

DEGRADAÇÃO DE DOXICICLINA PELO PROCESSO OXIDATIVO DE FENTON

A. A. BORGHI, M. S. A. PALMA

Universidade de São Paulo, Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
E-mail para contato: msapalma@usp.br

RESUMO – A Doxíciclina é um antibiótico da família das Tetraciclinas, de amplo espectro, presente em efluentes industriais, domésticos e provenientes de áreas rurais. Seu principal inconveniente no meio ambiente é a potencialização do surgimento de bactérias resistentes a ele. Os experimentos foram realizados conforme um planejamento experimental tipo DCCR, sendo estudadas as influências da temperatura ($T = 0$ a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$), concentração inicial de H_2O_2 ($C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 100$ a 900 ppm) e de Fe^{2+} ($C_{\text{Fe}^{2+}} = 5$ a 120 ppm) sobre a concentração residual final de Doxíciclina e Carbono Orgânico Total. Para a análise da concentração do fármaco residual foi utilizado o método espectrofotométrico. As concentrações residuais de Doxíciclina variaram de $0,0$ a $55,8\text{ ppm}$. O processo é incapaz de reduzir o TOC além de 30% , desta forma deixando no efluente moléculas orgânicas, as quais se mostraram não tóxicas através de testes de citotoxicidade com *Escherichia coli*. A melhor condição operacional foi $T = 35,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 611\text{ ppm}$ e $C_{\text{Fe}^{2+}} = 25\text{ ppm}$. O processo é pouco influenciado pela temperatura, razoavelmente influenciado pela concentração de íon ferroso e bastante influenciado pela concentração de peróxido de hidrogênio.

1. INTRODUÇÃO

A principal via de entrada de fármacos no meio ambiente é através do esgoto doméstico, tratados ou não. No entanto, também se deve considerar os efluentes das indústrias farmacêuticas e químico-farmacêuticas, descarte inadequado de medicamentos vencidos, efluentes das zonas rurais e a presença de antibióticos no estrume animal utilizado para fertilização do solo (Aga, 2008). O consumo mundial de antibióticos aumentou drasticamente na última década e desta forma cresceu também a sua excreção na sua forma original e de seus metabólitos. A maior parte dos antibióticos ingeridos não são totalmente metabolizados por seres humanos e animais e assim cerca de 25 a 75% dos antibióticos pode deixar o organismo em sua forma inalterada (Khan e Ongerth, 2004; Watkinson *et al.*, 2009; Rivas *et al.*, 2011). A Doxíciclina pertence à família das tetraciclinas e são o segundo grupo de antibióticos mais produzidos e consumidos em todo o mundo (Gu e Karthikeyan, 2005; Borghi e Palma, 2014). As tetraciclinas são consideradas antibióticos seguros e tem muitas propriedades favoráveis, tais como o amplo espectro de atividade, baixa toxicidade, baixo custo, e pode, na maioria dos casos, ser administrado por via oral (Jeong *et al.*, 2010). Os efeitos colaterais mais comuns são náuseas, vômitos e diarreia. A única restrição ao seu uso é por mulheres grávidas e crianças durante o crescimento devido a sua deposição nos ossos e calcificação de dentes. Os efeitos menos comuns são

fotosensibilidade induzida, urticária, dor de cabeça, dor abdominal, hipertensão, febre, leve leucopenia, anemia e trombocitopenia. Pacientes que tomam insulina devem ter acompanhamento especial, uma vez que as tetraciclina podem aumentar a persistência de insulina no organismo e, por isto, exigem maior acompanhamento (Zhanel *et al.*, 2004). Além da utilização em seres humanos, as tetraciclina são usadas na terapia animal para tratar infecções e promover o crescimento. Oxitetraciclina e clortetraciclina são dois dos dez antimicrobianos autorizados nos Estados Unidos como promotores de crescimento para bovinos (Jeong *et al.*, 2010). As tetraciclina são o terceiro antibiótico mais consumido, depois da penicilina e quinolonas e devido ao seu uso indiscriminado tem sido detectado um número crescente de bactérias resistentes às tetraciclina (Pereira-Maia *et al.*, 2010). O fenômeno da resistência bacteriana é na verdade hoje em dia uma grande preocupação, pois há cepas resistentes a quase todos os antibióticos atualmente conhecidos (Rocha *et al.*, 2011). O presente trabalho tem como objetivo estudar a degradação da Doxíciclina pelo processo Fenton e otimizar as condições experimentais (temperatura, concentração inicial de peróxido de hidrogênio e concentração inicial de ion ferroso) para se obter a menor concentração residual final de Doxíciclina e de Carbono Orgânico Total (TOC). Também são apresentados os resultados de citotoxicidade dos resíduos. Este trabalho dá continuidade ao trabalho já publicado de Borghi *et al.*, (2012).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Equipamento

A aparelhagem experimental utilizada nos ensaios consistiu de banho termostatzado, refrigerador, béqueres, balões volumétricos, balança semi-analítica, filtros, agitadores mecânicos, termopares, pHmetro, buretas e espectrofotômetro.

O esquema do equipamento utilizado está mostrado na Figura 1.

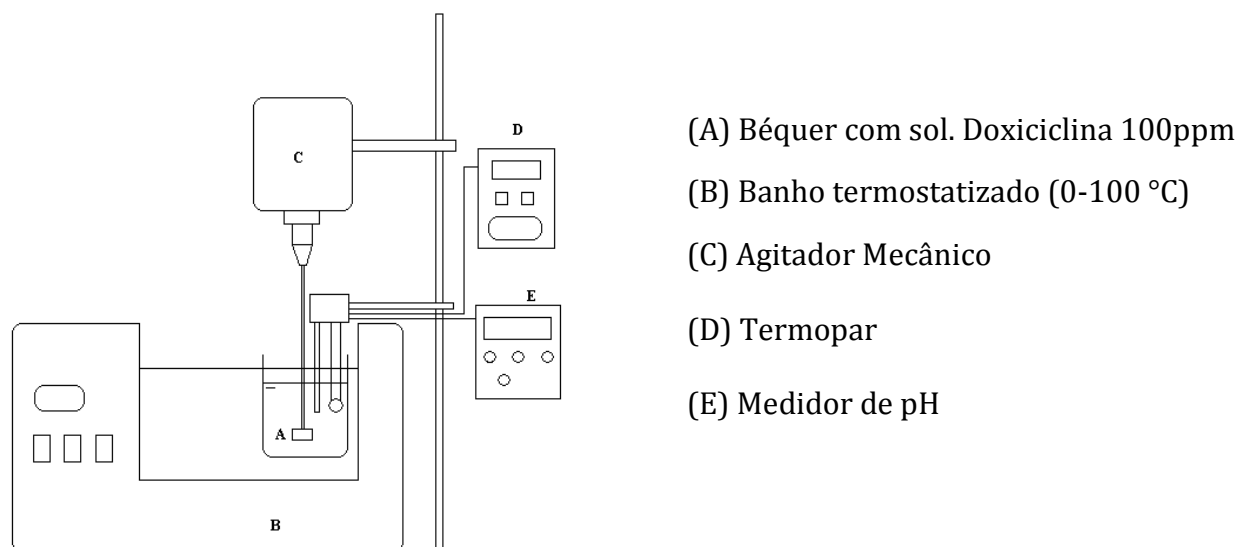


Figura 1 – Equipamento experimental para os ensaios de oxidação por Processo Fenton.

O béquer (A) contendo a solução aquosa de hclato de doxiciclina 100 mg/L ficava imerso em um banho termostatzado (B) com temperatura ajustável entre 0 e 100°C. O béquer dispunha de um agitador mecânico (C), um termopar (D), um medidor de pH (E). Nas dosagens e amostragens utilizaram-se micropipetas de 0 a 20, 20 a 200 e de 100 a 1000 µL.

2.2. Planejamento Experimental

Os ensaios de oxidação da Doxiciclina foram realizados de acordo com planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional, DCCR (Barros Neto *et al.*, 2002; Rodrigues e Iemma, 2005).

Os valores das variáveis estudadas estão discriminados na Tabela 1. O planejamento completo foi apresentado anteriormente (Borghi *et al.*, 2012).

Tabela 1 - Variáveis estudadas codificadas

Variáveis	-1,68	-1	0	+1	+1,68
$C_{Fe^{+2}}$ (ppm), X_1	5	28,3	62,5	96,7	120
$C_{H_2O_2}$ (ppm), X_2	100	262	500	738	900
T (°C), X_3	0,0	8,0	20,0	32,0	40,0

2.3. Ensaio

Transferia-se 200 mL de solução de Doxiciclina 100 ppm para béquer coberto e envolto com papel alumínio, protegido da luz ambiente, colocava-se este béquer em banho termostatzado na temperatura estabelecida no planejamento experimental (0, 8,0, 20,0, 32,0 ou 40,0 °C) sob agitação com agitador mecânico, quando atingida a temperatura desejada dentro do béquer, adicionava-se a este a solução de Sulfato Ferroso de modo que a concentração de Fe^{2+} no meio tivesse o valor desejado (5, 28,3, 62,5, 96,7 ou 120 ppm) e um volume de Peróxido de Hidrogênio necessário para que a concentração no meio tivesse o valor desejado (100, 262, 500, 738 ou 900 ppm).

O ensaio era iniciado com a adição do peróxido de hidrogênio, quando então o cronômetro era disparado e coletavam-se alíquotas em tempos pré-determinados.

2.4. Análises Químicas

Determinação espectrofotométrica da concentração de Doxiciclina: Os íons de ferro podem interferir na análise, sendo necessária a sua remoção do meio. Outro interferente nesta análise é o peróxido de hidrogênio que reage com o íon molibdato formando um complexo amarelo, resultando em um falso incremento nos resultados. Nesta quantificação foi necessário o uso de uma solução inibidora do sistema Fenton proposto por Mota *et. al.* (2005). Esta solução era composta de iodeto de potássio, sulfito de sódio e hidróxido de sódio em meio aquoso.

Coletava-se em frasco contendo 1mL da solução inibidora do sistema Fenton, 1mL de alíquota do meio reacional. Homogeneizava-se e filtrava-se com filtro de 0,45µm acoplado a seringa, coletando o filtrado em frasco de vidro.

Transferia-se 1mL do filtrado para balão volumétrico de 5mL e adicionava-se a este 1mL de solução Na_2MoO_4 5×10^{-3} M, 0,5mL de NaNO_3 1 M e 0,5mL de solução tampão acetato 0,01 M, pH 5,0. Avolumava-se o balão com água destilada e homogeneizava-se.

Transferia-se para uma cubeta de vidro de 1cm e efetuava-se a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 390 nm. Paralelamente eram preparadas soluções de calibração para determinação da concentração de Doxiciclina por comparação.

Carbono orgânico total: Para adequação da amostra, adicionava-se 3,5 mL de solução inibidora do sistema Fenton a 3,5 mL do meio reacional. Esta mistura era filtrada com filtro de acetato de celulose 0,45 µm diretamente para um vial e a este se adicionava 5 gotas de H_2SO_4 1:5, garantindo pH na faixa entre 2,0 e 3,0. Com auxílio de filme plástico, a abertura do vial era selada, possibilitando a homogeneização e posterior determinação no equipamento COT-5000A (Shimadzu), localizado no Centro de Sistemas de Engenharia Química – CESQ do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Oxidação de doxiciclina

Os resultados dos ensaios segundo o planejamento DCCR já foram publicados anteriormente (Borghi *et al.*, 2012) e não serão mostrados aqui. Observou-se uma grande variação nos resultados de $C_{\text{Doxi,Residual}}$ que variaram de 0 a 55,8 mg/L. Casualmente os menores valores, 0 a 2 ppm, que foram obtidos para o ponto central ($T = 20^\circ\text{C}$, $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 500$ ppm e $C_{\text{Fe}^{2+}} = 62,5$ ppm). Estes resultados também mostraram que o planejamento utilizado contemplou condições operacionais que influenciaram significativamente a variável dependente.

Os resultados foram tratados com o Software Statística[®] e mostraram que apenas a concentração de peróxido de hidrogênio (variável codificada X_2) ($p < 0,05$). Os valores finais de TOC não foram influenciados significativamente por T , $C_{\text{H}_2\text{O}_2}$ e $C_{\text{Fe}^{2+}}$, e apresentaram uma queda máxima de 30%.

De acordo com Pandey *et al.* (2000), a melhor condição operacional também pode ser estimada através da aplicação das derivadas parciais da equação da superfície, gerada pelo software Statística[®], em relação a X_1 , X_2 e X_3 e que, quando igualadas a zero, fornecem o mínimo da função.

Através da resolução do sistema de equações algébricas lineares obtidas determinou-se a melhor condição operacional para se obter a concentração residual mínima de Doxiciclina, resultando em $C_{\text{Fe}^{2+}} = 25$ ppm, $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 611$ ppm e $T = 35^\circ\text{C}$. Esta condição operacional foi admitida como o ponto de partida para se efetuar um estudo paramétrico das variáveis, cujas condições experimentais e resultados estão mostradas nas Figuras 2 a 4.

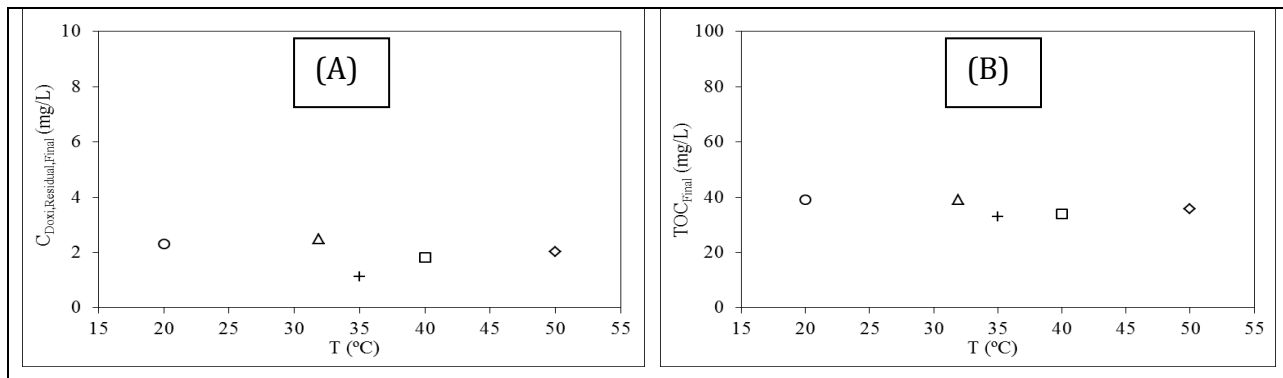


Figura 2 - Influência da temperatura sobre (A) $C_{Doxi,Residual,Final}$ e (B) TOC_{Final}

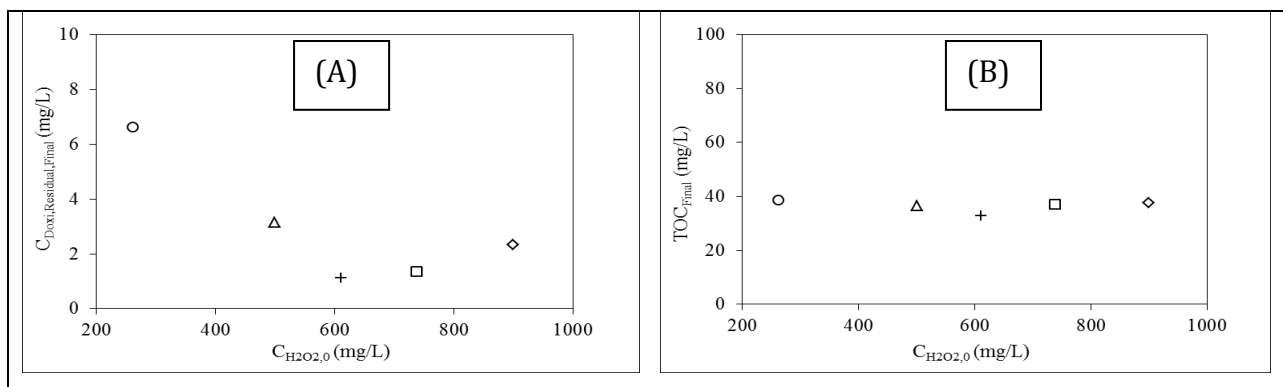


Figura 3 - Influência da concentração inicial de peróxido de hidrogênio sobre (A) $C_{Doxi,Residual,Final}$ e (B) TOC_{Final}

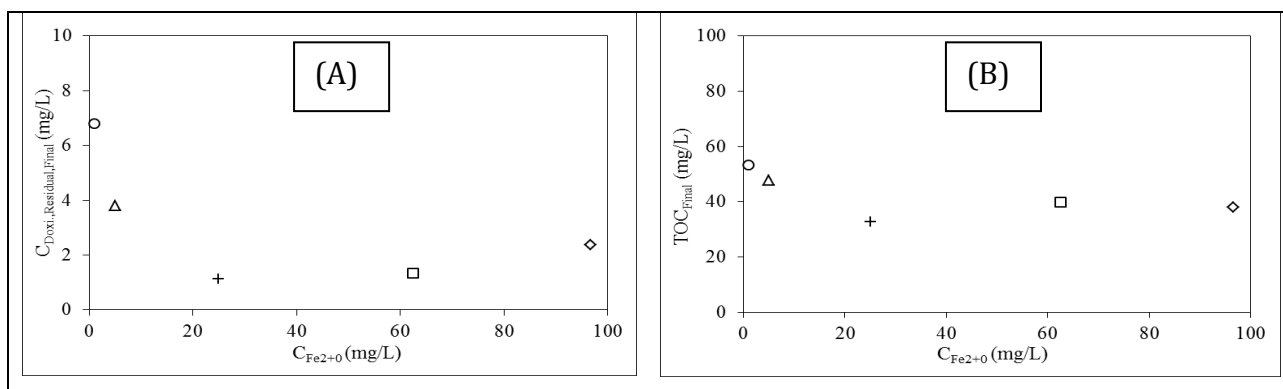


Figura 4 - Influência da concentração inicial de ion ferroso sobre (A) $C_{Doxi,Residual,Final}$ e (B) TOC_{Final}

A Figura 2 confirma os resultados da análise de variância, ou seja, A temperatura não influencia o processo em termos de $C_{Doxi,Residual,Final}$ e de TOC . Acreditamos que a concentração

residual final de Doxiciclina tenha sido completamente oxidada a compostos que tinham a mesma reação com molibdato, desta forma, mascarando a análise espectrofotométrica. Algumas análises em HPLC-MS mostraram que a Doxiciclina desaparece em tempos de reação inferiores a 10 min. Os produtos de degradação originados durante o processo sofrem ataque do radical hidroxila, originando moléculas instáveis, que são capazes de reagir com outras moléculas presentes no meio, possibilitando a formação de moléculas mais estáveis, mantendo uma concentração elevada de COT do meio reacional.

A Figura 3A mostra que a resposta do processo para $C_{\text{Doxi,Residual,Final}}$ são bastante influenciados pela concentração inicial de peróxido de hidrogênio. Para baixas concentrações de peróxido é possível que não haja formação de radicais hidroxila em concentração suficiente para degradar a Doxiciclina e demais subprodutos orgânicos. Como esperado, a TOC (Figura 3B) é independente da concentração de peróxido, porque detecta compostos orgânicos, inclusive a Doxiciclina, que pode estar presente no final do ensaio.

A Figura 4A mostra que a Doxiciclina, e demais compostos com a mesma resposta espectrofotométrica, são bastante influenciados para baixas concentrações de ion ferroso ($C_{\text{Fe}^{2+}}$ inferiores a 20 ppm) e independentes para $C_{\text{Fe}^{2+}}$ superiores a 20 ppm. O mesmo comportamento é observado para o TOC. Para concentrações de ion ferroso é possível que não haja formação de radicais hidroxila em concentração suficiente para degradar a Doxiciclina e demais subprodutos orgânicos.

3.2. Avaliação da Concentração Inibitória Mínima dos Resíduos

Os ensaios de concentração inibitória mínima são importantes para se determinar qual a menor concentração que um determinado agente antibiótico deve ter para exercer ação inibitória sobre um determinado microrganismo. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) da *Escherichia coli* ATCC 25922 à Doxiciclina é de 1,0 a 4,0 µg/mL (FDA, 2013).

Os ensaios para a determinação da CIM foram realizados em triplicata utilizando-se como organismo de controle a *Escherichia coli*. A concentração inibitória mínima da Doxiciclina foi de 1,6 µg/ml, compatível com a descrita na literatura (FDA, 2013) para *Escherichia coli*. O antibiótico oxidado não foi capaz de inibir o crescimento em concentração menor ou igual a 25% da solução inicial, equivalente a 25 µg/mL de Doxiciclina oxidada. A concentração do tratamento não foi aumentada acima de 25% para não diluir o meio de cultura em excesso, o que interfere na cinética de crescimento bacteriano. Através deste teste é possível afirmar que o efluente foi tóxico para o microrganismo estudado, pois não inibiu seu crescimento celular. A ausência de inibição também evidencia que a amostra mais concentrada contém menos que 6,4 µg/ml do antibiótico (quatro vezes o valor do CIM, pois estava diluído a 25%), ou seja, houve inativação de no mínimo 94% da quantidade inicial de Doxiciclina.

3.3. Avaliação da Citotoxicidade do Resíduo da Degradação da Doxiciclina

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados com o efluente na concentração real do experimento e concentrado 10 vezes em evaporador rotativo a vácuo, sendo a citotoxicidade medida pelo teste do MTT.

Os resultados obtidos mostraram que 20 a 30% de amostra pode afetar o crescimento celular, mesmo que a amostra seja o tampão fosfato (solução salina) não prejudicial à célula, não há diferença significativa entre o efluente e o branco da reação, o que mostra que não houve geração de subprodutos tóxicos a esse tipo celular no processo de tratamento do efluente. Comparando-se os dados da Doxiciclina esta manteve-se tóxica à célula em altas concentrações, sendo seu efeito, portanto, dependente da dose.

Na tentativa de avaliar a influência do efluente e branco da reação, estes foram concentrados 10 vezes. Observou-se que não havia diferença significativa entre o efluente e o branco da reação concentrados, pois a concentração do efluente e branco da reação aumentou a viabilidade celular, confirmando que a citotoxicidade anterior era relacionada à diluição do meio de cultura, e não a toxicidade do tratamento, não apresentando toxicidade significativa às células L929 em até 50% de concentração (5% de solução 10 vezes concentrada), que foi a maior concentração testada.

4. CONCLUSÕES

A análise paramétrica mostrou que as 3 variáveis estudadas ($C_{H_2O_2}$, $C_{Fe^{2+}}$ e T) exercem efeito na concentração residual final de Doxiciclina, porém, com base na análise de resíduos do software Statistica®, as variáveis que mais influenciaram o processo foram a concentração inicial de peróxido de hidrogênio e de ion ferroso, respectivamente. A melhor condição experimental determinada pelo planejamento fatorial foi $C_{Fe^{2+}} = 25$ mg/L, $C_{H_2O_2} = 611$ mg/L e $T = 35^\circ C$. Para estas condições obteve-se a menor concentração residual final de cloridrato de Doxiciclina e de TOC, que foram de 1,1 e 32,8 mg/L, respectivamente. Os resultados de Carbono Orgânico Total mostraram que a carga orgânica não foi reduzida, formando-se moléculas não detectáveis pelo método espectrofotométrico, que era específico para a determinação do fármaco.

A avaliação da citotoxicidade e da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos resíduos pela *Escherichia coli* mostraram que a Doxiciclina teve suas características antibióticas neutralizadas, sendo assim factível tecnologicamente o tratamento de resíduos contendo Doxiciclina pelo processo Fenton nas condições determinadas segundo o planejamento fatorial DCCR. Na continuidade deste trabalho foram determinados em HPLC-MS os produtos de degradação da Doxiciclina e numa publicação posterior mostraremos aqueles novos resultados e faremos uma discussão sobre suas toxicidades.

5. REFERÊNCIAS

- AGA, D. S. *Fate of Pharmaceuticals in the environment and in water treatment systems*. Boca Raton: CRC Press, 2008.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Como fazer experimentos, Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 2a. Ed. Campinas: Editora UNICAMP, 2002.

- BORGHI, A.A.; NAKAGAWA, M.I.; PALMA, M.S.A.; - “Oxidação química de hiclato de doxiciclina pelo processo Fenton: condição ótima de operação de acordo com o planejamento fatorial DCCR”. In: XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Búzios, RJ, 9 a 12 de setembro de 2012.
- BORGHI, A. A.; PALMA, M. S. A. Tetracycline: production, waste treatment and environmental impact assessment. *Braz. J. Pharm. Sci.*, v. 50, n. 1, p. 1-16, 2014.
- FDA. U.S. Food and Drug Administration. **Doryx (doxycycline hyclate) Capsule, Delayed Release Pellets.** Disponível em: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/050582s0271bl.pdf. Acesso em: 04 junho 2013.
- GU, G.; KARTHIKEYAN, K.G. Interaction of tetracycline with aluminum and iron hydrous oxides? *Environ. Sci. Technol.*, v. 39, p. 2660-2667, 2005.
- JEONG, J.; SONG, W.; COOPER, W.J.; JUNG, J.; GREAVES, J. Degradation of tetracycline antibiotics: Mechanisms and kinetic studies for advanced oxidation/reduction processes. *Chemosphere*, v.78, p.533–540, 2010.
- KHAN, S.J.; ONGERTH, J.E. Modelling of pharmaceutical residues in Australian sewage by quantities of use and fugacity calculations. *Chemosphere*, v. 54, p. 355-367, 2004.
- MOTA, A. L. N.; MURANAKA, C. T.; MORAES, J. E. F.; NASCIMENTO, C. A. O.; CHIAVONE-FILHO, O. Aplicação do processo Foto-Fenton na fotodegradação do fenol em meio aquoso utilizando lâmpadas de luz negra como fonte de radiação. *XXI Congresso Interamericano de Ingeniería Química – Peru*, 2005.
- PANDEY, P. K.; RAMASWAMY, H. S. GELASIS, D. Water-holding capacity and gel strength of rennet curd as affected by high-pressure treatment of milk. *Food Research Intern.*, v. 33, p. 655–663, 2000.
- PEREIRA-MAIA, E.C.; SILVA, P.P.; ALMEIDA, W.B.; SANTOS, H.F.; MARCIAL, B.L.; RUGGIERO, R.; GUERRA, W. Tetraciclinas e glicilciclinas: uma visão geral. *Quím. Nova*, v. 33, p. 700-706, 2010.
- RIVAS, J.; ENCINAS, A.; BELTRAN, F.; GRAHAN, N. Application of advanced oxidation processes to doxycycline and norfloxacin removal from water. *J. Environ. Sci. and Health, Part A*, v. 46, p. 944-951, 2011.
- ROCHA, D.P.; PINTO, G.F.; RUGGIERO, R.; OLIVEIRA, C.A.; GUERRA, W.; FONTES, A.P.S.; TAVARES, T.T.; MARZANO, I.M.; PEREIRA-MAIA, E.C. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. *Quím. Nova*, v. 34, p. 111-118, 2011.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. *Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos*. Campinas: Editora Casa do Pão Editora, 2005.
- WATKINSON, A.J.; MURBYD, E.J.; KOLPINE, D.W.; COSTANZO, S.D. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Sci. Tot. Environ.*, v. 407, p. 2711–2723, 2009.
- ZHANEL, G.G.; HOMENUIK, K.; NICHOL, K.; NOREDDIN, A.; VERCAIGNE, L.; EMBIL, J.; GIN, A.; KARLOWSKY, J.A.; HOBAN, D.J. The glycylicyclines: a comparative review with the tetracyclines. *Drugs*, v. 64, p. 63-88, 2004.