



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Escola Politécnica & Escola de Química
Programa de Engenharia Ambiental

Marco Aurélio Gomes Veiga

ESTUDO DA EFICIÊNCIA DE DEGRADAÇÃO DA ISONIAZIDA PELO PROCESSO
 H_2O_2 (UV) E IDENTIFICAÇÃO DOS INTERMEDIÁRIOS

Rio de Janeiro

2011



UFRJ

Marco Aurélio Gomes Veiga

ESTUDO DA EFICIÊNCIA DE DEGRADAÇÃO DA ISONIAZIDA PELO PROCESSO
 H_2O_2 (UV) E IDENTIFICAÇÃO DOS INTERMEDIÁRIOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Engenharia Ambiental, Escola Politécnica & Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

Orientadores: Prof^a. Juacyara Carbonelli Campos D.Sc

Prof^a. Márcia W. de Carvalho Dezotti D.Sc

Rio de Janeiro

2011



UFRJ

ESTUDO DA EFICIÊNCIA DE DEGRADAÇÃO DA ISONIAZIDA PELO PROCESSO
H₂O₂ (UV) E IDENTIFICAÇÃO DOS INTERMEDIÁRIOS

Marco Aurélio Gomes Veiga

Prof^a. Juacyara Carbonelli Campos D.Sc

Prof^a. Márcia W. de Carvalho Dezotti D.Sc COPPE/UFRJ

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Engenharia Ambiental, Escola Politécnica & Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

Aprovada pela Banca:

Presidente, Prof^a. Juacyara Carbonelli Campos D.Sc EQ/UFRJ

Prof^a. Márcia W. de Carvalho Dezotti D.Sc COPPE/UFRJ

Prof^a. Daniele Maia Bila D.Sc UERJ

Prof^a. Iene Christie Figueiredo D.Sc POLITÉCNICA/UFRJ

Ana Claudia Cerqueira D.Sc CENPES/PETROBRÁS

Rio de Janeiro
2011

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, Irany e Alypio Veiga, verdadeiros exemplos de ética, coragem, luta e determinação. Souberam vencer todas as dificuldades impostas pela vida com muita hombridade e honestidade. Sempre se mantiveram unidos, focados e obstinados, e estabeleceram como meta prioritária de suas vidas a promoção de uma boa educação aos seus filhos.

A vocês meus queridos pais, uma pequena retribuição por tudo aquilo que fizeram e ainda continuam fazendo por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Ex^o Senhor Contra Almirante (IM) Walter Lucas da Silva, pela cordialidade e palavras de incentivo, sobretudo por ter confiado à responsabilidade de um projeto tão importante para Marinha do Brasil, o qual com o seu apoio incondicional e irrestrito, num futuro próximo certamente iremos colher bons frutos dessa empreitada.

Agradeço ao Senhor Capitão-de-Mar-e-Guerra (RM1-S) Sergio da Silva Pereira Vice-diretor do Laboratório Farmacêutico da Marinha no período de 2005 a 2007, pois mesmo tendo acabado de ingressar na Marinha, acreditou no meu potencial profissional e me promoveu chefe de um setor extremamente importante na estrutura técnico organizacional do Laboratório Farmacêutico da Marinha. Comandante Sergio, Vossa Senhoria me ensinou o verdadeiro significado da palavra lealdade e amor a profissão, sobretudo a Marinha do Brasil. Sou e sempre serei eternamente grato por todos os ensinamentos e oportunidades que me proporcionou.

A professora D.Sc Márcia Walquiria de Carvalho Dezotti por ter aceito participar desse projeto como minha orientadora acadêmica, sobretudo pela amizade, pelas constantes palavras de incentivos e importantes orientações acadêmicas. Saiba que seus ensinamentos sempre foram e sempre serão importantes para a minha vida profissional e pessoal.

A professora D.Sc Juacyara Carbonelli Campos, pela sua pronta e rápida intervenção no sentido de viabilizar a defesa dessa dissertação. Muito obrigado por ter acreditado na proposta do trabalho, e fundamentalmente por ter aceito participar como minha orientadora acadêmica.

A professora D.Sc Claudia Morgado, coordenadora do Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, pela iniciativa e empreendedorismo na criação deste programa de pós-graduação, que sem dúvida nenhuma trará importantes contribuições científicas para Engenharia Sanitária e Ambiental do Brasil.

Ao professor Ph.D. Wagner Luís da Silva Faria, do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela amizade de longa data e pela troca de ideias ao longo desse trabalho.

Agradecimento especial a Rachel de Araujo Brochado, a quem devo sinceramente prestar todas as honras e homenagens, por mais essa conquista e sobretudo por ter sido a minha fiel amiga, companheira, namorada e grande incentivadora para consecução desse

trabalho. Saiba que aonde eu estiver, lembrarei com carinho de todos os momentos vividos ao seu lado.

Aos colegas do LABPOL/PEQ/COPPE pela convivência extremamente amigável e profissional. Não irei citar nomes de todos, sob pena de cometer alguma injustiça pela falta de lembrança. Mais gostaria que soubessem que todos foram igualmente importantes para mim nessa empreitada.

Aos alunos do PEA pela amizade e pelo convívio especialmente aos amigos Gustavo Aveiro Lins e Anderson Domenique pela parceria nos trabalhos e pela sincera amizade.

Agradeço também a toda equipe de suporte administrativo do PEA, especialmente a secretária Valéria Vieira, a qual com extremo profissionalismo e dedicação sempre colaborou nas resoluções dos problemas acadêmicos.

“O conhecimento não basta, temos de aplicá-lo. Querer não basta, é preciso agir.”

Johann Wolfgang Von Goethe

RESUMO

VEIGA, Marco Aurélio Gomes. **Estudo da Eficiência de Degradação da Isoniazida pelo Processo H_2O_2 (UV) e Identificação dos Intermediários**. Rio de Janeiro, 2011. Dissertação (Mestrado) - Programa de Engenharia Ambiental, Escola Politécnica e Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

A ocorrência de resíduos de fármacos no meio ambiente pertencentes à classe terapêutica dos antibióticos é um grave problema ambiental, devido à possibilidade dos microrganismos presentes nas matrizes ambientais desenvolverem mecanismos de resistência aos fármacos. No presente trabalho foi avaliada a eficiência de degradação da isoniazida via aplicação direta dos Processos Oxidativos Avançados (H_2O_2 /UV). A isoniazida é um antibiótico de primeira escolha, utilizado no tratamento da tuberculose pulmonar, considerada uma grave doença infecto contagiosa, o qual vem se observando o aumento da incidência de casos no Brasil. Esse dado é alarmante, pois aumenta a probabilidade de ocorrência desse fármaco no meio ambiente. Os experimentos se desenvolveram num reator de bancada operado sob o regime de batelada alimentada, nos seguintes Tempos de Retenção Hidráulica (TRH): 1; 3; 5; 7; 10; 20; 30; 40; 50; 60 minutos; e 60 minutos UV e 60 minutos H_2O_2 . As proporções molares de peróxido de hidrogênio avaliadas foram [1C:1 H_2O_2] e [1C:2 H_2O_2]. Foi utilizado efluente sintético contendo isoniazida na concentração de 10 mg L⁻¹. Com respeito à eficiência, o processo H_2O_2 /UV apresentou excelente performance na mineralização e degradação do fármaco. Esta tecnologia alcançou taxas de mineralização de 100% após tempos reacionais de 30 min, para proporção molar de [1C:1 H_2O_2]. Com relação à proporção [1C:2 H_2O_2], a mineralização total do fármaco foi alcançada no tempo de 60 minutos. A degradação do fármaco foi observada no mesmo tempo de reação para ambas as proporções molares, i.e, em 5 minutos. Apesar do pH foi observado ligeiramente ácido ao final de 60 minutos, sendo registrado pH 3,8 para [1C:1 H_2O_2] e pH 3,0 para [1C:2 H_2O_2]. Em relação à condutividade e a concentração de amônia, não foram observadas alterações significativas no meio aquoso. Adicionalmente, a degradação do fármaco deu origem a seis produtos de degradação, que foram removidos apenas ao final de 60 minutos de reação, para ambas as proporções molares. Face aos resultados obtidos é possível inferir que o processo é potencialmente viável de ser aplicado em tratamento de águas contaminadas com fármacos e, possivelmente outros poluentes.

Palavras-chave: Resíduos de fármacos, antibióticos, resistência bacteriana, processos oxidativos avançados (H_2O_2 /UV), isoniazida.

ABSTRACT

VEIGA, Marco Aurélio Gomes. **Efficiency Study of Degradation Process of Isoniazid by H₂O₂ (UV) and Identification of Intermediates.** Rio de Janeiro, 2011. Dissertação (Mestrado) - Programa de Engenharia Ambiental, Escola Politécnica e Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

The presence of drug residues in the environment outside the therapeutic class of antibiotics is a serious environmental problem due to the possibility of environmental microorganisms present in the matrix develop drug resistance mechanisms. In the present study was to evaluate the efficiency of degradation of INH through direct application of Advanced Oxidation Processes (UV/H₂O₂). Isoniazid is an antibiotic of first choice for the treatment of pulmonary tuberculosis, considered a serious contagious infectious disease, which has been observing the increasing incidence of cases in Brazil. This data is alarming because it increases the likelihood of this drug in the environment. The experiments were conducted in a batch reactor operated under fed batch system, the following Hydraulic Retention Times (HRT): 1, 3, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50, 60 minutes and UV 60 minutes, and 60 minutes H₂O₂. The molar ratios of hydrogen peroxide were evaluated [1C:1H₂O₂] and [1C: 2H₂O₂]. Was used isoniazid synthetic wastewater containing a concentration of 10 mg.L⁻¹. With respect to efficiency, the process UV/ H₂O₂ showed excellent performance in the mineralization and degradation of the drug. This technology mineralization rates reached 100% after reaction times of 30 minutes, molar ratio to [1C:1H₂O₂]. Since the proportion [1C: 2H₂O₂] mineralization total drug has been achieved in 60 minutes. The degradation of the drug was observed in the same reaction time of both molar ratios, ie, within 5 minutes. Despite the slightly acid pH was observed at 60 minutes, and registered to pH 3.8 [1C:1H₂O₂] and pH 3.0 to [1C:2H₂O₂]. In relation to the conductivity and the concentration of ammonia, no significant changes were observed in aqueous medium. Additionally, degradation of the drug led to six degradation products, which were removed only after 60 minutes of reaction, for both molar ratios. Considering our results we can infer that the process is potentially feasible to be applied in the treatment of water contaminated with drugs, and possibly other pollutants.

Key-words: Residues of drugs, antibiotics, bacterial resistance, advanced oxidation processes (UV/H₂O₂), isoniazid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1.	Representação esquemática das inter-relações entre absorção, distribuição, ligação as proteínas plasmáticas, metabolismo e excreção do fármaco e sua concentração no seu local de ação.....	22
Figura 1.1.1.	Consumo de medicamentos em função da paridade do poder de compra (PPP\$) per capita na Alemanha. Gráfico obtido do site oficial da Organização Mundial da Saúde (OMS).....	25
Figura 1.1.2.	Levantamento quantitativo em unidade farmacêutica de comprimidos de isoniazida (INH) produzidos.....	27
Figura 2.1(a)	Número de publicações em revistas e jornais sobre o desenvolvimento das técnicas de análise para o controle de resíduos de fármacos nos últimos dez anos.....	30
Figura 2.1(b)	Número de publicações em revistas e jornais sobre a degradação de resíduos de fármacos por POAs ao longo da última década.....	30
Figura 2.1.2.	Rotas de entrada e possível distribuição dos fármacos no meio ambiente	40
Figura 2.1.3.	Cromatogramas (HPLC-ESI-MS/MS) (a) amostras da água do Rio Ebro; e (b) amostras coletadas após o tratamento dos efluentes.....	43
Figura 2.2.1.	Etapas envolvidas na SPE: condicionamento do sorvente, adição da amostra, remoção dos interferentes e eluição do analito.....	46
Figura 2.2.2.	Faixa de aplicação da HPLC e GC para determinação de poluentes orgânicos emergentes baseados em suas propriedades físico-químicas de polaridade e volatilidade.....	50
Figura 2.3.1.	Mapa da tuberculose no mundo.....	52
Figura 2.3.2.	Bacilo Álcool Ácido Resistente.....	53
Figura 2.4.1.	Sítio de ação dos principais fármacos utilizados no tratamento da tuberculose.....	54
Figura 2.4.2.	Estrutura molecular da isoniazida	55
Figura 2.4.3.	Espectro de massa da isoniazida (composto puro)	56
Figura 2.4.4.	Mecanismo de ação da isoniazida (INH). A INH (1) sofre ativação pela enzima KatG para formar o aduto INH-NAD. O aduto inibe a InhA e, assim, a biossíntese dos ácidos graxos (FAS II), que são os responsáveis em sintetizar os ácidos micólicos (representação de três classes de ácidos micólicos: α -micolatos, metóxi-micolatos e cetomicolatos), é interrompida levando a morte celular.....	57
Figura 2.5.1.	Formação do grânulo por via úmida.....	61
Figura 2.5.2.	Esquema geral da granulação.....	61
Figura 2.5.3.	Levantamento fotográfico dos equipamentos envolvidos no processo de granulação por via úmida para produção em escala industrial da isoniazida, destacando a presença de grande quantidade de resíduos de fármacos aderidos na superfície dos equipamentos. (a) Câmara de granulação e mistura (High Shear); (b) Vista da câmara de granulação e mistura; (c) Funil alimentador do moinho granulador; (d) Vista do funil alimentador; (e) Perfil do moinho granulador; (f) Compressora rotativa; (g) Plataforma de coleta da compressora rotativa; (h) Bandeja para coleta de comprimidos.....	62

Figura 2.5.4. (a); (b); (c); (d)	Registro fotográfico da limpeza da câmara de granulação e mistura (High Shear). (a) início da limpeza; (b) efluente coletado em bombonas; (c) comparação entre a água destilada e os efluentes gerados após 1ª enxágüe e o 2ª enxágüe; (d) excesso de resíduo acumulado no fundo do becher.....	67
Figura 2.6.1.	Fluxograma do estudo de estresse químico: Hidrólise sob condições ácidas e básicas.....	70
Figura 2.6.2.	Fluxograma do estudo de estresse químico: Oxidação.....	71
Figura 2.6.3.	Fluxograma do estudo de estresse físico: Fotólise.....	72
Figura 2.7.1.	Compostos intermediários da isoniazida.....	75
Figura 2.7.2.	Mecanismo de ativação da isoniazida via agentes acetilantes.....	76
Figura 2.8.1.	Distribuição dos POAs avaliados para degradação de resíduos de fármacos	78
Figura 3.5.1.	Foto do reator fotocatalítico utilizado nos experimentos.....	89
Figura 3.5.2.	Desenho esquemático do reator fotocatalítico com as respectivas dimensões.....	89
Figura 3.6.1.	Foto do aparato experimental utilizado na SPE.....	100
Figura 3.6.2.	Marcha analítica utilizada nos procedimentos de extração por fase sólida (SPE).....	101
Figura 4.1.1.	Percentual de recuperação da isoniazida obtido na SPE para todos os cartuchos avaliados.....	104
Figura 4.1.2. (a);(b);(c);(d); (e);(f);(g).	Resultados cromatográficos da curva de calibração da isoniazida. (a) Branco (b) Padrão de 0,2 mg L ⁻¹ (c) Padrão de 1,0 mg L ⁻¹ (d) Padrão de 1,5 mg L ⁻¹ (e) Padrão de 2,0 mg L ⁻¹ (f) Padrão 2,5 mg L ⁻¹ ; (g) Padrão de 10,0 mg L ⁻¹	108
Figura 4.1.3. (a);(b);(c);(d); (e);(f).	Perfil cromatográfico das amostras resultantes do processo de SPE com o cartucho Varian® C ₁₈ 500 mg 3 mL. (a) Concentração de 0,1 mg L ⁻¹ (pH 3,0); (b) Concentração de 0,5 mg L ⁻¹ (pH 3,0); (c) Concentração de 1,0 mg L ⁻¹ (pH 3,0); (d) Concentração de 1,5 mg L ⁻¹ (pH 3,0); (e) Concentração de 2,0 mg L ⁻¹ (pH 3,0); (f) Concentração de 2,5 mg L ⁻¹ (pH 3,0).....	111
Figura 4.1.4. (a);(b).	Fórmula estrutural. (a) Isoniazida; (b) Paracetamol.....	113
Figura 4.2.1. (a); (b).	Monitoramento contínuo do pH em função do % Remoção de COT. (a) Proporção molar [1C:1H ₂ O ₂] : pH ₀ 7,3; pH _{Após H₂O₂} 5,9; pH _{60min (H₂O₂/UV)} 3,8; (b) Proporção molar [1C:2H ₂ O ₂]: pH ₀ 7,3; pH _{Após H₂O₂} 4,5; pH _{60min (H₂O₂/UV)} 3,0. (■) % Remoção de COT (■) pH.....	115
Figura 4.2.2.	Espectros da isoniazida, ácido isonicotínico e isonicotinamida obtidos pelo DAD durante as análises cromatográficas.....	117
Figura 4.2.3.	Formas iônicas da isoniazida e de seus compostos intermediários em valores de pH de 2,5 e 6,8.....	118
Figura 4.2.4.	Monitoramento de pH e condutividade em todos os tempos reacionais na proporção molar [1C:1H ₂ O ₂]. (▲) Condutividade μ S cm ⁻¹ (●) pH.....	118
Figura 4.2.5.	Percentual de remoção de COT (%) em função do tempo reacional	119
Figura 4.2.6. (a);(b).	Fórmula estrutural. (a) Isoniazida; (b) Paracetamol	120

Figura 4.2.7.	Perfil de absorção molecular da solução padrão de isoniazida a 10 mg L^{-1} no pH natural da solução (pH 7,3)	122
Figura 4.2.8.	Espectros de varredura completa no UV-Vis na proporção molar [1C:1H ₂ O ₂] indicando a sobreposição espectral do meio reacional....	123
Figura 4.2.9.	Espectros de varredura no UV-Vis na proporção molar [1C:2H ₂ O ₂], indicando a sobreposição espectral do meio reacional.....	123
Figura 4.2.10.	Espectros de absorção na região do UV-Vis da isoniazida, ácido isonicotínico e isonicotinamida obtidos pelo DAD durante as análises cromatográficas no pH 6,8.....	124
Figura 4.2.11.	%Remoção de COT em função do tempo. (●) Mineralização do fármaco para proporção molar [1C:1H ₂ O ₂]; (■) Mineralização do fármaco para proporção molar [1C:2H ₂ O ₂].	125
Figura 4.2.12.	Espectros de varredura no UV-Vis. (a) Alíquota retirada no TRH de 1 min na proporção molar [1C:1H ₂ O ₂]; (b) Alíquota retirada no TRH de 1 min na proporção molar [1C:2H ₂ O ₂].....	126
Figura 4.2.13.	Fórmula estrutural da isoniazida destacando os átomos de nitrogênio	128
Figura 4.2.14.	Formação de amônia no meio reacional. (a) Perfil de formação de amônia na proporção molar [1C:1H ₂ O ₂] onde $[\text{NH}_3]_0 = 0,01 \text{ mg L}^{-1}$; $[\text{NH}_3]_{\text{máx}} = 0,73 \text{ mg L}^{-1}$ no $t_{\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}} = 60 \text{ min}$; (b) Perfil de formação de amônia na proporção molar [1C:2H ₂ O ₂] onde $[\text{NH}_3]_0 = 0,01 \text{ mg L}^{-1}$; $[\text{NH}_3]_{\text{máx}} = 1,07 \text{ mg L}^{-1}$ no $t_{\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}} = 60 \text{ min}$. (■) COT (% Remoção) (▲) NH ₃ mg L ⁻¹	128
Figura 4.2.15.	Mecanismo de formação da amônia.....	129
Figura 4.2.16.	Concentração de isoniazida efetivamente degradada calculada a partir do CLAE-EM, para proporção molar [1C:1H ₂ O ₂]. (■) COT (% Remoção) (★) INH mg L ⁻¹	131
Figura 4.2.17.	Concentração de isoniazida efetivamente degradada calculada a partir do CLAE-EM, para proporção molar [1C:2H ₂ O ₂]. (■) COT (% Remoção) (★) INH mg L ⁻¹	132
Figura 4.2.18.	Espectros de varredura obtidos via sistema de CLAE-EM por infusão direta. (a) Alíquota retirada após $t = 7 \text{ min}$ de reação [1C:1H ₂ O ₂]; (b) Alíquota retirada após $t = 7 \text{ min}$ de reação [1C:2H ₂ O ₂]; (c) Alíquota retirada após $t = 50 \text{ min}$ de reação [1C:2H ₂ O ₂]; (d) Alíquota retirada após $t = 60 \text{ min}$ de reação [1C:1H ₂ O ₂]; (e) Alíquota retirada após $t = 60 \text{ min}$ de reação [1C:2H ₂ O ₂].....	134
Figura 4.2.19.	Espectros de massa da isoniazida e dos compostos intermediários formados. (a) isoniazida (m/z 136); (b) ácido isonicotínico (m/z 122); (c) isonicotinamida (m/z 121); e (d) ácido isonicotínico N ['] -(piridil-4-carbonil)-hidrazida (m/z 241).....	137
Figura 4.2.20.	Comportamento cinético do ácido isonicotínico (m/z 124) em função do tempo de exposição ao processo H ₂ O ₂ /UV. (■) ácido isonicotínico [1C:1H ₂ O ₂]; (★) ácido isonicotínico [1C:2H ₂ O ₂].....	139
Figura 4.2.21.	Comportamento cinético da isonicotinamida (m/z 120,8) em função do tempo de exposição ao processo H ₂ O ₂ /UV. (▲) isonicotinamida [1C:1H ₂ O ₂]. (■) isonicotinamida [1C:2H ₂ O ₂].....	140

Figura 4.2.22.	Comportamento cinético do ácido isonicotínico etilideno hidrazida (m/z 162,2) em função do tempo de exposição ao processo H_2O_2/UV . (⌘) ácido isonicotínico etilideno hidrazida [1C:1 H_2O_2] (⌘) ácido isonicotínico etilideno hidrazida [1C:2 H_2O_2].....	141
Figura 4.2.23.	Mecanismo de formação dos compostos intermediários da isoniazida.....	142
Figura 4.2.24.	Representação gráfica da função polinomial de 4ª ordem para as reações de fotodegradação do fármaco na proporção molar [1C:1 CH_2O_2].....	144
Figura 4.2.25.	Regressão linear dos dados experimentais para proporção molar [1C:2 H_2O_2].(■) $X_{COT}/(1-X_{COT})$	146
Figura 4.2.26.	Taxa de degradação da isoniazida em função do tempo reacional para cálculo da velocidade específica. (■) Conversão de isoniazida (X_{INH}).....	147

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1.1.	Ocorrência de antibiótico nos afluentes as ETAR em diversos Países	35
Tabela 2.1.2.	Resultados das análises de caracterização dos efluentes provenientes de 90 indústrias farmacêuticas.....	37
Tabela 2.1.3	Princípios ativos encontrados nas amostras de efluente de uma estação de tratamento que atende cerca de 90 indústrias farmacêuticas.....	37
Tabela 2.2.1.	Classe do antibiótico, tipo de amostra, solventes (volume da amostra e pH), solventes e percentual de recuperação em procedimentos de SPE.....	48
Tabela 2.4.1.	Propriedades físico-químicas da isoniazida.....	56
Tabela 2.5.1.	Propriedades físico-químicas da CMC.....	64
Tabela 2.5.2.	Propriedades físico-químicas do amido de milho.....	65
Tabela 2.5.3.	Propriedades físico-químicas do estearato de magnésio.....	65
Tabela 2.8.1.	Principais fontes bibliográficas utilizando H ₂ O ₂ /UV para remoção de fármacos.....	83
Tabela 3.2.1.	Informações detalhadas do padrão primário da isoniazida.....	87
Tabela 3.5.1.	Estratégia de monitoramento dos parâmetros analíticos avaliados.....	92
Tabela 3.6.1.	Dados do equipamento de CLAE e condições cromatográficas.....	94
Tabela 3.6.2.	Parâmetros cromatográficos de análise utilizados no sistema de CLAE-EM.....	96
Tabela 3.6.3.	Condições de estresse para realização do estudo de degradação forçada.....	97
Tabela 3.6.4.	Especificação técnica do espectrofotômetro de absorção molecular UV-Vis.....	98
Tabela 3.6.5.	Condições cromatográficas utilizadas para detecção das amostras resultantes do processo de SPE.....	102
Tabela 4.2.1.	Concentração de amônia formada no meio reacional nos ensaios controles.....	130
Tabela 4.2.2.	Compostos intermediários formados no decorrer dos ensaios com o processo H ₂ O ₂ /UV.....	136

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN-	Acetonitrila
AINES	Antiinflamatórios não esteroidais
ANVISA -	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI -	Introdução no espectrômetro de massas com ionização química a pressão atmosférica
CAC	Concentração ambientalmente crítica
CLAE-EM-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a Espectrometria de Massa
CMC-	Celulose microcristalina
COT -	Carbono orgânico total final
COT ₀ -	Carbono orgânico total inicial
DBO ₅ /DQO -	Demanda biquímica de oxigênio após 5 dias/Demanda química de oxigênio
DAD-	Detector de arranjo de diodos
DFC -	Doses fixas combinadas
EEC -	<i>European economic community</i>
EMEA-	<i>European Medicines Agency</i>
ETA-	Estação de tratamento de água
ETAR	Estação de tratamento de água residual
ETE -	Estação de tratamento de efluente
FB-	Farmacopéia Brasileira
FIOCRUZ-	Fundação Oswaldo Cruz
GC-MS-	Cromatografia gasosa acoplada ao detector de espectrometria de massas
H ₂ O ₂ -	Peróxido de hidrogênio
HIV-	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPA-	Hidrocarboneto policíclico aromático
HPLC-	<i>High performance liquid chromatography</i>
HPLC-ESI-MS/MS-	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a dois espectrômetros de massas em série com ionização electrospray
ICH-	International Conference on Harmonisation
INH-	Isoniazida
katG-	Catalase-peroxidase
LABPOL-	Laboratório de Controle de Poluição de Águas
CLAE-EM-	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa
CLAE-EM/EM-	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a dois espectrômetros de massa em série
LCR-	Líquido encefalorraquidiano
LFM-	Laboratório Farmacêutico da Marinha
LOQ-	Limite de quantificação
MDR-	Cepas multiresistentes
MRM-	Massas específicas no modo de monitoramento múltiplo de reações
NAT2-	N-acetiltransferase tipo 2
[NH ₃] ₀ -	Concentração inicial de amônia
[NH ₃] _{máx} -	Concentração teórica máxima de amônia possível de ser formada de acordo com dados estequiométricos

OMS-	Organização Mundial da Saúde
PA-	Pureza analítica
PNRS-	Política Nacional de Resíduos Sólidos
POA-	Processos oxidativos avançados
ppm-	Partes por milhão
ppb-	Partes por bilhão
PTFE-	Politetrafluoretileno (teflon)
PZA-	Pirazinamida
QqQ-	Analísadores de massa do tipo triplo quadrupolo
RMP-	Rifampicina
RP-	<i>Reversed phase</i>
R1-	Reator de bancada interligado em série de n° 1
RP-HPLC-	<i>High performance liquid chromatography reversed phase</i>
Rs-	Resolução
SM-	Estreptomicina
SPE-	<i>Extração em fase sólida</i>
SVS-	Secretaria de Vigilância Sanitária
SST-	Sólidos suspensos totais
STD-	Sólidos totais dissolvidos
t _{H₂O₂/UV}	Tempo reacional de 60 minutos sob irradiação da luz UV combinado a utilização do H ₂ O ₂ no meio reacional
TFA-	Ácido trifluoracético
TB-	Tuberculose
TB-MR	Tuberculose Multirresistente
TOF-	Analísadores de massa do tipo tempo de vôo " <i>time of flight</i> "
TRH-	Tempo de retenção hidráulica
UF-	Unidade farmacêutica de comprimidos
UR-	Umidade relativa
US-FDA-	<i>United States Food and Drug Administration</i>
USP 33 -	United States Pharmacopeia edição n° 33
UV-	Ultravioleta
W _F	Concentração final
W _i -	Concentração inicial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 JUSTIFICATIVA	24
1.1.1 Ocorrência ambiental de fármacos em função da atividade produtiva farmacêutica	24
1.1.2 Escolha do fármaco.....	26
1.2 OBJETIVO GERAL	28
1.2.1 Objetivos específicos	28
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1 A PRESENÇA DE RESÍDUOS DE FÁRMACOS NO MEIO AMBIENTE	31
2.1.1 Os efeitos nocivos dos resíduos de fármacos sobre a biota aquática	31
2.1.2 A ocorrência de antibióticos no meio ambiente	34
2.1.3 As diferentes formas de contaminação por resíduos de fármacos	36
2.1.3.1 Efluente de indústria farmacêutica	36
2.1.3.2. Efluentes de hospitais	38
2.1.4 Aspectos normativos e regulatórios	41
2.1.5 A baixa eficiência de remoção dos resíduos de fármacos pelas tecnologias convencionais de tratamento	43
2.2 QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS NAS DIVERSAS MATRIZES AMBIENTAIS	45
2.2.1 Metodologias de extração de resíduos de fármacos	45
2.2.2 Recursos cromatográficos para análise de resíduos de fármacos	49
2.2.2.1 Cromatografia líquida alta eficiência (CLAE)	49
2.2.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrofotometria de massa (CLAE-EM)	50
2.3 A TUBERCULOSE	51
2.3.1 Epidemiologia	52
2.3.2 Agente etiológico	53
2.3.3 Fisiologia e mecanismo de infecção	54
2.4 FÁRMACOS DE ESCOLHA PARA O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE	54
2.4.1 Isoniazida (INH)	55
2.4.1.1 Resistência bacteriana	56
2.4.1.2 Mecanismo de ação	57
2.4.1.3 Absorção, distribuição e excreção	58
2.4.1.4 Métodos de análise da isoniazida (INH)	58
2.5 ETAPAS DE PRODUÇÃO DA ISONIAZIDA	60
2.5.1 Memorial descritivo do processo produtivo	60
2.5.1.1 Granulação por via úmida	60
2.5.2 Insumos farmacotécnicos utilizados na produção da isoniazida	63
2.5.2.1 Celulose microcristalina (CMC)	64

2.5.2.2 Amido de milho	64
2.5.2.3 Estearato de magnésio	65
2.5.2.4 Talco R2BL	65
2.5.2.5 Isoniazida	66
2.5.3 Efluentes gerados após as etapas de produção	66
2.6 PROTOCOLOS DE ESTUDO DE ESTRESSE QUÍMICO DE FÁRMACOS PARA INVESTIGAÇÃO DOS COMPOSTOS INTERMEDIÁRIOS.....	67
2.6.1 As diferentes abordagens dos testes de estresse químico e físico de fármacos ...	68
2.6.1.1 Hidrólise	69
2.6.1.2 Oxidação	70
2.6.1.3 Fotólise	71
2.6.1.4 Estabilidade térmica	70
2.7 COMPOSTOS INTERMEDIÁRIOS	73
2.7.1 Os compostos intermediários da isoniazida e os ensaios <i>in vitro</i>	73
2.7.2 Toxicidade dos compostos intermediários da isoniazida.....	76
2.8 PROCESSOS OXIDATIVOS	77
2.8.1 Processos Oxidativos Avançados (POA)	79
2.8.1.1 O processo H ₂ O ₂ /UV	79
2.8.1.1.1 Restrições quanto à aplicabilidade do processo H ₂ O ₂ /UV	80
2.8.1.1.2 Remoção de resíduos de fármacos por processo H ₂ O ₂ / UV.....	82
3 MATERIAIS E MÉTODOS	86
3.1 FÁRMACO.....	86
3.2 PADRÃO PRIMÁRIO DE TRABALHO	87
3.3 PREPARO DAS AMOSTRAS	87
3.4 REAGENTES ANALÍTICOS	87
3.5 ENSAIOS EXPERIMENTAIS COM OS POA	88
3.5.1. O processo H ₂ O ₂ /UV	88
3.5.2 Especificações técnicas do reator fotocatalítico de bancada	88
3.5.2.1 Parâmetros operacionais e tempo de retenção hidráulica (TRH)	90
3.5.2.2 Procedimento de cálculo da quantidade de H ₂ O ₂	91
3.5.2.3 Procedimentos de cálculo da eficiência de degradação e mineralização do fármaco.....	91
3.5.2.4 Parâmetros analíticos avaliados.....	91
3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS	92
3.6.1 Carbono orgânico total (COT)	93
3.6.2 Preparo da curva padrão de calibração	93
3.6.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	94
3.6.3.1. Determinação da concentração residual de INH	94

3.6.4 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (CLAE-EM)	95
3.6.4.1 Determinação da concentração residual do fármaco	95
3.6.4.2 Caracterização dos compostos intermediários	95
3.6.5 Protocolo para realização dos testes de estresse químico	96
3.6.6 Espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta visível a $\lambda = 265$ nm	97
3.6.7 Determinação da concentração residual de peróxido de hidrogênio	98
3.6.8 Amônia	98
3.6.9 pH e temperatura	99
3.6.10 Condutividade	99
3.6.10 Extração por fase sólida (SPE) – Ensaio preliminar	99
3.6.11 Método de quantificação da isoniazida após a extração por fase sólida	102
3.6.12 Cálculo da eficiência do processo de extração por fase sólida (SPE)	103
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	103
4.1 ENSAIOS PRELIMINARES POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)	104
4.1.1 Eficiência do procedimento de extração	104
4.1.2 Influência do pH na etapa de condicionamento	109
4.1.3 Influência do volume da solução de extração sobre a recuperação do fármaco (%R)	113
4.2 REMOÇÃO DA ISONIAZIDA PELO PROCESSO H_2O_2/UV	114
4.2.1 Estudo da influência da concentração inicial de H_2O_2 sob o pH e condutividade	114
4.2.1.1 Determinação do percentual de remoção de COT	119
4.2.1.2 Monitoramento da degradação da INH via análise espectrofotométrica UV-Vis ..	122
4.2.1.2.1 Espectro do composto puro.....	122
4.2.1.3 Investigação da concentração de NH_3 formada no meio reacional	127
4.2.1.4 Determinação da concentração residual de INH via CLAE-EM	130
4.2.1.5 Identificação e monitoramento dos compostos intermediários da isoniazida via CLAE-EM	133
4.2.1.5.1 Estudo da cinética de oxidação do ácido isonicotínico	139
4.2.1.5.2 Estudo da cinética de oxidação da isonicotinamida.....	140
4.2.1.5.3 Estudo da cinética de oxidação do ácido isonicotínico etilideno hidrazida.....	141
4.2.1.6 Determinação do modelo cinético de fotodegradação da isoniazida	143
4.2.1.6.1 Experimento [1C:1 H_2O_2]	144
4.2.1.6.2 Experimento [1C:2 H_2O_2]	145
5 CONCLUSÃO	148
6 RECOMENDAÇÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	149
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151

1 INTRODUÇÃO

Fármacos são substâncias químicas que afetam a função fisiológica de modo específico (RANG *et al.*, 2004). Quando o fármaco acessa o organismo humano, por uma das possíveis vias de administração, inicia-se uma série de reações bioquímicas objetivando a absorção, distribuição, metabolismo (biotransformação) e a sua eliminação. O fármaco atua a nível de receptor o qual é responsável pela seletividade da ação farmacológica e pela relação quantitativa entre o fármaco e seu efeito. A Fig. 1.1 apresenta um esquema das inter-relações do fármaco entre absorção, distribuição, ligação as proteínas plásmáticas, metabolismo, excreção e a sua concentração no local de ação (GOODMAN & GILMAN 2006).

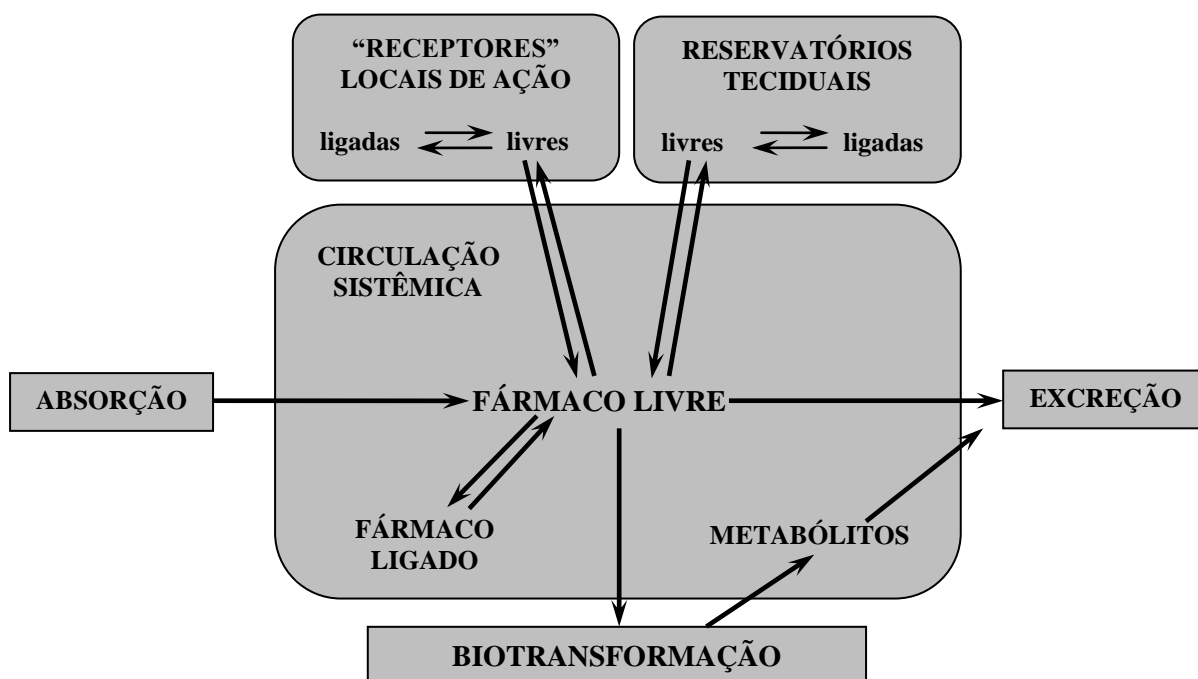


Figura 1.1. Representação esquemática das inter-relações entre absorção, distribuição, ligação as proteínas plasmáticas, metabolismo e excreção do fármaco e sua concentração no seu local de ação. Fonte: Adaptado de GOODMAN & GILMAN, 2006.

Fármacos em amostras ambientais são considerados poluentes emergentes e pertencem a uma classe de substâncias muito importante face as diversas possibilidades de uso como: fornecer elementos carentes ao organismo, vitaminas, sais minerais e hormônios; prevenção de doença; combate a infecções; bloqueio temporário de uma função; correção de uma função desregulada; desintoxicação do organismo e agentes auxiliares de diagnóstico (WENZEL *et al.*, 2001).

Durante as últimas décadas, a produção e o consumo de fármacos aumentaram rapidamente com o desenvolvimento da ciência médica. Cerca de aproximadamente 3.000

compostos são usados como medicamentos, e a quantidade da produção anual é superior a centenas de toneladas (SARMAH *et al.*, 2006; CALISTO & ESTEVES, 2009; KÜMMERER, 2009).

Fármacos são excretados e descartados e, posteriormente, entram no ambiente aquático na forma de águas residuais tratadas ou não. Assim, as águas residuais das estações de tratamento municipais (M-ETAR), atividades agrícolas, hospitais e indústrias farmacêuticas tornaram-se fontes conhecidas de produtos farmacêuticos lançados no ambiente aquático (ZHANG *et al.*, 2008; MATAMOROS *et al.*, 2009).

Nesse sentido, a presença de resíduos de fármacos no meio ambiente, ameaça a saúde humana, face a complexidade, possibilidade de interação sinérgica com os demais contaminantes presentes nos efluentes e devido a sua estabilidade e elevado grau de persistência. As indústrias farmacêuticas devido ao desenvolvimento de novas formulações, processamento analíticos de diversas amostras de fármacos, bem como a produção de diversas classes terapêuticas de medicamentos, contribuem significativamente para a geração de efluentes potencialmente poluidores, com destaque para a presença de resíduos de fármacos, os quais não são completamente removidos pelas tecnologias de tratamento convencional adotadas pela maioria das indústrias farmacêuticas, o que configura um grave problema ambiental e sanitário a ser resolvido.

Objetivando a avaliação de resíduos de fármacos no Estado do Rio de Janeiro, em 1997, foi realizada uma pesquisa buscando verificar a presença de diversos fármacos no meio ambiente. Resíduos de reguladores de lipídeos, antiinflamatórios e metabólitos de algumas drogas foram detectados. A concentração média em efluentes de ETE variou de 0,1–1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Em esgoto bruto foram encontrados resíduos na ordem de grandeza de $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo as maiores concentrações encontradas para os fármacos indometacina (0,95 $\mu\text{g L}^{-1}$); cofibrato (1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) e bezofibrato (1,2 $\mu\text{g L}^{-1}$) (STUMPF *et al.*, 1999).

No ano de 2006, foi realizada uma investigação das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas, SP por meio da quantificação de interferentes endócrinos, produtos farmacêuticos e de higiene pessoal. Dentre os compostos monitorados, os mais frequentemente detectados nas águas naturais e potável foram cafeína (1-106 $\mu\text{g L}^{-1}$), dietil e dibutilftalato (0,2-3,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), estradiol (1,8-6,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), etinilestradiol (1,0-3,5 $\mu\text{g L}^{-1}$), progesterona (1,2-4,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), bisfenol A (2-64 $\mu\text{g L}^{-1}$), colesterol (9-301 $\mu\text{g L}^{-1}$) e coprostanol (5-41 $\mu\text{g L}^{-1}$). Amostras de esgoto bruto e tratado também apresentaram concentrações muito próximas dos hormônios sexuais, indicando a eficiência limitada do tratamento empregado na

ETE. Em relação às amostras de esgoto bruto para o fármaco diclofenaco foram encontrados níveis de $2,87 \pm 0,04 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1,78 \pm 0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ em esgoto tratado. Para o ibuprofeno os níveis encontrados em esgoto bruto e tratado foram de $54,2 \pm 0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ e $48,4 \pm 0,4 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Já para o fármaco paracetamol foi obtido níveis de $18,1 \pm 0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ em esgoto bruto e $5,89 \pm 0,02 \mu\text{g L}^{-1}$ em esgoto tratado. Observou-se uma redução de 10% ; 7%; 38% e 67,5% para ibuprofeno, diclofenaco e paracetamol, respectivamente, sendo esses compostos parcialmente removidos no tratamento biológico. Na análise de águas superficiais, ibuprofeno e paracetamol estavam abaixo do limite de quantificação (LQ) em todas as amostras. Já para diclofenaco, apesar de geralmente estar abaixo do LOQ do método, foi encontrado níveis de até $5,9 \pm 0,6 \mu\text{g L}^{-1}$. Na análise de água potável apenas cafeína, colesterol e sibutilftalato foram detectadas (SUCHARA, 2007).

A ocorrência de fármacos no meio ambiente tende a se agravar ainda mais devido fundamentalmente a dois aspectos: a reduzida ou completa ausência de remoção pelas ETE, e pelo crescente uso de fármacos pela população incluindo as mais diversas classes terapêuticas. Segundo Vasskog *et al.*, (2006) a concentração de antidepressivos se apresenta cada vez maior nos sistemas de tratamento. Na Noruega, o consumo dessas substâncias aumentou em 320% na última década, crescimento esse que também é percebido em toda a Europa (LINS, 2010).

1.1 JUSTIFICATIVA

1.1.1 Ocorrência ambiental de fármacos em função da atividade produtiva farmacêutica

Os compostos farmacêuticos são a classe de poluentes orgânicos emergentes que mais tem chamado a atenção da comunidade científica, em face ao número crescente de utilização de medicamentos de forma abusiva em diversos Países do mundo.

Esses números são alarmantes, como por exemplo na Alemanha, onde o consumo de medicamentos ultrapassou (desde 2001) a quantidade de 100 toneladas por ano. A quantidade real de medicamentos consumidos tende ser ainda maior, devido ao fato de que nessas pesquisas não foram contempladas as informações dos medicamentos consumidos sem a receita médica.

O gráfico da Figura. 1.1.1 apresenta o consumo de medicamentos em função da renda per capita da população da Alemanha.

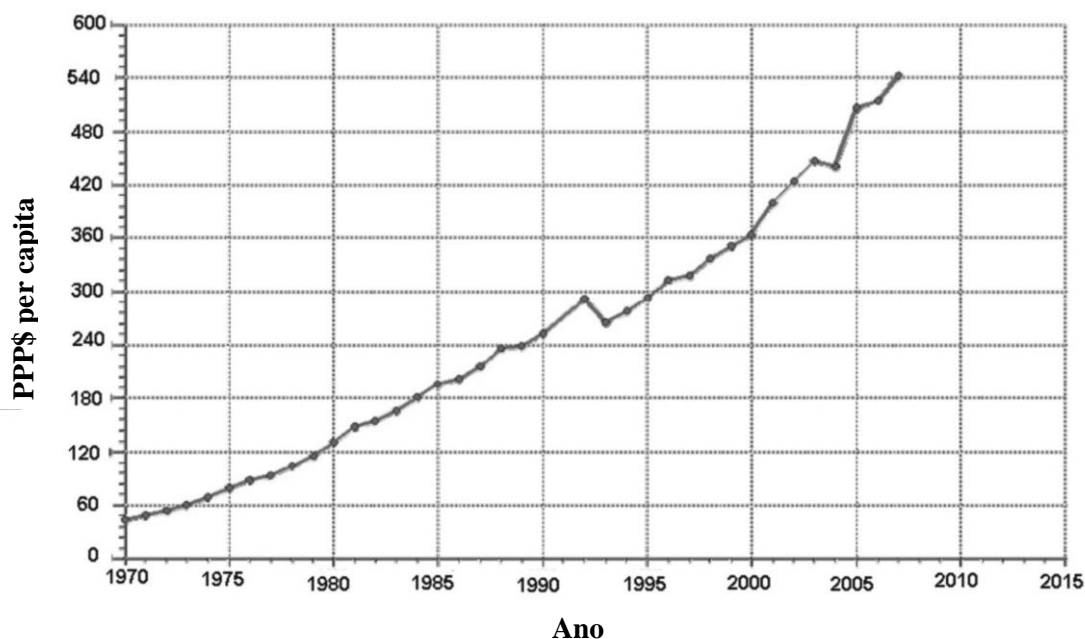


Figura 1.1.1. Consumo de medicamentos em função da paridade do poder de compra (PPP\$) per capita na Alemanha. Gráfico obtido do site oficial da Organização Mundial da Saúde (OMS)
Fonte: DA SILVA & COLLINS, 2011.

Em relação ao Brasil, o consumo de medicamentos pode ser ainda mais expressivo devido à ausência de fiscalização por parte dos órgãos de vigilância sanitária. Muitos fármacos podem ser obtidos nos pontos de venda sem a devida apresentação da receita médica, mesmo para aqueles medicamentos que segundo legislações sanitárias deveriam ser apresentado receita. Entretanto, não há informações disponíveis nos órgãos de fiscalização sanitária dos Estados que efetivamente comprovem a argumentação acima (DA SILVA & COLLINS, 2011).

Com intuito de suprir a enorme demanda do mercado, à indústria farmacêutica se desenvolveu, e hoje disponibiliza para o mercado mundial milhões de substâncias com o propósito terapêutico, acarretando colateralmente um grave problema ambiental, o qual vem crescendo em atenção e preocupação nas agências controladoras do meio ambiente de várias nações do mundo (GARRIC *et al.*, 2003). O aporte de substâncias farmacologicamente ativas no ambiente advém do uso intenso e extensivo no tratamento de doenças em seres humanos e animais; sendo excretadas na forma não metabolizada ou na forma de metabólito ativo e introduzidos, principalmente, a partir do lançamento via efluentes municipais e industriais nos corpos receptores das águas servidas (BROWN, 2006; PETROVIC, 2005; CALAMARI & CROSA *et al.*, 2003).

Neste contexto, Won-Jim Sim *et al.*, (2011) investigaram a presença de resíduos de fármacos em efluentes de indústrias farmacêuticas e confirmaram a presença de vários

compostos incluindo a cafeína, acetaminofeno, A.A.S, lincomicina, ciprofloxacino, florfenicol, ácido mefenâmico e naproxeno.

Segundo Larsson *et al.*, (2007) os efluentes provenientes de indústrias farmacêuticas apresentaram níveis relativamente altos de compostos farmacêuticos e esse fenômeno é atribuído ao processo de produção.

1.1.2 Escolha do fármaco

O fármaco escolhido para a realização deste trabalho denomina-se isoniazida, considerado um potente agente tuberculostático de primeira escolha pertencente à classe terapêutica dos antibióticos quimioterápicos. É utilizado no protocolo clínico de tratamento da tuberculose pulmonar.

Em relação à tuberculose pulmonar, dados fornecidos pela Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) denotam que a incidência no Brasil dessa doença é em torno de 71 casos por 100 mil habitantes com taxa de mortalidade bastante elevada, cerca de 4,8/mil habitantes, enquanto que o número de pessoas infectadas é estimado em 42 milhões e cerca de 10% dos casos notificados por ano ocorrem em menores de 15 anos. As maiores incidências encontra-se no Estado do Rio de Janeiro com 69,8 novos casos/100 mil habitantes (SVS, 2011).

A luz do exposto, esses dados contribuem para o possível aumento da ocorrência da isoniazida nas diversas matrizes ambientais tanto sob o ponto de vista do aumento do consumo do fármaco devido a grande incidência da tuberculose no Brasil, bem como, devido ao uso intensivo pelos indivíduos portadores da doença, o qual segundo dados farmacocinéticos cerca de 75 a 95% de uma dose de isoniazida são excretados na urina dentro de 24 h, em sua maioria sob a forma de metabólitos ativos (GOODMAN & GILMAN 2006).

Deste modo pode-se destacar duas formas de contaminação ambiental, que poderá ser tanto sob a forma de metabólitos ativos, ou ainda em decorrência do processo produtivo farmacêutico na forma de efluentes industriais, em virtude da necessidade de aumentar a escala de produção para atender a demanda local dos órgãos de saúde pública.

A Figura 1.1.2 apresenta o levantamento quantitativo em unidade farmacêutica de comprimidos de isoniazida produzidos nos últimos anos.

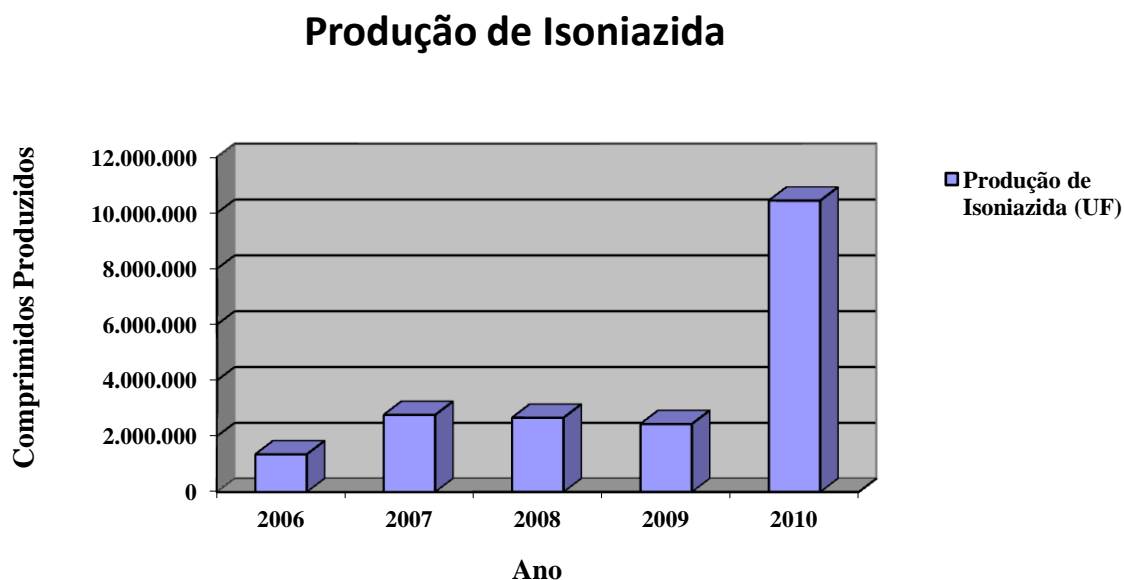


Figura 1.1.2. Levantamento quantitativo em unidade farmacêutica de comprimidos de isoniazida produzidos. Fonte: Planejamento e controle da produção (Laboratório Farmacêutico da Marinha, 2011).

Em observância aos fármacos utilizados no tratamento de infecções bacterianas, alguns autores consideram que, de todos os fármacos, os antibióticos são os mais preocupantes, visto que o seu lançamento no meio ambiente tem aumentado a ocorrência de bactérias resistentes (DAUGHTON APUD PETROVIC *et al.*, 2003).

Com respeito à resistência bacteriana causada pela presença de fármacos no meio ambiente, caso o microrganismo causador da tuberculose pulmonar venha adquirir resistência a isoniazida, poderá levar o indivíduo a morte, pois o fármaco não será capaz de combater a infecção.

Em referência a isoniazida, não foram encontrados dados bibliográficos que reportassem a sua ocorrência no meio ambiente. Todavia, cabe ressaltar que a isoniazida pertence a classe terapêutica dos antibióticos e o seu consumo é considerado de longo prazo, face as necessidades impostas pelo protocolo terapêutico recomendado pela Organização Mundial da Saúde, aumentando a possibilidade de sua ocorrência no meio ambiente.

Ademais Fick *et al.*, (2010) desenvolveram uma metodologia para calcular a concentração ambientalmente crítica (CAC) para cerca de 500 fármacos, que apresentaram maior prevalência em águas de superfície reportados em estudos anteriormente realizados em

diversos Países, e a isoniazida foi contemplada. O estudo foi desenvolvido para cada fármaco isoladamente com base em testes de eficácia e segurança (potência farmacológica), juntamente com fator de bioconcentração e lipofilicidade em peixes, assumindo que a droga também atua em espécies alvo e não-alvo. De acordo com os autores seria possível prever a probabilidade de interações farmacológicas em espécies presentes no meio ambiente. Com referência aos resultados das pesquisas, a isoniazida apresentou uma CAC no valor de $1,5 \times 10^8 \text{ ng L}^{-1}$, ou seja, concentração previsível capaz de desenvolver alguma interação com os microrganismos presentes no meio ambiente.

Portanto, os resultados desses estudos sugerem que em algum momento a ocorrência da isoniazida no meio ambiente foi reportada, e assim sendo justificam as pesquisas no sentido de monitorar a sua ocorrência no meio ambiente, com objetivo de investigar tecnologias de tratamento eficientes capazes de eliminar completamente o fármaco presente nos efluentes, evitando assim possíveis mecanismos de interação com os microrganismos presentes em diferentes matrizes ambientais.

1.2 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a eficiência da aplicação direta dos Processos Oxidativos Avançados (POA) na sua variante peróxido de hidrogênio combinado com a radiação ultravioleta ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$), para total remoção da isoniazida no efluente sintético pesquisado.

1.2.1 Objetivos específicos

- Avaliação preliminar de alguns sorventes disponíveis comercialmente através da aplicação da técnica de extração por fase sólida (SPE), para identificação de um sorvente compatível com as características físico-química do fármaco, para assim validar a metodologia de extração e quantificação que apresentar o melhor percentual de recuperação.
- Estudo da influência da concentração de peróxido de hidrogênio no pH e na condutividade do meio reacional.

- Avaliação do percentual de remoção de Carbono Orgânico Total (% Remoção COT) e da concentração de isoniazida efetivamente degradada para ambas as proporções molares de peróxido de hidrogênio utilizadas [1C:1H₂O₂] e [1C:2H₂O₂].
- Investigação da formação dos compostos intermediários monitorados via cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (CLAE-EM), obtidos ao longo dos tempos de retenção hidráulica (TRH) do reator fotocatalítico.
- Determinação dos parâmetros operacionais ótimos do reator fotocatalítico.
- Investigação da concentração de amônia formada no meio reacional, em decorrência das reações de fotoclivagem exercidas pelos radicais HO[•] sobre a molécula de isoniazida.
- Determinação da constante cinética da reação de fotodegradação do fármaco.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

É notável que a questão da contaminação ambiental ocasionada por resíduos de fármacos em diversas matrizes ambientais, despertou grande preocupação em toda comunidade acadêmica, e ocupou posição de destaque no cenário científico nos últimos anos, fato que pode ser facilmente observado através do grande número de trabalhos de pesquisas desenvolvidos a cerca do tema.

As Figuras 2.1(a) e 2.1(b) apresentam os resultados dos números de publicações em jornais e revistas indexadas, sobre o desenvolvimento das técnicas analíticas para o controle de resíduos de fármacos no meio ambiente nos últimos dez anos.

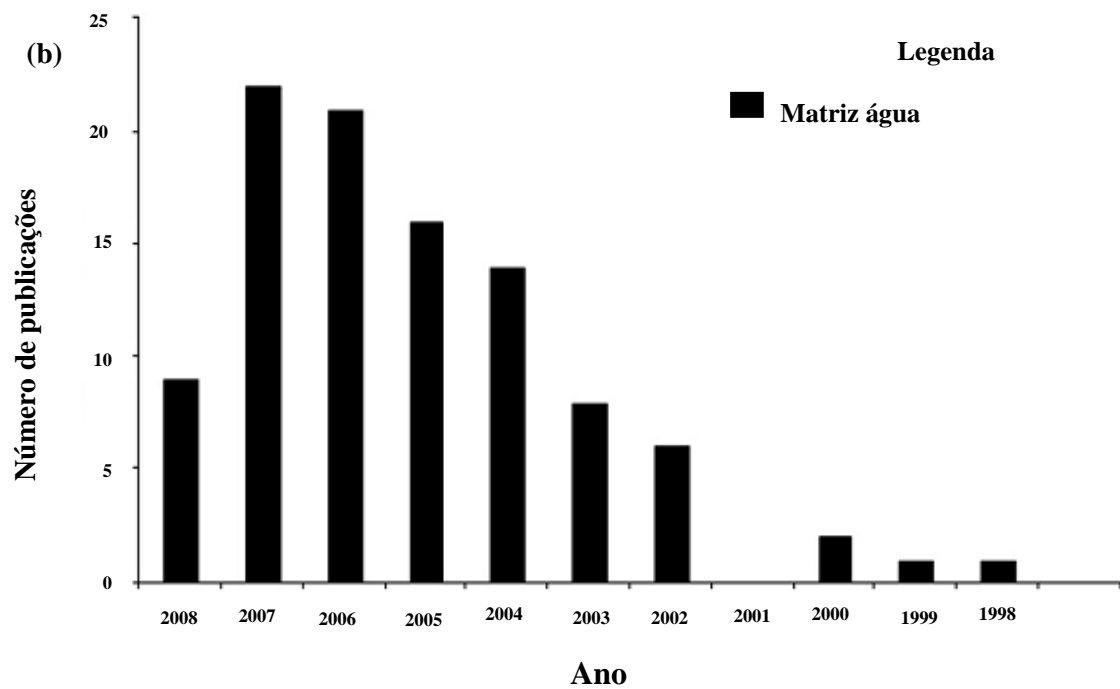
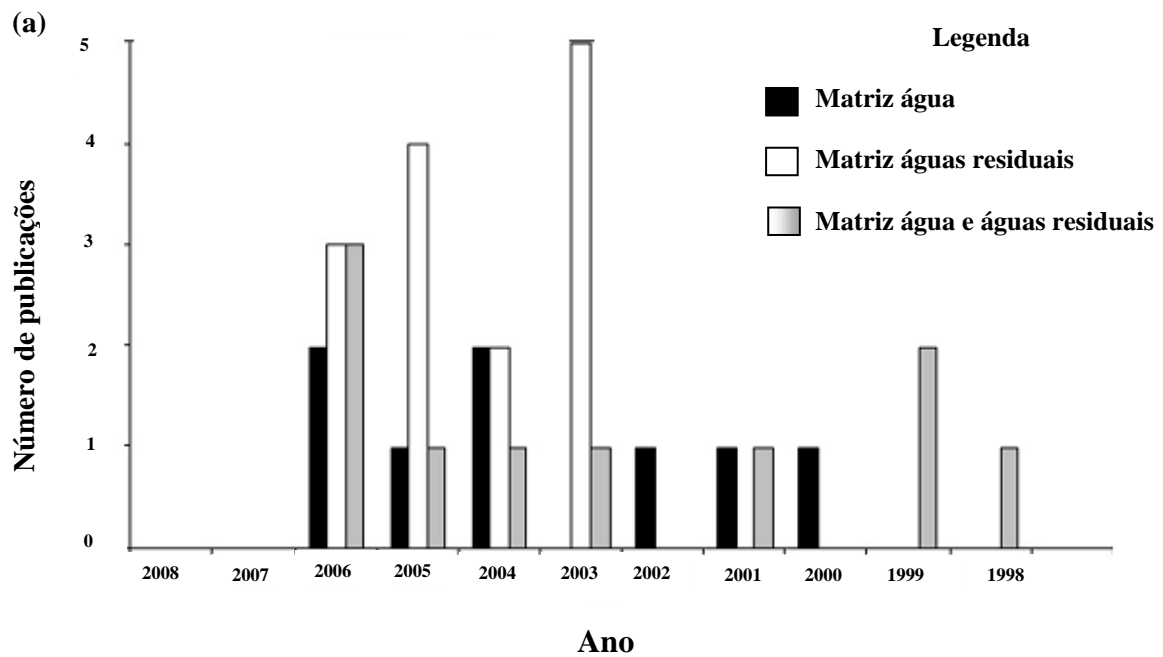


Figura 2.1(a) Número de publicações em revistas e jornais sobre o desenvolvimento das técnicas de análise para o controle de resíduos de fármacos nos últimos dez anos. Fonte: Adaptado de: FATTA *et al.*,2007 apud KLAVARIOTI *et al.*,2009. (b) Número de publicações em revistas e jornais sobre a degradação de resíduos de fármacos por POAs ao longo da última década. Fonte: Adaptado de FATTA *et al.*,2007 apud KLAVARIOTI *et al.*, 2009.

Portanto, este capítulo apresenta os resultados das pesquisas bibliográficas, destacando a ocorrência dos resíduos de fármacos, sobretudo os antibióticos sendo estes considerados de elevado grau de criticidade, em face aos seus diversos mecanismos de ação e possibilidade de desenvolver resistência bacteriana nos microrganismos presentes nas diversas matrizes ambientais.

Apresenta também um breve panorama da tuberculose pulmonar no Brasil, seu agente etiológico, fisiologia e mecanismos de infecção, assim como o tratamento farmacológico indicado segundo a OMS. Descreve os recursos analíticos no que tange as metodologias de pré-concentração, concentração, extração e quantificação do resíduo de fármaco via cromatografia líquida de alta performance acoplado a espectrometria de massa (CLAE-EM). Apresenta os protocolos de estudo de estresse químico de fármacos para investigação dos compostos intermediários, bem como todos os possíveis intermediários da isoniazida formados frente às condições dos ensaios realizados.

2.1 A PRESENÇA DE RESÍDUOS DE FÁRMACOS NO MEIO AMBIENTE

2.1.1 Os efeitos nocivos dos resíduos de fármacos sobre a biota aquática

De acordo com dados disponíveis na literatura, de todas as classes terapêuticas utilizadas na prática médica, os resíduos dos antibióticos são os que mais preocupam, os quais quando presentes na matriz ambiental podem sensibilizar os microrganismos e assim desenvolver resistência bacteriana sob os mais diversos mecanismos, como por exemplo, os mecanismos celulares.

Compostos farmacêuticos pertencentes a classe terapêutica dos antibióticos administrados a seres humanos, representam uma ampla gama de produtos químicos, que inclui os β -lactâmicos, sulfonamidas, macrolídeos, fluoroquinolonas, tetraciclínas e nitroimidazóis. Essa diversidade de classes químicas é igualmente representada pela variabilidade física, química e propriedades bioquímicas, resultando em suscetibilidade variável para processos de tratamento físico, químico e biológico. A exemplo os β -lactâmicos são caracterizados pelo fato de geralmente ser muito rapidamente degradado durante os processos de tratamento convencionais de águas residuais. Este comportamento, presume ser

em função da susceptibilidade à hidrólise química e bioquímica do anel β -lactâmico. No entanto, observa-se que os comportamentos de outras classes de antibióticos são muito mais difíceis de caracterizar, devido à variação da eficiência de remoção, conforme relatados a partir de estudos realizadas em diferentes partes do mundo (LE-MINH *et al.*, 2010).

Uma vez lançados nos corpos receptores, os resíduos de antibióticos poderão interagir com os microrganismos presentes na biota aquática, podendo desenvolver mecanismos de resistência bacteriana. Caso o microrganismo resistente venha infectar o homem, este por sua vez desenvolverá a doença. Entretanto ao fazer uso do medicamento indicado para combater a infecção, o organismo não responderá ao tratamento, podendo levar o indivíduo a morte.

Os antibióticos nas águas superficiais têm o potencial de interromper ciclos bacterianos chave e processos críticos para os organismos aquáticos (nitrificação e desnitrificação) ou agrícola (fertilidade do solo) e produção animal (processos rudimentares) (COSTANZO *et al.*, 2005; KINNEY *et al.*, 2006a;. KUMMERER, 2004).

Apesar dos fármacos serem detectados no ambiente em baixas concentrações ($\text{ng} - \mu\text{g L}^{-1}$), este quadro gera grande preocupação, uma vez que são substâncias biologicamente ativas que podem desencadear efeitos farmacodinâmicos em organismos aquáticos que possuam receptores enzimáticos compatíveis (FENT *et al.*, 2006 & BOUND *et al.*, 2004).

Efeitos de toxicidade costumam ser observados somente em concentrações acima de $1 \mu\text{g L}^{-1}$, no entanto, é importante salientar que os ensaios de toxicidade priorizam os efeitos agudos, quando na realidade os organismos aquáticos são expostos a baixas concentrações a um longo período e, portanto, efeitos crônicos são mais prováveis (FENT *et al.*, 2006). Folmar *et al.*, (2000) observaram que concentrações a partir de 200 ng L^{-1} de 17β -estradiol (estrogênio endógeno) e 100 ng L^{-1} de 17α -etinilestradiol (estrogênio sintético) induziram a síntese da proteína vitelogenina (regulada por estrogênios e, portanto, usualmente encontrada em peixes fêmeas) e em peixes machos da espécie *Cyprinodon variegatus*, sendo este efeito considerado crônico.

No estudo de Rodgers-Gray *et al.*, (2003) peixes jovens da espécie *Rutilus rutilus* foram expostos a concentrações gradativas de efluente de ETE por 150 dias contendo além de outros perturbadores endócrinos, estrogênios sintéticos. Os resultados revelaram que a exposição induziu à feminização de peixes machos. Subseqüentemente, os peixes foram gradativamente expostos a águas naturais por mais de 150 dias, resultando na redução de

vitelogenina no plasma, porém, não se observou alteração no sistema sexual feminizado dos peixes, indicando que a anomalia no sistema reprodutivo não possui caráter reversível.

Não menos importantes são as considerações de que os organismos são expostos a muitos compostos diferentes simultaneamente, podendo ocorrer efeito aditivo ou até mesmo sinérgico entre os fármacos ou outras substâncias presentes no ambiente (BOUND *et al.*, 2004 & CLEUVERS *et al.*, 2003).

Akiyama & Savin (2010) relataram os efeitos tóxicos em vários organismos, por exemplo, bactérias, algas e pulgas d'água (*Daphnia magna*), encontrados não apenas em altas concentrações, mas também em baixas concentrações e em testes de toxicidade crônica (ALATON *et al.*, 2004). Uma das possibilidades mecânicas que corroboram para comprovação do fenômeno da resistência bacteriana desenvolvida pelos microrganismos é a presença de antibióticos nos ecossistemas aquáticos em baixas concentrações. Os antibióticos podem atuar como compostos de sinalização na concentração sub-inibitória e selecionar bactérias resistentes aos antibióticos.

A *Escherichia coli* são utilizadas como indicadores de contaminação fecal e em situação de equilíbrio não se desenvolvem no meio ambiente. Entretanto a *E. coli* são conhecidas por persistir no sedimento de efluentes até várias semanas (JAMIESON *et al.*, 2005). Devido ao fato das bactérias viverem junto aos biofilmes, são mais propensas a trocar seus genes. Com a possibilidade dos antibióticos influenciarem as características fenotípicas e genotípicas das bactérias, os biofilmes são importantes reservatórios para o desenvolvimento e a transferência horizontal de genes de resistência a antibióticos em ecossistemas aquáticos (DAVEY & O'TOOLE, 2000; MOLIN & TOLKER-NIELSEN, 2003).

Richardson & Bowron (1985) analisaram uma série de antibióticos como a ampicilina, eritromicina, sulfametoxazol, tetraciclina e grupos penicilâmicos para avaliar a sua biodegradabilidade durante o tratamento de esgoto. O estudo indicou que estes antibióticos eram praticamente não biodegradáveis e apresentou potencial para se manter farmacologicamente ativo no tratamento de esgoto. Essas propriedades levam a persistência destes compostos no meio ambiente e potenciais efeitos de bioacumulação (WOLLENBERGER *et al.*, 2000).

2.1.2 Ocorrência de antibióticos no meio ambiente

Os antibióticos foram recentemente classificados como um grupo de risco prioritário devido à sua alta toxicidade para as algas e bactérias em baixas concentrações e o potencial em causar resistência entre populações de bactérias presente no meio ambiente (HERNANDO *et al.*, 2006).

Grande parte da preocupação quanto à presença de antibióticos em águas residuais, é em função da sua persistência através dos processos de tratamento de águas residuais sobretudo devido a possibilidade de que eles podem contribuir para a prevalência da resistência a antibióticos em espécies de bactérias presentes nos efluentes e águas superficiais próximas as estações de tratamento de águas residuais (ETE) (ADELOWO *et al.*, 2008; AUERBACH *et al.*, 2007; BAQUERO *et al.*, 2008).

A presença de antibióticos em águas residuais tem contribuído para o desenvolvimento e disseminação de espécies resistentes a antibióticos já que um número significativo de genes de resistência a antibióticos têm sido encontrados em ETE (SZCZEPANOWSKI *et al.*, 2009). Várias bactérias, como coliformes fecal, *E.coli* e enterococos encontradas no esgoto têm demonstrado resistência à ciprofloxacina, trimetoprim, sulfametoxazol e vancomicina (NAGULAPALLY *et al.*, 2009). Um estudo desenvolvido por KIM *et al.*, 2007 utilizando um lote de tetraciclina no reator de bancada, mostraram que a exposição na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ aumenta a concentração de tetraciclina no interior do reator por bactérias resistentes. No entanto, o significado real das baixas concentrações de antibióticos em ETAR, em termos de propagação da resistência ainda está para ser conclusivamente determinada (LE-MINH *et al.*, 2010).

Cagné *et al.*, (2006) pesquisaram amostras de águas residuais de várias unidades de tratamento, objetivando detectar a presença de 21 resíduos de compostos farmacêuticos a base de antibióticos. Um total de seis antibióticos foram detectados, incluindo duas sulfonamidas (sulfametazina, sulfametoxazol), uma tetraciclina, fluoroquinolona (ciprofloxacina), macrólídeos (eritromicina- H_2O) e trimetoprim. A frequência de detecção de antibióticos foi na seguinte ordem: tetraciclina e trimetoprim (80%); sulfametoxazol (70%); eritromicina- H_2O (45%); ciprofloxacino (40%); sulfametazina (10%). No entanto, as concentrações detectadas foi $\leq 1,3 \mu\text{g L}^{-1}$. As concentrações avaliadas encontrava-se numa ordem de magnitude reportados para sistemas semelhantes na Europa e no Canadá.

De fato, a ocorrência de antibióticos no meio ambiente é significativa e extremamente diversa. A Tabela 2.1.1 apresenta os resultados da compilação das pesquisas bibliográficas realizadas, com referência a ocorrência de antibióticos nos efluentes em diversos Países.

Tabela 2.1.1. Ocorrência de antibiótico nos afluentes as ETAR em diversos Países

Antibiótico	Concentração no afluente	Referência
País	(ng L⁻¹)	
<i>Cefalexina</i>		
Australia	2000	(Costanzo <i>et al.</i> , 2005)
Australia	≤ 5600	(Watkinson <i>et al.</i> , 2007)
China	670-2900	(Gulkowska <i>et al.</i> , 2008)
Taiwan	1563-4367	(Lin <i>et al.</i> , 2009)
<i>Amoxicilina</i>		
Australia	≤ 280	(Watkinson <i>et al.</i> , 2007)
<i>Cloxacilina</i>		
Australia	< (1)-320	(Watkinson <i>et al.</i> , 2007)
USA	< (13)-15	(Cha <i>et al.</i> , 2006)
<i>Penicilina G</i>		
Australia	< (2)	(Watkinson <i>et al.</i> , 2007)
<i>Penicilina V</i>		
Australia	≤ 160	(Watkinson <i>et al.</i> , 2007)
<i>Sulfametoxazol</i>		
USA	1090	(Yang <i>et al.</i> , 2005)
Coréia	450	(Choi <i>et al.</i> , 2007)
China	5450-7910	(Peng <i>et al.</i> , 2006)
Croácia	590	(Gros <i>et al.</i> , 2006)
Suécia	230-570	(Gobel <i>et al.</i> , 2005a)
Mexico	390	Brown <i>et al.</i> , 2006)
USA	< (50)-1250	Karthikeyan and Meyer, 2006)
Suécia	20	(Bendz <i>et al.</i> , 2005)
Espanha	580	(Carballa <i>et al.</i> , 2004)
Espanha	0,60	(Carballa <i>et al.</i> , 2005)
Suécia	< (80)-674	Lindberg <i>et al.</i> , 2005)
Austria	24-145	(Clara <i>et al.</i> , 2005)
China	10-118	Xu <i>et al.</i> , 2007)
Taiwan	179-1760	(Lin <i>et al.</i> , 2009)
<i>N⁴-sulfametaxazol</i>		

Suíça	850-1600	(Gobel <i>et al.</i> , 2005a)
<i>Sulfatiazol</i>		
Coréia	10-570	(Choi <i>et al.</i> , 2007)
<i>Sulfametazina</i>		
USA	150	(Yang <i>et al.</i> , 2005)
Coréia	4010	(Choi <i>et al.</i> , 2007)
<i>Sulfadimethoxina</i>		
USA	70	(Yang <i>et al.</i> , 2005)
Coréia	460	(Choi <i>et al.</i> , 2007)

Fonte: Adaptado de LE-MINH *et al.*, 2010.

2.1.3 As diferentes formas de contaminação por resíduos de fármacos

2.1.3.1 Efluente de indústria farmacêutica

As indústrias farmacêuticas possuem uma longa e complexa cadeia produtiva, e os resíduos de fármacos são gerados, desde as áreas de fracionamento de matéria-prima, controle de qualidade, desenvolvimento de novos fármacos e produção, até a embalagem e o acondicionamento do produto final (BILA & DEZOTTI 2003 & BRAILE *et al.*, 1993).

Neste sentido, ressalta-se que a contribuição de lançamento de resíduos de fármacos presente nos efluentes de origem farmacêutica é considerada de maior impacto face os seguintes aspectos: reduzida eficiência de degradação desses contaminantes pelas tecnologias de tratamentos convencionais adotadas pelas indústrias o qual determina o lançamento de compostos com a sua fórmula estrutural praticamente intacta; altas concentrações de resíduos de fármacos de diversas classes terapêuticas presentes nos efluentes podendo desencadear efeitos sinérgicos e até mesmo a ocorrência de produtos de degradação devido a exposição à luz e as variações de pH e temperatura.

Com o objetivo de investigar a presença de resíduos de fármacos nos efluentes de origem farmacêutica Larsson *et al.*, (2007), analisaram amostras provenientes de uma estação de tratamento que recebe efluentes de 90 indústrias farmacêuticas, localizada no centro sul da Índia, um local de grande produção de medicamentos genéricos. As análises de caracterização dos efluentes brutos e tratados apresentaram os seguintes resultados, conforme indicados na Tabela 2.1.2.

Tabela 2.1.2. Resultados das análises de caracterização dos efluentes provenientes de 90 indústrias farmacêuticas.

Parâmetros Unidade	Resultados	
	Efluente Bruto	Tratado
DBO ₅ (mg L ⁻¹)	1300	270
DQO (mg L ⁻¹)	6000	1400
Sólidos Totais Dissolvidos (STD)	9000	500
Sólidos Suspensos Totais (SST)	5000	300
pH	7,5	7,5

A triagem inicial de 59 compostos farmacêuticos detectou que 21 destes estavam presentes em concentrações acima de 1 µg L⁻¹. Uma análise quantitativa independente em nove drogas de maior prevalência e dois antibióticos, confirmaram os resultados da triagem. Quase todos os 11 medicamentos foram detectados em níveis acima de 100 µg L⁻¹ (Tabela 2.1.3). A descarga de ciprofloxacino no meio ambiente corresponde a aproximadamente 45 kg de princípio ativo produzido por dia, que é equivalente à quantidade total consumida por um período de 5 dias pela população da Suécia com nove milhões de habitantes (WILLIAMS *et al.*, 2005).

Tabela 2.1.3. Princípios ativos encontrados nas amostras de efluentes de uma estação de tratamento que atende cerca de 90 indústrias farmacêuticas.

Princípio ativo	Classificação terapêutica	Limite (µg L ⁻¹)
Ciprofloxacino	Antibiótico-fluoroquinolona	28,0 – 31,0
Losartan	Receptor angiotensina II (antagonista)	2,4 – 2,5
Certirizine	Receptor-H ₁ (antagonista)	1,3-1,4
Metoprolol	Adrenoreceptor-β ₁ (antagonista)	800 - 950
Enrofloxacin	Antibiótico-fluoroquinolona (uso veterinário)	780-900
Citalopran	Inibidor da recaptção da serotonina	770-840
Norfloxacin	Antibiótico-fluoroquinolona	390-420
Lomefloxacin	Antibiótico-fluoroquinolona	150-300
Enoxacin	Antibiótico-fluoroquinolona	150-300
Ofloxacin	Antibiótico-fluoroquinolona	150-160
Ranitidina	Antagonistas do receptor H ₂	90-160

Fonte: Larsson *et al.*, (2007).

Behera *et al.*, (2011) pesquisaram a ocorrência de vinte compostos farmacêuticos em cinco estações de tratamento da Ulsan, a maior cidade industrial da Coreia. Os fármacos investigados incluíram os antibióticos, hormônios, analgésicos, anticonvulsivante, antihiperlipidêmicos e anti-hipertensivos. Os resultados mostraram que acetaminofeno, atenolol e lincomicina foram os principais poluentes individuais normalmente encontrados em concentrações acima de $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Na estação de tratamento, as concentrações do paracetamol, cafeína, estriol e estradiol diminuíram mais de 99%. Entretanto, para o antibiótico sulfametazina, e metoprolol, e a carbamazepina apresentaram eficiência de remoção muito reduzida, cerca de 30%.

Lin & Tsai (2009) investigaram a ocorrência e a distribuição de resíduos de fármacos incluindo antibióticos, estrogênios, antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), beta-bloqueadores, e os reguladores de lipídios em três rios e no ponto de lançamento de efluentes de quatro indústrias farmacêuticas em Taiwan. O resíduo de fármaco mais frequentemente detectado foi o paracetamol, eritromicina- H_2O , sulfametoxazol e genfibrozila. Os AINEs foram os fármacos que apresentaram maior prevalência ($> 60\%$). O presente estudo demonstrou uma perda significativa de fármacos em decorrência do processo de produção em águas de superfície no distrito de Taipei. As altas concentrações de fármacos encontrados por drenagem nos rios de Sindian e Dahan demonstraram o grau alarmante a que esses rios foram impactados por resíduos de fármacos de efluentes hospitalares, doméstico, e instalações de produção farmacêutica.

2.1.3.2. Efluentes de hospitais

Os hospitais são importantes fontes de contaminação de compostos farmacêuticos: uma grande variedade de micropoluentes incluindo resíduos de diagnósticos, atividades de laboratório e pesquisa, e excreção de fármacos e metabólitos por pacientes internados após o uso de medicamentos, foram frequentemente detectados (VERLICCHI *et al.*, 2010).

Antibióticos têm sido relatados em águas residuárias de hospitais (KUMMERER, 2001; LINDBERG *et al.*, 2004). A maioria dos trabalhos de análises de efluente hospitalar têm focado as pesquisas dando ênfase especial na identificação de resíduos de antibióticos, entretanto, é interessante ressaltar que os hospitais podem ser uma importante fonte de contaminação de fármacos pertencentes a outras classes terapêuticas (KUMMERER *et al.*, 1997; HARTMANN *et al.*, 1998; KUMMERER, 2001; BROWN *et al.*, 2006; MAHNIK *et al.*, 2007; THOMAS *et al.*, 2007a,b).

O efluente de um hospital de pequeno porte na Espanha, com apenas 75 leitos apresentaram concentrações médias de aproximadamente $20 \mu\text{g L}^{-1}$ e $16 \mu\text{g L}^{-1}$ de ibuprofeno e paracetamol, respectivamente (GOMEZ *et al.*, 2006).

Embora a mistura de compostos farmacêuticos em efluentes hospitalar seja mais extenso, é provável que as concentrações estejam em níveis inferiores. Os estudos de toxicidade puseram em evidência o potencial tóxico do efluente hospitalar (HARTMANN *et al.*, 1998;. EMMANUEL *et al.*, 2004).

Bactérias resistentes aos antibióticos podem ser liberadas diretamente para sistemas de águas residuais a partir de pacientes medicados com antibióticos e, conseqüentemente, liberados no meio ambiente. A Resistência também pode ser adquirida através da transferência horizontal de gene, através da captação de genes determinantes da resistência por conjugação, transdução, transformação e, portanto, ser disseminado para além do habitat original dos hospedeiros (ZHANG *et al.*, 2009).

Recentemente, bactérias resistentes aos antibióticos, incluindo *S. aureus* A1 *mecA^r* e *E. cloacae* A10 *ampC^r* foram taxonomicamente identificados nas águas residuais de hospital (VOLKMANN *et al.*, 2004). Isto é de particular importância uma vez que existem casos em que as águas residuais podem ser reutilizadas como por exemplo para irrigação (FATTA-KASSINOS *et al.*, 2011).

Langford *et al.*,(2009) pesquisaram a ocorrência de quase 40 compostos farmacêuticos nos afluentes e efluentes das estações de tratamentos que recebem efluentes de dois hospitais. Os resultados revelaram que o propranolol contribuíram com 11,5% para o aumento da carga de resíduos de fármacos nos efluentes. Atorvastatina e atenolol contribuíram com 2% cada. Cetoprofeno, carisoprodol, metoprolol, fenazona, tamoxifeno, carbamazepina, paroxetina, sertralina, clotrimazol e sinvastatina contribuíram com pouco menos de 2%. Os outros compostos não foram detectados.

Watkinson *et al.*, (2007) avaliaram a presença de 28 antibióticos em três efluentes de origem hospitalar. Todos os antibióticos foram detectados pelo menos uma vez, com exceção apenas da bacitracina. As concentrações variaram de $0,01-14,5 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo predominante os β -lactâmicos, quinolonas e grupos sulfonamida. Antibióticos também foram encontrados em afluentes das estações de tratamento de águas residuárias na concentração de $64 \mu\text{g L}^{-1}$, representado também pelos β -lactâmicos, quinolonas e grupos sulfonamida.

A Figura 2.1.2 exemplifica as possíveis rotas de entrada e distribuição de resíduos de fármacos em diversas matrizes ambientais.

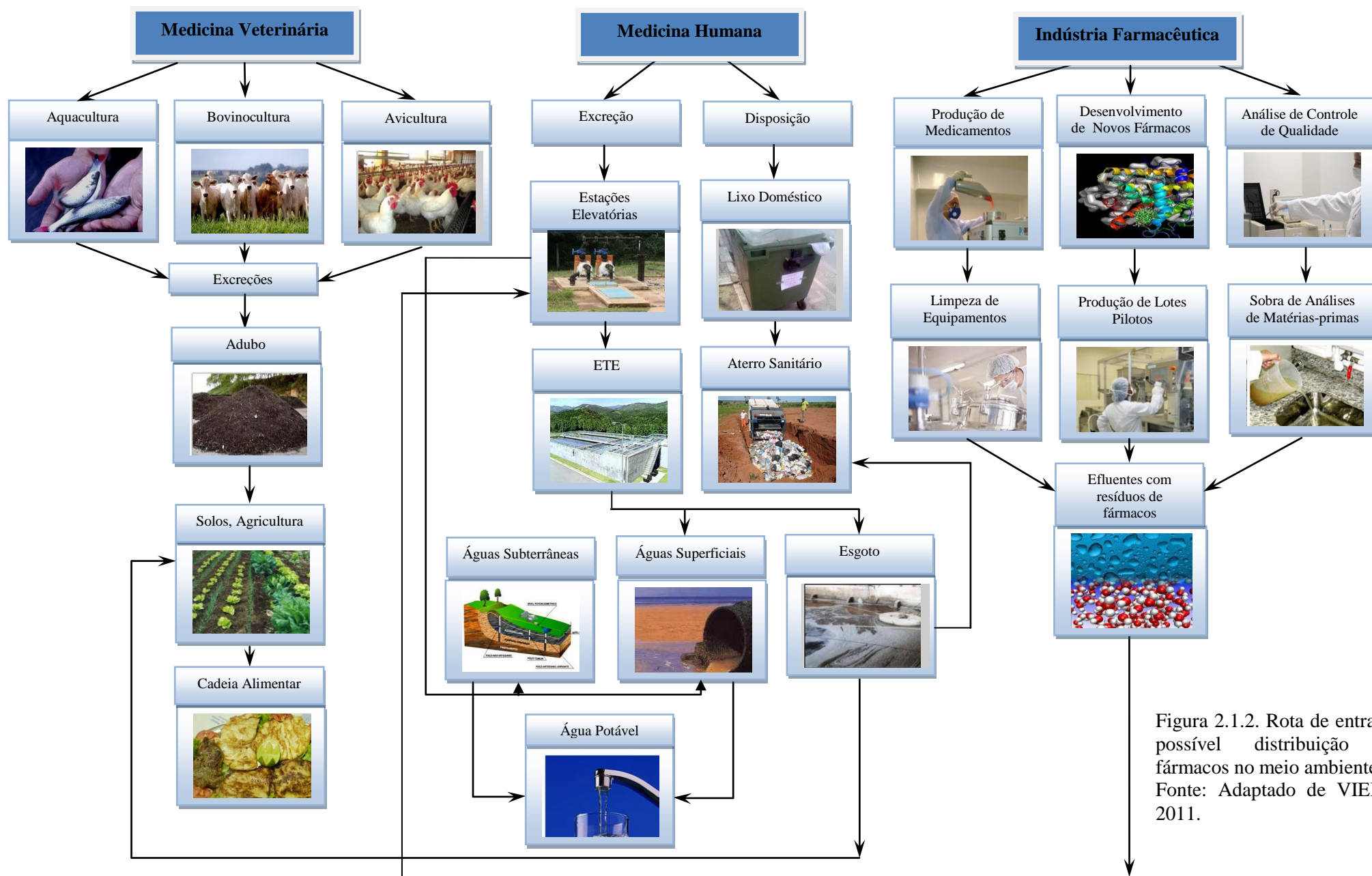


Figura 2.1.2. Rota de entrada e possível distribuição dos fármacos no meio ambiente.
Fonte: Adaptado de VIEIRA, 2011.

2.1.4 Aspectos normativos e regulatórios

As legislações ambientais aplicadas as indústrias farmacêuticas geralmente compreendem uma série de rigorosos procedimentos e normas, entretanto sem um foco específico para o controle de lançamento de substâncias farmacologicamente ativas presentes em efluentes de origem farmacêutica, bem como o registro do uso dos produtos finais (USFDA, 1998 & EMEA, 2006).

O aumento crescente nas pesquisas para quantificação dos resíduos de fármacos no ambiente ocorre pelo fato de que ainda não estão inseridos em legislações que regulamentam a qualidade da água. No entanto, espera-se que num futuro próximo esses contaminantes poderão sofrer regulamentações dos órgãos ambientais fiscalizadores, bem como dos órgãos sanitários do País, por tratar-se de um grave problema de saúde pública (HERNÁNDEZ *et al.*, 2007; RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2007).

No Brasil, ainda não existe nenhuma legislação ambiental e sanitária que determinem parâmetros e limites para lançamentos de resíduos de fármacos presentes em efluentes de origem farmacêutica, impossibilitando a atuação dos órgãos de fiscalização sanitária e ambientais.

Mesmo sem nenhuma legislação que normatize os limites para descarte de fármacos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), regulamentou a Resolução de N° 44 de 26 de outubro de 2010, que institui critérios para comercialização de antibióticos no Brasil (BRASIL, 2010).

Compreende-se que essa nova regulamentação irá coibir o uso indiscriminado de antibióticos, reduzindo a elevação da resistência bacteriana no País, além de minimizar o descarte tanto para os aterros sanitários como para as estações de tratamento das municipalidades, reduzindo a possibilidade de ocorrência do fármaco no meio ambiente.

Outro aspecto normativo interessante é referente à logística reversa no segmento farmacêutico, o qual a ANVISA iniciou um levantamento nos laboratórios oficiais farmacêuticos, com o intuito de conhecer efetivamente os processos produtivos, bem como os procedimentos de gerenciamento e descarte de resíduos de medicamentos gerados em decorrência da atividade industrial farmacêutica.

A logística reversa é o principal instrumento da Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS), e garantirá maior eficácia no descarte final de medicamentos para o meio ambiente (CALDAS, 2011).

O resultado desse estudo possibilitará a ANVISA traçar o perfil produtivo de todo o segmento industrial farmacêutico, com o propósito de elaborar uma resolução específica, para o correto gerenciamento de resíduos de fármacos aplicado as indústrias farmacêuticas.

Com relação aos demais países, os Estados Unidos regulamentam produtos farmacêuticos no meio ambiente através da *United States Food and Drug Administration* (US-FDA). Essa regulamentação ocorre através de processos de revisão ambiental requerido para novas drogas submetidas ao FDA (KOT-WASIK, *et al.*, 2006).

No entanto essa avaliação ambiental como pré-requisito para o registro de novos fármacos somente passou a ser solicitada nos últimos anos (HALLING-SORENSEN *et al.*, 1998).

Na Europa as práticas de avaliação de riscos ambientais já estão inseridas no contexto da engenharia de segurança já alguns anos. Em 2005, novas normas foram disponibilizadas e o aspecto positivo foi o requerimento para testes de ecotoxicidade crônica preferencialmente ao agudo, reconhecendo que a maioria dos compostos farmacêuticos ativos podem apresentar a longo prazo, efeitos crônicos em baixos níveis (KOT-WASIK, *et al.*, 2006). Segundo a *European Medicines Agency* (EMA), se o valor da concentração ambiental detectada estiver abaixo de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ o risco para o ambiente ocasionado pelo composto farmacêutico é considerado improvável. Acima de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$, análise bruta do efeito ambiental deve ser executada (CASTIGLIONI *et al.*, 2004 e KNACKER *et al.*, 2003).

A diretriz orientadora do Conselho da União Européia (81/852/EEC) para segurança no meio ambiente estabelece que a concentração de fármacos veterinários no meio ambiente não deve exceder a valores de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ no solo e $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ em água bruta (ARIESE *et al.*, 2001). Limites toxicológicos para 13 fármacos em água foram estabelecidos em pesquisa desenvolvida na Holanda. Esses limites foram baseados sobre 10% da dose máxima diária aceitável ou para o limite máximo permitido para resíduos de fármacos veterinários em leite, considerando um peso médio de uma pessoa de 60 kg e a dose diária de 2 litros de água. Foram estabelecidos os seguintes limites para fármacos em água potável: paracetamol, $150 \mu\text{g L}^{-1}$; sulfametoxazol, $75 \mu\text{g L}^{-1}$; carbamazepina, $50 \mu\text{g L}^{-1}$; metoprolol, $50 \mu\text{g L}^{-1}$; diclofenaco, $7,5 \mu\text{g L}^{-1}$; bisoprolol, $1 \mu\text{g L}^{-1}$; bezafibrate, $35 \mu\text{g L}^{-1}$; eritromicina, $15 \mu\text{g L}^{-1}$; fenofibrate, $50 \mu\text{g L}^{-1}$; ácido acetil salicílico, $25 \mu\text{g L}^{-1}$; ibuprofeno, $150 \mu\text{g L}^{-1}$; ácido clofibrico, $30 \mu\text{g L}^{-1}$; cloranfenicol, limite de quantificação do método tão baixo quanto possível (MULLER, 2002).

2.1.5 A baixa eficiência de remoção dos resíduos de fármacos pelas tecnologias convencionais de tratamento

Tecnologias convencionais de tratamento não são capazes de eliminar totalmente os fármacos que chegam às estações de tratamento dos grandes centros urbanos. A análise de uma amostra de uma unidade de tratamento na Espanha, identificou a presença de vários compostos farmacêuticos incluindo: metoprolol, propranolol, carbamazepina, ácido salicílico, benzafibrato, ibuprofeno, acetoaminofeno, diclofenaco, naproxeno e ácido clofíbrico na faixa de concentração entre 0,01-0,69 $\mu\text{g L}^{-1}$, evidenciando que o processo de tratamento realizado não foi efetivo para eliminar os fármacos, conforme indicado na Figura 2.1.3(a). No mesmo trabalho, foi analisada a água do Rio Ebro, um dos maiores da Península Ibérica, onde os ármacos acetoaminofeno, cafeína, carbamazepina, benzafibrato, diclofenaco e ibuprofeno foram quantificados na faixa de concentração de 9-240 ng L^{-1} Figura 2.1.6 (b) (PEDROUZO *et al.*, 2007).

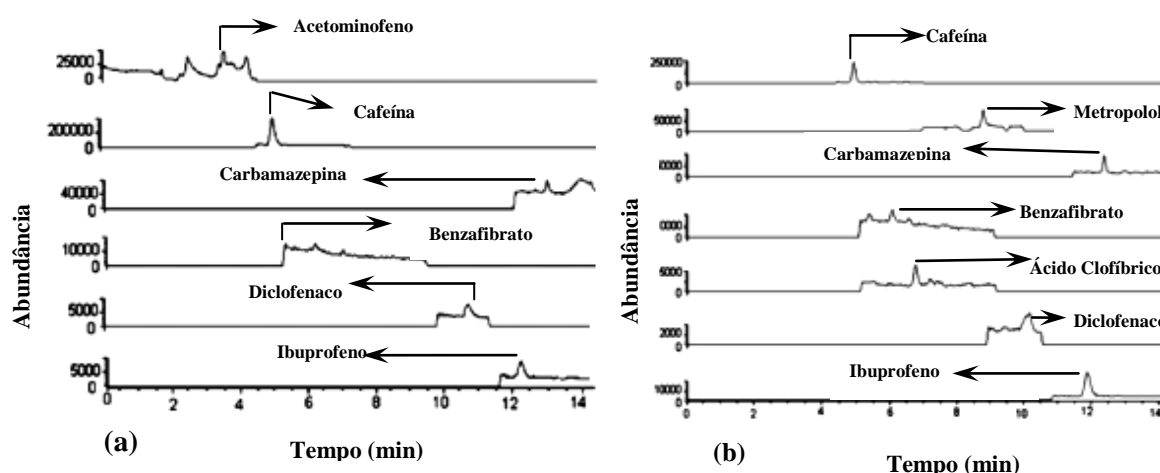


Figura 2.1.3. Cromatogramas (HPLC-ESI-MS/MS). (a) amostras da água do Rio Ebro; e (b) amostras coletadas após o tratamento dos efluentes. Fonte: Adaptado de: PEDROUZO *et al.*, (2007).

Ainda segundo Richardson & Bowron (1985) nas estações de tratamento de efluentes existem três possíveis destinos para os resíduos de fármacos:

- pode ser biodegradável, ou seja, mineralizado a gás carbônico e água, como é o caso do ácido acetilsalicílico;
- pode passar por algum processo metabólico ou ser degradado parcialmente, como ocorre com as penicilinas;
- e, finalmente, pode ser persistente, como o clofibrato.

Os processos biológicos são os mais frequentemente utilizados porque permitem o tratamento de grandes volumes, conseguem alcançar altas taxas de remoção de matéria orgânica e os custos são relativamente baixos. No entanto, alguns compostos são recalcitrantes e podem, inclusive, ser tóxicos aos microrganismos. Em estudos de biodegradação de fármacos as taxas de remoção foram apenas de 50% para sistemas convencionais de lodos ativados (CLARA *et al.*, 2005; e RADJENOVIC *et al.*, 2007).

Os processos físicos (decantação, flotação, filtração, adsorção) são caracterizados pela transferência de fase do contaminante, sem que este seja de fato degradado. Por outro lado, costumam ser bastante eficientes, podendo ser úteis como pré ou pós-tratamento do processo final (FREIRE *et al.*, 2000 & KUNZ *et al.*, 2002). Em estações que operam com sistema de lodos ativados, tecnologia esta adotada pela maioria das indústrias farmacêuticas, a adsorção é o principal mecanismo de remoção de fármacos lipofílicos, como os estrógenos (FENT *et al.*, 2006 & RADJENOVIC *et al.*, 2007).

Os processos químicos baseiam-se na oxidação dos contaminantes pela adição de compostos químicos altamente oxidantes, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), cloro (Cl_2), dióxido de cloro (ClO_2) e permanganato (MnO_4^-). Entretanto, a utilização deste tipo de tratamento não promove a mineralização completa dos contaminantes a CO_2 , havendo a formação de uma grande variedade de sub-produtos em geral, ácidos orgânicos (oxálico, tartárico, fórmico e acético) (VELLA *et al.*, 1993).

A eficiência de remoção dos fármacos em estações de tratamento depende das propriedades físico-químicas de cada composto. Vários trabalhos relatam que a eliminação destes compostos é frequentemente incompleta, pois a taxa de remoção é variável. Por exemplo, para o anticonvulsivante carbamazepina uma remoção de 7% foi observada, enquanto que para o analgésico ácido acetilsalicílico 99% de remoção foi obtida numa estação de tratamento na Alemanha (TERNES *et al.*, 1998).

Huber *et al.*, (2005) relataram que os filtros biológicos e unidades de lodos ativados são tecnologias de tratamento secundário mais frequentemente usadas em ETE. No entanto, o tratamento de lodos ativados mostrou degradar produtos farmacêuticos em pequenas extensões. Maior tempo de retenção de lodo melhorou a degradação, mas a maioria dos compostos investigados não foram completamente degradados. Como resultado, muitos medicamentos são apenas parcialmente removidas durante os processos biológicos e são liberados para águas superficiais (ANDREOZZI *et al.*, 2003). Por isso, o tratamento biológico de águas residuais é insuficiente para alguns produtos farmacêuticos recalcitrantes, e o

processo de tratamento avançado antes e/ou após o tratamento biológico, parece promissor e até necessário (IKEHATA *et al.*, 2006).

Behera *et al.*, (2011) reportaram que as estações de tratamento da municipalidade alcançaram mais de 99% de eficiência para a remoção de paracetamol, cafeína e estradiol. Entretanto, para a sulfametazina, metoprolol e carbamazepina apresentaram eficiência de remoção abaixo de 30%. Particularmente, a remoção de antibióticos variou entre 11,2 e 69%. No tratamento primário (processo físico-químico), a remoção dos fármacos foi insignificante (até 28%).

2.2 QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS NAS DIVERSAS MATRIZES AMBIENTAIS

2.2.1 Metodologias de extração de resíduos de fármacos

Em relação à quantificação dos resíduos de fármacos presentes nas diversas matrizes ambientais, um dos maiores desafios a ser alcançado, é o desenvolvimento de metodologias experimentais de baixa complexidade analítica, incluindo aparatos experimentais mais simples e de baixo custo, para identificação de fármacos.

A análise direta de resíduos de fármacos, em baixos níveis de concentração, é praticamente inviável, seja pela complexidade da matriz, seja pelo limite de detecção das técnicas instrumentais disponíveis. Assim, faz-se necessário um pré-tratamento das amostras para eliminar, ao máximo, os interferentes e pré-concentrar os analitos para alcançar os limites de detecção desejados (SANTOS *et al.*, 2007).

Extração de amostra (isolamento e enriquecimento do analito) é comumente realizadas com fatores de concentração típico de 100 a 1000, este intervalo é necessário para análise de amostras com baixos limites de detecção (LOD). Embora uma variedade de técnicas têm sido empregadas para a extração de antibióticos, como liofilização (HIRSCH *et al.*, 1998) ou extração líquido-líquido (LLE), a técnica mais utilizada é a extração por fase sólida (SPE) com cartuchos hidrofílicos e lipofílicos como por exemplo o HLB equilibrados (JEN *et al.*, 1998).

Fatta *et al.*, (2007) pesquisaram o uso de vários sorventes utilizados na SPE e confirmaram que Oasis HLB foi entre os de melhor desempenho, possibilitando a utilização em múltiplos analitos com características ácidas, básicas e neutras incluindo os antibióticos.

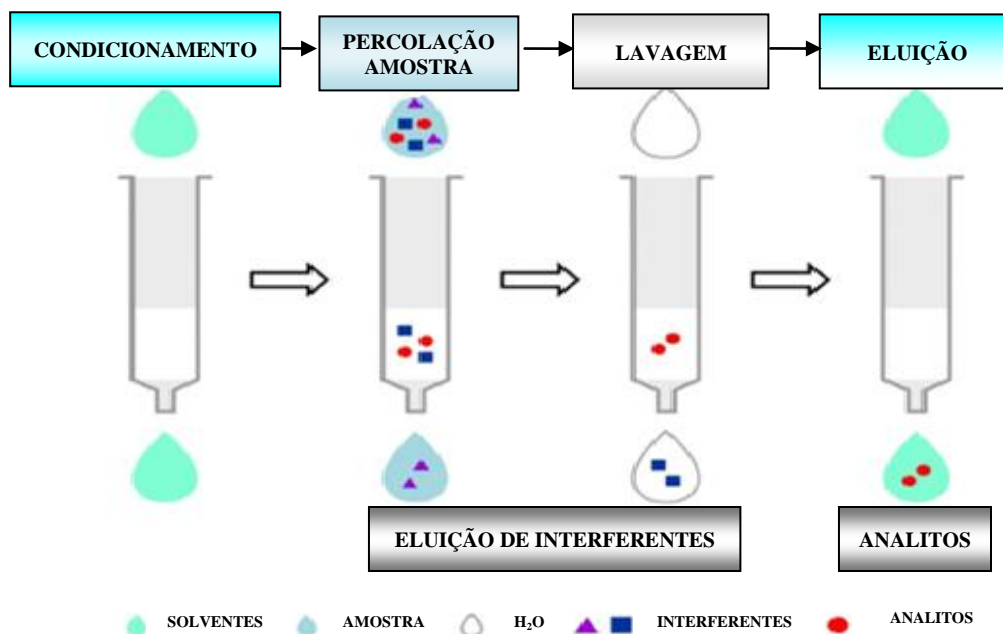


Figura 2.2.1. Etapas envolvidas na SPE: condicionamento do sorvente, adição da amostra, remoção dos interferentes e eluição do analito. Fonte: Adaptado de: CALDAS *et al.*, (2011).

A Figura. 2.2.1 ilustra os procedimentos de SPE que consiste basicamente nas etapas conforme descritos a seguir: ativação do sorvente para deixar os sítios ativos disponíveis; condicionamento do sorvente com solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente utilizado no preparo da amostra de extração; percolação da amostra, quando ocorre a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes; lavagem da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito alvo; e por fim a eluição e coleta do analito (CALDAS *et al.*, 2011; LINGEMAN & HOEKSTRA-OUSSOREN, 1997).

Wardencki *et al.*, (2007) ressalta a importância de atender para alguns fatores para que o procedimento de extração (SPE) alcance a máxima eficiência. Os fatores incluem o recheio do cartucho, pH da amostra, modo de extração, temperatura, força iônica e tempo de extração.

Os procedimentos de análise exigem um cuidado específico na sua execução, pois como os fármacos encontram-se muitas das vezes em matrizes complexas e em concentrações reduzidas, qualquer incompatibilidade do fármaco com o solvente, poderá comprometer o resultado da recuperação. Na SPE vários são os fatores intervenientes no sucesso do processo

de isolamento e concentração dos analitos. Na literatura encontra-se uma enorme quantidade de métodos díspares para um mesmo propósito, denotando que o estudo aprofundado da otimização da técnica de SPE necessita ser realizado (LAGANÀ, *et al.*, 2004; MOZAZ *et al.*, 2004).

Para antibióticos, antifúngicos e antiparasitários de uso humano e veterinário, os sorventes mais utilizados são os cartuchos com copolímero divinilbenzeno e N-vinilpirrolidona que, por apresentarem características de interação mista hidrofílica-lipofílica, esses cartuchos podem extrair analitos de média a alta polaridade, apresentando os melhores percentuais de recuperação (DIAZ-CRUZ e BARCELÓ, 2006).

Para extração de analitos com características mais básicas, como fármacos de uso psiquiátrico (fluoxetina e sertralina) e β -bloqueadores (propranolol e metoprolol) podem ser utilizados sorventes de copolímero divinilbenzeno e N-vinilpirrolidona modificados com grupos sulfonato, para troca catiônica. Para analitos com características ácidas, como fármacos da classe dos antiinflamatórios não esteroidais (diclofenaco e naproxeno) podem ser utilizados sorventes com grupos dimetilbutilamina, capazes de realizar troca aniônica, ou à base de sílica modificada com C₁₈ (PETROVIC *et al.*, 2005). Uma alternativa é a utilização de cartuchos em série, como utilizados na extração de quinze fármacos com características distintas de acidez (básicos, neutros e ácidos) (LAVÉN *et al.*, 2009). Para eluição dos analitos, são utilizados solventes com características polares, como acetona, metanol, acetonitrila e acetato de etila (PETROVIC *et al.*, 2005; HERNANDEZ *et al.*, 2007; DIAZ-CRUZ e BARCELÓ, 2006).

Para escolha do sorvente compatível com as características do fármaco e da matriz, é fundamental realizar um estudo detalhado das propriedades físico-químicas do fármaco alvo, em face ao grande número de sorventes disponíveis no mercado. A Tabela 2.2.1 apresentada o resultado das pesquisas com referência aos diferentes procedimentos da aplicação da técnica de extração em SPE para diversas classes de antibióticos, bem como as matrizes ambientais, tipos de sorventes e volume das amostras utilizadas no procedimento de extração e resultado do percentual de recuperação obtido.

Tabela 2.2.1. Classe do antibiótico, tipo de amostra, sorventes (volume da amostra e pH), solventes e percentual de recuperação em procedimentos de SPE.

Classe do Antibiótico	Amostra	Sorvente		Solventes	Recuperação (%)	Referência
		Volume da amostra (mL), pH				
5 β -lactâmicos	Efluente	SPE Oasis HLB 200 mL, pH 7,5		Metanol Acetonitrila Ácido fórmico Ácido trifluoroacético	>70% Amoxicilina (10%)	Cha <i>et al.</i> , 2006
16 Sulfonamidas Trimetropim	Efluente	SPE Oasis HLB Sílica gel 250 - 500 mL		Metanol Ácido fórmico	62-102%	Chang <i>et al.</i> , 2008
6 Sulfonamidas Trimetropim 5 Macrolídeos	Efluente	SPE Oasis HLB 50 - 250 mL, pH 4		Metanol Ácido fórmico Acetato de etila	91-108% 30 - 47% 78 - 124%	Gobel <i>et al.</i> , 2004
2 Macrolídeos Sulfametoxazol Trimetropim Ofloxacino	Efluente	SPE Oasis HLB 100 - 200 mL		Metanol/ Acetonitrila Acetato de amônio	40 - 116% 50 - 80% 88 - 111% 95 - 106%	Gros <i>et al.</i> , 2006
Trimetropim	Lodo	SPE Oasis HLB		Ácido fórmico Acetato de etila	78%	Gobel <i>et al.</i> , 2005b
5 Fluoroquinolonas 3 Sulfonamidas Trimetropim	Efluente	SPE Oasis HLB 100 mL pH 2,5		Metanol Acetonitrila	90-129% 37- 65% 98 -109%	Renew & Huang, 2004
8 Fluoroquinolonas	Efluente	SPE Anpel MEP, 100 e 500 mL, pH 3,0		Metanol Ácido Fórmico Acetonitrila Tetrabutila amônio	79 -109%	Shi <i>et al.</i> , 2009
20 Quinolonas e Fluoroquinolonas	Efluente	SPE Oasis HLB 200 e 400 mL, pH 3,0 SPE Water WCX		Metanol Ácido fórmico	64-127% Ácido piromidico <29%	Xiao <i>et al.</i> , 2008
3 Macrolídeos	Efluente	SPE Oasis HLB 120 mL, pH 5,0		Metanol Acetonitrila Ácido fórmico	83 -86%	Yang & Carlson, 2004
6 Tetraciclina 5 Sulfonamidas	Efluente	SPE Oasis HLB 120 mL, pH 3,0		Metanol Acetonitrila Ácido fórmico	78-95% 91-104%	Yang <i>et al.</i> , 2005
2 Fluoroquinolonas 2 Macrolídeos Sulfametoxazol Trimetropim	Efluente	SPE Strata-X p XC 250 mL, pH 3,0		Metanol Acetonitrila Ácido fórmico	76-97% 92-100% 68% 104%	Segura <i>et al.</i> , 2007
5 Sulfonamida Trimetropim	Efluente	SPE Oasis HLB 50 mL, pH 4,0		Metanol Acetonitrila Ácido fórmico	72-110% 80- 103%	Botisti <i>et al.</i> , 2007

Fonte: Adaptado de: LE-MINH *et al.*, 2010.

2.2.2 Recursos cromatográficos para análise de resíduos de fármacos

2.2.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A CLAE possui ampla aplicabilidade na consecução de estudos qualitativos e quantitativos de amostras provenientes de diversas matrizes ambientais, sobretudo na quantificação de resíduos de fármacos. Entretanto, deve-se ter atenção quanto aos produtos de degradação, o qual tem sido relatado que quando formados em detrimento as tecnologias de tratamento utilizadas, tem apresentado absorção no mesmo comprimento de onda do composto original. Neste caso é de crucial importância o acoplamento de recursos analíticos avançados, como por exemplo, a espectrometria de massa (EM).

A cromatografia líquida é utilizada na análise de fármacos pelo fato de não necessitar volatilizar o composto, não correndo assim o risco de perder o analito e também pelo fato de não necessitar o uso de soluções derivatizantes, as quais geralmente são substâncias de alta toxicidade (LÖFFLER & TERNES, 2003).

Foi relatado que a determinação de resíduos de antibióticos por CLAE com detecção espectrofotométrica incluindo fluorescência e absorbância ultravioleta apresentou resultados satisfatórios (CHOI *et al.*, 2007;. ESPONDA *et al.*, 2009;. GOLET *et al.*, 2002;. JEN. *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2007;. PENG *et al.*, 2008). No entanto, Hernández *et al.*, (2007) ao realizar um levantamento mais detalhado, constatou o impressionante progresso no desenvolvimento de método utilizando cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massa (CLAE-EM), em particular a cromatografia líquida-tandem (CLAE-EM/EM) para determinar antibióticos em matrizes complexas tais como águas residuais municipais.

Para análises ambientais com o propósito de triagem (*screening*), com limites de detecção na faixa de concentração de $\mu\text{g L}^{-1}$, o detector de UV pode ser perfeitamente utilizado ou ainda, quando a concentração dos analitos na matriz é elevada (KUMAR *et al.*, 2008; AGUILAR-ARTEAGA *et al.*, 2010).

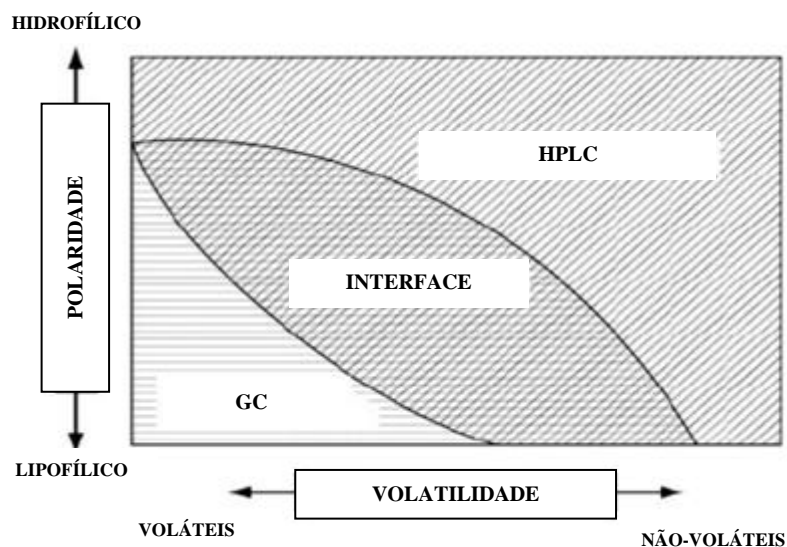


Figura 2.2.2. Faixa de aplicação da HPLC e GC para determinação de poluentes orgânicos emergentes baseados em suas propriedades físico-químicas de polaridade e volatilidade.

Fonte: Adaptado de GIGER, 2009.

A Figura 2.2.2 apresenta o diagrama de polaridade-volatilidade e de acordo com as características físico-químicas exibida pelos poluentes orgânicos o diagrama pode indicar de forma geral qual a técnica de separação mais adequada para ser aplicada como sistema de detecção do analito (GIGER, 2009).

O conhecimento das propriedades físico-químicas dos analitos é de extrema importância para evitar problemas na quantificação dos analitos alvo, que podem estar relacionados com reações secundárias, com impurezas ou degradações na sua estrutura durante a aplicação do método analítico (HERNANDEZ *et al.*, 2007).

As fases estacionárias mais utilizadas na CLAE para separação de compostos orgânicos são do tipo fase reversa (RP, *reversed phase*), com base de sílica com grupos C₁₈. Fases estacionárias com grupos C₈ podem ser utilizadas para β-bloqueadores e antibióticos (tetraciclina, penicilinas, sulfonamidas e macrolídeos) (PETROVIC *et al.*, 2005; HERNANDEZ *et al.*, 2007).

2.2.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrofotometria de massa (CLAE-EM)

Nos últimos anos, a aplicação da técnica de CLAE-EM tornou-se um importante recurso analítico para determinação de resíduos de fármacos em amostras ambientais, em função da combinação entre a aplicabilidade da cromatografia líquida aliada à grande capacidade de detecção dos analisadores de massa. Desta forma, esta integração viabilizou o

desenvolvimento de métodos que possuem como características maior seletividade, sensibilidade e especificidade (COUTINHO *et al.*, 2005; GALLI *et al.*, 2006; BRONDI *et al.*, 2005).

Análise de resíduos de fármacos em amostras ambientais como água de rios e água potável requer métodos sensíveis para a detecção de concentrações na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} . Os produtos farmacêuticos e interferentes endócrinos que apresentam elevada solubilidade e polaridade, recentemente foram quantificados nos países mais desenvolvidos como Alemanha, EUA, Canadá, Holanda, Inglaterra, Espanha, Itália, Suécia, Japão, empregando a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa CLAE-EM. Neste caso, a utilização do espectrômetro de massas é feita basicamente através da ionização por eletrospray (ESI) ou ionização química a pressão atmosférica (APCI) (CASTILHO & BARCELÓ 2001; KOLPIN *et al.*, 2002; RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2004; GLASSMEYER *et al.*, 2005; CÉSPEDES *et al.*, 2006).

Os analisadores de massas mais comumente utilizados para detecção dos analitos são o triplo quadrupolo (QqQ) para o modo sequencial (massas em série), por tempo de voo (TOF, *time of flight*) e o íon trap. O analisador tipo TOF foi empregado na determinação de fármacos (analgésicos, antibióticos, β -bloqueadores e antiepiléticos) em amostras de águas superficiais, águas subterrâneas e efluentes por apresentar maior detectabilidade, faixa dinâmica linear e exatidão de massa (PETROVIC *et al.*, 2005).

Triplo quadrupolos (QqQ) são muito utilizados para a quantificação sensível e seletiva de compostos conhecidos que mostram transições de massas específicas no modo monitoramento múltiplo de reações (MMR) (KOSJEK *et al.*, 2007).

2.3 A TUBERCULOSE

A tuberculose (TB) humana é uma doença infectocontagiosa, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*. No passado a tuberculose foi responsável por milhões de morte (MARQUES e CUNHA, 2003).

A introdução da quimioterapia e medidas profiláticas reduziram drasticamente o número de mortes, e esta situação se manteve por algumas décadas até que a TB voltou a ser considerada como a infecção por único agente que mais mata no mundo (DUCATI *et al.*, 2005).

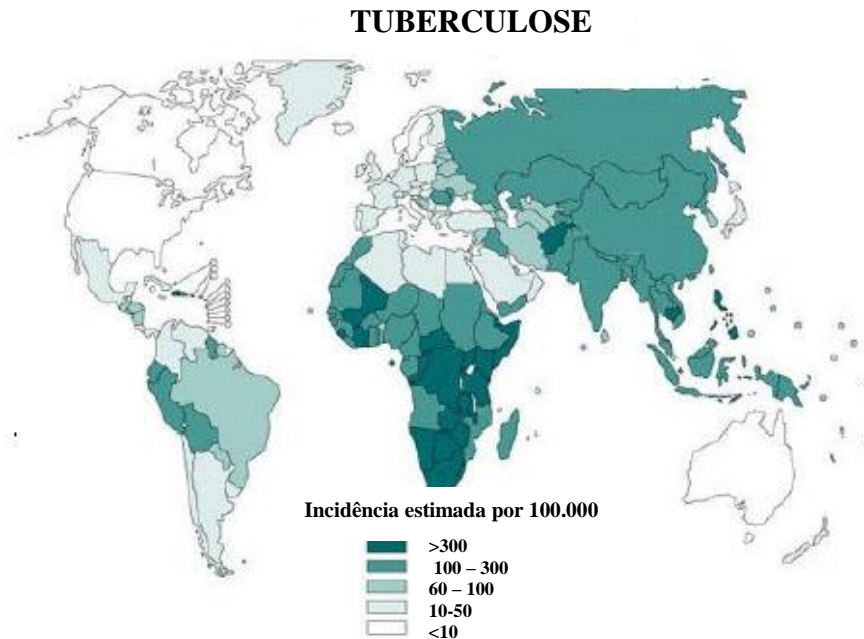


Figura.2.3.1. Mapa da tuberculose no mundo

Fonte: <http://www.gamapreven.who.int/maplibrary/app/leanchresults.aspx>

A TB continua sendo um dos mais sérios problemas de Saúde Pública no mundo, sendo considerada uma doença reemergente. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que um terço da população mundial esteja infectada pelo bacilo da tuberculose e que anualmente ocorrem cerca de 9,2 milhões de novos casos no mundo, levando cerca de 1,7 milhões de pessoas ao óbito (VENDRAMINI *et al.*, 2005). A Figura 2.3.1 apresenta o mapa de distribuição da TB no mundo.

2.3.1 Epidemiologia

No Brasil a incidência dessa doença é em torno de 71 casos por 100 mil habitantes com taxa de mortalidade bastante elevada, cerca de 4,8 mortes/mil habitantes. Essa realidade fez com que a OMS incluísse o Brasil, o único das Américas, na lista das 22 nações que concentram 80% dos casos de tuberculose registrados no mundo, ocupando a 19ª posição em número de casos em 2010. As maiores incidências estão nos Estados no Rio de Janeiro (69,8

novos casos /100 mil habitantes), Amazonas (65,8 novos casos/100 mil habitantes), Pernambuco e Pará (46,0 novos casos/100 mil habitantes) e Rio Grande do Sul (44,8 novos casos/100 mil habitantes). A Região Centro-Oeste é a que apresenta a menor taxa do país (SINAN/SVS/MS, 2011).

2.3.2 Agente etiológico

O agente etiológico da TB é o *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 2.3.2), foi descoberto em 1822 por Robert Koch, ficando conhecido por bacilo de Koch. O *Mycobacterium tuberculosis*, é um parasita intracelular que possui propriedade álcool ácido resistente, devido à grande quantidade de lipídeos presentes em sua parede celular (MARTINS *et al.*, 2000).

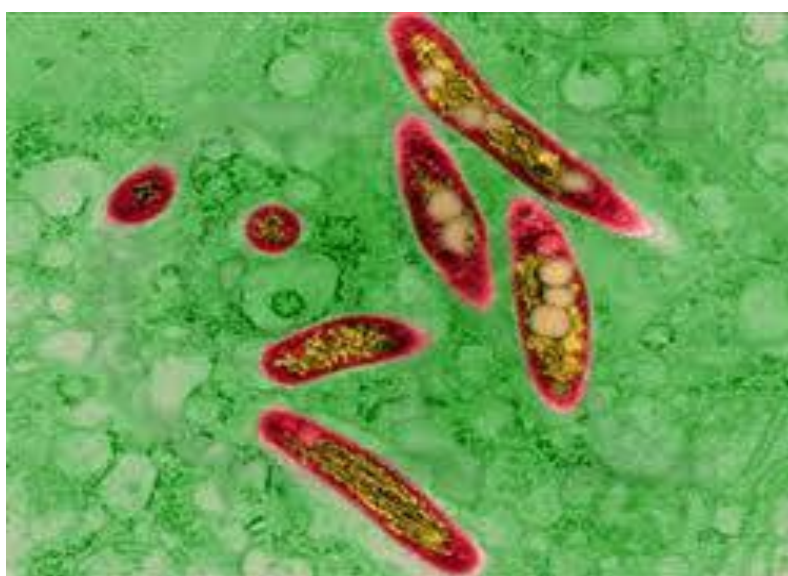


Figura. 2.3.2. Bacilo Álcool Ácido Resistente.

Fonte: Disponível em: <<http://www.fapeam.am.gov.br/noticia.php?not=5049>>. Acesso em: 10 set 2011.

É capaz de sobreviver e multiplicar-se no interior de células fagocitárias, principalmente do sistema pulmonar, e sua ação é regulada pelo sistema imune do hospedeiro, e na maioria das vezes está condicionado a um estado de dormência. Produzem enzimas hidrolíticas ou fármaco modificador como β -lactamase, aminoglicosídeo-acetil transferase que podem esclarecer a resistência natural de algumas cepas de *Mycobacterium* aos antibióticos usados no tratamento (ROSSETI *et al.*, 2002).

2.3.3 Fisiologia e mecanismo de infecção

A transmissão da TB envolve a interação entre os fatores: micobactéria, hospedeiro, ambiente e tempo iniciando a partir da liberação de partículas infectantes de pacientes com a doença ativa. A tosse caracteriza sintomas de inflamação pulmonar crônica, além de ser o principal mecanismo de disseminação do microrganismo para novos hospedeiros. Esses bacilos expelidos pela tosse, espirro ou perdigotos são expulsos do pulmão pelo o ar, podendo permanecer em suspensão por algumas horas no meio ambiente. As gotículas mais pesadas se depositam no ambiente, e as mais leves permanecem em suspensão no ar ou então evaporam, quando inaladas podem atingir os bronquíolos e os alvéolos pulmonares e assim iniciar a multiplicação. É uma doença altamente contagiosa. Calcula-se que durante um ano uma pessoa infectada pode contaminar de 10 a 15 pessoas que tenha tido contato direto (GAZETTA *et al.*, 2008).

2.4 FÁRMACOS DE ESCOLHA PARA O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE

A arma mais eficiente e poderosa contra a TB ainda é a quimioterapia que é capaz de curar a quase totalidade dos casos (BISAGLIA *et al.*, 2003; BARROSO *et al.*, 2004).

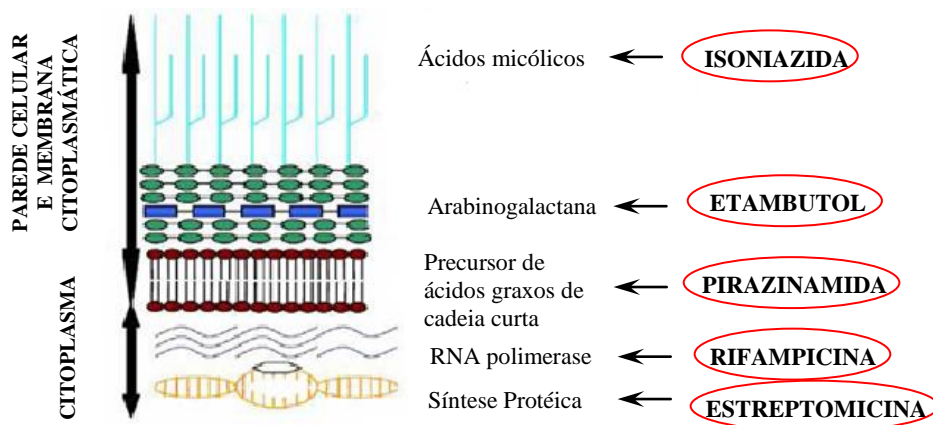


Figura 2.4.1. Sítio de ação dos principais fármacos utilizados no tratamento da tuberculose. Fonte: Adaptado de: TOIT *et al.*, (2006).

A Figura 2.4.1 correlaciona os fármacos pertencentes ao esquema terapêutico de tratamento da TB com os seus sítios de ação no agente patogênico.

O tratamento da tuberculose no Brasil preconiza dois esquemas: Esquema I, para novos casos, sem tratamento anterior para TB utilizando isoniazida (INH=H), rifampicina (RMP=R), pirazinamida (PZA=Z) e (b) Esquema III, para casos de falência ao E-I e acrescenta etambutol (EMB=E), estreptomicina (SM=S) ou etionamida (ETH=Et). Para situações de tuberculose multi resistente, são indicados esquemas especiais com drogas de segunda linha (alternativas), sob os cuidados de um sistema de Vigilância Epidemiológica da TB-MR, pois a transmissão de isolados de *M. tuberculosis* resistentes pode ter sérias repercussões na epidemiologia e controle da TB (SVS, 2011).

2.4.1 Isoniazida (INH)

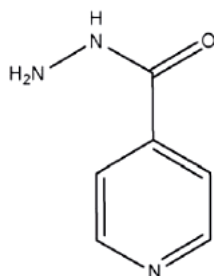


Figura 2.4.2. Estrutura molecular da Isoniazida (INH)

A isoniazida (hidrazida do ácido isonicotínico, metabólito ativo), possui um grupo funcional amida o qual normalmente se comporta como ácido muito fraco, o tipo de substituinte ligado ao nitrogênio da função amida pode influenciar no grau de acidez dos hidrogênios ligados a este grupo (Figura 2.4.2).

A isoniazida continua sendo considerada o principal fármaco de escolha para a quimioterapia da tuberculose. Todos os pacientes com doença causada por cepas do bacilo da tuberculose sensíveis à isoniazida devem receber o fármaco se forem capazes de tolerá-lo (MS, 2011).

Na Tabela 2.4.1 estão descritas as informações do fármaco investigado e as propriedades físico-química mais relevantes, que influenciam diretamente a ação biológica nos seres humanos e conseqüentemente o seu comportamento no meio ambiente. A Figura 2.4.3 apresenta o espectro de massa do composto puro.

Tabela 2.4.1. Propriedades físico-químicas da isoniazida

Fármaco Nomenclatura IUPAC	N° CAS	pKa	Fórmula Molecular Peso Molecular	Solubilidade a 25° C	Coefficientes de Partição óleo/água pKa a 20° C	Toxicidade
Isoniazida (piridina-4- carbohidrazida)	54-85-3	2,0 e 3,5 (BH ⁺)	C ₆ H ₇ N ₃ O 137,14 g/mol	1.4 E+005 mg L ⁻¹	1,82	DL ₅₀ 100 mg/kg (oral em humanos)

Fonte: Disponível em: <<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00339>> Acesso em: 20 ago 2011

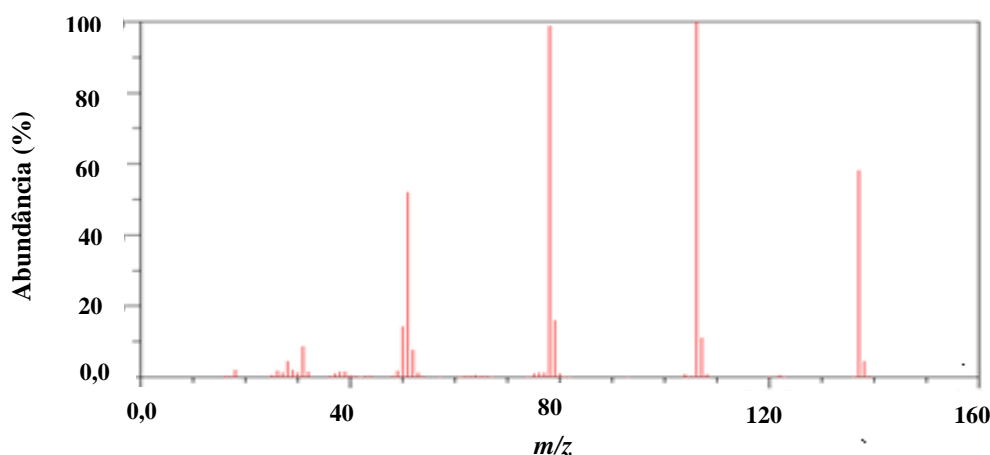


Figura 2.4.3. Espectro de massa da isoniazida (composto puro)

Fonte: Disponível em: <http://www.drugbank.ca/system/mass_specs/DB00951.gif?1265922773> Acesso em: 20 ago 2011.

2.4.1.1 Resistência bacteriana

Os mecanismos de resistência a isoniazida estão associadas às mutações enzimáticas próximas ao sítio ativo da molécula, resultantes da substituição de um único aminoácido, como por exemplo, serina por alanina na posição 94 [Ser94Ala] (DESSEN *et al.*, 1995; QUÉMARD *et al.*, 1995; BALDOCK *et al.*, 1996; ROZWARSKI, *et al.*, 1998) são considerados suficientes para o desenvolvimento da resistência à INH. Adicionalmente, mutações resultantes da substituição dos resíduos Ser94, já mencionados, Ile194, Ile21, Ile95

e Val78 também conferem resistência à INH (BANERJEE *et al.*, 1998; MORLOCK *et al.*, 2003; KRUIH *et al.*, 2007; DIAS *et al.*, 2007).

2.4.1.2 Mecanismo de ação

A isoniazida possui uma estrutura química simples, porém o seu mecanismo de ação contra o *M. tuberculosis* é extremamente complexo. É necessário a utilização de ferramentas genéticas para o estudo completo dos possíveis mecanismos de ação da isoniazida (VILCHÈZE & JACOBS, 2007). Muitos estudos bioquímicos e genéticos têm confirmado o alvo principal da isoniazida como sendo a proteína codificada pelo gene *inhA* (BANERJEE *et al.*, 1994; QUÉMARD *et al.*, 1995; VILCHÈZE *et al.*, 2000; LARSEN *et al.*, 2002; KREMER *et al.*, 2003).

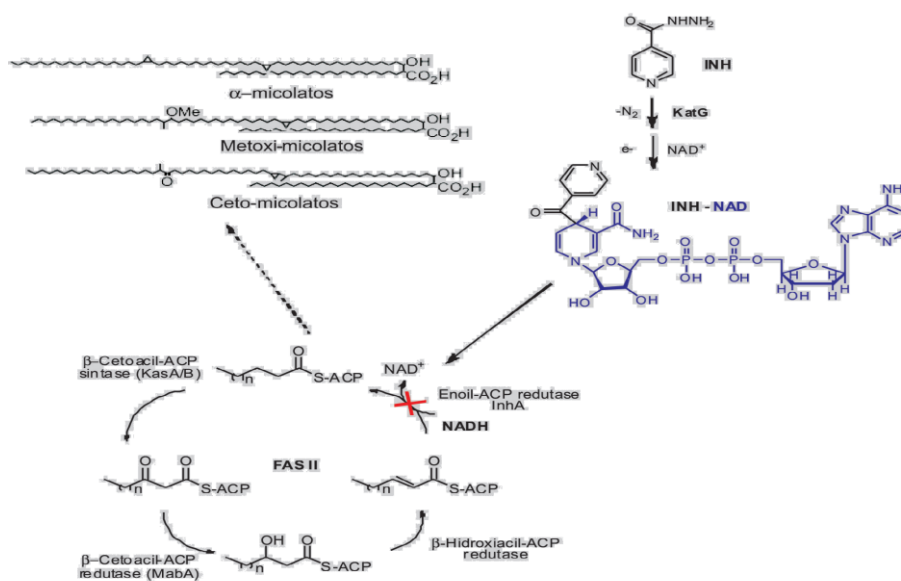


Figura 2.4.4. Mecanismo de ação da INH. A INH (1) sofre ativação pela enzima KatG para formar o aduto INH-NAD. O aduto inibe a InhA e, assim, a biossíntese dos ácidos graxos (FAS II), que são os responsáveis em sintetizar os ácidos micólicos (representação de três classes de ácidos micólicos: α -micolatos, metóxi-micolatos e ceto-micolatos), é interrompida levando a morte celular. (VILCHÈZE & JACOBS, 2007). Fonte: Andrade *et al.*, 2008.

A isoniazida é considerada um pró-fármaco (bioprecursor), que é ativado *in vivo* pela enzima KatG, uma catalase-peroxidase micobacteriana (ZHANG *et al.*, 1992; ROZWASKI *et al.*, 1999), para gerar a forma ativa (ânion ou radical), que se liga covalentemente ao átomo de carbono na posição 4 do anel nicotinamida do cofator (NAD, nicotinamida adenina dinucleotídeo), dando origem a um aduto no sítio ativo da enzima InhA,

inativando-a (Figura 2.4.4). Como consequência, ocorre a interrupção da biossíntese dos ácidos micólicos, considerados os principais constituintes da parede celular do *M. tuberculosis* (ROZWASKI *et al.*, 1998).

2.4.1.3 Absorção, distribuição e excreção

A isoniazida é rapidamente absorvida quando administrada por via oral ou parenteral. As concentrações plasmáticas máximas, que são de 3 a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ são lançadas dentro de 1 a 2 h após a ingestão oral de doses habituais (GOODMAN & GILMAN, 2006).

Nos seres humanos, os principais produtos de excreção resultam de acetilação enzimática (acetilisoniazida o primeiro metabólito formado pela isoniazida, sofre hidrólise enzimática para formar ácido isonicotínico e acetilidrazina) e hidrólise enzimática (ácido isonicotínico). Além disso, podem-se detectar na urina pequenas quantidades de um conjugado de ácido isonicotínico (provavelmente isonicotil glicina), uma ou mais isonicotil hidrazonas e diminutas quantidades de N-metilisoniazida.

2.4.1.4 Métodos de análise da isoniazida (INH)

As boas práticas farmacêuticas recomendam que antes de utilizar um método analítico para análise de fármacos, é necessário validá-lo para garantir que o método atenda às especificações desejadas (BRITAIN, 1998; ERMER, 2001). O International Conference on Harmonisation (ICH, 2005), UNITED STATES PHARMACOPEIA 33 (USP 33, 2010), e a Resolução N° 899 (BRASIL, 2003) apresentam todos os parâmetros analíticos que devem ser avaliados para a validação de um método analítico, sendo que o tipo do método e seu respectivo uso determinam quais os parâmetros que devem ser avaliados, devendo ser selecionado o parâmetro de maior relevância no que diz respeito a comprovar efetivamente a validação de cada metodologia.

Os métodos de análises para quantificação do teor do princípio ativo de INH em formulações farmacêuticas estão previstos nos principais compêndios oficiais de análises, e, portanto podem ser utilizados seguramente, pois são considerados métodos validados de acordo com os princípios postulados pela RE N° 899 (BRASIL, 2003). Existem também na literatura outros métodos para quantificação da INH como, por exemplo, em fluídos

biológicos que são extremamente úteis para avaliar o pico da concentração sérica do fármaco no organismo em ensaios de biodisponibilidade relativa.

A UNITED STATES PHARMACOPEIA 33 (USP 33, 2010) encontra-se descrito o método para determinação da isoniazida em formulação farmacêutica e na análise da matéria-prima utilizando a cromatografia líquida, empregando como fase móvel o tampão fosfato de potássio monobásico de 0,1 M a pH 6,9. A essa mesma solução, foi adicionada a trietanolamina. A fase móvel é preparada com solução tampão e metanol na proporção respectivamente de (95:5). As condições cromatográficas para análise de fármacos são as seguintes: Detector UV 254 nm; Coluna: 3,9-mm X 30 cm contendo L1, fluxo de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ e com volume de injeção de 20 μL .

Bhutani *et al.*, (2007) desenvolveram e validaram uma metodologia de análise para pesquisar e elucidar os compostos intermediários da isoniazida obtido após testes de estresse químico e físico. Os parâmetros cromatográficos bem como a especificação da coluna e composição da fase móvel, estão descritas a seguir: Coluna de fase reversa C_{18} (250 mm X 4,6 mm, 5 μm); fase móvel contendo uma mistura de água:acetonitrila (96:4 v/v) no modo de eluição isocrático, vazão da bomba é de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, e detetor UV no comprimento de onda de 254 nm. Para tanto, o método provou ser simples, exato, preciso, específico, seletivo e facilmente transferível para CLAE-EM.

Unsalan *et al.*, (2005) avaliaram a concentração no plasma sanguíneo dos pacientes sob terapia medicamentosa com os agentes tuberculostáticos, incluindo a isoniazida, pirazinamida e a rifampicina. As análises das amostras foram processadas por cromatografia líquida de alta performance (CLAE), usando uma coluna de fase reversa C_{18} acoplada a uma pré-coluna C_{18} de 4 μm , com um gradiente de solvente na proporção de 3% a 40% (v/v) acetonitrila e tampão fosfato na vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. Foi utilizado um detetor de fotodíodo. O método é reprodutível e acurado com baixos limites de quantificação sendo possível encontrar $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ para a isoniazida, $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ para a pirazinamida e $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ para a rifampicina.

Smith *et al.*, (1999), desenvolveram uma metodologia de análise considerada rápida, simples e sensível para aplicação em amostras geradas em estudos de biodisponibilidade de fármacos incluindo a rifampicina, isoniazida e pirazinamida. As amostras eram extraídas sob os procedimentos da SPE usando um cartucho C_{18} , e após a eluição as amostras eram injetadas diretamente no sistema cromatográfico sob os seguintes parâmetros: composição da fase móvel 3% de acetonitrila e 0,06% de ácido trifluoroacético

(TFA). Coluna de fase reversa C₈ Spherisorb, (150 mm x 4,6 mm, 5 µm), acoplado a uma pré coluna C₈. A vazão foi de 1,5 mL min⁻¹ e detector de 254 nm.

2.5 ETAPAS DE PRODUÇÃO DA ISONIAZIDA

2.5.1 Memorial descritivo do processo produtivo

Os comprimidos são preparações farmacêuticas de consistência sólida, forma variada, geralmente cilíndrica ou lenticular, obtidas agregando, por meio de pressão, várias substâncias medicamentosas secas e podendo ou não encontrar-se envolvidos por revestimentos especiais, assumindo, nesse caso, a designação de comprimidos revestidos (PRISTA *et al.*, 2002). Os comprimidos são responsáveis por mais de 80% das diversas formas farmacêuticas atualmente administradas ao homem (PRISTA *et al.*, 2002 & JIVRAJ *et al.*, 2000).

Conforme previsto na literatura especializada, os comprimidos podem ser fabricados de três formas: a partir da granulação por via úmida; granulação por via seca, ou também denominada de dupla compressão e a técnica da compressão direta (ANSEL *et al.*, 2007; PRISTA *et al.*, 2002; REMINGTON, 2000; LACHMAN *et al.*, 2001).

A tecnologia de fabricação do comprimido da isoniazida denomina-se granulação por via úmida, o qual sob o ponto de vista ambiental pode ser considerada de maior impacto ambiental, quando comparada com os demais tecnologias de fabricação de comprimidos, tendo em vista um maior número de processos unitários envolvidos na fabricação, além de que nesta etapa ocorre a adição de água, o que de certa forma contribui com o aumento do volume de efluentes potencialmente poluidores com destaque para a presença de resíduos de compostos farmacêuticos farmacologicamente ativos.

2.5.1.1 Granulação por via úmida

A granulação por via úmida envolve quatro processos unitários: o umedecimento dos pós; granulação da massa úmida; secagem do granulado obtido e a posterior calibração do granulado seco em grãos de tamanho uniforme com uma adequada umidade. As Figuras 2.5.1 e 2.5.2 apresentam as etapas de formação de grãos, e o esquema geral de granulação respectivamente.

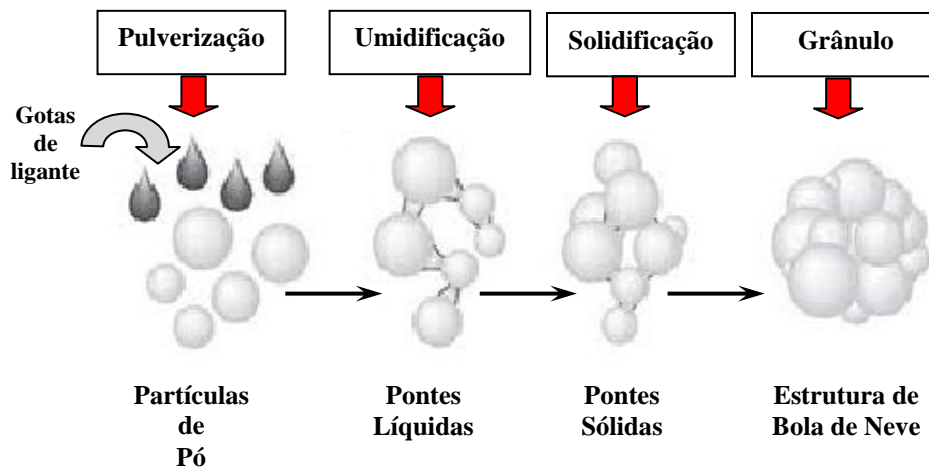


Figura 2.5.1 Formação do grânulo por via úmida. Fonte: Adaptado de BERNARDES, 2006.

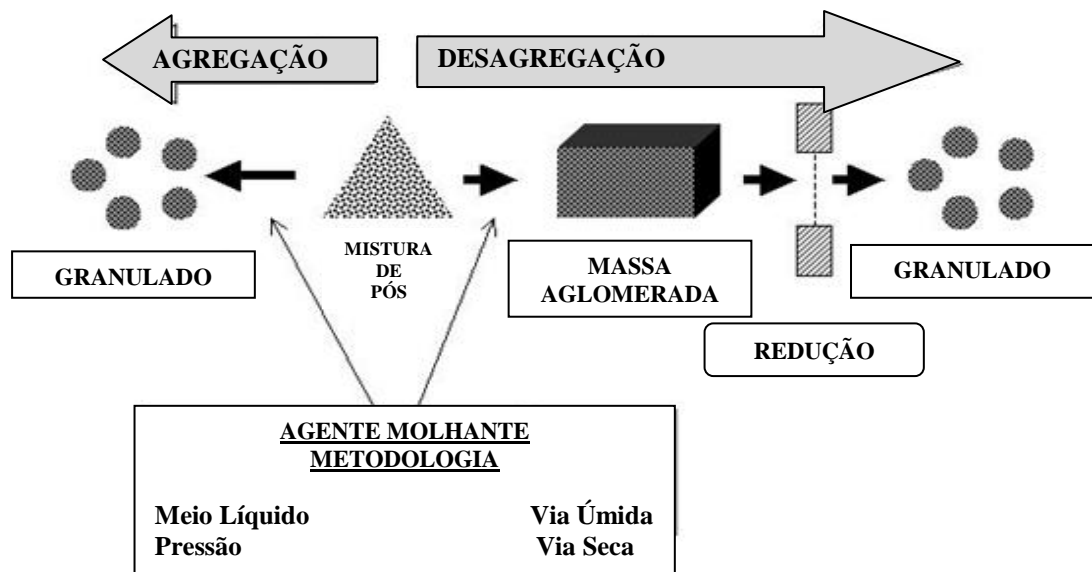
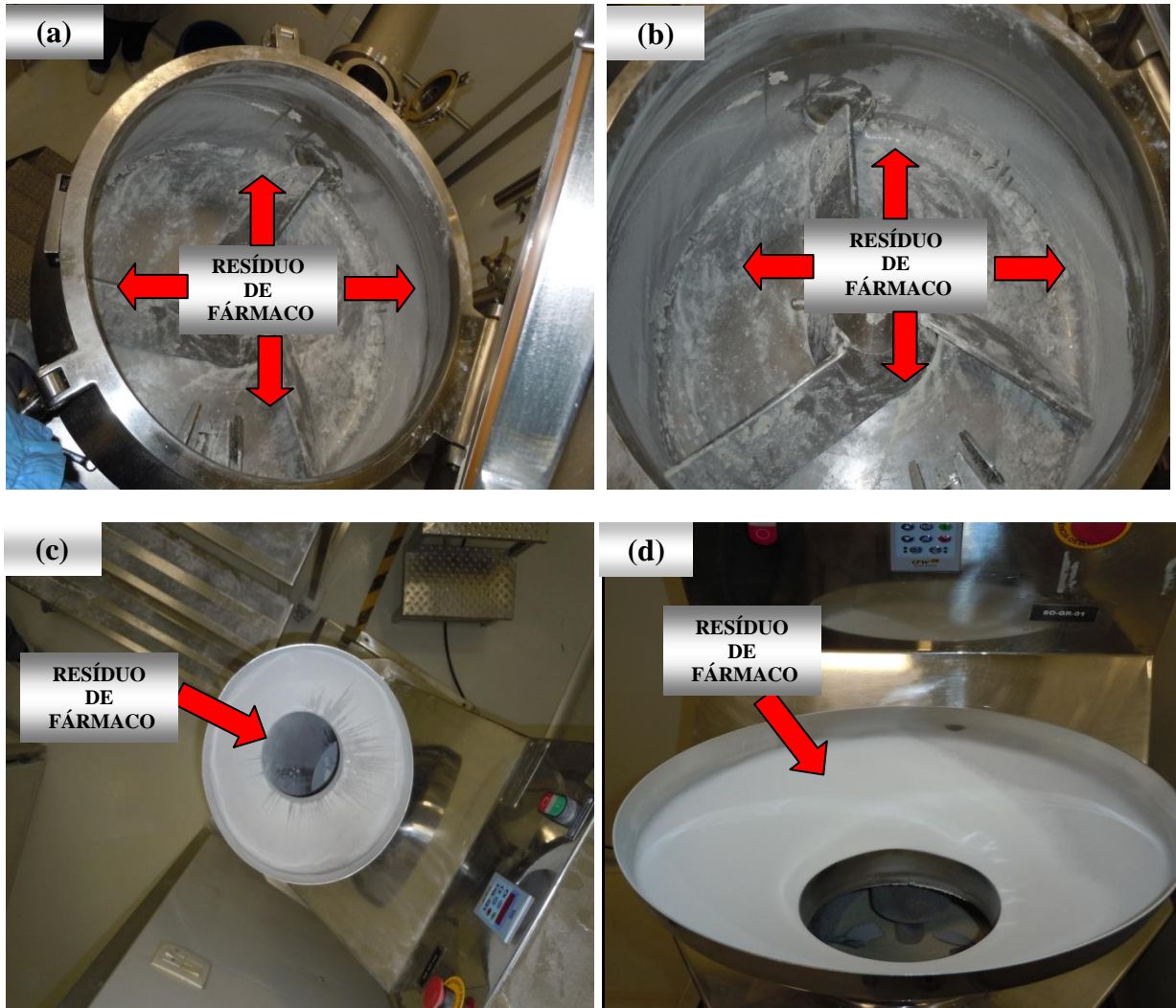


Figura 2.5.2. Esquema geral da granulação. Fonte: Adaptado de CONTO *et al.*, 2000.

Segundo Martinello & Consiglieri (2005), a técnica de granulação por via úmida apresenta alguns aspectos negativos, que inclui a impossibilidade de fabricação de comprimidos contendo substâncias termolábeis ou facilmente hidrolisáveis e a suscetibilidade a contaminações.

Adicionalmente a estes aspectos cabe ainda ressaltar o elevado custo de produção pela necessidade de utilização de vários equipamentos, aumentando o consumo de água tanto no processo como também para efetuar a limpeza, como pode ser constatado nas Figuras 2.5.3 (a); (b); (c); (d); (e); (f); (g) e (h), gerando grandes quantidades de efluentes contendo altos teores de resíduos de compostos farmacêuticos, especialmente a isoniazida.



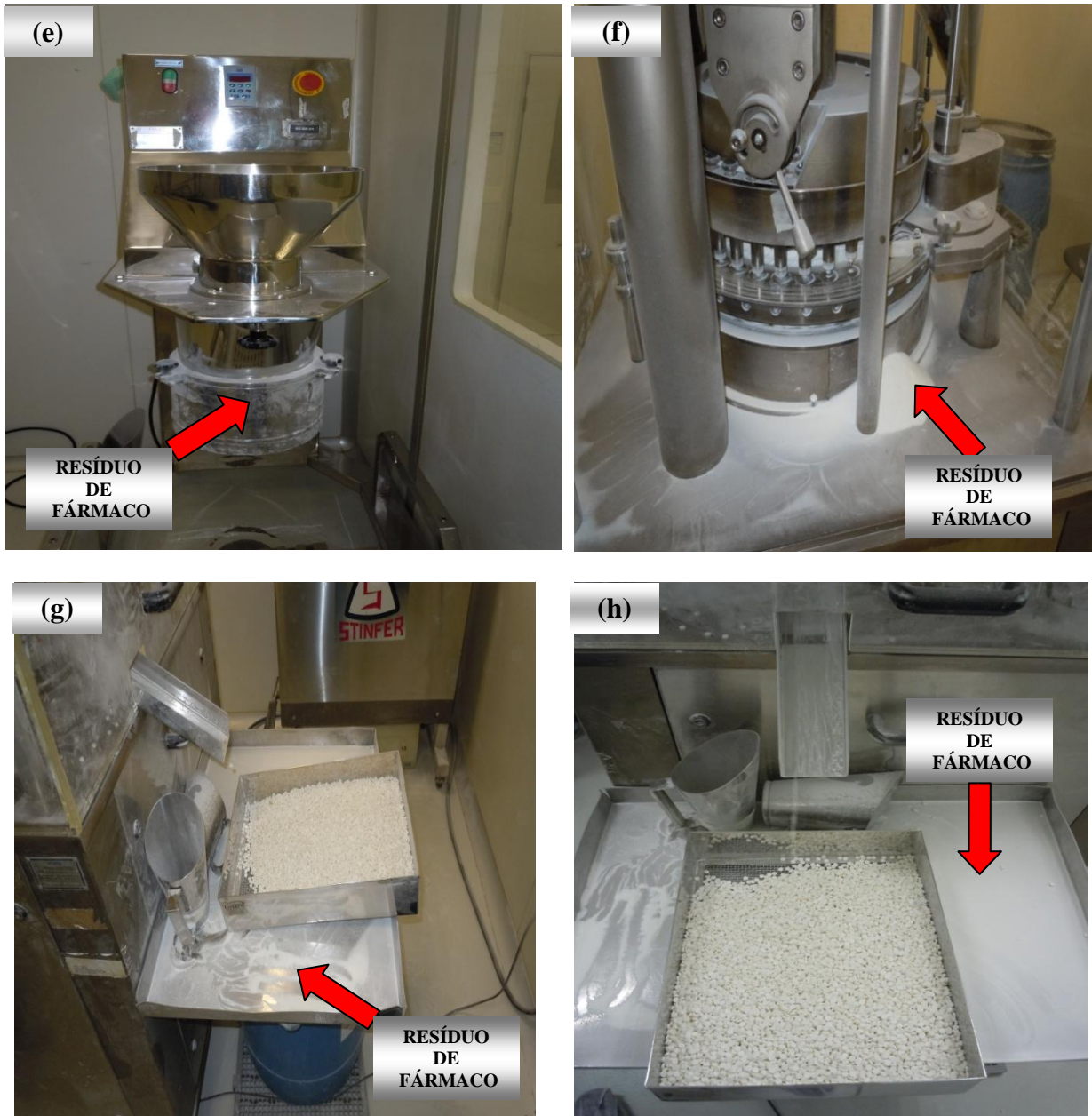


Figura 2.5.3. Levantamento fotográfico dos equipamentos envolvidos no processo de granulação por via úmida para produção em escala industrial da isoniazida, destacando a presença de grande quantidade de resíduos de fármacos aderidos na superfície. (a) Câmara de granulação e mistura (High Shear); (b) Vista da câmara de granulação e mistura; (c) Funil alimentador do moinho granulador; (d) Vista do funil alimentador; (e) Perfil do moinho granulador; (f) Compressora rotativa; (g) Plataforma de coleta da compressora rotativa; (h) Bandeja para coleta de comprimidos.

2.5.2 Insumos farmacotécnicos utilizados na produção da isoniazida

Os excipientes ou também denominados de adjuvantes ao processo produtivo são utilizados na preparação de comprimidos e divide-se em: diluentes, absorventes, aglutinantes,

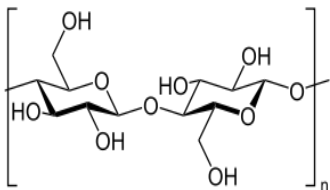
desagregantes, lubrificantes, agentes molhantes, corantes, tampões, aromatizantes e edulcorantes (PRISTA *et al.*, 2002).

No que se refere à produção em escala industrial da isoniazida, os insumos farmacotécnicos utilizados incluem a celulose microcristalina; amido de milho; estearato de magnésio, gelatina branca grau farmacêutico, talco R2BL, e o princípio ativo do fármaco, nesse caso a isoniazida, os quais serão apresentados a seguir dando ênfase especial a função de cada insumo no processo produtivo.

2.5.2.1 Celulose microcristalina (CMC)

A celulose microcristalina é amplamente utilizada na indústria farmacêutica como material retentor de água, estabilizante de suspensões, controlador característico de fluxo em sistemas utilizados para produtos finais, e como um agente aderente utilizado em formulação de comprimidos (PEREIRA *et al.*, 2009).

Tabela 2.5.1. Propriedades físico-químicas da CMC

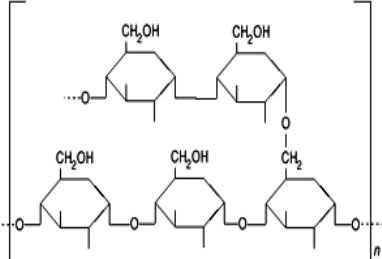
Número CAS	Fórmula molecular e Estrutural	Temp. Ignição	Solubilidade em água (20 °C)	Dens.	Valor de pH
9004-34-6	$(C_6H_{10}O_5)_n$ 	440 °C	Insolúvel	1,5 g/cm ³ (20 °C)	5,0 – 7,5 (100 g/L, H ₂ O, 20 °C) (pasta)

Fonte: <<http://www.drugbank.ca/drugs>> Acesso em: 20 ago 2011

2.5.2.2 Amido de milho

O Amido resulta de uma modificação física ou química do amido de milho, sendo este parcialmente pré-gelificado. Possui diversas funções dentre as quais podemos destacar a compressibilidade, desintegração, agregação e lubrificação. Suas características principais são: inércia química e baixa viscosidade, oferecendo maior estabilidade frente à umidade (PRISTA *et al.*, 2002).

Tabela 2.5.2. Propriedades físico-químicas do amido de milho

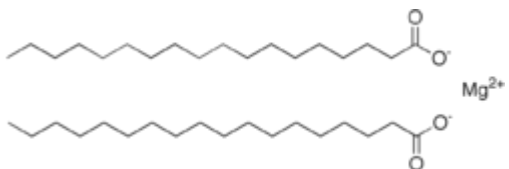
Número CAS	Fórmula molecular e Estrutural (C ₆ H ₁₀ O ₅) _n	Ponto de fusão	Solubilidade em água	Densidade
9005-25-8		decompõe-se a 200 °C	50 g L ⁻¹ (90 °C)	550 a 700 kg/m ³ 1,5 g/cm ³

Fonte: <<http://www.drugbank.ca/drugs>> Acesso em: 20 ago 2011

2.5.2.3 Estearato de magnésio

Este insumo farmacêutico exerce uma função extremamente importante em qualquer processo produtivo, o qual denomina-se de lubrificação diminuindo o atrito entre os punções e a matriz, facilitando a ejeção dos comprimidos e reduzindo o desgaste dos punções das máquinas (SHETH *et al.*, 1980; PRISTA *et al.*, 2002; LACHMAN *et al.*, 2001).

Tabela 2.5.3. Propriedades físico-químicas do estearato de magnésio

Nome IUPAC	Número CAS	Fórmula molecular e Estrutural C ₃₆ H ₇₀ MgO ₄	Massa molar	Ponto de fusão
Magnesium octadecanoate	557-04-0		591.27 g/mol	88 °C

Fonte: <<http://www.drugbank.ca/drugs>> Acesso em: 20 ago 2011

2.5.2.4 Talco R2BL

O talco de grau farmacêutico é um silicato de magnésio hidratado nativo, que é apresentado como um pó muito fino cristalino, branco ou acinzentado, sem areias, que espalha-se facilmente e adere à pele com facilidade (PRISTA *et al.*, 2002).

2.5.2.5 Isoniazida

Apresenta-se como um pó cristalino branco, solúvel em água 125 mg mL^{-1} (25°C), ligeiramente solúvel em etanol e praticamente insolúvel em éter e benzeno. Suas soluções em água na proporção 1:10 possuem pH entre 6,0 a 7,5. Valores de pka de 2,0 e 3,5 e Log P (pH 7,4) é de 1,1 (UNITED STATES PHARMACOPEIA 33, 2010). Portanto, esse princípio ativo é adicionado na formulação, sendo este responsável por desencadear os efeitos terapêuticos sobre o agente patogênico.

2.5.3 Efluentes gerados após as etapas de produção

A produção farmacêutica pode incluir quatro diferentes tipos de processos de fabricação - fermentação, síntese química, extração, e formulação. As características e quantidades das águas residuais geradas depende do processo de fabricação. Os efluentes produzidos nas etapas de lavagem dos equipamentos é potencialmente mais poluidor do que os resíduos gerados nas operações unitárias (AKMEHMET-BALCIOGLU & ÖTKER, 2003).

A Figura 2.5.5 apresenta o registro fotográfico da seqüência dos procedimentos realizados para limpeza da câmara de granulação e mistura (High Shear), utilizado na etapa de granulação durante a produção da isoniazida. Conforme pode ser observado, nota-se uma turbidez acentuada nos efluentes gerados, face a grande quantidade de resíduos ainda presentes na superfície dos equipamentos e que foram parcialmente solubilizados e transferidos para os efluentes. As análises de caracterização com referência aos principais indicadores de contaminação ambiental não foram contempladas nesse trabalho. Entretanto, é interessante ressaltar que de acordo com Alaton *et al.*, (2004) os quais relataram que os efluentes farmacêuticos provenientes das etapas de processo de formulações de antibióticos possuíam DBO com valores menores que 20 mg L^{-1} , mas a DQO apresentará valores na faixa de $800\text{-}1500 \text{ mg L}^{-1}$, sugerindo que os antibióticos podem ser considerados praticamente não biodegradáveis.

Outro aspecto digno de nota, diz respeito a possibilidade desses efluentes causarem resistência aos microorganismos presentes na etapa biológica das estações de tratamento de efluentes das indústrias farmacêuticas, configurando um grave problema ambiental.

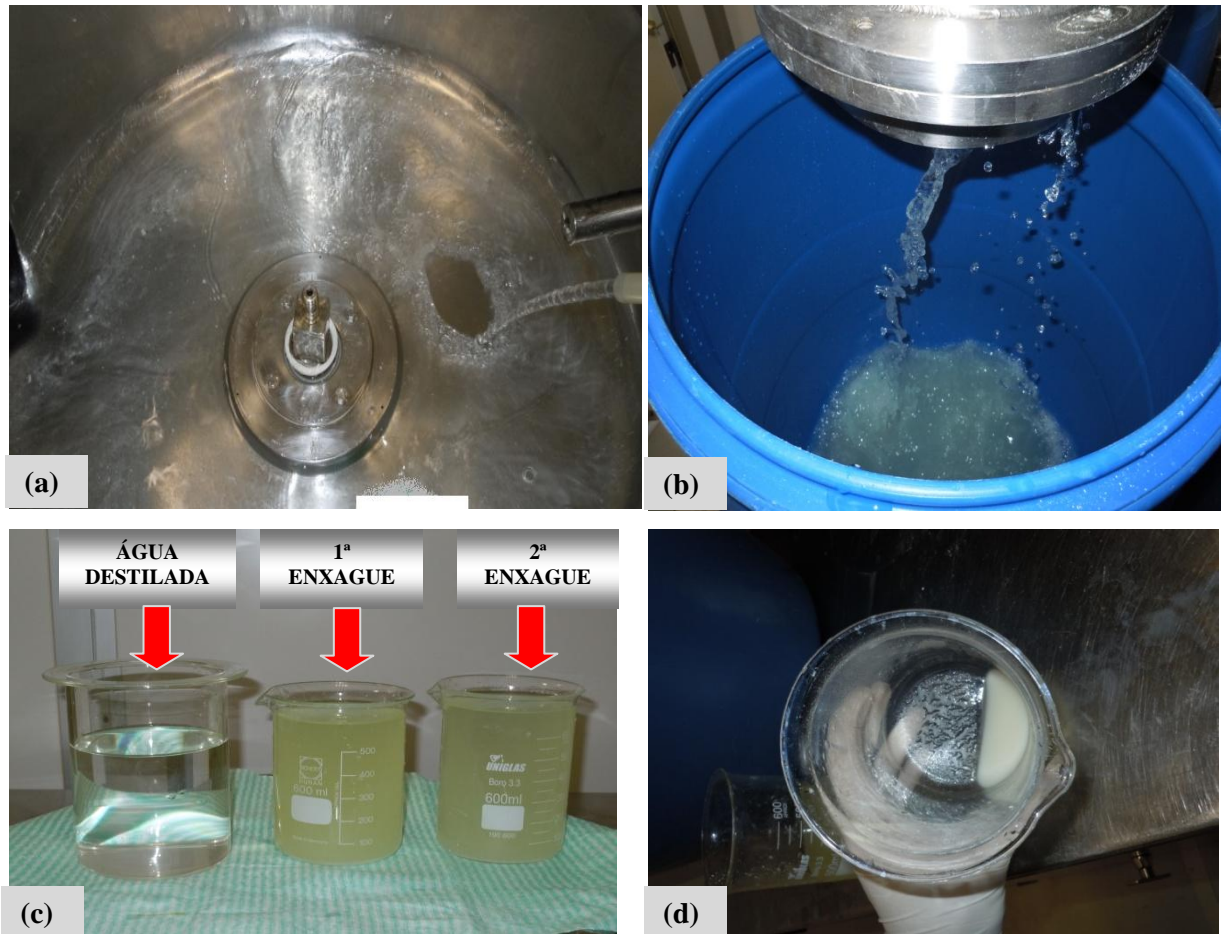


Figura 2.5.4. Registro fotográfico da limpeza da câmara de granulação e mistura (High Shear). (a) início da limpeza; (b) efluente coletado em bombonas; (c) comparação entre água destilada e os efluentes gerados após o 1ª enxágüe e 2ª enxágüe; (d) excesso do resíduo acumulado no fundo do becher.

2.6 PROTOCOLOS DE ESTUDO DE ESTRESSE QUÍMICO DE FÁRMACOS PARA INVESTIGAÇÃO DOS COMPOSTOS INTERMEDIÁRIOS

A estabilidade dos produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade, luz e de outros fatores relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas das substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagens (BRASIL, 2005).

A Resolução N° 01 “Guia para Estudo de Estabilidade” (BRASIL, 2005), trouxe uma relevante contribuição para consecução de ensaios onde se deseja forçar a degradação de compostos farmacêuticos, com o intuito de investigar e elucidar a formação dos produtos de degradação. A resolução foi elaborada com o propósito de estudar a estabilidade de

formulações farmacêuticas, o qual para se estabelecer prazos de validade, necessita submeter as amostras a condições de estresse, para mapear a formação de produtos de degradação.

Com respeito à identificação dos compostos intermediários formados nas amostras resultantes do processo de oxidativos avançados, as metodologias descritas por esta resolução podem ser amplamente utilizadas.

Buthani *et al.*, (2007) com o intuito de investigar o potencial de degradação da molécula da isoniazida, submeteu o fármaco a condições de fotólise, hidrólise ácida e alcalina e também a temperatura. Esses ensaios encontram-se totalmente compatíveis com as metodologias descritas pela Resolução N° 01 (BRASIL, 2005).

Segundo Klick *et al.*, (2005) a natureza do teste de estresse utilizado para o fármaco depende de suas características intrínsecas e da forma farmacêutica a ser desenvolvida. Para consecução dos ensaios, são utilizadas condições mais severas do que as condições do estudo de estabilidade acelerada, como estratégia para a fase de desenvolvimento da forma farmacêutica (ICH, 2003).

2.6.1 As diferentes abordagens dos testes de estresse químico de fármacos

Sabe-se que os fatores intrínsecos dos fármacos, como por exemplo a estrutura molecular e os seus substituintes determinam a sua maior ou menor reatividade. Entretanto, existem outros fatores que podem afetar a estabilidade de um fármaco (ALLEN, 2002, 2010).

O estudo de degradação forçada inclui os efeitos causados pela variação da temperatura, solvente, umidade quando necessário, oxidação, fotólise e suscetibilidade à hidrólise por extensa variação dos valores de pH, condições mais comum da degradação de fármacos.

A despeito do pH pode ser considerado uma das variáveis mais importantes no que se refere a estabilidade de um fármaco (ALLEN, 2002, 2010).

Um grande número de pesquisas vem sendo realizadas para a obtenção de compostos intermediários de muitos fármacos utilizados na prática médica, utilizando diferentes métodos de obtenção e identificação (KAPOOR *et al.*, 2006; KUMAR *et al.*, 2008; BEDSE *et al.*, 2009). A seguir serão apresentados alguns protocolos que podem ser utilizados na consecução de ensaios, onde se deseja realizar a degradação forçada de fármacos, para posterior identificação de intermediários.

2.6.1.1 Hidrólise

A possibilidade de reduzir o efeito da hidrólise nos fármacos pode ser explicada pela constante dielétrica. O efeito da constante dielétrica do solvente sobre a estabilidade do fármaco, no qual a reação de decomposição envolve a reação de um íon e um fármaco carregado (por exemplo, a catálise específica ácida ou básica) pode ser expressa pela Equação 1:

$$\log k = \log k_{\infty} - Kz_A z_B / \epsilon \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

z_A e z_B representam a carga do íon e do fármaco;

K = constante para um dado sistema a uma temperatura fixada;

K_{∞} é a constante de velocidade num solvente de constante dielétrica infinita, obtida pela extrapolação do gráfico de $\log k$ em função de $1/\epsilon$, onde ϵ é a constante dielétrica (FLORENCE & ATTWOOD, 2006).

A realização do estudo de estresse em condição de hidrólise ácida, utiliza-se principalmente o ácido clorídrico e para a hidrólise básica utiliza-se hidróxido de sódio, sendo que, muitas variações são observadas no tempo e na temperatura de exposição de fármacos para essa condição (Figura 2.6.1). A configuração experimental adotada deve reproduzir fielmente as condições do ensaio realizado com o intuito de fotodegradar o fármaco. Para a hidrólise realizada em pH neutro, onde geralmente se utiliza água como agente de hidrólise a taxa de decomposição é lenta, o que é compreensível, porque reações em pH neutro são não-catalíticas e por isso podem ser necessários períodos mais longos sob condições de temperatura extremas, para conseguir quantidades suficientes de produtos de degradação. No início do ensaio são utilizadas condições mais amenas, assumindo que o fármaco seja instável. Dependendo dos resultados obtidos, aumenta ou diminui a concentração, adicionalmente as condições de reação empregadas (SINGH & BAKSHI, 2000).

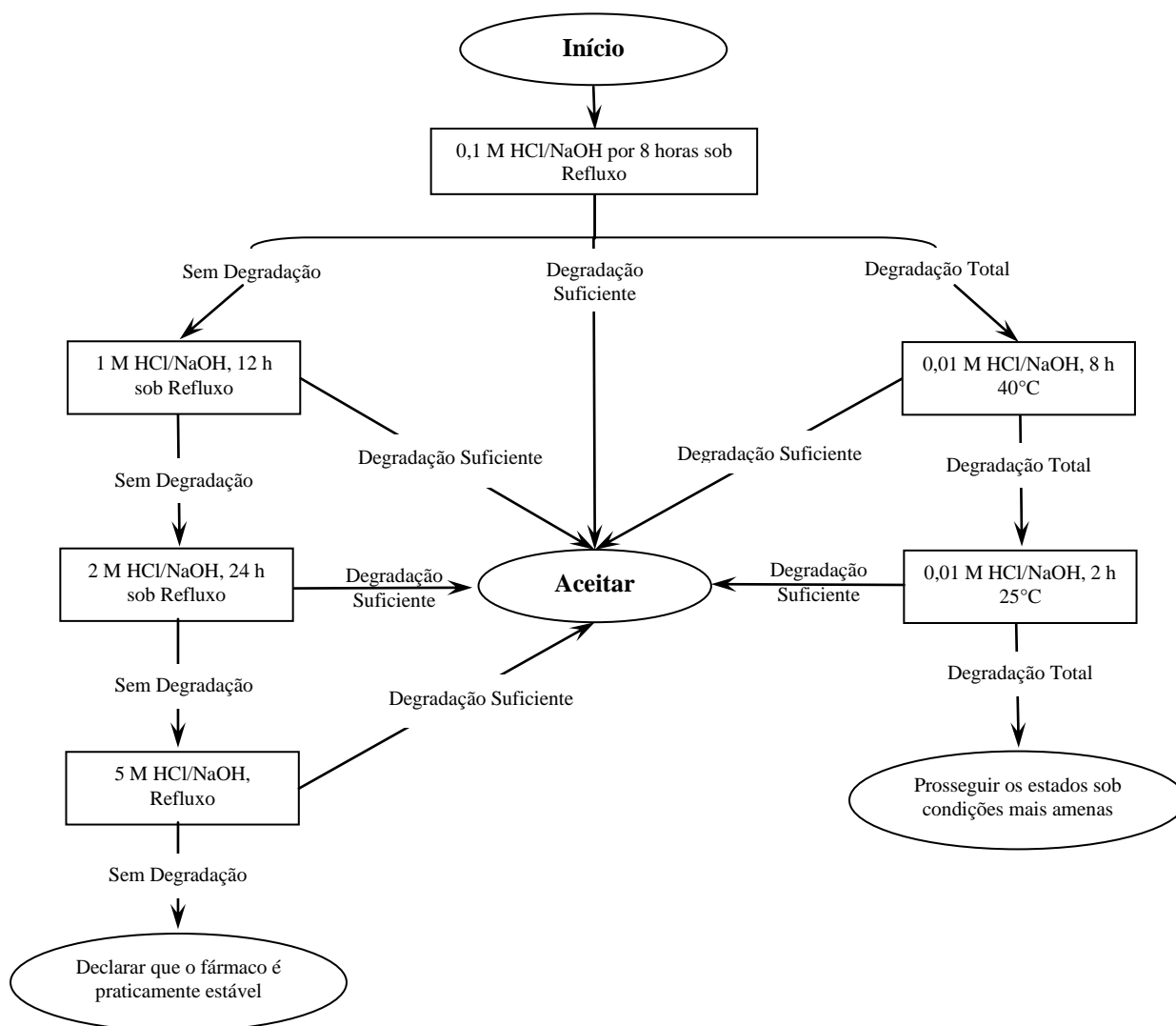


Figura 2.6.1. Fluxograma do estudo de estresse: Hidrólise sob condições ácidas e básicas.
Fonte: Singh & Bakshi, 2000.

2.6.1.2 Oxidação

A degradação oxidativa é um dos principais problemas de estabilidade das formulações de fármacos, dentre os mais conhecidos e estudados têm-se os esteróides, antibióticos, vitaminas, óleos e gorduras. A oxidação (Figura 2.6.2) envolve a retirada de um átomo eletropositivo, radical ou elétron, ou a adição de um átomo eletronegativo ou radical. Muitas oxidações são reações em cadeia, que se desenvolvem lentamente sob a influência do oxigênio molecular. Tal processo de reação é referido como uma auto-oxidação (FLORENCE e ATTWOOD, 2003).

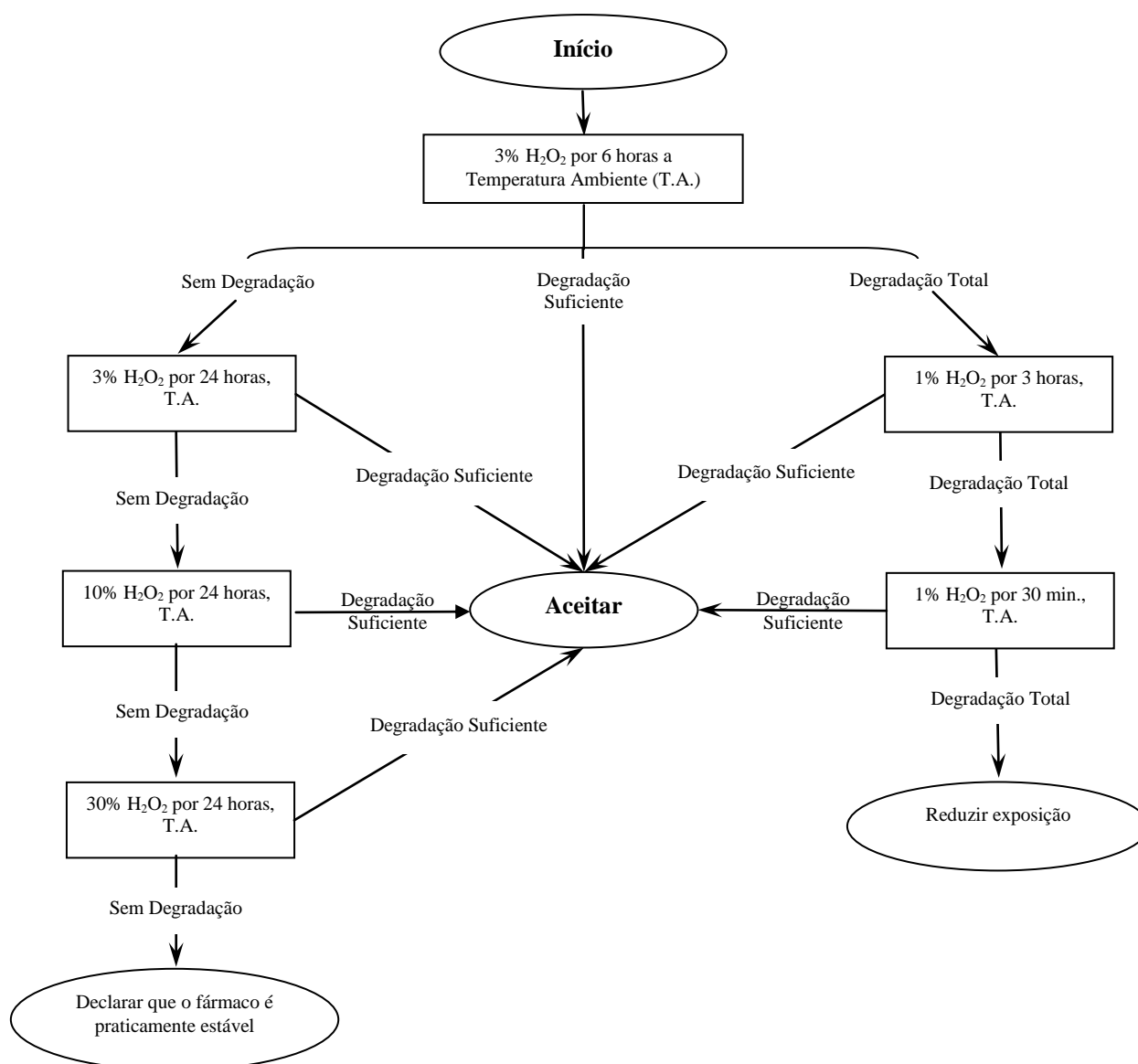


Figura 2.6.2. Fluxograma do estudo de estresse: Oxidação.

Fonte: Singh & Bakshi, 2000.

2.6.1.3 Fotólise

Segundo Moriwaki *et al.*, (2001) a maioria dos princípios ativos empregados na formulação de medicamentos apresenta máximos de absorção na região do ultravioleta do espectro eletromagnético. A radiação ultravioleta é muito energética e pode propiciar a clivagem de muitas ligações químicas, ocorrendo à degradação da molécula. Desta forma, é importante conhecer a fotoestabilidade das drogas utilizadas e os produtos formados.

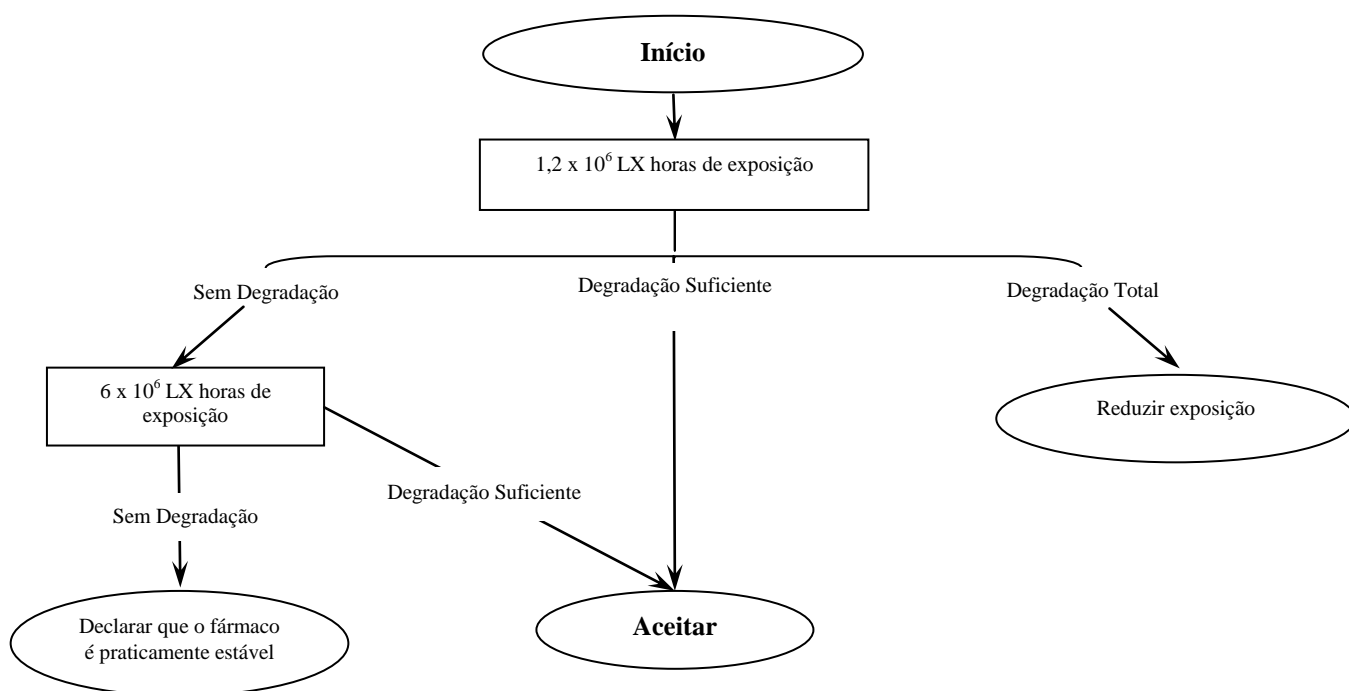


Figura 2.6.3. Fluxograma do estudo de estresse: Fotólise.

Fonte: Singh & Bakshi, 2000.

O estudo de fotoestabilidade é atualmente uma importante ferramenta para a avaliação da estabilidade de fármacos. Existe muita variação da maneira na qual a fotoestabilidade é realizada. Os fármacos podem sofrer exposição a comprimentos de onda curtas ou longas dentro da faixa do UV, ou luz fluorescente sob temperatura ambiente (Figura 2.6.3). O período de exposição pode variar passando de algumas horas a vários meses (SINGH & BAKSHI, 2000).

2.6.1.4 Estabilidade térmica

A temperatura assim como o pH, é uma das variáveis mais importantes em se tratando de estabilidade do fármaco. A temperatura altera a estabilidade, aumentando a taxa da velocidade das reações cerca de duas a três vezes para cada aumento de 10°C, para a grande maioria das moléculas. O efeito da temperatura foi sugerido pela primeira vez por Arrhenius, através da Equação 2.

$$K(t) = A \exp^{-E_a/RT} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

k = constante da velocidade da reação;

A = fator pré-exponencial ou fator de frequência;

Ea = energia de ativação aparente;

R= constante universal dos gases perfeito (1, 987 cal · K⁻¹ · mol⁻¹);

T = temperatura absoluta

Derivando a Equação acima tem-se:

$$\frac{d\alpha}{dt} = A \exp^{-E_a/RT} f(\alpha) \quad (\text{Equação 3})$$

Através das relações implícitas presente na equação acima, pode-se inferir que a elevação da temperatura no meio reacional, resulta num aumento da velocidade de reação ou da velocidade de degradação do fármaco. A energia de ativação, que oscila entre 10 a 30 kcal.mol⁻¹ para maioria das moléculas, é uma medida da sensibilidade a velocidade de degradação, em decorrência das alterações da temperatura. A representação de Arrhenius (ln k vs 1/T) permite prever a estabilidade de uma gama diversificada de fármacos, já que possibilita extrapolar a velocidade de reação a uma dada temperatura (WATERMAN E ADAMI, 2005; YOSHIOTA E STELLA, 2002).

2.7 COMPOSTOS INTERMEDIÁRIOS

2.7.1 Os compostos intermediários da isoniazida e os ensaios *in vitro*

As diversas impurezas que podem ser encontradas nas matérias-primas de fármacos podem receber a denominação de orgânicas, inorgânicas e solventes residuais. Em relação às impurezas orgânicas, estas podem ser em função das etapas de síntese ou então do próprio armazenamento da matéria-prima. Quanto às impurezas inorgânicas, normalmente são em decorrência do processo de síntese e incluem os metais, sais inorgânicos e os catalisadores. Os solventes são líquidos orgânicos e inorgânicos, que exercem a função de veículos da solução e são utilizados nas etapas de síntese do composto (ICH, 2006a).

Para efeito de estudo, podem ser consideradas duas classes: impurezas e compostos intermediários. As impurezas são grupo de substâncias presentes na matéria-prima

do produto farmacêutico, como co-produtos ou intermediários de síntese. Os compostos intermediários constituem uma importante classe de subprodutos presentes nos fármacos, que são resultantes da reação do fármaco com os excipientes farmacotécnicos de produção, ou agentes físicos e químicos. A luz da legislação vigente, as impurezas presentes na matéria-prima do fármaco não necessitam ser monitoradas no produto farmacêutico final, a não ser que possua o comportamento de produto de degradação i.e composto intermediário (ICH, 2006b).

Segundo Rao *et al.*, (1971) determinaram a estabilidade da molécula da isoniazida livre em solução de xarope de groselha utilizando vários açúcares. O mecanismo de degradação *in vitro* da isoniazida caracteriza-se por hidrólise, com a formação de hidrazonas, seguida de reação de condensação.

Gallo & Radaelli (1976) & Singh *et al.*, (2001) descreveram a ordem de vulnerabilidade à degradação da molécula do fármaco para as associações de produtos farmacêuticos de primeira linha, utilizado no tratamento da tuberculose o qual apresentou a seguinte ordem: rifampicina >isoniazida >pirazinamida.

Devani, Shishoo & Patel (1985) estudaram a interação entre a isoniazida e açúcares redutores representados pela lactose, galactose e maltose e observaram a formação de lactose isonicotina hidrazona, sendo este considerado produto de degradação da lactose com a isoniazida. Este produto tem sido detectado em comprimidos de isoniazida na faixa de 0,3-14%, sendo que estes valores aumentam para 22% em países de clima quente. De todos os açúcares pesquisados a galactose foi que apresentou o maior efeito catalítico sobre a isoniazida.

Matsui *et al.*, (1983) pesquisaram as propriedades mutagênicas e cancerígenas da hidrazona (um dos possíveis intermediários da isoniazida), e alertam sobre os perigos da formação desta substância em matérias-primas e formas farmacêuticas como comprimidos. Ainda de acordo com esses autores, análises de comprimidos de isoniazida (100 mg) armazenados durante 5 meses na umidade relativa de 60 - 70% UR, revelaram aproximadamente 1,5% de hidrazona.

Singh *et al.*,(2002) investigaram a absorção da umidade na ausência e na presença de luz em especialidades farmacêuticas contendo princípios ativos da classe dos tuberculostáticos. Maior teor de umidade foi observado para as formulações contendo isoniazida/etambutol, quando comparada com formulações contendo apenas etambutol.

Lewin & Hirsch (1955) avaliaram os efeitos do calor e agentes quelantes sobre a estabilidade da isoniazida, em solução, sob diferentes valores de pH. Foi detectado que em

solução tampão pH 8,8 e pH 6,5 a isoniazida sofre decomposição de 90 e 80% respectivamente, enquanto que em pH 4,8 a decomposição é cerca de 10%. Em relação à adição de EDTA à solução pH 6,7 manteve a estabilidade do fármaco. Na presença de calor, os cátions Cu^{2+} e Mn^{2+} – favorecem a degradação da isoniazida.

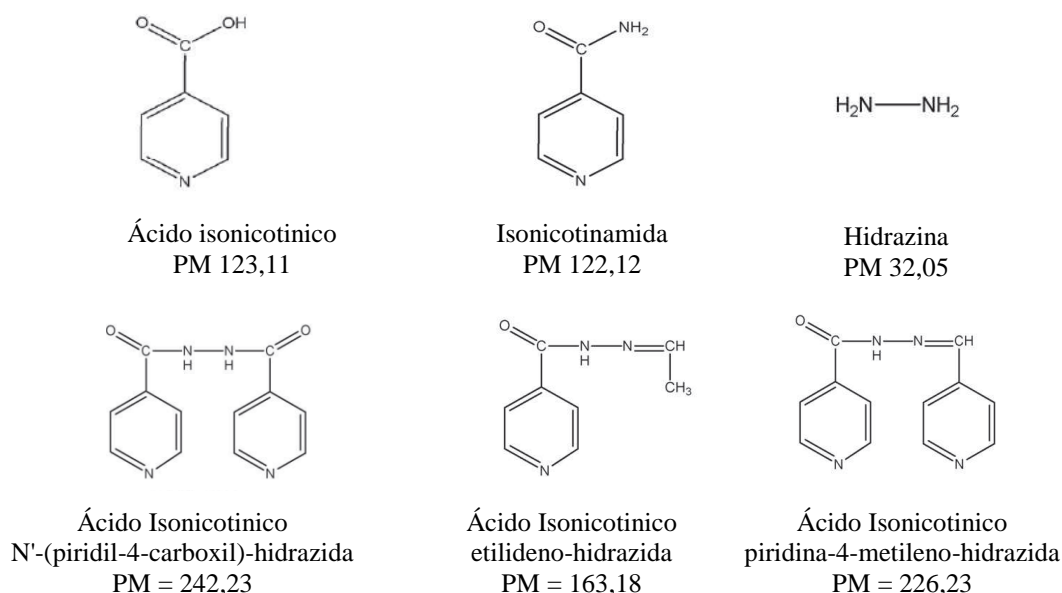


Figura 2.7.1. Compostos intermediários da isoniazida.

Fonte: Bhutani *et al.*, 2007.

Bhutani *et al.*, (2007) submeteram a isoniazida a diferentes condições reacionais, incluindo a hidrólise, oxidação, fotólise e estresse térmico. A exposição do fármaco no estado sólido a 50 °C por 60 dias e 60 °C por 15 dias não resultou em decomposição significativa. Em HCl 0,1 mol L⁻¹ a 80 °C, foi observado degradação gradual com formação de ácido isonicotínico. Comportamento similar foi constatado em meio com HCl 1 mol L⁻¹, sendo observado neste caso mais de 50 % de degradação em 4 dias. A velocidade da hidrólise em meio ácido foi superior à observada em água ou em meio alcalino. O aquecimento do fármaco em água gerou, além do ácido isonicotínico, quantidade reduzida de isonicotinamida. A exposição da isoniazida ao peróxido de hidrogênio a 3 ou 30 % resultou na formação de ácido isonicotínico e isonicotinamida. A exposição à luz das soluções em ácido, água ou base não resultou em degradação diferente do observado no escuro. Em contra partida, quando o fármaco sólido foi exposto à luz, tornou-se inicialmente amarelo e, após exposição prolongada, marrom. O cromatograma registrou um pico sendo então caracterizado como sendo o do

ácido isonicotínico *N'*-(piridil-4-carbonil)-hidrazida, não observado nos outros experimentos. Seis compostos intermediários foram identificados conforme indicados na Figura 2.7.1.

2.7.2 Toxicidade dos compostos intermediários da isoniazida

Tsarichenko *et al.*,(1977) pesquisaram a toxicidade do ácido isonicotínico em camundongos através da aplicação tópica, e foi observado uma leve hiperemia e irritação no local. A inalação desta substância por ratos estimulou o sistema nervoso central e aumentou a velocidade de respiração bem como causou alterações histológicas no fígado, além de ser cumulativo e apresentar propriedades alergênicas. Os autores estabeleceram ainda o limite de 1 mg/m^3 para a presença do ácido isonicotínico no ar.

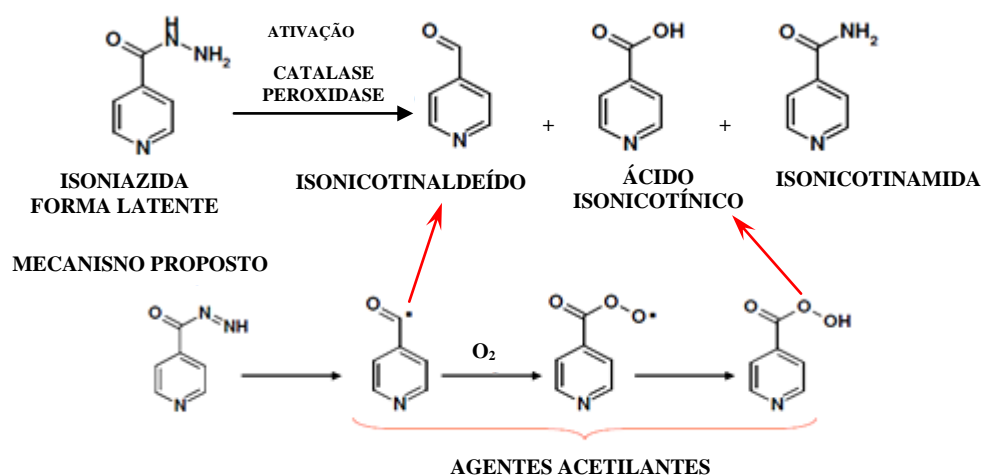


Figura 2.7.2. Mecanismo de ativação da isoniazida via agentes acetilantes
Fonte: SARMA *et al.*, 1986

Sarma *et al.*,(1986) avaliaram o efeito hepatotóxico da hidrazina, e concluíram que a administração diária da rifampicina associada a isoniazida resulta na formação do ácido isonicotínico e hidrazina, em função do mecanismo de ação desencadeado via acetiladores lentos e rápidos da isoniazida Figura 2.7.2. A formação de hidrazina foi mais expressiva em acetiladores lentos, grupo cuja frequência de ocorrência de hepatite é considerada maior. Esse efeito está associado à indução da enzima hidrolase sobre a isoniazida causada pela rifampicina.

Sax & Dang (apud TIMPERIO *et al.*, 2005) reportaram que a hidrazina causa um número diversificado de efeitos tóxicos incluindo neuropatia periférica, efeitos hepatotóxicos, hiperglicemia e câncer. A isoniazida mostrou produzir tumor de pulmão em camundongos

(DELANEY & TIMBRELL, 1995) e de induzir aberrações cromossômicas e trocas de cromátides irmãs em cultura de células de roedores (MacRAE *et al.*, 1979).

Donald *et al.*, (1994) examinaram crianças que receberam doses de isoniazida para tratamento da meningite tuberculosa, e foi constatado concentrações significativas de hidrazina decorrentes do metabolismo do fármaco. Entretanto, nenhuma correlação clínica pode ser estabelecida entre a produção de hidrazina e indicadores clínicos ou bioquímicos de disfunção hepática. Para que a hidrazina alcance o seu potencial tóxico, são necessários fatores adicionais como danos hepáticos pré-existentes em decorrência de hepatite viral ou outra patologia hepática existente.

Sarich *et al.*, (1996) ressaltam que embora os metabólitos da isoniazida como a acetilidrazina e hidrazina sejam normalmente indicados como os responsáveis pela hepatotoxicidade do fármaco, não foi observada nenhuma relação entre a concentração da acetilidrazina ou da isoniazida com a presença de efeitos hepatotóxicos. Em contra partida, a hidrazina parece estar associada no mecanismo patogênico da necrose hepática.

Sanfeliu *et al.*, (1999) estudaram o grau de toxicidade da isoniazida e concluíram que apesar da isoniazida ser considerada razoavelmente tóxica, alguns pacientes desenvolveram neuropatia periférica associada a deficiência de vitamina B6. Alguns metabólitos da isoniazida são considerados hepatotóxicos, e não existe informações suficientes sobre o seu potencial efeito neurotóxico. Com objetivo de avaliar esse efeito, células neurais obtidas de camundongos foram expostas à isoniazida e seus metabólitos. A isoniazida não apresentou neurotoxicidade em até sete dias de estudo e a hidrazina foi o metabólito que apresentou maior toxicidade. As demais substâncias, incluindo o ácido isonicotínico, causaram efeitos neurotóxicos de leve a moderado.

2.8 PROCESSOS OXIDATIVOS

Ao longo dos últimos anos, os compostos farmacêuticos vem sendo considerados um problema ambiental emergente, devido à sua entrada contínua e elevada persistência no ecossistema aquático, mesmo em baixas concentrações. Processos Oxidativos Avançados (POAs) são tecnologias baseadas na intermediação de radicais hidroxila e outros para oxidar compostos recalcitrantes, tóxicos e não-biodegradáveis a vários subprodutos e, eventualmente, para produtos finais inertes. As aplicações ambientais de POAs são numerosas, incluindo água e tratamento de águas residuais (isto é, remoção de poluentes

orgânicos e inorgânicos e agentes patogênicos), redução da poluição do ar e remediação do solo. Os POAs são aplicados para a redução da poluição causada pela presença de resíduos de fármacos em águas (KLAVARIOTI *et al.*, 2009).

A Figura 2.8.1 apresenta o percentual da aplicação dos POAs para degradação de diversos compostos farmacêuticos.

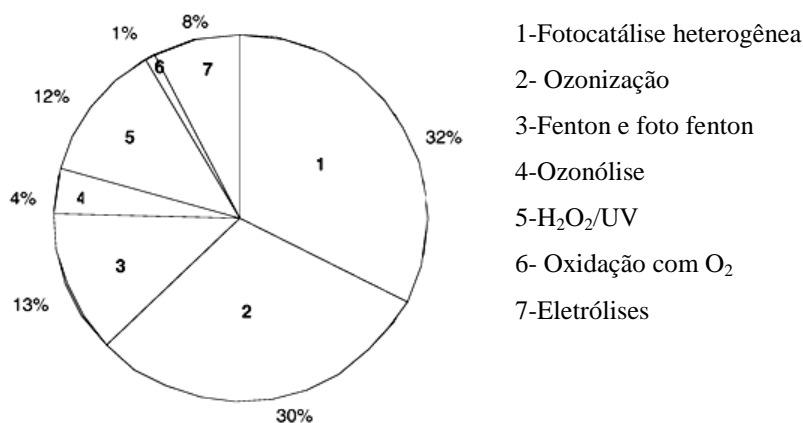


Figura 2.8.1. Distribuição dos POAs avaliados para degradação de compostos farmacêuticos.

Fonte: KLAVARIOTI *et al.*, 2009.

Em via de regra estes processos têm como principal característica a geração de radicais hidroxilas (HO[•]) altamente reativo e não seletivo, em quantidade suficiente para oxidar a maioria dos compostos orgânicos presentes nos efluentes dando início a uma série de reações de degradação que podem culminar em espécies inócuas, tipicamente CO₂ e H₂O (AMIRI *et al.*, 1997). Vários processos de produção do radical hidroxila têm sido estudados, geralmente utilizando ozônio, peróxido de hidrogênio, irradiação na região UV, fotocatalise e reagente de Fenton (STEPNOWSKI *et al.*, 2002; ZALAZAR *et al.*, 2008; ROSAL *et al.*, 2009).

Para o tratamento de efluentes contendo compostos farmacêuticos dentre as opções de processos oxidativos, a radiação ultravioleta associada ao peróxido de hidrogênio se mostram viáveis sob o ponto de vista técnico por envolverem reações com espécies com alto poder oxidante, além de não ocorrer à formação de lodo e transferência de fase dos poluentes e os produtos finais da reação são CO₂, H₂O e íons inorgânicos. A principal característica dos resíduos de fármacos diz respeito à elevada complexidade estrutural, sobretudo no que diz respeito ao potencial de que mesmo parcialmente degradado esses compostos ainda podem exercer efeitos terapêuticos sobre os microrganismos presentes na biota aquática. A luz do

exposto será apresentado a seguir os resultados das referências bibliográficas destacando a aplicação do POA para fotodegradação de fármacos pertencentes à classe terapêutica dos antibióticos

2.8.1 Processos Oxidativos Avançados (POA)

Os radicais hidroxila são formados a partir de oxidantes como H_2O_2 ou O_3 , sendo que a eficiência pode ser aumentada pela combinação com irradiação ultravioleta (UV) ou visível ou catalisadores (íons metálicos, semicondutores) (GLAZE *et al.*, 1987).

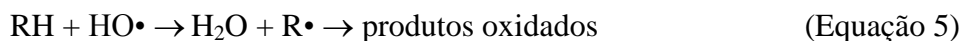
Os POA são alternativas tecnológicas viáveis e eficientes para degradação de substâncias orgânicas recalcitrantes, presentes em efluentes aquosos em baixas concentrações, como por exemplo, os resíduos de fármacos.

Sob o ponto de vista operacional, os POA podem ser aplicados à degradação de resíduos de fármacos, tanto na saída das ETE quanto em etapas finais do processo de tratamento de água. Em efluentes de ETE, a remoção desses resíduos evitaria a contaminação de águas superficiais por essa fonte e, conseqüentemente, os efeitos em organismos aquáticos seriam minimizados (MELO *et al.*, 2009).

2.8.1.1 O processo $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$

A formação de radical $\text{HO}\cdot$ ocorre em função da reação de oxidação do peróxido de hidrogênio, no qual ocorre a cisão homolítica da molécula, rompendo a ligação sigma de elevada energia ($\text{O} - \text{O}$, $48,5 \text{ kcal mol}^{-1}$), sob irradiação direta da lâmpada de UV, que emite energia luminosa no comprimento de onda de 254 nm. O rendimento quântico dessa reação é quase unitário ($\Phi_{\text{HO}\cdot} = 0,98$ a 254 nm) (DOMÈNECH *et al.*, 2001).

As Equações 3 a 5 mostram formação do radical $\text{HO}\cdot$ e a oxidação de um composto R.



O rendimento do sistema $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ pode ser otimizado com uso de lâmpadas específicas. Normalmente em projetos de reatores fotocatalíticos são utilizadas lâmpadas de vapor de mercúrio de média ou baixa pressão, que emitem em comprimento de onda de 254 nm. Entretanto, a absorvidade do peróxido de hidrogênio é baixa nesta região do espectro ($\epsilon_{254} = 18,6 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), sendo necessárias altas concentrações do oxidante para atingir oxidação satisfatória dos contaminantes (DOMÈNECH *et al.*, 2001).

2.8.1.1.1 Restrições quanto à aplicabilidade do processo $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$

Apesar da eficiência cientificamente comprovada desta tecnologia, é importante considerar algumas observações e/ou restrições quanto à correta aplicabilidade do processo $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$.

Em reações de fotodegradação o peróxido de hidrogênio também pode agir como sequestrador de radicais $\text{HO}\cdot$. Neste sentido, altas concentrações de H_2O_2 podem reduzir a eficiência do processo de degradação, o que pode ser representado pela Equação 6.



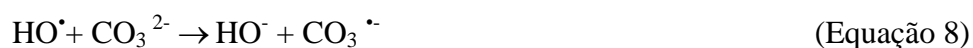
Bandara *et al.*, (1997) avaliaram o procedimento de adição de H_2O_2 em relação a taxa de conversão do substrato. Foi observado um aumento na taxa de mineralização com a adição gradativa do peróxido durante o transcurso da reação, ao invés de adicioná-lo numa única vez, logo no início da reação.

A taxa de adição de H_2O_2 pode influenciar na mineralização do composto alvo. Os autores verificaram um aumento na taxa de mineralização com a adição de peróxido aos poucos na reação, ao invés de adicioná-lo no início da reação. Este comportamento pode ter sido ocasionado pelo fato do H_2O_2 , mesmo em condições ótimas de operação, pode atuar como capturador de radicais $\text{HO}\cdot$ (Equação 6), e ainda pela ocorrência de intermediários que dificulta o alcance do estado pseudo-estacionário da reação. Assim, haverá competição entre os intermediários e o poluente alvo pelo radical $\text{HO}\cdot$. É interessante, portanto, avaliar uma

modificação experimental da batelada simples para a batelada alimentada com pequenas taxas de aplicação do H_2O_2 no decorrer da reação (CRUZ, 2000).

A fotólise do peróxido de hidrogênio é dependente do pH, uma vez que em meio alcalino a dissociação do H_2O_2 é favorecida formando o íon HO_2^- , que apresenta maior absorvidade molar (MELO *et al.*, 2009).

No entanto, a elevação excessiva do pH prejudica o processo, devido ao sequestro de radicais hidroxila por íons carbonato e bicarbonato (Equações 7 e 8). A ação competitiva desses íons constitui a principal interferência nos processos oxidativos baseados na produção de radicais HO^\bullet (LEGRINI *et al.*, 1993; DOMÈNECH *et al.*, 2001).



Andreozzi *et al.*, (1999) relataram que a fotólise direta do H_2O_2 em meio aquoso depende do pH e cresce a medida que condições mais alcalinas são utilizadas por causa do coeficiente de absorvidade molar do anion HO_2^- . Em pH ácido o efeito dos “sequestradores” de radicais, principalmente carbonatos e bicarbonatos, é anulado e, por isso, baixos valores de pH são normalmente preferidos para o processo $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$.

Segundo Andreozzi *et al.*, (2003) unindo-se o mecanismo de degradação por fotólise com radiação UV o mecanismo químico oxidativo com H_2O_2 , o tratamento híbrido $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ fornece, em geral, uma degradação maior do que a obtida com a aplicação dos processos separadamente.

Em altas concentrações de peróxido de hidrogênio, podem ocorrer reações que consomem radicais HO^\bullet (Equações 9 a 11), afetando negativamente o processo de degradação (DOMÈNECH *et al.*, 2001).



Ainda neste contexto, Wong & Chu (2003) relataram que o pH inicial do meio após a adição do H_2O_2 interfere no processo de fotodegradação. Nesse sentido, os autores chamam a atenção para determinação do valor ótimo de pH para cada molécula alvo que se deseja fotodegradar.

Segundo Chu (2001) em condições de pH inicial menores que o pH ótimo, há uma diminuição dos íons hidroxilas o que provavelmente reduz a formação dos radicais hidroxilas no meio. Em contra partida, num meio alcalino o H_2O_2 se torna instável, se decompondo rapidamente em água e oxigênio mesmo na presença da luz.

2.8.1.1.2 Remoção de resíduos de fármacos por processo H_2O_2 /UV

O POA na sua variante H_2O_2 /UV tem sido amplamente utilizado em diversos estudos como tecnologia de escolha para remoção de resíduos de fármacos em diferentes tipos de efluentes. A Tabela 2.8.1 apresenta uma série de estudos, aplicados a remoção de diversos fármacos, na sua grande maioria pertencente à classe terapêutica dos antibióticos.

Tabela 2.8.1. Principais fontes bibliográficas utilizando o processo H₂O₂/UV para remoção de fármacos

Fármaco	Matriz	Objetivo	Condições Experimentais	Resultados	Referência
Amoxicilina e Paracetamol.	Água Milli-Q contendo os fármacos de forma isolada na concentração de 0,1 mmol L ⁻¹ .	Avaliar a eficiência de fotodegradação do fármaco em diferentes valores de pH e concentração de H ₂ O ₂ .	Reator de 800 mL cujo volume irradiado foi de 280 mL. Lâmpada de UV de 15 W e irradiação no $\lambda = 254$ e 365 nm. O pH na faixa de 2,5 a 9,0. Concentração de H ₂ O ₂ utilizada foi de 5 a 20 mmol L ⁻¹ .	A eficiência de remoção dos fármacos, foi obtida após 5 e 10 min de irradiação, alcançando percentuais de remoção de COT de 63% (amoxicilina) e 70% (paracetamol) no tempo de 30 minutos. A variação de pH não influenciou a efetividade da reação de degradação.	Trovó <i>et al.</i> , (2011).
Cetoprofeno, Naproxeno, Carbamazepina, Ácido Clofibrico, Iohexol e Ciprofloxacina.	Água de superfície e Água Milli-Q.	Avaliar a eficiência de foto degradação frente a potência da lâmpada.	Foram utilizadas lâmpadas de baixa e média pressão.	A lâmpada de média pressão provou ser mais eficaz para a maximização da degradação de todos os fármacos avaliados do que as lâmpadas de baixa pressão. Foi observado um aumento considerável na taxa de degradação da carbamazepina e naproxeno, passando de não detectável para 13% e de 36% para 52% respectivamente. As constantes de velocidade aumentaram com a diminuição da duração da fonte de luz e o aumento da concentração de H ₂ O ₂ , reduz a taxa de degradação devido o sequestro dos radicais OH. A fotólise UV do naproxeno foi acompanhada pela produção de pelo menos dois produtos de degradação.	Pereira <i>et al.</i> , (2007).
41 fármacos. Incluindo 12 antibióticos e 10 analgésicos.	Efluente real.	Avaliar a remoção de fármacos de águas residuais em tempo real.	A configuração experimental possui três reatores de bancada interligados em série, com volume de 35 L cada e TRH de 5 min com vazão de 10m ³ /dia. Foram utilizadas três lâmpadas de vapor de mercúrio de baixa pressão (65 W) e $\lambda = 254$ nm. O reator foi aerado com uma taxa de 0,5 L min ⁻¹ . A concentração de H ₂ O ₂ foi 1,7 mg L ⁻¹ . O reator foi continuamente aerado numa vazão de 1,9 e 416,7 L h ⁻¹ .	Foi observado em R1 90% de eficiência de remoção para a maioria dos fármacos, exceto norfloxacina (69%) e cafeína (67%), a uma dose de UV de 923 mJ/cm ² .	Kim <i>et al.</i> , (2009).

Sulfametoxazol, sulfametazina, sulfadiazina, e sulfametoxazol.	Água ultrapura, água de lago, águas residuais, e efluentes de estação de tratamento.	Avaliar o efeito do pH, concentração de H ₂ O ₂ e composição da matriz sobre as taxas de foto-oxidação.	Os experimentos se desenvolveram em reator de bancada utilizando uma lâmpada de UV de baixa pressão com $\lambda = 254$ nm.	O pH influenciou as taxas de fotólise, e exerceu pequeno efeito na taxa de foto-oxidação. Para o sulfametoxazol a forma neutra (pH 7,6) foi mais facilmente fotodegradada do que a forma aniônica (pH 3,6), além de ter apresentado maior rendimento quântico e elevada taxa de fotólise. A sulfametazina e sulfadiazina apresentaram efeito inverso o qual a forma aniônica foi mais rapidamente fotolisada do que a forma neutra. O trimetropim, a taxa de oxidação foi maior para a forma catiônica (pH 3,6) do que para a forma neutra (pH 7,8). Com relação a efetividade do processo, para uma dose de 10 mg H ₂ O ₂ L ⁻¹ a intensidade da energia UV necessária para alcançar 90% de remoção de sulfametoxazol foi < 860 e < 330 mJ/cm ² respectivamente. Para a sulfametazina, sulfadiazina e trimetropim, foram necessários uma maior intensidade UV > 900 mJ/cm ² para alcançar a eficiência de degradação de 90%.	Baeza & Knappe (2011).
Meprobamato, carbamazepina, dilantin, atenolol, primidona e trimetoprim.	Efluente real.	Avaliar a eficiência de foto-oxidação na presença de contaminantes incluindo alcalinidade, nitrito e especialmente matéria orgânica.	O sistema utilizou lâmpada UV de 254 nm. Foram avaliadas intensidade de UV de 300, 500 e 700 mJ/cm ² para três amostras. Os tempos de exposição variaram de 6 a 20 min para atingir a intensidade UV desejada. As dosagens de H ₂ O ₂ foram de 0, 2, 5, 10, 15, 20 mg L ⁻¹ aplicados 30 s antes da radiação UV. Foi utilizado 75 mL de cada alíquota de água residual num reator de vidro de 250 mL.	Os resultados variaram de não observado a > que 90% de eficiência e indicaram que a eficácia do tratamento H ₂ O ₂ /UV para a remoção de fármacos a partir de águas residuais ocorre não só devido a concentração de matéria orgânica mas também em função da reatividade intrínseca dos radicais OH. A remoção de fármacos também foi correlacionada com reduções na absorção UV a 254 nm.	Rosário-Ortiz <i>et al.</i> , (2010).

Metoprolol, amoxicilina, naproxeno e fenacetina.	Água do reservatório, água subterrânea e efluentes secundários a partir de duas ETAR municipal.	Avaliar a eficiência de remoção de fármacos dissolvidos em água Milli-Q ou em matrizes de água.	Foi utilizado reator cilíndrico de 500 mL encamisado em banho termostático, a temperatura de $20 \pm 0,2$ °C. Lâmpada de baixa pressão (15W), com $\lambda=254$ nm. O reator foi alimentado com 350mL com um dos quatro produtos farmacêuticos e dissolvido em água Milli-Q e ajustado o pH com tampão de ácido fosfórico / fosfato (0,05M). No segundo grupo de experimentos, quatro matrizes de água foram utilizadas para estudar a oxidação em condições reais de tratamento de água. Dois deles foram coletadas de águas naturais. A água subterrânea, e de superfície e água do reservatório público. As demais matrizes de água foram coletadas amostras de efluentes secundários a partir de duas ETAR.	A taxa de degradação seguiu a seguinte seqüência: amoxicilina > naproxeno > metoprolol > fenacetina. Taxas mais baixas foram obtidas com os fármacos dissolvidos em águas naturais e efluentes secundários, devido à presença de matéria orgânica presente que consumia os agentes oxidantes.	Benitez <i>et al.</i> , (2009).
--	---	---	---	---	---------------------------------

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Será apresentado a seguir a abordagem técnico-experimental adotada durante a consecução dos estudos para avaliar a eficiência de fotodegradação face a utilização dos processos oxidativos avançados (POA), na sua variante H_2O_2/UV como tecnologia terciária de escolha para redução da concentração ativa do fármaco em estudo, bem como a identificação qualitativa e estrutural dos compostos intermediários possivelmente formados.

Neste capítulo será especificado também todo o aparato instrumental, e as metodologias analíticas utilizadas para quantificação dos parâmetros de eficiência. Os experimentos referentes ao tratamento do fármaco por POA utilizando o reator fotocatalítico de bancada, e as análises de determinação de carbono orgânico total (COT), pH, condutividade, espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta (UV-Vis) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foram realizados no Laboratório Farmacêutico da Marinha (LFM), na divisão de controle de qualidade, seção de análises físico-química.

Em relação às análises da concentração residual de amônia, e os experimentos de extração por fase sólida (SPE), foram realizados no Laboratório de Controle de Poluição de Águas (LABPOL) do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ.

As análises por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (CLAE-EM), foram realizadas no Laboratório de Bioequivalência e Farmacocinética da Vice-Presidência de Produção e Inovação em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

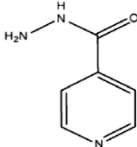
3.1 FÁRMACO

O fármaco utilizado nos experimentos de fotodegradação foi: isoniazida (INH) (piridina-4-carbohidrazida). A amostra de referência foi fornecida pelo Laboratório Farmacêutico da Marinha (LFM), em grau analítico USP (UNITED STATES PHARMACOPEIA), sendo o mesmo padrão de referência utilizado nas análises de controle de qualidade dos comprimidos de isoniazida produzidos e fornecidos ao Ministério da Saúde (MS).

3.2. PADRÃO PRIMÁRIO DE TRABALHO

Tanto para o preparo do efluente sintético, e para a realização das análises de investigação da concentração residual em solução do fármaco, bem como nos experimentos de SPE foi utilizado o padrão primário USP, conforme preconizado nas metodologias analíticas dos principais compêndios oficiais de análises adotados pelas indústrias farmacêuticas. A Tabela 3.2.1 apresenta as informações detalhadas do padrão de isoniazida.

Tabela 3.2.1. Informações detalhadas do padrão primário de isoniazida.

Padrão	Fórmula Molecular e Estrutural	Teor	Lote	Teor de pureza	CAT N°	Fornecedor
INH	$C_6H_7N_3O$ 	200 mg	10G205	99,97%	1349706	USP

Fonte: <<http://www.drugbank.ca/drugs>> Acesso em: 20 ago 2011.

3.3 PREPARO DAS AMOSTRAS

A solução contendo o fármaco utilizada nos ensaios de fotodegradação foram preparadas a partir do padrão primário (Tabela 3.2.1), na concentração inicial de 10 mg L^{-1} com água Milli-Q ($0,22 \mu\text{m}$) num balão volumétrico âmbar de 2 L e mantido sob agitação no banho ultrassônico por 30 minutos. Após a completa dissolução do fármaco, as amostras eram submetidas imediatamente a análise de medição de Carbono Orgânico Total (COT) e transferidas para o reator fotocatalítico.

3.4. REAGENTES ANALÍTICOS

Os solventes utilizados no processamento analítico das amostras na CLAE, CLAE-EM, bem como nos experimentos de SPE eram de elevado grau de pureza analítico. Todos os outros reagentes e compostos químicos usados eram de Pureza Analítica (PA), e foram mantidos sob um rigoroso controle de qualidade, pois eram também utilizados nas

análises de verificação do enquadramento dos padrões de qualidade exigidos para aprovação dos medicamentos produzidos pelo Laboratório Farmacêutico da Marinha conforme preconizado pelo UNITED STATES PHARMACOPEIA 33, 2010. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) utilizado possuía a concentração de 30% v/v, da empresa Veteq Química.

3.5. ENSAIOS EXPERIMENTAIS COM OS POA

3.5.1. O processo H_2O_2 /UV

O sistema H_2O_2 /UV foi selecionado entre outros POAs porque possibilita a construção de reatores simples, não necessitando de unidades de separação após o tratamento. O processo requer uma etapa prévia de filtração para a remoção de sólidos suspensos, os quais, se presentes no reator fotoquímico, dispersam o feixe de luz, podendo reduzir a eficiência do processo (LIRA *et al.*, 2006). Entretanto, durante a realização dos experimentos não houve necessidade de filtrar as amostras.

Para consecução dos ensaios de fotodegradação, foram utilizadas as seguintes proporções molares de carbono e peróxido de hidrogênio: C: H_2O_2 [1:1] e [1:2] e diferentes tempos de retenção hidráulica (TRH), objetivando a identificação das condições ótimas de operação do reator, visando posteriormente o “*scale up*” do sistema de tratamento.

3.5.2 Especificações técnicas do reator fotocatalítico de bancada

O reator empregado neste estudo (Figura 3.5.1), já havia sido utilizado em diversos trabalhos de pesquisas desenvolvidos no Laboratório de Controle de Poluição de Águas (LABPOL) do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ, onde sua eficiência foi devidamente comprovada. O presente trabalho não contemplou o estudo dos efeitos hidrodinâmicos no reator.



Figura 3.5.1. Foto do reator fotocatalítico utilizado nos experimentos.

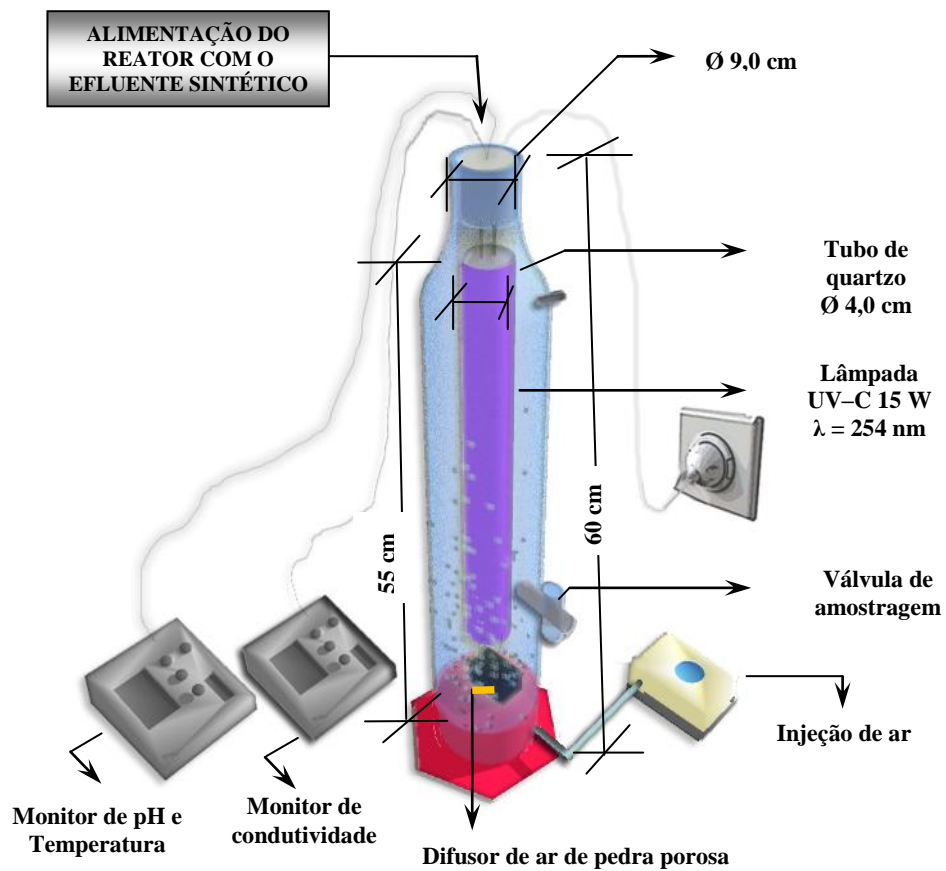


Figura 3.5.2. Desenho esquemático do reator fotocatalítico com as respectivas dimensões.

Conforme ilustrado na Figura 3.5.2 esse sistema é composto por um reator fotoquímico em vidro borossilicato com geometria cilíndrica possuindo altura de 60 cm e diâmetro de 9,0 cm com volume total de 2 L. A lâmpada de UV-C germicida (Philips) emite energia luminosa no comprimento de onda de 254 nm, e possui potência nominal de 15 Watts, e encontrava-se encamisada por um tubo de quartzo de 2 mm de espessura por 55 cm de comprimento e diâmetro de 4,0 cm.

Após a alimentação do reator com o efluente sintético, a lâmpada devidamente encamisada pelo o tubo de quartzo, era posicionada concentricamente ao reator. O sistema possui ainda um difusor de ar de pedra porosa, localizado na base do reator ao qual encontrava-se conectado a um sistema de ar comprimido, para manter o reator em constante agitação a fim de promover uma completa homogeneização do líquido. O sistema é dotado de uma válvula manual para retirada de alíquotas de amostras para posterior processamento analítico. O reator foi protegido com papel laminado, para não haver dispersão do feixe de luz da lâmpada de UV.

3.5.2.1 Parâmetros operacionais e tempo de retenção hidráulica (TRH)

O reator foi operado em batelada simples tradicional (volume constante), onde foi fixado um volume reacional de 2 L, sendo o reator alimentado numa única vez, e as alíquotas retiradas nos intervalos de tempo pré-fixados para reação, a fim de processar as análises físico-químicas de avaliação da eficiência de degradação e mineralização, e demais parâmetros. O fluxo de ar introduzido na massa líquida, para manter o sistema em constante agitação foi medido por um fluxômetro o qual registrou o valor de $0,5 \text{ L min}^{-1}$. A radiação emitida pela lâmpada de UV-C germicida foi de aproximadamente $8,0 \text{ mW/cm}^2$ (SOUZA *et al.*, 2010).

Os tempos de retenção hidráulica (TRH) adotados para consecução dos experimentos foram especificados conforme descritos a seguir: 1,3, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min. Foram também adotados os tempos de 60 min UV e 60 min H_2O_2 com objetivo de avaliar o comportamento do fármaco quando submetido apenas a irradiação ultravioleta (UV) e apenas na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) respectivamente, sendo estes denominados de experimento controle.

Antes do *start up* do sistema, a lâmpada de UV era mantida acesa por 5 minutos, a fim de estabilizar a intensidade da energia luminosa. Após esse período era dosado o H₂O₂ no reator, e simultaneamente o cronômetro era acionado para controle do tempo de reação.

A eficiência do sistema foi acompanhada pela retirada sistemática de 100 mL de amostra, nos tempos de reação pré-estabelecidos para avaliação da eficiência conforme parâmetros informados no item 3.5.2.4 do presente trabalho.

3.5.2.2 Procedimento de cálculo da quantidade de H₂O₂

A quantidade de H₂O₂ adicionado no reator estava diretamente relacionada com o volume total de efluente sintético a ser tratado bem como o resultado obtido nas análises de COT. Para cada nova batelada, o efluente sintético era submetido à análise de COT, para cálculo exato do volume de H₂O₂ a ser adicionado no reator. O H₂O₂ foi adicionado ao sistema sempre numa dosagem única no início do experimento, com auxílio de uma micropipeta devidamente calibrada. A concentração de H₂O₂ utilizada variou de 0,84 mmol para proporção molar [1C:1H₂O₂], e 1,86 mmol para [1C:2H₂O₂].

3.5.2.3. Procedimentos de cálculo da eficiência de degradação e mineralização do fármaco

$$\% ED = \frac{W_i - W_F}{W_i} \cdot 100 \quad (\text{Equação 12})$$

Onde W_i e W_F indicam as concentrações iniciais e finais respectivamente, dos parâmetros analíticos investigados. Essa equação foi utilizada para estimar a eficiência da concentração de isoniazida degradada (INH mg L⁻¹) e do percentual de remoção de COT (% Remoção de COT) em função do tempo reacional.

3.5.2.4. Parâmetros analíticos avaliados

Com objetivo de avaliar a eficiência do processo de fotodegradação, foram escolhidos os parâmetros analíticos, bem como adotado a estratégia de monitoramento, conforme apresentado a seguir e resumido na Tabela 3.5.1.

- **COT (mgC L^{-1})** – imediatamente após o preparo do efluente sintético e após POA nos intervalos de tempo especificados;
- **pH** - imediatamente após o preparo do efluente sintético (pH original da solução), após a dosagem do H_2O_2 e após POA em todos os intervalos de tempo especificados;
- **Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)** - imediatamente após o preparo do efluente sintético (condutividade original da solução), após a dosagem do H_2O_2 e após POA em todos os intervalos de tempo especificados;
- **NH_3 (mg L^{-1})** - imediatamente após o preparo do efluente sintético e após POA em todos os intervalos de tempo especificados;
- **ABS UV-Vis ($\lambda=265 \text{ nm}$)** - após o preparo do efluente sintético e após POA em todos os intervalos de tempo especificados;
- **Conc. residual do fármaco via CLAE-EM (mg L^{-1})** - somente após POA em todos os intervalos de tempo especificados; e
- **Produtos de degradação via CLAE-EM** - somente após POA em todos os intervalos de tempo especificados.

Tabela 3.5.1. Estratégia de monitoramento dos parâmetros analíticos avaliados.

Tempo (min)	Parâmetros Analíticos													
	COT (mg C L^{-1})		pH			Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)			NH_3 (mg L^{-1})		ABS UV-Vis $\lambda=265 \text{ nm}$		Conc. Residual CLAE-EM (mg L^{-1})	PD CLAE-EM
	ANTES POA	APÓS POA	ANTES (H_2O_2)	APÓS (H_2O_2)	FINAL POA	ANTES (H_2O_2)	APÓS (H_2O_2)	FINAL POA	ANTES POA	APÓS POA	ANTES POA	APÓS POA	APÓS POA	APÓS POA
1		X			X			X		X		X	X	X
3		X			X			X		X		X	X	X
5		X			X			X		X		X	X	X
7		X			X			X		X		X	X	X
10		X			X			X		X		X	X	X
20		X			X			X		X		X	X	X
30	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
40		X			X		X	X		X	X	X	X	X
50		X			X			X		X		X	X	X
60		X			X			X		X		X	X	X
60 (UV)		X		NR*	X		NR*	X		X		X	X	X
60 (H_2O_2)		X		X	X		X	X		X		X	X	X

NR* - Não Realizado.

3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

Será descrito a seguir os equipamentos bem como as metodologias analíticas utilizadas durante o monitoramento da eficiência de degradação e mineralização da INH, bem

como a caracterização dos produtos de degradação formados. A grande maioria das metodologias analíticas utilizadas neste estudo constam nos compêndios oficiais de análise e por esse motivo são metodologias consagradas e sistematicamente aplicadas pelas indústrias farmacêuticas.

3.6.1 Carbono orgânico total (COT)

Para os procedimentos experimentais realizados neste trabalho, o COT foi analisado imediatamente após o preparo da solução contendo o fármaco, e após o término da reação conforme escopo experimental apresentado no item 3.5.2.4 O equipamento utilizado no processamento das análises foi o COT 2000 FARMA (Ind. Com. Eletro Eletrônica GEHAKA Ltda.), com mecanismo de funcionamento baseado no princípio de Foto-Oxidação Catalítica.

Neste sistema, a amostra é primeiramente coletada e armazenada dentro de um reator. Este compartimento possui uma lâmpada de ultravioleta com comprimento de onda de 185 nm e um material catalítico. Com a emissão de raios UV, o carbono é desprendido das moléculas orgânicas e inorgânicas e forma o CO₂. Este último altera sensivelmente a condutividade da água, que por fim é registrada por um condutivímetro e convertida em COT, sendo o valor expresso em ppb.

Antes da realização das análises de COT, foi realizada a calibração do equipamento, utilizando uma solução padrão de sacarose (C₁₂H₂₂O₁₁) COT de 500 ppb, conforme procedimentos recomendado pelo fabricante.

3.6.2 Preparo da curva padrão de calibração

O preparo da curva padrão de calibração da INH utilizada respectivamente para o cálculo do percentual de recuperação da SPE bem como para o cálculo da concentração residual da INH por CLAE-EM, foi realizada a partir do padrão primário USP (Tabela 3.2.1), usando como diluente a água Milli-Q (0,22 µm) na seguinte faixa de concentração: 0,01 a 10 mg L⁻¹.

A concentração residual de INH foi calculada pela interpolação dos dados adquiridos na curva de calibração, realizada com a solução padrão contendo o fármaco estudado.

3.6.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

3.6.3.1. Determinação da concentração residual de INH

Neste trabalho a CLAE, foi utilizada com o propósito de quantificar o percentual de recuperação obtidos na extração por fase sólida.

Para escolha da metodologia analítica, foram realizadas pesquisas nos principais compêndios oficiais de análises, denominadas de Farmacopéia utilizada rotineiramente pelas indústrias farmacêuticas, tendo em vista que as metodologias analíticas empregadas nas análises de controle de qualidade dos fármacos, no que se refere à determinação do teor do princípio ativo, são extraídas desses compêndios, e portanto, são metodologias consagradas e algumas validadas segundo os requisitos da Resolução de N° 899 (BRASIL, 2003).

A Tabela 3.6.1 apresenta os dados do equipamento bem como a especificação da coluna, fase móvel e os parâmetros cromatográficos utilizados no processamento analítico das amostras.

Tabela 3.6.1. Dados do equipamento de CLAE e condições cromatográficas (UNITED STATES PHARMACOPEIA 33, 2010).

Dados do Equipamento	Fármaco - Isoniazida		
	Composição Fase Móvel	Condições Cromatográficas	
Marca Waters® Alliance	KH ₂ PO ₄ 0,1 M + N(C ₂ H ₄ OH) ₃ (95:5)	Coluna	C ₁₈ 5µm 4,6x250mm Waters
Modelo Waters 2695		Part. N°	186003117 12138164134614
Separations Module Waters 2993 DAD	TAMPÃO (KH ₂ PO ₄) + METANOL pH 6,9	Vol de Injeção	100 µL
		Detector	UV/DAD 254 -nm
		Fluxo	1,5 mL min ⁻¹

3.6.4 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (CLAE-EM)

3.6.4.1 Determinação da concentração residual do fármaco

Foram realizadas análises no equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massa tipo quadrupolo (CLAE-EM), para todas as alíquotas retiradas nos tempos de retenção hidráulica (TRH) amostrados no reator, com intuito de determinar a concentração residual do fármaco alvo bem como caracterizar qualitativamente os produtos de degradação resultante do POA empregado.

As análises foram realizadas no Laboratório de Bioequivalência e Farmacocinética da Vice-Presidência de Produção e Inovação em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). As amostras eram colocadas nos vials e mantidas sob temperatura controlada (20°C), e somente conduzidas ao laboratório da FIOCRUZ, no dia em que as análises eram processadas.

Os parâmetros cromatográficos de análise bem como composição da fase móvel estão descritas na Tabela 3.6.2. Com relação a metodologia analítica empregada, foi utilizada uma metodologia desenvolvida no próprio laboratório da FIOCRUZ.

3.6.4.2 Caracterização dos compostos intermediários

As análises de caracterização dos compostos intermediários foram realizadas apenas de forma qualitativa e foram processadas via sistema CLAE-EM, em todos os TRH especificados para o experimento.

O equipamento utilizado nas análises de identificação dos produtos de degradação possuía tecnologia triplo quadrupolo com dois quadrupolos (analisadores) em paralelo e câmara de colisão (quadrupolo em U) ligados ao detector elétron multiplier, que possui a função de multiplicação dos elétrons. Possui sistema de capilar após o shield a 6 graus em relação ao primeiro quadrupolo que também precisa de quebra de vácuo para promover a limpeza do circuito. O sistema possui ainda uma bomba de baixa pressão com dois pistões e um único motor delta de fluxo/pressão não muito baixo para CLAE-EM.

A Tabela 3.6.2 apresenta os dados do equipamento utilizado, incluindo modelo bem como os parâmetros cromatográficos de análises e composição da fase móvel adotados para consecução das análises.

Tabela 3.6.2. Parâmetros cromatográficos de análise utilizados no sistema de CLAE-EM.

Dados	Equipamento				
	Composição Fase Móvel	Condições Cromatográficas		Condições Instrumentais	
Espectrômetro de Massas Varian Mod. 320 MS	Fase A	Coluna	C ₁₈ 5µm - 4,6x150mm Atlantis t3	Detector	1400V
	H ₂ O/			Needle	5500V
	Ácido fórmico			Shield	500V
	0,1%			Housing (temp)	60 °C
				Dry gas (temp)	370 °C
Cromatógrafo Varian Mod. 212 LC	Fase B	Vol de Injeção	10 µL	CID gas	2mTorr
	Metanol	Detector	UV/DAD 254-nm	Nebulizing gas	Argônio a 50 psi
	Acetonitrila 50:50			Dry gas	45 psi
				Dwell time	0,25 ms
					121,0 (capilar: 50V)
				123,9 (capilar: 30V)	
Injetor Automático HTS CTC Analytics	Composição	Fluxo	0,4 mL min ⁻¹	Q ₁ mass	138,2 (capilar: 25V)
	10% B				163,0 (capilar: 15V)
	90% A				226,8 (capilar: 15V)
					242,1 (capilar: 15V)

3.6.5 Protocolo para realização dos testes de estresse químico

O teste de estresse é definido como um teste de avaliação da estabilidade de fármacos quando submetida a condições críticas, conforme preconizado pela Resolução N° 899 (BRASIL, 2003).

Este estudo visa à maximização do estresse químico da molécula de INH, objetivando a formação dos intermediários numa maior proporção, para então estabelecer uma

comparação com os compostos formados nas condições dos ensaios com os POA, para avaliar o máximo potencial de degradação que a molécula de INH pode sofrer em condições críticas.

A Tabela 3.6.3 apresenta as condições em que foram realizadas os testes de estresse químico.

Tabela 3.6.3. Condições de estresse para realização do estudo de degradação forçada.

Parâmetros	Valores
Volume de amostra	2 L
Concentração do fármaco	10 mg L ⁻¹
Solução oxidativa	H ₂ O ₂ a 30% (v/v)
Fotólise	Irradiação UV a 254 nm
Potência da lâmpada	15 W
Proporção	1 L do efluente sintético + 1 L de H ₂ O ₂ a 30% v/v
Tempo reacional	1440 minutos
Aparato experimental	Reator fotocatalítico de 2 L de volume reacional, sob agitação constante pela introdução forçada de ar.

3.6.6 Espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta visível a $\lambda = 265$ nm

A espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta na indústria farmacêutica é amplamente utilizada, e a metodologia para análise da INH consta no compêndio oficial brasileiro denominado de Farmacopéia Brasileira, razão pelo qual pode ser considerada validada sob os parâmetros preconizados pela Resolução N° 899 “Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos” (BRASIL, 2003).

Inicialmente foram realizados experimentos confirmatórios com a solução padrão de isoniazida a 10 mg L⁻¹, no comprimento de onda de 265 nm, que é comprimento de onda no qual ocorre o máximo de absorção (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 2010).

Em seguida todas as amostras resultantes do processo de fotodegradação foram submetidas ao espectro de absorção molecular no UV-visível no modo de varredura completa na faixa de comprimento de onda de 200 a 800 nm, com correção da linha de base com intervalos de 0,2 nm, e foi utilizada uma cubeta de quartzo de caminho ótico de 1 cm. O equipamento utilizado nos ensaios possui as seguintes especificações técnicas conforme Tabela 3.6.4.

Tabela 3.6.4. Especificação técnica do espectrofotômetro de absorção molecular UV-Vis

Equipamento		Metodologia	
Marca	Varian [®]	Varredura	200 a 800 nm
Modelo	Cary Win UV 50 Conc	Leitura da amostra	$\lambda = 265$ nm
Módulo	UV-Vis	Correção	0,2 nm

3.6.7 Determinação da concentração residual de peróxido de hidrogênio

Neste experimento, os níveis de peróxido de hidrogênio residual foram avaliados por duas metodologias analíticas. A primeira utilizando tiras reativas pertencentes ao teste kit de triagem da Merckoquant, e a segunda metodologia utilizada foi via determinação do número de peróxido de hidrogênio utilizando um titulador automático com eletrodo de platina.

Entretanto, face a imprecisão analítica do método das tiras reativas da Merck, associado aos resultados considerados insatisfatórios da determinação do número de peróxido de hidrogênio via titulador potenciométrico automático, esses resultados não serão considerados no presente trabalho.

3.6.8 Amônia

Especificamente neste trabalho, a quantificação da concentração de amônia gerada em decorrência do ataque não seletivo do radical HO[•], se fez extremamente necessário, pois dependendo da composição do fármaco, o POA pode contribuir significativamente com o aumento da concentração de amônia nos efluentes de origem farmacêutica.

Durante os experimentos de fotodegradação a concentração da amônia foi monitorada em todos os TRH do reator fotocatalítico, e em ambas as proporções molares de carbono C:H₂O₂ [1:1] e [1:2]. As análises foram processadas com o auxílio de um medidor de pH/ORP/ISE/ temperatura da marca DIGIMED, DM 23 utilizando um eletrodo íon seletivo de amônio gas-sensing combinando o eletrodo 9512BNWP.

3.6.9 pH

O pH foi continuamente monitorado ao longo de todos TRH do reator fotocatalítico. O pH foi determinado pelo método potenciométrico com auxílio do medidor automático da marca WTW inolab modelo pH 720.

3.6.10 Condutividade

A condutividade elétrica é a capacidade que a água possui de conduzir corrente elétrica e pode inclusive contribuir para possíveis reconhecimentos de impactos ambientais. Este parâmetro indica a presença de íons dissolvidos em solução, por intermédio de uma varredura na quantidade de íons presentes, não fazendo referência qualitativa, apenas expressa o resultado global de forma quantitativa.

Apesar desse parâmetro não ser considerado crítico nos ensaios de fotodegradação de fármacos via processo H_2O_2/UV , nesse trabalho foi proposto o monitoramento contínuo ao longo de todos os TRH, com objetivo de acompanhar evolutivamente o comportamento do fármaco frente ao ataque do radical HO^\bullet principalmente no que diz respeito à abertura do anel aromático e a transferência de íons para a solução aumentando sua concentração.

Para realização desse monitoramento foi utilizado um condutivímetro microprocessado digital da WTW (conductivity meter) modelo LF 320.

3.6.11 Extração por fase sólida (SPE) – Ensaios preliminares

Com intuito de desenvolver e validar uma metodologia de extração por fase sólida para quantificação da isoniazida possivelmente presente nos efluentes de origem farmacêutica, foram realizados ensaios preliminares com três tipos de sorventes: Oasis® HLB 60 mg 3mL, Varian® C₁₈ 500mg 3 mL e por fim Oasis® HLB 30 µm 200 mg 6 mL. Este último cartucho foi utilizado pois segundo dados experimentais reportados por LI *et al.*, 2004, fármacos com alta polaridade, como o caso da INH, não retêm bem em colunas de fase reversa.

Quanto à solução de extração, foi preparado 1000 mL de solução de extração a partir do padrão primário USP, usando como diluente a água Milli-Q numa faixa de

concentração de 0,5 a 2,5 mg L⁻¹ e as determinações foram realizadas em duplicatas. Após o preparo foram transferidas para garrafas de vidro âmbar, e em seguida foi dado início os procedimentos de extração, com uma vazão de 23 mL min⁻¹ e foi utilizado o aparato experimental conforme apresentado na Figura 3.6.1.

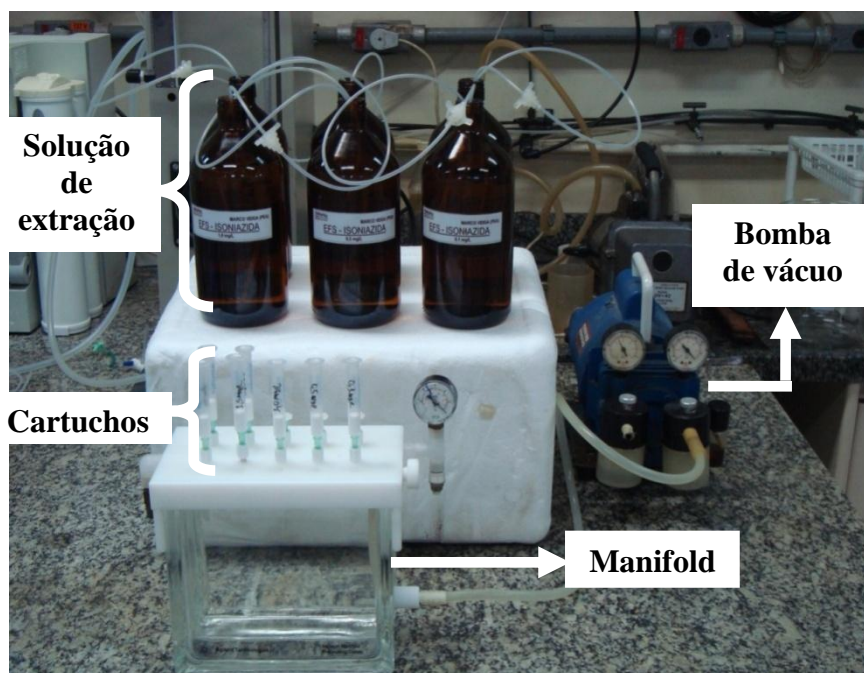


Figura 3.6.1. Foto do aparato experimental utilizado na SPE
Fonte: Adaptação de BILA *et al.*, 2003.

A Figura 3.6.2 apresenta a marcha analítica empregada nos procedimentos de extração por fase sólida (SPE).

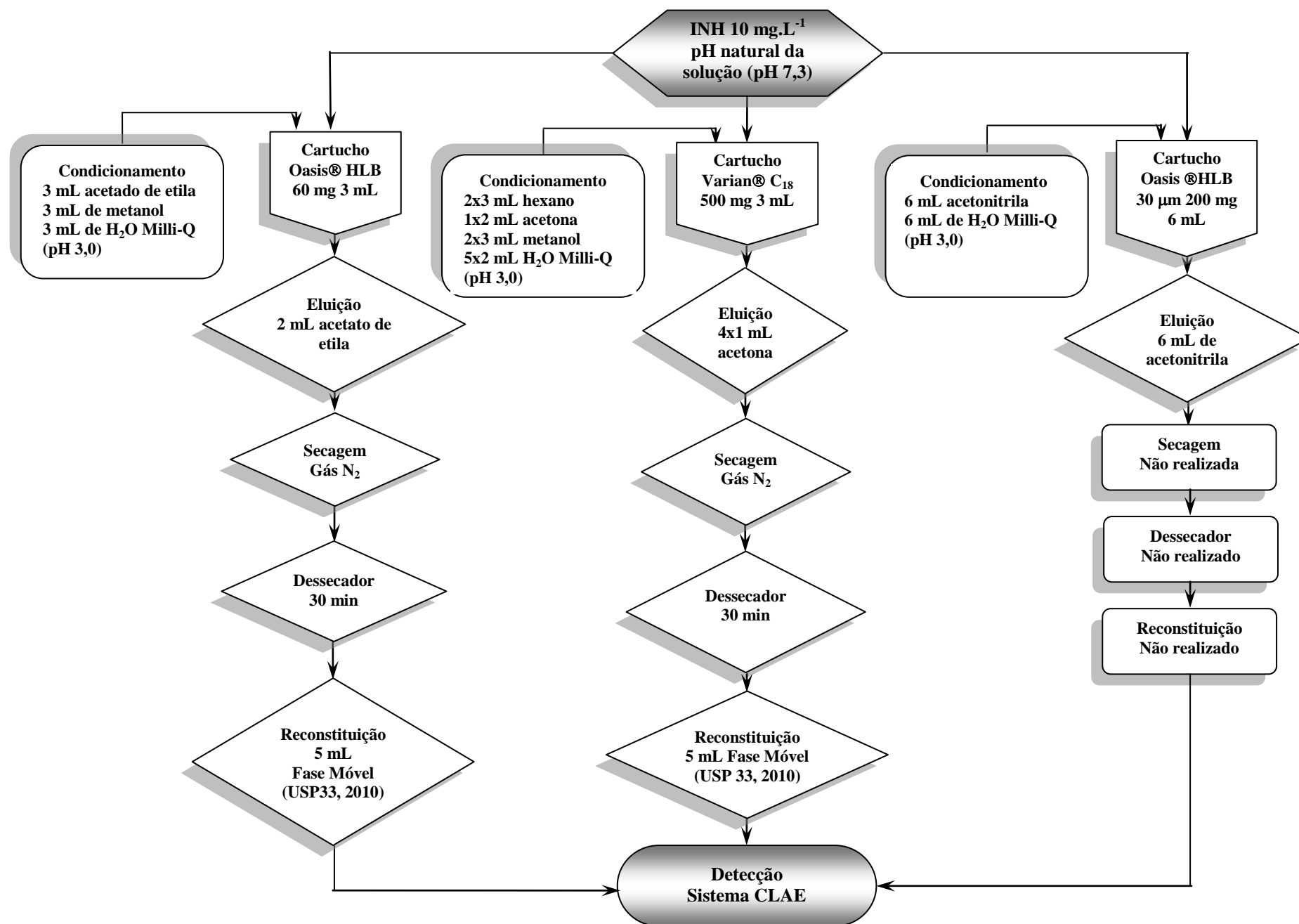


Figura 3.6.2. Marcha analítica utilizada nos procedimentos de extração por fase sólida (SPE).

Tabela 3.6.5. Condições cromatográficas utilizadas para detecção das amostras resultantes do processo de SPE.

Isoniazida			
Cartucho	Oasis HLB 60 mg 3mL	Varian C ₁₈ 500mg 3 mL	Oasis HLB 30 µm 200 mg 6 mL
Fase móvel	(95:5) TAMPÃO KH ₂ PO ₄ 0,1 M + N(C ₂ H ₄ OH) ₃ + Metanol @ pH 6,9 Método: USP 33, 2010.		(700:300:10:0,25) v/v ACN/Água MilliQ/Ac.acético/TFA Método: Smith <i>et al.</i> ,1999.
Condições Cromatográficas	Coluna: C ₁₈ 5µm 4,6 X 250mm Waters Detetor: UV 254 nm Fluxo: 1,5 mL min ⁻¹ Vol. Injeção: 100 µL Método: USP 33, 2010.		Coluna: Hypersyl Sílica 50 X 4,6 mm 5µm Detetor: UV 254 nm Fluxo: 3 mL min ⁻¹ Vol. Injeção: 100 µL Método: Smith <i>et al.</i> ,1999.

3.6.11 Método de quantificação da isoniazida após a extração por fase sólida

Nos ensaios utilizando os sorventes Oasis® HLB 60 mg 3mL e Varian® C₁₈ 500 mg 3 mL para quantificação do fármaco retido no cartucho, foi utilizada as mesmas condições cromatográficas para determinação do teor de isoniazida em comprimidos, prevista na UNITED STATES PHARMACOPEIA 33, 2010, conforme descrito na Tabela 3.6.5, por se tratar de uma metodologia amplamente utilizada pelas indústrias farmacêuticas. A única adaptação realizada no método foi a alteração do volume de injeção para 100 µL, devido a baixa concentração do analito presente na solução de extração. Em relação ao aumento do volume de injeção, é interessante destacar que o volume máximo de injeção para qualquer coluna, deve ser 1% do volume interno da coluna vazia, e para o cálculo do volume máximo de injeção, foi utilizada Equação 14:

$$V_{\text{máx}} = (\pi \times r^2 \times C) (0,01) \quad (\text{Equação 14})$$

Onde:

$(\pi \times r^2 \times C)$ é o volume interno da coluna

Para quantificação do fármaco resultante do processo de extração com o cartucho Oasis HLB 30 µm 200 mg 6 mL foi avaliada as mesmas condições cromatográficas utilizadas por Smith *et al.*,1999 com exceção apenas do volume de injeção, o qual foi mantido em 100 µL.

3.6.12 Cálculo da eficiência do processo de extração por fase sólida (SPE)

Segundo Santos *et al.*, 2007 a medida da eficiência do procedimento de extração por fase sólida é realizada com base no cálculo do percentual de recuperação do fármaco (%R). A recuperação geralmente é dependente da concentração, por isso deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para a amostra.

Portanto, para o cálculo do percentual de recuperação R(%) foi utilizada a Equação 15:

$$R(\%) = (\text{massa obtida} / \text{massa real}) \times 100 \quad (\text{Equação 15})$$

Onde:

R(%) = percentual de recuperação da amostra

Os valores da massa obtidos após os procedimentos de extração foram chamados de valor obtido, enquanto que os valores de massa real relativo à concentração da solução padrão foram chamados de valor real.

O cálculo do percentual de recuperação (%R) foi realizado com base na interpolação dos dados adquiridos na curva de calibração realizada com a solução padrão de isoniazida, nas seguintes concentrações: 0,2; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 10,0 mg L⁻¹.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente capítulo apresenta os resultados obtidos em referência aos ensaios realizados utilizando a técnica de extração por fase sólida, para extração, pré-concentração e posterior quantificação da INH, utilizando como técnica analítica a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Na seqüência serão apresentados os resultados dos parâmetros analíticos avaliados para se determinar a eficiência, resultantes da utilização do processo H₂O₂/UV aplicado segundo as condições operacionais ótima do reator fotocatalítico.

Por fim, apresentam-se os resultados qualitativos dos compostos intermediários caracterizados pelo sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massa tipo quadrupolo (CLAE-EM).

4.1 ENSAIOS PRELIMINARES POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)

A SPE é uma técnica analítica extremamente útil e atualmente vem se destacando no cenário científico, por ser considerada uma técnica eficiente para extração e pré-concentração de micropoluentes em baixas concentrações (na faixa de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$ ou pg g^{-1} a ng g^{-1}), presentes em diversas matrizes ambientais.

Neste contexto, para avaliar a seletividade dos cartuchos e considerando as propriedades físico-químicas da isoniazida foram realizados ensaios preliminares com três tipos de sorventes disponíveis comercialmente: Oasis® HLB 60 mg 3mL, Oasis® HLB 30 μm 200 mg 6 mL e Varian® C₁₈ 500mg 3 mL acompanhados de seus respectivos procedimentos de condicionamentos, solventes para eluição do analíto, secagem com gás de arraste de nitrogênio e métodos de reconstituição recomendados pelo próprio fabricante, bem como dados referenciados em trabalhos científicos, sendo específicos e diferenciados para cada tipo de sorvente empregado.

4.1.1 Eficiência do procedimento de extração

A Figura 4.1.1 apresenta os resultados dos percentuais de Recuperação R (%) da isoniazida, obtidos para todos os cartuchos avaliados.

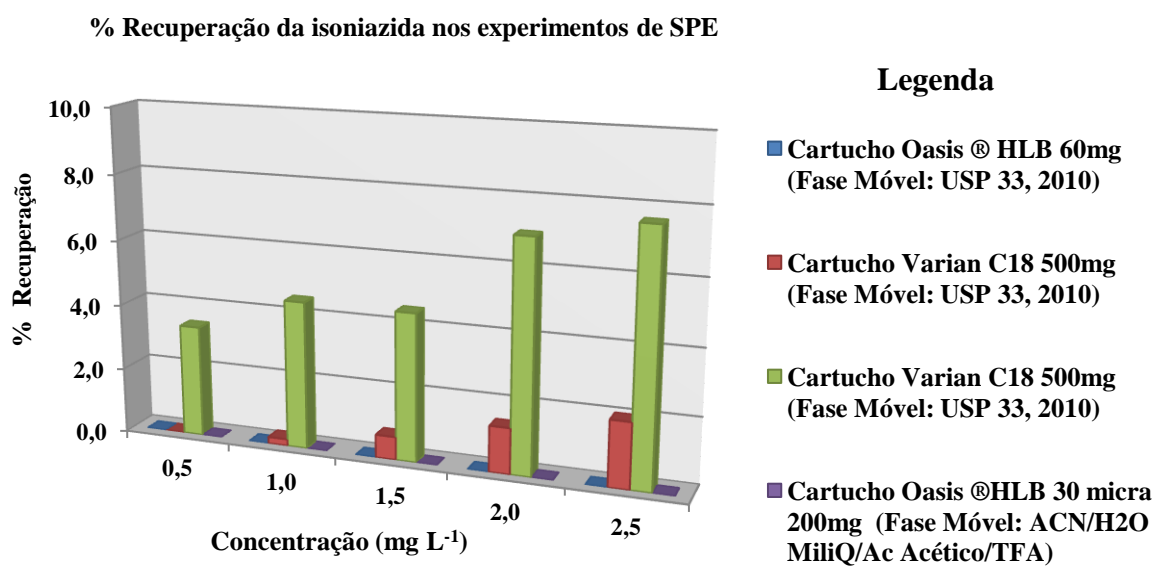


Figura 4.1.1. Percentual de recuperação da isoniazida obtido na SPE para todos os cartuchos avaliados.

O percentual de recuperação dos cartuchos (%R) foi determinado em duplicadas nas seguintes faixas de concentração: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; e 2,5 mg L⁻¹.

De acordo com a Figura 4.1.1 o melhor percentual de recuperação encontrado foi para o cartucho C18 500mg 3 mL da Varian®, no qual para a solução de extração na concentração de 2,5 mg L⁻¹ foi obtido o percentual de recuperação de 7,6%. Para efeito de discussão dos resultados, será considerado apenas os resultados obtidos para este cartucho, tendo em vista que os demais apresentaram baixíssimos percentuais de recuperação.

É importante ressaltar que não foram encontrados dados na literatura que reportassem a utilização da técnica de SPE, para quantificação da isoniazida no meio ambiente. Entretanto, para efeito de estudos de correlação foram considerados dados bibliográficos utilizando a técnica de SPE para matriz biológica (plasma sanguíneo), em função da determinação da concentração sérica do fármaco, em ensaios de biodisponibilidade farmacêutica.

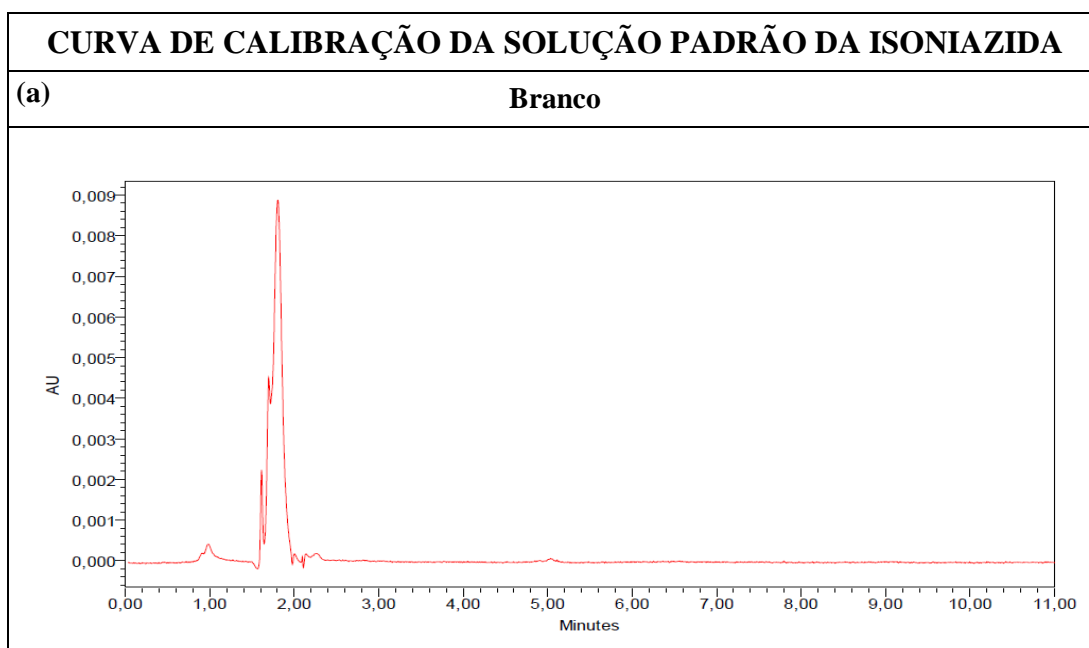
Na literatura foi reportado valor de recuperação para a isoniazida de 72% usando o cartucho C18 (Analytichem) para amostra de plasma sanguíneo, no qual foram adotados os seguintes procedimentos de extração: lavagem seqüencial do cartucho com 2 X 2mL de metanol; 2 X 2mL de água e 2 mL de tampão fosfato de potássio a 0,05M (pH 4,5). As condições cromatográficas utilizadas para quantificação foram: fase móvel: 3% de acetonitrila e 0,06% de TFA, e a coluna utilizada foi uma C8 Spherisorb, 150 X 4,6 mm 5 µm – Supelco, acoplada a uma pré-coluna C8. O fluxo da fase móvel foi de 1,5 mL min⁻¹ e detecção de 254 nm. (SMITH *et al.*, 1999).

Guermouche (2004) encontrou o percentual de recuperação da isoniazida de 87,2% ± 4,9 em amostras de plasma sanguíneo utilizando uma solução de extração contendo a isoniazida na concentração de 0,5 µg L⁻¹, e cartucho Oasis® HLB 60 mg da Waters. Para esses experimentos foram consideradas as seguintes etapas de extração: condicionamento com 1 mL de metanol, 1 mL de acetonitrila e 1mL de tampão fosfato a 0,05 M (pH 4,5), e após a filtração da amostra, o cartucho foi lavado com 1 mL de tampão fosfato na mesma concentração e pH utilizado na etapa de condicionamento do cartucho. A eluição foi feita com 1 mL de solução de acetonitrila-metanol (1:1 v/v). O cartucho foi então evaporado à secura com nitrogênio e em seguida a amostra foi reconstituída com 100 µL de metanol.

Com referência aos resultados experimentais da SPE utilizando o cartucho C18 500mg 3 mL da Varian® Figura 4.1.1, foi observado uma pequena resposta relativa as áreas dos picos cromatográficos resultantes do processo de extração Figura 4.1.3, indicando que a massa do analito retida no cartucho foi muito pequena, e esses resultados exerceram uma

influência direta no cálculo do percentual de recuperação do fármaco, inviabilizando a validação das metodologias de extração, o qual segundo dados reportados em literatura, para validação dos procedimentos cromatográficos, as recuperações devem estar entre 85 e 115% (LANÇAS, 2004).

Com objetivo de otimizar a resposta cromatográfica no que diz respeito a quantificação do fármaco tanto na solução padrão como para as amostras submetidas a SPE, face as baixas concentrações, foi alterado o volume de injeção do método de análise, passando de 20 μ L para o mesmo volume de extensão do loop, ou seja, 100 μ L, e foram mantidas todas as outras variáveis cromatográficas, conforme Tabela 3.6.5 referente a materiais e métodos. Espera-se que igualando o volume de injeção a extensão do loop, tem-se um aumento de massa do analito no interior da coluna cromatográfica, proporcionando assim uma melhor quantificação, melhorando a performance cromatográfica.



(b) Concentração (Padrão Isoniazida)	t_R (min)	Área (valor médio)
0,2 mg L ⁻¹	4,1	24790
(c) Concentração (Padrão Isoniazida)	t_R (min)	Área (valor médio)
1,0 mg L ⁻¹	4,1	121616
(d) Concentração (Padrão Isoniazida)	t_R (min)	Área (valor médio)
1,5 mg L ⁻¹	4,1	174219

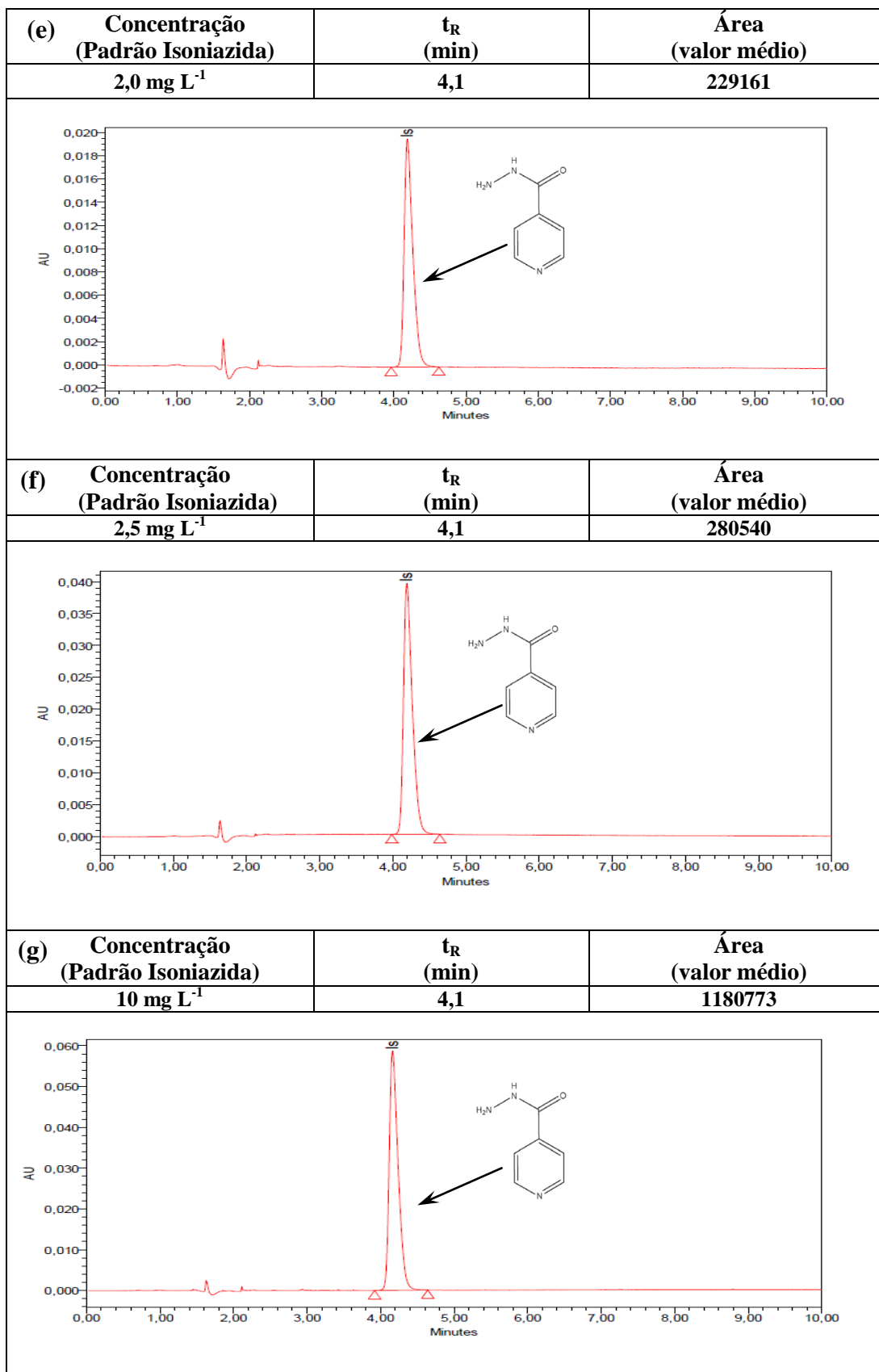


Figura 4.1.2. Resultados cromatográficos da curva de calibração da isoniazida. (a) Branco; (b) Padrão de 0,2 mg L⁻¹; (c) Padrão de 1,0 mg L⁻¹; (d) Padrão de 1,5 mg L⁻¹; (e) Padrão de 2,0 mg L⁻¹; (f) Padrão 2,5 mg L⁻¹; (g) Padrão de 10,0 mg L⁻¹.

A Figura 4.1.2 apresenta os resultados da curva de calibração da isoniazida obtida pela CLAE. Com o aumento do volume de injeção, foi verificado uma melhora significativa na detecção do fármaco, sendo possível evidenciar picos bem definidos com boa resolução, e as intensidades dos sinais cromatográficos foram proporcionais as faixas de concentração do fármaco, e o tempo de retenção (t_R) da isoniazida foi reprodutivo ($t_R = 4,1$ min). Quanto a linearidade da metodologia analítica empregada, foi observado boa linearidade com coeficiente de correlação de 0,99 indicando claramente que a metodologia analítica foi satisfatória para quantificar a concentração das amostras resultantes do processo de extração (SPE), sendo inclusive a mesma metodologia preconizada pela UNITED STATES PHARMACOPEIA 33 (2010), amplamente utilizada pelas indústrias farmacêuticas para determinação do teor do princípio ativo de isoniazida em comprimidos. Portanto, os baixos percentuais de recuperação não podem ser atribuídos ao método cromatográfico empregado.

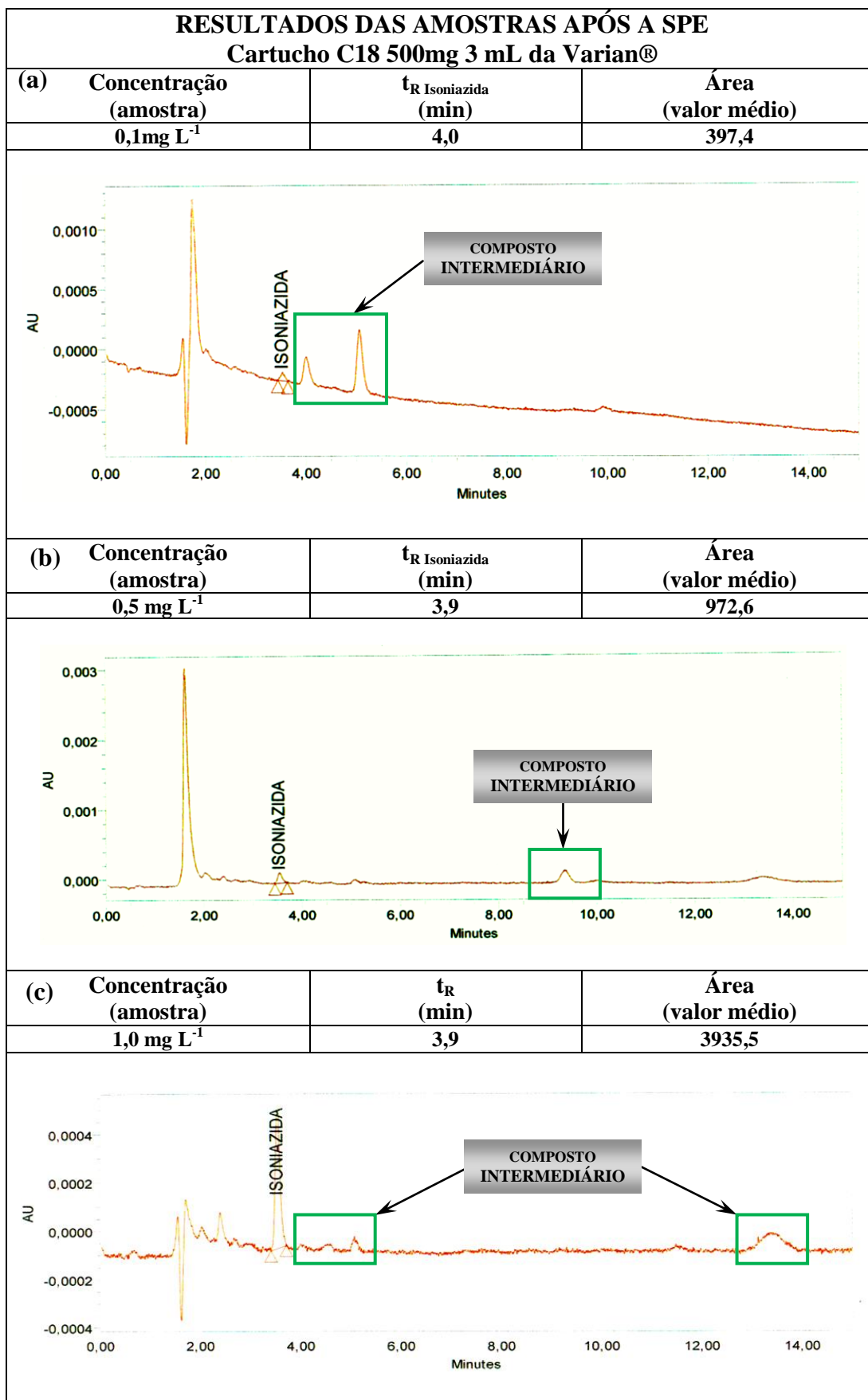
Em referência aos demais cartuchos, em virtude dos valores indicados no gráfico Figura 4.1.1 nenhum dos sorventes avaliados (Oasis® HLB 60 mg 3mL e Oasis® HLB 30 μ m 200 mg 6 mL), foram eficientes, no que se refere a retenção da isoniazida na fase sólida pesquisada. Sendo assim, para consecução das demais fases previstas neste trabalho, foi considerado apenas o fármaco preparado a partir da água Milli-Q (0,22 μ m) na concentração de 10 mg L⁻¹ e transferido diretamente para o reator fotocatalítico.

Quanto aos demais resultados obtidos para o cartucho C18 500mg 3 mL da Varian®, serão apresentados e discutidos nos itens 4.1.2 e 4.1.3.

4.1.2 Influência do pH na etapa de condicionamento

Giroto *et al.*, (2007) relataram que diversos são os fatores considerados na otimização do processo de extração por fase sólida de compostos orgânicos. Dentre eles se destaca o pH.

Da Silva & Collins (2011) reportaram que um dos parâmetros críticos a serem observados durante a determinação dos poluentes orgânicos emergentes, principalmente fármacos, é o que se refere ao pH o qual em muitos casos pode determinar a forma química do analito em solução e, conseqüentemente, interferir na eficiência de extração. Por exemplo, o baixo percentual de recuperação do processo de extração das quinolonas (ciprofloxacino) foi melhorado após acidificação da solução em pH 2,5. Hernandez *et al.*, (2007) ressaltam ainda a importância de escolher uma faixa de pH onde também não ocorra degradação dos analitos.



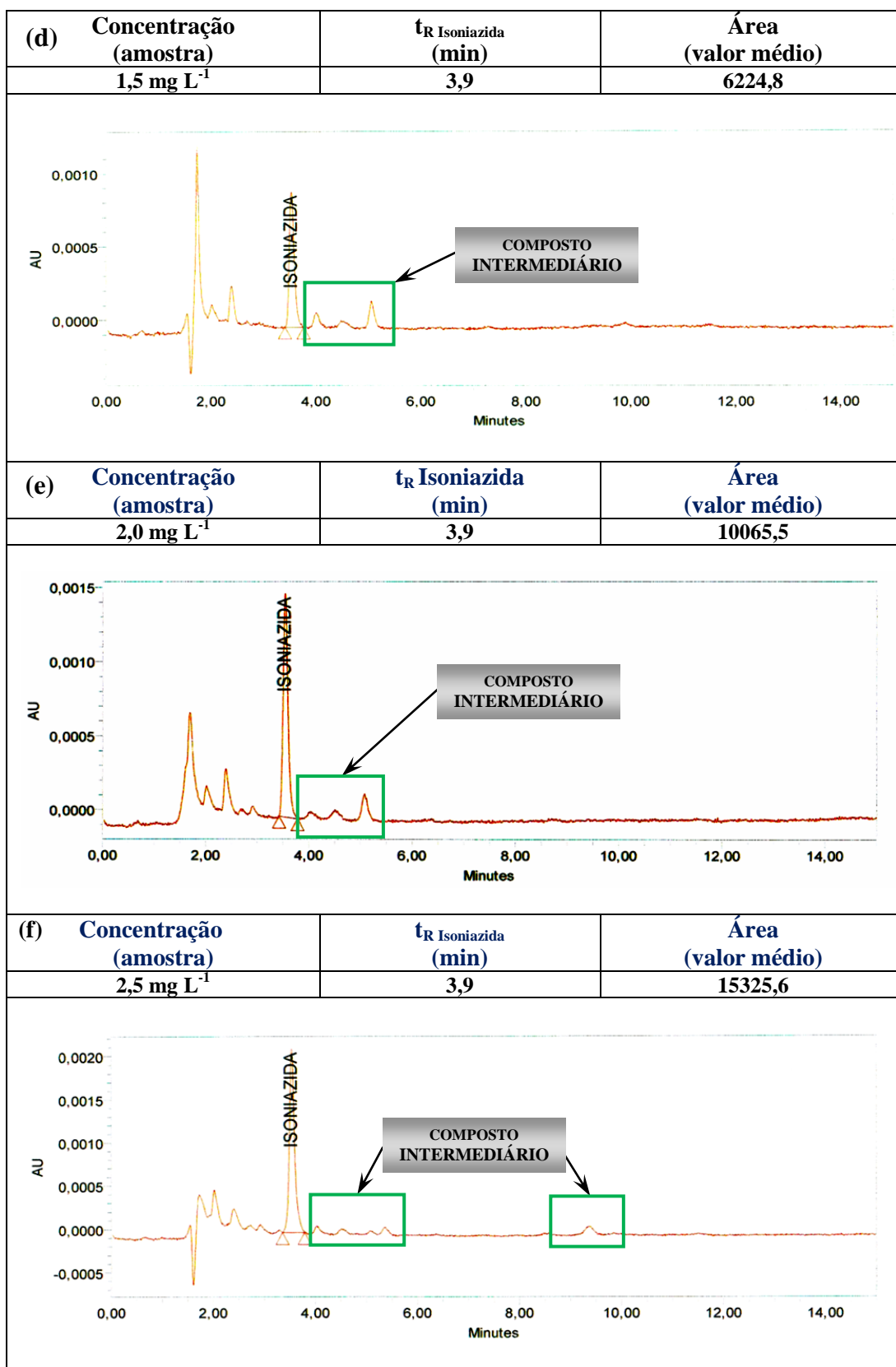


Figura 4.1.3. Perfil cromatográfico das amostras resultantes do processo de SPE com o cartucho Varian® C₁₈ 500 mg 3 mL. (a) Concentração de 0,1 mg L⁻¹ (pH 3,0); (b) Concentração de 0,5 mg L⁻¹ (pH 3,0); (c) Concentração de 1,0 mg L⁻¹ (pH 3,0); (d) Concentração de 1,5 mg L⁻¹ (pH 3,0); (e) Concentração de 2,0 mg L⁻¹ (pH 3,0); (f) Concentração de 2,5 mg L⁻¹ (pH 3,0).

As Figuras 4.1.3(a);(b);(c);(d);(e) e (f), apresentam os resultados cromatográficos das amostras resultantes do processo de extração com o cartucho Varian® C18 500mg 3 mL. Nota-se que os picos saíram bem definidos, porém com uma pequena resposta em área, e em algumas concentrações foram detectados picos próximos ao tempo de retenção característico da isoniazida, podendo ser considerados interferentes, ou até mesmo indícios de formação de compostos intermediários com características semelhantes ao do fármaco em estudo.

Em relação aos demais picos registrados em diferentes tempos de retenção (t_R) Figura 4.1.3 é provável que em função do condicionamento dos cartuchos realizados em pH ácido (água Milli-Q pH 3,0), a isoniazida possa ter sofrido degradação. Lewin & Hirsch (1985) avaliaram a estabilidade da INH sob diferentes valores de pH e observaram que em pH 4,8 a INH sofreu aproximadamente 10% de decomposição, portanto de acordo com os autores é razoável argumentar que os baixos percentuais de recuperação (%R) e o aparecimento de picos em diferentes tempos de retenção (t_R) conforme indicados nas Figuras 4.1.3 (a);(b);(c);(d);(e) e (f), pode ter sido em função da formação de compostos intermediários, que serão detalhados no item 4.2.1.6 do presente trabalho.

Diante da possibilidade de degradação da isoniazida na etapa de condicionamento, cogitou-se a possibilidade de não realizar tal procedimento, o qual de acordo com dados da literatura existem alguns cartuchos como, por exemplo, Nexus®, Chromabond EASY e Oasis® HLB que não requer etapa de condicionamento antes da extração (WEIGEL *et al.*, 2004; ZHONGE *et al.*, 2005; FONTANALS *et al.*, 2007). Entretanto, alguns experimentos realizados com o cartucho Nexus® comprovaram que a eficiência de extração podem diminuir, quando a etapa de condicionamento não é considerada (WEIGEL *et al.*, 2004, GIACOMETTI *et al.*, 2002), provavelmente devido a resistência imposta pelo fase sólida durante a filtração da amostra, ou também devido ao fenômeno da coeluição dos fármacos (WEIGEL *et al.*, 2004). Em face a observação ora relatada, os experimentos não foram realizados.

Ainda com relação a influência do efeito do pH, Gomez *et al.*,(2006) testaram diferentes valores de pH (2,0, 4,0 e 7,0) através da aplicação da técnica de SPE em amostras contendo compostos farmacêuticos e observaram que o maior percentual de recuperação foi alcançado no pH 7,0.

4.1.3 Influência do volume da solução de extração sobre a recuperação do fármaco (%R)

O volume de extração também é considerado um parâmetro crítico nos experimentos de SPE, tendo em vista que algumas características físico-químicas do fármaco podem sofrer influência da matriz.

Santos *et al.*, (2007) realizaram experimentos de SPE utilizando os cartuchos LC-18, Envi Chrom P e Nexus® e fármacos pertencentes a classe terapêutica dos antibióticos (tetraciclina, cefalexina, amoxicilina e ampicilina), com objetivo de avaliar o efeito do volume da solução de extração sobre a recuperação dos fármacos. Para tanto, foi realizado ensaios considerando dois volumes distintos da solução de extração (50 e 250 mL). O volume que apresentou a melhor retenção dos fármacos foi de 50 mL, para cefalexina e tetraciclina utilizando o cartucho Chrom P, obtendo o percentual de recuperação de 95,6 % e 81,0 % respectivamente. Em relação ao volume de 250 mL (amoxicilina e ampicilina), utilizando os cartuchos Chrom P, LC-18 e Nexus®, para todos os cartuchos avaliados apresentaram baixo percentual de recuperação. Na análise da solução após a filtração no cartucho foi detectado a presença de até 95% dos fármacos, sendo possível concluir que os analitos eram arrastados pelo próprio solvente da amostra, que nesse caso em específico foi utilizado a água.

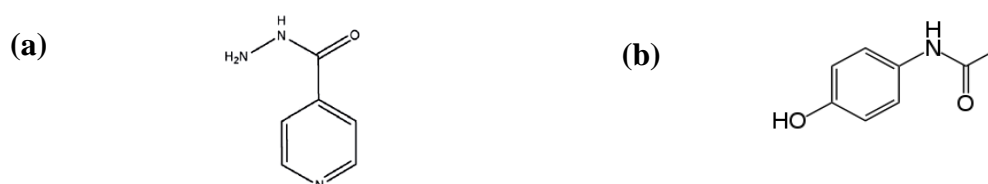


Figura 4.1.4. Fórmula estrutural. (a) Isoniazida; (b) Paracetamol.

Suchara *et al.*, (2007) reportaram baixa eficiência de extração para o paracetamol que possui uma similaridade estrutural com a isoniazida Figura 4.1.4. Para a realização dos experimentos de SPE do paracetamol foram avaliados os seguintes sorventes: (PSDVB “não funcionalizados”, Bakerbond SDB-1, Lichrolut EN, Chromabond HR-P, sorventes funcionalizados PS-DVB de alta área, Isolut Env+, Chromabond EASY, e os co-polímeros compostos de ambos monômeros lipofílicos e hidrofílicos (OASIS® HLB, absolut Nexus®) de baixa área superficial. Para todos os sorventes avaliados foram encontrados uma recuperação na faixa de 0 – 72%, provavelmente devido à grande solubilidade do fármaco em água.

Face ao observado por Suchara *et al.*, (2007) e levando-se em consideração os dados reportados na Tabela 2.4.1 nos permite concluir que a isoniazida apresenta elevada solubilidade em água, além também da alta polaridade, os quais é razoável afirmar que devido ao volume utilizado no procedimento de extração, o analito pode ter sido arrastado pelo próprio solvente.

4.2 REMOÇÃO DA ISONIAZIDA PELO PROCESSO H₂O₂/UV

4.2.1. Estudo da influência da concentração inicial de H₂O₂ sob o pH e condutividade

Com o intuito de maximizar o efeito da concentração do peróxido de hidrogênio sobre o pH, objetivando alcançar máxima eficiência na taxa de mineralização e degradação do fármaco, foi realizado um estudo da influência da concentração de H₂O₂ no pH natural do efluente sintético. A concentração de H₂O₂ utilizada variou de 0,84 mmol para proporção molar [1C:1H₂O₂], e 1,86 mmol para proporção molar [1C:2H₂O₂].

A fotólise do peróxido de hidrogênio é dependente do pH, uma vez que em meio alcalino a dissociação do H₂O₂ é favorecida formando o íon HO₂⁻, que apresenta maior absorvidade molar (MELO *et al.*,2009).

Em altas concentrações de peróxido de hidrogênio, podem ocorrer reações que consomem radicais HO[•] conforme demonstrado nas Equações 15 a 17, afetando negativamente o processo de degradação (DOMÈNECH *et al.*,2001).

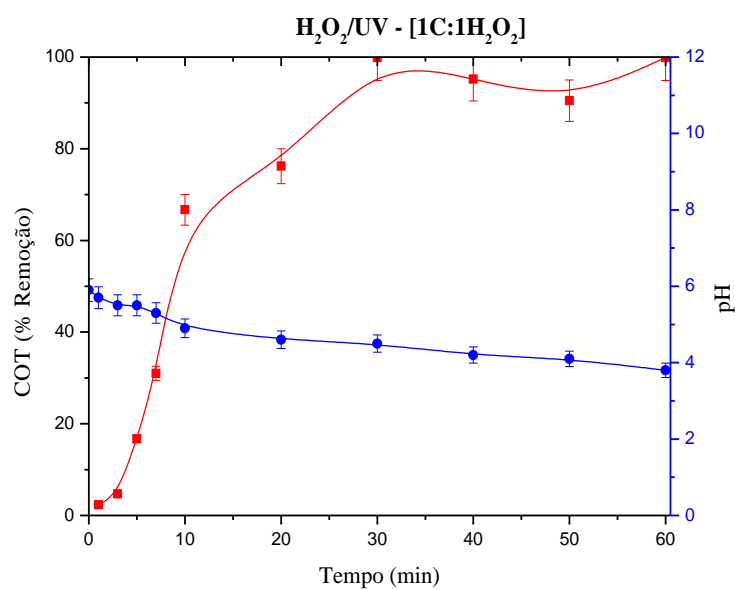


Como pode ser observado nas Figuras 4.2.1 (a) e (b), o peróxido de hidrogênio causou uma sensível redução no pH inicial do efluente sintético (pH natural), e esta variação foi percebida ao longo de todos os tempos reacionais para ambas as proporções molares.

Neste contexto, Wong & Chu (2003) relataram que o pH inicial do meio após a adição do H₂O₂ interfere no processo de fotodegradação. Adicionalmente, os autores chamam a atenção para determinação do valor ótimo de pH para cada molécula alvo que se deseja fotodegradar.

Em relação aos resultados obtidos nos experimentos realizados, temos que para a proporção molar $[1C:1H_2O_2]$ o pH logo após a adição de H_2O_2 registrou o valor de 5,9 Figura 4.2.1 (a), enquanto que na proporção molar $[1C:2H_2O_2]$ foi de 4,5 Figura 4.2.1 (b). De acordo com a análise gráfica realizada, é possível argumentar que na razão molar $[1C:1H_2O_2]$ a variação de pH ao longo da reação só alcançou valor próximo do considerado crítico (pH 4,8) segundo Lewin & Hirsch (1985) no tempo de 10 minutos, fato que reforça a tese da ocorrência de compostos intermediários somente após esse tempo reacional, exercendo uma pequena influência na taxa de reação de oxidação.

(a)



(b)

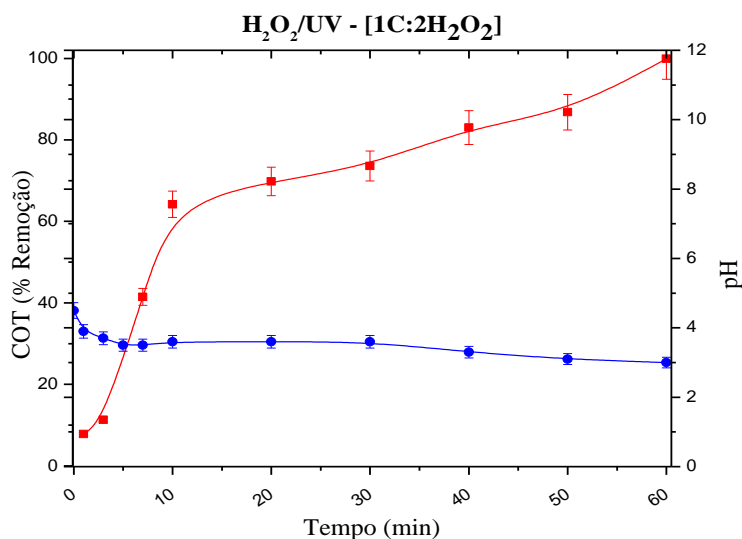


Figura 4.2.1. Monitoramento contínuo do pH em função do % Remoção de COT. (a) [1C:1H₂O₂]: pH₀ 7,3; pH_{Após H₂O₂} 5,9; pH_{60min (H₂O₂/UV)} 3,8; (b) [1C:2H₂O₂]: pH₀ 7,3; pH_{Após H₂O₂} 4,5; pH_{60min (H₂O₂/UV)} 3,0. (■) % Remoção de COT (■) pH.

Na razão molar [1C:2H₂O₂] Figura 4.2.1 (b) o pH registrado logo após a adição de H₂O₂ foi de 4,5 próximo portanto do pH onde a INH sofre decomposição (pH 4,8), sendo assim logo no início da reação é razoável afirmar que já ocorra a formação de compostos intermediários.

Lira *et al.*, (2006) reportaram que a faixa de pH ótimo para o processo H₂O₂/UV deve levar em consideração o efeito combinado de: (1) estabilidade do H₂O₂ em função do pH; (2) taxa de fotólise de H₂O₂ em função do pH (3) equilíbrio de carbonatos, bicarbonatos e ácido carbônico e (4) características do substrato alvo.

Bhutani *et al.*, (2007) avaliaram a estabilidade da isoniazida frente a uma solução de HCl na concentração de 1 mol L⁻¹, sendo observado para este ensaio mais de 50% de degradação em quatro dias. Os autores ressaltam ainda que a velocidade da hidrólise em meio ácido foi superior à observada em água ou no meio alcalino.

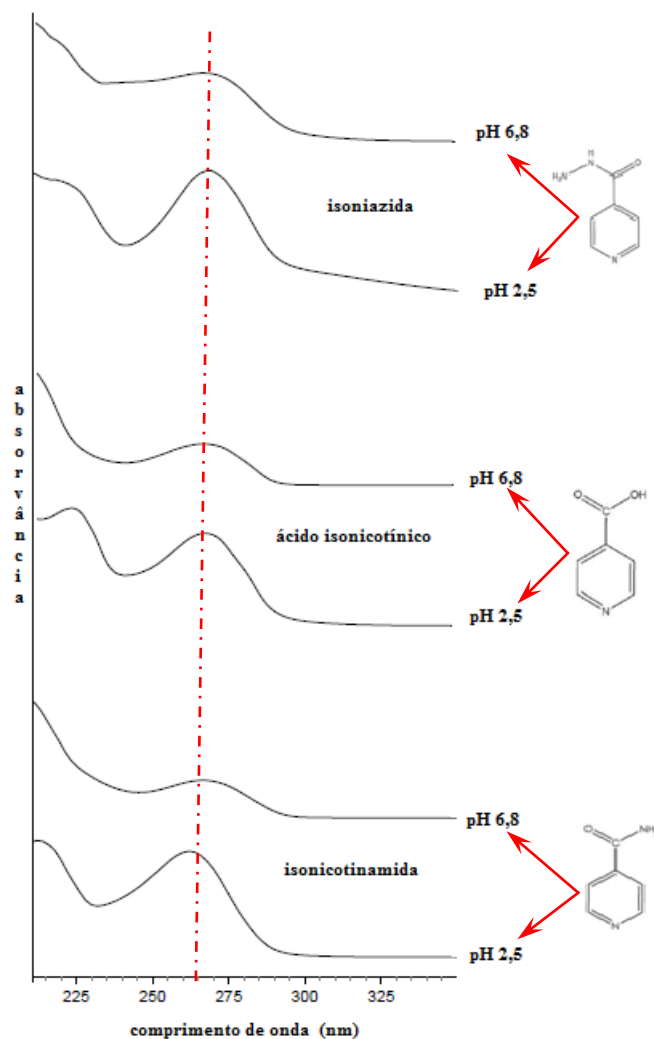


Figura 4.2.2. Espectros da isoniazida, ácido isonicotínico e isonicotinamida obtidos pelo DAD durante as análises cromatográficas. Fonte: Wollinger *et al.*, 2008.

Wollinger *et al.*, (2008) avaliaram a estabilidade da isoniazida em diferentes valores de pH e foram obtidos os espectros via HPLC-DAD da isoniazida e de seus principais compostos intermediários conforme apresentado na Figura 4.2.2. Nota-se claramente que em pH ácido (2,5) ocorre um incremento na formação de intermediários quando comparado com o pH próximo a neutralidade (pH 6,8), confirmando efetivamente que o pH ácido favorece a reação de formação dos compostos intermediários da isoniazida. A Figura 4.2.3 apresenta as estruturas químicas das formas iônicas presentes no meio reacional correspondente as faixas de pH de 2,5 e 6,8.

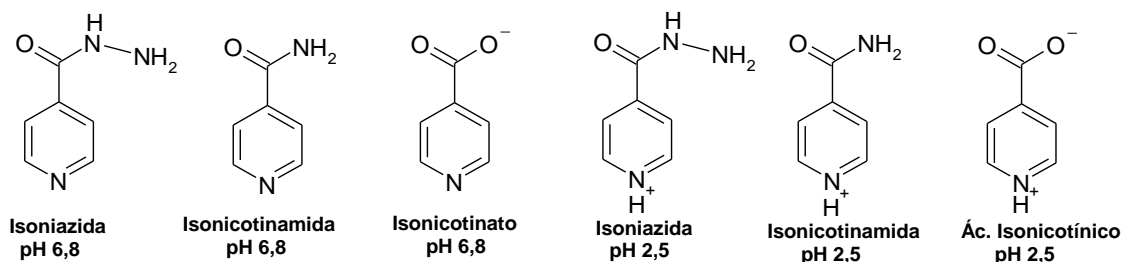


Figura 4.2.3. Formas iônicas da isoniazida e de seus compostos intermediários em valores de pH de 2,5 e 6,8. Fonte: Wollinger *et al.*, 2008.

Portanto, pode-se concluir que a concentração de H_2O_2 exerceu uma influência direta no pH inicial do meio reacional, possibilitando além da formação de produtos de degradação, como já anteriormente mencionado, alteração na taxa de reação de oxidação do fármaco (% de Remoção de COT) para ambas proporções molares avaliadas. Deste modo, a constante da taxa de reação da isoniazida é fortemente dependente do pH do meio reacional.

Com respeito aos resultados de condutividade, será apresentado apenas os dados obtidos para os experimentos na proporção molar $[\text{1C:1H}_2\text{O}_2]$, o qual foi observado um aumento discreto e gradual na condutividade, podendo estar associado ao ataque do radical $\text{HO}\cdot$ que promove a descaracterização da molécula original do fármaco, transferindo íons orgânicos e inorgânicos para a solução, que além de reduzir o pH em função dos novos produtos formados, aumenta a condutividade (Fig.4.2.4). Entretanto, a formação de espécies iônicas poderia ser convenientemente confirmada por meio da análise da cromatografia de íons, o que não foi possível realizar neste trabalho.

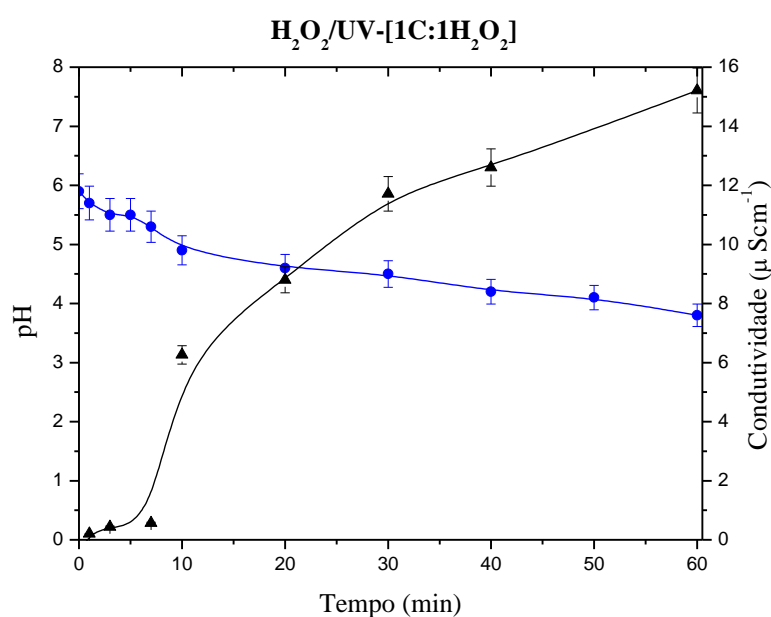


Figura 4.2.4. Monitoramento de pH e condutividade em todos os tempos reacionais na proporção molar $[\text{1C:1H}_2\text{O}_2]$. (\blacktriangle) Condutividade $\mu\text{S cm}^{-1}$ (\bullet) pH.

Com referência aos dados obtidos na proporção molar [1C:2H₂O₂], não serão reportados pois não demonstraram-se consistente, talvez devido a erros experimentais, ou então a formação de compostos intermediários em excesso.

4.2.1.1 Determinação do percentual de remoção de COT

A Figura 4.2.5 apresenta os percentuais de remoção de COT alcançados via processo H₂O₂/UV, para ambas as proporções molares investigadas.

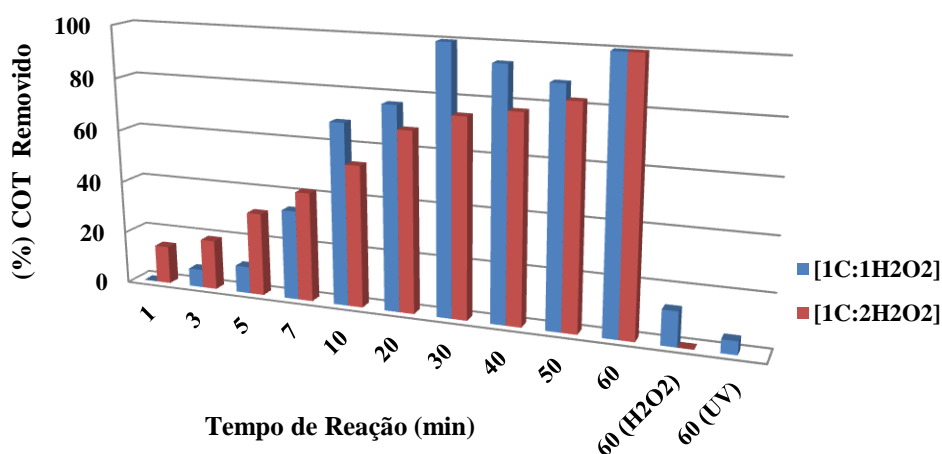


Figura 4.2.5. Percentual de remoção de COT (%) em função do tempo reacional.

De acordo com os resultados experimentais obtidos (Figura 4.2.5), observou-se que a remoção de COT ocorreu de forma satisfatória, alcançando 100% de mineralização em 30 minutos de reação para a proporção molar [1C:1H₂O₂]. Vale ressaltar que após esse tempo, o percentual de remoção reduziu para 95,2% voltando novamente a alcançar o patamar de 100% somente no tempo de 60 minutos. A análise de tais resultados permite supor, portanto, que a maior parte (ou a totalidade) do carbono remanescente em solução está relacionado à presença de compostos intermediários, os quais sabidamente são formados em pH 4,8 conforme anteriormente discutido e apresentam-se mais reativos do que a molécula original do fármaco e o ataque do radical HO[•] ocorreu preferencialmente nesses compostos consumindo os radicais HO[•], retardando a velocidade de degradação e consequentemente o atingimento do estado pseudo estacionário da reação, o que justifica a completa mineralização somente no tempo reacional de 60 minutos.

Em relação à proporção molar [1C:2H₂O₂], a máxima taxa de oxidação somente foi alcançada em 60 minutos. A diferença entre os perfis das taxas de mineralização, parece estar associado à formação dos compostos intermediários observado logo no início da reação, face os valores de pH alcançados logo nos instantes iniciais.

Segundo Caretti & Lubello (2003), os radicais hidroxil têm meia vida de, aproximadamente, 10µs e são capazes de reagir muito rapidamente e pouco seletivamente com a maioria dos compostos orgânicos e inorgânicos no meio aquoso.

Não foram encontrados dados disponíveis na literatura sobre a degradação da isoniazida para nenhum processo oxidativo avançado. Entretanto, para efeito de discussão dos resultados, buscou-se avaliar fármacos com estruturas moleculares similares submetidos ao mesmo processo de tratamento utilizado neste trabalho.

Neste sentido, foi constatado que os resultados obtidos para degradação da isoniazida encontram-se em consonância com os experimentos realizados por Trovó *et al.*, (2011) os quais também avaliaram a eficiência da fotodegradação pelo processo H₂O₂/UV para a amoxicilina e paracetamol, no que se refere a influência da concentração inicial de H₂O₂, objetivando o aumento da velocidade de mineralização. Foram avaliados as concentrações na faixa de 5 a 20 mmol L⁻¹ no pH natural da solução (4,2 - 4,5), e os autores observaram que dobrando e quadruplicando a concentração de 5 para 10 e 20 mmol L⁻¹ respectivamente, a degradação total da amoxicilina ocorreu em apenas 1 min, enquanto na presença de 5 mmol L⁻¹ de H₂O₂ foram necessários 5 min. Entretanto, o mesmo comportamento não foi observado com relação à degradação do paracetamol. Portanto, segundo os autores os resultados de remoção de COT demonstraram que a mineralização de ambos os fármacos é independente da concentração inicial de H₂O₂.



Figura 4.2.6. Fórmula estrutural. (a) Isoniazida; (b) Paracetamol.

Diante das argumentações expostas, pode-se inferir que tais resultados podem ser associado com os resultados obtidos para a isonazida na proporção molar [1C:2H₂O₂] Figura 4.2.6 (a) devido a semelhança estrutural com o paracetamol Figura 4.2.6 (b), onde mesmo aumentando a concentração de H₂O₂ não se observou a degradação da isoniazida em menores tempos reacionais.

Com respeito à validação do processo de tratamento proposto, de acordo com os dados apresentados na Figura 4.2.5 no tempo reacional de 60 min foi obtido apenas 5,0% de remoção de COT quando da exposição de forma isolada à luz UV. Em relação à exposição ao H₂O₂ foi alcançado apenas 13% de remoção de COT para proporção [1C:1H₂O₂]. Enquanto que para a proporção molar [1C:2H₂O₂], não foi observado remoção. Esperava-se um maior percentual de remoção de COT na proporção molar [1C:2H₂O₂] do que na proporção [1C:1H₂O₂], devido a maior concentração de H₂O₂ no meio reacional (1,86 mmol), entretanto, não foi o que ocorreu.

Tais resultados não invalidam o processo proposto, o qual comparando esses resultados com os reportados anteriormente por Trovó *et al.*, (2011), não foi observado redução no tempo reacional simultaneamente ao aumento da concentração de H₂O₂, sendo possível concluir de acordo com as autores que a mineralização dos fármacos é independente da concentração inicial de H₂O₂.

Segundo dados experimentais reportados por Lobo & Ried (2008) o peróxido de hidrogênio possui um potencial de oxidação em meio aquoso de 1,79 V, i.e valor abaixo do potencial do radical hidroxila que é de 2,80 V, pois na ausência da radiação UV, não ocorre à formação de radicais OH[•]. Sendo assim, os resultados obtidos para remoção do teor de COT em solução aquosa, nas condições do ensaio controle estão coerentes.

Ainda segundo Xu *et al.*, (2007;2009), Wang *et al.*, (2005); Sundstron *et al.*,(1989) relataram que o uso dos processos isolados na oxidação de compostos orgânicos apresentaram baixa eficiência de degradação direta do efluente quando submetido apenas a radiação UV e apenas ao H₂O₂ mesmo para elevados tempo de reação.

Neste contexto Lira *et al.*, (2006) reporta que ao submeter efluentes provenientes de uma indústria petroquímica, com COT₀ = 4 mgC L⁻¹ (aproximadamente a mesma concentração inicial de carbono presente no efluente sintético contendo a isoniazida), e concentração de [H₂O₂] = 6,9 mM, observou uma significativa redução na eficiência de remoção do COT do efluente na ausência de luz UV, uma vez que não são gerados radicais hidroxila.

4.2.1.2 Monitoramento da degradação da INH via análise espectrofotométrica UV-Vis

4.2.1.2.1 Espectro do composto puro

Antes de realizar as leituras das amostras no espectrofotômetro UV-Vis resultantes do processo de fotodegradação, foram realizados experimentos confirmatórios, para validar a metodologia inicialmente proposta.

As metodologias previstas nos compêndios oficiais de análises preconizam que a análise de identificação de substâncias com alto grau de pureza, nesse caso a isoniazida, devem apresentar absorção molecular máxima no espectro do UV-visível no comprimento de onda de 212 a 265 nm (UNITED STATES PHARMACOPEIA 33, 2010).

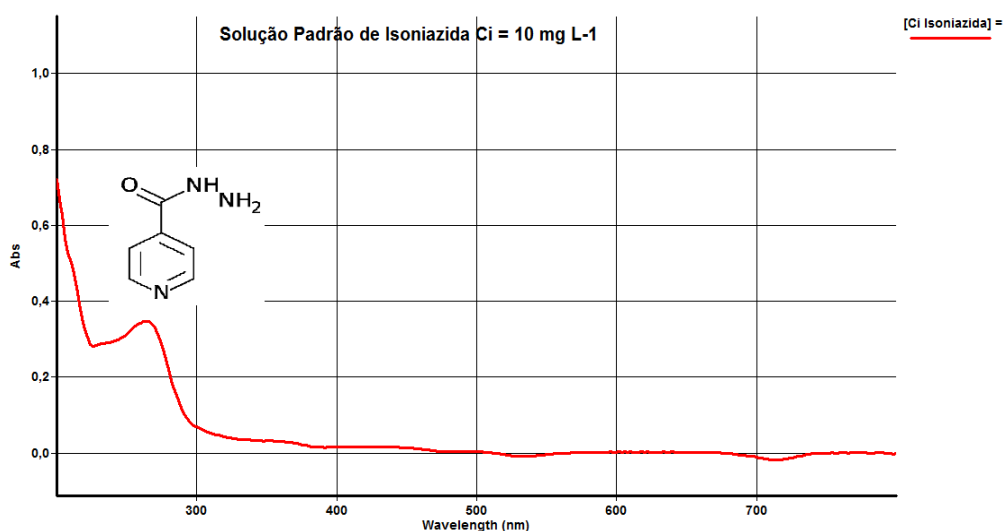


Figura 4.2.7. Perfil de absorção molecular da solução padrão da isoniazida a 10 mg L^{-1} no pH natural da solução (pH 7,3).

A Figura 4.2.7 apresenta o espectro de absorção molecular obtido para a INH no $t = 0$ na concentração inicial de 10 mg L^{-1} . Como pode ser observado, o espectro apresentou pico de absorção bem definido, exibindo máximo em 264,1 nm, estando, portanto compatível com a faixa de comprimento de onda previsto no método da UNITED STATES PHARMACOPEIA 33, 2010.

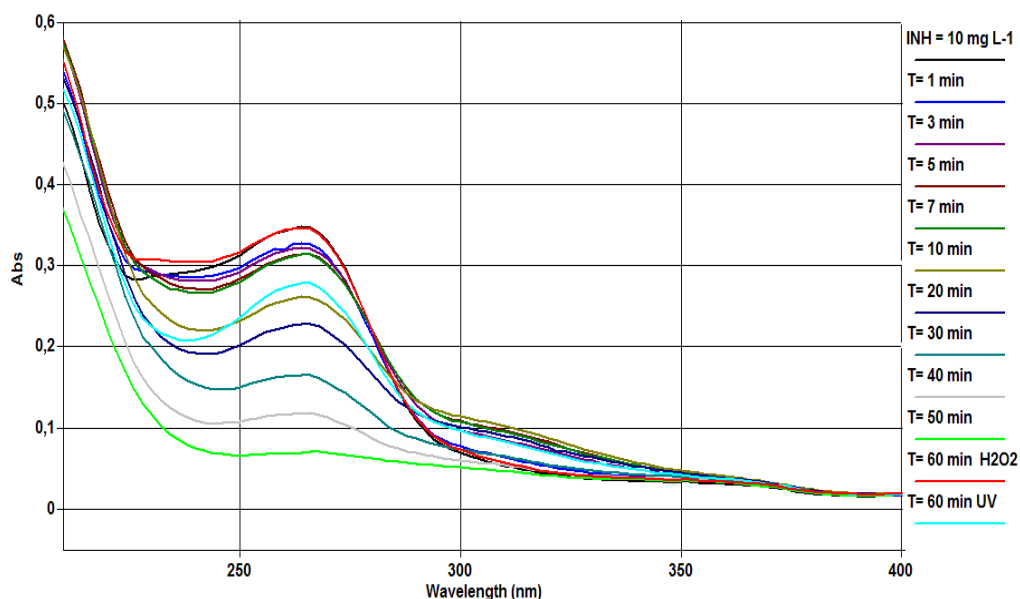


Figura 4.2.8. Espectros de varredura completa no UV-Vis para proporção molar [1C:1H₂O₂] indicando a sobreposição espectral do meio reacional.

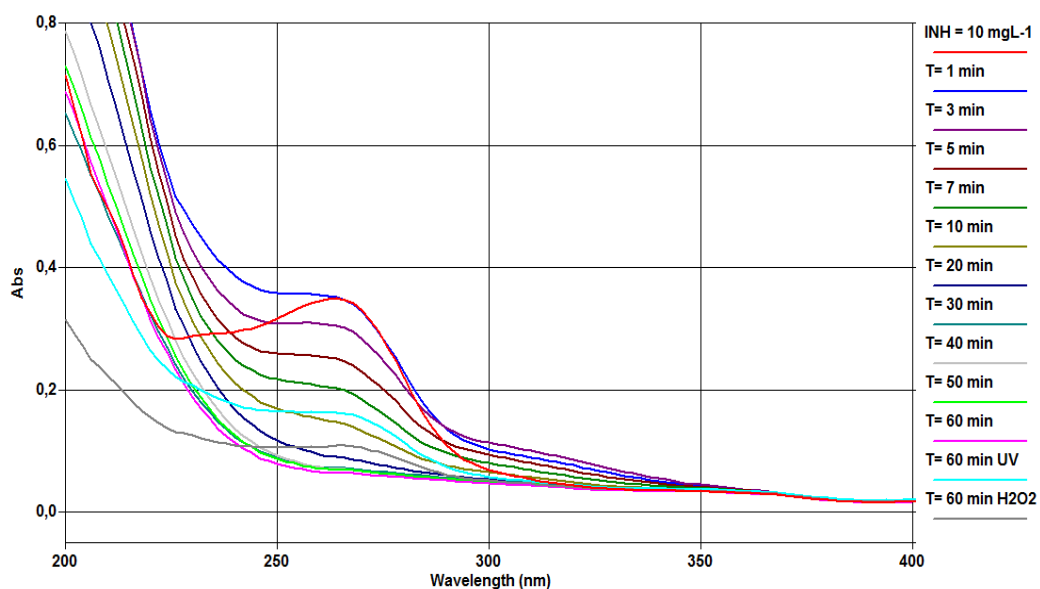


Figura 4.2.9. Espectros de varredura completa no UV-Vis para proporção molar [1C:2H₂O₂], indicando a sobreposição espectral do meio reacional.

Os espectros de absorção obtidos para ambas proporções molares Figuras 4.2.8 e 4.2.9, apresentaram ao longo do tempo reacional uma sensível diminuição da absorbância das principais bandas características do fármaco indicando que o anel piridínico parece ser rompido e conseqüentemente a perda do efeito terapêutico para o qual o fármaco foi concebido. Simultaneamente, foram observadas mudanças contínuas nas regiões entre 590,9 a

669,0 nm acusando uma discreta absorção variando de 0,004 a 0,006, e também nas regiões de 600,0 a 622,1 nm com absorção de 0,004 a 0,007, confirmando que concomitante a degradação do fármaco, ocorreu a formação de outros compostos.

É importante registrar que a absorção do H_2O_2 ocorre no comprimento de onda de 220 nm. Entretanto, não foi observada nenhuma banda de absorção nesse comprimento de onda, o que nos permite concluir que o H_2O_2 foi totalmente convertido em radicais HO^\bullet , mediante a Equação 21.



Outro dado relevante observado nos espectros obtidos para a proporção molar [1C:2 H_2O_2] Figura 4.2.9, foi o surgimento logo no primeiro minuto de reação de uma banda de absorção superior a banda de absorção da solução padrão de isoniazida 10 mg L^{-1} , caracterizando a formação de intermediários no comprimento de onda próximo ao do fármaco em análise, confirmando a hipótese experimental inicialmente postulada.

Favila *et al.*, (2007) determinaram o espectro UV-Vis da isoniazida e de seus principais produtos de degradação. Segundo os autores não foram observadas diferenças significativas entre os espectros da isoniazida, isonicotinamida e do ácido isonicotínico sendo possível argumentar que esses compostos apresentam absorção máxima próximo do comprimento de onda característico da isoniazida.

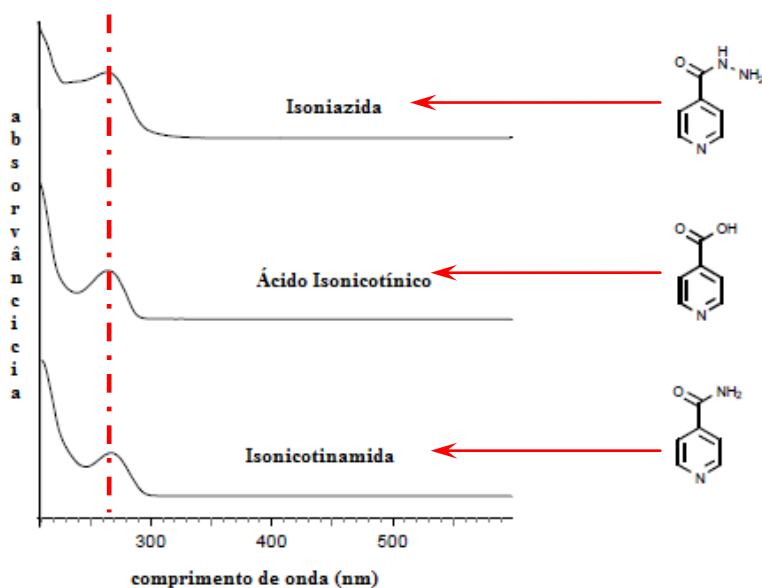


Figura 4.2.10. Espectros de absorção na região do UV-Vis da isoniazida, ácido isonicotínico e isonicotinamida obtidos pelo DAD durante as análises cromatográficas (pH 6,8). Fonte: Adaptado de Wollinger *et al.*, 2008.

Wollinger *et al.*, (2008) caracterizaram os perfis dos espectros de absorção na região do UV-Vis para a isoniazida, ácido isonicotínico e isonicotinamida Figura 4.2.10. Os resultados confirmam efetivamente que as bandas de absorção com o comprimento de onda próximo da isoniazida obtidos nos experimentos de fotodegradação, pertencem de fato a esses produtos de degradação.

Outro aspecto importante que chama a atenção diz respeito à diminuição mais acentuada da intensidade das bandas de absorção características da isoniazida, para proporção molar [1C:2H₂O₂] Figura 4.2.9 do que para proporção molar [1C:1H₂O₂] Figura 4.2.8, o qual pode ser facilmente confirmada tendo em vista os elevados percentuais de mineralização alcançados logo nos primeiros minutos de reação e se mantendo até 10 minutos Figura 4.2.11, até que passa se observar a formação de compostos intermediários que consomem os radicais HO[•] retardando a velocidade da reação.

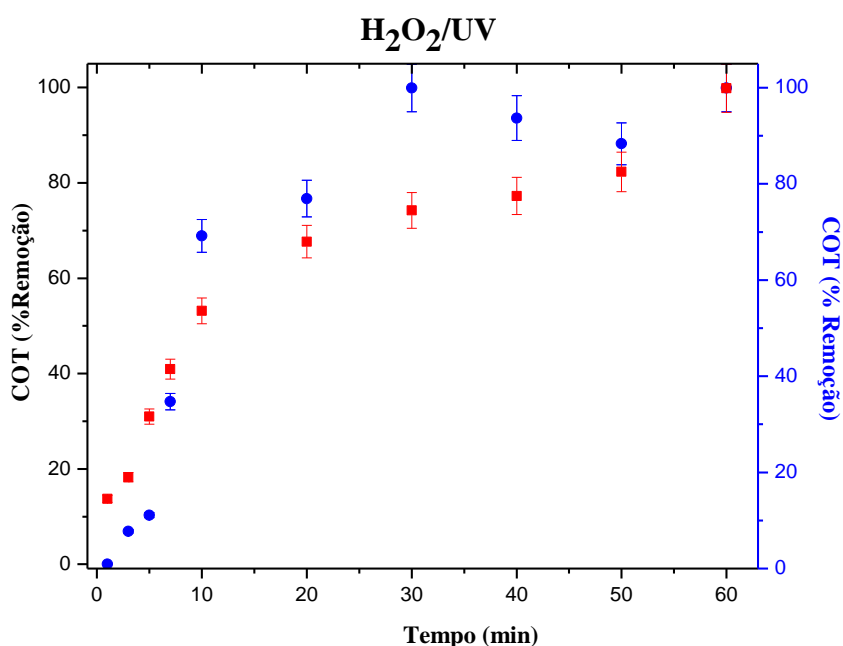


Figura 4.2.11. %Remoção de COT em função do tempo. (●) Mineralização do fármaco para proporção molar [1C:1H₂O₂]; (■) Mineralização do fármaco para proporção molar [1C:2H₂O₂].

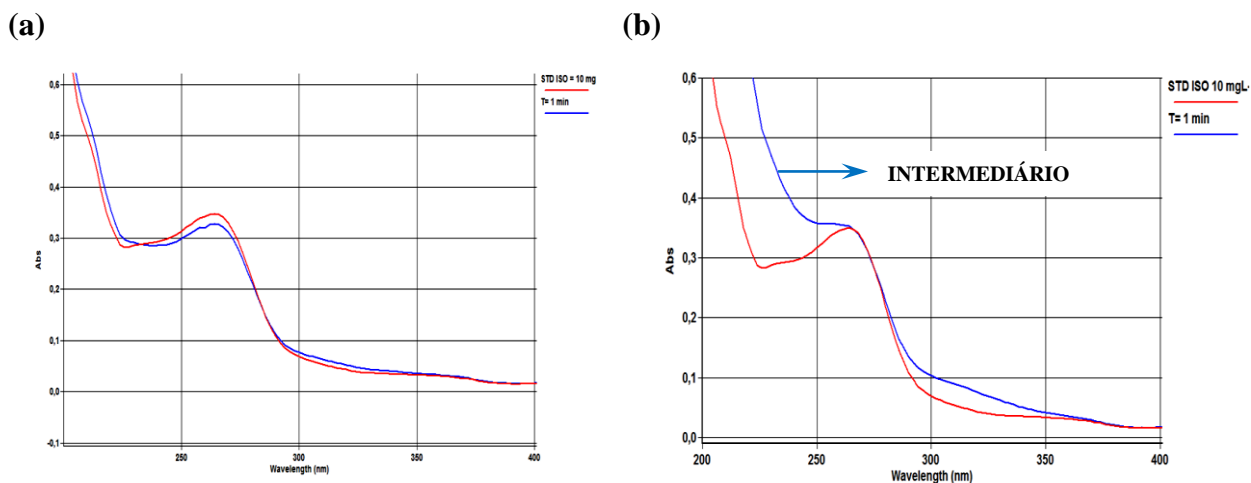


Figura 4.2.12. Espectros de varredura no UV-Vis. (a) Alíquota retirada no TRH de 1 min na proporção molar [1C:1H₂O₂]; (b) Alíquota retirada no TRH de 1 min na proporção molar [1C:2H₂O₂].

A análise de tais resultados permite supor um aumento da ocorrência de compostos intermediários, o qual foi confirmado com o aparecimento de uma banda de absorção superior a banda característica da solução padrão de isoniazida logo no primeiro minuto de reação Figura 4.2.12 (b), retardando a degradação do fármaco alvo, em função da possibilidade destes atuarem como seqüestradores de radicais HO[•]. Com relação à proporção molar [1C:1H₂O₂], foi observado o mesmo comportamento, após o tempo reacional de 30 minutos quando foi observado uma ligeira queda na taxa de conversão, em função da redução dos radicais HO[•], em função destes terem sido seqüestrados pelos compostos intermediários formados.

Por fim, é importante ressaltar que embora a espectrofotometria de absorção molecular no UV-Vis seja amplamente utilizada na indústria farmacêutica por ser tratar de um método farmacopéico para determinação do teor de princípio ativo, podendo também ser empregada em testes de dissolução e no monitoramento da cinética de degradação em formas farmacêuticas, para consecução desses experimentos esse recurso analítico foi meramente qualitativo.

Segundo Crews *et al.*, (1998) a espectrometria de absorção no UV-Vis embora não seja uma ferramenta de identificação por excelência, permitiu um rápido reconhecimento de pequenas diferenças estruturais na molécula original da substância, comprovando efetivamente a potencialidade e importância desta técnica analítica para monitoramento do comportamento do fármaco em ensaios de fotodegradação utilizando os POA como tecnologia terciária de tratamento.

4.2.1.3 Investigação da concentração de NH_3 formada no meio reacional

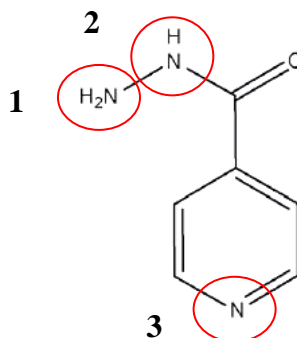


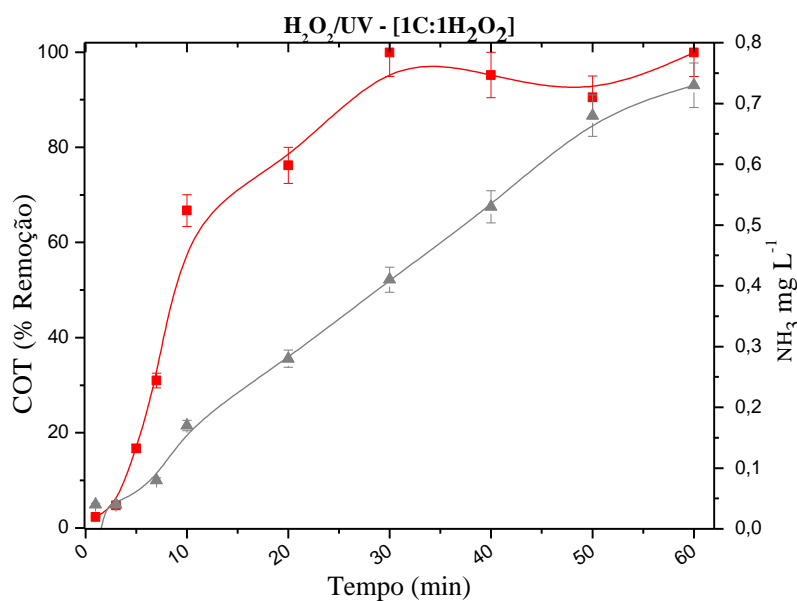
Figura 4.2.13 Fórmula estrutural da isoniazida destacando os átomos de nitrogênio.

Os princípios ativos e excipientes farmacêuticos possuem na sua grande maioria átomos de nitrogênio em sua fórmula estrutural, que em função da degradação, esses compostos podem ser facilmente convertidos a amônia, aumentando a sua concentração no efluente final.

Sobre a investigação da concentração de amônia possivelmente gerada durante a reação de fotodegradação via processo $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$, para este trabalho foi proposto o monitoramento contínuo sendo os efluentes amostrados em todos os TRH, face a molécula da isoniazida apresentar em sua estrutura química 3 átomos de nitrogênio, sendo um desses pertencente a função amina (Figura 4.2.13).

Nesse sentido, a amônia é considerada um parâmetro crítico de controle em estação de tratamento de efluentes, especialmente em indústrias farmacêuticas dotadas de sistemas terciários como exemplo os POA, o qual segundo Esteves & Harremões (1998), destacam além do aspecto da toxicidade aos organismos vivos, a amônia é a principal forma de nitrogênio associada ao incremento da produtividade primária, levando à deterioração da qualidade da água dos corpos d'água.

(a)



(b)

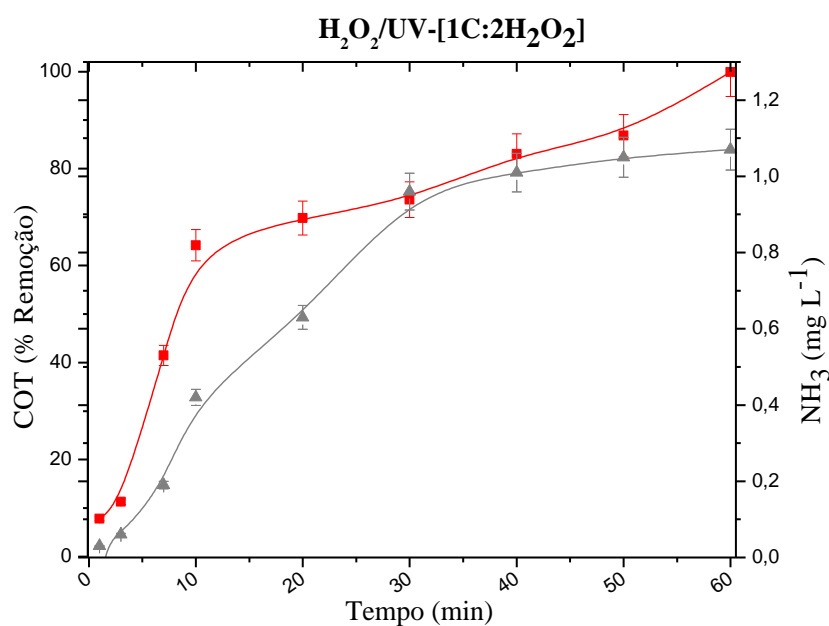


Figura 4.2.14. Formação de amônia no meio reacional. (a) Perfil de formação de amônia na proporção molar [1C:1H₂O₂] onde $[\text{NH}_3]_0 = 0,01 \text{ mg L}^{-1}$; $[\text{NH}_3]_{\text{máx}} = 0,73 \text{ mg L}^{-1}$ no $t_{\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}} = 60 \text{ min}$; (b) Perfil de formação de amônia na proporção molar [1C:2H₂O₂] onde a $[\text{NH}_3]_0 = 0,01 \text{ mg L}^{-1}$; $[\text{NH}_3]_{\text{máx}} = 1,07 \text{ mg L}^{-1}$ no $t_{\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}} = 60 \text{ min}$. (■) COT (% Remoção) (▲) NH₃ mg L⁻¹.

Com respeito às vias de degradação do nitrogênio, sabe-se que existem duas vias de degradação, uma formando o íon nitrato (NO₃⁻) e uma outra via dando origem ao íon amônio (NH₄⁺). Diante do resultado preliminar obtido com base em cálculos estequiométricos com a molécula da isoniazida, constatou-se que a possibilidade de formação do íon amônio é maior, tendo em vista que os cálculos teóricos revelaram valores de amônia no meio reacional de 2,5 mg L⁻¹ (concentração máxima possível de ser formada). Portanto, para este trabalho

foi escolhido apenas o monitoramento da rota que contribui para aumentar a concentração deste íon resultante do processo de fotodegradação.

A concentração de amônia inicial, foi determinada após o imediato preparo do efluente sintético contendo a isoniazida numa concentração de 10 mg L^{-1} . Portanto no $t = 0$ a concentração inicial de amônia obtida foi de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$.

Com base nos resultados das Figuras 4.2.14 (a) e (b), o aumento da concentração da amônia no meio reacional, esta relacionada ao tipo de ataque realizado pelo radical HO^\bullet sobre a molécula da INH, além da reduzida estabilidade bem como a facilidade de saída dos grupamentos (regiosseletividade) representado na Figura 4.2.13 pelas regiões 1 e 2 ($\text{H}_2\text{N} - \text{NH}$), por estar localizado na extremidade da molécula, sobretudo por não apresentar impedimento estérico, além de estar associado ao reduzido tamanho destes grupos.

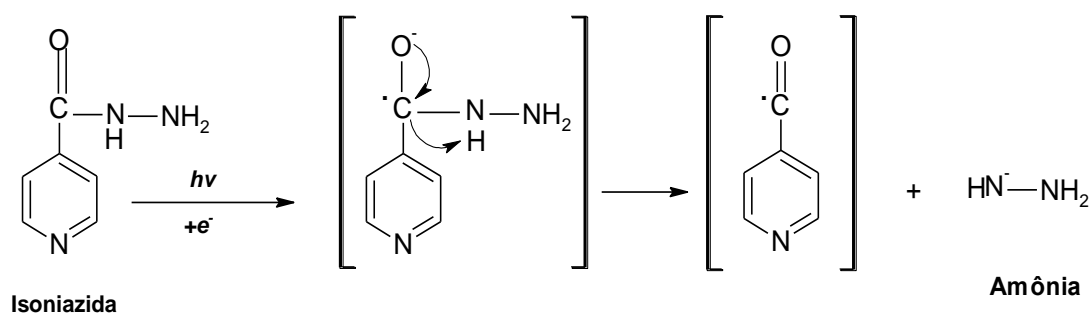


Figura 4.2.15. Mecanismo de formação da amônia no meio reacional.

Fonte: Adaptado de Bhutani *et al.*, 2007.

A Figura 4.2.15 apresenta o possível mecanismo proposto por Bhutani *et al.*, (2007), o qual destaca a formação da amônia no meio reacional, resultado da degradação da molécula de isoniazida.

Em relação à região 3 Figura 4.2.13, observa-se uma maior complexidade para saída do nitrogênio desta posição, devido a exigência da quebra de um número maior de ligações.

Rezende *et al.*, (2010) relataram mecanismos semelhantes na formação de íons cloreto e nitrato em função da degradação eletroquímica da molécula de clorofenicol em reator de fluxo. Os autores ressaltam que a facilidade de saída dos grupamentos contendo átomos de cloro e nitrogênio, ocorre em função da baixa estabilidade e devido à localização destes grupos substituintes estarem posicionados na extremidade da molécula.

Os resultados apresentados na Figura 4.2.14 (a) e (b), indicaram ainda que na proporção molar $[\text{IC}:\text{H}_2\text{O}_2]$ com o aumento do TRH os valores da concentração de amônia

aumentam de forma linear, alcançando valor máximo de $0,73 \text{ mg L}^{-1}$ no tempo 60 min; e na proporção molar [1C:2H₂O₂], observa-se o mesmo comportamento, entretanto a concentração final é quase 2 vezes superior ($1,07 \text{ mg L}^{-1}$). Este comportamento é um forte indicativo da formação de um número maior de produtos intermediários de degradação contendo átomos de nitrogênio, induzida pela maior quantidade de radicais HO[•], presentes no meio reacional, favorecendo o ataque em posições onde os átomos de nitrogênio estão presentes aumentando a concentração da amônia no meio reacional.

Tabela 4.2.1. Concentração de amônia formada no meio reacional nos ensaios controles

Tempo (min)	[1C:1H ₂ O ₂]	[1C:2H ₂ O ₂]
	NH ₃ mg L ⁻¹	NH ₃ mg L ⁻¹
60 (H ₂ O ₂)	0,02	0,02
60 (UV)	0,13	

Para os ensaios controles, foram observados baixas concentrações de amônia no meio reacional, conforme pode ser visto na Tabela 4.2.1. Esses resultados sugerem que em virtude da ausência dos radicais HO[•], a molécula de isoniazida não sofre alterações significativas quando submetida apenas a radiação UV, bem como apenas ao H₂O₂ a 30% v/v. Portanto, não se observa formação de amônia, sendo assim, de acordo com os dados obtidos para os ensaios controles, pode-se inferir mais uma vez que o processo H₂O₂/UV foi validado nas condições em que se desenvolveram os experimentos.

4.2.1.4 Determinação da concentração residual de INH via CLAE-EM

Os cromatogramas obtidos por CLAE-EM, em ambas as proporções molares, para todos os TRH monitorados, estão apresentados no Anexo A e B. Para a proporção molar [1C:1H₂O₂] foi observado que a intensidade do pico relativo a isoniazida ($t_R = 2,9 \text{ min}$) diminui gradualmente com o transcorrer da reação, indicando o consumo contínuo do fármaco, até a sua total degradação, conforme Anexo A.

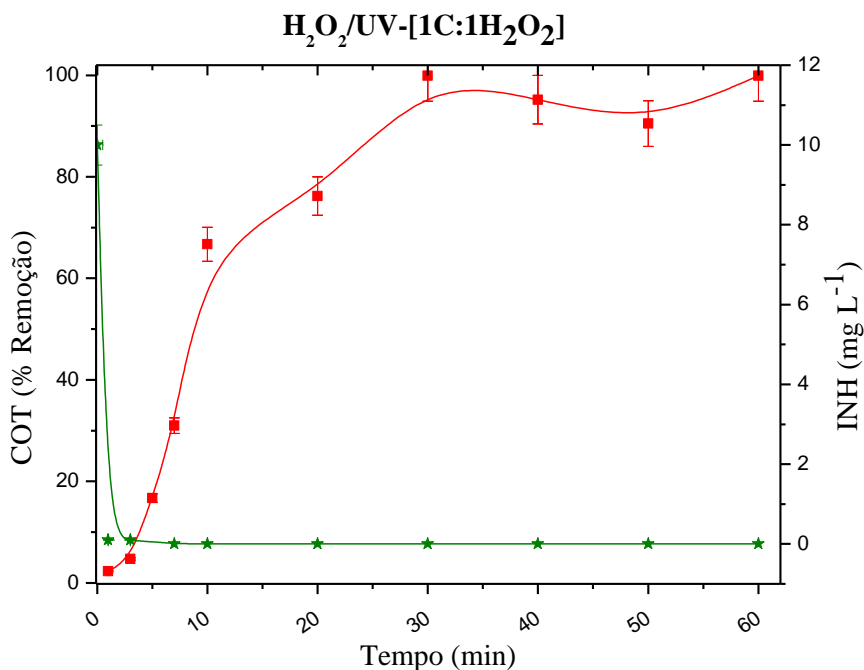


Figura 4.2.16. Concentração de isoniazida efetivamente degradada calculada a partir do CLAE-EM, para proporção molar [1C:1H₂O₂]. (■) COT (% Remoção) (★) INH mg L⁻¹.

De acordo com a Figura 4.2.16 pode-se concluir que após o tempo reacional de 5 minutos 100% da isoniazida havia se degradado, entretanto com uma taxa de mineralização de apenas 16,7%, reforçando a tese inicialmente apresentada da formação de produtos intermediários, e por isso não é conveniente inferir a respeito da completa mineralização do fármaco. Somente no tempo de 30 minutos, é que foi observado 100% de taxa de mineralização. A divergência entre estes resultados parece estar associado à formação de produtos de intermediários (Anexos C, D, E, F, G, H) que serão detalhadamente reportados no item 4.2.1.5.

Em relação aos ensaios controles, os resultados obtidos estão em perfeito acordo, o qual a aplicação isolada do UV e H₂O₂ não apresentaram resultados expressivos, registrando valores respectivamente de 4,0 mg L⁻¹ i.e apenas 60% de degradação e 10 mg L⁻¹ ou seja, nenhuma conversão de isoniazida foi observada utilizando apenas H₂O₂ a 30% v/v, sendo possível concluir que o processo mais uma vez foi validado.

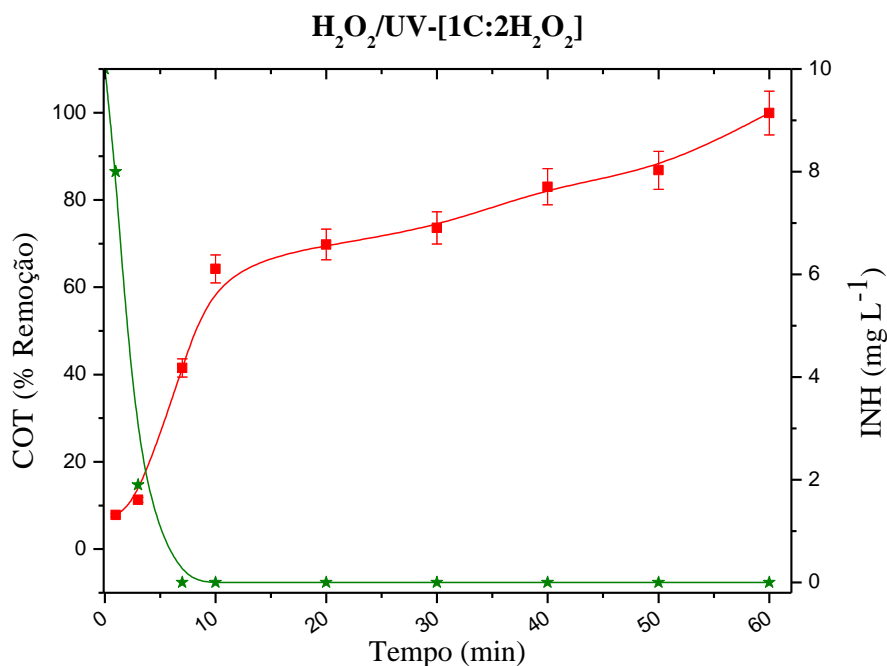


Figura 4.2.17. Concentração de isoniazida efetivamente degradada calculada a partir do CLAE-EM, para proporção molar [1C:2H₂O₂]. (■) COT (% Remoção) (★) INH mg L⁻¹.

A Figura 4.2.17 apresenta o gráfico da concentração degradada do fármaco versus consumo de substrato (%COT) em função do tempo reacional. O sistema mostrou ser altamente eficiente na degradação do fármaco em estudo, alcançando 100% de taxa de degradação após 5 minutos de reação.

Os resultados obtidos para os ensaios controles, estão em consonância com Bhutani *et al.*, (2007) os quais relataram que a isoniazida quando exposta apenas a irradiação UV não sofre degradação extensiva, alcançando apenas 60% de taxa de degradação. Em relação ao ensaio isolado com adição de H₂O₂ foi obtido apenas 53% de taxa de conversão.

Em relação aos demais cromatogramas, foram observados picos com o tempo de retenção próximo ao da isoniazida, e em alguns cromatogramas foram também observados um aumento da intensidade do sinal, podendo indicar a formação de produtos de degradação com maior absorção e no mesmo comprimento de onda da isoniazida, ora o consumo destes produtos pelos radicais HO[•] dando origem a outros compostos com características similares a isoniazida.

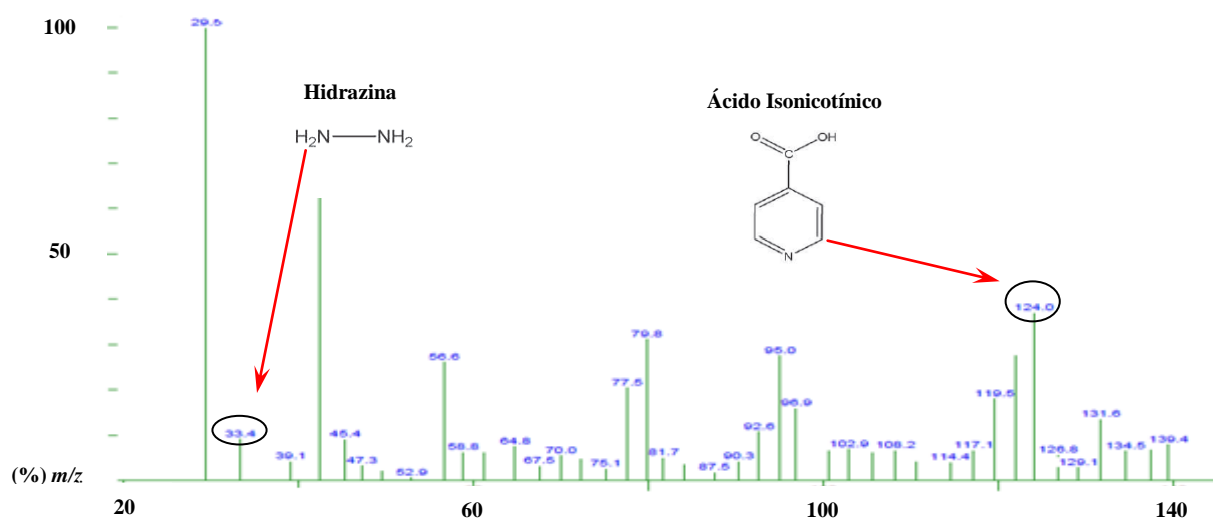
4.2.1.5 Identificação e monitoramento dos compostos intermediários da isoniazida via CLAE-EM

Outra série de análises foram realizadas incluindo a cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massa (CLAE-EM), para monitorar não apenas a degradação da isoniazida, mas também a formação e caracterização dos compostos intermediários formados ao longo dos tempos reacionais.

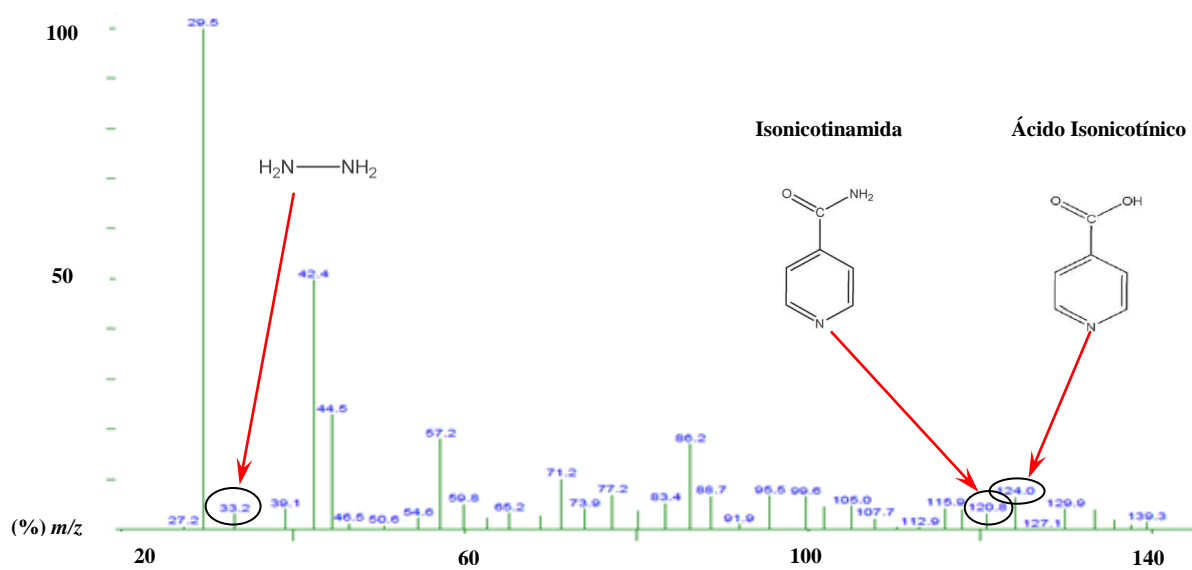
A fotodegradação da isoniazida após a exposição ao processo H_2O_2/UV ocorreu de forma bastante extensiva, conforme pode ser observado nos espectros de massa no modo de varredura completa obtidos via infusão direta. Os compostos intermediários formados estão apresentados conforme indicados nas Figuras 4.2.18 (a), (b), (c), (d) e (e) identificados como hidrazina (m/z 32,05); ácido isonicotínico (m/z 123,11); isonicotinamida (m/z 122,12); ácido isonicotínico etilideno hidrazida (m/z 163,18); ácido isonicotínico N'- (piridil-4-carbonil)-hidrazida (m/z 242,23); ácido isonicotínico piridino-4-ilmetileno-hidrazida (m/z 226,23), os quais passaremos a discutir sobre os seus possíveis mecanismos cinéticos de formação.

É importante destacar que para efeito do estudo de caracterização dos compostos intermediários, foi considerado apenas os espectros obtidos no tempo reacional de 7 minutos, para ambas as proporções molares, em virtude da total degradação do fármaco observada após 5 minutos de reação.

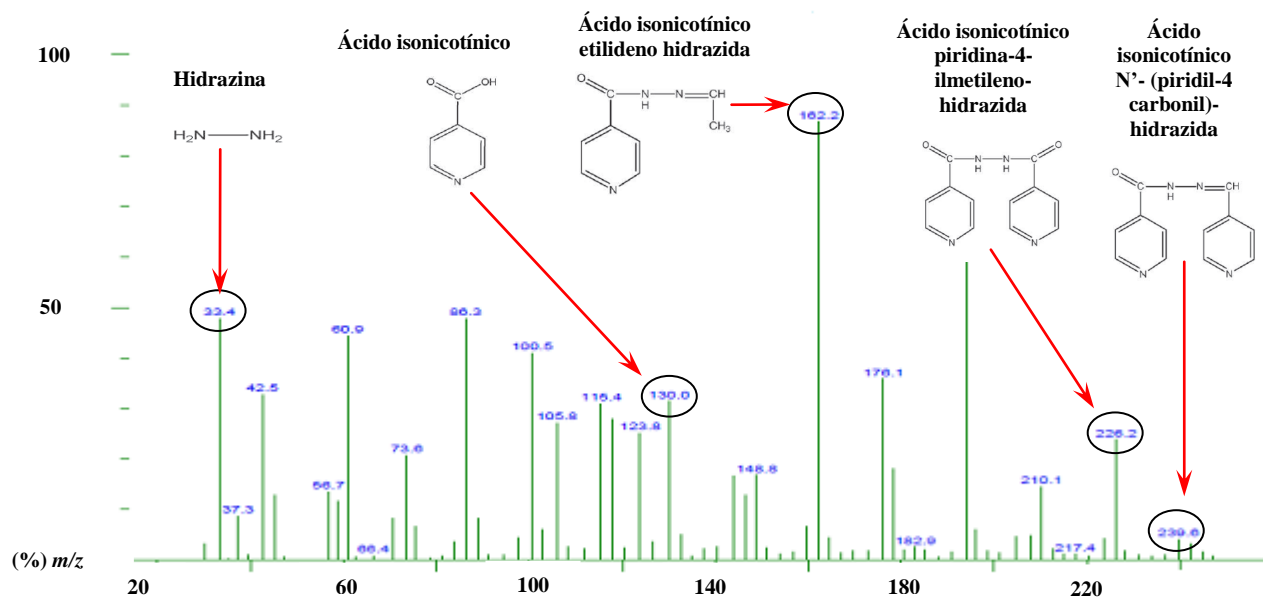
(a)



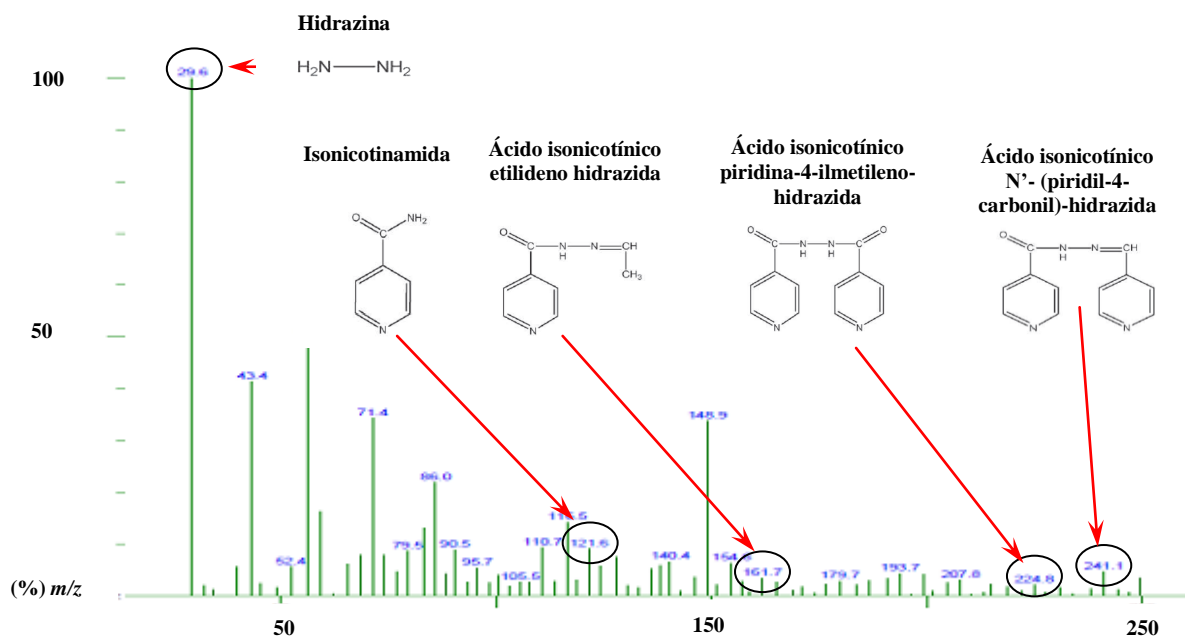
(b)



(c)



(d)



(e)

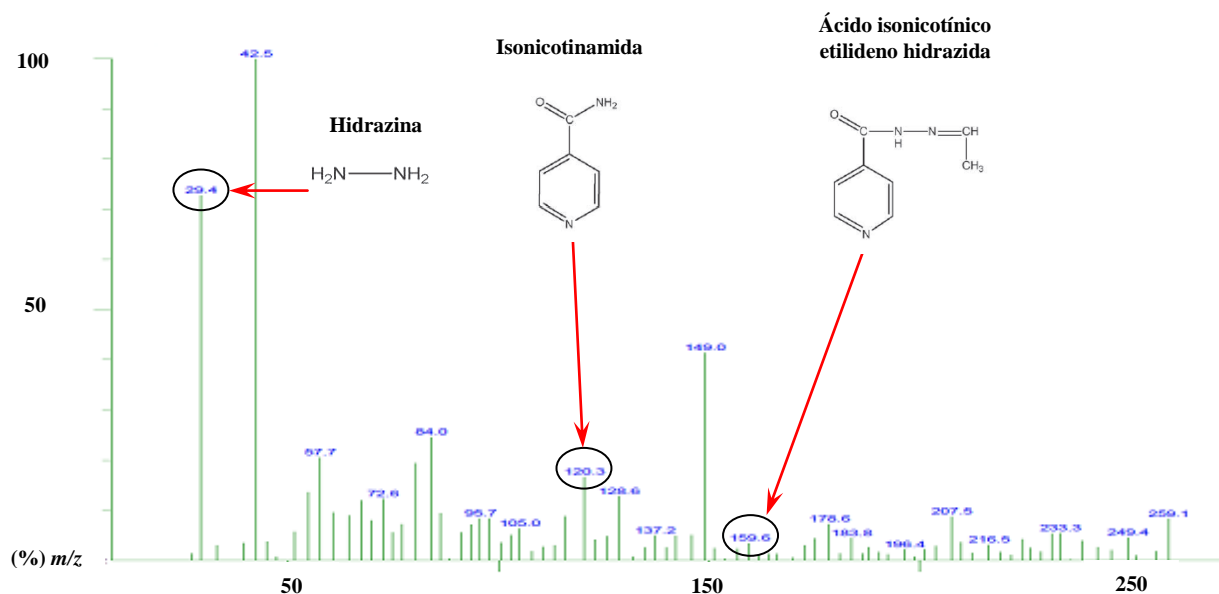
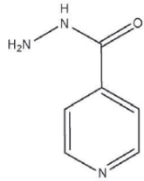
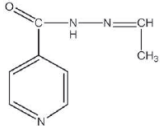
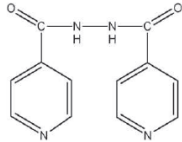
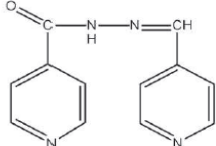


Figura 4.2.18. Espectros de varredura obtidos via sistema CLAE-EM por infusão direta. (a) Alíquota retirada após $t = 7$ min de reação [1C:1H₂O₂]; (b) Alíquota retirada após $t = 7$ min de reação [1C:2H₂O₂]; (c) Alíquota retirada após $t = 50$ min de reação [1C:2H₂O₂]; (d) Alíquota retirada após $t = 60$ min de reação [1C:1H₂O₂]; (e) Alíquota retirada após $t = 60$ min de reação [1C:2H₂O₂].

Tabela 4.2.2. Compostos intermediários formados no decorrer dos ensaios com o processo H₂O₂/UV

Fármaco Original	Tempo de Retenção min (t_R)	Massa Molar (m/z)	Estrutura Química	Nome do Composto	Referência
	ND	32,05	<chem>NN</chem>	Hidrazina	
	2,84	122,12	<chem>NC(=O)c1cccnc1</chem>	Isonicotinamida	
	2,90	123,11	<chem>OC(=O)c1cccnc1</chem>	Ácido isonicotínico	Bhutani, <i>et al.</i> , 2007.

Isoniazida				
	1,22	163,18		Ácido isonicotínico etilideno hidrazida
	ND*	226,23		Ácido isonicotínico N'-(piridil-4- carbonil)-hidrazida
	ND*	242,23		Ácido isonicotínico piridino-4-ilmetileno- hidrazida

ND* - Não Detectado

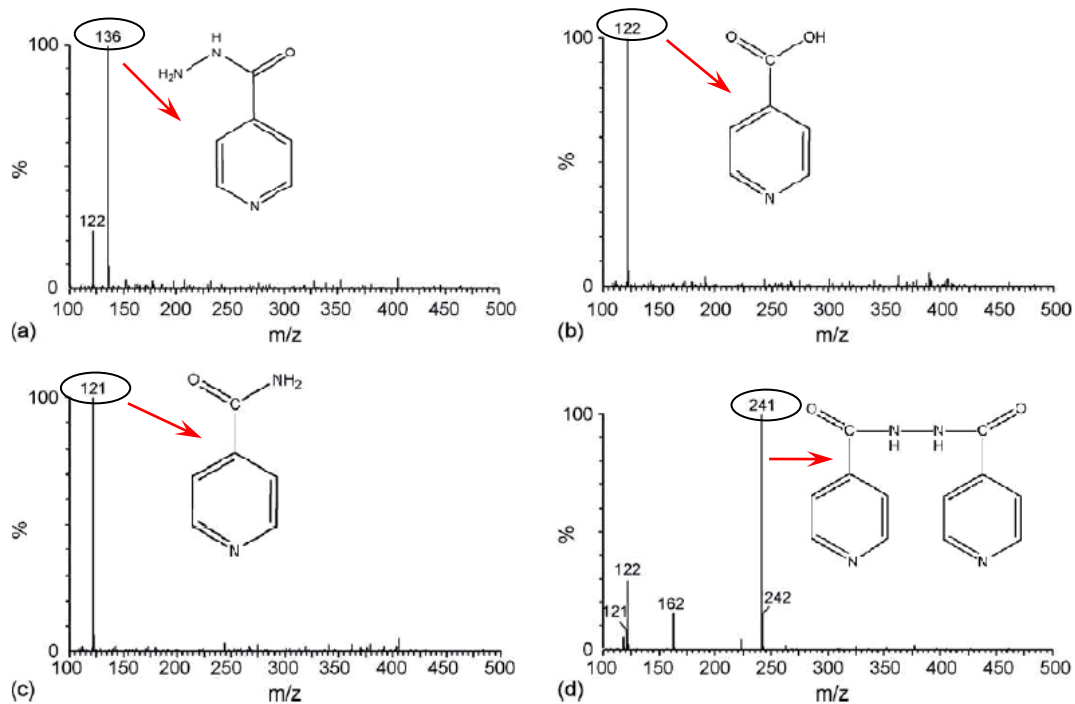


Figura.4.2.19. Espectros de massa da isoniazida e dos compostos intermediários formados. (a) Isoniazida (m/z 136); (b) Ácido isonicotínico (m/z 122); (c) Isonicotinamida (m/z 121); e (d) Ácido isonicotínico N'-(piridil-4-carbonil)-hidrazida (m/z 241).

Adaptado de Bhutani *et al.*, 2007.

Vale ressaltar que as análises de caracterização dos compostos intermediários foram realizadas num equipamento de CLAE-EM, contendo um único analisador de m/z . Com isso, não foi possível realizar experimentos de fragmentação com o intuito de confirmar os produtos formados. Entretanto, o processo H_2O_2/UV utilizado para degradar e mineralizar a isoniazida foi muito semelhante aos métodos aplicados por Bhutani *et al.*, 2007, no qual obteve pleno sucesso na identificação dos compostos intermediários formados conforme Figura 4.2.19 e Tabela 4.2.2.

Nas análises de CLAE-EM esses compostos foram monitorados e as suas respectivas cinéticas de formação/decomposição foram apresentadas nos gráficos nos itens a seguir do presente trabalho. Caso o experimento tivesse sido realizado num equipamento de CLAE-EM/EM seria possível realizar experimentos de fragmentação para confirmação dos compostos intermediários previamente relatados.

Os gráficos de cinética de formação/desaparecimento dos diferentes compostos foram traçados em função da área dos picos cromatográficos referentes aos diferentes intermediários nos diferentes tempos de retenção em que foram amostrados. Em alguns casos, é relatado que a cinética de formação/desaparecimento pode ser traçada em função da porcentagem da área de um determinado composto frente à soma das áreas de todos os compostos. Essa abordagem, entretanto foi preterida frente à primeira por dois motivos: i) para que ela funcione, é necessário conhecer todos os produtos de degradação formados; caso contrário, a formação de outro produto desconhecido pode distorcer significativamente os dados; ii) os produtos formados apresentam propriedades químicas muito distintas (alguns são ácidos, outros neutros e outros básicos), de modo que a facilidade com que ionizam são muito diferentes. Com isso, não é possível comparar a área desses compostos, desse modo considera-se que a resposta será a mesma para todos. No caso da abordagem utilizada, a resposta a partir da qual a cinética é traçada é sempre proveniente do mesmo composto, eliminando esse efeito.

Para os produtos de degradação que encontravam-se acima do Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ), as áreas foram integradas e os cromatogramas estão apresentados nos Anexos C; D; E; F; G; H. Porém como não há substância química de referência disponível comercialmente para todos os compostos intermediários formados no meio reacional, a análise se processou apenas de forma qualitativa.

4.2.1.5.1 Estudo da cinética de oxidação do ácido isonicotínico

De acordo com as Figuras 4.2.18(a) e (b), foi constatado um fragmento com íon quasimolecular (m/z) 124 apresentando uma abundância superior do que a proporção molar [1C:2H₂O₂]. Com o intuito de melhor avaliar o comportamento dos intermediários formados, foi construído um gráfico correlacionando a área normalizada de cada composto como uma função do tempo reacional. Deste modo, os resultados indicaram que o ácido isonicotínico é formado logo nos primeiros minutos de reação quase que na mesma concentração da proporção molar [1C:2H₂O₂] (Figura 4.2.20).

Estes resultados sugerem que a isoniazida é altamente susceptível ao ataque dos radicais OH[•] se decompondo muito rapidamente. Entretanto para a proporção [1C:1H₂O₂], observa-se que a degradação deste composto ocorre de forma mais lenta, tendo em vista uma menor concentração de radicais OH[•] no meio reacional, e a sua total eliminação somente foi alcançada no tempo reacional de 10 minutos.

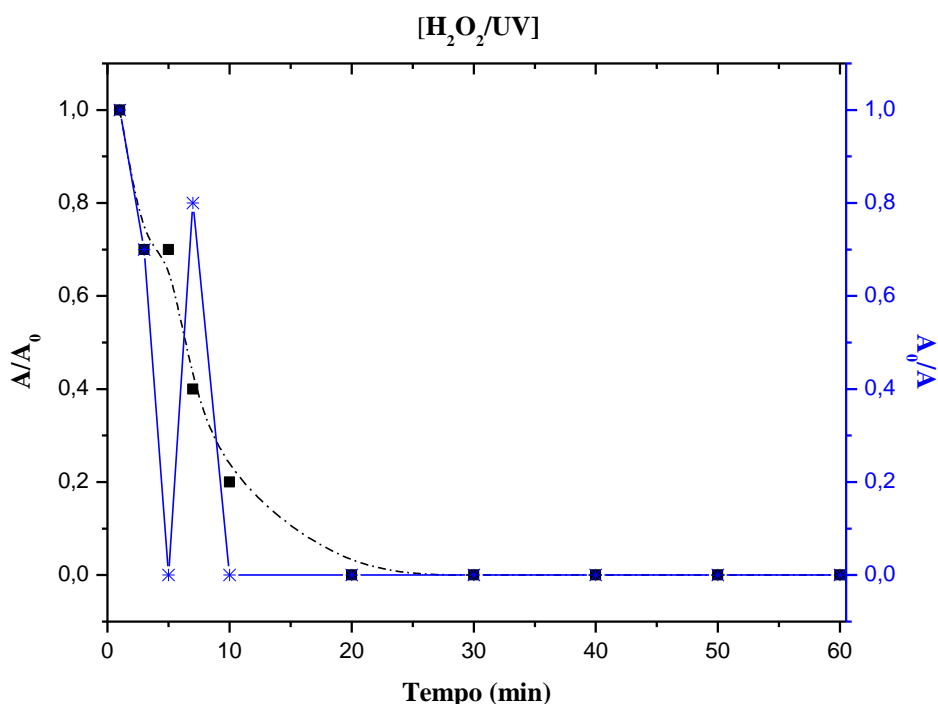


Figura 4.2.20. Comportamento cinético do ácido isonicotínico (m/z) 124 em função do tempo de exposição ao processo H₂O₂/UV. (■) Ácido isonicotínico [1C:1H₂O₂]; (✱) Ácido isonicotínico [1C:2H₂O₂].

Para a proporção molar [1C:2H₂O₂], observa-se um perfil completamente distinto, o qual o composto intermediário é rapidamente consumido pelos radicais OH[•] (Figura 4.2.20). O aparecimento deste produto intermediário parece estar associado a um outro composto com

características e massa molecular semelhante ao do ácido isonicotínico. Entretanto, para caracterizar precisamente este composto, seria necessário a análise na CLAE-EM/EM, todavia, não houve recursos para sua realização.

No que se refere à toxicidade, mesmo não tendo sido realizado tais análises, de acordo com os dados bibliográficos já apresentados anteriormente indicam que este produto intermediário apresenta certo grau de toxicidade, sendo possível inferir que a presença desse composto no meio ambiente oferece potenciais riscos.

4.2.1.5.2 Estudo da cinética de oxidação da isonicotinamida

Os dados obtidos para o monitoramento desse composto encontram-se de acordo com os resultados apresentados no espectro de massa da Figura 4.2.18(a), o qual não acusou a presença desse íon na proporção molar [1C:1H₂O₂]. Tais resultados indicam que em função da baixa concentração de radicais OH[•], o ataque sobre a molécula da isoniazida ocorre de forma menos intensiva, resultando na formação de intermediários em pequena proporção.

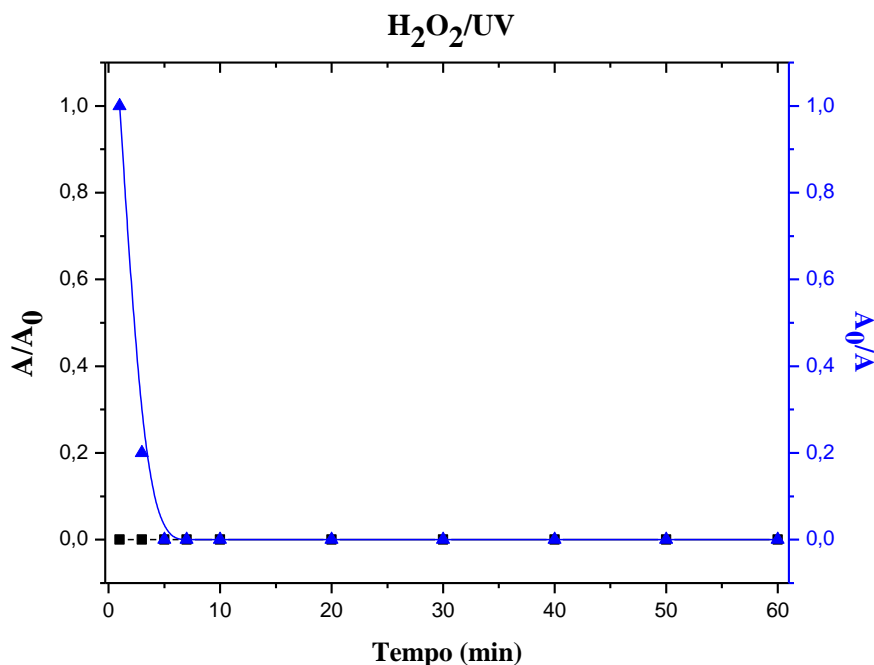


Figura 4.2.21. Comportamento cinético da isonicotinamida (m/z) 120,8 em função do tempo de exposição ao processo H₂O₂/UV. (■) Isonicotinamida [1C:1H₂O₂]; (▲) Isonicotinamida [1C:2H₂O₂].

Em referência a proporção molar [1C:2H₂O₂], Figura 4.2.18(b), foi possível observar nitidamente a presença do fragmento caracterizado pelo íon quasimolecular (m/z) 120,8. Diante da análise gráfica (Figura 4.2.21), pode-se afirmar que logo no início da reação

observa-se a formação de uma pequena concentração desse composto, mais que é imediatamente degradado nos primeiros minutos de reação, indicando ser este produto menos resistente ao ataque do radical $\text{OH}\cdot$.

4.2.1.5.3 Estudo da cinética de oxidação do ácido isonicotínico etilideno hidrazida

Para os compostos intermediários em referência, os resultados dos espectros de massa Figuras 4.2.18 (a) e (b) não detectaram a sua presença no meio reacional, provavelmente por estar abaixo dos limites de detecção do sistema de CLAE-EM. Entretanto, nos tempos reacionais de 50 min Figura 4.2.18 (c); (d) e (e), foram observados fragmentos com uma discreta abundância.

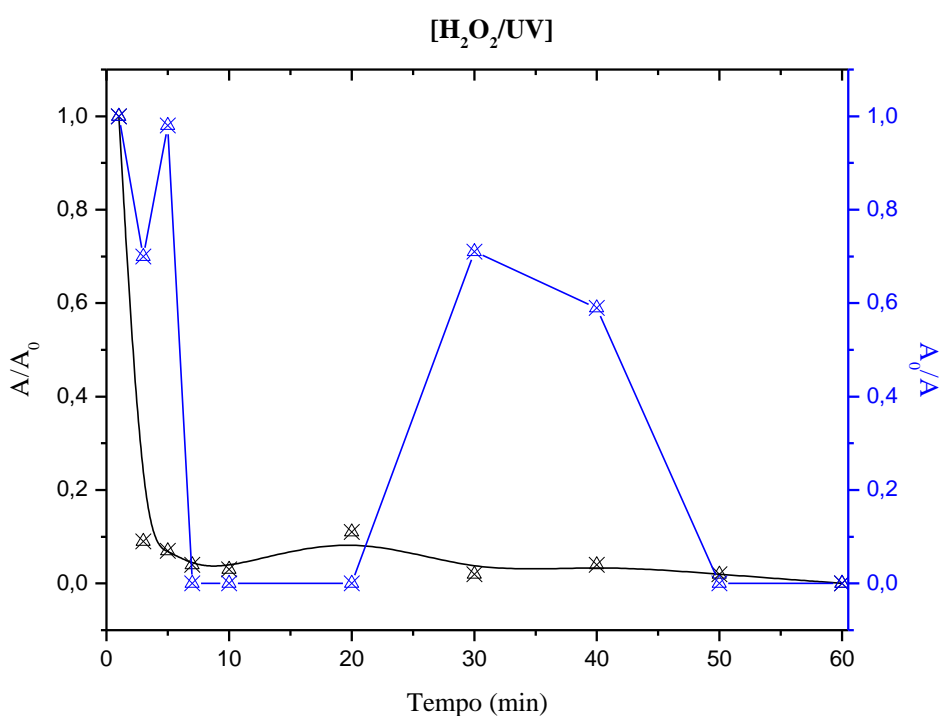


Figura 4.2.22. Comportamento cinético do ácido isonicotínico etilideno hidrazida (m/z) 162,2 em função do tempo de exposição ao processo $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$. (x) Ácido Isonicotínico Etilideno Hidrazida [1C:1H₂O₂]; (x) Ácido Isonicotínico Etilideno Hidrazida [1C:2H₂O₂].

De acordo com a Figura 4.2.22 nota-se um comportamento similar aos mecanimos anteriormente discutido. Todavia, é digno ressaltar que esse intermediário apresenta uma estrutura molecular mais complexa caracterizado pela presença de radicais com maior reatividade, indicando possíveis diferentes caminhos de reação, dando origem continuamente

a outros compostos, com características semelhantes a este intermediário. Por isso, justifica-se um maior tempo de reação para se atingir o estado estacionário sendo observado somente no tempo reacional de 50 minutos quando foi alcançada a sua total eliminação.

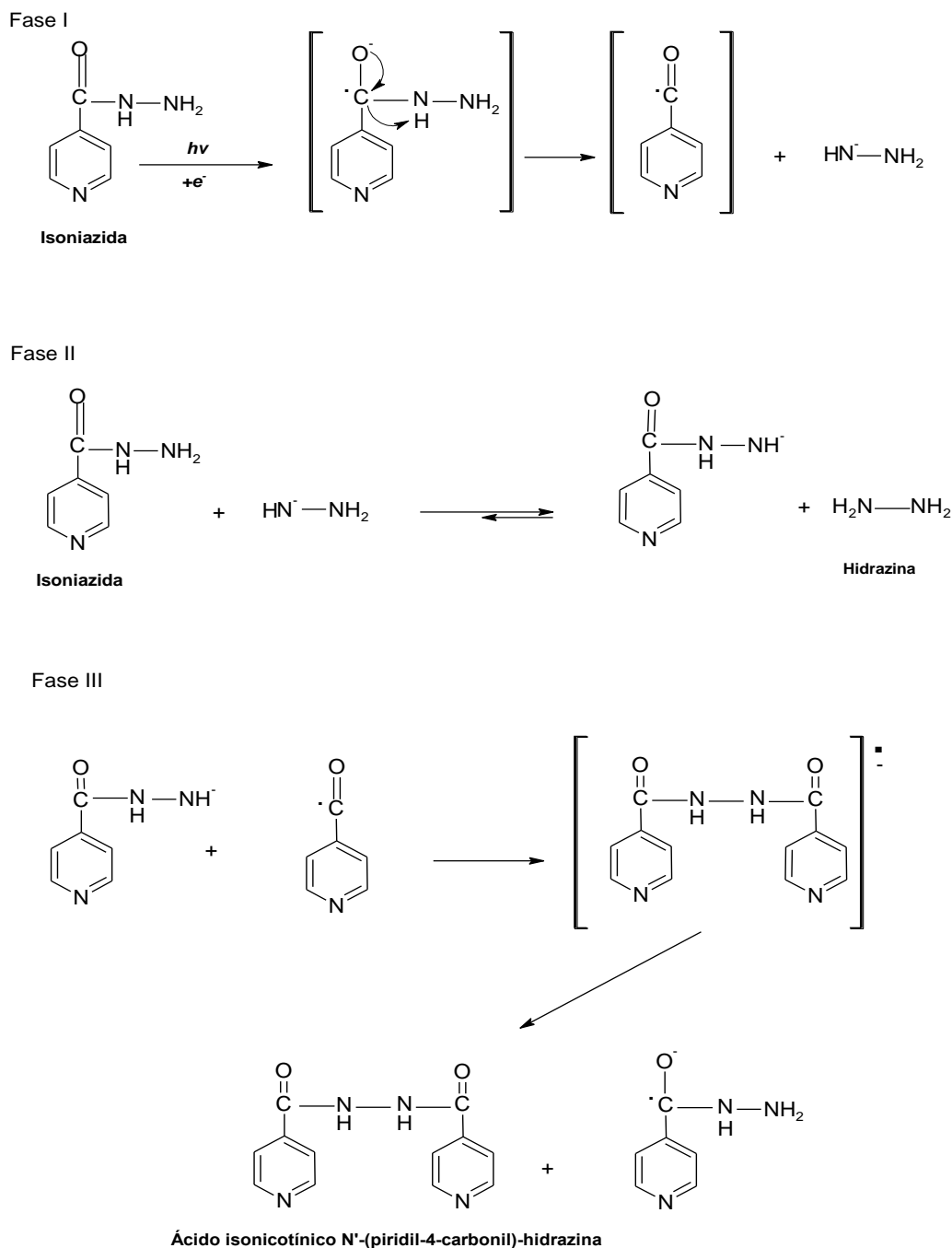


Figura. 4.2.23. Mecanismo de formação dos produtos de degradação da INH.
Fonte: Adaptado de Bhutani *et al.*, 2007.

Em relação aos demais fragmentos contidos nos espectros de massa Figuras 4.2.18 (a); (b); (c); (d); (e) é importante destacar a presença da hidrazina em ambas as proporções molares, representado pelo íon quase molecular (m/z) 33,2, o qual é formado rapidamente, conforme mecanismo reacional apresentado por Buthani *et al.*, (2007) (Figura 4.2.23). Foi observado também a formação do ácido isonicotínico N'- (piridil-4-carbonil)-hidrazida (m/z) 241,1 e o ácido isonicotínico piridino-4-ilmetileno-hidrazida (m/z) 224,8 os quais apresentaram uma discreta abundância, e por isso não foi possível obter os seus espectros de massa. Sob o ponto de vista ambiental o composto intermediário mais preocupante é a hidrazina o qual segundo dados toxicológicos trata-se de um produto de elevada toxicidade, podendo desencadear de acordo com Sarma *et al.*, (1986) hepatite, e segundo Sax & Dang (apud TIMPERIO *et al.*, 2005) neuropatia periférica, além de efeitos hepatotóxicos, hiperglicemia e câncer.

Em face ao exposto, embora tenha se observado que esse composto forma-se numa pequena faixa de concentração, o seu monitoramento é extremamente importante sob o ponto de vista ambiental, em virtude do elevado grau de toxicidade.

O mecanismo de formação do ácido isonicotínico N'- (piridil-4-carbonil)-hidrazida esta representado na Figura 4.2.23. Ainda de acordo com as considerações mecanísticas apresentadas por Bhutani *et al.*, 2007, a formação da amônia, parece estar associada a saída do grupamento HN-NH₂.

4.2.1.6 Determinação do modelo cinético de fotodegradação da isoniazida

A cinética dos diversos reatores fotocatalíticos pode ser avaliada partindo-se de modelos consagrados na literatura, e pode ser desenvolvida conforme cada tipo de reator, dependendo das condições e características existentes tanto do substrato como dos objetivos estabelecidos para os ensaios com o substrato alvo.

Em virtude da elevada taxa de degradação e os complexos mecanismos envolvidos na reação de fotodegradação da isoniazida, não foi possível determinar a cinética de degradação pela avaliação direta da concentração residual do fármaco alvo no meio reacional. Em face ao exposto, a avaliação da cinética foi realizada por meio da medida indireta da eficiência de degradação do fármaco, expressa como percentual de remoção de carbono orgânico total (% Remoção de COT).

Neste contexto, os ensaios realizados para ambas as proporções molares de C:H₂O₂, foram avaliados quanto a atividade de fotodegradação do fármaco, buscando

determinar os valores ótimos dos parâmetros que maximizassem a degradação fotocatalítica do contaminante alvo.

4.2.1.6.1 Experimento [1C:1H₂O₂]

A partir dos dados experimentais obtidos para os ensaios desenvolvidos para essa proporção molar, foram testados vários modelos para ajustar a uma equação que descrevesse a concentração ao longo do tempo reacional no reator fotocatalítico utilizado.

O modelo que melhor representou a curva experimental é indicado por um polinômio de 4ª ordem, conforme a Figura 4.2.24.

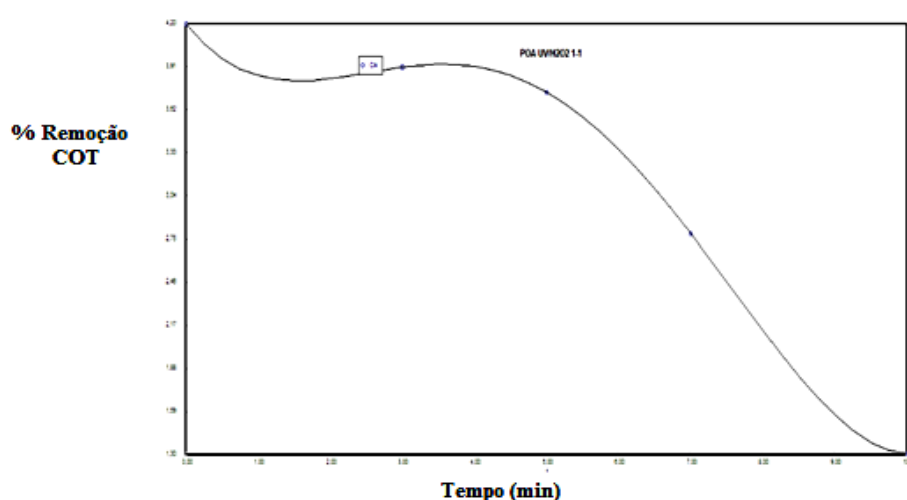


Figura 4.2.24 Representação gráfica da função polinomial de 4ª ordem para as reações de fotodegradação do fármaco na proporção molar [1C:1CH₂O₂].

Ainda com relação aos experimentos na proporção molar [1C:1H₂O₂] tem-se uma menor concentração de peróxido no meio reacional. Em decorrência desse efeito provavelmente a concentração de peróxido influencia na expressão da taxa de reação. No entanto, não foi possível mensurar de forma precisa sua concentração no meio reacional, impossibilitando a determinação correta da equação da taxa, sendo possível apenas descrever a concentração ao longo do tempo reacional, através de uma equação polinomial de 4ª ordem, conforme Equação 22:

$$c_{cot} = 4,2 - 0,608 t + 0,313t^2 - 0,056t^3 + 0,0028t^4 \quad (\text{Equação 22})$$

4.2.1.6.2 Experimento [1C:2H₂O₂]

Para determinação da cinética de reação para proporção molar [1C:2H₂O₂] foi realizada medida indireta da degradação da INH através das medidas de COT, em função da rápida degradação do fármaco no meio reacional, impossibilitando a retirada de alíquotas em intervalos de tempos menores.

Foram testadas diversas expressões de taxa do tipo homogênea, onde a taxa de reação é proporcional a velocidade específica e a concentração dos reagentes, elevados a uma ordem específica. Sendo assim, a Equação assume a seguinte forma:

$$(-r_{COT}) = k(I_{254\text{ nm}}) \cdot C_{cot}^n \cdot [H_2O_2]^a \quad (\text{Equação 23})$$

(Expressão da taxa de reação)

Onde:

($I_{254\text{ nm}}$) = Intensidade da energia luminosa e comprimento de onda da radiação UV 254 nm

$[H_2O_2]^a$ = Concentração de H₂O₂ no meio reacional

n = Ordem de reação em relação ao COT

a = Ordem de reação em relação a concentração inicial de H₂O₂

k = Velocidade específica da reação (indica a quantidade de fármaco que se degrada por unidade de tempo), calculada a partir da inclinação da reta em cada tempo da retirada da alíquota do reator fotocatalítico.

Para a proporção molar [1C:2H₂O₂] foi possível inferir as seguintes suposições:

i - Taxa de incidência da energia luminosa em excesso em relação ao COT.

ii - A concentração de H₂O₂ é aproximadamente constante (excesso) em reação ao COT.

Logo:

$$(-r_{COT}) = k' \cdot C_{COT}^n \quad (\text{Equação 24})$$

Como a reação se processou em fase líquida, pode-se aplicar a Equação 25, onde:

$$C_{COT} = C_{COT}^0 (1 - X_{cot}) \quad (\text{Equação 25})$$

O balanço no reator batelada fornece:

$$t = C_{COT}^0 \int_0^{X_{COT}} \frac{dX_{COT}}{(-r_{cot})} \quad (\text{Equação 26})$$

Foi realizado o método integral de análise e foi encontrado ordem 2 ($n = 2$) de maior correlação ($R^2 = 0,999$), indicando que este foi o melhor modelo que se adequou aos dados experimentais referentes aos ensaios realizados.

Substituindo na expressão da taxa de reação temos:

$$t = C_{COT}^0 \int_0^{X_{COT}} \frac{dX_{COT}}{k' \cdot (C_{COT}^0 (1 - X_{COT}))^2} \quad (\text{Equação 27})$$

Rearranjando a expressão, temos a Equação 28:

$$C_{COT}^0 \cdot k' \cdot t = \int_0^{X_{COT}} \frac{dX_{COT}}{1 - X_{COT}} \quad (\text{Equação 28})$$

A integração da expressão acima fornece a Equação 29

$$k' \cdot t \cdot C_{COT}^0 = \frac{X_{COT}}{1 - X_{COT}} \quad (\text{Equação 29})$$

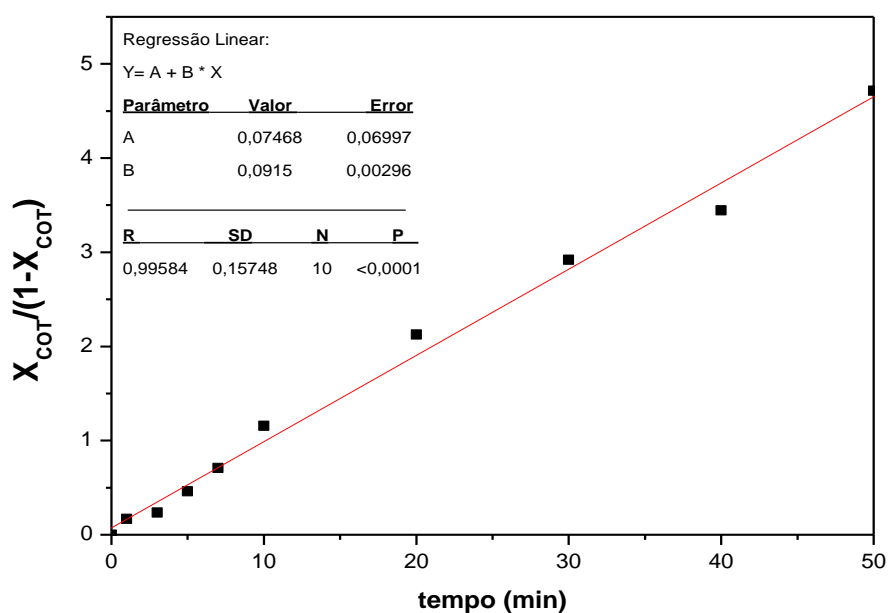


Figura 4.2.25. Regressão linear dos dados experimentais para proporção molar [1C:2H₂O₂].
 (■) $X_{COT}/(1-X_{COT})$.

A plotagem da curva $\frac{X_{COT}}{1-X_{COT}}$ versus tempo de reação nos permite determinar a velocidade específica da reação, conforme Figura 4.2.26.

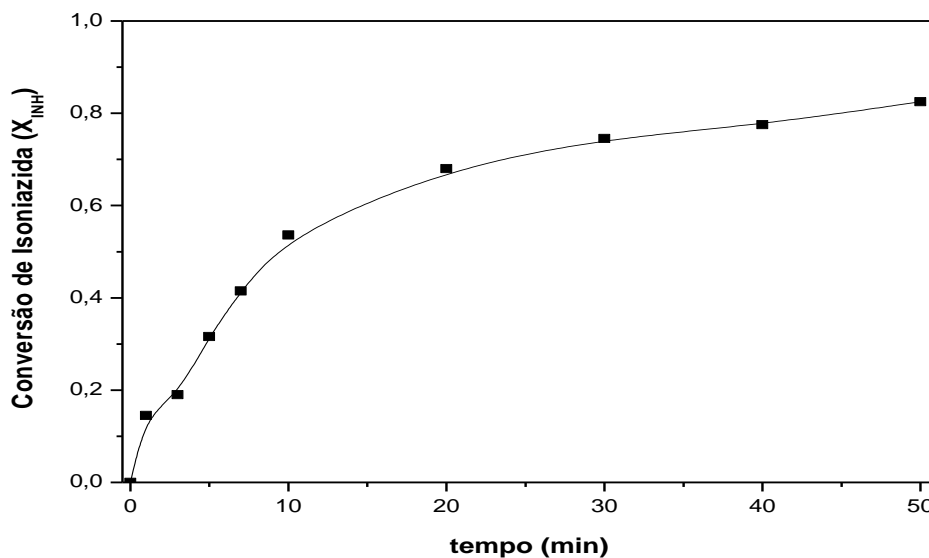


Figura 4.2.26. Taxa de degradação da isoniazida em função do tempo reacional para cálculo da velocidade específica. (■) Conversão de isoniazida (X_{INH}).

De acordo com os resultados obtidos a partir da análise gráfica realizada na Figura 4.2.25 e 4.2.26, demonstraram claramente que os pontos experimentais se adequaram de forma satisfatória ao modelo cinético proposto de ordem 2 ($n = 2$), para a reação de degradação da isoniazida. O coeficiente angular da reta conforme apresentado pela Figura 4.2.25 nos fornece $k' \cdot C_{COT}^0$. Dessa forma que a expressão da taxa desdobra-se em:

$$(-r_{COT}) = k' \cdot (C_{COT})^2 \quad (mg/L \text{ min}^{-1}) \quad (\text{Equação 30})$$

E o valor de k' é igual á:

$$(k') = 0,016 \text{ mg} \cdot L^{-1} \text{ min}$$

5 CONCLUSÃO

Diante do atual cenário e das perspectivas recentes fundamentadas nas pesquisas de identificação e quantificação dos poluentes emergentes, especialmente os resíduos de fármacos, cremos ser fundamentalmente necessário o desenvolvimento e aprimoramento de novas técnicas analíticas com o intuito de se conseguir otimizar sobretudo reduzir custos para alcançar a rápida determinação desses poluentes nas diversas matrizes ambientais, este que parece ser sem dúvida nenhuma o principal desafio do presente tema.

Em consonância com as modernas práticas de pesquisa, o presente trabalho avaliou a degradação fotocatalítica da isoniazida, via processo H_2O_2/UV utilizando o fármaco pertencente à classe terapêutica dos antibióticos, utilizado no protocolo clínico recomendado para o tratamento da tuberculose pulmonar. Diante dos resultados obtidos pôde-se concluir que:

Devido a alta polaridade do fármaco, associados ao elevado volume empregado nos procedimentos de extração adicionalmente as condições de condicionamento dos cartuchos em pH ácido (Água Milli-Q em pH 3,0), o qual parece estar associado a principal causa da degradação da isoniazida, não foi possível alcançar percentuais de recuperação satisfatórios a ponto de possibilitar a validação das metodologias empregada.

A concentração de H_2O_2 adicionado antes do start up do reator, exerceu uma influência significativa no pH inicial do meio reacional, possibilitando além da formação de produtos de degradação, alteração na taxa da reação de oxidação do fármaco (% Remoção de COT) para ambas proporções molares avaliadas. Deste modo, a constante da taxa de reação da isoniazida é fortemente dependente do pH do meio reacional.

Com referência a tecnologia utilizada para degradar a isoniazida, o processo H_2O_2/UV apresentou uma excelente performance na degradação e mineralização em meio aquoso para ambas as proporções molares. Este processo possibilitou a obtenção de taxas de degradação de 100% após o tempo reacional de 30 minutos para proporção molar de $[1C:1H_2O_2]$. No que se refere ao monitoramento da condutividade e concentração de amônia no meio reacional, os resultados indicaram que não houve alterações significativas com base nos limites determinados para lançamento de efluentes de indústria farmacêutica, de acordo com a nova Resolução CONAMA de N° 430 de 13 de maio de 2011. Apesar da formação dos produtos de degradação, os resultados obtidos na CLAE-EM comprovaram efetivamente a sua presença no meio reacional, entretanto numa menor proporção quando comparado a

proporção molar [1C:2H₂O₂], sendo totalmente degradado e mineralizado ao longo dos tempos reacionais, desaparecendo completamente.

Para proporção molar [1C:2H₂O₂], foi observado um comportamento similar dos parâmetros acima monitorados, com apenas uma diferença marcante no que diz respeito a formação dos produtos de degradação, o qual sua ocorrência foi observada numa maior proporção. Este fenômeno parece estar associado à degradação mais extensiva do fármaco, o que retardou o atingimento do estado estacionário, sendo possível observar somente no tempo de 60 minutos 100% de remoção de COT. Com referência ao estudo do comportamento cinético da reação de oxidação dos compostos intermediários formados, foram observados que mesmo após 100% de mineralização, o sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a Espectrometria de massa detectou novamente a presença de um composto, indicando possivelmente a presença de outro composto intermediário talvez com as mesmas características físico-químicas e peso molecular do intermediário inicialmente identificado e confirmado com os resultados obtidos por Bhutani *et al*, 2007.

Na determinação do modelo cinético foi observado que a degradação da isoniazida apresentou uma cinética de segunda ordem, entretanto, é necessária uma pesquisa adicional a fim de estabelecer menores intervalos de amostragem, para melhor compreender a cinética de degradação da isoniazida.

Por fim, em face aos resultados experimentais obtidos que comprovaram efetivamente toda a potencialidade deste sistema, é razoável argumentar que o processo H₂O₂/UV é eficiente para mineralizar e degradar a isoniazida, entretanto não é conveniente inferir que o processo é seguro, pois o presente trabalho não contemplou os ensaios para avaliar a toxicidade residual, bem como a atividade antibacteriana dos efluentes resultantes do processo de tratamento avaliado.

6 RECOMENDAÇÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Realizar novos ensaios para identificar um sorvente compatível com as características físico-químicas apresentados pelo fármaco.

Estabelecer intervalos menores de tempos para melhor caracterizar o modelo cinético do experimento.

Com o intuito de investigar a atividade farmacoterapêutica dos produtos de degradação formados, bem como avaliar a sua toxicidade, deverá ser realizado testes *in vitro* e

in vivo para efetivamente comprovar que os compostos formados no meio reacional não exibem nenhuma atividade farmacológica e nem tão pouco toxicidade.

Realizar testes com o efluente real, para avaliar a eficiência do processo H_2O_2/UV , frente a degradação e mineralização da isoniazida presente nos efluentes de origem farmacêutica.

Proceder análises das amostras resultantes do processo de fotodegradação, na cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa com detetor de massa, para maior exatidão na confirmação dos produtos de degradação formados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMAN, B.L.; BERNA, M.J.; MURPHY, A.T. Recent advances in use of LC/MS/MS for quantitative high-throughput bioanalytical support of drug discovery. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. v.2, n.1, p.53-66, 2002.

ADELOWO, O. O.; FAGADE, O. E.; OKE, A. J. Prevalence of co-resistance to disinfectants and clinically relevant antibiotics in bacterial isolates from three hospital laboratory wastewaters in Southwestern, Nigeria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.24 n.9 p.1993-1997, 2008

AGRAWAL, S; KAUR, K J; SINGH, I; BHADRE, S R; KAUL, C L; PANCHANGULA,R. Assessment of bioequivalence of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide in a four drug fixed dose combination with separate formulations at the same dose levels. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 233, p. 169-177, 2002.

AGUILAR, C., FERRER, I., BORRULL F, MARCÉ, R.M., BARCELÓ, D. Monitoring of pesticides in river water based on samples previously , in polymeric cartridges followed by on-line solid-phase extraction liquid chromatography diode array detection and confirmation by atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Analytical Chimica Acta* v.386 n.3. p. 237-248, 1999.

AGUILAR-ARTEAGA, K.; RODRIGUEZ, J. A.; MIRANDA, J. M.; MEDINA, J.; BARRADO, E.. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in wastewaters by magnetic matrix solid phase dispersion-HPLC. *Talanta* v.80 n.3 p. 1152-1157, 2010.

AKIYAMA, T.; SAVIN, M.C. Populations of antibiotic-resistant coliform bacteria change rapidly in a wastewater effluent dominated stream. *Science of the Total Environment*, v.408 p.6192–6201, 2010.

AKMEHMET-BALCIOGLU, I.; ÖTKER, M. Treatment of pharmaceutical wastewater containing antibiotics by O₃ and O₃/H₂O₂ processes. *Chemosphere*, v.50, p.85–95, 2003.

ALATON, A. I; DOGRUEL, S.; BAYKAL, E.; GERONE, G. Combined chemical and biological oxidation of penicillin formulation effluent. *Journal of Environmental Managemen*, v.73 p.155–163, 2004.

ALBERT, A. The affinity of isonicotinic hydrazide for metals. *Experientia*, v.9, p.370,1953.

ALENCAR, J.R.B.; BEDOR D.C.G.; MEDEIROS, F.P.M; ALENCAR, J.R.B, LITE, A.C.L., MACÊDO, R.; ALBUQUERQUE, M.M.; ROLIM NETO, P.J. Caracterização e propriedades térmicas do Ritonavir para qualidade de fornecedores. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. v.25 n.2, p.170-176, 2006.

ALFANO, O.M., BAHNEMANN, D., CASSANO, A.E., DOLLERT, R., GOSLICH, R. Photocatalysis in water environments using artificial and solar light, *Catalysis Today*, v. 58, p. 199-230, 2000.

ALLEN, JR.L.V. Compoundig, stability and beyond-use dates. Secundum Artem-Current and practical compounding information for the pharmacist, v.7, n.3, 2010. www.paddocklabs.com> Acessado em 20/06/2010.

ALLEN, JR.L.V. *The art, and technology of pharmaceutical compounding*. American Pharmaceutical Association. Washington, D. C. 2002.

ALMEIDA, G. A.; WEBER, R. R. Fármacos na Represa Billings *Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal*, v. 6, n. 2, 2005.

ALSANTE, K.; MARTIN L.; BAERTSCHI, S.W. A stress testing benchmarking study. *Pharmaceutical Technol*, v.27, n.2, p.60-72, 2003.

ALVES G.M.C.; ROLIM, L.A.; ROLIM NETO P.J.; LEITE A.C.; BRONDANI, D.J., MEDEIROS, F.P.M.; BIEBER, L.W.; MENDONÇA Jr, F.J.B. Purificação e caracterização da β -lapachona e estudo de estabilidade dos cristais em diferentes condições de armazenamento. *Química Nova*, v.31, n.2, p.413-416, 2008.

AMIRI, A. S., BOLTON, J. R., CATER, S. R., “Ferrioxalate-mediated photodegradation of organic pollutants in contaminated water”, *Water Research*, v. 31, n. 4, p. 787-798, 1997.

ANDERL, J.N.; FRANKLIN, M.J.; STEWART, P.S. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, p.3648-3663, 2000.

ANDREOZZI, R., CAPRIO, V., INSOLA, A. Advanced Oxidation Processes (AOP) for Water Purification and Recovery, *Catalysis Today*, v. 53, n. 1, pp. 51-59, 1999.

ANDREOZZI, R., CAPRIO, V., INSOLA, A.. The oxidation of metol (n-methyl-p-aminophenol) in aqueous solution by UV/H₂O₂ photolysis, *Water Research* v. 34, n. 2, p. 463-472, 2000.

ANDREOZZI, R., CAPRIO, V., MAROTTA, R. Paracetamol oxidation from aqueous solutions by means of ozonization and UV/H₂O₂ system, *Water Research*, v. 37, n. 5, p. 993-1004, 2003.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN Jr, L.V. *Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos*. 8 ed. Porto Alegre: Artmed; 2007. p. 775.

APHA, AWWA, WEF.. Standard Methods for the Examination Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington, D.C., 2005.

APPLEBY, C. A.; WITTENBERG, B. A. AND WITTENBERG, J. B. Nicotinic Acid as a Ligand Affecting Leghemoglobin Structure and Oxygen Reactivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 70 n.2, p.564-568, 1973.

ARIËNS E.J.; SIMONIS, A.M. Design of bioactive compounds. *Topics in Current Chemistry*. v.52, p.1–61, 1974.

ARIESE, F.; WILFRIED, H.O. E.; DICK, T.H.M.; SIJM, C. Natural and synthetic organic compounds in the environment a symposium report. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 10, p. 65–80, 2001.

ARSLAN-ALATON I, DOGRUEL S. Pre-treatment of penicillin formulation effluent by advanced oxidation processes. *Journal of Hazard Material*, v.12 p.105–13, 2004.

ARSLAN-ALATON, I., CAGLAYANA, E. Toxicity and biodegradability assessment of raw and ozonated procaine penicillin G formulation effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety* v.;63, p.131–40, 2006.

AUERBACH, E. A.; SEYFRIED, E. E., McMAHON, K. D. Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants. *Water Research*, v.41 n. 5, p.1143-1151, 2007.

AULTON, M.E. *Pré-formulação farmacêutica: delineamento de formas farmacêuticas*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed; 2005. p. 677.

BAEZA, C.; KNAPPE, D.R.U. Transformation kinetics of biochemically active compounds in low pressure UV Photolysis and UV/H₂O₂ advanced oxidation processes, *Water Research*, v. 5 p.39, 2011.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability indicating assay methods: critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v.28 p.1011– 1040, 2002.

BALAKRISHNAN, V.K., TERRY, K.A., TOITO, J. Determination of sulfonamide antibiotics in wastewater: a comparison of solid phase microextraction and solid phase extraction methods. *Journal of Chromatography A*, v.1131, n.1-2, p.1-10, 2006.

BALDOCK, C.; RAFFERTY, J.B.; SEDELNIKOVA, S.E.; BAKER, P.J.; STUITJE, A.R.; SLABAS, A.R.; HAWKES, T.R.; RICE, D.W. A mechanism of drug action revealed by structural studies of enoyl reductase. *Science*, v.274, p.2107-2110, 1996.

BANDARA, J., NADTOCHENKO, V., KIWI, J. "Dynamics of oxidant addition as a parameter in the modelling of dye mineralization (Orange II) via advanced oxidation technologies", *Water Science & Technology*, v. 35, n. 4, p. 87-93, 1997.

BANERJEE, A., DUBNAU, E., QUEMARD, A. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. v.63 p.227-330, 1994.

BANERJEE, A.; SUGANTINO, M.; SACCHETTINI, J.C.; JACOBS, W.R.Jr. The *mabA* gene from the *inhA* operon of *Mycobacterium tuberculosis* encodes a 3-ketoacyl reductase that fails to confer isoniazid resistance. *Microbiology*, v.144, p.2697-2704, 1998.

BAQUERO, F. M J.L, CANTÓN R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*;v.19, p.260–265, 2008

BARBENI, M.; MINERO, C.; PELIZZETTI, E.; BORGARELLO, E.; SERPONE, N.; Chemical degradation of chlorophenols with Fenton's reagent ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$) *Chemosphere*, v. 16 n.10-12 p. 2225-2237, 1987.

BARCELÓ, D. Em *Applications of LC-MS in Environmental Chemistry*, Journal of Chromatography Library; Barceló, D., ed.; Elsevier: Amsterdam, 1996, vol. 59, p. VI.

BARROSO, E. C. Ocorrência de tuberculose doença entre contatos de tuberculose sensível e multirresistente. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, São Paulo, v. 30, n. 4, 2004.

BATES, H.G.C., URI, N. Oxidation of aromatic compounds in aqueous solution by free radicals produced by photo-excited electron transfer in iron complexes. *Journal American Chemichal*, v.75, p. 2754-2759, 1953.

BATT, A.L; BRUCE, I.B; AGA, D.S. Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges. *Environmental Pollution*, v.142, p.295–302, 2006.

BAZZO, G.C.; SILVA, M.A.S. Estudo termoanalítico de comprimidos revestidos contendo Captopril através de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41 n.3 p.315-322, 2005.

BEATI, A.A.G.F.; ROCHA, R.S. Estudo da degradação de ranitidina via H_2O_2 eletrogerado/Fenton em um reator eletroquímico com eletrodos dedifusão gasosa. *Quimica Nova*, v. 32, n.1, p.125-130, 2009.

BEDSE, G., KUMAR, V., SINGH, S. Study of forced decomposition behavior of lamivudine using LC, LC–MS/TOF and MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 49, p.55-63, 2009.

BEHERA, S. K.; KIM, H. W.; OH, JEONG-EUN, PARK, HUNG-SUCK. Occurrence and removal of antibiotic, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea. *Science of the Total Environment*, v. 409, p.4351-4360, 2011.

BENDZ, D., PAXEUS, N.A., GINN, T.R., LOGE, F.J. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Hoje River in Sweden. *Journal of Hazardous Materials*, v.122, n.3, p.195-204, 2005

BENITEZ, F. J.; ACERO, J. L., REAL, F. J.; ROLDÁN, G.; CASAS, F. Comparison of different chemical oxidation treatments for the removal of selected pharmaceuticals in water matrices. *Chemical Engineering Journal*, v. 168, p. 1149–1156, 2011.

BENITEZ, F. J.; ACERO, J. L., REAL, F. J.; ROLDÁN, G. Ozonation of pharmaceutical compounds: Rate constants and elimination in various water matrices. *Chemosphere*, v.77, n.1, p.53-59, 2009.

BILA, D.M.; DEZOTTI, M. Pharmaceutical drugs in the environment, *Quimica Nova*. V. 26, p.523-530, 2003,

BISAGLIA, J. B.; SANTUSSI, W. M.; GUEDES, A. G. M.; GOMES, A. P.; OLIVEIRA, P. C.; SIQUEIRA-BATISTA, R. Atualização Terapêutica em Tuberculose: Principais Efeitos Adversos dos fármacos - Revisão de tema; *Boletim de Pneumologia Sanitária*, v.11, n.2, p. 53-59, 2003.

BLACKWELL, P.A; HOLTEN LUTZHOFT, H.C; Ma HP, HALLING-SØRENSEN, B; BOXALL, A.B.A; KAY, P. Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC-UV and fluorescence detection. *Talanta*, v.64, p.1058–1064, 2004.

BOTITSI, E., FROSYNI, C., TSIPI, D. Determination of pharmaceuticals from different therapeutic classes in wastewaters by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.387, n.4, p.1317-1327, 2007.

BOTT, R.F.; OLIVEIRA, W.P. Storage conditions for stability testing of pharmaceuticals in hot and humid regions. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.33, n.4, p.393-401, 2007.

BOUDREAU, S.P.; MCELVAIN, J.S.; MARTIN, L.D.; DOWLING, T.; FIELDS, S.M. Method validation by phase of development an acceptable analytical practice. *Pharmaceutical Technology*, v.28, n.11, p.54-66, 2004.

BOUND, J.P; VOULVOULIS, N. Pharmaceuticals in the aquatic environment - a comparison of risk assessment strategies. *Chemosphere*, v.56, p. 1143–1155, 2004.

BOYD, G. R.; REEMTSMA, H.; GRIMM, D. A.; MITRA, S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. *The Science of the Total Environment*, v. 311, p. 135 –149, 2003.

BRAILE, P. M.; CAVALCANTI, J. E. W. A.; *Manual de Tratamento de Águas Residuárias Industriais*, CETESB: São Paulo, 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde . Resolução nº 1, de 29 de julho de 2005. *Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade*. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde Informe Técnico nº 01, de 15 de julho de 2008 - Esclarecimento sobre o item 2.9 do anexo da Resolução RE nº1 de 29/07/2005, que trata do Guia para realização dos estudos de estabilidade. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Guia de Vigilância Epidemiológica. 7 ed.* – Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução nº 44, DE 26 DE OUTUBRO DE 2010. *Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição médica, isoladas ou em associação e dá outras providências*. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 2010

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 2003.

BRAUN, A. M.; OLIVEROS, E. How to evaluate photochemical methods for water treatment. *Water Science and Technology*, v.35, n. 4. p.17-23, 1997

BRITTAIN, H.G. Validação de métodos analíticos não cromatográficos. *Pharmaceutical technology*, v.2, n.3, p. 4-9, 1998.

BRONDI, S. H. G.; LANÇAS, F. M.; Development and validation of a multi-residue analytical methodology to determine the presence of selected pesticides in water through liquid chromatography. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. vol.16, n.3b, p.650-653, 2005.

BROWN, K.D., KULIS, J., THOMSON, B., CHAPMAN, T.H., MAWHINNEY, D.B. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Science of the Total Environment*, v.366, n.2-3, p.772-783, 2006.

BHUTANI, H, SINGH, S., VIR, S., BHUTANI , K.K.; KUMAR, R.A.J.; CHAKRABORTI, A. K.; JINDAL , K.C. LC and LC-MS study of stress decomposition behaviour of isoniazid and establishment of validated stability-indicating assay method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.43, n.4, p.1213-1220, 2007

CALAMARI, D.; CROSA, G. Long-term ecological assessment of West African rivers treated with insecticides: methodological considerations on quantitative analyses. *Toxicology Letters*, v.140-141, p.379-389, 2003.

CALDAS, A.L. Logística Reversa é ponto forte da Política de Resíduos Sólidos para melhorar a reciclagem no país. *Empresa Brasil de Comunicação*, Brasília – DF, 08 mai 2011. Disponível em:< <http://agenciabrasil.ebc.com.br/noticia/2011-05-08/logistica-reversa-e-ponto-forte-da-politica-de-residuos-solidos-para-melhorar-reciclagem-no-pais>>. Acesso: 15 ago 2011.

CALISTO, V.; ESTEVES, V.I. Psychiatric pharmaceuticals in the environment. *Chemosphere*, v.77, p.1257–1274. 2009.

CAPIELLO, A.; FAMIGLINI, G.; MANGANI, F.; PALMA, P.; SIVIERO, A. Nano-high-performance liquid chromatography–electron ionization mass spectrometry approach for environmental analysis *Analytica Chimica Acta*, v.49, n.2, p.125-136, 2003

CAPONE, D.G; WESTON, D.P; MILLER, V; SHOEMAKER, C. Antibacterial residues in marine sediments and invertebrates following chemotherapy in aquaculture. *Aquaculture* v.1,45 p.55–75, 1996.

CARBALLA, M; OMIL, F; LEMA, J; LLOMPART, M; GARCIA-JARES, C; RODRIGUEZ, I; GOMEZ, M; TERNES, T; Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Research*, v.38, p.2918–2926, 2004.

CARBALLA, M., OMIL, F., LEMA, J.M., LLOMPART, M., GARCIA-JARES, C., RODRIGUEZ, I., GOMEZ, M. Behavior of pharmaceuticals and personal care products in sewage treatment plant of northwest Spain. *Water Science & Technology*, v.52, n.8, p.29-35, 2005.

CARBALLA, M.; MANTEROLA, G.; LARREA, L.; TERNES, T.; OMIL, F.; LEMA, J.M. Influence of ozone pretreatment on sludge anaerobic digestion: removal of pharmaceutical and personal care products. *Chemosphere*, v.67, p.1444–1452, 2007.

CARBALLO, M; AGUAYO, S; DE LA TORRE, A; MUÑOZ, M.J. Plasma vitellogenin levels and gonadal morphology of wild carp (*Cyprinus carpio* L.) in a receiving rivers downstream of Sewage Treatment Plants. *Science of the Total Environmental*, v.341, p.71-79. 2005.

CARETTI, C.; LUBELLO, C. Wastewater disinfection with PAA and UV combined treatment: a pilot plant study. *Water Research*, v.37, p. 2365-2371, 2003.

CARVALHO, J.P.; SANTOS, A.S.; SÁ, A.S.; TEIXEIRA, C.S.; NOGUEIRA, M.S. Estabilidade de medicamentos no âmbito farmacológico. *Rev Farm Med.* v.34, n.6, p.22-27, 2005.

CASTIGLIONI, A.; FANELLI, R.; CALAMARI, D.; BAGNATI, R.; ZUCCATO, E. Methodological approaches for studying pharmaceuticals in the environment by comparing predicted and measured concentrations in River Po, Italy. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.39, p. 25-32, 2004.

CASTILLO, M.; BARCELÓ, D.. Characterization of Organic Pollutants in Textile Wastewater and Landfill Leachate by using Toxicity-based Fractination Methods followed by Liquid and Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometric Detection. *Analytica Chimica Acta*, v.426, p. 253-264, 2001.

CASTRO, A. V. S., 2004, *Processos oxidativos avançados para tratamento de águas ácidas de refinaria de petróleo*, Dissertação de M.Sc., PEQ/COPPE, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

CAVALCANTE, A. M., 2005, *Técnicas oxidativas para a remoção de matéria orgânica de uma corrente de soda exausta de refinaria de petróleo*, Dissertação de M.Sc., PEQ/COPPE, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

CÉSPEDES, R; LACORTE, S; GINEBREDÀ, A; BARCELÓ, D. Chemical monitoring and occurrence of alkylphenols, alkylphenol ethoxylates, alcohol ethoxylates, phthalates and benzothiazoles in sewage treatment plants and receiving waters along the Ter river Basin (Catalonia, N.E. Spain). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. v.385, p.992-1000, 2006.

CHA, J.M., YANG, S., CARLSON, K.H. Trace determination of beta-lactam antibiotics in surface water and urban wastewater using liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1115 (1e2), 46-57, 2006.

CHOI, K.J., KIM, S.G., KIM, C.W., KIM, S.H. Determination of antibiotic compounds in water by on-line SPE-LC/MSD. *Chemosphere* v.66, n.6, p.977-984, 2007a.

CIOLINO, H. P., Levine, R. L Modification of Proteins in Endothelial Cell Death during Oxidative Stress. *Free Radical Biology and Medicine*, v.22 n.7 p.1277-1282, 1997.

CISNEROS, R. L.; ESPINOZA, A. G.; LITTER, M. I. Photodegradation of an azo dye of the textile industry. *Chemosphere*, v. 48, n.4, p.393-399, 2002.

CLARA, M.; STRENN, B.; GUNS, O.; MATINEZ, E.; KREUZINGER, N.; KROISS, H.; Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Research*.v.39 n.19 p. 4797-4807, 2005.

Cláudia Poli de Almeida Barêa Teixeira e Wilson de Figueiredo Jardim. *Estudo comparativo entre diferentes processos oxidativos avançados na oxidação de fenol*. 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2001.

CLEUVERS, M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letter*, v.142, n.3, p.185-194, 2003.

CONAMA. Resolução N.º 430 – 13 de maio 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, 2011.

COSTANZO, S.D; MURBY, J; BATES J. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Marine Pollution Bulletin*, v. 51, p.218–223, 2005.

COUTINHO, C. F. B.; TANIMOTO, S. T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G. S.; AMARAL, R. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente v.15* p. 65, 2005 *apud* Jonathan, T.; *Introduction of environmental studies*, 3rd ed., Saunders College: New York, 1989.

COUTO, A.G.; GONZÁLEZ ORTEGA, G; PETROVICK, P.R. Granulação. Programa de pós-graduação Em ciências farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, UFRGS. Caderno de Farmácia, v. 16, n. 1, p. 13-20, 2000.

COUTO, A.G.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P.R. *Granulação*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Caderno de Farmácia, v. 16, n. 1, p. 13-20, 2000.

CREWS, P.; RODRÍGUEZ, J.; JASPARS, M. Organic structure analysis. New York:Oxford University Press, 1998. 552p.

CRUZ, R. M., 2000 *Reativo de Fenton e Foto-Fenton em efluente de alta salinidade*, Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

DA SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. *Química Nova*, v. 34, n.4, p.665-676, 2011.

DAUGHTON, C.G; TERNES, T. A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives*, v.107, p.907-938, 1999.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Marine Pollution Bulletin*, v.64, p.847–867, 2000.

DE BEER, D.; SRINIVASAN, R.; STEWART, P.S. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60 p.4339–4344, 1994.

DE WITTE, B.; LANGENHOVE, H. V.; DEMEESTERE, K., SAERENS, K., WISPELAERE, P.; DEWULF, J. Ciprofloxacin ozonation in hospital wastewater treatment plant effluent: Effect of pH and H₂O₂. *Chemosphere*, v.78, p.1142–1147, 2010

DELANEY, J.; TIMBRELL, J.A. Role of cytochrome P450 in hydrazine toxicity in isolated hepatocytes in vitro. *Xenobiotica*. v.25 n.12, p.1399-1410, 1995.

DESSEN, A.; QUÉMARD, A.; BLANCHARD, J.S.; Jr JACOBS, W.R.; SACCHETTINI, J.C. Crystal structure and function of the isoniazid target of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, v.267, p.1638-1641, 1995.

DESTRUTI, A. B. C. B. *Noções Básicas de Farmacotécnica*. 3 ed. São Paulo: Editora SENAC, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, *Farmacopéia Brasileira*. 5 ed. vol. 2. Brasília, 2010

EVANI, M.B.; SHISHOO, C.J.; DOSHI, K.J.; PATEL, H.B. Kinetic studies of the interaction between isoniazid and reducing sugars. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v.74 n.4, p.427-432, 1985.

DEZOTTI, M., 2008, *Processos e técnicas para o controle ambiental de efluentes líquidos*, Ed. E-papers.

DIAS, M.V.B.; Vasconcelos, I.B.; Prado, A.M.X.; Fadel, V.; Basso, L.A.; DE AZEVEDO, W.F.; SANTOS, D.S. Crystallographic studies on the binding of isonicotinyl- NAD adduct to wild-type and isoniazid resistant 2-transenoyl- ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Structural Biology*, v.159, p.369-380, 2007.

DIAZ-CRUZ, M.S., BARCELO, D. Determination of antimicrobial residues and metabolites in the aquatic environment by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* v. 386 p.973-985, 2006.

DOLLIVER, H; KUMAR, K; GUPTA, S. Sulfamethazine uptake by plants from manure-amended soil. *Journal of Environment Quality*, v. 36, p.1224–1230, 2007.

DOMÈNECH, X.; JARDIM, W. F.; LITTER, M. I. Em *Eliminación de contaminantes por fotocatalisis heterogênea*; Blesa, M. A., ed.; Digital Grafic: La Plata, 2001, cap. 1.

DONALD, P.R.; SEIFART, H.I.; PARKIN, D.P.; van JAARSVELD, P.P. Hydrazine production in children receiving isoniazid for the treatment of tuberculous meningitis. *The Annals of Pharmacotherapy*, v.28, n.12, p.1340-1343, 1994.

TOIT, L. C. du; PILLAY, V.; DANCKWERTS, M. P. Tuberculosis chemotherapeutic current drug delivery approaches. *Respiratory Research*, v.7 p.118, 2006.

DUCATI, R.G.; BASSO, I.A.; SANTOS, D.S. *Micobactérias*. In: Trabulsi IR, Alterthum F. *Microbiologia*. 4a ed. São Paulo: Atheneu; 2005.

DUONG, H., PHAM, N., NGUYEN, H., HOANG, T., PHAM, H., CA PHAM, V., BERG, M., GIGER, W., ALDER, A. Occurrence, fate and antibiotic resistance of fluoroquinolone antibacterials in hospital wastewaters in Hanoi, Vietnam. *Chemosphere*, v.72, p.968–973, 2008.

EDGE, S.; STEELE, D.F.; CHEN, A.; TOBYN, M.J.; STANFORTH, J.N. The mechanical properties of compacts of microcrystalline cellulose and silicified microcrystalline cellulose. *International Journal of Pharmaceutics*, v.200, p. 67-72, 2000.

EDSTROM INDUSTRIES, 2003, “Ultraviolet Disinfection”, *Edstrom Industries, Inc.*, Waterford, Wisconsin.

ELASRI, M.O.; MILLER, R.V. Study of the response of biofilm bacterial community to UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, p.2025–2031, 1999.

EMEA, Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use, CHMP/SWP/4447/00, European Medicines Agency, London, 2006.

EMMANUEL, E. Evaluation des risques sanitaires et ecotoxicologiques liés aux effluents hospitaliers. Ph.D. Dissertation, Institut National des Science Appliquées Lyon, France, 2004.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v.24, p. 755-767, 2001.

ESPONDA, S. M.; PADRON, M. E. T.; FERRERA, Z. S.; RODRIGUEZ, J. J. S. Solid-phase microextraction with micellar desorption and HPLC-fluorescence detection for the analysis of fluoroquinolone residues in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 394 , n.4, p.927-935, 2009.

ESTEVEZ, F. A. *Fundamentos de limnologia*. Editora Interciência/FINEP. 575 p. Rio de Janeiro. 1988.

FARIA, E.A.; LELES, M.I.G.; IONASHIR, M.; ZUPPA, T.O. Estudo da estabilidade térmica de óleos e gorduras vegetais. *Eclética Química*, v. 27, p.111-119, 2002.

FARRE, M.; FERRER, I.; GINEBREDÀ, A.; FIGUERAS, M.; OLIVELLA, L.; TIRAPU, L. C.; VILANOVA, M.; BARCELO, D. Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography–mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. *Journal of Chromatography A*, v. 938, p. 187–197, 2001.

FATTA, D., NIKOLAOU, A., ACHILLEOS, A., MERIC, S. Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. *Trends in Analytical Chemistry*, v.26, n.6, p.515-533, 2007.

FATTA-KASSINOS, D; KALAVROUZOTIS, I.K; KOUKOULAKIS, P.H; VASQUEZ, M.I. The risks associated with wastewater reuse and xenobiotics in the agroecological environment. Review. *Science of the Total Environment*, v.409, p.3555–3563, 2011.

FATTA-KASSINOS, F.D.; VASQUEZ, M.I.; KÜMMERER, K. Transformation products of pharmaceuticals in surface waters and wastewater formed during photolysis and advanced oxidation processes – Degradation, elucidation of byproducts and assessment of their biological potency. *Chemosphere* (2011), doi:10.1016/j.chemosphere.2011.06.082.

FAUSTINI, A.; Hall, A.J., PERUCI, C.A., Risk factors for multidrug resistant tuberculosis in Europe. *A Systematic Review Thorax*, p.158-63, 2006.

FAVILA, A.; GALLO, M; GLOSSMAN-MITNIK, D. CHIH-DTF determination of the molecular structure infrared spectra, UV spectra and chemical reactivity of three antitubercular compounds: Rifampicin, Isoniazid and Pyrazinamide. *Journal of Molecular Modeling*, v. 13 p.505-518, 2007.

FENG, W; NANSHENG, D. Photochemistry of hydrolytic iron (III) species and photoinduced degradation of organic compounds. A minireview. *Chemosphere*, v. 41, n. 8, p.1137-1147, 2000.

FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, v.76, n.2, p.122-159, 2006.

FERREIRA, M. S.; TIAGO, I.; VERISSIMO, A.; BOAVENTURA, R.A., NUNES, O.C.; MANAIA, C.M. Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology*, v.55, p.322–329, 2006.

FICK, J.; LINDBERG, R. H.; TYSKLIND, M.; LARSSON, D. G. J. Predicted critical environmental concentrations for 500 pharmaceuticals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.58, p. 516-523, 2010.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. *Physicochemical principles of pharmacy*. Great Britain, Pharmaceutical Press (PhP), 2006.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. *Princípios físico-químicos em farmácia*. 3.ed. São Paulo: Edusp; 2003. p. 711.

FOLMAR, L.C; HEMMER, M; HEMMER, R; BOWMAN, C; FROLL, K; DENSLOW, N.D. Comparative estrogenicity of estradiol, ethynyl estradiol and diethylstilbestrol in an in vivo, male sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*), vitellogenin bioassay. *Aquatic Toxicology*, v.49, p.77-88, 2000.

FONTANALS, N.; MARCÉ, R.M.; BORRULL, F. New materials in sorptive extraction techniques for polar compounds. *Journal of Chromatography A*, v. 1152, p. 4–31, 2007.

FOSTER, A.L. *Occurrence and Fate of Endocrine Disruptors through the San Marco Wastewater Treatment Plant*, Thesis of Master of Science, Texas Stae University, 2007.

FREIRE, R. S.; PELEGRINI, R.; KUBOTA, L. T.; DURÁN, N.; PERALTA-ZAMORA, P. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. *Quimica Nova*, v.23, n.4, p.504-511, 2000.

GALITSKY, C.; CHANG, S-C, WORRELL, E.; MASANET, E. *Energy Efficiency Improvement and Cost Saving Opportunities for the Pharmaceutical Industry An ENERGY STAR® Guide for Energy and Plant Managers* . Berkeley, California .Energy Analysis Department; 2008. p.1.

GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos *Quimica Nova*, v.29, n.1, p.105-112, 2006.

GALLO, G.G.; RADAELLI, P. Rifampicin. In: FLOREY, K. *Analytical profile of drug substances*. New York: Academic Press, 1976. v.5, p.467-515. *apud* SHISHOO, C.J.; SHAH, S.A.; RATHOD, I.S.; SAVALE, S.S.; KOTECHA, J.S.; SHAH, P.B. Stability of rifampicin in dissolution medium in presence of isoniazide. *International Journal of Pharmaceutics*, v.190, p.109- 123, 1999.

GARRIC, J.; LÉGER, J-M.; GRELARD, A.; OHKITA, M.; HUC, I. Solid state and solution conformation of 2-pyridinecarboxylic acid hydrazides: a new structural motif for foldamers. *Tetrahedron Letters*, v. 44, n.7, p.1421-1424, 2003.

GAZETTA E.G. *et al.*, Controle de Comunicantes de Tuberculose no Brasil: Revisão de Literatura (1984-2004); *Rev. Latino-Americano Enfermagem*, março - abril 2008.

GEBHARDT, W.; SCHRÖDER, H. FR. Liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry for the follow-up of the elimination of persistent pharmaceuticals during wastewater treatment applying biological wastewater treatment and advanced oxidation. *Journal of Chromatography A*, v.1160, n.1-2, p.34-43, 2007.

GHAFOURIAN, T.; BARZEGAR-JALALIA, M.; DASTMALCHIC, S.; KHAVARI KHORASANIA, T.; HAKIMIHA, N.; NOKHODCHIB, A. QSPR models for the prediction of apparent volume of distribution. *Intertional Journal of Pharmaceutics*, v.319, n.1-2, p.82-97,2006.

GHISELLI, G. *Avaliação da Qualidade das Águas Destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: Ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP)*. 2006. 190 f..Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

GIACOMETTI, J.; MILOSEVIC, A.; MILIN, C. Gas chromatographic determination of fatty acids contained in different lipid classes after their separation by solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, v. 976, p. 47–54, 2002.

GIGER, W. Hydrophilic and amphiphilic water pollutants: using advanced analytical methods for classic and emerging contaminants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. v.393, n.1 p.37-44, 2009.

GIROTTI,G; NOGUEIRA,K.L; MOURA,L.A;SOUZA,J.B; GIACOMETTI,LL; MARCHI, M.R.R; TOGNOLLI, J.O. Estrógenos em água: otimização da extração em fase sólida utilizando ferramentas quimiométricas. *Eclética química*. v. 32 n.2. p.61-67, 2007.

GLASSMEYER, S.T.; FURLONG, E.T.; KOLPIN, D.W.; CAHIL, J.D.; ZAUGG, S.T.; WERNER, S.L.; MEYER, M.T.; KRYAK, D.D. Transport of chemical and microbial compounds from known wastewater dischargers: Potential for use as indicators of human fecal contamination. *Environmental Science & Technology*. v.39, n.14, p.5157-5169, 2005

GLAZE, W. H. Drinking-Water Treatment With Ozone. *Environmental Science Technology*, v. 21, n. 3, p. 224-230, 1987.

GOBEL, A., ATHOMSEN, A., MCARDELL, C.S., JOSS, A., GIGER, W., Occurrence and sorption behavior of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in activated sludge treatment. *Environmental Science Technology*, v.39, n.11, p.3981-3989, 2005a.

GOBEL, A., THOMSEN, A., MCARDELL, C.S., ALDER, A.C., GIGER, W., THEI, N., LOFFLER, D., TERNES, T.A. Extraction and determination of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in sewage sludge. *Journal of Chromatography A*, v.1085, n. 2, p. 179-189, 2005b.

GOBEL, A., MCARDELL, C.S., JOSS, A., SIEGRIST, H., GIGER, W. Fate of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment technologies. *Science of the Total Environment*, v.372, n.2-3, p.361-371, 2007.

GOLET, E.M., STREHLER, A., ALDER, A.C., GIGER, W. Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using

accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction. *Analytical Chemistry* v.74, n.21, p.5455-5462, 2002.

GOMEZ, M.J.; PETROVIC, M; FERNANDEZ-ALBA, A.R; BARCELO, D. Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. . *Journal of Chromatography A*; v.1114, p.1224–1233, 2006.

GOMEZ, M.J., BUENO, M., LACORTE, S., FERNANDEZ-ALBA, A., AGUERA, A. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere*. v.66, p.993–1002, 2007.

GOODMAN & GILMAN: *As bases farmacológicas da terapêutica/ revisão de conteúdo* Almir Lourenço da Fonseca – Rio de Janeiro: McGraw Hill Interamericana do Brasil, 2006.

GOTTSCHALK, C., LIBRA, J. A., SAUPE, A., 2000, *Ozonization of water and wastewater – A practical guide to understanding ozone and its applications*. 2 ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

GRANGEIRO Jr, S.; STRATTMANN, R.R.; ALBUQUERQUE, M.M.; ARAÚJO, A.A.S.; MATOS, J.R.; ROLIM NETO, P.J. In vitro evaluation of dissolution profiles and thermal properties of some commercial formulations of nevirapine tablets. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v.25, n.1, p.76-82, 2006.

GROB, K. Modified stripping technique for the analysis of trace organics in water. *Journal of Chromatography A*, v.260, p.527, 1983

GROS, M., PETROVIC, M., BARCELO, D. Development of a multiresidue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* v.70, n.4, p.678-690, 2006.

GUERMOUCHE, S.; GUERMOUCHE, M. H. Solid-phase extraction and HPTLC determination of isoniazid and acetylisoniazidnin serum. Comparison with HPLC. *Journal of Chromatographic Science*, v.42, p.250-252, 2004.

GULKOWSKA, A., LEUNG, H.W., SO, M.K., TANIYASU, S., YAMASHITA, N., YEUNQ, L.W.Y., RICHARDSON, B. J., LEI, A. P., GIESY, J. P., LAM, P. K. S. Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, China. *Water Research*, v.42, n.1-2 p. 395-403, 2008.

GUSTAVO AVEIRO LINS *Impactos Ambientais em Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs)* Tese de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte do Programa de Engenharia Ambiental. 2010.

HALLING-SORENSEN, B., NORS NIELSEN, S., LANZKY, P.F., INGERSLEV, F., HOLTEN LUTZOFT, H.C., JORGENSEN, S.E. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. *Chemosphere*, v.36, p.357–393, 1998.

HARREMÖES, P. The challenge of managing water and material balances in relation to eutrophication. *Water Science and Technology*, v. 37, n 3. p. 9-17, 1998.

HARTMANN, A; ALDER, A.C; KOLLER, T; WIDMER, R. Identification of fluorochinolone antibiotics as the main source of amuC genotoxicity in native hospital waste water. *Environmental Toxicology & Chemistry*, v.17, p.383–393, 1998.

HARTMANN, A; GOLET, E.M; GARTISER, S; ALDER, A.C; KOLLER, T; WIDMER, R.M. Primary DNA damage but not mutagenicity correlates with ciprofloxacin concentrations in German hospital wastewaters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v.36, p.115–119, 1999.

HENNION, M-C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 856, n.1-2, p.3-54, 1999.

HERNÁNDEZ, F.; SANCHO, J. V.; IBÁÑEZ, M.; GUERRERO, C. Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 26, n. 6, p. 466-485, 2007.

HERNANDO, M.D; MEZCUA, M; FERNANDEZ-ALBA, A.R; BARCELÓ D. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surfacewaters and sediments. Talanta 1st Swift-WFD workshop on validation of Robustness of sensors and bioassays for Screening Pollutants—1st SWIFT-WFD 2004, v. 69, p. 334–342, ; 2006.

HIGNITE, C.; AZARNOFF, D.L. Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: Chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. *Life Sciences*, v.20, n.2, p.337-341, 1977.

HILSDORF, A. S., 2002, “Reuso de Efluentes”, *I Seminário Internacional de Tecnologias para Resíduos Sólidos e Saneamento*, Recife, PE, Brasil, 03-06 de junho.

HILTON, M. J.; THOMAS, K. V. Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1015, p. 129–141, 2003.

HIRSCH, R., TERNES, T.A., HABERER, K., MEHLICH, A., BALLWANZ, F., KRATZ, K.-L., Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* v.815, n.2, p.213-223, 1998.

HIRSCH, R; TERNES, T.A; HABERER, K; KRATZ, K.L. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, v. 225, p.109–118, 1999.

HOLDINESS, M. R. Cerebrospinal fluid pharmacokinetics of antituberculosis antibiotics. *Clinical Pharmacokinetic.*, v.10, p.532-534, 1985.

HUBER, M. M.; CANONICA, S.; PARK, GUN-YOUNG; VON GUNTEN, U. Oxidation of Pharmaceuticals during Ozonation and Advanced Oxidation Processes. *Environmental Science Technology*, v.37 n.5, p.1016–1024, 2003.

HUBER, M.M.; GÖBEL, A; JOSS, A; HERMANN, N; LÖFFLER, D; MCARDELL, C.S; RIED, A; SIEGRIST, H; TERNES, T.A; VON GUNTEN, U. Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewater effluents: A pilot study. *Environmental Science Technology*, v.39, p.4290–4299, 2005.

IKEHATA, K; NAGHASHKAR, N.J; GAMAL EL-DIN, M.. Degradation of aqueous pharmaceuticals by ozonation and advanced oxidation processes: A review. *Ozone Science. Engineering*, v.28, p.353–414, 2006.

ILHO, K.; NAOYUKI, Y.; HIROAKI, T. Performance of UV and UV/H₂O₂ processes for the removal of pharmaceuticals detected in secondary effluent of a sewage treatment plant in Japan. *Journal of Hazardous Material.*, v.166, p.1134–1140, 2009.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). HARMONIZED TRIPARTITE GUIDELINE. *Guideline stability testing: photostability testing of new drug Substances and products*. nov. 1996. Disponível em: www.ich.org. Acesso em: 10 agosto de 2011.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). HARMONIZED TRIPARTITE GUIDELINE. *Guidance for industry Q1A(R2) stability testing of new drug substances and products*. nov, 2003. Disponível em: www.ich.org. Acesso em: 10 agosto de 2011.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). HARMONIZED TRIPARTITE GUIDELINE. *Q2(R1) Validation of analytical procedures: text and methodology*. 2005. Disponível em: www.ich.org. Acesso em: 10 agosto de 2011.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). HARMONIZED TRIPARTITE GUIDELINE. *Q3A(R2) Impurities in new drug substances*. 2006a. Disponível em: www.ich.org. Acesso em: 10 agosto de 2011.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). HARMONIZED TRIPARTITE GUIDELINE. *Q3B(R2) Impurities in new drug products*. 2006b. Disponível em: www.ich.org. Acesso em: 10 agosto de 2011.

JACOBSEN, A.M; HALLING-SØRENSEN, B; INGERSLEV, F; HONORE HANSEN, S; Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem massspectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1038, p.157–170, 2004.

JAMIESON R.C.; JOY, D.M.; LEE, H.; KOSTASCHUK, R.; GORDON, R.J. Resuspension of sediment associated *Escherichia coli* in a natural stream. *Journal of Environmental Quality*, v.34, p.581–589, 2005.

JANIN, J. Y. Antituberculosis drugs: Ten years of research. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.15, n.7, p.2479-2513, 2007.

JEMBA, P.K. Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxic. and Environ. Safety*, v.63, p.113–130, 2006.

JEN, J.F., LEE, H.L., LEE, B.N. Simultaneous determination of seven sulfonamide residues in swine wastewater by highperformance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.793, n.2, p.378-382,1998.

JIVRAJ, M.; MARTINI, L. G.; THOMSONET, C. M. An overview of the different excipients useful for the direct compression of tablets. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, v.3, n.2, p.58-63, 2000.

JORGENSEN, S.E; HALLING-SORENSEN, B. Drugs in the Environment. *Chemosphere*, v.40, p.691-699, 2000.

JURY, K.L., KHAN, S.J., VANCOV, T., STUETZ, R.M., ASHBOLT, N.J. Are sewage treatment plants promoting antibiotic resistance? *Critical Reviews in Environmental Science & Technology*, in press.

KANG, S. F., LIAO, C. H., CHEN, M. C., 2002, “Pre-oxidation and coagulation of textile wastewater by the Fenton process”, *Chemosphere*, v.46, n.6, p. 923-928.

KAPOOR, N.; KHANDAVILLI S.; PANCHAGNULA, R. Simultaneous determination of lamivudine and stavudine in antiretroviral fixed dose combinations by first derivative spectrophotometry and high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.41, p.761–765, 2006.

KARTHIKEYAN, K.G., MEYER, M.T. Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin. USA. *Science of the Total Environment*. v361, n.1-3, p.196-207, 2006

KAUFMANN, A.; BUTCHER, P. Quantitative liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of chloramphenicol residues in food using sub-2 µm particulate

high-performance liquid chromatography columns for sensitivity and speed . *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 19, n.24, p.3694–3700, 2005.

KERRY, J; COYNE, R; GILROY, D; HINEY, M. SMITH, P. Spatial distribution of oxytetracycline and elevated frequencies of oxytetracycline resistance in sediments beneath a marine salmon farm following oxytetracycline therapy. *Aquaculture*, V.145 p.31–39, 1996.

KIM, I; YAMASHITA, N; TANAKA, H. Performance of UV and UV/H₂O₂ processes for the removal of pharmaceuticals detected in secondary effluent of a sewage treatment plant in Japan. *Journal of Hazardous Materials*, v.166 p.1134–1140, 2009.

KIM, S., JENSEN, J.N., AGA, D.S., WEBER, A.S. Tetracycline as a selector for resistant bacteria in activated sludge. *Chemosphere*, v.66, n. 9, p.1643-1651, 2007.

KIM, S.C; CARLSON, K. Occurrence of ionophore antibiotics in water and sediments f a mixed-landscape watershed. *Water Research*, v.40, p.2549–2560, 2006.

KINNEY, C.A; FURLONG, E.T; WERNER, S.L; CAHILL, J.D. Presence and distribution of wastewater-derived pharmaceuticals in soil irrigated with reclaimed water. *Environment Toxicology Chemical*, v.25 p.317, 2006a.

KINNEY, C.A; FURLONG, E.T; ZAUGG, S.D; BURKHARDT, M.R; WERNER, S.L; CAHILL, J.D; Survey of organic wastewater contaminants in biosolids destined for land application. *Environment Science Technology*, v.40, n.23, p.7207–7215, 2006b.

KINZIG-SCHIPPERS, M., TOMALIK-SCHARTE, D., JETTER, A., *et al.* Should we use N-acetyltransferase type 2 genotyping to personalize isoniazid doses? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.49, p.1733 – 1738, 2005.

KLAIS, O. Hydrogen peroxide decomposition in the presence of organic material: A case study. *Thermochimica Acta*, v.225, n.2, p.213-222, 1993.

KLAVARIOTI, M.; MANTZAVINOS, D.; KASSINOS, D. Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environmental International*, v.35 p. 402-407, 2009.

KLICK, .S, MUIJSELAAR, P.G.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDING T.K.; DEBETS, A.J.; DE GRIEND, C.S.; SOMSEN, G.W.; DEJONG, G.J. Towards a generic approach for stress testing of drug substances and drug products. *Pharmaceutical Technology*, v.29, n.2, p.48-66, 2005.

KNACKER, T. Preliminary Environmental Risk EMEA em Assessment (ERA) for Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) ECT. *Oekotoxikologie*.Flörsheim am Main Germany, 2003.

KOCH, H.M; MÜLLER, J; DREXLER, H; ANGERER, J. Dibutylphthalat (DBP) in Arzneimitteln: ein bisher unterschätztes Risiko für schwangere und Kleinkinder *umweltmed. forsch. prax.* v.10, p.144–146, 2005.

KOLBERG, D. I. S.; PRESTA, M. A.; WICKERT, C.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R.; Rapid and accurate simultaneous determination of abamectin and ivermectin in bovine milk by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v.20, n.7, p.1220-1226, 2009.

KOLPIN, D.W.; FURLONG, E.T.; MEYER, M.T.; THURMAN, E.M.; ZAUGG, S.D.; BARBER, L.B.; BUXTON, H.T. Pharmaceuticals, Hormones and other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A national Reconnaissance. *Environmental Science Technology*, v.36, p. 1202-1211, 2002.

KONG, W.D; ZHU, Y.G; LIANG, Y.C; ZHANG, J; SMITH, F.A; YANG, A. Uptake of oxytetracycline and its phytotoxicity to alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Environmental Pollution*, v.147, p.187–93, 2007.

KOSJEK, T.; HEATH, E.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Mass spectrometry for identifying pharmaceutical biotransformation products in the environment. *Trends in Analytical Chemistry*, v.26, 2007.

KOT-WASIK, A.; DEBSKA, J.; NAMIES, N.J. Analytical techniques in studies of the environmental fate of pharmaceuticals and personal-care products. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 26, n. 6, p. 557-568, 2006.

KOUTSOUBA, V.; HEBERER, T.; FUHRMANN, B.; SCHMIDT-BAUMLER, K.; TSIPI, D.; HISKIA, A. Determination of polar pharmaceuticals in sewage water of Greece by gas chromatography mass spectrometry. *Chemosphere*, v. 51, p. 69 -75, 2003.

KREMER, L.; DOVER, L.G.; MORBIDONI, H.R.; VILCHÈZE, C.; MAUGHAN, W.N.; BAULARD, A.; TU, S.C.; HONORÉ, N.; DERETIC, V.; SACCHETTINI, J.C.; LOCHT, C.; JACOBS, W.R. Jr.; BESRA, G.S. Inhibition of InhA activity, but not KasA activity, induces formation of a KasA-containing complex in mycobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, v.278, n.23, p.20547-20554, 2003.

KRUH, N.A.; RAWAT, R.; RUZSICKA, B.P.; TONGE, P.J. Probing mechanisms of resistance to the tuberculosis drug isoniazid: Conformational changes caused by inhibition of InhA, the enoyl reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Science*, v.16, p.1617-1627, 2007

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – a review – part I. *Chemosphere*, v.75, p.417–434, 2009.

KUMAR, A.; MALIK, A. K.; TEWARY, D. K.; SINGH, B. Gradient HPLC of antibiotics in urine, ground water, chicken muscle, hospital wastewater, and pharmaceutical samples using C-18 and RP-amide columns. *Journal of Separation Science*, v.31, n.2, p. 294, 2008b.

KUMMERER, K.; STEGER-MARTMANN, T.; MEYER, M.T. Biodegradability of the anti-tumour agent ifosfamide and its occurrence in hospital effluents and communal sewage. *Water Research*; v.31, p.2705–10, 1997.

KUMMERER, K.; AL-AHMAD, A. Biodegradability of the anti-tumor agents 5-fluorouracil, cytarabine, and gemcitabine: impact of the chemical structure and synergistic toxicity with hospital effluent. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, v.25, n.4, p.166–172, 1997a.

KUMMERER, K.; STEGER-HARTMANN, T.; MEYER, M. Biodegradability of the antitumour agent ifosfamide and its occurrence in hospital effluents and communal sewage. *Water Research*, v. 31, n.11, p.2705–2710, 1997b.

KUMMERER, K.; ERBE, T.; GARTISER, S.; BRINKER, L. AOX-emissions from hospital into municipal wastewater. *Chemosphere*, v.36, n.11, p.2437–2445, 1998.

KUMMERER, K.; HELMERS, E.; HUBNER, P.; MASCART, G.; MILANDRI, M.; REINTHALER, F.; ZWAKENBERG, M. European hospitals as a source for platinum in the environment in comparison with other sources. *Science of the Total Environment*, v.225, p.155–165, 1999.

KUMMERER, K.; HELMERS, E. Hospital effluents as a source of gadolinium in the aquatic environment. *Environmental Science & Technology*, v.34, p.573–577, 2000.

KUMMERER, K. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources—a review. *Chemosphere*; v.45, p.957–69, 2001.

KUMMERER, K., HENNINGER, A. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 9, p.1203–1214, 2003.

KUMMERER, K. Resistance in the Environment. *Journal of Antimicrobiol Chemotherapy*, v. 54, n.2, p.311-320, 2004.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G.; DURÁN, N.; Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. *Química Nova*, v.25, n.1, p. 78-82, 2002.

KUSIC, H., KOPRIVANAC, N., BOZIC, A. L. Minimization of organic pollutant content in aqueous solution by means of AOPs: UV - and ozone – based technologies, *Chemical Engineering Journal*, v. 123, p. 127-137, 2006.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANG, J.L. *Teoria e prática na indústria farmacêutica*. Lisboa: Fundação Lacouste Gulbenkian, 2001 p.899.

LAGANÀ, A.; BACALONI, A., DE LEVA, I.; FABERA, I.; FAGO, G.; MARINO, A. Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Analytica Chimica Acta*, v.501, n.1, p. 79-88, 2004.

LANÇAS, F. M. *Extração em Fase sólida (SPE)*. São Carlos: Editora RiMa, 2004. 96 p.

LANGE, R.; HUTCHINSON, T. H.; CROUDACE, C. P.; SIEGMUND, F.; SHWEINFURTH SHWEINFURTH, H.; HAMPE, P.; PANTER, G. H.; SUMPTER, J. P. Effects of the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology & Chemistry*, v. 20, p.1216-1227, 2001.

LANGFORD, K. H; THOMAS, K.V. Determination of pharmaceutical compounds in hospital effluents and their contribution to wastewater treatment works. *Environment International*, v.35, p.766-770, 2009.

LARSEN, M.H.; VILCHÈZE, C.; KREMER, L.; BESRA, G.S.; PARSONS, L.; SALFINGER, M.; HEIFETS, L.; HAZBON, M.H.; ALLAND, D.; SACCHETTINI, J.C.; JACOBS, W.R.Jr. Overexpression of *inhA*, but not *kasA*, confers resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium smegmatis*, *M. bovis* BCG and *M.tuberculosis*. *Molecular Microbiology*, v.46, p.453-466, 2002.

LARSSON, D.G.J; PEDRO, G; PAXEUS, N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials*, v.148, p.751-755, 2007.

LAVÉN, M.; ALSBERGA, T., YUB, Y.; ADOLFSSON-ERICIA, M.; SUN, H. Serial mixed mode cation and anion exchange solid phase extraction for separation of basic, neural and acidic pharmaceuticals in wastewater and analysis by high performance liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1216, n.1, p.49-62, 2009.

LEE, J. D., 2001, *Química inorgânica não tão concisa*, 2a Ed., Edgard Blücher, São Paulo.

LEGRINI, O.; OLIVEROS, E.; BRAUN, A.M.. Photochemical processes for water treatment. *Chemical Reviews*, v.93, n.2, p. 671-698, 1993.

LE-MINH, N.; COLEMAN, H.M.; KHAN, S.J.; VAN LUER, Y.; TRANG, T.T.T.; WATKINS, G., STUETZ, R.M.. The application of membrane bioreactors as decentralised systems for removal of endocrine disrupting chemicals and pharmaceuticals. *Water Science and Technology*, v. 61, n.5, p.1081-1088., 2010.

LENZ, K., KOELLENSPERGER, G., HANN, S., WEISSENBACHER, N., MAHNIK, S.N., FUERHACKER, M. Fate of cancerostatic compounds in biological wastewater treatment of hospital effluents. *Chemosphere*, v.69, p.1765–1774, 2007a.

LENZ, K., MAHNIK, S.N., WEISSENBACHER, N., MADER, R.M., KRENN, P., HANN, S., KOELLENSPERGER, G., UHL, M., KNASMULLER, S., FERK, F., BURSCH, W., FUERHACKER, M. Monitoring, removal and risk assessment of cytostatic drugs in hospital wastewater. *Water Science and Technology*, v.56, n.12, p.141–149, 2007b.

LEWIN, E.; HIRSCH, J.G. Studies on the stability of isoniazid. *Am Rev Tuberc.* v.71 n.5 p.732–742, 1955.

LI, J. D.; CAI, Y. Q., SHI, Y.L.; MOU, S. F.; JIANG, G. B. Determination of sulfonamide compounds in sewage and river by mixed hemimicelles solid-phase extraction prior to liquid chromatography-spectrophotometry. *Journal of Chromatography A*, v.1139, n.2, p.178-184, 2007.

LI, A. C.; JUNGA, H., SHOU, W. Z.; BRYANT, M. S.; JIANG, X; NAIDONG, W. Direct injection of solid-phase extraction effluents onto silica columns for the analysis of polar compounds isoniazid and cetirizine in plasma using hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrometry*. v.18: 2343–2350, 2004.

LIN, A. Y.C; TSAI, Y.T. Occurrence of pharmaceuticals in Taiwan's surface waters: Impact of waste streams from hospitals and pharmaceutical production facilities. *Science of the Total Environment*, v.407, p.3793–3802, 2009.

LINDBERG, R; JARNHEIMER, PA; OLSEN, B; JOHANSSON, M. Tysklind M. Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/ mass spectrometry and group analogue internal standards. *Chemosphere*, v.57, p.1479–1488, 2004.

LINDBERG, R. H.; WENBERG, P.; JOHANSSON, M. I.; TYSKLIND, M.; ANDERSSON, B. A. V. Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in five sewage treatment plants in Sweden. *Environmental Science & Technology*, v.39 n.10, p.3421-3429, 2005.

LINDSEY, M.E; MEYER, T.M; THURMAN, E.M; Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, v.73, n.19, p.4640–4646, 2001.

LINGEMAN, H.; HOEKSTRA-OUSSOREN, S. J. F. Particle-Loaded Membranes for Sample Concentration and/or Cleanup in Bioanalysis *Journal of Chromatography B* v.689, p.221-237, 1997.

LINS, Gustavo Aveiro. 2010. 177 f. *Impactos ambientais em estações de tratamento de esgotos (ETEs)*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Escola Politécnica e Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

LIRA, D. C. B.; NASCIMENTO, L.; WILL, I. B.S.; CHAVIONE-FILHO, O.; GUARDANI, R.; NASCIMENTO, C. A. O. Fotodegradação em um sistema contínuo de um efluente industrial contendo polímeros visando reuso. *Revista Petro & Química*, n. 281, p. 71-77, 2006.

LIVRAJ, M.; MARTIN, L.G.; THOMPSON, C.M. An overview of the different excipients for the direct compression of tablets. *Pharmaceutical Science Technology*, v.3, p.58-63, 2000.

LOBO, W. S., RIED, A. A comparison of treatment processes combining ozone, UV and Hydrogen peroxide, *Ozone News*, v. 36, n. 4, p. 18-27, 2008.

LÖFFLER, D.; TERNES, T. A. Determination of acidic pharmaceuticals, antibiotics and ivermectin in river sediment using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1021, p. 133–144, 2003.

LUCAS, T.I.; BISHARA, R.H.; SEEVERS, R.H.. A stability program for the distribution of drug products. *Pharmaceutical Technology*. v.2. p.68-73, 2004.

MA, C. W.; CHU, W. Photodegradation mechanism and rate improvement of chlorinated aromatic dye in non-ionic surfactant solutions *Water Research*, v.35, n.10 p.2453-245, 2001.

MACIEL, E.L.N. *et al* Tuberculose em profissionais de saúde: um novo olhar sobre um antigo problema. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, p. 83-90,2009.

MacRAE, W.D.; STICH, H.F. Induction of sister-chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells by thiol and hydrazine compounds. *Mutation Research*, v. 68, n.4, p.351-365, 1979.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J. M. and PARKER, J. *Biology of microorganisms*. 9th edition. Prentice Hall International, Inc. 991 p. London. 2000.

MAHMOUD, A., FREIRE, R. S. Métodos emergentes para aumentar a eficiência do ozônio no tratamento de águas contaminadas. *Química Nova*, v. 30, n. 1, p. 198-205, 2007.

MAHNIK, S; LENZ, K; WEISSENBACHER, N; MADER, R; FUERHACKER, M; Fate of 5-fluorouracil, doxorubicin, epirubicin, and daunorubicin in hospital wastewater and their elimination by activated sludge and treatment in a membrane-bioreactorsystem. *Chemosphere* v.66, p.30–37, 2007.

MAMEDE, L.C.; CAETANO, B.L.; ROCHA, L.A.; FERREIRA, E.M.; CESTARI, A.; KFURI, C.R.; CIUFFI, K.J.; CALEFI, P.S.; MELLO, C., CUNHA, W.R., NASSAR, E.J. Comportamento térmico de alguns fármacos e medicamentos. *Revista Ciência Farmacêutica Básica Aplicada*, v.27 n.2, p.151-155, 2006.

MARQUES, A.M.C, CUNHA R.V. A medicação assistida e os índices de cura de tuberculose e de abandono de tratamento na população indígena Guaraní- Kaiwá no Município de Dourados, Mato Grosso do Sul- Brasil. *Cad. Saúde Pública*, p.1405-11, 2003.

MARTINELLO, Tiago. *Desenvolvimento de comprimidos de paracetamol de 500 mg fabricados por compressão direta utilizando o planejamento estatístico de mistura*. 2005. 134 f. Dissertação (Pós Graduação em Fármaco e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MARTINS, A.G. *et al.*, Manifestações Otorrinolaringológicas da Tuberculose. Artigo de revisão; *Rev. Bras. de Otorrinolaringologia*, v.66, n.6, p. 2533, 2000.

MATAMOROS, V; HIJOSA, M., BAYONA, J.M. Assessment of the pharmaceutical active compounds removal in wastewater treatment systems at enantiomeric level. Ibuprofen and naproxen. *Chemosphere*, v.75, 2, p.200-205, 2009.

MATSUI, F.; ROBERTSON, D.L.; LOVERING, E.G. Determination of hydrazine in pharmaceuticals III: hydralazine and isoniazid using GLC. *Journal of Pharmaceutical Science*. v.72, n.8, p.948-951, 1983.

MATTHEWS, B.R. Regulatory aspects of stability testing in Europe. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. v.25, n.7, p.831-856, 1999.

MATTOS, I.L; SHIRAIISHI, K.A; BRAZ, A.D; FERNANDES, J.R. Peróxido de hidrogênio: importância e determinação. *Química Nova*, v.26, n.3, p.373-380, 2003.

MEISEL, P., Arylamine N-acetyltransferases and drug response. *Pharmacogenomics*, v.3, p.349-366, 2002.

MELO, S.A.S.; TROVÓ, A.G.; BAUTITZ, I.R.; NOGUEIRA, R. F. P. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. *Química Nova*, v.32, p.188-197, 2009.

MERCK index 13 ed. Withehouse Station: Merck Research, 2001. p.46

MIDDLEBROOK, G.; COHN, M.L. Some observations on the pathogenicity of isoniazid-resistant variants of tubercle bacilli. *Science*, v.118, p.297-299, 1953.

MIERZWA, J. C., 2008, *Tratamento Avançado de Aguas de Abastecimento - Desinfecção de água de abastecimento por radiação ultravioleta*, PHD Hidráulica e Sanitária, Disciplina 5750, Aula 13, USP, São Paulo. Disponível em: <http://200.144.189.36/phd/default.aspx?id=95&link_uc=disciplina>. Acesso em: 20 ago 2011.

MIESEL, L. WEISBORD, T. MARCINKEVICIENE, J. A. *et al.*, NADH dehydrogenase defects confer resistance to isoniazida and conditional lethality in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology*, v.180, p.2459 – 2467, 1998.

MOLIN, S.; TOLKER-NIELSEN, T. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology*, v.14, p.255–261, 2003.

MOLINARI, R., PALMISANO, L., DRIOLI, E. Studies on various reactor configurations for coupling photocatalysis and membrane processes in water purification. *Journal of Membrane Science*, v. 206, n. 1-2, p. 399-415, 2002.

MORAES, S. G., FREIRE, R. S.; DURÁN, N. Degradation and toxicity reduction of textile effluent by combined photocatalytic and ozonation processes. *Chemosphere*, v. 40, n. 4. p. 369-373, 2000.

MORIWAKI, C.; BRESCANSIN, E.G.; HIOKA, N.; MAIONCHI, F.; MATIOLI, G. Estudo da degradação do fármaco Nabumetona por fotólise direta. *Acta Science*, v.23, n.3, p.651-654, 2001.

MORLOCK, G.P.; METCHOCK, B.; SIKES, D.; CRAWFORD, J.T.; COOKSEY, R.C. *ethA*, *inhA*, and *katG* loci of ethionamide-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.47, p.3799-3805, 2003.

MOZAZ, S. R.; ALDA, M.J.L.; BARCELÓ, D. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction–liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1045, n.1-2 p.85-92, 2004.

MULLER, J. J. A. *Toxicological limits of medicines in drinking-water*. RIVM Rapport 703719004, p.35-45, 2002. Disponível em: <www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten>. Acesso em 10 maio 2011.

NAGULAPALLY, S.R., AHMAD, A., HENRY, A., MARCHIN, G.L., ZUREK, L., BHANDARI, A. Occurrence of ciprofloxacin-, trimethoprim-, sulfamethoxazole-, and vancomycin-resistant bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Water Environment Research*, v.81, n.1, p.82-90, 2009.

NEBOT, C., GIBB, S. W. AND BOYD, K. G. Quantification of human pharmaceuticals in water samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. v.598, p.87-94, 2007.

NÓBREGA, I.M.F.; GRANGEIRO Jr. S.; SILVA, R.M.F; ROLIM NETO, P.J.; ALBUQUERQUE, M.M.. Estudo de estabilidade de comprimidos de Captopril 25 mg acondicionados em blister frente a diferentes tipos de filmes moldáveis. *Revista Brasileira de Farmácia*. v.8, n.4, p.128-131, 2006.

NUDELMAN, Norma Sbarbati. Estabilidade de medicamentos. Motevideo: Libreria El Ateneo Editorial, 1975.

NUNES, L.C.C.; SOBRINHO, J.L.S., LIMA, A.A.N; SILVA, J.L.; ROLIM NETO, P.J. Câmara climática: estudo de caso. *Revista Brasileira de Farmácia*, v.88, n.3, p.137-140, 2007.

OHLSEN, K., TERNES, T., WERNER, G., WALLNER, U., LOFFLER, D., ZIEBUHR, W., WITTE, W., HACKER, J. Impact of antibiotics on conjugational resistance gene transfer in *Staphylococcus aureus* in sewage. *Environmental Microbiology*, v.5, n.8, p.711–716, 2003.

OMS. Quadro geral estratégico para reduzir o peso da TB/HIV. Geneva: Organização Mundial de Saúde, 2002

ONESIOS, K.M; YU, J.T; BOUWER, E.J; Biodegradation and removal of pharmaceuticals and personal care products in treatment systems: a review. *Biodegradation*, v.20, p.441–466, 2009.

ORMAD, P., CORTES, S., PUIG, A. Degradation of organochloride compounds by O₃ and O₃/H₂O₂. *Water Research*, v. 31, n. 9, p. 2387–2391, 1997

PAUWELS, B., NOPPE, H., DE BRABANDER, H., VERSTRAETE, W. Comparison of steroid hormone concentration in domestic and hospital wastewater treatment plants. *Journal of Environmental Engineering*, v.134, n.11, p.933–936, 2008.

PAWLOWSKI, S.; VAN AERLE, R.; TYLER, C.R.; BRAUNBECK, T. Effects of 17alpha-ethinylestradiol in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.57, p.330-345, 2004.

PEDROUZO, M.; REVERTÉ, S.; BORRULL, F.; POCURULL, E.; MARCÉ, R. M.; Pharmaceutical determination in surface and wastewaters using high-performance liquid chromatography-(electrospray)-mass spectrometry. *Journal Separation Science*, v.30, n.3 p.297, 2007.

PENG, X., WANG, Z., KUANG, W., TAN, J., LI, K. A preliminary study on the occurrence and behavior of sulfonamides, ofloxacin and chloramphenicol antimicrobials in wastewaters

of two sewage treatment plants in Guangzhou, China. *Science of the Total Environment* v.371, n.1-3, p.314-322, 2006.

PENG, X., TAN, J., TANG, C., YU, Y., WANGT, Z. Multiresidue determination of fluoroquinolone, sulfonamide, trimethoprim, and chloramphenicol antibiotics in urban waters in China. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.27, n.1, p.73-79, 2008.

PEREIRA, V. J.; LINDENB, K.G.; WEINBERGA, H. S. Evaluation of UV irradiation for photolytic and oxidative degradation of pharmaceutical compounds in water *Water Research*, v.41, p.4413 – 4423, 2007.

PEREIRA, V. R.; COSTA, S. S.; ROCHA, S. C. S. *Análise do crescimento da celulose microcristalina granulada em leite vibrofluidizado* In: VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, Uberlândia, Minas Gerais, 2009.

PÉREZ, J.H.; JURADO, M.E.; QUETIGLAS, E.G.; PEREA, J.R.A. Fármacos antituberculosos, *Medicine*, v.7, n.84, p.3931-3942, 1998.

PÉREZ, M. I. B.; GARCÍA, A. M. C.; IRRUELA, C.; GRACIA, L. G.; BLANCO, C. Trace determination of 10 beta-lactam antibiotics in environmental and food samples by capillary liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.1216, p.8355-8361, 2009.

PERRY, R. H; CHILTON, C. H., 1974. *Chemical Engineers Handbook*, 5^a ed., Tokyo, McGraw-Hill International.

PETROVIC, M.; HERNANDO, M.D.; CRUZ, M.S.D.; BARCELÓ, D.; Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review *Journal of Chromatography A*. . v.1067, n.1-2, 4, p.1-14, 2005

PETROVIC, M; GONZALES, S; BARCELÓ, D. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewaters and drinking waters. *Trends in Analytical Chemistry*, v.22, n.10, p.685–696, 2003.

PETROVIC, M; GROS, M; BARCELÓ, D. Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by ultra-performance liquid chromatography–quadrupole–time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1124, p.68-81, 2006.

PETROVICK, P.R. *Tecnologia Farmacêutica I: Polígrafo de acompanhamento*. ed. 2000/II.Porto Alegre: Faculdade de Farmácia da UFRGS, 2000.

POZO, O. J.; GUERRERO, C.; SANCHO, J. V.; IBANEZ, M.; PITARCH, E.; HOGENDOORN, E.; HERNANDEZ, F. Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid

chromatography/tandem mass spectrometry *Journal of Chromatography A*, v.1103, n.1, p.83-93, 2006.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. *Tecnologia Farmacêutica* .6ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002. v.1, p.199-478.

QUEIROZ, M. E. C.; SILVA, S. M.; CARVALHO, D.; LANÇAS, F. M. Comparison Between Solid Phase Extraction Methods for the Chromatographic Determination of Organophosphorus Pesticides in Water. *Journal of Environmental Science and Health Part B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*. v. 36, n. B36, p. 517-527, 2001.

QUEIROZ, Sonia Cláudia. Nascimento de. *Determinação multirresíduos de pesticidas em água por cromatografia líquida de alta eficiência com ênfase em espectrometria de massas e novos sorventes para fase sólida*. 2001. 162f.. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de Extração e/ou Concentração de Compostos encontrados em Fluidos Biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Química Nova*, v. 24, n.1, p. 68-76, 2001.

QUÉMARD, A.; SACCHETTINI, J.C.; DESSEN, A.; VILCHÈZE, C.; BITTMAN, R.; Jr. JACOBS, W.R.; BLANCHARD, J.S. Enzymatic characterization of the target for isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*, v.34, p.8235-8241, 1995.

RADJENOVIC, J.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. v. 387, n.4, p.1365-1377, 2007.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. *Agentes antimicobacterianos* In: *Farmacologia* . 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.590-592.

RAO, K. K.; CAMMACK, R.; HALL, D. O.; JOHNSON, C. E.. Mössbauer effect in *Scenedesmus* and spinach ferredoxins. The mechanism of electron transfer in plant-type iron-sulphur proteins. *Biochemical Journal*. v.122, n.3, p.257-265, 1971.

REINTHALER, F.F.; POSCH, J.; FEIERL, WUST, G.; HAAS, D.; RUCKENBAUER, G.; MASCHER, F.; MARTH, E. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Research*, v.37, p.1685-1690, 2003.

REIS FILHO, R.W; ARAÚJO, J.C; VIEIRA, E.M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. *Química Nova*, v.29, n.4, p.817-822. 2006.

REIS, J. A. T. e MENDONÇA, A. S. F. Amônia em efluentes e mananciais de água doce - uma avaliação dos limites impostos pelo CONAMA. In: *XX Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*. Anais. Rio de Janeiro: ABES, 1999.

REMGINGTON'S the science and practice of pharmacy. 20 ed. Easton: Mack, 2000. P.1455.

RENEW, J.E., HUANG, C.H. Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography* ., v.1042, n.1-2, p.113-121, 2004.

RENNER, T.; BAUMGARTEN, D.; UNGER, K. K. Analysis of organic pollutants in water at trace levels using fully automated solid-phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography. *Chromatographia*, v.45, p.199-205, 1997.

REYNOLDS, D.W.; FACCHINE, K.L.; MULLANEY, F.J.; ALSANTE, K.M.; HATAJIK, T.D.; MICHEL, M.G. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. *Pharmaceutical Technology*. v.26, n.2, p.48-56, 2002.

REZENDE, L. G. P. et al. Degradação eletroquímica do cloranfenicol em reator de fluxo, *Química Nova*, v.33, p.1088-1092, 2010.

RICHARDSON, M. L.; BOWRON, J. M. The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.37, n.1, p.1-12, 1985.

ROBERTS, P. H.; BERSUDER, P. Analysis of OSPAR priority pharmaceuticals using high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1134, p 143–150, 2006.

ROBINSON, A.A; BELDEN, J.B; LYDY, M.J. Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. *Environmental Toxicology & Chemistry*, v.24, n.2, p.423-30, 2005

RODANTE, F.; VECCHIO, S.; CATALANI, G.; TOMASSETTI, M. Compatibility between active components of a commercial drug. *Farmaco*. v.57 p.833-843, 2002.

RODGER-GRAY, T.P., JOBLING, S., KELLY, C. Exposure of Juvenile Roach (*Rutilus rutilus*) to Treated Sewage Effluent Induces Dose-Dependent and Persistent Disruption in Gonadal Duct Development” *Environmental Science Technology*, v. 35 n.3 p. 462-470, 2001.

RODRIGUES, I.; QUINTANA, J.B.; CARPINTEIRO, J.; CARRO, A. M.; LORENZO, R. A.; CELA, R. Determination of drugs in sewage water by gas chromatography-mass spectrometry as tert-butyldimethylsilyl derivatives. *Journal of Chromatography A*, v. 985, p. 265-274, 2003.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; ALDA, M.J.L.; BARCELÓ, D. Monitoring of estrogens pesticides and bisphenol a in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1045, p. 85-92, 2004.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; LOPEZ DE ALDA, M. J.; BARCELÓ, D. Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. *Journal of Chromatography A*, v. 1152, n. 2, p. 97-115, 2007.

ROSAL, R., GONZALO, M.S., BOLTES, K., LETÓN, P., VAQUERO, J.J., GARCÍA-CALVO, E., Identification of intermediates and assessment of ecotoxicity in the oxidation products generated during the ozonation of clofibrac acid. *Journal of Hazardous Materials*, v.172, p.1061-1068, 2009.

ROSAL, R., RODRIGUEZ, A., MELON, J. A. P. Oxidation of dissolved organic matter in the effluent of a sewage treatment plant using ozone combined with hydrogen peroxide (O_3/H_2O_2). *Chemical Engineering Journal*, v.149. n.1-3. p.311- 318, 2009.

ROSARIO-ORTIZ, F. L.; WERT, E. C., SNYDER, S. A. Evaluation of UV/H₂O₂ treatment for the oxidation of pharmaceuticals in wastewater. *Water Research*, v.44. p. 144-1448, 2010.

ROSSETI, M. L. R., VALIM, A. R. M.; SILVA, M. S. Tuberculose resistente: revisão molecular. *Rev. Saúde Pública*, v.36, n.4, p. 525-532, 2002.

ROZWARSKI, D.A.; GRANT, G.A.; Jr. BARTON, D.H.R.; JACOBS, W.R.; SACCHETTINI, J.C. Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, v.279, p.98-102, 1998.

ROZWARSKI, D.A.; VILCHEZE, C.; SUGANTINO, M.; BITTMAN, R.; SACCHETTINI, J.C. Crystal structure of the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-acyl reductase, InhA, in complex with NAD⁺ and a C16 fatty acyl substrate. *The Journal of Biological Chemistry*, v.27, p.15582-15589, 1999.

RUFFIER, PETER J., BOYLE, WILLIAN C., KLEINSSCHMIDT, JAMES. Short-term acute bioassays to evaluate ammonia toxicity and effluent standards. *Journal Water Pollution Control Federation*, v.53, n.3, p.367-377, 1981.

SACCHETTINI, J. C.; BLANCHARD, J. S. The structure and function of the isoniazida target in *M. tuberculosis* *Research in Microbiology*, v.147, n.1-2, p. 36-43, 1996.

SACHER, F., LANGE, F. T., BRAUCH, H. Pharmaceuticals in Groundwaters Analytical Methods and Results of a Monitoring Program in Baden-Wurttemberg, Germany. *Journal Chromatography A*, v. 938, p. 199-210, 2001.

SAIEN, J., NEJATI, H. Enhanced photocatalytic degradation of pollutants in petroleum refinery wastewater under mild conditions. *Journal of Hazardous Materials*, v.148, n.1-2, p. 491–495, 2007.

SANFELIU, C.; WRIGHT, J. M.; KIM, S. U. Neurotoxicity of isoniazid and its metabolites in cultures of mouse dorsal root ganglion neurons and hybrid neuronal cellline. *Neurotoxicology*, v.20, n.6, p.935-944, 1999.

SANTOS, J. H. Z.; PIZZOLATO, T. M.; CUNHA, A. C. B. Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação de fármacos em meio aquático por extração em fase sólida e HPLC. *Revista de Ciências Ambientais*, v.1 n.2, p. 19-34, 2007.

SARICH, T.C, YOUSSEFI, M.; ZHOU, T.; ADAMS, S.P.; WALL, R.A.; WRIGHT, J.M. Role of hydrazine in the mechanism of isoniazid hepatotoxicity in rabbits. *Archives of Toxicology*. v.70, p. 835–40, 1996.

SARMA G.R.; IMMANUEL C, KAILASA.M S, NARAYANA AS, VENKATESAN P. Rifampin-induced release of hydrazine from isoniazid. A possible cause of hepatitis during treatment of tuberculosis with regimens containing isoniazid and rifampin. *The American Review of Respiratory Disease*, v.133, p.1072–1075,1986.

SARMAH, A.K; MEYER, M.T; BOXALL, A.B.A; A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment, *Chemosphere*, v.65, n.5, p.725-759, 2006.

SCHLÜTER, A.; SZCZEPANOWSKI, R., PÜHLER, A.; TOP, E.M. Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. *FEMS Microbiology Review*, v.31 p.449–477, 2007.

SCIOR, T.; GARCES-EISELE, S.J. Isoniazid is not a lead compound for its pyridyl ring derivatives, isonicotinoylamides, hydrazides, and hydrazones: a critical review. *Current Medicinal Chemistry*, v.13, p.2205-2219, 2006.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Ministério da Saúde. Apresentação do Programa Nacional e Controle da Tuberculose, Brasília, 2011 Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2site_31_05_2011.pdf>. Acesso em: 21 ago 2011.

SEGURA, P.A., GARCIA-AC, A., LAJEUNESSE, A., GHOSH, D., GAGNON, C., SAUVE, S. Determination of six anti-infectives in wastewater using tandem solidphase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Environmental Monitoring*, v.9, n.4, p.307-313, 2007..

SEIFRTOVA, M., PENA, A., LINO, C., SOLICH, P. Determination of fluoroquinolone antibiotics in hospital and municipal wastewaters in Coimbra by liquid chromatography with

a monolithic column and fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.391, p.799–805, 2008.

SHEMER, H., KUNUKCU, Y.K., LINDEN, K.G. Degradation of the pharmaceutical metronidazole via uv, fenton and photo-fenton processes. *Chemosphere*, v.63, p. 269-276, 2006.

SHETH, B.B.;BANDELIN, F.J.; SHANGRAW, R.F. In: *Pharmaceutical Dosage Forms: tablets*. New York: Macel Dekker, v.1, p.109-185, 1980.

SHI, L., ZHOU, X.F., ZHANG, Y.L., GU, G.W. Simultaneous determination of 8 fluoroquinolone antibiotics in sewage treatment plants by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Water Science and Technology*,v.59,n.4, p.805-813, 2009.

SHISHIR KUMAR BEHERA, HYEONG WOO KIM, JEONG-EUN OH, HUNG-SUCK PARK. Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea . *Science of The Total Environment*, v. 409, n. 20, p.4351-4360, 2011.

SILVA, R.M.F.; MEDEIROS, F.P.M.; NASCIMENTO, T.G.; MACÊDO, R.O.; ROLIM NETO, P.J. Thermal characterization of inidavir sulfate using TG, DSC and DSC-Photovisual. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v.95, n.3, p.965-968, 2009.

SINGH, S.; MARIAPPAN, T.T.; SANKAR, R.; SARDA, N.; SINGH, B. A critical review of the probable reasons for the poor/variable bioavailability of rifampicin from antitubercular fixed-dose combination (FDC) products, and the likely solutions to the problem. *International Journal of Pharmaceutics*, v.228, p.5 – 17, 2001.

SINGH, S., BAKSHI, M. Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs. *Pharmaceutical & Technology*, v. 24 p.1-14, 2000.

SINGH, S.; BAKSHI, M. Development of validated stability-indicating assay methods—critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.28, p.1011–1040, 2002.

SIRTORI, C., AGÜERA, A., GERNJAK, W., MALATO, S., Effect of water–matrix composition on Trimethoprim solar photodegradation kinetics and pathways. *Water Reserch*, v.44, p.2735–2744, 2010.

SMITH, P. J.; VAN DYK, J.; FREDERICKS, A. Determination of rifampicin, isoniazida and pyrazinamide by high performance liquid chromatography after their simultaneous extraction from plasma. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, v.3, n.11, p.325-328, 1999.

SMITH, P.; NORMAN, J.; BURGER, A.; MCILLERON, HELEN, WASH, P.; FOLB, P. I. Determinants of rifampin, isoniazid, pyrazinamide, and ethambutol pharmacokinetics in a cohort of tuberculosis patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, n.4, p. 1170-1177, 2006.

SONG, B., WANG, G., SHOEMAKER, N.B., SALYERS, A.A. An unexpected effect of tetracycline concentration: growth phase-associated excision of the *Bacteroides mobilizable* transposon NBU1. *Journal of Bacteriology*, v.191 p.1078–82, 2009.

SOUZA, Bianca Miguel de. *Avaliação de processos oxidativos avançados acoplados com carvão ativado granulado com biofilme para reúso de efluentes de refinaria de petróleo*. 2010. 160 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química COPPE) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SOUZA, R. M. L. Desenvolvimento de comprimidos de mebendazol e avaliação comparativa com dois genéricos disponíveis no mercado. Recife: *Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 27, n.2, p.139-144, 2006.

STACKELBERG, P; FURLONG, E.; MEYER, M.; ZAUGG, S.; HENDERSON, A.; REISSMAN, D. Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. *Science of the Total Environment*. v.329, p.99–113, 2004.

STEFAN, M. I.; BOLTON, J. R. Mechanism of the degradation of 1,4-dioxane in dilute aqueous solution using the UV/ hydrogen peroxide process. *Environmental Science & Technology*, v.32, p.1588–1595, 1998.

STEPNOWSKI, P., SIEDLECKA, E. M., BEHREND, P. Enhanced photo-degradation of contaminants in petroleum refinery wastewater, *Water Research*, v. 36, n. 9, p. 2167-2172, 2002.

STOOB, K., SINGER, H.P., GOETZ, C.W., RUFF, M., MUELLER, S.R.. Fully automated online solid phase extraction coupled directly to liquid chromatography-tandem mass spectrometry: quantification of sulfonamide antibiotics, neutral and acidic pesticides at low concentrations in surface waters. *Journal of Chromatography A* v.1097, n.1-2, p.138-147, 2005.

STULZER, H.K, SILVA, M.A. Estudo de estabilidade de grânulos revestidos e comprimidos contendo Captopril. *Acta Farmaceutica Bonaerense*. v.25, n.4, p.497-504, 2006.

STUMPF, M.; TERNES, T. A.; WILKEN, R. D.; RODRIGUES, S. V.; BRAUMANN, V. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil *The Science of the Total Environment*, v. 225, n.1-2, p. 135-141, 1999.

SUAREZ, S., LEMA, J., OMIL, F. Pre-treatment of hospital wastewater by coagulation–flocculation and flotation. *Bioresource Technology*. v.100, p.2138–2146, 2009.

SUCHARA, E. A.; DA ROCHA, E. C. *Desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação de fármacos em fluidos biológicos e amostras ambientais por cromatografia líquida e gasosa*. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

SZCZEPANOWSKI, R., LINKE, B., KRAHN, I., GARTEMANN, K.H., GUTZKOW, T., EICHLER, W., PUHLER, A., SCHLUTER, A. Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. *Microbiology-Sgm.v.* 155, P. 2306-2319, 2009.

TABORIANSKI, AM. Validação de métodos para análise e estudos de estabilidade de anti-retrovirais em preparações farmacêuticas [Dissertação] São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2003.

TAFFAREL, S. R. *Degradação fotocatalítica de estireno em solução aquosa*. Dissertação de mestrado em Engenharia Química - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

TALINLI, I., ANDERSON, G. K. Interference of hydrogen peroxide on the standard COD test, *Water Research*, v. 26, n. 1, p. 107–110, 1992.

TARR, M. A, *Chemical Degradation Methods for Wastes and Pollutants - Environmental and Industrial Applications*, p. 1–76, 2003

TARRÁN, E. P Desinfección por luz ultravioleta. *Agua Latinoamerica*, v. 2, n. 2, pp. 28-35, 2002. Disponível em: <<http://www.agualatinoamerica.com/docs/PDF/3-4-02inter.pdf>>. Acesso em: 21 Janeiro, 2011.

TERNES, T.A. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers: *Water Research*, v. 32, n. 11, p. 3245–3260, 1998.

TERNES, T.A; HIRSCH, R. Occurrence and behavior of x-ray contrast media in sewage facilities and the aquatic environment. *Environmental Science and Technology*, v.34, p.2741-2748, 2000.

TERNES, T.A. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*, v.20, n.8, p. 419-434, 2001.

TERNES, T. A.; BONERZ, M.; SCHMIDT, T. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 938, p. 175–185, 2001.

TERNES, T. A.; MEISENHEIMER, M.; MCDOWELL, D.; SACHER, F.; BRAUCH, H-J.; HAIST-GULDE, B.; PREUSS, G.; WILME, U.; ZULEI-SEIBERT, N. Removal of Pharmaceuticals during drinking water treatment. *Environment Science Technology*, v.36, n.17, p. 3855–3863, 2002.

THOMAS, K; DYE, C; SCHLABACH, M; LANGFORD, K.H; Source to sink tracking of to aquatic organisms, *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 24, p.423–430, 2005.

THOMAS, K. V.; DYE, C.; SCHLABACH, M. AND LANGF, K. H. Source to sink tracking of selected human pharmaceuticals from two Oslo city hospitals and a wastewater treatment works. *Journal of Environmental Monitoring*, v.9, p.1410–1418, 2007a.

THOMAS, K., DYE, C., SCHLABACH, M., LANGFORD, K.H. Source to sink tracking of selected human pharmaceuticals from two Oslo city hospital and a wastewater treatment works. *Journal of Environmental Monitoring*, v.9, p.1410–1418, 2007b.

TIMPERIO, A. M.; RINALDUCCI, S.; ZOLLA, L. Hydrazide derivatives produce active oxygen species as hydrazine. *Bioorganic Chemistry*, v. 33, n. 6, p. 459-469, 2005

TOMASSETTI, M.; CATALANI, A.; ROSSI, V.; VECCHIO, S. Thermal analysis study of the interactions between acetaminophen and excipients in solid dosage forms and in some binary mixtures. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.37 p.5949-5955, 2005.

TOMIZAWA, K.; SUGANO, K.; YAMADA, H. and HORII. Physicochemical and cell-based approach for early screening of phospholipidosis-inducing. *The Journal of Toxicological Sciences*, v.31, n.4, p.315-324, 2006.

TROVÓ A. G.; NOGUEIRA, R. F.; AGÜERA, A.; FERNANDEZ-ALBA A. R.; MALATO, S. Degradation of the antibiotic amoxicillin by photo-Fenton process-chemical and toxicological assessment. *Water Research*. v.4, n.3, p.394-402, 2011.

TROVÓ, A. G.; MELO, S. A. S.; NOGUEIRA, R. F. P. Photodegradation of the pharmaceuticals amoxicillin, bezafibrate and paracetamol by the photo-Fenton process - Application to sewage treatment plant effluent. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v.198, n. 2-3, 15, p. 215-220, 2008.

TSARICHENKO, G.V.; BOBROV, V.I.; STARKOV, M.V. Toxicity of isonicotinic acid. *Khimico-Farmatsevticheskii Zhurnal*, v.11, n.4, p.45-47, 1977.

UNITED STATES PHARMACOPEIA: *USP 33, National Formulary: NF 28*. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2010.

UNSANAN, S.; SANCAR, M.; BEKCE, B.; CLARK, P. M.; KARAGOZ, T.; IZZETIN, F. V.; ROLLAS, S. Therapeutic monitoring of isoniazida, pyrazinamide and rifampicin in tuberculosis patients using LC. *Chromatographia*, v. 61, p. 595-598, 2005.

USFDA, *Guidance for Industry; Environmental Assessment of Human Drugs and Biologics*, 1998

VASSKOG, T; BERGER, U; SAMUELSEN, P.J.; KALLENBORN, R; JENSEN, E. Selective serotonin reuptake inhibitors in sewage influents and effluents from Tromsø, Norway. *Journal of Chromatography A*, v.1115, p.187-195, 2006

VEHABOVIC, M.; HADZOVIC, S.; STAMBOLIC, F.; HADZIC, A.; VRANJES, E.; HARACIC, E. Stability of ranitidine in injectable solutions. *International Journal of Pharmaceutic.*, v.256, p.109–115, 2003;

VÉKEY, K.; Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. *Journal Chromatography A*, v.921, n.2, p.227-236, 2001.

VELLA, P.A.; MUNDER, J.A. Em *Emerging technologies in hazardous waste management III*; Tedder, D. W.; Pohland, F. G., eds.; American Chemical Society: Washington, 1993, cap. 5.

VENDRAMINI, S. H. F. *et al.* Tuberculose em município de porte médio do Sudeste do Brasil: indicadores de morbidade e mortalidade de 1985 a 2003. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, Brasília, v. 31, n. 3, p. 237-243, 2005.

VERLICCHI, P., GALLETTI, A., MASOTTI, L. Caratterizzazione e trattabilità di reflui ospedalieri: indagine sperimentale (con sistemi MBR) presso un ospedale dell'area ferrarese. In: Proc. SIDISA Conference Firenze (in Italian), 2008.

VERLICCHI, P; GALLETTI, A; PETROVIC, M; BARCELÓ, D. Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options. *Journal of Hydrology* 389 416–428, 2010.

VIEIRA, Karla Moreira. Aplicação dos processos oxidativos, redutivos e (foto) eletroquímicos na degradação de fármacos em meio aquoso. 2011. 147 f. Tese (Doutorado em Ciências - Químicas) – Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

VILCHÈZE, C.; JACOBS, W.R.Jr. The mechanism of isoniazid killing: Clarity through the scope of genetics. *Annual Review of Microbiology.*, v.61, p.35-50, 2007.

VILCHEZE, C.; MORBIDONI, H. R.; WEISBROD, T. R. Inactivation of the inhA-encoded fatty acid synthase II (FASII) enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FASI end products and cell lysis of *Micobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology*, v.182, p.4059 – 4067, 2000.

VILLA, T.C.S. *et al.*, Cobertura do tratamento diretamente observado (DOTS) da Tuberculose no Estado de São Paulo (1998 a 2004).; *Revista Escola de Enfermagem, USP*, p.98-104, 2008.

VOGNA, D.; MAROTTA, R.; NAPOLITANO, A.; ANDREOZZI, R.; D'ISCHIA, M. Advanced oxidation of the pharmaceutical drug diclofenac with UV/H₂O₂ and ozone', *Water Research*, v.38, p. 414-422, 2004.

VOLKMANN, H.; SCHWARTZ, T.; BISCHOFF, P.; KIRCHEN, S. Obst U. Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). *Journal of Microbiological Methods*; v.56, p.277–86, 2004.

WARDENCKI, W; CURYŁO, J; NAMIE'SNIK, Trends in solventless sample preparation techniques for environmental analysis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 70, n.2, p. 275-288,2007.

WATERMAN, K.C., ADAMI, R.C. Accelerated again: prediction of chemical stability of pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceuticals*. v.293, p. 101-125, 2005.

WATKINSON, A.J.; MICALIZZI, G.R.; BATES, J.R.; COSTANZO, S.D. Novel method for rapid assessment of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates from environmental waters by use of a modified chromogenic agar. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 73 p.2224–2229, 2007.

WEIGEL, S.; BESTER, K.; HUHNERFUSS, H. New method for rapid solid-phase extraction of large-volume water samples and its application to non-target screening of North Sea water for organic contaminants by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 912, p. 151–161, 2001.

WEIGEL, S.; KALLENBORN, R.; HÜHNERFUSS, H. Simultaneous solid-phase extraction of acidic, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1023, p. 183–195, 2004.

WEISSBRODT, D., MCARDELL, C., KOVALOVA, L., HOLLENDER, J., SIEGRIST, H. Hospital Wastewater: mass flow analysis of pharmaceuticals and disinfectants. In: Proc. LET Conference Zurich CH, 2008.

WENZEL, A.; SCHAFERS, C. A.; SCHIMITZ, V. V. Research efforts towards the identification of endocrine disrupting chemicals. In: TERNES, T. A. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *Trends in analytical chemistry*, v. 20, n. 8, p. 419, 2001.

WILLIAMS, R.T; Human health pharmaceuticals in the environment—an introduction, in: R.T. Williams (Ed.), *Human Pharmaceuticals: Assessing the Impact on Aquatic Ecosystems*, *Society of Environmental Toxicology and Chemistry*, Pensacola, FL, p. 1–46, 2005.

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

WOLLINGER, Wagner, 2008.154 f. *Influência dos excipientes na degradação dos fármacos da associação dos tuberculostáticos isoniazida e rifampicina em comprimidos*. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

WONG, C.C.; CHU, W. The direct photolysis and photocatalytic degradation of alachlor at different TiO₂ and UV sources, *Chemosphere*, v. 50, 981-987, 2003.

WON-JIN, S., JI-WOO L. A., EUNG-SUN L. A., SUN-KYOUNG S. B, SEUNG-RYUL HWANG C, JEONG-EUN OH. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. *Chemosphere* v.82, p.179–186, 2011.

WU, J.S.; HO, H.O.; SHEU, M. T. A statistical design to evaluate the influence of manufacturing factors on the material properties and functionalities of microcrystalline cellulose. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.*, v.12, p.417-425, 2001.

XIAO, Y., CHANG, H., JIA, A., HU, J.Y. Trace analysis of quinolone and fluoroquinolone antibiotics from wastewaters by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1214, n.1-2, p.100-108, 2008,

XIU-SHENG, M.; KOENIG, B. G.; METCALFE. C. D. Analysis of acidic drugs in the effluents of sewage treatment plants using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 952, p. 139–147, 2002.

XIU-SHENG, M.; KOENIG, B. G.; METCALFE. C. D. Analysis of acidic drugs in the effluents of sewage treatment plants using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 952, p. 139–147, 2002.

XU, W.H.; ZHANG, G.; LI, X.D.; ZOU, S.C.; LI, P.; HU, Z.H.; LI, J. Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in the Pearl River Delta (PRD), South China. *Water Research*, v. 41, n.19, p.4526-4534, 2007.

YANG, S., CARLSON, K.H. Solid-phase extraction-highperformance liquid chromatography-ion trap mass spectrometry for analysis of trace concentrations of macrolide antibiotics in natural and waste water matrices. *Journal of Chromatography A*, v.1038, n.1-2, p.141-155, 2004

YANG, S., CHA, J., CARLSON, K. Simultaneous extraction and analysis of 11 tetracycline and sulfonamide antibiotics in influent and effluent domestic wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization tandemmass spectrometry. *Journal of Chromatography A* v.1097, n.1-2, p.40-53, 2005.

YOSHIOTA, S.; STELLA, V.J (2002). Chemical stability of drug substances. In: YOSHIOTA, S.; STELLA, V.J. (Ed.). *Stability of drugs and dosage forms*. New York, Kluwer Academic Publishers.

ZALAZAR, C. S.; SATUF, M. L.; ALFANO, O. M. Comparison of H₂O₂/UV and heterogeneous photocatalytic processes for the degradation of dichloroacetic acid in water”, *Environmental Science Technology*, v. 42, n. 16, p. 6198–6204, 2008.

ZHANG, Y. *Isoniazid*. In *Tuberculosis 2^a Ed* (ROM, W.N., and GRAY, S. M., eds.) Lippincott, Williams e Wilkins, Philadelphia, 2004, p.739-758.

ZHANG, Y.; HEYM, B.; ALLEN, B.; YOUNG, D.; COLE, S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*, v.358, p.591- 593, 1992.

ZHANG, Y.J; GEIßEN, S.-U; GAL, C. Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*, v.73, p.1151–1161, 2008.

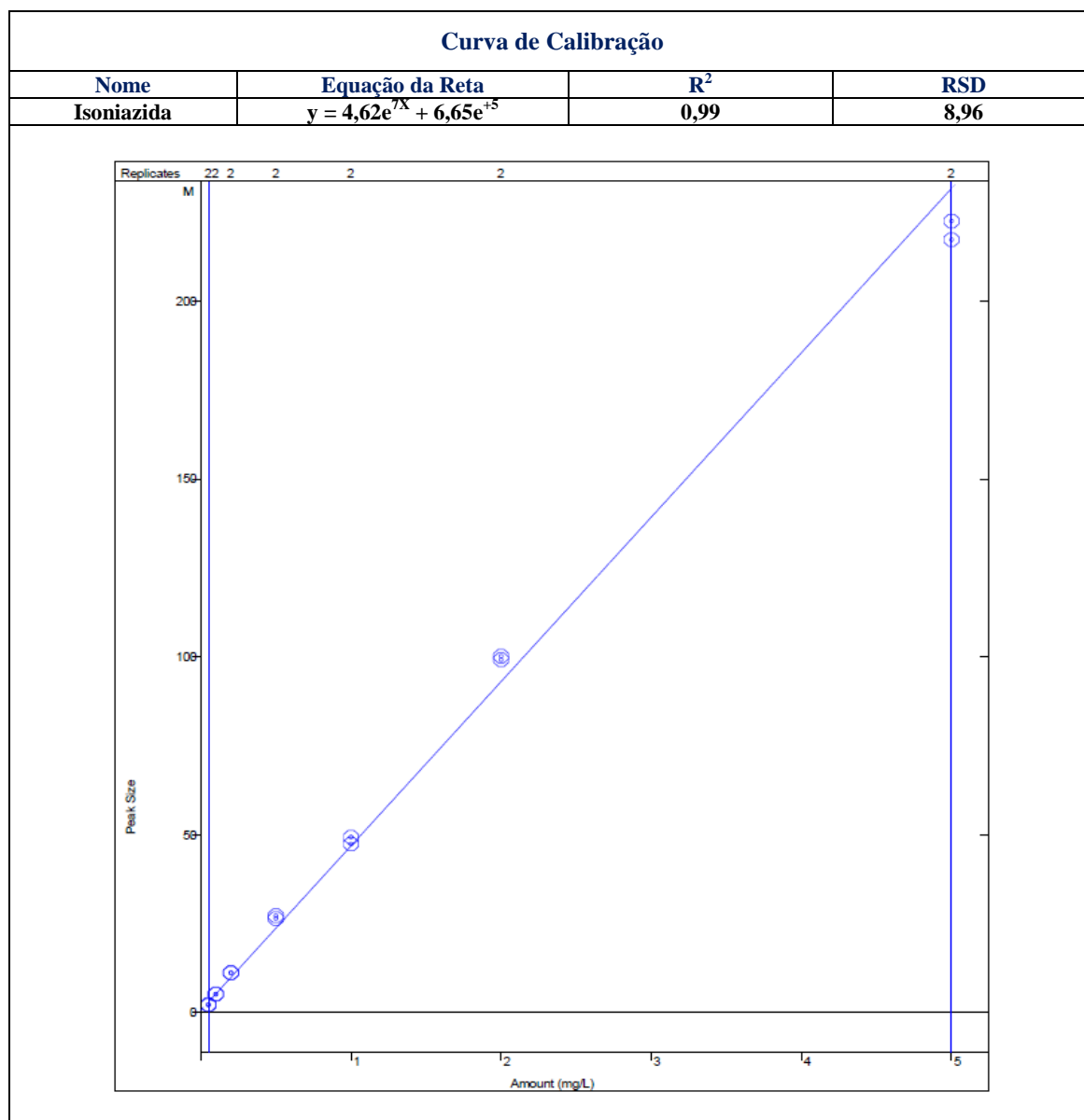
ZHANG, Y; MARRS C.F; SIMON, C; XI, C. Wastewater treatment contributes to selective increase of antibiotic resistance among *Acinetobacter spp.* *Science Total Environment* 407:3702–6, 2009.

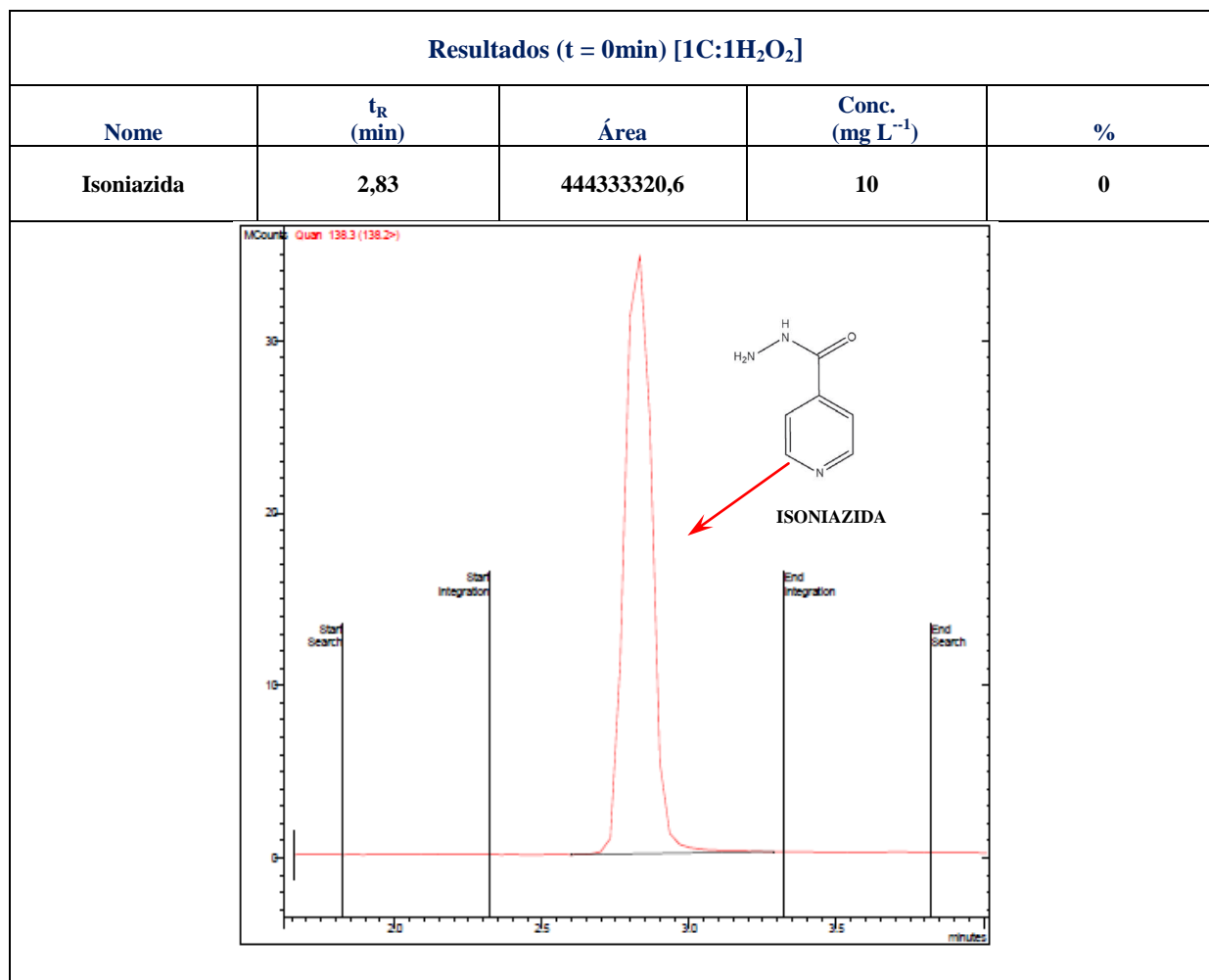
ZHONGE, M.; WU, Q.; LEE, Y. W. D.; TRACY, M.; LUKAS, S. E. Determination of puerarin in human plasma by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 823, p. 08–114, 2005.

ZUCCATO, E; CALAMARI, D; NATANGELO, M; FANELLI, R. Presence of therapeutic drugs in the environment, *Lancet*, v.355, p.1789–1790, 2000.

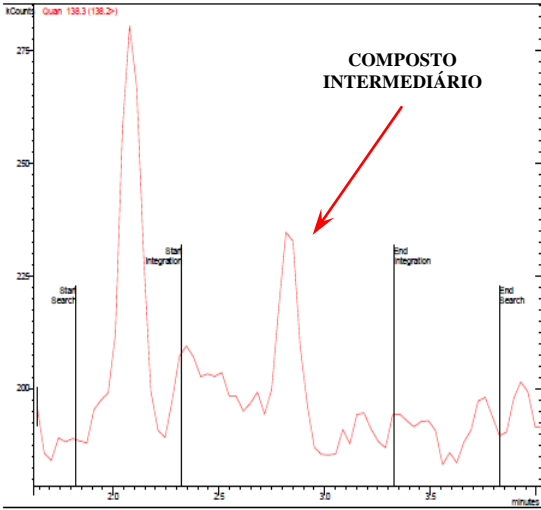
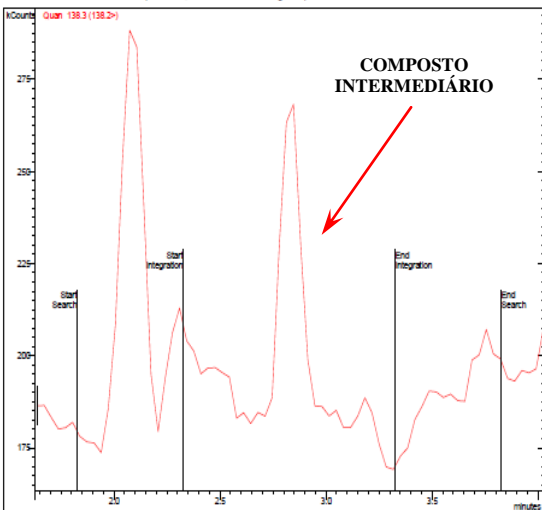
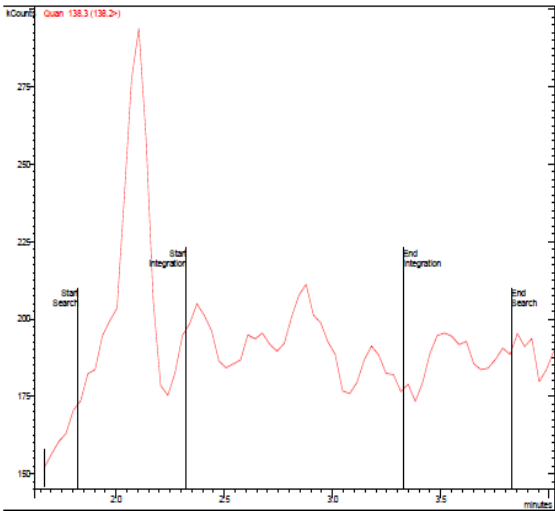
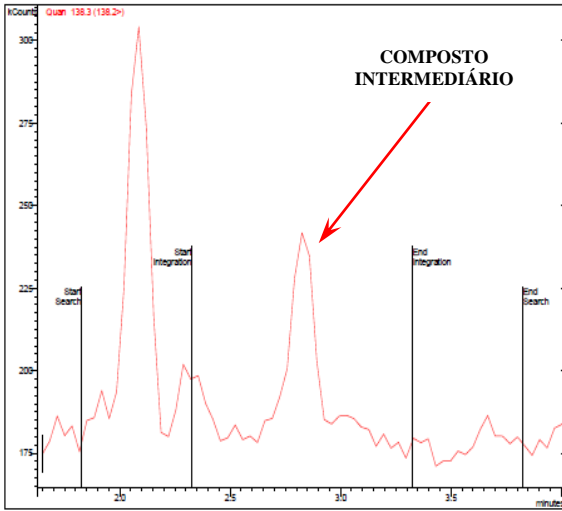
ANEXOS

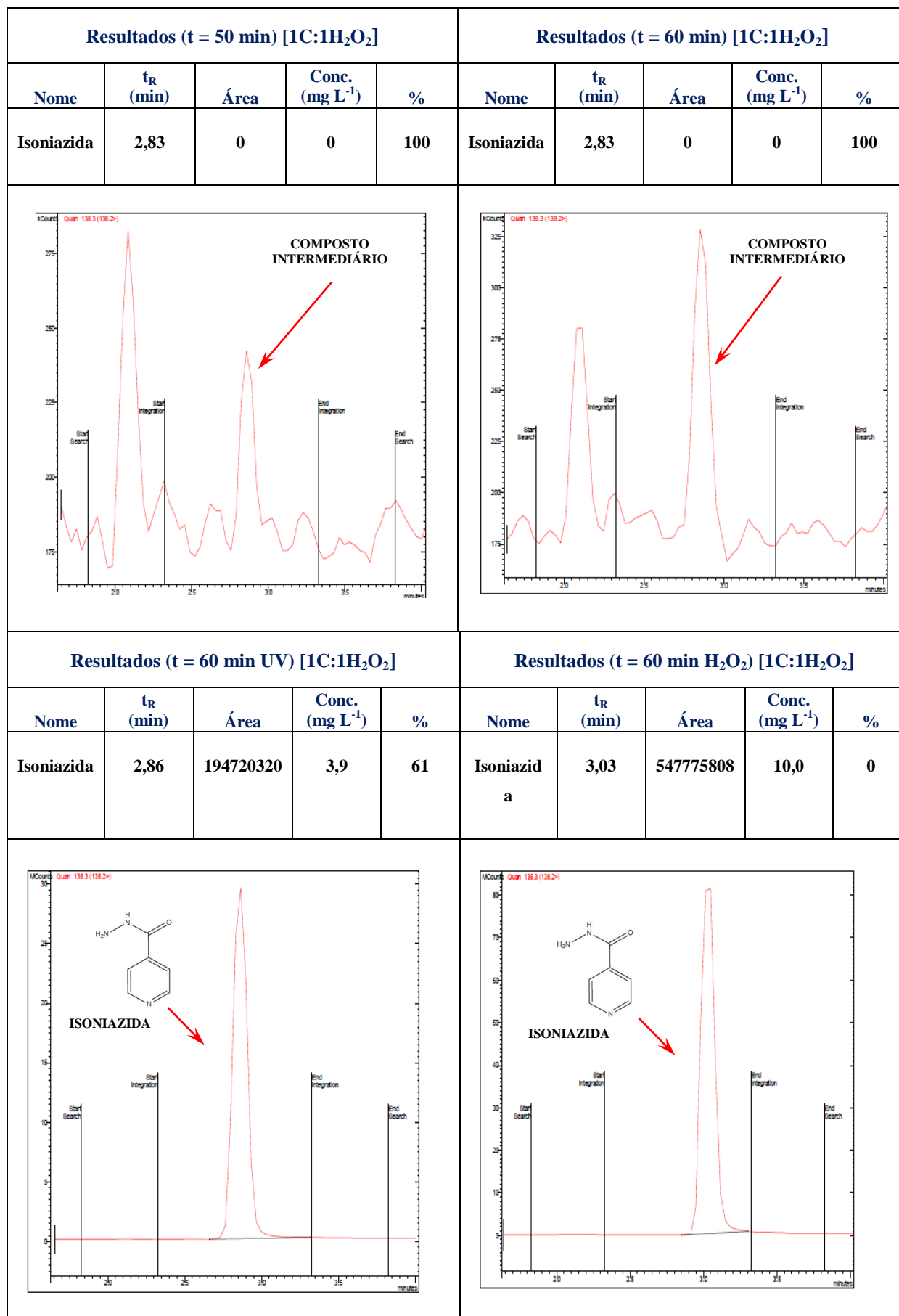
ANEXO A - CROMATOGRAMAS OBTIDOS VIA SISTEMA CLAE-EM EM TODOS OS TRH PARA O CÁLCULO DO PERCENTUAL DE DEGRADAÇÃO DA ISONIAZIDA E MONITORAMENTO DOS COMPOSTOS INTERMEDIÁRIOS FORMADOS APÓS O PROCESSO H₂O₂/UV PARA PROPORÇÃO MOLAR [1C:1H₂O₂].





Resultados (t = 1 min) [1C:1H ₂ O ₂]					Resultados (t = 3 min) [1C:1H ₂ O ₂]				
Nome	t _R (min)	Área	Conc. (mg L ⁻¹)	%	Nome	t _R (min)	Área	Conc. (mg L ⁻¹)	%
Isoniazida	2,86	4961321	0,099	99,01	Isoniazida	3,02	670878	0,085	99,2
Resultados (t = 5 min) [1C:1H ₂ O ₂]					Resultados (t = 7 min) [1C:1H ₂ O ₂]				
Nome	t _R (min)	Área	Conc. (mg L ⁻¹)	%	Nome	t _R (min)	Área	Conc. (mg L ⁻¹)	%
Isoniazida	2,85	10144752	0,202	99,8	Isoniazida	2,83	0	0	100

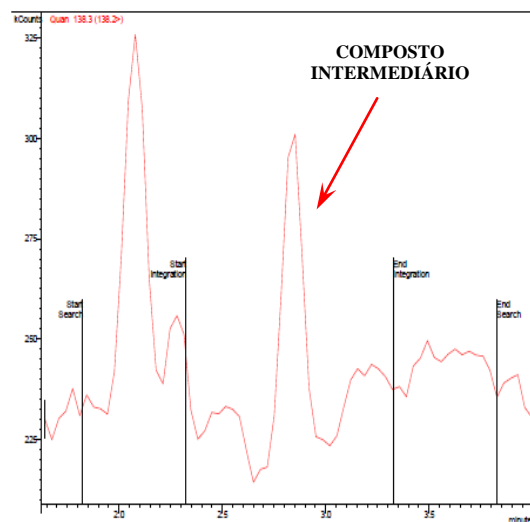
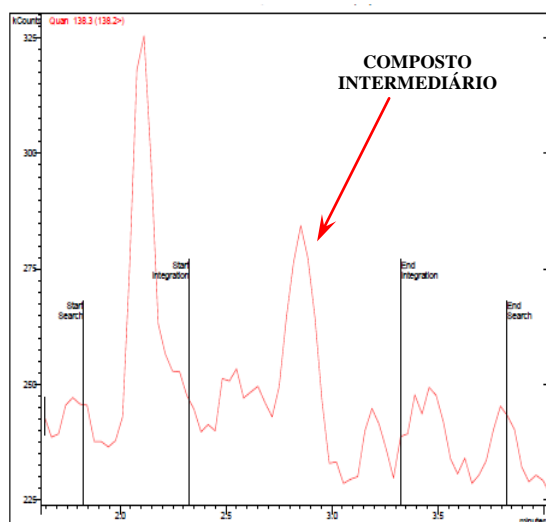
Resultados (t = 10 min) [1C:1H ₂ O ₂]					Resultados (t = 20 min) [1C:1H ₂ O ₂]				
Nome	t _R (min)	Área	Conc. (mg L ⁻¹)	%	Nome	t _R (min)	Área	Conc. (mg L ⁻¹)	%
Isoniazida	2,83	0	0	100	Isoniazida	2,83	0	0	100
									
Resultados (t = 30 min) [1C:1H ₂ O ₂]					Resultados (t = 40 min) [1C:1H ₂ O ₂]				
Nome	t _R (min)	Área	Conc. (mg L ⁻¹)	%	Nome	t _R (min)	Área	Conc. (mg L ⁻¹)	%
Isoniazida	2,83	0	0	100	Isoniazida	2,83	0	0	100
									



ANEXO B - CROMATOGRAMAS OBTIDOS VIA SISTEMA CLAE-EM EM TODOS OS TRH PARA O CÁLCULO DO PERCENTUAL DE DEGRADAÇÃO DA ISONIAZIDA E MONITORAMENTO DOS COMPOSTOS INTERMEDIÁRIOS APÓS O PROCESSO H_2O_2/UV PARA PROPORÇÃO MOLAR [1C:2 H_2O_2]

Resultados (t = 1 min) [1C:2 H_2O_2]					Resultados (t = 3 min) [1C:2 H_2O_2]				
Nome	t _R (min)	Área	Conc. (mg L ⁻¹)	%	Nome	t _R (min)	Área	Conc. (mg L ⁻¹)	%
Isoniazida	2,9	403771008	8,0	20	Isoniazida	2,9	95979904	1,9	98
Resultados (t = 5 min) [1C:2 H_2O_2]					Resultados (t = 7 min) [1C:2 H_2O_2]				
Nome	t _R (min)	Área	Conc. (mg L ⁻¹)	%	Nome	t _R (min)	Área	Conc. (mg L ⁻¹)	%
Isoniazida	2,8	0	0	100	Isoniazida	2,8	0	0	100
Resultados (t = 10 min) [1C:2 H_2O_2]					Resultados (t = 20 min) [1C:2 H_2O_2]				

Nome	t_R (min)	Área	Conc. (mg L ⁻¹)	%	Nome	t_R (min)	Área	Conc. (mg L ⁻¹)	%
Isoniazida	2,8	0	0	100	Isoniazida	2,8	0	0	100

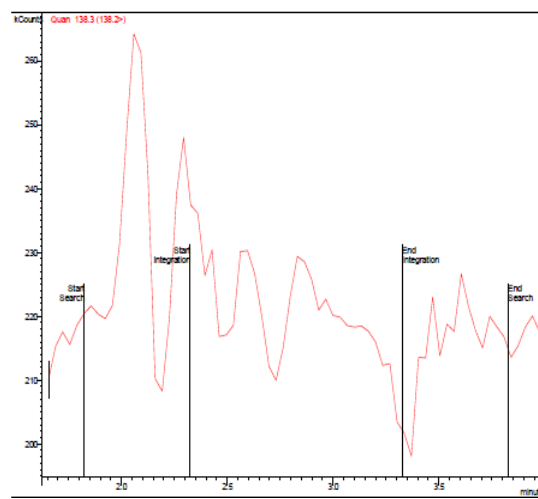
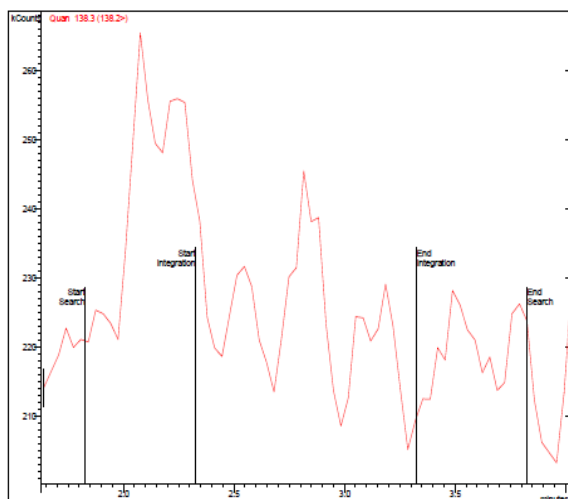


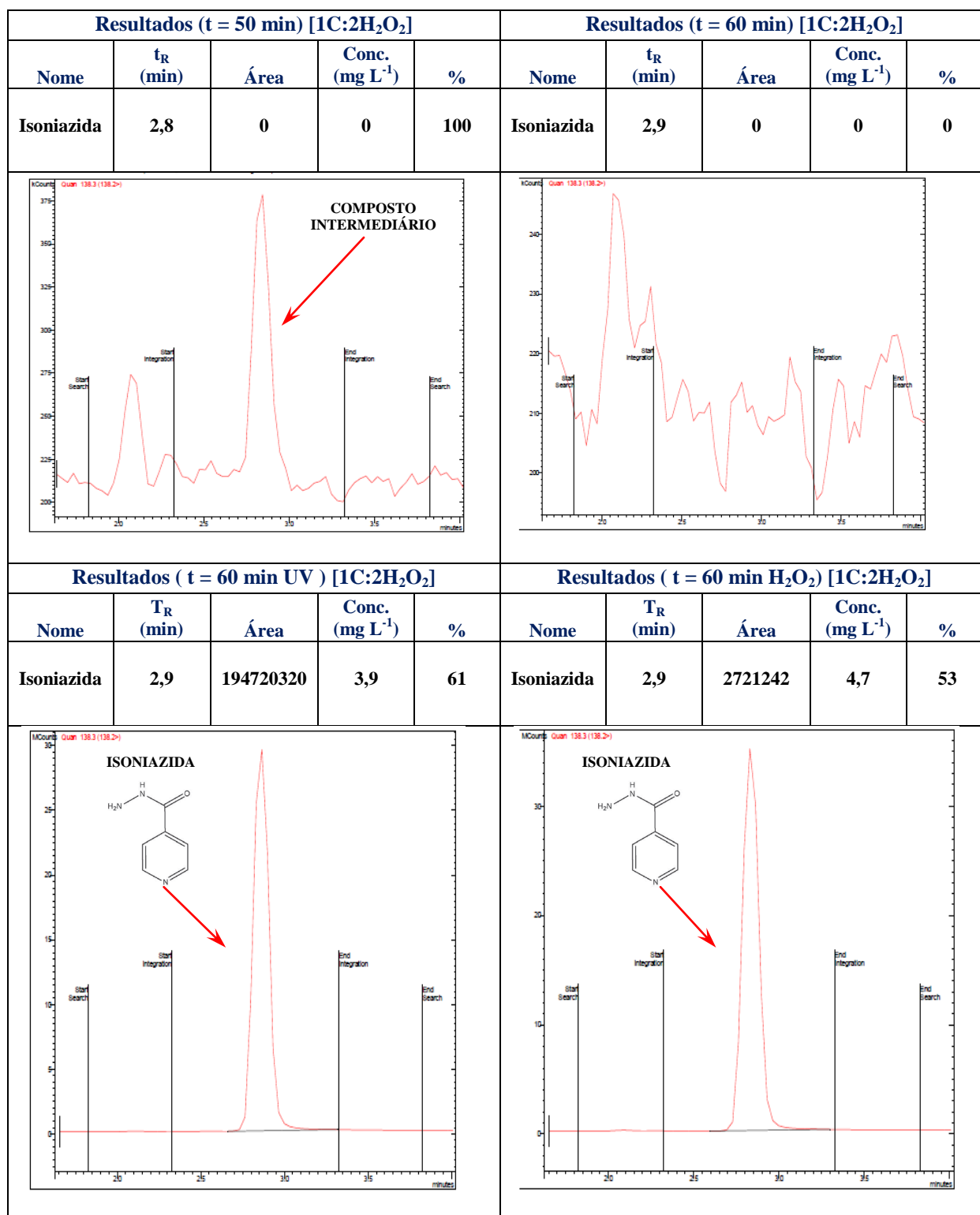
Resultados (t = 30 min) [1C:2H₂O₂]

Nome	t_R (min)	Área	Conc. (mg L ⁻¹)	%
Isoniazida	2,8	0	0	100

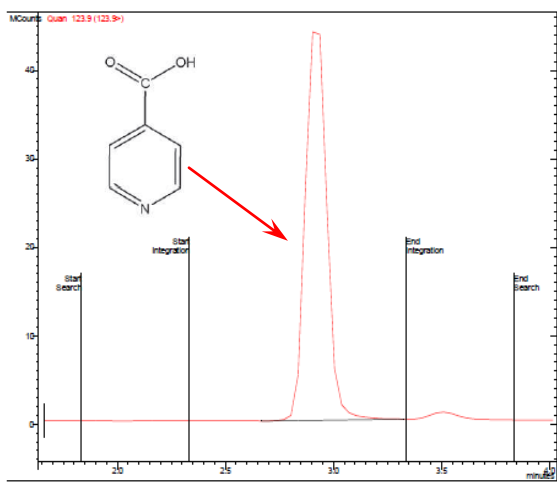
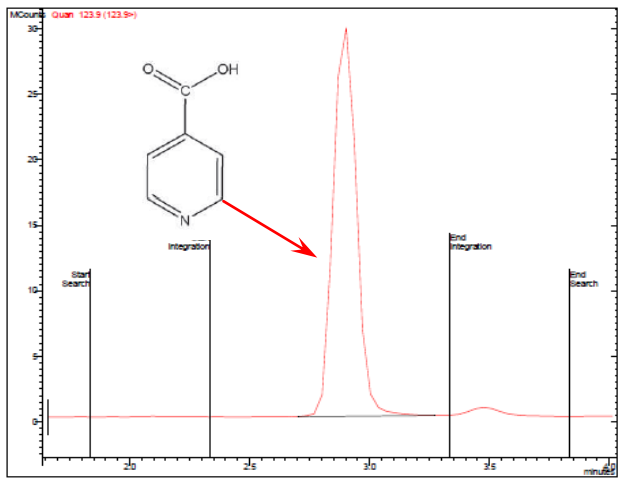
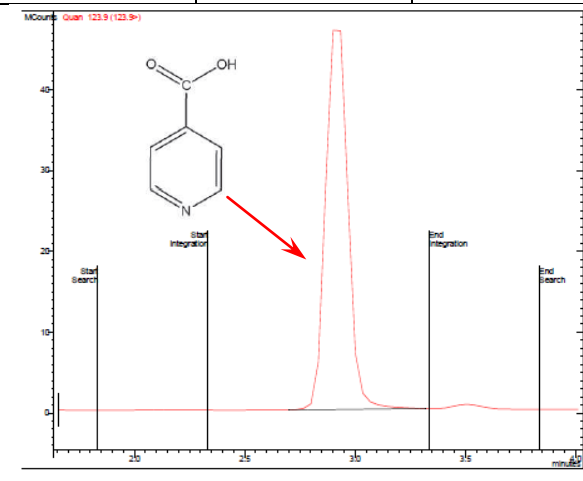
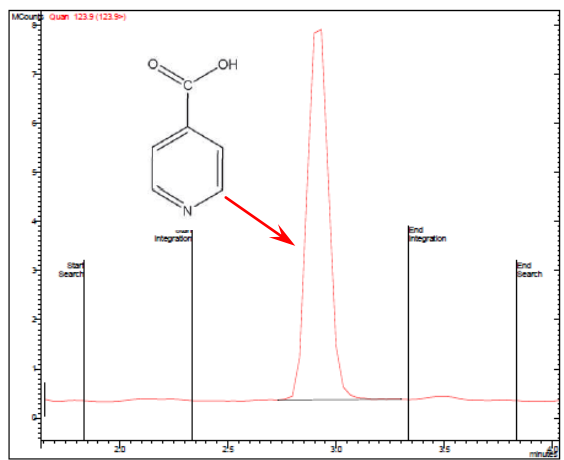
Resultados (t = 40 min) [1C:2H₂O₂]

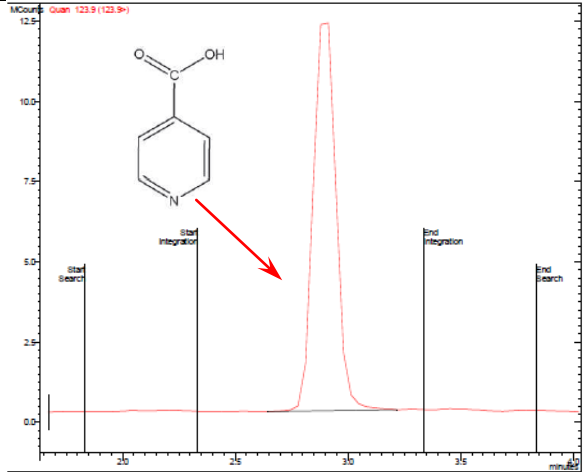
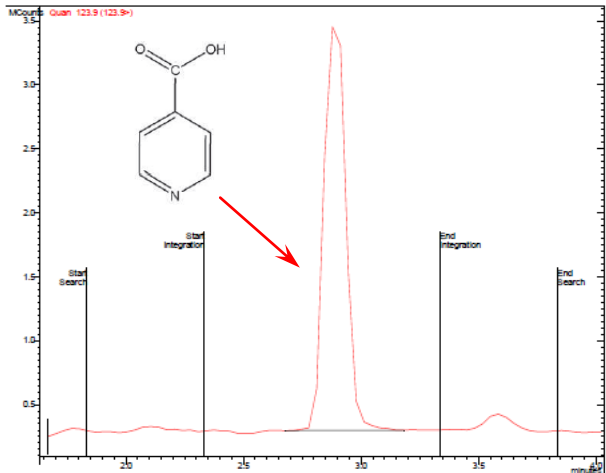
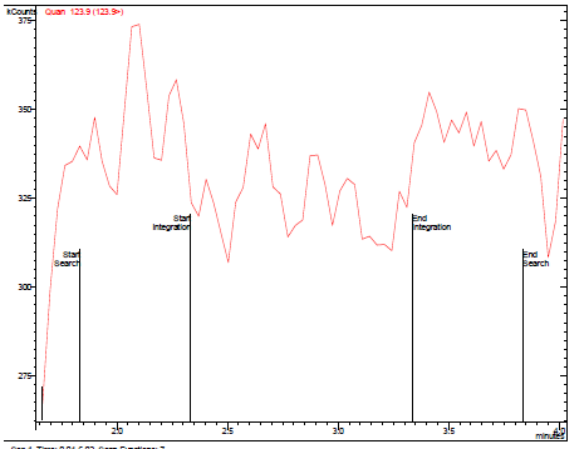
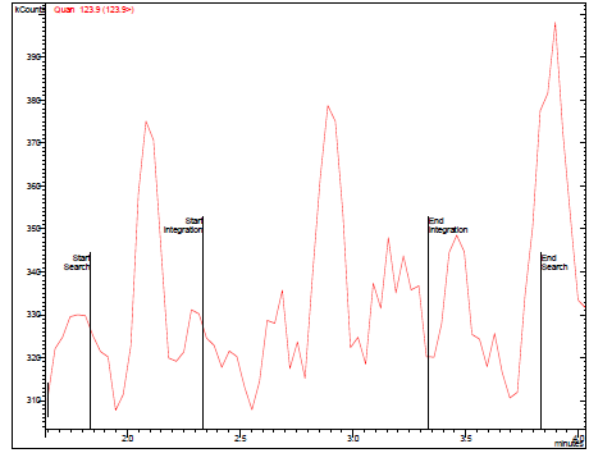
Nome	t_R (min)	Área	Conc. (mg L ⁻¹)	%
Isoniazida	2,8	0	0	100





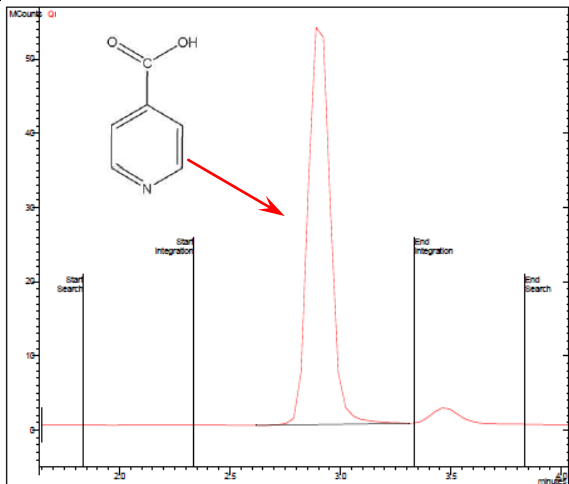
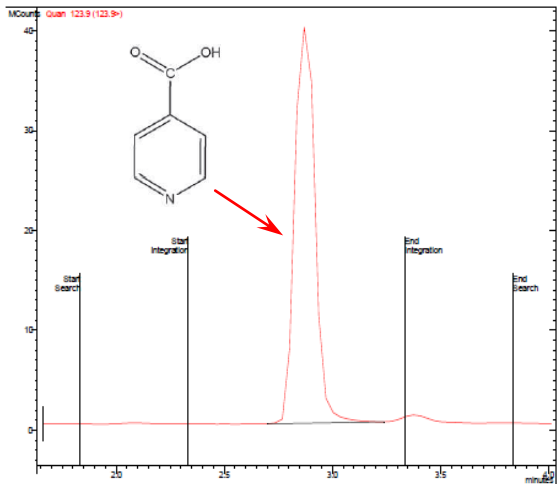
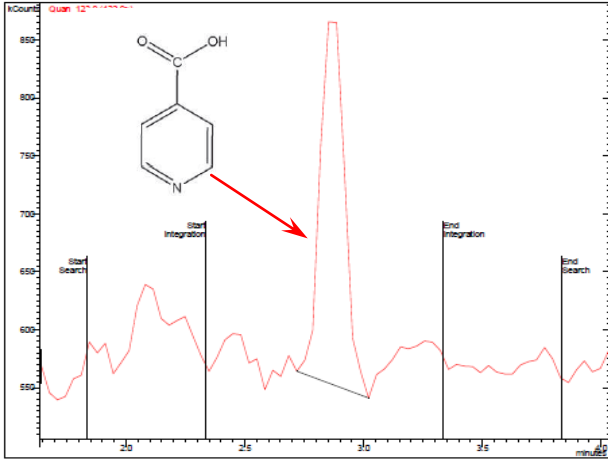
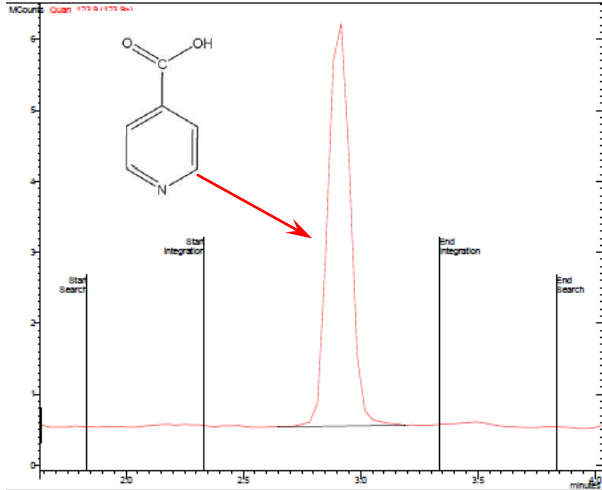
ANEXO C - CROMATOGRAMAS OBTIDOS VIA SISTEMA CLAE-EM DO COMPOSTO INTERMEDIÁRIO DA ISONIAZIDA (ÁCIDO ISONICOTÍNICO) FORMADO AO LONGO DOS TEMPOS REACIONAIS NA PROPORÇÃO MOLAR DE [1C:1H₂O₂].

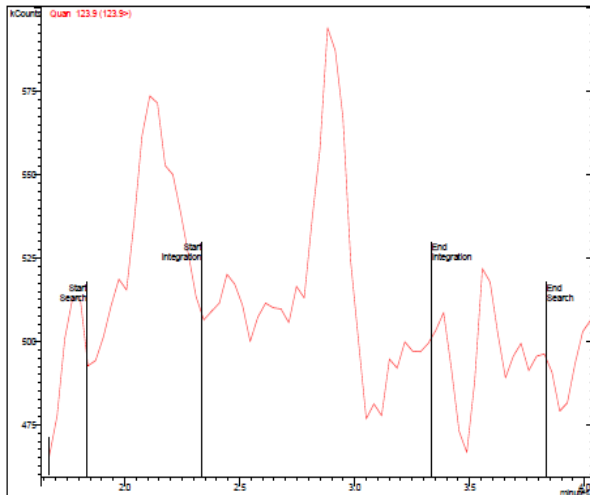
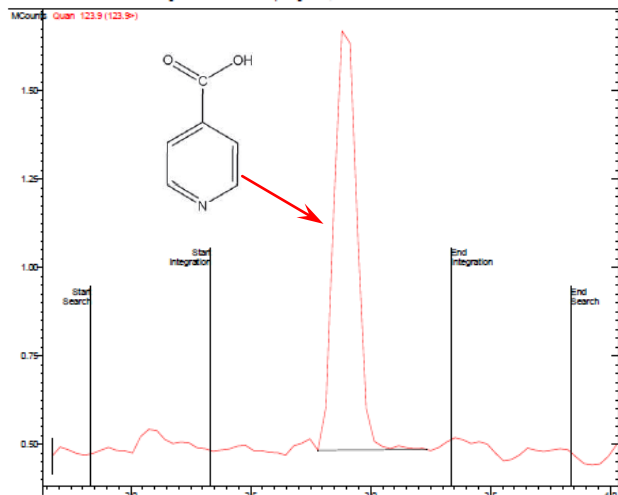
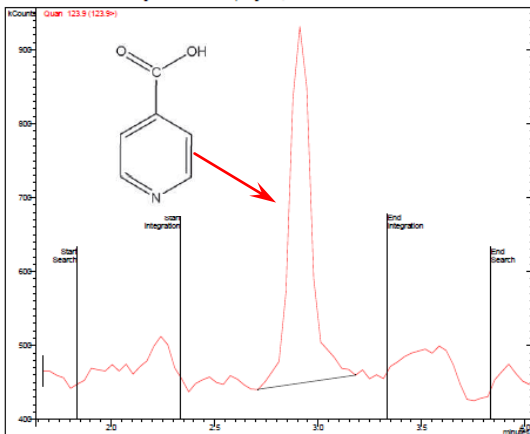
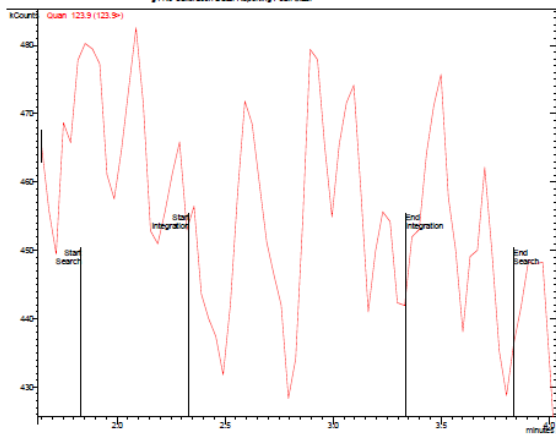
Resultados (t = 1 min) [1C:1H ₂ O ₂]			Resultados (t = 3 min) [1C:1H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Ácido Isonicotínico	2,92	676589696	Ácido Isonicotínico	2,90	494284320
					
Resultados (t = 5 min) [1C:1H ₂ O ₂]			Resultados (t = 7 min) [1C:1H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Ácido Isonicotínico	2,92	443046944	Ácido Isonicotínico	2,92	255955920
					

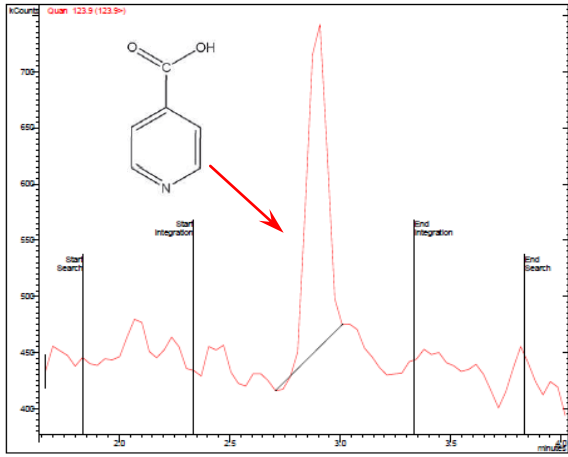
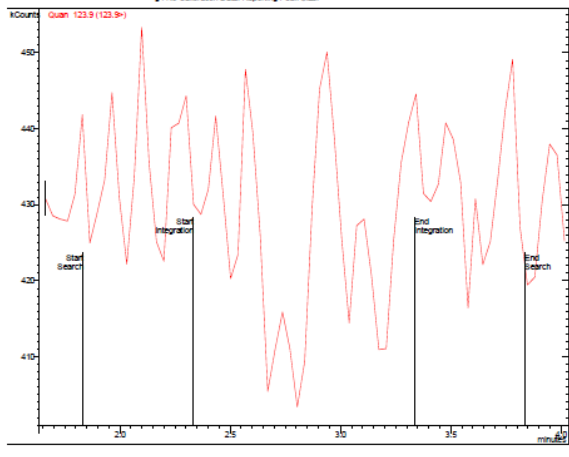
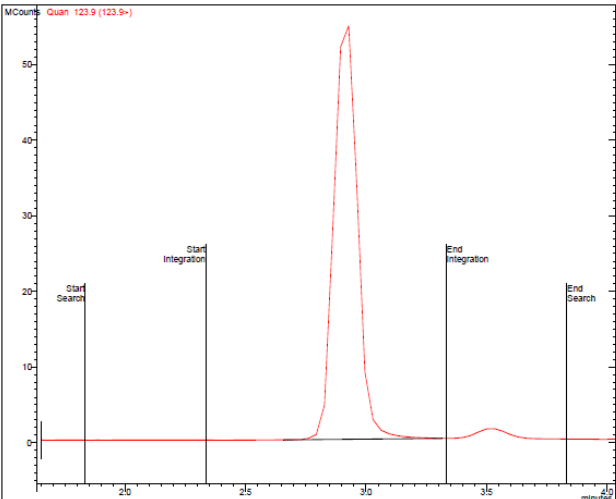
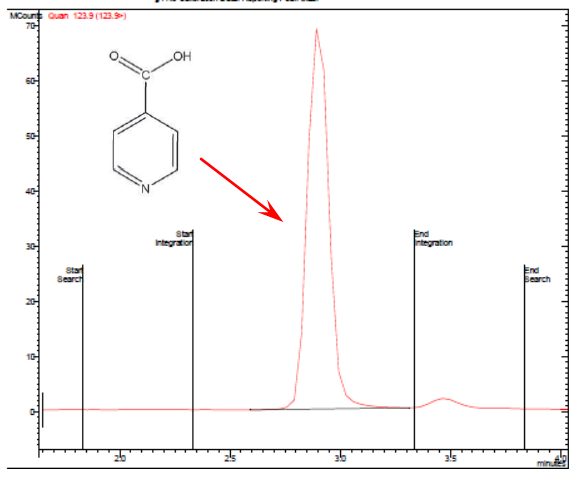
Resultados (t = 10 min) [1C:1H ₂ O ₂]			Resultados (t = 20 min) [1C:1H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Ácido Isonicotínico	2,90	150468816	Ácido Isonicotínico	2,90	7545068
					
Resultados (t = 30 min) [1C:1H ₂ O ₂]			Resultados (t = 40 min) [1C:1H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Ácido Isonicotínico	2,83	0	Ácido Isonicotínico	2,83	0
					

Resultados (t = 50 min) [1C:1H ₂ O ₂]			Resultados (t = 60 min) [1C:1H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Ácido Isonicotínico	2,83	0	Ácido Isonicotínico	2,83	0
Resultados (t = 60 min UV) [1C:1H ₂ O ₂]			Resultados (t = 60 min H ₂ O ₂) [1C:1H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Ácido Isonicotínico	2,92	376996768	Ácido Isonicotínico	2,93	320244288

ANEXO D - CROMATOGRAMAS OBTIDOS VIA SISTEMA CLAE-EM DO COMPOSTO INTERMEDIÁRIO DA ISONIAZIDA (ÁCIDO ISONICOTÍNICO) FORMADO AO LONGO DOS TEMPOS REACIONAIS NA PROPORÇÃO MOLAR DE [1C:2H₂O₂].

Resultados (t = 1 min) [1C:2H ₂ O ₂]			Resultados (t = 3 min) [1C:2H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Ácido Isonicotínico	2,90	375911328	Ácido Isonicotínico	2,87	260084240
					
Resultados (t = 5 min) [1C:2H ₂ O ₂]			Resultados (t = 7 min) [1C:2H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Ácido Isonicotínico	2,87	2278568	Ácido Isonicotínico	2,91	37921756
					

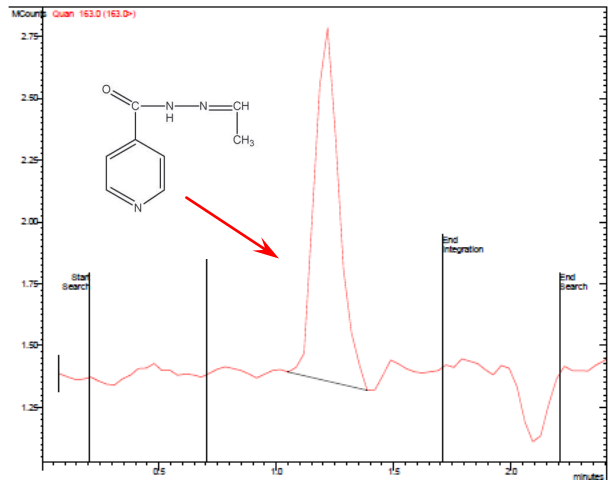
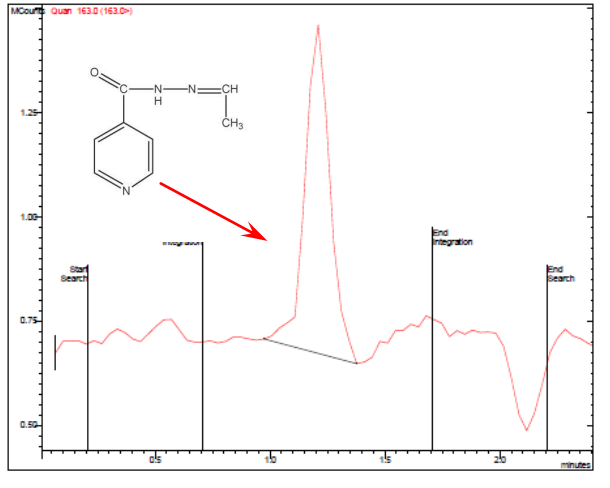
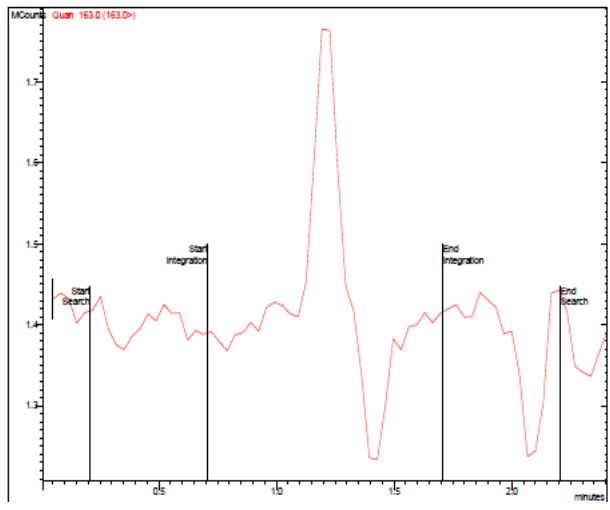
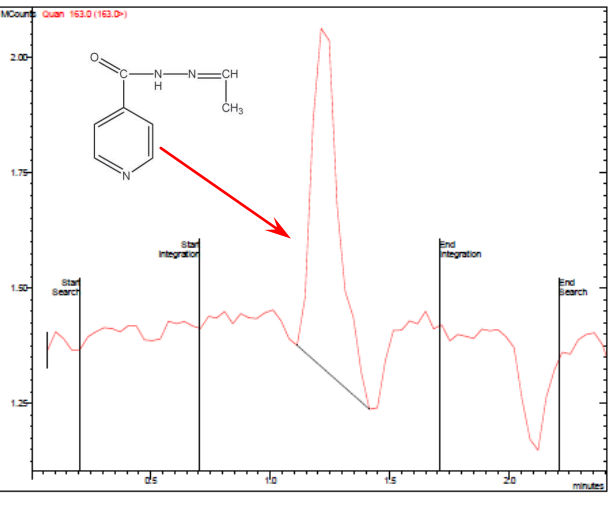
Resultados (t = 10 min) [1C:2H ₂ O ₂]			Resultados (t = 20 min) [1C:2H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Ácido Isonicotínico	2,83	0	Ácido Isonicotínico	2,90	7893153
					
Resultados (t = 30 min) [1C:2H ₂ O ₂]			Resultados (t = 40 min) [1C:2H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Ácido Isonicotínico	2,91	0	Ácido Isonicotínico	2.83	0
					

Resultados (t = 50 min) [1C:2H ₂ O ₂]			Resultados (t = 60 min) [1C:2H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Ácido Isonicotínico	2,90	0	Ácido Isonicotínico	2,83	0
					
Resultados (t = 60 min UV) [1C:2H ₂ O ₂]			Resultados (t = 60 min H ₂ O ₂) [1C:2H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Ácido Isonicotínico	2,92	376996768	Ácido Isonicotínico	2,90	251056832
					

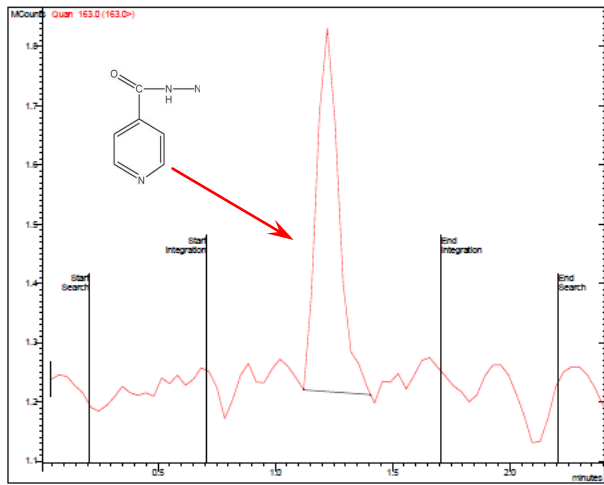
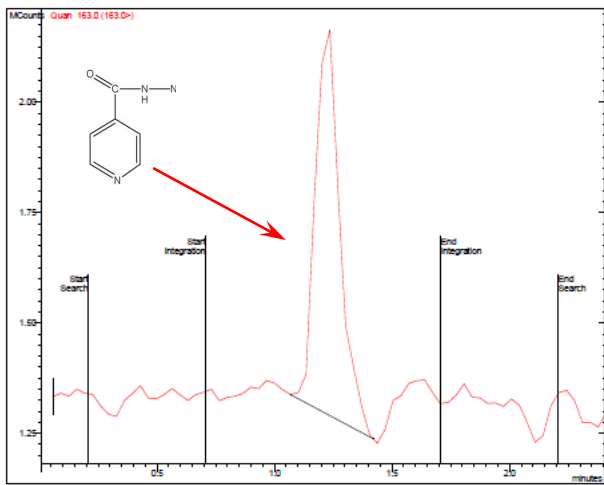
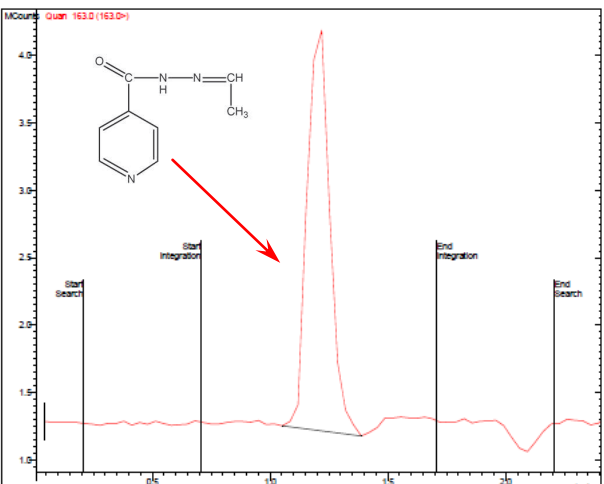
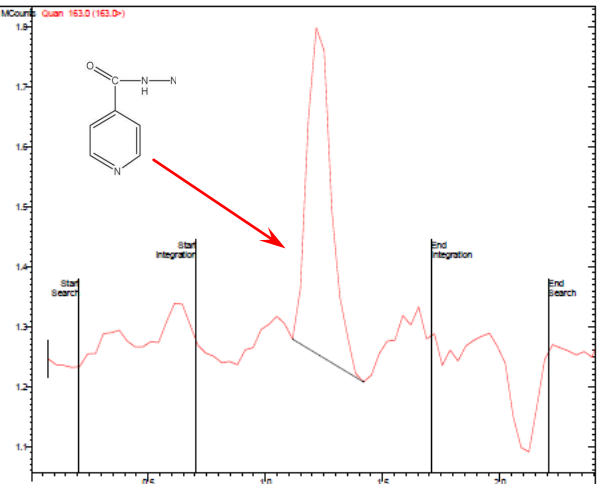
ANEXO E - CROMATOGRAMAS OBTIDOS VIA SISTEMA CLAE-EM DO COMPOSTO INTERMEDIÁRIO DA ISONIAZIDA (ÁCIDO ISONICOTÍNICO ETILIDENO HIDRAZIDA) FORMADO AO LONGO DOS TEMPOS REACIONAIS NA PROPORÇÃO MOLAR DE [1C:1H₂O₂].

Resultados (t = 1 min) [1C:1H ₂ O ₂]			Resultados (t = 3 min) [1C:1H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Ácido isonicotínico etilideno hidrazida	1,21	17809380	Ácido isonicotínico etilideno hidrazida	1,22	17021740
Resultados (t = 5 min) [1C:1H ₂ O ₂]			Resultados (t = 7 min) [1C:1H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Ácido isonicotínico etilideno hidrazida	1,22	4113180	Ácido isonicotínico etilideno hidrazida	1,23	19485790

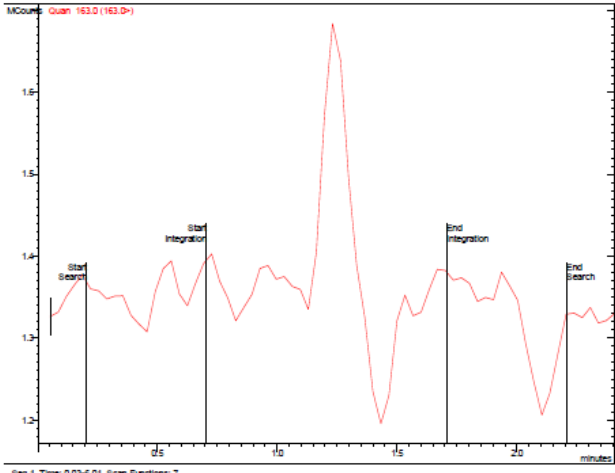
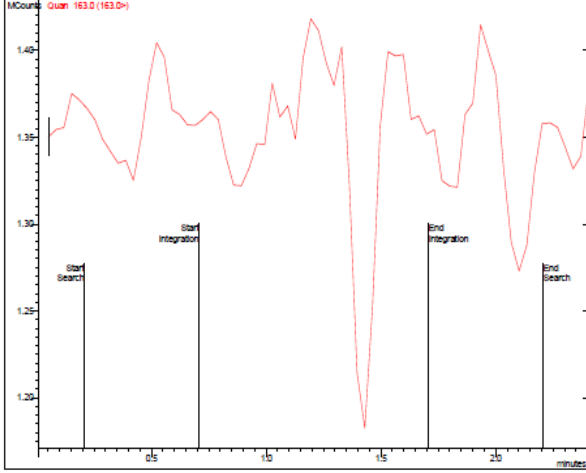
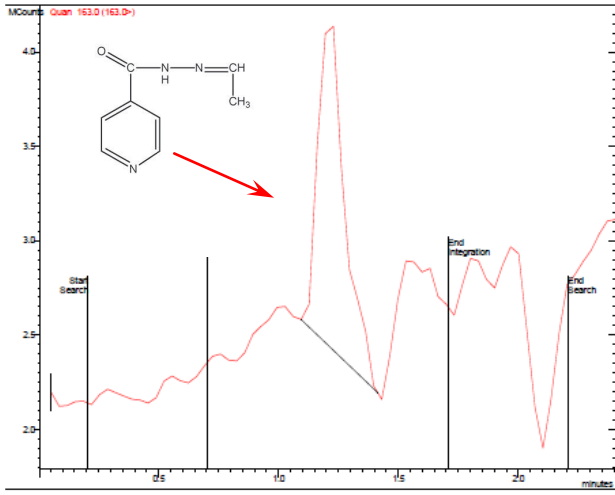
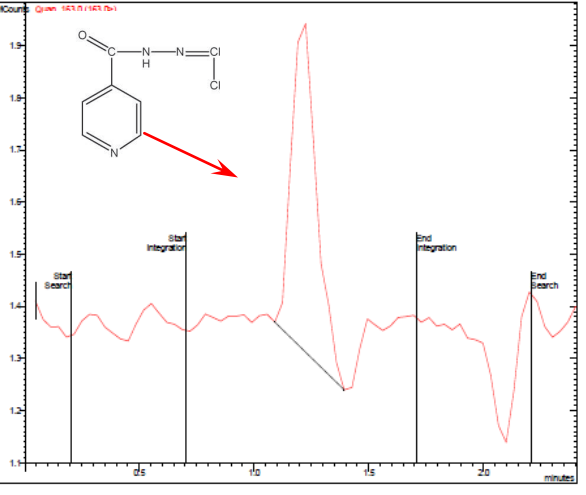
Resultados (t = 10 min) [1C:1H ₂ O ₂]			Resultados (t = 20 min) [1C:1H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Ácido isonicotínico etilideno hidrazida	1,21	11685921	Ácido isonicotínico etilideno hidrazida	1,22	50027800
Resultados (t = 30 min) [1C:1H ₂ O ₂]			Resultados (t = 40 min) [1C:1H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Ácido isonicotínico etilideno hidrazida	1,23	10351073	Ácido isonicotínico etilideno hidrazida	1,22	17199014

Resultados (t = 50 min) [1C:1H ₂ O ₂]			Resultados (t = 60 min) [1C:1H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Ácido isonicotínico etilideno hidrazida	1,21	10358260	Ácido isonicotínico etilideno hidrazida	1,21	5934468
					
Resultados (t = 60 min UV) [1C:1H ₂ O ₂]			Resultados (t = 60 min H ₂ O ₂) [1C:1H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Ácido isonicotínico etilideno hidrazida	1,21	13434830	Ácido isonicotínico etilideno hidrazida	1,23	5851945
					

ANEXO F - CROMATOGRAMAS OBTIDOS VIA SISTEMA CLAE-EM DO COMPOSTO INTERMEDIÁRIO DA ISONIAZIDA (ÁCIDO ISONICOTÍNICO ETILIDENO HIDRAZIDA) FORMADO AO LONGO DOS TEMPOS REACIONAIS NA PROPORÇÃO MOLAR DE [1C:2H₂O₂].

Resultados (t = 1 min) [1C:2H ₂ O ₂]			Resultados (t = 3 min) [1C:2H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Ácido isonicotínico etilideno hidrazida	1,23	6383866	Ácido isonicotínico etilideno hidrazida	1,23	4486849
					
Resultados (t = 5 min) [1C:2H ₂ O ₂]			Resultados (t = 7 min) [1C:2H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Ácido isonicotínico etilideno hidrazida	1,21	6282618	Ácido isonicotínico etilideno hidrazida	1,23	0
					

Resultados (t = 10 min) [1C:2H ₂ O ₂]			Resultados (t = 20 min) [1C:2H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Ácido isonicotínico etilideno hidrazida	1,24	0	Ácido isonicotínico etilideno hidrazida	1,21	0
Resultados (t = 30 min) [1C:2H ₂ O ₂]			Resultados (t = 40 min) [1C:2H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Ácido isonicotínico etilideno hidrazida	1,22	0	Ácido isonicotínico etilideno hidrazida	1,21	3744350

Resultados (t = 50 min) [1C:2H ₂ O ₂]			Resultados (t = 60 min) [1C:2H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Ácido isonicotínico etilideno hidrazida	1,21	0	Ácido isonicotínico etilideno hidrazida	1,21	0
					
Resultados (t = 60 min UV) [1C:2H ₂ O ₂]			Resultados (t = 60 min H ₂ O ₂) [1C:2H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Ácido isonicotínico etilideno hidrazida	1,21	13434830	Ácido isonicotínico etilideno hidrazida	1,21	4793647
					

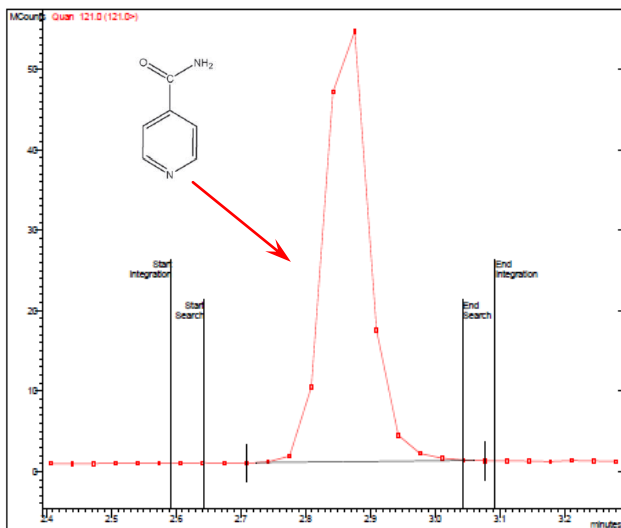
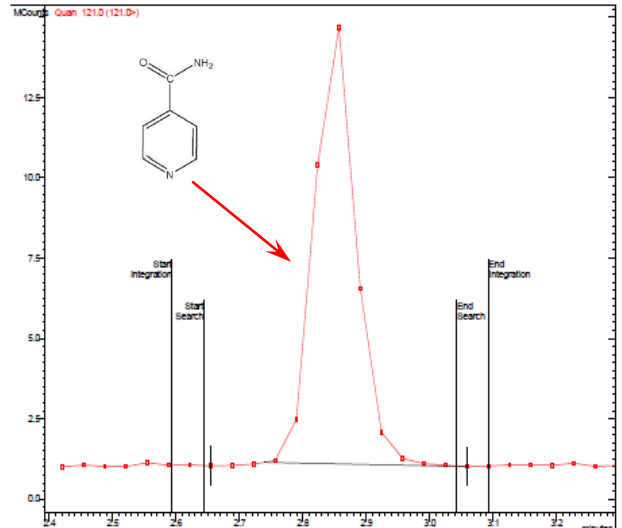
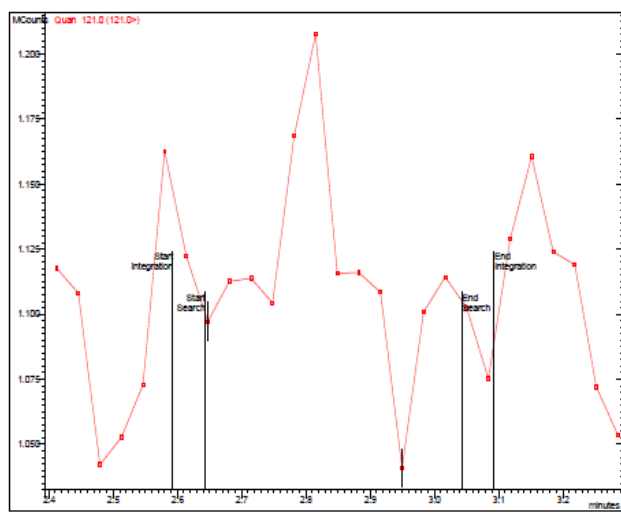
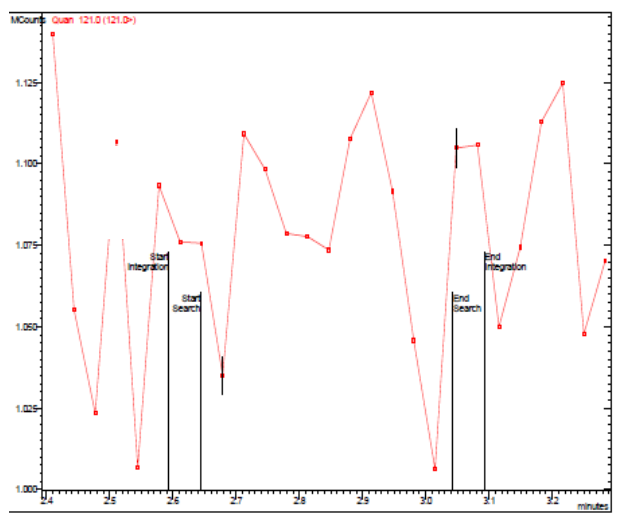
ANEXO G - CROMATOGRAMAS OBTIDOS VIA SISTEMA CLAE-EM DO COMPOSTO INTERMEDIÁRIO DA ISONIAZIDA (ISONICOTINAMIDA) FORMADO AO LONGO DOS TEMPOS REACIONAIS NA PROPORÇÃO MOLAR DE [1C:1H₂O₂].

Resultados (t = 1 min) [1C:1H₂O₂]			Resultados (t = 3 min) [1C:1H₂O₂]		
Nome	T_R (min)	Área	Nome	T_R (min)	Área
Isonicotinamida	2,84	0	Isonicotinamida	2,84	0
Resultados (t = 5 min) [1C:1H₂O₂]			Resultados (t = 7 min) [1C:1H₂O₂]		
Nome	T_R (min)	Área	Nome	T_R (min)	Área
Isonicotinamida	2,84	0	Isonicotinamida	2,84	0

Resultados (t = 10 min) [1C:1H ₂ O ₂]			Resultados (t = 20 min) [1C:1H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Isonicotinamida	2,84	0	Isonicotinamida	2,84	0
Resultados (t = 30 min) [1C:1H ₂ O ₂]			Resultados (t = 40 min) [1C:1H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Isonicotinamida	2,84	0	Isonicotinamida	2,84	0

Resultados (t = 50 min) [1C:1H ₂ O ₂]			Resultados (t = 60 min) [1C:1H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Isonicotinamida	2,84	0	Isonicotinamida	2,84	0
Resultados (t = 60 min UV) [1C:1H ₂ O ₂]			Resultados (t = 60 min H ₂ O ₂) [1C:1H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Isonicotinamida	2,84		Isonicotinamida	2,84	0

ANEXO H - CROMATOGRAMAS OBTIDOS VIA SISTEMA CLAE-EM DO COMPOSTO INTERMEDIÁRIO DA ISONIAZIDA (ISONICOTINAMIDA) FORMADO AO LONGO DOS TEMPOS REACIONAIS NA PROPORÇÃO MOLAR DE [1C:2H₂O₂].

Resultados (t = 1 min) [1C:2H ₂ O ₂]			Resultados (t = 3 min) [1C:2H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Isonicotinamida	2,86	263107024	Isonicotinamida	2,85	62606356
					
Resultados (t = 5 min) [1C:2H ₂ O ₂]			Resultados (t = 7 min) [1C:2H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Isonicotinamida	2,84	0	Isonicotinamida	2,84	0
					

Resultados (t = 10 min) [1C:2H ₂ O ₂]			Resultados (t = 20 min) [1C:2H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Isonicotinamida	2,84	0	Isonicotinamida	2,84	0
Resultados (t = 30 min) [1C:2H ₂ O ₂]			Resultados (t = 40 min) [1C:2H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Isonicotinamida	2,84	0	Isonicotinamida	2,84	0

Resultados (t = 50 min) [1C:2H ₂ O ₂]			Resultados (t = 60 min) [1C:2H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Isonicotinamida	2,84	0	Isonicotinamida	2,84	0
Resultados (t = 60 min UV) [1C:2H ₂ O ₂]			Resultados (t = 60 min H ₂ O ₂) [1C:2H ₂ O ₂]		
Nome	T _R (min)	Área	Nome	T _R (min)	Área
Isonicotinamida	2,84	0	Isonicotinamida	2,84	85446312