939) demonstraram que o peróxido de hidrogênio era formado pela redução do oxigênio. Atualmente o mecanismo de atuação da glucose oxidase está bem definido, ocorrendo em duas etapas sequenciais, esquematizada na FIGURA 6. Primeiramente a β-D-glicose é oxidada a D-glucona-δ-lactona a qual espontaneamente se hidrolisa em ácido glucônico, gerando como coproduto o peróxido de hidrogênio (MANO, 2019; WOHLFAHRT et al., 2004). A estequiometria da reação pode ser observada na Equação 10 a qual demonstra a proporção molar necessária em relação ao substrato:oxigênio:peróxido (1:1:1).

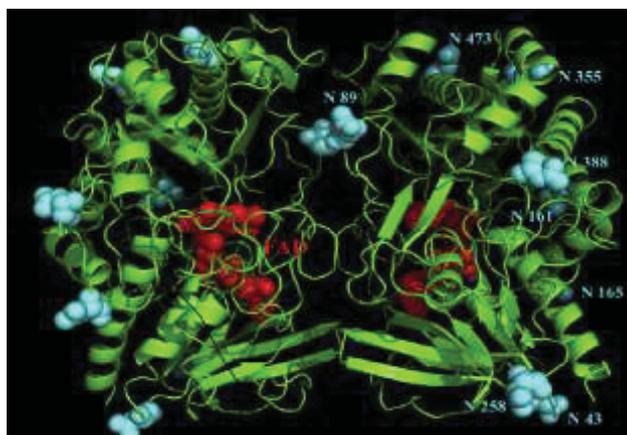


FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DAS REAÇÕES DE OXI-REDUÇÃO DA GLUCOSE OXIDASE



FONTE: Adaptado de Simpson e colaboradores (2007).

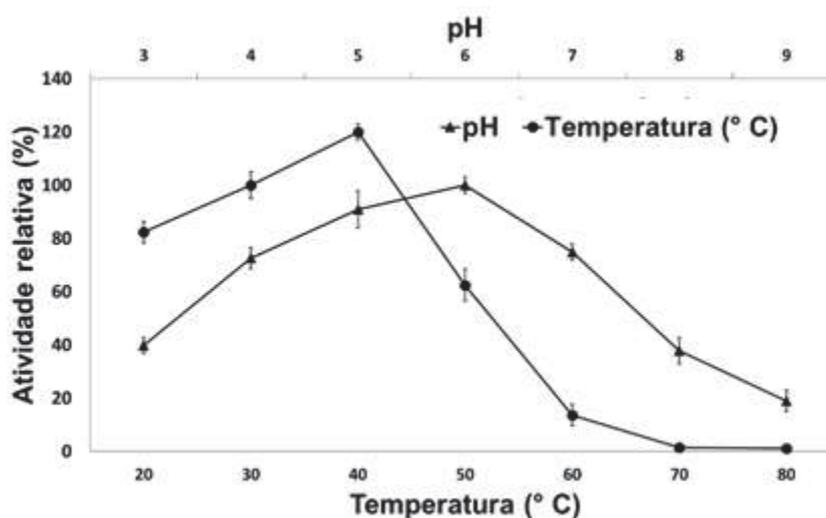
Em relação a sua estrutura, trata-se de uma glicoproteína dimérica, que consiste em duas subunidades de cadeias polipeptídicas ligadas covalentemente via pontes de dissulfeto (RANDO; KOHRING; GIFFHORN, 1997; KALISZ; HENDLE; SCHMID, 1997). Por ser uma holoenzima, possui uma parte prostética em cada monômero, o cofator FAD/FADH<sub>2</sub>, o qual se liga a superfície da enzima conforme indicado em vermelho na FIGURA 7. Seu peso molecular varia dependendo da fonte, método de obtenção e da extensão da glicosilação. Gox provenientes de espécies como *A.niger* e *P. amagasakiense* apresentaram peso molecular entre 130 e 180 kDa (KALISZ; HENDLE; SCHMID, 1997; WOHLFAHRT et al., 1999). Já Liu e colaboradores (1998) e Shin e colaboradores (1993) demonstraram uma estrutura diferente das Gox obtidas a partir de *Botrytis cinérea* e *Pleurotus ostreatus*. Estas apresentaram quatro subunidades, portanto tetraméricas, com peso molecular de 160 kDa e 290 kDa, respectivamente.

FIGURA 7 - RECONSTRUÇÃO DE IMAGEM DE UMA GOx OBTIDA POR *A. NIGER*

FONTE: Mano (2019).

Os grupos ionizáveis presentes nas cadeias laterais dos aminoácidos da enzima caracterizam-na em relação ao comportamento frente ao pH (MOTTA, 1901). Dependendo da fonte de obtenção, a faixa de pH para atuação GOx varia possuindo boa atividade de 4 a 7, e com pH ótimo entre 5,5 a 6 (KALITSZ et al., 1991; BANKAR et al., 2009; SOUSA, 2017). No entanto, por ser uma proteína possui sensibilidade a temperaturas acima de 60 °C, mas atividade ótima em valores próximos a 40 °C (FIGURA 8) (ZIA et al., 2010; SOUSA, 2017).

FIGURA 8 - AÇÃO CATALÍTICA DA ENZIMA GLUCOSE OXIDASE EM DIFERENTES TEMPERATURAS E PH.



FONTE: Sousa (2017).

A alta especificidade ao substrato  $\beta$ -glicose da enzima é considerada uma de suas principais vantagens (KEILIN e HARTREE, 1952). E segundo Adams e colaboradores (1960) a oxidação da glicose é limitada quando está na forma alfa de mutarrotação. Apesar disso, é possível encontrar estudos que demonstram também sua capacidade de oxidar, em escala menor, outros açúcares como D-maltose, D-galactose, D-manose e D-xilose (SEMASHKO; MIKHAILOVA; EREMIN, 2003; ADAMS et al., 1960).

O principal inibidor da atividade enzimática da GOx é o peróxido de hidrogênio, próprio produto da reação que afeta os aminoácidos oxidando os resíduos de metionina (KLEPPE, 1966; BAO e colaboradores, 2003). O ácido glucônico e concentrações acima de 50 mM de cátions divalentes ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ) também contribuem para inativação da enzima (KLEPPE, 1966; ROGERS e

BRANDT, 1971; TONGBU e colaboradores, 1996). Já a interação de cátions monovalentes podem levar a compactação da enzima e conseqüente aumento da estabilidade térmica e a desnaturação (AHMAD; AKHTAR; BHAKUNI, 2001). Em outro estudo com os cátions divalentes  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , Akhtar, Ahmad, Bhakani (2002) demonstraram que, dependendo da concentração aplicada, estes podem aumentar a estabilidade da enzima (<1 M) ou induzir sua dissociação (>2 M).

Ao longo dos anos, a glucose oxidase foi largamente utilizada em diversas áreas por suas propriedades bioquímicas, somadas ao seu custo relativamente baixo e boa estabilidade. A especificidade ao substrato permitiu o desenvolvimento de biossensores usados para medição da concentração de glicose em sangue, prática necessária e constante para indivíduos diabéticos. Acoplados em linha ou não, biossensores de glicose também podem auxiliar na monitoria contínua de níveis de glicose em processos industriais. Chudobova e colaboradores (1996) desenvolveram um biossensor em fibra ótica para controle na produção de refrigerantes, enquanto Vodopivec e colaboradores (2000) aplicaram em processo fermentativo. Com propósito diferente, a enzima também apresentou emprego potencial na produção de vinhos de baixo teor alcoólico, por meio da redução da concentração de glicose do meio (PICKERING; HEATHERBELL; BARNES, 1998).

Ainda na área de alimentos, a GOx é utilizada como agente de conservação e aumento de *shelf life* por remover o teor de glicose e oxigênio residual do meio (BANKAR et al., 2009). A descoloração do vinho, a perda de aroma da cerveja, manutenção da qualidade de bebidas gaseificadas e a oxidação lipídica da maionese são retardados (CRUEGER e CRUEGER, 1990; ISAKSEN e ADLER-NISSEN, 1997). Pode ser considerada um coadjuvante de tecnologia devido ao efeito positivo na reologia e qualidade de pães (BONET et al., 2006).

É considerado um bactericida o que está relacionado à formação de peróxido possibilitando inclusive a aplicação em produtos de higiene oral (ETEMADZADEH; AINAMO; MURTOMAA, 1985). Em indústrias têxteis são utilizadas nos processos de descoloração e branqueamento de fibras naturais permitindo menor utilização do peróxido de hidrogênio em espécie (TZANOV et al., 2002). Outra vertente em estudo, são as biocélulas combustíveis que se baseiam no poder de oxi-redução da enzima para gerar energia como alternativa tecnológica de substituição das baterias convencionais (CHEN et al., 2001).

### 3 METODOLOGIA

A parte experimental deste trabalho foi realizada no laboratório de Análise Instrumental e Controle de Qualidade no Bloco de Química da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina.

#### 3.1 REAGENTES

Nesse trabalho foram empregados os seguintes reagentes e solventes: água ultrapura; acetonitrila ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) (Vetec); metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) (Vetec); sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (Vetec), D (+) Glucose anidra (Dextrose) ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) (Vetec); fosfato dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Synth); fosfato monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Vetec); ácido oxálico ( $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$ ) (Nuclear); ácido clorídrico (HCl) (Impex), ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (Alphatec) e Hidróxido de sódio (NaOH) (Biotec).

O princípio ativo do fármaco utilizado nas reações foi o cloridrato de tetraciclina ( $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_8\text{N}_2 \cdot \text{HCl}$ ) obtida de fonte comercial (Anexo 1).

A enzima utilizada foi a glucose oxidase (EC 1.1.3.4) de *Aspergillus niger*, (Glucozyn Concentrada, Prozyn) com atividade enzimática de 10.000 GOPU/g (onde GOPU: Unidade de glicose oxidase produzida por *Penicillium*).

#### 3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES

A solução estoque de tetraciclina foi preparada, semanalmente, na concentração de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  em água ultrapura. E as demais soluções foram preparadas por diluição da solução estoque.

A solução estoque de sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) foi preparada, semanalmente, na concentração de 5 mM em água ultrapura, onde para cada experimento era retirado o volume correspondente à concentração desejada.

A solução de ácido oxálico (0,01M), usada como fase móvel, foi preparada, semanalmente, em água ultrapura, filtrada a vácuo em membrana de celulose regenerada  $0,45 \mu\text{m}$ , ficando 20 minutos em banho ultrassônico.

A solução tampão de fosfato ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), usada para solubilizar a enzima, foi preparada com fosfato dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) e fosfato monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

conforme Zeraik, Souza e Fatbello-Filho (2008), onde o pH foi ajustado entre 6,5 e 7 com solução HCl (6 M).

As soluções de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (proporção 1:3) e de NaOH ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) foram preparadas em água ultrapura.

### 3.3 EQUIPAMENTOS E SOFTWARE

Os equipamentos utilizados neste trabalho foram: cromatógrafo líquido marca *Thermo Scientific*, modelo *Ultimate 3000*, composto por módulo de bomba, auto injetor e detector *Dionex Ultimate 3000*; Software para análise dos dados cromatográficos *Chromeleon 7*. Bomba de vácuo marca *Primatec*, modelo *131*; lavadora ultrassônica marca *Sanders Medical*, modelo *Soniclean 2*. Purificador de água Marca *Elga Lab Water*, modelo *Purelab Classic* (Tipo I,  $18.2 \text{ M}\Omega\text{-cm}$ ); agitador magnético com aquecimento marca *Solab*, modelo *SL-91*, medidor de pH marca *MS Tecnopon Equip. Especiais Ltda*, modelo *LUCA-210* e uma balança analítica marca *Shimadzu*, modelo *Ay-220*.

### 3.4 SISTEMA DE BIODEGRADAÇÃO

Os experimentos de degradação foram conduzidos em béqueres transparentes abertos contendo 100 mL de solução de tetraciclina ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ) colocados sob agitação contínua (60 a 70 RPM), com ajuste de temperatura no agitador com aquecimento de acordo com o experimento. O ajuste de pH do meio reacional, quando necessário, foi feito utilizando as soluções de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1:3) e NaOH ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ). No meio adequado às condições, a fonte de ferro ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), a enzima glucose oxidase (previamente diluída em 0,5 mL de solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e o substrato da enzima (dextrose anidra) foram adicionados concomitantemente. Na FIGURA 9 apresenta-se a fotografia do sistema utilizado para reação.

O início da reação foi considerado o momento em que todos os reagentes foram colocados no meio. Padronizou-se a primeira coleta de alíquota para análise após 1 minuto de reação, e demais coletas realizadas de 7 em 7 minutos, (tempo da análise cromatográfica). Desta forma as amostras foram coletadas, filtradas em filtro

de seringa PVDF Hidrofílico 0,22  $\mu\text{m}$  (marca *Membrane solutions*) e imediatamente analisadas no cromatógrafo.

FIGURA 9 - FOTOGRAFIA DO SISTEMA DE BIODEGRADAÇÃO DA TETRACICLINA.



FONTE: O autor (2020).

A definição deste procedimento para realização dos experimentos e tempos para coleta foi feita baseada em testes preliminares que demonstraram que a ordem de adição poderia gerar impacto nos resultados. Nos experimentos iniciais a ordem de inserção dos reagentes no meio não era controlada, sendo colocados um a um, sem ordem definida, e somente após a introdução do último, se iniciava a contagem do tempo. Isso causava resultados diferentes mesmo quando o experimento era submetido às mesmas condições. Quando se adicionava a enzima e seu substrato antes do ferro, logo no primeiro tempo de coleta os resultados de degradação já se apresentavam altos. O que se acredita ser ocasionado devido à formação de peróxido no meio previamente, e, quando o ferro era adicionado já possuía uma disponibilidade de peróxido suficiente para fazer uma reação de Fenton “instantânea”. Desta forma, padronizou-se a inclusão conjunta de todos os reagentes na solução de tetraciclina, e a primeira coleta realizada no minuto um, para contornar estas situações.

Outro ponto que foi padronizado foi em relação aos tempos de coleta. Inicialmente eram realizadas de 5 em 5 minutos, porém como o tempo da corrida no cromatógrafo era maior (7 minutos), a análise não era realizada no momento da

coleta, e sim minutos após. Mas como se trata de uma reação de degradação a qual não era interrompida quando a amostra era coletada no vial, obtinha-se resultados incorretos. Apesar da literatura apresentar possibilidades para a inativação da reação de Fenton, como adição de metanol para consumo de radical hidroxila, ou de utilização de um agente precipitante para consumo do peróxido residual e precipitação de ferro, optou-se por não usar esses procedimentos visto que o equipamento estava disponível para análise imediata (BAUTITZ, 2006).

### 3.5 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO COMPOSTO-ALVO

A determinação de tetraciclina foi feita utilizando um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplado com detector de arranjo de fotodiodos (*diode array detector* - DAD) e amostrador automático termostatizado. As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna de fase reversa C18 (ACE 250 x 4,6 mm), com tamanho de partícula de 5 µm, comprimento de onda de detecção 355 nm, fase móvel com composição de ácido oxálico (0,01 M), metanol e acetonitrila (72:08:20), volume de injeção 20 µL, temperatura de injeção 22 °C, fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e temperatura do forno 30 °C (BAUTITZ, 2006).

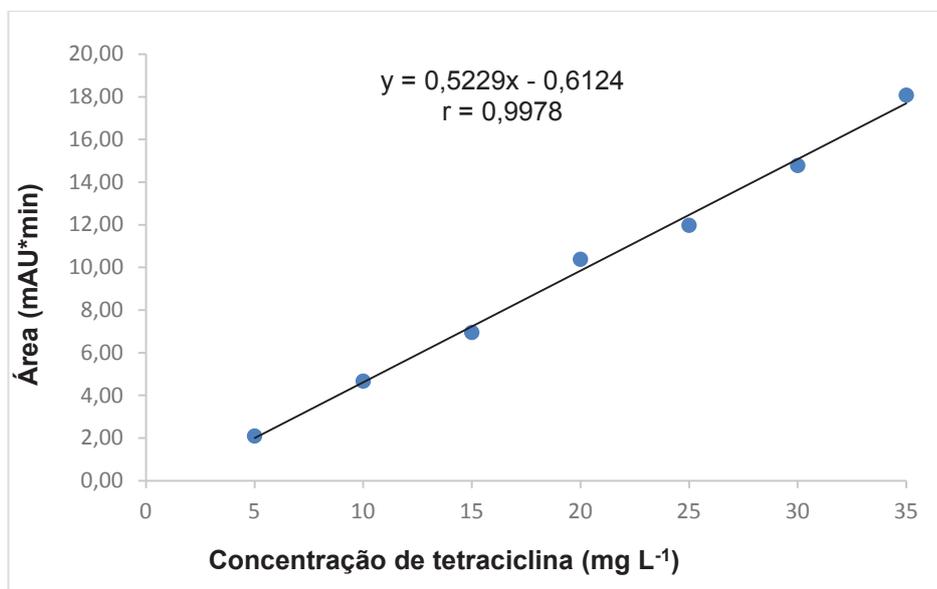
#### 3.5.1 Curva analítica

Segundo Ribani e colaboradores (2004) está sendo cada vez mais reconhecida e exigida a qualidade de medições químicas baseadas em sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade. As análises cromatográficas estão entre as técnicas em destaque pela capacidade de quantificar compostos diversos em amostras de alimentos, farmacêuticas, biológicas e ambientais. Além disso, a geração de dados científicos confiáveis e interpretáveis contribui para fomentar entidades reguladoras e a criação de políticas governamentais focadas.

A relação linear simples, descrita por  $y = ax + b$  pode ser utilizada para verificar a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI et al., 2004).

Assim para possibilitar a quantificação da degradação da tetraciclina por meio da análise cromatográfica (CLAE), bem como obter dados confiáveis, gerou-se a curva padrão da tetraciclina, representada na FIGURA 10.

FIGURA 10 - CURVA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE TETRACICLINA.



Condições cromatográficas: fase móvel ácido oxálico (0,01 M), metanol e acetonitrila (72:08:20), detecção em comprimento de onda 355 nm, vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>. FONTE: O autor (2020).

A partir da análise do coeficiente de correlação ( $r = 0,9978$ ) pode se estimar a qualidade da curva demonstrando que os dados apresentaram uma boa distribuição linear.

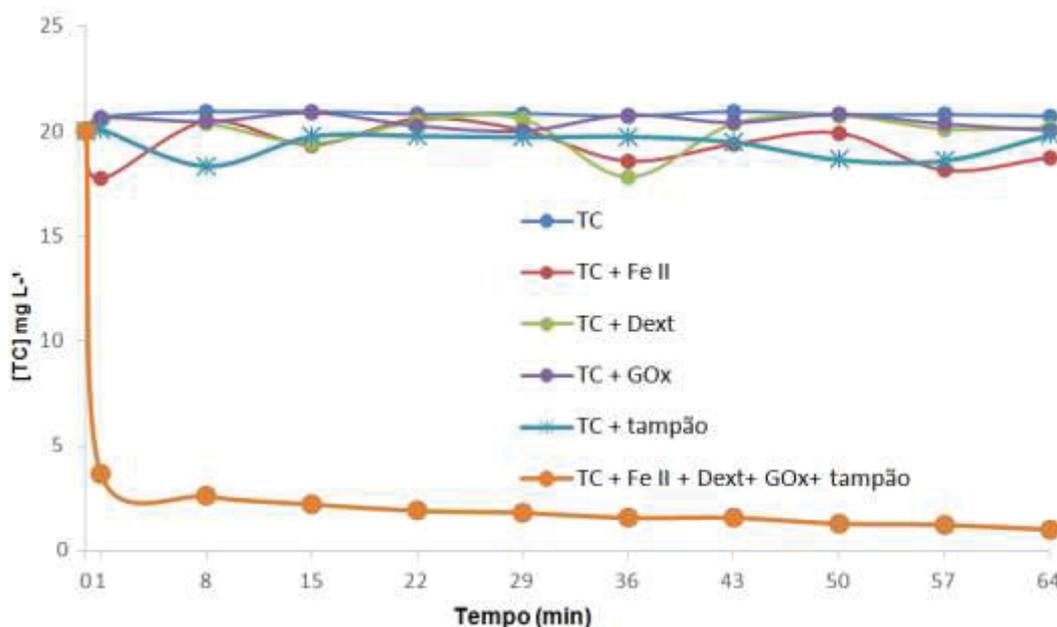
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 DEGRADAÇÃO DE TC POR BIO-FENTON: EXPERIMENTOS CONTROLE

A obtenção de resultados satisfatórios de degradação de contaminantes emergentes, em especial de compostos hidrossolúveis como a tetraciclina, depende de diversos fatores devido a suas características e propriedades físico-químicas. Além disso, a própria definição de CE já declara que são compostos cuja atuação no ambiente ainda é pouco elucidada. Desta forma, é importante que novos processos de degradação, além de demonstrarem seus resultados, efetivamente, também elucidem as possíveis reações e impactos relacionados.

Assim, para confirmar se a metodologia planejada para realização dos experimentos estava adequada e investigar se algum dos reagentes poderia interferir na degradação da tetraciclina, individualmente, realizou-se um estudo dos controles (FIGURA 11) comparando-os com uma reação com a adição de todos os componentes.

FIGURA 11 - EXPERIMENTOS CONTROLES DA REAÇÃO

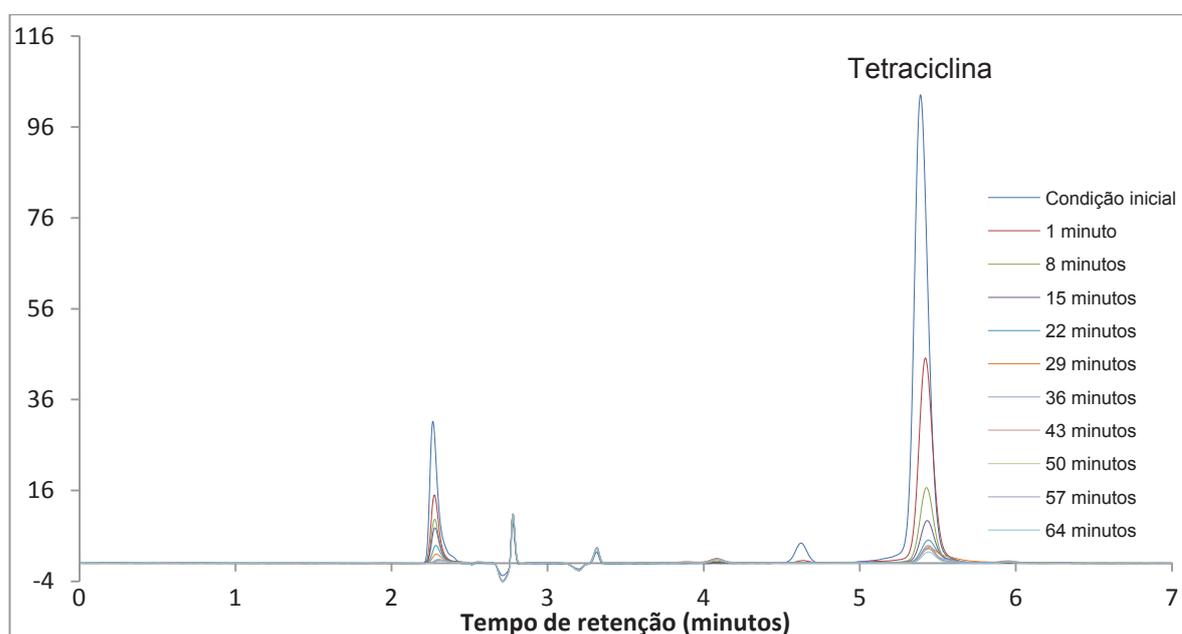


Condições iniciais: [TC] = 20 mg L<sup>-1</sup>; Temperatura 31 °C. pH natural (4,2). Componentes variados: [FeSO<sub>4</sub>] = 0,25 mM, [dextrose anidra] = 75 mg L<sup>-1</sup>, [GOx] = 40 mg L<sup>-1</sup>, [tampão fosfato] = 5 mM. FONTE: O autor (2020).

A partir da FIGURA 11 observa-se que os componentes dextrose (substrato), enzima (GOx), sulfato ferroso e tampão não geraram alteração

significativa da concentração de tetraciclina ao longo do tempo quando adicionados individualmente. Por outro lado, 75% de degradação de TC já foi alcançado no primeiro minuto de reação o que sugere estar relacionado diretamente à reação Bio-Fenton proposta, a qual pode promover ao final de 64 minutos 88% de degradação. O monitoramento da concentração de tetraciclina por cromatografia líquida revela a rápida degradação que ocorre já no primeiro minuto de reação (FIGURA 12).

FIGURA 12 - CROMATOGRAMA DA DEGRADAÇÃO DE TETRACICLINA POR BIO-FENTON



Condições iniciais: [TC] = 20 mg L<sup>-1</sup>; Temperatura 31 °C. pH natural (4,2); [FeSO<sub>4</sub>] = 0,25 mM; [dextrose anidra]= 75 mg L<sup>-1</sup>, [GOx]= 40 mg L<sup>-1</sup>, [tampão fosfato]= 5 mM. FONTE: O autor (2020).

#### 4.2 EFEITO DO PH SOBRE A REAÇÃO

A definição do pH do meio de uma reação de Bio-Fenton é um desafio visto que se busca considerar as condições ideais para um processo químico (Fenton: pH < 3) alinhado com um enzimático (enzima: pH > 4) (KAHOUSH et al., 2018).

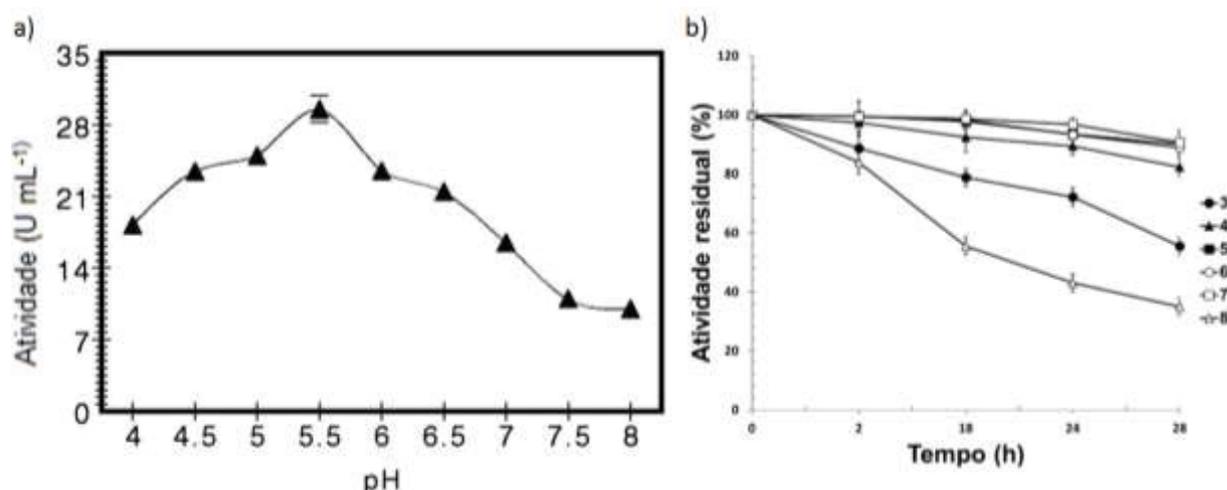
Para reação de Fenton o pH é um fator a ser considerado para manter a solubilidade da fonte de ferro utilizada. Onde, em pH maiores que 3 os íons Fe<sup>2+</sup> podem precipitar reduzindo a capacidade de reação com o peróxido de hidrogênio. No entanto em pH < 2,5 a alta concentração de H<sup>+</sup> pode sequestrar os radicais hidroxilas gerados, impedindo sua reação com o contaminante (PIGNATELLO,

1992). Além disso, o peróxido de hidrogênio é mais estável em condições altamente ácidas (ELHAMI, KARIMI, AGHBOLAGHY, 2015).

Já as enzimas, geralmente atuam em pHs próximos a neutralidade ou levemente ácidos. Cada enzima possui suas propriedades e funções ativas em pH específicos, possuindo sempre um valor onde sua atividade é máxima. A glucose oxidase possui uma faixa de atuação de pH de 4 a 7, atingindo condição ótima em pH entre 5,5 e 6 (KALITSZ et al., 1991; BANKAR et al., 2009; SOUSA, 2017).

Na FIGURA 13 verifica-se dois estudos onde pode ser observado este comportamento da atividade da enzima em diferentes pHs (FIGURA 13 a)) e sua atividade residual após algumas horas submetidas a diferentes valores de pH (FIGURA 13 b)).

FIGURA 13 - EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GOX DE *Aspergillus niger*

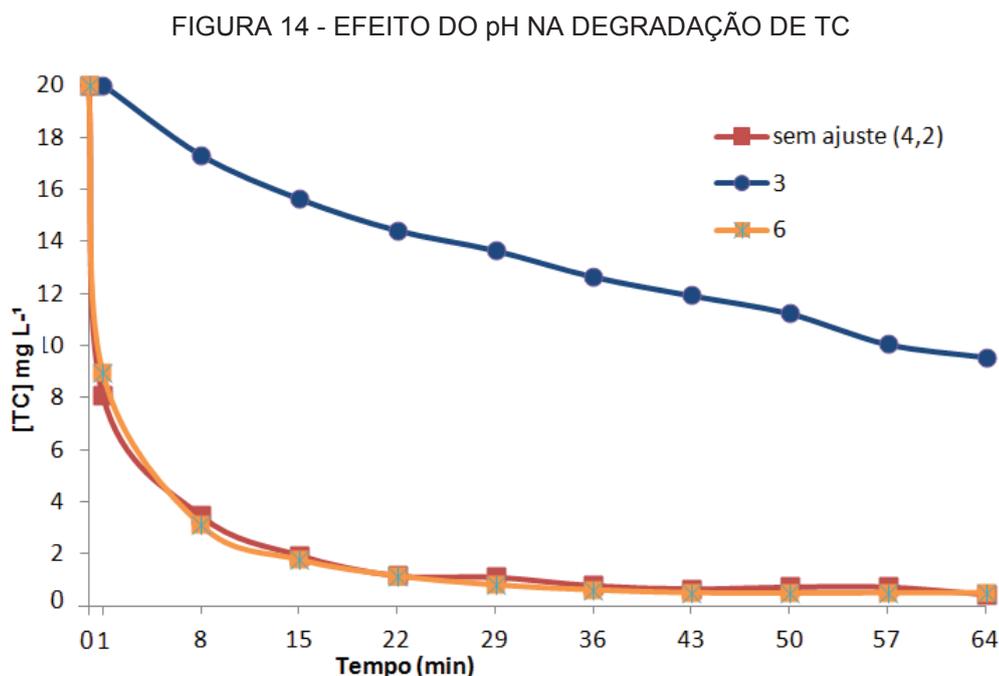


FONTE: a) Zia e colaboradores (2010); b) Sousa (2017).

Desta forma, os trabalhos relacionados à Bio-Fenton utilizando a enzima glucose oxidase apresentam, geralmente, melhores resultados de degradação dos compostos em pHs dentro desta variação de 3,5 a 5,5. E acima do pH 5,5, a taxa de degradação apresenta significativa redução, a qual é justificada pela formação de  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ , que nesta forma decompõe o peróxido em água e oxigênio (ELHAMI, KARIMI, AGHBOLAGHY, 2015; ESKANDARIAN et al., 2013; HAMEED e LEE, 2009). Enquanto que outros autores têm alcançado valores satisfatórios submetendo os experimentos em condições de pH natural da solução a ser tratada, e utilizando o pH somente como um parâmetro de monitoramento da reação (HUANG et al., 2020).

Assim, considerando essas questões, realizou-se um estudo (FIGURA 14) para avaliar a degradação da tetraciclina sob três condições diferentes de pH: 3

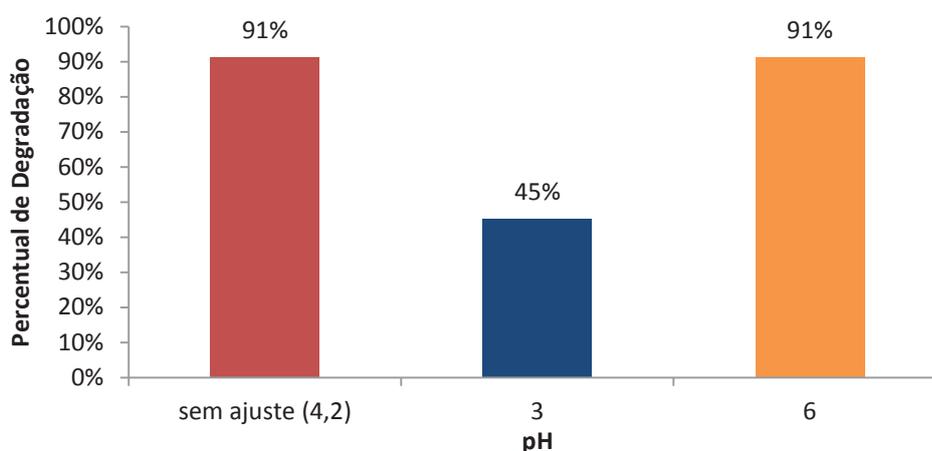
(pois é ideal para a reação de Fenton), 6 (além de ser uma das condições indicadas para melhor atuação da enzima, está mais próximo da neutralidade trazendo vantagens no descarte de efluentes), e 4,2 (que é o pH natural da solução de tetraciclina  $20 \text{ mg L}^{-1}$ , condição que possibilita mais facilmente aplicações práticas, bem como para conhecimento da evolução natural do pH da reação).



Condições iniciais: [TC] =  $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ ; Temperatura  $31 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $[\text{FeSO}_4] = 0,25 \text{ mM}$ , [dextrose anidra] =  $75 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $[\text{GOx}] = 40 \text{ mg L}^{-1}$ , [tampão fosfato] =  $5 \text{ mM}$ . FONTE: O autor (2020).

Os resultados mostrados na FIGURA 14 confirmam o que outros autores já haviam observado sobre o comportamento da degradação de contaminantes pelo processo Bio-Fenton. Demonstrou-se que esta não é favorecida quando submetida ao pH 3, mesmo que esse seja o pH adequado para o Fenton clássico. Enquanto que em pH natural (4,2) e no ajustado em 6, pode-se observar uma degradação mais rápida. Isso pode ser justificado pela atuação da enzima no meio, a qual é favorecida em condições menos ácidas, promovendo a geração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que leva a consequente reação de Fenton e degradação do contaminante. Desta forma, ao final de 64 minutos os tratamentos sob pH natural (4,2) e pH 6 atingiram 91% de degradação, por outro lado no pH 3 alcançou-se apenas 45% (FIGURA 15).

FIGURA 15 - PERCENTUAL DE DEGRADAÇÃO DE TETRACICLINA VARIANDO O pH DO MEIO.



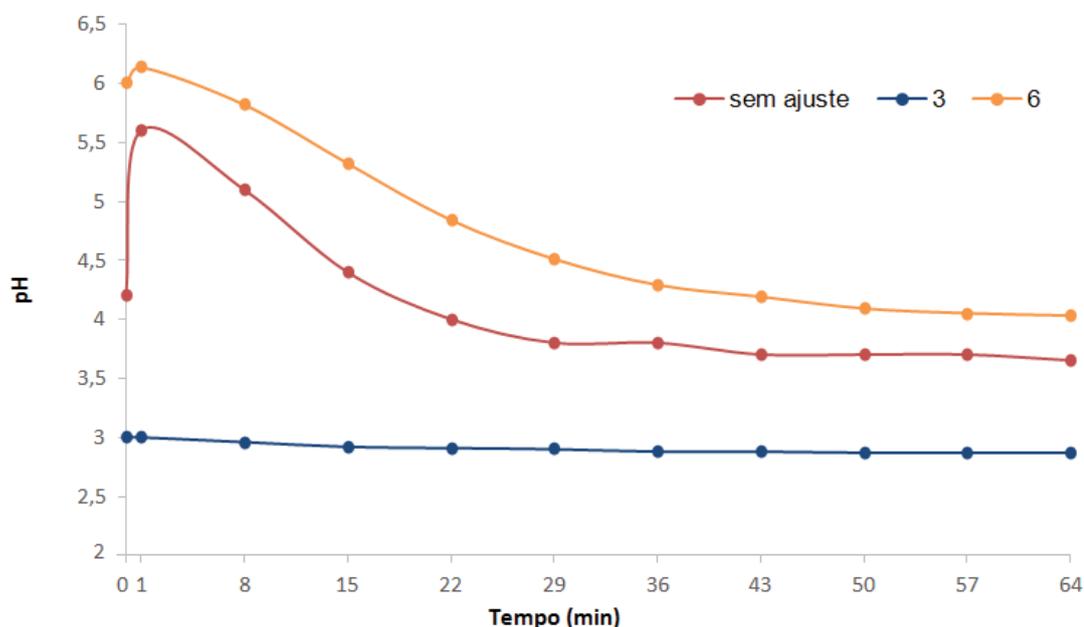
Condições iniciais: [TC] = 20,0 mg L<sup>-1</sup>; Temperatura 31 °C, [FeSO<sub>4</sub>] = 0,25 mM, [dextrose anidra] = 75 mg L<sup>-1</sup>, [GOx] = 40 mg L<sup>-1</sup>, [tampão fosfato] = 5 mM. Tempo de experimento = 64 min. FONTE: O autor (2020).

Considerando a natureza diferenciada de uma reação biotecnológica como o Bio-Fenton, esses resultados na degradação da tetraciclina são positivos quando comparados a outros processos químicos e físicos já estudados reportados na literatura. Yu e colaboradores (2019) submeteram 50 mg L<sup>-1</sup> de tetraciclina em pH natural (4,25) aos processos de UV/Fenton/T-TiO<sub>2</sub> e UV/Fenton, e alcançaram 99,5% e 98% de degradação em 40 e 90 minutos, respectivamente. Mas quando o pH da solução foi ajustado para pH 3, a reação UV/Fenton/T-TiO<sub>2</sub> apresentou melhor eficiência de degradação (99,9%, 90 minutos) seguido do pH 5 e 7, obtendo menor percentual em pH 9 (92,8%, 90 minutos). Já Barhoumi e colaboradores (2017) alcançaram 100% de degradação da tetraciclina (0,2 mM) em 15 minutos, em pH 3 utilizando eletrodo de diamante dopado com boro (BDD do inglês “*Boron Doped Diamond*”) como ânodo e cátodo de carbono, utilizando o Eletro-Fenton.

No monitoramento do pH (FIGURA 16) destas reações ao longo do processo de degradação da tetraciclina, pode-se observar que no experimento em que o pH foi ajustado inicialmente para 3, o mesmo manteve-se nesta condição até o final do acompanhamento variando pouco ao longo do processo, entre 3 e 2,87 (final). Já o experimento de pH ajustado inicialmente em 6, alcançou 4,03 após 64 minutos o que representa uma acidificação ao longo do processo. Tal comportamento foi muito similar ao da degradação sem ajuste de pH, o qual também apresenta uma redução do pH durante a reação. Portanto esses dados contribuem para o entendimento da

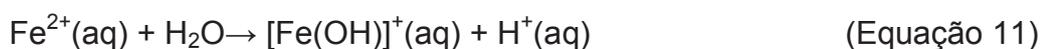
menor degradação de tetraciclina quando submetida à reação em pH 3, bem como melhores resultados em pH natural ou 6.

FIGURA 16 -MONITORAMENTO DO pH DURANTE A DEGRADAÇÃO DE TC.



Condições iniciais: [TC] = 20,0 mg L<sup>-1</sup>; Temperatura 31 °C, [FeSO<sub>4</sub>] = 0,25 mM, [dextrose anidra]= 75 mg L<sup>-1</sup>, [GOx]= 40 mg LV, [tampão fosfato]= 5 mM. FONTE: O autor (2020).

Essa alteração de pH pode ser explicada pelo aumento de H<sup>+</sup> no meio ocasionado tanto pela ação da enzima com seu substrato formando ácido glucônico (Equação 10), como pela hidrólise dos íons Fe<sup>2+</sup> (Equação 11) ou do Fe<sup>3+</sup> (Equação 5) (MARTEL; SMITH; MOTEKAITIS, 1997).



Huang e colaboradores (2020) ao estudar a degradação por Bio-Fenton do composto tricloroetileno também associaram a produção de ácido glucônico para justificar a diferença de pH inicial ajustado e ao final da reação, 6,7 e 3,5, respectivamente. Mas, outro ponto avaliado pelos mesmos autores, foi a influência no pH após adição de Fe(II), o qual gerou uma diminuição leve de 6,7 a 5,5 no início da reação. Yu e colaboradores (2019) estudando a degradação de tetraciclina pelo processo híbrido de UV/Fenton/T-TiO<sub>2</sub>, puderam observar esse declínio do pH ao longo da reação. Em condições similares às aplicadas neste trabalho, os autores

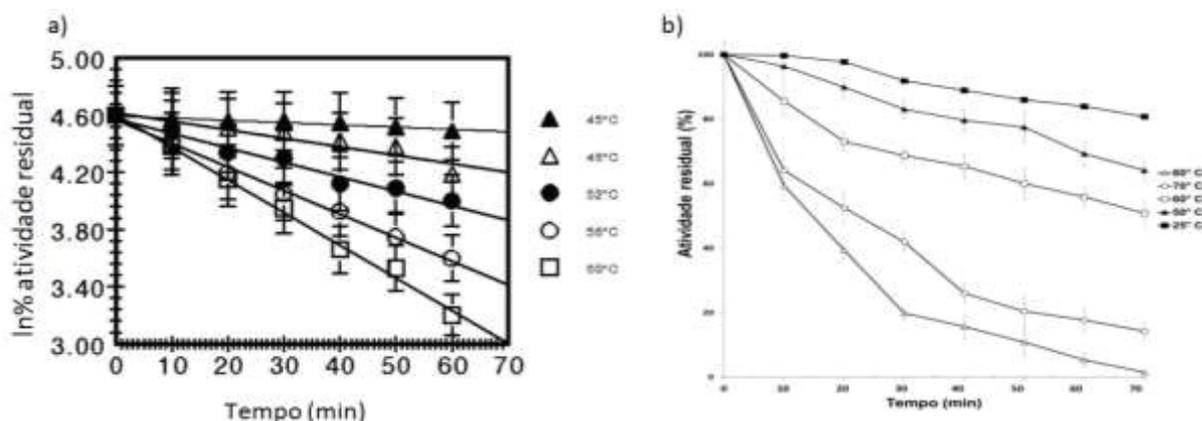
submeteram  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de tetraciclina a pHs iniciais de 3, 5, 7 e 9, e, ao final de 90 minutos, estes apresentaram pH de 3,03, 3,62, 3,61 e 3,92, respectivamente. Neste caso, também associaram a redução do pH a formação de outros tipos de intermediários ácidos, os quais Barhoumi e colaboradores (2017) detectaram como ácidos málico, malônico, succínico, acético, oxálico e oxâmico.

Assim, devido a obtenção de resultados satisfatórios em condição sem a necessidade de ajuste de pH, definiu-se seguir os experimentos sob pH natural (4,2), acompanhando a variação do pH para conhecimento das possíveis reações que estão ocorrendo.

#### 4.3 EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A REAÇÃO

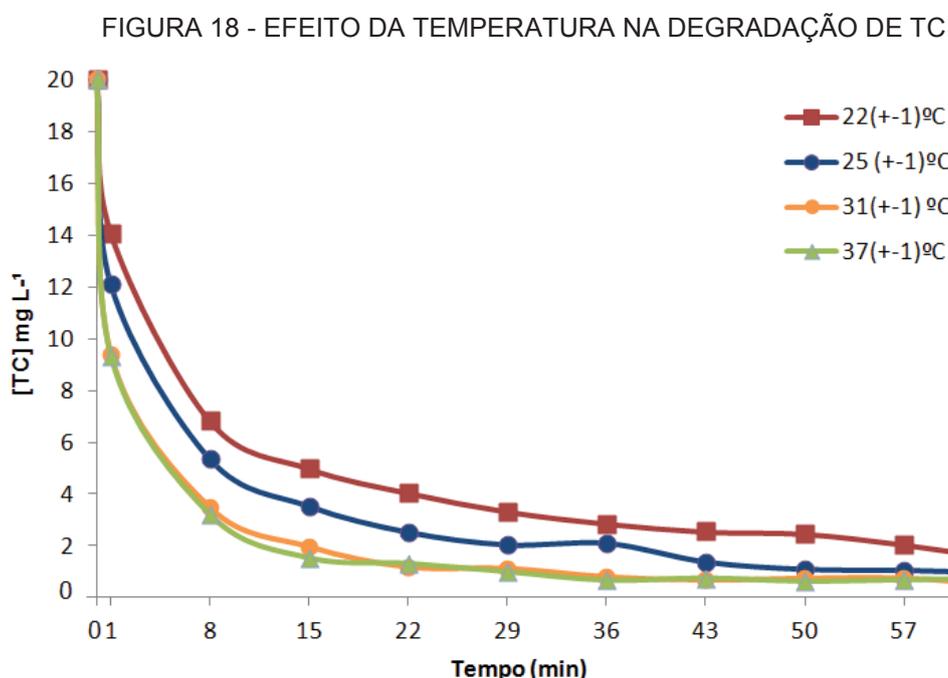
No geral, as curvas de atividade enzimática versus temperatura apresentam um padrão similar. A atividade enzimática aumenta à medida que a temperatura é elevada, o que proporciona maior produção de peróxido de hidrogênio e conseqüentemente maiores índices de degradação dos compostos pelo aumento da reação de Fenton. No entanto, após ultrapassada a temperatura ótima da enzima, as reações tornam-se mais lentas, e em alguns casos são até interrompidas uma vez que o processo de desnaturação se sobrepõe ao aumento da velocidade da reação (KAHOUSH et al., 2018). Tal comportamento pode ser observado no trabalho de caracterização da enzima GOx realizado por Zia e colaboradores (2010) e Sousa (2017) onde foi submetida a diferentes temperaturas ao longo de 70 minutos (FIGURA 17).

FIGURA 17 - INATIVAÇÃO TÉRMICA DA GOx DE *Aspergillus niger*.



FONTE: a) Zia e colaboradores (2010); b) Sousa (2017).

Diversos são os trabalhos com enzimas em que se estudou o efeito da temperatura na eficiência de degradação de contaminantes e obteve-se conclusões diferentes dependendo do tipo de composto-alvo. Para degradação do corante azul ácido, Eskandarian e colaboradores (2013) reportaram a temperatura de 23 °C como a melhor. Enquanto que Elhami, Karimi, Aghbolaghy (2015) apontaram a temperatura de 40 °C como ótima para degradar o corante verde malaquita. Desta forma, estudar a temperatura que apresenta a melhor condição para a degradação da tetraciclina é um parâmetro importante a ser verificado. Dessa forma, submeteu-se a reação a quatro condições: 22 °C (ambiente), 25 °C, 31 °C e 37 °C com variação de +/-1 °C, onde os resultados podem ser observados na FIGURA 18.



Condições iniciais: [TC] = 20,0 mg L<sup>-1</sup>; pH natural (4,2), [FeSO<sub>4</sub>] = 0,25 mM, [dextrose anidra] = 75 mg L<sup>-1</sup>, [GOx] = 40 mg L<sup>-1</sup>, [tampão fosfato] = 5 mM. FONTE: O autor (2020).

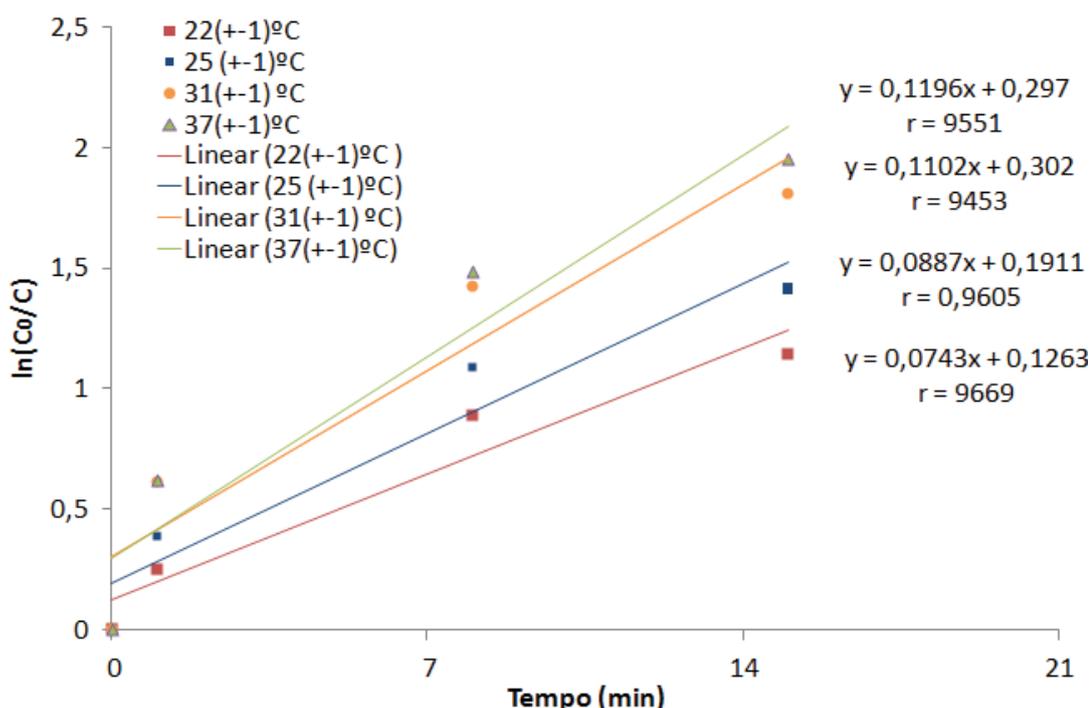
A partir da FIGURA 18 pode se observar que a temperatura do meio mantém a tendência da curva de degradação, gerando leves diferenças na sua inclinação. Mas, ao final de 64 minutos se alcança percentuais de degradação similares entre os tratamentos de 86%, 89%, 91% e 90%, para as temperaturas 22, 25, 31 e 37, respectivamente. A taxa de degradação diminui ao longo do tempo, onde a velocidade inicial (1 minuto) foi sempre a maior entre todas as medições para cada tratamento gerando a seguinte relação:  $V_{37^{\circ}\text{C}} = V_{31^{\circ}\text{C}} = 9,2 \text{ mg min}^{-1} > V_{25^{\circ}\text{C}} = 6,4 \text{ mg min}^{-1} > V_{22^{\circ}\text{C}} = 4,4 \text{ mg min}^{-1}$ . Nesse período a velocidade produziu uma relação

positiva com a temperatura, ou seja, maiores velocidades foram encontradas quando se aplicou maiores temperaturas. No entanto, nos minutos posteriores, essa relação não foi observada.

Para isso, considerando que a cinética da reação de degradação da tetraciclina por Bio-Fenton atende ao Modelo de Primeira Ordem (Equação 12), foi aplicado uma regressão linear de  $\ln(C_0/C)$  versus tempo, nos primeiros 15 minutos de reação para se obter a constante de degradação cinética  $k$  ( $\text{min}^{-1}$ ). Onde  $C_0$  e  $C$  são a concentração de TC inicial e concentração de TC no tempo ( $t$ ), respectivamente. As curvas e equações obtidas para cada tratamento estão apresentados na FIGURA 19.

$$\ln(C_0/C) = kt + b \quad (\text{Equação 12})$$

FIGURA 19 - CONSTANTE CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE PRIMEIRA ORDEM EM DIFERENTES TEMPERATURAS.



Condições iniciais:  $[\text{TC}] = 20,0 \text{ mg L}^{-1}$ ; pH natural (4,2),  $[\text{FeSO}_4] = 0,25 \text{ mM}$ ,  $[\text{dextrose anidra}] = 75 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $[\text{GOx}] = 40 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $[\text{tampão fosfato}] = 5 \text{ mM}$ . FONTE: O autor (2020).

Os valores das constantes cinéticas calculadas foram sequenciados em ordem crescente  $0,0743 \text{ min}^{-1}$ ,  $0,0887 \text{ min}^{-1}$ ,  $0,1102 \text{ min}^{-1}$ ,  $0,1196 \text{ min}^{-1}$ , correspondendo às temperaturas de  $22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $31 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  e  $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ , respectivamente.

Assim, baseado nestes resultados pode se inferir que temperaturas amenas de  $20$  a  $26^\circ\text{C}$  tendem a gerar uma degradação mais lenta quando comparada as temperaturas mais altas ( $30^\circ\text{C}$  a  $38^\circ\text{C}$ ). De acordo com os dados de percentual final

de degradação, bem como da constante cinética, entende-se que a temperatura de  $31\pm 1^\circ\text{C}$  é a mais adequada à reação. E, em temperaturas superiores a essa os resultados de degradação da tetraciclina foram positivos, no entanto não tiveram melhorias significativas. Isso pode indicar que a temperatura ótima para essa condição de experimento para degradação da tetraciclina encontra-se entre  $30$  e  $36^\circ\text{C}$ .

Guo e colaboradores (2019) utilizando luz visível (420 nm) em um processo de Foto-Fenton, com adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  obtiveram 92% de degradação da tetraciclina ( $40\text{ mg L}^{-1}$ ) com uma constante de  $0,042\text{ min}^{-1}$ .

Wen, Jia e Li (2009) estudando a degradação de tetraciclina e oxitetraciclina utilizando as enzimas manganês peroxidase e lignina peroxidase, também perceberam uma melhor degradação em temperatura de  $30^\circ\text{C}$ , provavelmente devido sua temperatura de atuação ótima. Já Karimi e colaboradores (2012) utilizando a glucose oxidase para reação de Bio-Fenton para degradação do corante verde malaquita, apresentaram observações similares às deste estudo. Apesar de identificarem maior velocidade à medida que a temperatura era aumentada, esta não apresentava mesma taxa ao longo do período de reação. Nos primeiros 20 minutos sob a temperatura de  $15$ ,  $30$ ,  $35$  e  $40^\circ\text{C}$  apresentaram % de degradação de  $30,5\%$ ,  $38,7\%$ ,  $37,5\%$  e  $40,0\%$ , respectivamente. Mas posteriormente, esta taxa decaiu para todos a um nível similar, representando, após 60 minutos valores próximos a  $17\%$ , e após 120 minutos, taxas de  $8$  a  $9\%$ .

Para os autores, essa menor taxa pode ter sido ocasionada pela menor atividade da enzima na produção de peróxido devido a uma desnaturação das mesmas, inativando sítios ativos. Enquanto que a maior velocidade de degradação nos tempos iniciais em mais altas temperaturas pode ser relacionada à aceleração da reação do peróxido de hidrogênio com o  $\text{Fe}^{2+}$  (HAMEED e LEE, 2009; DURIGAN; VAZ; PERALTA-ZAMORA, 2012). Esses apontamentos poderiam justificar a mesma característica da degradação da tetraciclina neste estudo.

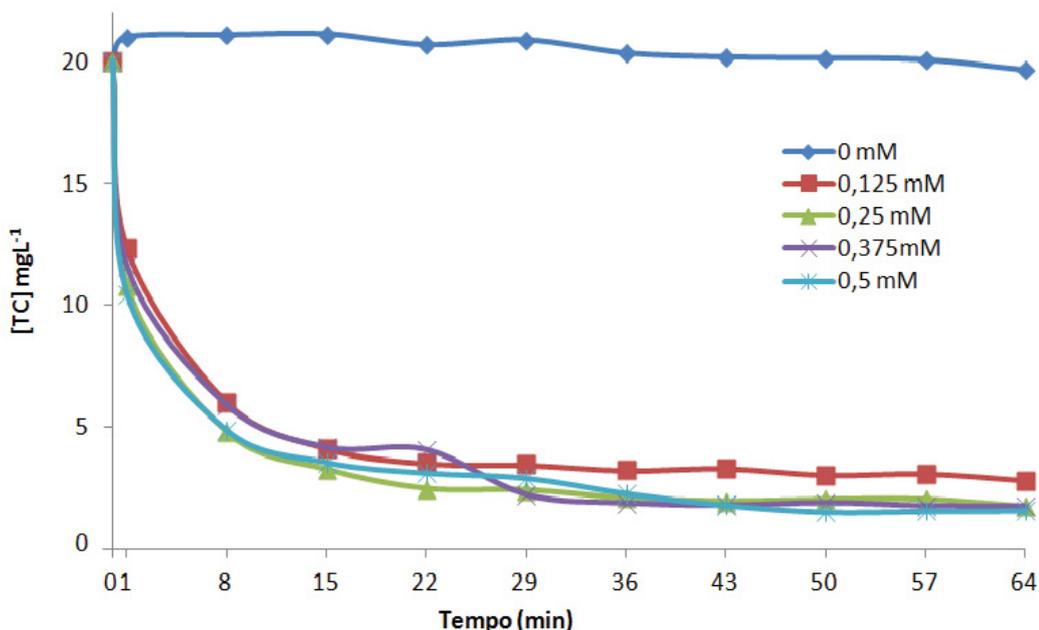
Durante os experimentos, foi realizado o monitoramento do pH (dados não mostrados) no qual não se identificou grandes diferenças aparentes entre os tratamentos. Todos apresentaram característica similar de acidificação do meio alcançando pH final entre  $3,6$  a  $3,9$ , onde as possíveis causas (formação de ácido glucônico, hidrólise de  $\text{Fe}^{2+}$ ) já foram pontuadas anteriormente.

#### 4.4 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE FERRO SOBRE A REAÇÃO

A disponibilidade de uma fonte de Fe(II) à reação de Fenton é indispensável visto que é o responsável por decompor o peróxido de hidrogênio gerando os radicais  $\bullet\text{OH}$  que atuam sobre os compostos a serem degradados (FENTON, 1984). Em contrapartida, o ferro é responsável por uma das maiores desvantagens ambientais do processo, pois gera resíduos que precisam ser removidos para destinação aos corpos hídricos, além de ocasionar maiores custos ao processo. No Brasil, dispõe-se da Resolução nº 430 de 13 de maio de 2011 do CONAMA, a qual prevê um limite para ferro em efluentes de  $15 \text{ mg L}^{-1}$ , o que corresponde a  $0,267 \text{ mM}$  (BRASIL, 2011). Assim, um dos mais importantes estudos para otimização do processo de Fenton está relacionado à aplicação de menores concentrações de ferro à reação.

Considerando essas questões, submeteu-se a solução de tetraciclina a reação de Bio-Fenton utilizando quatro concentrações diferentes de sulfato ferroso:  $0,125 \text{ mM}$ ,  $0,25 \text{ mM}$ ,  $0,375 \text{ mM}$  e  $0,5 \text{ mM}$ , e na sua ausência ( $0 \text{ mM}$ ). As curvas de degradação nestas condições podem ser observadas na FIGURA 20.

FIGURA 20 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE FERRO NA DEGRADAÇÃO DE TC.



Condições iniciais:  $[\text{TC}] = 20,0 \text{ mg L}^{-1}$ ; Temperatura  $31 \text{ }^\circ\text{C}$ ; pH natural (4,2), [dextrose anidra] =  $75 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $[\text{GOx}] = 40 \text{ mg L}^{-1}$ , [tampão fosfato] =  $5 \text{ mM}$ . FONTE: O autor (2020).

Esses resultados evidenciam que a utilização de Fe(II) é necessária para a degradação da tetraciclina visto que no experimento controle realizado na ausência de Fe não se observou degradação significativa. Além disso a concentração de Fe(II) influencia diretamente na reação de Bio-Fenton, onde a menor concentração (0,125 mM) apresentou menor degradação ao final de 64 minutos (85,9%), seguido das concentrações intermediárias (0,25 mM e 0,375 mM) que apresentaram 91,3% de degradação. Já a maior concentração de ferro (0,5 mM), apesar de ter gerado maior degradação final (92,1%), esta não foi proporcionalmente maior ao aumento de sua disponibilidade e nem considerada significativa.

Eskandarian e colaboradores (2013), em um trabalho similar para degradar o corante Azo 113 azul ácido, identificaram que a partir de uma concentração de 0,4 mM de  $\text{Fe}^{2+}$  a degradação começava a diminuir. Já Yu e colaboradores (2019) estudando a degradação da tetraciclina por Foto-Fenton, obtiveram aumento da eficiência da degradação com o aumento do  $\text{Fe}^{2+}$  até certa razão molar ( $n\text{Fe}^{2+}:\text{nH}_2\text{O}_2 = 1;20$  a  $1:10$ ). Quando a concentração de ferro foi maior ( $n\text{Fe}^{2+}:\text{nH}_2\text{O}_2=1:7,5$ ), obtiveram redução de eficiência, a qual justificaram ser proveniente do excesso de  $\text{Fe}^{2+}$  que captura os radicais OH antes dos mesmos atuarem sobre o composto-alvo. Assim, segundo os mesmos autores esse comportamento não linear pode ser justificado pela não adequada proporção dos reagentes envolvidos, demonstrando que existe um valor ótimo de  $\text{Fe}^{2+}$  para cada quantidade de peróxido no meio. Utset, Lopez e Diaz (2000) ainda apontam a possibilidade de formação de complexos  $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})^{2+}$  em  $\text{pH} > 3$  como responsáveis pelo ataque de moléculas orgânicas.

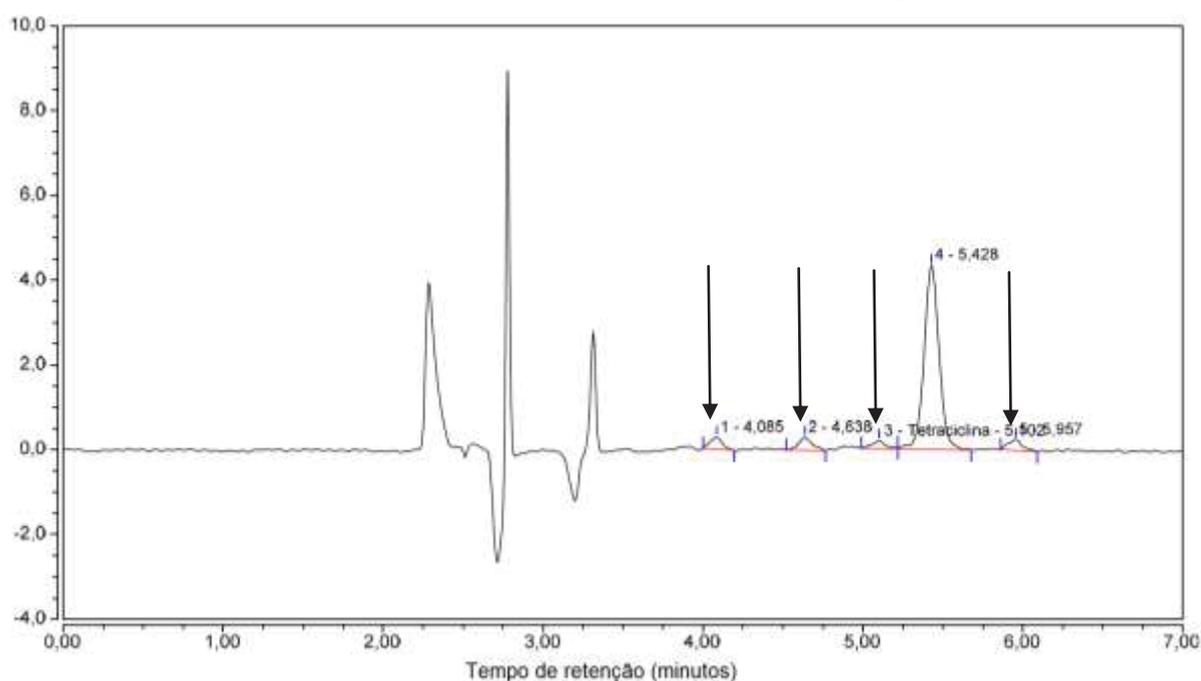
O resultado positivo obtido em maiores concentrações ferro apresentou pequena diferença perceptiva em relação às concentrações menores. Isso é vantajoso pois permite a utilização de menores concentrações de ferro, possibilitando assim o atendimento aos limites impostos pela legislação para efluentes, atingindo um bom percentual de degradação, sem necessidade de tratamento posterior para remoção do ferro residual.

Outra questão observada é que em todos os tratamentos, obtém-se uma rápida e imediata degradação do composto-alvo nos minutos iniciais da reação, atingindo valores entre 38 e 48% no primeiro minuto, e 69 a 76% aos 8 minutos. Segundo Yu e colaboradores (2019) esses dados indicam que há  $\text{Fe}^{2+}$  suficiente para reagir com o peróxido, bem como demonstra que a enzima está sob condições favoráveis para atuar sobre a dextrose e fornecer imediatamente ao meio o peróxido

necessário. Os mesmos autores ao estudar a degradação da tetraciclina ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) pelo sistema UV/Fenton/T-TiO<sub>2</sub> alcançaram 99,5% de degradação após 40 minutos utilizando 1mM de sulfato ferroso.

Segundo Bilal e colaboradores (2019) as reações de degradação que ocorrem mais comumente nos compostos formando intermediários e transformando-os são: Hidrogenação, Dimetilação, Dihidroilação, Deamoniação e Descarboxilação. Desta forma, estudando os metabólitos gerados na degradação do cloridrato de tetraciclina pela enzima laccase, Shao e colaboradores (2019) identificaram que as maiores reações de transformação ocorridas são as de Dimetilação e Dihidroilação. Yang e colaboradores (2017) também utilizando a enzima laccase projetaram seu mecanismo de degradação baseado em seus produtos intermediários. E, assim como Llorca e colaboradores (2015) identificaram as reações de oxidação seguida da dimetilação e dehidrogenação. No entanto, diferente da enzima laccase, a enzima glucose oxidase não atua sobre a tetraciclina diretamente. As reações intermediárias que ocorrem são relacionadas à reação de Fenton. Na FIGURA 21 observa-se um cromatograma onde se verifica a formação de possíveis intermediários da reação caracterizado pela formação de picos menores antes e após o tempo de retenção específico da tetraciclina.

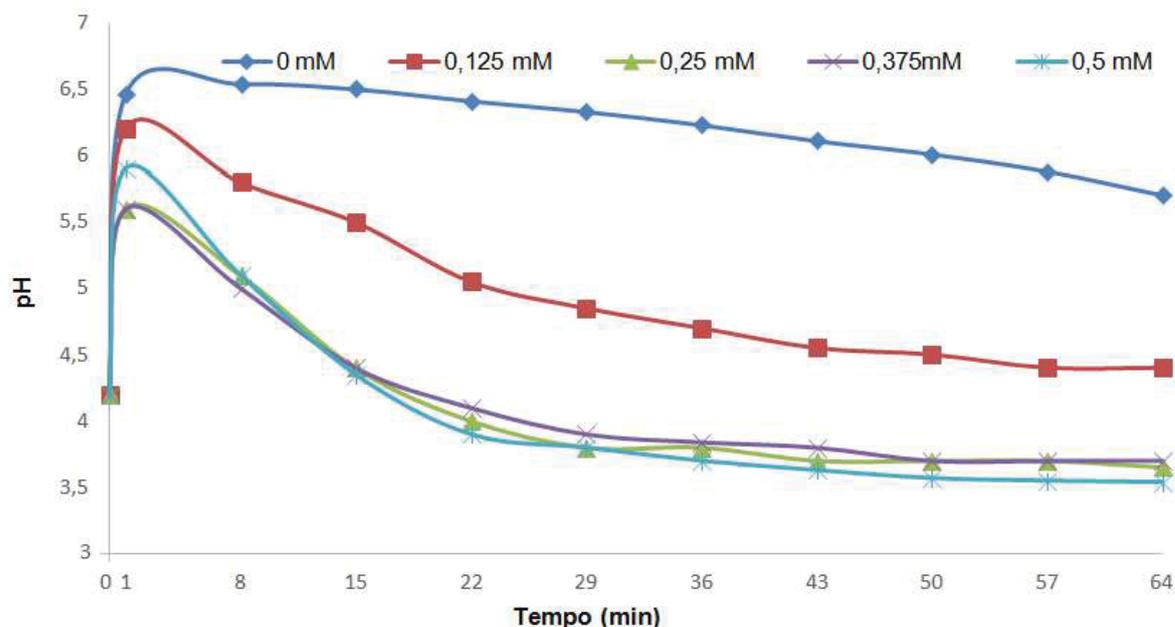
FIGURA 21 -CROMATOGRAMA COM INTERMEDIÁRIOS DA DEGRADAÇÃO DA TETRACICLINA



Condições iniciais: [TC] =  $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ ; Temperatura  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ; pH natural (4,2), [FeSO<sub>4</sub>] =  $0,25 \text{ mM}$ , [dextrose anidra] =  $150 \text{ mg L}^{-1}$ , [GOx] =  $83 \text{ mg L}^{-1}$ , [tampão fosfato] =  $5 \text{ mM}$ . Tempo: 64 minutos.  
 FONTE: O autor (2020).

As contribuições da formação de ácido glucônico e da hidrólise dos íons ferrosos na diminuição do pH durante as reações ficam evidenciadas na FIGURA 22.

FIGURA 22 - MONITORAMENTO DO pH DURANTE A VARIAÇÃO DO FERRO.



Condições iniciais: [TC] = 20,0 mg L<sup>-1</sup>; Temperatura 31 °C; pH natural (4,2), [dextrose anidra]= 75 mg L<sup>-1</sup>, [GOx]= 40 mg L<sup>-1</sup>, [tampão fosfato]= 5 mM. FONTE: O autor (2020).

Na menor concentração de ferro a variação de pH também é menor quando comparada as concentrações de 0,25 mM a 0,5 mM, as quais apresentam redução do pH similar. Por outro lado, no experimento controle feito na ausência de ferro a diminuição de pH é bem menos pronunciada. Assim, embora possa ter algum efeito da formação de ácido glucônico, evidenciada no experimento controle (sem ferro), esses dados corroboram com a hipótese de que está ocorrendo a hidrólise do Fe<sup>2+</sup> (Equação 11) a qual provoca redução maior do pH nos tratamentos em que se utilizou sulfato ferroso.

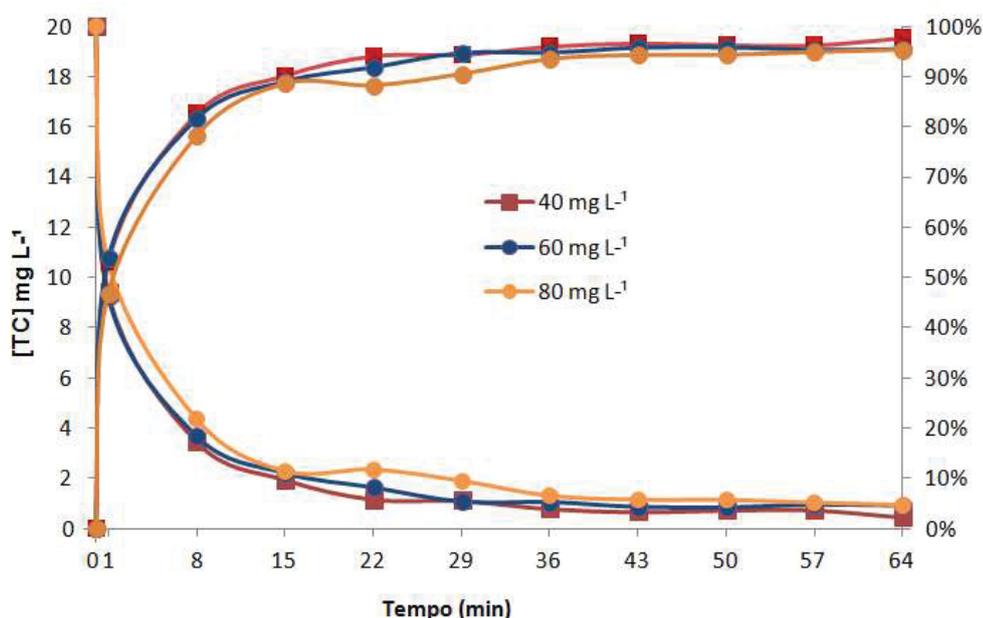
Assim, por considerar satisfatórios os resultados obtidos quando se utilizou a concentração de 0,25 mM de sulfato ferroso, bem como atender a legislação brasileira vigente sobre qualidade de efluentes, definiu-se seguir os experimentos nesta condição.

#### 4.5 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA SOBRE A REAÇÃO

A enzima é responsável juntamente com a dextrose e oxigênio molecular pela produção de peróxido. E esse por sua vez, reage com os íons ferro II gerando hidroxilas livres, as quais atuam sobre os contaminantes, degradando-os. No entanto, quando o  $H_2O_2$  está em excesso compete com o composto-alvo pelo radical hidroxila e quando em baixas concentrações diminui a formação deste radical e consequentemente pode prejudicar a eficiência do tratamento (DOMÈNECH; JARDIM; LITTER, 2001). Assim, a concentração da enzima pode interferir diretamente sobre a reação de Bio-Fenton devido ao seu fornecimento de peróxido.

Desta forma o estudo do efeito de sua concentração é necessário, buscando conhecer se o seu aumento ou diminuição podem gerar ou não impacto na reação, fornecendo-se a mesma quantidade de substrato. Para isso, avaliou-se três concentrações de enzima ( $40, 60$  e  $80 \text{ mg L}^{-1}$ ) nos experimentos de degradação de tetraciclina (FIGURA 23) onde a concentração de substrato foi fixada ( $75 \text{ mg L}^{-1}$ ).

FIGURA 23 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA NA DEGRADAÇÃO DE TC.



Condições iniciais: [TC] =  $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ ; Temperatura  $31 \text{ }^\circ\text{C}$ . pH natural (4,2),  $[\text{FeSO}_4] = 0,25 \text{ mM}$ , [dextrose anidra] =  $75 \text{ mg L}^{-1}$ ; [tampão fosfato] =  $5 \text{ mM}$ . FONTE: O autor (2020).

Nas condições de ensaio avaliadas para a concentração de enzima, houve pouca diferença no percentual de degradação da TC, variando de 89 a 91% ao final de 64 minutos. Ao longo do tempo a menor concentração de enzima  $40 \text{ mg L}^{-1}$

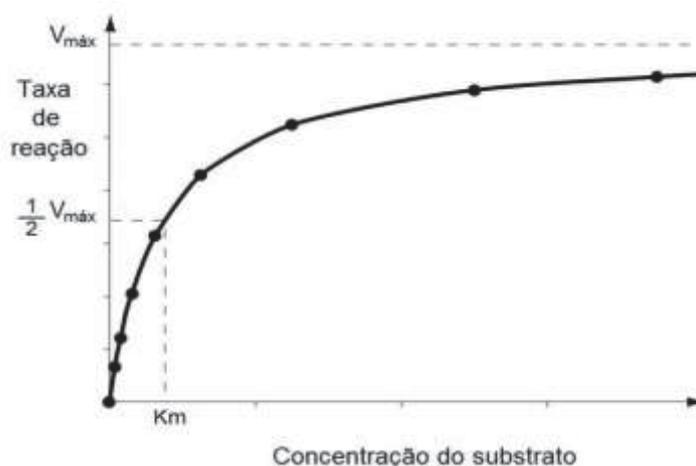
apresenta melhores valores de degradação, seguido da concentração intermediária e maior que alcançaram mesmo valor. Assim, verificando-se que a maior quantidade de glucose oxidase não propiciou melhores resultados de degradação torna tal dado interessante economicamente, visto que pode contribuir com um menor custo à reação.

Com isso, ponderando os resultados apresentados, considera-se que a quantidade de substrato utilizada está adequada a concentração de  $40 \text{ mg L}^{-1}$  de enzima. Mas também é possível que para a quantidade de substrato disponibilizada nestes experimentos a concentração de enzima citada ainda esteja em excesso.

#### 4.6 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO DA ENZIMA SOBRE A REAÇÃO

A produção do peróxido de hidrogênio é proporcional à concentração do substrato da enzima na reação, a qual alcança valor máximo de acordo com o modelo de cinética enzimática de Michaelis-Menten (FIGURA 24), dada pela Equação 13. Onde  $V$  é a razão inicial da reação ou a velocidade (mole/tempo),  $[S]$  a concentração molar do substrato, e  $V_{\text{max}}$  é a velocidade máxima alcançada com a maior concentração de substrato quando todas as moléculas da enzima estão ocupadas, e  $K_m$  é a constante de Michaelis-Menten (mesma unidade da concentração) (REUVENI, URBAKH, KLAFTER, 2014).

FIGURA 24 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO COMPORTAMENTO DE UMA ENZIMA QUE OBEDECE ÀS LEIS DE MICHAELIS-MENTEN



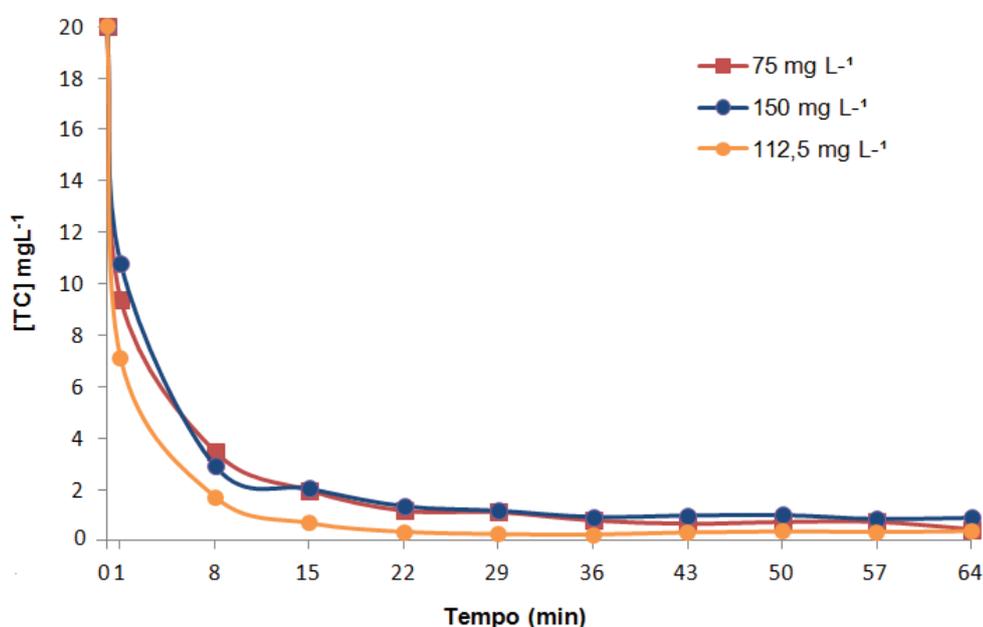
Fonte: Aragão (2011).

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_m + [S]}$$

(Equação 13)

Assim, a fim de se conhecer a atuação da enzima na degradação quando exposta sob diferentes concentrações de substrato, disponibilizou-se três concentrações de dextrose anidra  $75 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $112,5 \text{ mg L}^{-1}$  e  $150 \text{ mg L}^{-1}$  para uma concentração fixa de enzima de  $40 \text{ mg L}^{-1}$ . O efeito destas concentrações na degradação da tetraciclina pode ser visualizado na FIGURA 25.

FIGURA 25 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DEXTROSE ANIDRA NA DEGRADAÇÃO DE TC



Condições iniciais:  $[TC] = 20 \text{ mg L}^{-1}$ ; Temperatura  $31 \text{ }^\circ\text{C}$ . pH natural (4,2),  $[\text{FeSO}_4] = 0,25 \text{ mM}$ ,  $[\text{GOx}] = 40 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $[\text{tampão fosfato}] = 5 \text{ mM}$ . FONTE: O autor (2020).

Observou-se que o incremento de dextrose no meio propiciou aumento na degradação da tetraciclina no primeiro minuto, onde a concentração de dextrose intermediária atingiu velocidade de  $11,53 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , seguido da concentração menor ( $9,18 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ), e da concentração de  $150 \text{ mg L}^{-1}$  que resultou em  $7,75 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . Assim, já em 8 minutos de reação, 76%, 85% e 79% da tetraciclina já havia sido degradada, utilizando  $75 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $112,5 \text{ mg L}^{-1}$  e  $150 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente. E, ao final do experimento os percentuais de degradação entre as quantidades de dextrose menores ficaram próximos (91 e 92%), enquanto que na maior concentração foi inferior (89%), mas também satisfatória.

Isso pode ter ocorrido devido à enzima já apresentar seus sítios ativos saturados, onde o incremento de disponibilidade de substrato não promoveu o aumento de sua atuação para fornecimento de peróxido a reação de Fenton. Por outro lado se a enzima estiver apta a utilizar todo esse substrato adicionado, outra possibilidade que pode ter ocorrido é uma produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em excesso, a qual pode ocasionar efeito sequestrante (MOHEY, LIBRA, WIESMANN, 2003). Uma alternativa para este caso seria um sistema contínuo de alimentação de dextrose no meio reacional, desde que mantidas as formas ferrosas durante o processo (DURIGAN; VAZ; PERALTA-ZAMORA, 2012).

Segundo Kahoush e colaboradores (2018), médias a altas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podem levar a ocorrência da reação de formação de radicais hidroxiperoxil (HO<sub>2</sub>•) (Equação 14). Esses, tendem a se recombinar uns com os outros reformando o peróxido de hidrogênio (Equação 15) que segue a reação de Fenton, mas afetando sua eficiência global (GLIGOROVSKI et al., 2015). Quando o radical hidroxiperoxil não se recombina, pode atuar sobre os compostos alvo de degradação, no entanto sua habilidade é menor pois possui potencial de oxidação de 1,7 V, inferior quando comparado ao radical hidroxila (E<sup>0</sup>=2,8 V) (HULING e PIVETZ, 2006).



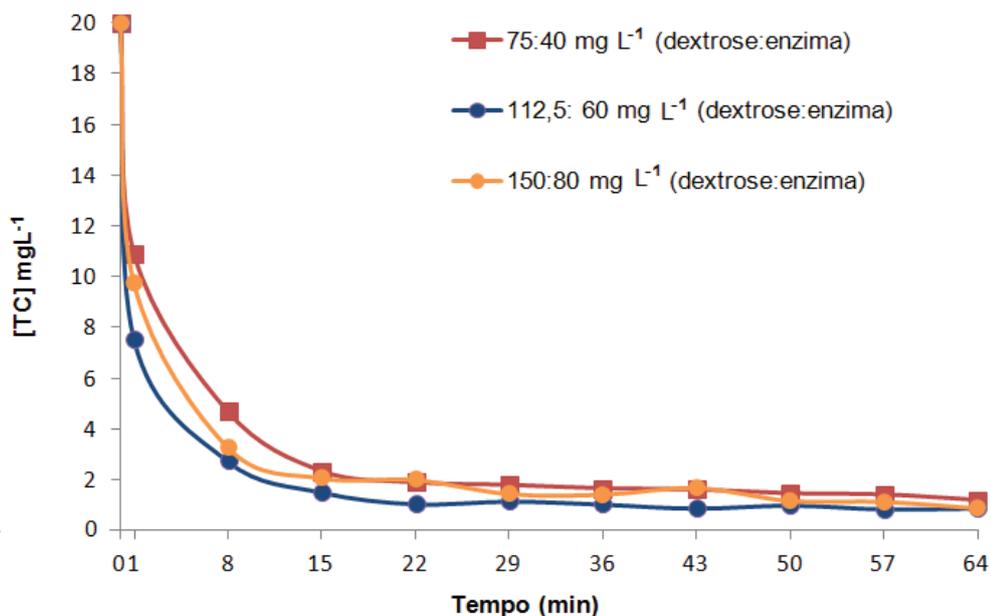
Assim, os resultados obtidos nesta avaliação contribuem para confirmação de que foi adequado o cálculo teórico realizado para definir a quantidade de dextrose a ser disponibilizada para a enzima atuar.

#### 4.7 EFEITO DO AUMENTO DA PROPORÇÃO FIXA DE ENZIMA:SUBSTRATO SOBRE A REAÇÃO

Baseado nos resultados anteriores dos estudos individuais da enzima e substrato, considerando que a proporção 75:40 (dextrose:enzima) foi adequada a reação, investigou-se também se o maior fornecimento conjunto de ambos poderia promover melhor degradação. Desta forma, avaliou-se a utilização de três

tratamentos de dextrose:enzima: 75:40 ; 112,5: 60 e 150:80 ( $\text{mg L}^{-1}$ ), onde os resultados podem ser observados na FIGURA 26.

FIGURA 26 - EFEITO DO AUMENTO DA PROPORÇÃO FIXA DE ENZIMA:SUBSTRATO SOBRE A REAÇÃO



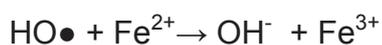
Condições iniciais:  $[\text{TC}] = 20 \text{ mg L}^{-1}$ ; Temperatura  $31 \text{ }^\circ\text{C}$ . pH natural (4,2),  $[\text{FeSO}_4] = 0,25 \text{ mM}$ ,  $[\text{tampão fosfato}] = 5 \text{ mM}$ . FONTE: O autor (2020).

Quando se estudou o efeito da variação da concentração de enzima em conjunto com a disponibilidade de substrato, notou-se um comportamento interessante, visto que, a condição intermediária ao longo do tempo foi a que apresentou os melhores resultados de degradação ao longo do tempo. Esta condição atingiu 80% de degradação em 8 minutos, seguido da maior concentração (150:80 dextrose:enzima) que alcançou 83%, e da menor que atingiu 82%.

Ao final, a menor quantidade de enzima e dextrose gerou menor degradação atingindo 88%, mas o contrário não ocorreu. Tanto a proporção dextrose:enzima 112,5:60 quanto a 150:80 alcançaram 89% de degradação. Desta forma pode-se dizer que a adição conjunta de maiores quantidades de enzima e substrato, ocasionar maior degradação até certa proporção. A partir de um momento o aumento desses componentes não proporciona melhoria, gerando inclusive piores condições de processo em alguns casos. Eskandarian e colaboradores (2013) estudando a degradação do corante Azo 113 azul ácido pela reação de Bio-Fenton

concluíram que acima de 3000 UL<sup>-1</sup> de glucose oxidase, a remoção do corante diminui.

Dentre as explicações para esse comportamento pode estar a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em excesso, que conforme já citado anteriormente pode ocasionar efeito sequestrante dos radicais disponíveis (MOHEY, LIBRA, WIESMANN, 2003). Outra questão pode estar relacionada à falta de Fe<sup>2+</sup> no meio na mesma proporção demandada pela reação (DURIGAN; VAZ; PERALTA-ZAMORA, 2012). Kahoush e colaboradores (2018) ainda citam que uma atividade enzimática excessiva pode propiciar uma geração elevada de radicais HO●, que atuam sobre os íons Fe(II) (Equação 16), reduzindo a disponibilidade dos radicais para atuar sobre os compostos-alvo.



(Equação 16)

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo foi possível demonstrar a degradação de tetraciclina em água pelo processo Bio-Fenton utilizando como biocatalisador a enzima glucose oxidase. Dentre as condições de Bio-Fenton testadas, alcançou-se em 8 minutos percentuais de degradação que variaram de 66,4% a 84,9%. Já após 64 minutos obteve-se uma melhoria dos resultados atingindo 85,9% a 92,4% de degradação.

Pode ser demonstrado que fatores como pH e temperatura do meio impactam na cinética da reação de degradação. Os ensaios em que não houve ajuste de pH e naqueles em que o pH foi ajustado para 6, resultaram maiores percentuais de degradação de TC do que nos ensaios em pH 3. Já entre as temperaturas testadas identificou-se uma relação positiva, onde maiores temperaturas alcançaram maiores velocidades de degradação inicial. No entanto, como as temperaturas de 31 °C  $\pm$  1°C e 37 °C  $\pm$  1°C alcançaram percentuais de degradação final similares aponta-se a temperatura de 31 °C  $\pm$  1°C como mais indicada para a reação.

Em relação ao efeito da concentração de ferro sobre a reação, observou-se uma tendência de aumento da degradação à medida que mais ferro foi disponibilizado até a concentração de 0,25 mM. Acima disso, os resultados não foram proporcionalmente superiores, o que é interessante para atendimento à legislação relacionada à disposição de efluentes.

Quanto à influência da concentração da enzima e do substrato demonstrou-se que a proporção entre os reagentes da reação foi adequado nas concentrações testadas, atingindo valores finais de degradação variando entre 88,8 e 91,7%. Já em relação à disponibilização ao meio de maiores concentrações de ambas associadas, não se observou melhorias ou resultados inferiores nas condições testadas.

Assim, considerando as condições e variáveis testada, sugere-se a utilização das seguinte condição de operação do processo de Bio-Fenton para tetraciclina: Temperatura 31 °C; pH natural (4,2), [FeSO<sub>4</sub>] = 0,25 mM, [dextrose anidra] = 75 mg L<sup>-1</sup>, [GOx] = 40 mg L<sup>-1</sup>, [tampão fosfato] = 5 mM.

É importante destacar que as contribuições deste trabalho vão muito além da busca por percentuais de degradação satisfatórios. A elucidação e o entendimento do mecanismo químico em conjunto com o enzimático da reação de Bio-Fenton aplicada à tetraciclina também devem ser considerados. Além disso, os

dados científicos gerados fomentam a temática ambiental na busca por métodos biotecnológicos para degradação de contaminantes.

## 5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Neste trabalho todas as variáveis estudadas (pH, temperatura, concentração de ferro, concentração de enzima e concentração de substrato) foram avaliadas de forma separada ou dois a dois. No entanto em um bioprocessamento, é importante que seja avaliadas as variáveis atuando concomitantemente. Assim, para trabalhos futuros sugere-se a realização dos experimentos baseados em um planejamento experimental.

Sugere-se realizar a quantificação de peróxidos para conhecer o comportamento da reação de produção e consumo do mesmo neste processo, bem como realizar a monitoria e quantificação dos ácidos carboxílicos intermediários formados.

Também é importante a realização da análise de Carbono Orgânico Total (COT) para verificar se além da degradação do contaminante também se alcançou a remoção da matéria orgânica do resíduo. No entanto essa análise representa um desafio no bio-fenton pela utilização de dextrose e enzima, visto que também seriam contabilizados na carga orgânica.

Além disso, estudar o efeito da concentração de tetraciclina na degradação, bem como aplicar a reação de Bio-Fenton em efluentes para verificar se há interferentes de grande impacto a reação.

Outra sugestão é que em futuros estudos verifique se é possível obter resultados similares ou melhores com concentrações de enzima inferiores a 40 mg L<sup>-1</sup>.

E por fim, baseado em resultados positivos obtidos para tetraciclina, sugere-se testar a mesma reação com outros contaminantes.

## REFERÊNCIAS

- ACHARYA, M. R. et al. Chemically modified tetracyclines as inhibitors of matrix metalloproteinases. *Drug Resistance Updates*, v. 7, n. 3, p. 195-208, 2004.
- ADAMS, C. et al. Specificity of Glucose Oxidase ' Glucose oxidase was initially described by Miiller in 1925 ( 1 ). This enzyme catalyzes the aerobic oxidation of glucose to gluconic acid and hydrogen peroxide. The enzyme is early penicillin investigations and only after. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 239, n. 1, p. 3927–3934, 1960.
- AFSHAR, K. et al. Diet-specific salivary gene expression and glucose oxidase activity in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Journal of Insect Physiology*, v. 56, p. 1798–1806, 2010.
- AHMAD, A.; AKHTAR, M.S.; BHAKUNI, V. Monovalent cation-Induced conformational change in glucose oxidase leading to a stabilization of the enzyme. *Biochemistry*, p.1945–1955, 2001.
- AHMED, I.; IQBAL, H. M. N.; DHAMA, K. Enzyme-based biodegradation of hazardous pollutants – an overview .*Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences* . , v. 5, n. 2320, 2017.
- Al, Z. et al. Fe@Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> core-shell nanowires as iron reagent. agent. 1. Efficient degradation of rhodamine B by a novel sono-Fenton process. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 111 p. 4087–4093, 2007.
- AKHTAR, M.S.; AHMAD, A.; BHAKANI, V. Divalent cation induced changes in structural propertie sof the dimeric enzyme glucose oxidase: duel effect of dimer stabilization and dissociaion with loss of cooperative interactions in enzyme monomer. *Biochemistry*, v. 41, p. 7142–7149, 2002.
- ALI, S. et al. Integrated desizingebleachingereactive dyeing process for cotton towel using glucose oxidase enzyme. *Journal of Cleaner Production*, v. 66, p. 562-567, 2014.
- ARAGÃO, C. de B. P. de. Cinética da enzima alfa-galactosidase A e investigação de doença de Fabry em pacientes hemodialisados. 93 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular). Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.
- AZANU, D. et al. Occurrence and risk assessment of antibiotics in water and lettuce in Ghana. *Science of the Total Environment*, v. 622, p. 293-305, 2018.

BACKHAUS, T.; GRIMME, L.H. The toxicity of antibiotic agents to the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Chemosphere*, v. 38, n. 14, p. 3291-3301, 1999.

BAI, X. et al. Occurrence, distribution, and seasonality of emerging contaminants in urban watersheds. *Chemosphere*, v. 200, p. 133-142, 2018.

BANKAR, S. B. et al. Glucose oxidase - An overview. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 4, p. 489–501, 2009. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.003>>.

BAO, J. et al. Competitive inhibition by hydrogen peroxide produced in glucose oxidation catalyzed by glucose oxidase. *Biochemical Engineering Journal*. v. 13, p. 69-72, 2003.

BARCELLOS, D. da S.; BOLLMANN, H. A.; AZEVEDO, J. C. R. de. Prioritization of pharmaceuticals in urban rivers: the case of oral contraceptives in the Belém River basin, Curitiba / PR, Brazil. *Revista Ambiente & Água.*, v. 14, n. 3, p. 2334, mai., 2019. Disponível em <<https://doi.org/10.4136/ambi-agua.2334>>.

BARHOUMI, N. et al., Enhanced degradation of the antibiotic tetracycline by heterogeneous electro-Fenton with pyrite catalysis, *Environ. Chem. Lett.* 15 (2017) 689–693.

BARR, L. et al. Measurement of paraben concentrations in human breast tissue at serial locations across the breast from axilla to sternum. *Journal of Applied Toxicology*, v. 32, n. 3, p. 219–232, 2012.

BARRIOS-ESTRADA, C.; et al. Emergent contaminants: Endocrine disruptors and their laccase-assisted degradation – A review. *Science of the Total Environment*, v. 612, p. 1516–1531, 2018.

BAUTITZ, I. R.. Degradação de tetraciclina utilizando o processo foto-fenton. 87 f. Dissertação (Mestrado em Química) Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2006.

BAZEI, B. C. Degradação do antibiótico tetraciclina em matriz aquosa por processos oxidativos avançados. 110 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Ambientais). Campus Medianeira, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2019.

BEAN, R.C.; HASSID, W.Z. Carbohydrate oxidase from a red alga, *Iridophycus flaccidum*, *Journal of Biological Chemistry.*, v. 218, p. 425–436, 1956.

BEAN, R.C.; PORTER, G.G.; STEINBERG, B.M. Carbohydrate metabolism of citrus fruits: II. oxidation of sugars by an anerohydrogenase from young orange fruits, *Journal of Biological Chemistry.* v. 236, p. 1235–1240, 1961.

BERGMAN, Å. et al. The impact of endocrine disruption: a consensus statement on the state of the science. *Environmental Health Perspectives*. v. 121, n. 4, p. a104, 2013.

BHANDARI, S. K.; NYACHOTI, C. M.; KRAUSE, D. O. Raw potato starch in weaned pig diets and its influence on postweaning scours and the molecular microbial ecology of the digestive tract. *Journal of Animal Science*., v. 87, p. 884-893, 2008. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.2527/jas.2007-0747>>.

BILAL, M. et al.. Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradarion – A review. *Environment International*, v. 124, n. Jan, p. 336-353, 2019. Elsevier.

BISOGNIN, R. P.; WOLFF, D. B.; CARISSIMI, E. Revisão sobre fármacos no ambiente. *Revista DAE*. v. 66, n. 210, p.78-95, jun. 2018.

BOGER, B. et al. Micropoluentes emergentes de origem farmacêutica em matrizes aquosas do Brasil: uma revisão sistemática. *Ciência e Natura Santa Maria*, v. 37, n. 4, p. 725-739, 2015.

BONET A. et al. Glucose oxidase effect on dough rheology and bread quality: a study from macroscopic to molecular level. *Food Chem*, v. 99, p. 408–15, 2006.

BOUR, A. et al. Environmentally relevant approaches to assess nanoparticles ecotoxicity: a review *Journal of Hazardous Materials*, v. 283, p. 764-777, 2015.

BRACK, W. et al. Towards the review of the European Union Water Framework management of hemical contamination in European surface water resources. *Science of the total environment*, v. 37, p. 576-720, 2017.

BRADEL, B.G.; PREIL W.; JESKE H. Remission of the free-branching attern of *Euphorbia pulcherrima* by tetracycline treatment. *Journal of Phytopathology*, v. 148, p. 587-590, 2000.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria n.º 2.914, de 12 de Dezembro de 2011. Dispõe sobre normas de potabilidade de água para o consumo humano. Brasília: SVS, 2011. Disponível em: <[https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914\\_12\\_12\\_2011.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html)>.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional de Recursos Hídricos. Resolução 15 de 11 de janeiro de 2001. Estabelece diretrizes gerais para a gestão das águas subterrâneas. Disponível em: <<http://www.sema.df.gov.br/wp-content/uploads/2017/09/Resolu%C3%A7%C3%A3o-CNRH-n%C2%BA-15-de-2001.pdf>>.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18/03/2005b, p. 58-63 Disponível em:

<<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. RESOLUÇÃO CONAMA nº 358, de 29 de abril de 2005 Dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 04/05/2005a, Seção 1, o 63-65 Disponível em:

<<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=462>>.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 430 de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16/05/2011, p. 89 Disponível em:

<<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>.

BRUSSEAU, M.L. et al. Source-zone characterization of a chlorinated-solvent contaminated Superfund site in Tucson, AZ. *Journal of Contaminant Hydrology.*, v. 90 n. 1-2, p. 21-40, 2007.

CANESI, L. et al. Effects of blood lipid lowering pharmaceuticals (bezafibrate and gemfibrozil) on immune and digestive gland functions of the bivalve mollusc, *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere*, v. 69, p. 994–1002, 2007.

CHANG, Q. et al. Enzymatic removal of chlorophenols using horseradish peroxidase immobilized on superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/graphene oxide nanocomposite. *Chinese Journal of Catalysis.*, v. 36, n. 7, p. 961-968, 2015.

CHEN, H. et al. Characterization of antibiotics in a large-scale river system of China: occurrence pattern, spatiotemporal distribution and environmental risks. *Science of the Total Environment*, v. 618, p. 409-418, 2018.

CHEN, K.; ZHOU, J. Occurrence and behavior of antibiotics in water and sediments from the Huangpu River, Shanghai, China. *Chemosphere*, v. 95, p. 604-612, 2014.

CHEN, T. et al. A miniature biofuel cell. *Journal of the American Chemical Society*, v. 123, p. 8630, 2001.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 65, n. 2, p. 232–260, 2001.

CHUDOBOVA I. et al. Fibre optic biosensor for the determination of D-glucose based on absorption changes of immobilized glucose oxidase. *Analytica Chimica Acta*, v. 319, n. 1, p. 103–110, 1996.

COLAÇO, R. et al.. Poluição por resíduos contendo compostos farmacêuticos ativos: aspectos ambientais, geração a partir de esgoto doméstico e a situação do Brasil. *Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. v. 35, n. 4, p. 539-548, 2015.

CRUEGER, A.; CRUEGER, W. Glucose transforming enzymes. In: FOGARTY, W. M.; KELLY, C. T. (Ed.). *Microbial Enzymes and Biotechnology*. New York: Elsevier, 1990. p. 177-226.

DAÂSSI, D. et al. Degradation of bisphenol A by different fungal laccases and identification of its degradation products. *International Biodeterioration & Biodegradation*., v. 110, p. 181–188, 2016.

DENG, W.-J.; LI, N.; YING, G.-G. Antibiotic distribution, risk assessment, and microbial diversity in river water and sediment in Hong Kong. *Environmental Geochemistry and Health*, p. 1-13, 2018.

DHAKA, S. et al. Aqueous phase degradation of methyl paraben using UV-activated persulfate method. *Chemical Engineering Journal*., v. 321, p. 11–19, 2017.

DINH, Q.T. et al. Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC–MS/MS. *Talanta*, v. 85 n. 3, p. 1238-1245, 2011.

DOMÈNECH, X.; JARDIM, W. F.; LITTER, M. I. Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes. *Eliminación de contaminantes por fotocatalisis heterogénea*, v. 1, p. 3-26, 2001.

DREWES, J.E. Removal of pharmaceutical residues during wastewater treatment. *Comprehensive Analytical Chemistry*, v. 50, p. 427–449, 2007. Elsevier Inc.

DUARTE, H. Ferro – Um Elemento Químico Estratégico Que Permeia História, Economia E Sociedade. *Química Nova*, v. 42, n. 10, p. 1146–1153, 2019.

DUGGAR, B. M. Aureomycin, a product of the continuing search for new antibiotics. *Annals of the New York Academy of Science*, v. 51, p. 177, 1948.

DURIGAN, M. A. B.; VAZ, S. R.; PERALTA-ZAMORA, P. Degradação de poluentes emergentes por processos fenton e foto-fenton. *Química Nova*, v. 35, n. 7, p. 1381-1387, 2012.

EBELE, J. A.; ABDALLAH, A-E, M.; HARRAD, S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerging Contaminants*, v. 3, n. 1, p. 1-16, mar. 2017.

EBRAHIEM, E.E.; AL-MAGHRABI, M.N.; MOBARKI, A.R. Removal of organic pollutants from industrial wastewater by applying photo-Fenton oxidation technology. *Arabian Journal of Chemistry*, 2013. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.06.012>>.

EL-DEIN, A. M.; LIBRA, J. A.; WIESMANN, U. Mechanism and kinetic model for the decolorization of the azo dye Reactive Black 5 by hydrogen peroxide and UV radiation. *Chemosphere*, v. 52, n. 6, p. 1069-1077, 2003.

ELHAMI, V; KARIMI, A.; AGHBOLAGHY, M, Preparation of heterogeneous bio-Fenton catalyst for decolorization of Malachite Green. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 56, p. 154-159, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2015.05.006>>.

EPA - United States Environmental Protection Agency. Aquatic Life criteria for contaminants of emerging concern. . Part I: general challenges and recommendations. USEPA. OW/ORD Emerging Contaminants Workgroup. 2008. Disponível em:< <https://www.epa.gov/wqc/contaminants-emerging-concern-including-pharmaceuticals-and-personal-care-products>>.

EPA - United States Environmental Protection Agency – USEPA. National Primary Drinking Water Regulations., EPA 816-F-09-004, mai. 2009.

EPA - United States Environmental Protection Agency – USEPA. <https://www.epa.gov/> Acesso 15 de novembro de 2020.

ESKANDARIAN, M. et al. Bio-Fenton process for Acid Blue 113 textile azo dye decolorization: characteristics and neural network modeling. *Desalination and Water Treatment*. v. 52, p. 4990–4998, 2013. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1080/19443994.2013.810325>>.

ETEMADZADEH, H.; AINAMO, J.; MURTOMAA, H. Plaque growth-inhibiting effects of an abrasive fluoride–chlorhexidine toothpaste and a fluoride toothpaste containing oxidative enzymes. *Journal of Clinical Periodontology* v. 7, p. 607–16, 1985.

FELIS, E. et al. Antimicrobial pharmaceuticals in the aquatic environment - occurrence and environmental implications. *European Journal of Pharmacology*, v. 866, p. 1-15, 2020.

FENTON, H. J. H. Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *Journal of Chemical Society*, v. 65, p. 899-910, 1894.

FINLAY, A. C. et al. Terramycin, a new antibiotic. *Science*, v. 111, p. 85, 1950.

FORAN, C.M.; BENNETT, E.R.; BENSON, W.H. Developmental evaluation of a potential non-steroidal estrogen: triclosan. *Marine Environmental Research*, v. 50, n. 1, p. 153–156, 2000.

FRANKE, W.; DEFFNER, M. Zur Kenntnis der sog. Glucose-oxydase. II. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, v. 541, p. 117–150, 1939.

GAGO-FERRERO, P.; DÍAZ-CRUZ, M.S.; BARCELÓ, D. Occurrence of multiclass UV filters in treated sewage sludge from wastewater treatment plants *Chemosphere*, v. 84, n. 8, p. 1158-1165, 2011.

GAMA, M. G. Processos Fenton como Alternativa na Remoção de Interferentes Endócrinos e outros Micropoluentes Ambientais. *Revista Virtual de Química*, v. 4, n. 6, p. 777-787, nov. 2012.

GEE, R.H. et al. Oestrogenic and androgenic activity of triclosan in breast cancer cells. *Journal of Applied Toxicology*, v. 28, n. 1, p. 78–91, 2008.

GHELFI, A. Efeitos toxicológicos do diclofenaco em peixes *Rhamdia quelen*. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação). Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

GLIGOROVSKI, S. et al. Environmental implications of hydroxyl radicals ( $\cdot\text{OH}$ ), *Chemical Reviews*, v. 115, p. 13051–13092, 2015. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1021/cr500310b>>.

GOGATE, P.R.; PANDIT, A.B. A review of imperative technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions. *Advances in Environmental Research*, v. 8, p. 501-551, 2004.

GÓMEZ-CANELA, C. et al. Analysis of 44 pharmaceuticals consumed by elderly using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.168, p. 55-63, 2019.

GONZALEZ-MARTINEZ, A. et al. Effect of ciprofloxacin antibiotic on the partial-nitrification process and bacterial community structure of a submerged biofilter. *Science of the Total Environment*, v. 476, p. 276-287, 2014.

GUO, T. et al. A novel  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3@g\text{-C}_3\text{N}_4$  catalyst: synthesis derived from Fe-based MOF and its superior photo-Fenton performance. *Applied Surface Science*, v. 469, p. 331–339, 2019.

HAAP, T.; TRIEBSKORN, R.; KOHLER, H.R. Acute effects of diclofenac and DMSO to *Daphnia magna*: immobilisation and Hsp70- induction. *Chemosphere*, v. 73, p. 353–359, 2008.

HABER, F.; WEISS, J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society A*, v. 134, p. 332-351, 1934.

HALLING-SORENSEN, B. et al.. Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. *Journal Antimicrob Chemother*, v. 46, p. 53-58, 2000.

HAMEED, B.H.; LEE, T.W. Degradation of malachite green in aqueous solution by Fenton process, *Journal of Hazardous Materials*, v. 164, p. 468–472, 2009. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.08.018>>.

HARNISZ, M.; KORZENIEWSKA, E.; GOŁAŚ, I. The impact of a freshwater fish farm on the community of tetracycline-resistant bacteria and the structure of tetracycline resistance genes in river water. *Chemosphere*, v. 128, p. 134-141, 2015.

HAVELKOVA, B. et al.. Ecotoxicity of selected antibiotics for organisms of aquatic and terrestrial ecosystems. *Neuro Endocrinology Letters*, v. 37, n. 1, p. 38–44, 2016.

HERNEY-RAMÍREZ, J.; MADEIRA, L.M. Use of pillared clay-based catalysts for wastewater treatment through Fenton-like processes. *Pillared Clays and Related Catalysts*, Springer, New York, NY, p. 129–165, 2010.

HUANG, Y. et al. Glucose oxidase modified Fenton reactions for in-situ ROS generation and potential application in groundwater remediation. *Chemosphere*, v. 253, p. 126648, 2020. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126648>>.

HULING, S.; PIVETZ, B. Engineering Issue Paper: In-Situ Chemical Oxidation. *Engineering*, p. 1–60, 2006.

ISAKSEN, A.; ADLER-NISSEN, J. Antioxidative Effect of Glucose Oxidase and Catalase in Mayonnaises of Different Oxidative Susceptibility. II. Mathematical Modelling. *LWT - Food Science and Technology*, v. 30, n. 8, p. 847-852, 1997. Disponível em <<https://doi.org/10.1006/fstl.1997.0284>>.

IURASCU, B. et al. Phenol degradation in water through a heterogeneous photo-Fenton process catalyzed by Fe-treated laponite. *Water Research*, v. 43, p. 1313-1322, 2009.

JAHANGIRI, E. et al. Laccase-and electrochemically mediated conversion of triclosan:metabolite formation and influence on antibacterial activity. *Chemosphere*, v. 168, p. 549–558, 2017.

JIANG, Y. et al. Distribution and ecological risk of antibiotics in a typical effluent–receiving river (Wangyang River) in north China. *Chemosphere*, v. 112, p. 267-274, 2014.

KABIR, E.R.; RAHMAN, M.S.; RAHMAN, I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology Pharmacology*, v. 40, n. 1, p. 241–258, 2015.

KAHOUSH, M. et al. Bio-Fenton and Bio-electro-Fenton as sustainable methods for degrading organic pollutants in wastewater. *Process Biochemistry*, v. 64, n. September 2017, p. 237–247, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.10.003>>.

KALISZ, H. M. et al. Effects of carbohydrate depletion on the structure, stability and activity of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochim Biophys Acta* 1991;1080(2):138–42.

KALISZ, H. M.; HENDLE, J.; SCHMID, R. D. Structural and biochemical properties of glycosylated and deglycosylated glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 47, n. 5, p. 502–507, 1997.

KARIMI, A. et al. Use of Enzymatic Bio-Fenton as a New Approach in Decolorization of Malachite Green. *The ScientificWorld Journal*, 2012. 691569.0.1100/2012/691569.

KASAI, K. et al. Guanosine tetra- and pentaphosphate synthase activity in chloroplasts of a higher plant: association with 70S ribosomes and inhibition by tetracycline. *Nucleic Acids Research*, v. 32, p. 5732-5741, 2004.

KATZUNG, B. G. *Farmacologia básica & clínica*. 6. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1998. p. 529-532.

KEILIN, D.; HARTREE, E.F. Specificity of glucose oxidase (notatin). *Biochemical Journal*, v. 50, p. 331–341, 1952.

KELLY, K.R.; BROOKS, B.W. Global aquatic hazard assessment of ciprofloxacin: exceedances of antibiotic resistance development and ecotoxicological thresholds. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, v. 159, p. 59-77, 2018.

KHALIL, N. et al. Bisphenol A and cardiometabolic risk factors in obese children. *Science of the Total Environment*, v. 470, p. 726–732, 2014.

KHATAEE, A. et al. Electrochemical generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> using immobilized carbon nanotubes on graphite electrode fed with air: investigation of operational parameters. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 659, p. 63–68, 2011.

KLAPER, R.; WELCH, L. C. Emerging contaminant threats and the Great Lakes: existing science, estimating relative risk and determining policies. *Alliance for the Great Lakes*, 2011.

KLEPPE, K. The effect of hydrogen peroxide on glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochemistry*, v. 5, p. 139–143, 1966.

- KOLPIN, D. W. et al. Pharmaceuticals, hormones and other organic wastewater contaminants in U.S streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environmental Science and Technology*, v. 36, p. 1202-1211, 2002.
- KUMAR, M. et al. Antibiotics bioremediation: perspectives on its ecotoxicity and resistance. *Environmental International*, v. 124, p. 448-461, 2019.
- LEE, D.G. et al. Biodegradation of triclosan by a wastewater microorganism. *Water Research*, v. 46, n. 13, p. 4226–4234, 2012.
- LEGRINI, O.; OLIVEROS, E.; BRAUN, A. M. Photochemical processes for water treatment. *Chemical Reviews*, v. 93, p. 671-698, 1993.
- LEITE, G. S.; AFONSO, R. J. C. F.; AQUINO, S. F. Characterization of contaminants present in sewage treatment plants, by liquid chromatography high resolution tandem mass spectrometry. *Química Nova*, v. 33, n. 3, p. 734-738, 2010.
- LI, X.Y. et al. Toxic effects of 1-methyl-3-octylimidazolium bromide on the early embryonic development of the frog *Rana nigromaculata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 72, n. 2, p. 552-556, 2009.
- LIU, H et al. The occurrence of chloramphenicol and tetracyclines in municipal sewage and the Nanming River, Guiyang City, China. *Journal of Environmental Monitoring*, v. 11 n. 6, p. 1199-1205, 2009.
- LIU, S. et al. Purification and characterization of glucose oxidase of *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 53, p. 123–132, 1998.
- LLORCA, M. et al. Identification of new transformation products during enzymatic treatment of tetracycline and erythromycin antibiotics at laboratory scale by an on-line turbulent flow liquid-chromatography coupled to a high resolution mass spectrometer LTQ-Orbitrap. *Chemosphere*, v. 119, p. 90-98, 2015.
- LOCATELLI, M. A. F.; SODRÉ, F. F.; JARDIM, W. F. Determination of antibiotics in brazilian surface waters using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 60, n. 3, p. 385–393, 2011.
- LUNDEN, T. et al. Influence of oxytetracycline and oxolinic acid on the immuneresponse of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunology*, v. 8, n. 3, p. 217-230, 1998.
- LÜTZHØFT, H.H.; HALLING-SØRENSEN, B.; JØRGENSEN S.E. Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 36, p. 1-6, 1999.

MANO, N. Engineering glucose oxidase for bioelectrochemical applications. *Bioelectrochemistry*, v. 128, p. 218–240, 2019. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2019.04.015>>.

MANSILLA, H.D.; et al.. Homogeneous and heterogeneous advanced oxidation of a bleaching effluent from the pulp and paper industry. *Wat. Sci. Tech.*, v. 35, n. 4, p. 273-278, 1997.

MARCO-URREA, E. et al. Dechlorination of 1, 2, 3- and 1, 2, 4-trichlorobenzene by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Journal of Hazardous Materials*, v. 166, n. 2, p. 1141–1147, 2009.

MARTELL, A. E.; SMITH, R. M.; MOTEKAITIS, R. J.; *Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes*. College Station, v. 46, 1997.

MOCKTAR, C. et al. Complexity and diversity of  $\beta$ -lactamase expression in inhibitor-resistant *Escherichia coli* from public hospitals in KwaZulu-Natal, South Africa. *Southern African Journal of Epidemiology and Infection*, v. 24, n. 4, p. 29-33, 2009.

MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. D. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: Cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. *Química Nova*, v. 40, n. 9, p. 1094–1110, 2017.

MOTTA, V. T. *Bioquímica*. EDUCS. 332 p., 1991.

MULLER, D. Oxidation von glukose mit extraktten aus *Aspergillus niger*, *Biochemische Zeitschrift*, v.199, p. 136–170, 1928.

MULROY, A. Antibiotic contaminant of surface water and groundwater may be promoting the development of drug-resistant pathogens. *Water Environment and Technology*, v. 13, p. 32-36, 2001.

MUNARI, M.; et al. Seawater acidification and emerging contaminants: A dangerous marriage for haemocytes of marine bivalves. *Environmental Research*, v. 175, n. February, p. 11–21, 2019. Elsevier Inc. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.04.032>>.

NAKAYAMA, S.F. et al. Worldwide trends in tracing poly-and perfluoroalkyl substances (PFAS) in the environment. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 121, p. 115410, 2019.

NIDHEESH, P.; GANDHIMATHI, R. Trends in electro-Fenton process for water and wastewater treatment: an overview. *Desalination*, v. 299, p. 1–15, 2012.

NORVILL, Z.N.; SHILTON, A.; GUIEYSSE, B. Emerging contaminant degradation and removal in algal wastewater treatment ponds: identifying the research gaps. *Journal of Hazardous Materials*, v. 313, p. 291-309, 2016.

NUNES, B. et al. Acute effects of tetracycline exposure in the freshwater fish *Gambusia holbrooki*: antioxidant effects, neurotoxicity and histological alterations. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 68, n. 2, p. 371–381, 2015.

OSEGUEDA O. et al. In situ generation of hydrogen peroxide in catalytic membrane reactors. *Catalysis Today*, v. 193, p. 128-136, 2012.

OTURAN, N.; OTURAN, M.A. Electro-Fenton process: background, new developments, and applications. *Electrochemical Water and Wastewater Treatment*, p. 193–221, 2018. Elsevier Inc. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813160-2.00008-0>>.

PAILLER, J.-Y. et al. Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg. *Science of the Total Environment*, v. 407, n. 16, p. 4736-4743, 2009.

PANIZZA, M.; CERISOLA, G. Direct and mediated anodic oxidation of organic pollutants. *Chemical Reviews*, v. 109, p. 6541–6569, 2009.

PEREIRA-MAIA, E. C. et al. Tetraciclina e gliciliclinas: uma visão geral. *Química Nova*, v. 33, n. 3, p. 700–706, 2010.

PETRIE, B.; BARDEN, R.; KASPRZYK-HORDERN, B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Research*, v. 72, p. 3-27, 2015.

PICKERING, G.J.; HEATHERBELL, D.A.; BARNES, M.F. Optimising glucose conversion in the production of reduced alcohol wine using glucose oxidase. *Food Research International*, v. 31, n. 10, p. 685-92, 1998.

PIGNATELLO, J. J. Dark and photoassisted Fe<sup>+3</sup>- catalyzed degradation of chlorophenoxy herbicides by hydrogen peroxide. *Environmental Science and Technology*, v. 26, p. 944-951, 1992.

PIGNATELLO, J. J.; OLIVEROS, S. E.; MACKAY, A. Advanced oxidation processes of organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 36, p. 1-84, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10643380500326564>>.

POLLOCK, T.; WEAVER, R.E.; GHASEMI, R. Butyl paraben and propyl paraben modulate bisphenol A and estradiol concentrations in female and male mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 325, p. 18–24, 2017.

POMATI F. et al. Effects of a complex mixture of therapeutic drugs at environmental levels on human embryonic cells. *Environmental Science Technology*, v. 40, p. 2442–2447, 2006.

QUINN, B.; GAGNÉ, F.; BLAISE, C. An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuata*. *Science of the Total Environment*, v. 389, p. 306–314. 2008.

RAIZADA, P. et al. Zero valent iron-brick grain nanocomposite for enhanced solar-Fenton removal of malachite green. *Separation and Purification Technology*, v. 133, p. 429-437, 2014.

RANDO, D.; KOHRING, G.; GIFFHORN, F. Production, purification and characterization of glucose oxidase from a newly isolated strain of *Penicillium pinophilum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 48, p. 34-40, 1997.

REUVENI, S.; URBAKH, M.; KLAFTER, J. Role of substrate unbinding in Michaelis-Menten enzymatic reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, p. 4391–4396, 2014.

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

RODRIGUEZ-NARVAEZ, O. M. et al. Treatment technologies for emerging contaminants in water: a review. *Chemical Engineering Journal*, v. 323, p. 361-380, 2017.

ROGERS, M.J.; BRANDT, K.G. Interaction of halides ions with *Aspergillus niger* Glucose oxidase. *Biochemistry*, v. 10, p. 4630–4635, 1971.

ROMO-RODRÍGUEZ, P. et al. Cr(VI) reduction by gluconolactone and hydrogen peroxide, the reaction products of fungal glucose oxidase: Cooperative interaction with organic acids in the biotransformation of Cr(VI). *Chemosphere*, v. 134, p. 563–570, 2015.

SAGAR, J. et al. Does Doxycycline work in synergy with cisplatin and oxaliplatin in colorectal cancer? *World journal of surgical oncology*, v. 7, n. 1, p. 2, 2009.

SCHNITZLER, J.G. et al. Triclosan exposure results in alterations of thyroid hormone status and retarded early development and metamorphosis in *Cyprinodon variegatus*. *Aquatic Toxicology*, v. 181, p. 1–10, 2016.

SEMASHKO, T.V.; MIKHAILOVA, R.V.; EREMIN, A.N. Extracellular glucose oxidase of *Penicillium funiculosum* 46.1. *Applied Biochemistry Microbiology*, v. 39, p. 368–374, 2003.

SHAKERIAN, F.; ZHAO, J.; LI, S. P. Recent development in the application of immobilized oxidative enzymes for bioremediation of hazardous micropollutants – A review. *Chemosphere*, v. 239, p. 124716, 2020. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124716>>.

SHAO, B. et al. Immobilization of laccase on hollow mesoporous carbon nanospheres: noteworthy immobilization, excellent stability and efficacious for antibiotic contaminants removal. *Journal of Hazardous Materials*, v. 362, p. 318-326, 2019.

SHIN, K.-S. et al. Purification and characterization of d-glucose oxidase from white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *European Journal of Biochemistry*, v. 215, p. 747–75, 1993.

SIDDIQUE, S.; KUBWABO, C.; HARRIS, S. A. A review of the role of emerging environmental contaminants in the development of breast cancer in women. *Emerging Contaminants*, v. 2, n. 4, p. 204–219, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.emcon.2016.12.003>>.

SIFAKIS, S. et al. Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 51, p. 56–70, 2017.

SILVA, R. F de. Avaliação de risco ambiental de fármacos. 222f. Tese (Doutorado em Sistemas de Gestão Sustentáveis) – Escola de Engenharias, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2019.

SIMPSON, C. et al. Isolation, purification and characterization of a novel glucose oxidase from *Penicillium* sp. CBS 120262 optimally active at neutral pH. *Protein Expression and Purification*, v. 51, n. 2, p. 260–266, 2007.

SIRES, I. et al. Catalytic behavior of the Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup> system in the electro-Fenton degradation of the antimicrobial chlorophene. *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 72, p. 382-394, 2007.

SOUSA, D. R. T. de. Produção de Glicose Oxidase (E.C. 1.1.3.4) por fungos isolados da Floresta Amazônica. 115 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia BIONORTE, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2017.

STEPHENS, C.R. et al. Acidity constants of the tetracycline antibiotics. *Journal of the American Chemical Society*, v. 78, n. 16, p. 4155-4158, 1956.

SUBEDI, B. et al. Emission of artificial sweeteners, select pharmaceuticals, and personal care products through sewage sludge from wastewater treatment plants in Korea. *Environment International*, v. 68, p. 33-40, 2014.

SUTHERLAND, D. L.; RALPH, P. J. Microalgal bioremediation of emerging contaminants – Opportunities and challenges. *Water Research*, v. 164, n. Jul, p. 114921, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.114921>>.

TAVARES, W. Manual de antibióticos para o estudante de medicina. 3. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1986. p. 255-265.

TONGBU, L. et al. The production of glucose oxidase using the waste myceliums of *Aspergillus niger* and the effects of metal ions on the activity of glucose oxidase. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 19, p. 339–342, 1996.

TRAN, N.H.; REINHARD, M.; GIN, K.Y.H. Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions-a review. *Water Research*, v. 133, p. 182-207, 2018.

TSE, L.A. et al. Bisphenol A and other environmental risk factors for prostate cancer in Hong Kong. *Environment International*, v. 107, p. 1–7, 2017.

TZANOV T. et al. Hydrogen peroxide generation with immobilized glucose oxidase for textile bleaching. *Journal of Biotechnology*, v. 93, p. 87-94, 2002.

UTSET, A.; LOPEZ, T.; DIAZ, M. A comparison of soil maps, kriging and a combined method for spatially predicting bulk density and field capacity of ferralsols in the Havana–Matanzas Plain. *Geoderma*, v. 96, n. 3, p. 199-213, 2000.

VALCÁRCEL, Y. et al. Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the Madrid region (Spain) and potential ecotoxicological risk. *Chemosphere*, v. 84, p. 1336-1348, jun. 2011.

VAN DEN BRANDHOF, E.J., MONTFORTS, M. Fish embryotoxicity of carbamazepine, diclofenac and metoprolol. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 73, p. 1862–1866, 2010.

VANNINI, C. et al. Effects of a complex mixture of therapeutic drugs on unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Aquatic Toxicology*, v. 101, p. 459-465, 2011.

VODOPIVEC, M. et al. Application of convective interaction media disks with immobilized glucose oxidase for on-line glucose measurements. *Analytica Chimica Acta*, v. 407, p. 105-110, 2000.

WANG, I.J.; CHEN, C.Y.; BORNEHAG, C.G. Bisphenol A exposure may increase the risk of development of atopic disorders in children. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v. 219, n. 3, p. 311–316, 2016.

WATKINSON et al. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: from wastewater to drinking water. *Science of the Total Environment*, v. 407, n. 8, p. 2711-2723, 2009.

WEN, X.; JIA, Y.; LI, J. Degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude lignin peroxidase prepared from *Phanerochaete chrysosporium* - A white rot fungus. **Chemosphere**, v. 75, n. 8, p. 1003–1007, 2009. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.01.052>>.

WILLIAMS, R.T.; COOK, J.C. Exposure to Pharmaceuticals Present in the Environment. *Drug information journal: DIJ/Drug Information Association*, v. 41, n. 2, p. 133-141, 2007

WOHLFAHRT, G. et al. 1.8 and 1.9 Å resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidases as a basis for modelling substrate complexes. *Acta Crystallographica*, v. 55, p. 969-77, 1999.

WOHLFAHRT, G. et al. The chemical mechanism of action of glucose oxidase from *Aspergillus niger*, *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 260, p. 69–83, 2004.

WOLLENBERGER, L.; HALLING-SØRENSEN, B.; KUSK, K. O. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. *Chemosphere*, v. 40, p. 723-730, 2000.

XIAO, K. et al. Citric acid assisted Fenton-like process for enhanced dewaterability of waste activated sludge with in-situ generation of hydrogen peroxide. *Water Research*, v. 140, p. 232-242, 2018.

YANG, L.H. et al. Growthinhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 27, p. 1201–1208, 2008.

YANG, Y. et al. Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: a review. *Science of the Total Environment*, v. 596, p. 303-320, 2017.

YI, L. et al. Rapid nitrogen-rich modification of *Calotropis gigantea* fiber for highly efficient removal of fluoroquinolone antibiotics. *Journal of Molecular Liquids*, v. 256, p. 408–415, 2018.

YOUNGHEE, K. et al. Aquatic Toxicity of Acetaminophen, Carbamazepine, Cimetidine, Diltiazem and Six Major Sulfonamides, and Their Potential Ecological Risks in Korea. *Environment international*, v. 33, n. 3, p. 370-375, 2007.

YU, F.; WANG, Y.; MA, H. Enhancing the yield of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from oxygen reduction reaction performance by hierarchically porous carbonmodified active carbon fiber as an effective cathode used in electro-Fenton. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 838, p. 57–65, 2019.

YU, X.; et al. Enhanced catalytic performance of a bio-templated TiO<sub>2</sub> UV-Fenton system on the degradation of tetracycline. *Applied Surface Science*, v. 465, n. September 2018, p. 223–231, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.09.145>>.

ZEBA, Z. Overview of  $\beta$ -lactamase incidence on bacterial drug resistance. *African Journal of Biotechnology*, v. 4, n. 13, 2005.

ZERAIK, A.E.; SOUZA, F.S.; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. *Química Nova*, v.31, p.731-734, 2008.

ZIA, M. A.; et al. Thermal Characterization of Purified Glucose Oxidase from A Newly Isolated *Aspergillus Niger* UAF-1. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 41(2), 132–138. <https://doi.org/10.3164/jcbn.2007018> (Retraction published *J Clin Biochem Nutr.* v. 47, n. 3, p. 268, nov. 2010).

ZUO, Y.; HOIGNE, J. Formation of hydrogen peroxide and depletion of oxalic acid in atmospheric water by photolysis of iron(III)-oxalate complexes. *Environmental Science and Technology*, v. 26, p. 1014-1022, 1992.

## ANEXO 1 – CERTIFICADO DE ANÁLISE DA TETRACICLINA



## CERTIFICADO DE ANÁLISE

<b>Insumo:</b>	Tetraciclina Hcl	<b>Data de Análise:</b>	16-10-2018
<b>Lote Interno:</b>	18J04-B032-039582	<b>Lote Fabricante:</b>	S201804004
<b>Data de Fabricação:</b>	27-04-2018	<b>Data de Validade:</b>	06-05-2022
<b>Origem:</b>	Coreia Do Sul	<b>Procedência:</b>	China
<b>Condições de Armazenamento:</b>	Temperatura Ambiente	<b>Ordem de Fracionamento:</b>	039582

<b>DCB:</b>	08465	<b>DCI:</b>	-
<b>CAS:</b>	64-75-5	<b>Peso Molecular:</b>	480,8985
<b>Fórmula Molecular:</b>	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> .ClH		

Testes	Especificações	Resultados	Unidade	Referências
Descrição *	Pó cristalino, amarelo.	Conforme		EP - 9
Identificação *	(A): CCD- A mancha principal obtida no cromatograma da solução teste é similar em posição e tamanho com a mancha principal da solução padrão.	Conforme		EP - 9
Identificação *	(B): Colorimétrica - a solução torna-se amarela.	Conforme		EP - 9
Identificação *	(C): Positivo para cloreto.	Conforme		EP - 9
Solubilidade *	Solúvel em água, pouco solúvel em etanol 96% e praticamente insolúvel em acetona.	Conforme		EP - 9
Solubilidade *	Dissolve em soluções de hidróxidos alcalinos e carbonatos. As soluções em água tornam-se turvas em repouso, devido à precipitação da tetraciclina.	Conforme		EP - 9
pH *	1,8 - 2,8 (Solução 1 %)	2,51		EP - 9
Perda por Dessecação *	<= 2,0 (1g/ 60 °C/ a vácuo com pentóxido de fósforo/ 3 horas)	0,54	%	EP - 9
Cinzas Sulfatadas *	<= 0,5	0,06	%	EP - 9
Rotação Específica *	- 240 a - 255 (Base seca)	-249,70	°	EP - 9
Substâncias Relacionadas(HPLC)	Impureza A <= 3,0	2,3	%	EP - 9
Substâncias Relacionadas(HPLC)	Impureza B <= 1,5	0,5	%	EP - 9
Substâncias Relacionadas(HPLC)	Impureza C <= 0,5	0,2	%	EP - 9
Substâncias Relacionadas(HPLC)	Impureza D <= 0,5	Não detectado	%	EP - 9
Solvente Residual(CG) *	Butanol <= 5000	4828,80	ppm	EP - 9
Solvente Residual(CG) *	Acetona <= 100	63,31	ppm	EP - 9
Teor (HPLC) *	95,0 - 102,0 (Base seca)	97,49	%	EP - 9
Testes Microbiológicos				
Contagem total de bactérias *	<= 1000	< 10	UFC/g	Fabricante



## CERTIFICADO DE ANÁLISE

Insumo:	Tetraciclina Hcl	Data de Análise:	16-10-2018
Lote Interno:	18J04-B032-039582	Lote Fabricante:	S201804004
Data de Fabricação:	27-04-2018	Data de Validade:	06-05-2022
Origem:	Coreia Do Sul	Procedência:	China
Condições de Armazenamento:	Temperatura Ambiente	Ordem de Fracionamento:	039582

DCB:	08465	DCI:	-
CAS:	64-75-5	Peso Molecular:	480,8985
Fórmula Molecular:	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> .ClH		

Testes	Especificações	Resultados	Unidade	Referências
Fungos e Leveduras *	≤ 100	< 10	UFC/g	Fabricante
Escherichia coli *	Negativo	Negativo		Fabricante
Teste Adicional				
Densidade Aparente *	Informativo (sem compactação)	0,73	g/mL	MGFB - V

\* Resultados obtidos em análises realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA. E os demais foram transcritos conforme certificado de análise do fabricante.

### Conclusão:

Aprovado (X)  
Reprovado ( )



Farmacêutico Responsável  
João Paulo Sertão Mendes  
CRF-GO: Nº 7.355  
Fagrin Services Brasil

*Luiza C. de O. Costa*

Farmacêutico Responsável  
Luiza C. de O. Costa  
CRF-SP: Nº 74.121  
Via Farma  
SAC: (11) 4785-5643

Fim do Documento