

Mestrado Integrado em Engenharia Química

Tecnologias alternativas de remoção de produtos farmacêuticos em matrizes aquosas

Tese de Mestrado

desenvolvida no âmbito da disciplina de

Projecto de Desenvolvimento em Ambiente Académico

Sílvia Maria Castro Coelho



Universidade do Porto

Faculdade de Engenharia

FEUP

Departamento de Engenharia Química

Orientadora na FEUP: Dr.^a Lúcia Santos

Fevereiro de 2008

*“Aparelhei o barco da ilusão
E reforcei a fé de marinheiro.
Era longe o meu sonho, (...)*

*Mas corto as ondas sem desanimar,
Em qualquer aventura,
O que importa é partir, não é chegar.”*

Miguel Torga, Antologia Poética.

Agradecimentos

Na conclusão do Projecto de Desenvolvimento em Ambiente Académico não poderia deixar de agradecer a algumas pessoas que contribuíram para a realização deste Projecto.

Quero agradecer à minha orientadora, a Professora Doutora Lúcia Santos, pela ajuda na concretização deste projecto; no apoio e disponibilidade que demonstrou.

Agradeço às pessoas do Laboratório, a ajuda e amabilidade prestada, durante o dia a dia.

À Eng.^a Salomé pela sua ajuda sempre oportuna.

Aos meus pais e ao meu irmão, a paciência e amor imprescindíveis.

A todos os meus amigos, a compreensão e amizade dedicadas no decorrer deste período de trabalho e a sua contribuição na minha aprendizagem assim como a partilha de experiências.

Ao Eng.^o Luís Carlos pela ajuda e a todos os funcionários do Departamento de Engenharia Química.

Resumo

Os produtos farmacêuticos no ambiente representam potenciais riscos de saúde do consumidor sendo, deste modo, uma questão ambiental bastante pertinente. As concentrações antropogénicas destes poluentes emergentes têm vindo a aumentar, podendo gerar pressões selectivas favoráveis a bactérias resistentes e provocando efeitos deletérios para os seres vivos.

Com vista a abrandar as ameaças dos poluentes na sociedade e no nosso ambiente, é imprescindível tirar partido dos benefícios que temos adquirido ao longo dos anos. Para tal, os produtos excedentários agrícolas, como a casca de noz, tornaram-se importantes alternativas para ensaios de adsorção e, portanto, de possível remoção de poluentes de soluções aquosas.

Neste projecto de desenvolvimento, utilizaram-se processos como a Adsorção e a Oxidação com Reagente de Fenton para a Remoção/Degradação de antibióticos (cloranfenicol). No caso particular do processo de Adsorção, foi determinado o tempo de equilíbrio e procedeu-se a ajustes dos modelos das isotérmicas de adsorção/dessorção. No processo oxidativo, avaliou-se a possibilidade da Oxidação Química com Reagente de Fenton como uma alternativa eficiente na degradação do cloranfenicol.

Numa primeira fase, procedeu-se a ensaios de caracterização da casca de noz e estudou-se o tempo necessário para atingir o equilíbrio de adsorção bem como as isotérmicas de adsorção/dessorção que se podiam aplicar. Numa fase posterior, foi realizado um ensaio de oxidação com Reagente de Fenton, de modo a verificar o comportamento do cloranfenicol face a este processo. O método de análise utilizado para quantificar o cloranfenicol foi a cromatografia líquida de alta pressão com detector *diode array*.

No processo de Adsorção, a remoção do cloranfenicol das matrizes aquosas segue, aproximadamente, uma cinética de pseudo-segunda ordem, e a isotérmica que mais se ajusta é a de Freundlich. Foram adquiridas remoções na ordem dos 65%. Pelos ensaios de dessorção constatou-se que o adsorvente utilizado é um bom adsorvente e, por conseguinte, não permite a dessorção em água.

Na oxidação com Reagente de Fenton verificou-se que, nas condições específicas utilizadas, este processo apenas garante uma remoção de 20% do antibiótico da matriz aquosa.

Palavras-chave: Cloranfenicol; Cromatografia líquida de alta pressão; Cinética de adsorção; Isotérmicas de adsorção; Resíduos de antibióticos.

Abstract

Pharmaceutical drugs in the environment represent potential health risks for the consumer, being as such a quite relevant environmental question. The anthropogenic concentrations of these emerging pollutants have been increasing, potentially generating favourable selective pressures to resistant bacterias, causing deleterious effects on living organisms.

To decrease the menace of these pollutants in society and in our environment, it is vital to take the best out of the benefits that we have been acquiring over the years. To accomplish that, the agricultural by-product, such as the nut shell, have become important alternatives for adsorption rehearsals and, therefore, of possible removal of pollutants of aqueous solutions.

On the project at hand, many processes were used such as Adsorption and Fenton's reagent oxidation for the removal/degradation of antibiotics (chloramphenicol). In Adsorption, specifically, the contact time for sufficient adsorption of antibiotics was timed and some adjustments were made to the adsorption/desorption isotherms. The possibility of using Fenton's reagent oxidation as an efficient alternative to the degradation of chloramphenicol was evaluated, in the oxidation process.

In a first step, nut shell characterization assays were made and there was studied the time needed to achieve adsorption equilibrium as well as adsorption/desorption isotherms that could be applied. In a later phase, Fenton's reagent oxidation experiment was performed to check the chloramphenicol's behavior. The analytical method used to quantify the chloramphenicol was liquid chromatography with diode-array detection.

In the adsorption process, the removal of chloramphenicol from aqueous matrices follows, approximately, a pseudo-second-order kinetics, being the Freundlich's isothermal the most suited. Removals of 65% have been acquired. In the desorption assays, it was acknowledged that the adsorbent used is good and, as such, it does not allow the desorption in water.

In Fenton's reagent oxidation, it was verified that in the specific utilized conditions, this process only guarantees a 20% removal of the antibiotic of the aqueous matrice.

Keywords: Chloramphenicol; high-performance liquid chromatography; kinetic adsorption; adsorption isotherms; Antibiotic residue.

Índice

1	Introdução	1
1.1	Enquadramento e Apresentação do Projecto.....	1
1.2	Poluentes Emergentes	2
1.2.1	Fármacos no meio ambiente	3
1.2.2	Fármacos nos alimentos	4
1.3	Antibiótico.....	5
1.4	Cloranfenicol.....	8
1.4.1	Limites Legais do Cloranfenicol	10
1.5	Liberação controlada de antibióticos	11
1.6	Métodos de Remoção de poluentes.....	12
1.6.1	Oxidação Avançada	12
1.6.2	Adsorção.....	14
1.7	Isotérmicas de Adsorção	16
1.8	Cinética de Adsorção	18
1.9	Adsorventes	19
1.10	Métodos de Detecção de Resíduos de Medicamentos em Matrizes Aquosas	20
1.11	Método Analítico seleccionado para a Determinação do Cloranfenicol em Matrizes Aquosas	20
1.12	Contributos do Trabalho	21
1.13	Organização da Tese	22
2	Estado da Arte	23
3	Descrição Técnica.....	27
3.1	Quantificação de cloranfenicol por HPLC-DAD	27
3.1.1	Método de Análise	27
3.1.2	Recta de Calibração	29
3.1.3	Validação do Método Analítico	29
3.2	Adsorção em <i>Batch</i> utilizando casca de noz	29
3.2.1	Tratamento e Caracterização da casca de noz	29

3.2.2	Tempo de equilíbrio	30
3.2.3	Isotérmica de Adsorção	32
3.2.4	Isotérmica de Dessorção	33
3.3	Oxidação com Reagente de Fenton.....	33
3.4	Regras de Segurança.....	34
4	Resultados e Discussão	35
4.1	Caracterização da Casca de Noz	35
4.2	Validação do Método Analítico	37
4.3	Adsorção em <i>Batch</i>	39
4.3.1	Tempo de equilíbrio	39
4.3.2	Cinética de Adsorção	41
4.3.3	Isotérmica de Adsorção/Dessorção	41
4.4	Oxidação com Reagente de Fenton.....	43
5	Conclusões.....	45
6	Avaliação do trabalho realizado.....	46
6.1	Objectivos Realizados.....	46
6.2	Limitações e Trabalho Futuro	46
6.3	Apreciação final	47
7	Referências.....	48
Anexo 1	56
1.1	Preparação da Solução-mãe e Soluções Intermédias de Cloranfenicol	55
1.2	Preparação das Soluções-padrão.....	55
Anexo 2	Caracterização da Casca de Noz	57
Anexo 3	Funcionamento do HPLC.....	58
Anexo 4	Ensaio Preliminares.....	60
Anexo 5	Validação do Método Analítico.....	62
5.1	Recta de Calibração	62
5.1.1	Parâmetros de Linearidade.....	64
5.1.2	Repetibilidade	65
Anexo 6	Ensaio em <i>Batch</i>.....	67

6.1	Adsorvente - Casca de Noz	67
6.1.1	Tempo de Equilíbrio	67
6.1.2	Cinética de Adsorção	68
6.1.3	Isotérmica de Adsorção	71
6.2	Adsorvente - Cinza de Casca de Noz	72
Anexo 7	Oxidação com reagente de Fenton	74

Lista de Figuras

<i>Figura 1.1 - Percursos dos Fármacos no Ambiente</i>	3
<i>Figura 1.2 - Etapas metabólicas afectadas por antibióticos</i>	6
<i>Figura 1.3 - Estrutura química do Cloranfenicol</i>	8
<i>Figura 3.1 - Equipamento de HPLC-DAD</i>	28
<i>Figura 3.2 - Incubadora orbital</i>	30
<i>Figura 3.3 - Oxidação com Reagente de Fenton</i>	33
<i>Figura 4.1 - Distribuição de tamanhos das partículas da casca de noz</i>	36
<i>Figura 4.2 - Recta de Calibração obtida para o antibiótico cloranfenicol, por HPLC-DAD</i>	37
<i>Figura 4.3 - Gráfico da concentração de cloranfenicol presente na matriz aquosa face à sua respectiva remoção</i>	40
<i>Figura 4.4 - Concentração e Remoção de Cloranfenicol versus quantidade de adsorvente</i>	42
<i>Figura 2.i - Espectro da análise da casca de noz através da técnica de FTIR</i>	57
<i>Figura 3.i - Procedimento para purificar a água destilada</i>	58
<i>Figura 3.ii - Cromatograma obtido por análise de HPLC-DAD</i>	59
<i>Figura 6.i - Representação gráfica da concentração de antibiótico na matriz aquosa face à sua respectiva remoção de noz</i>	67
<i>Figura 6.ii - Gráfico da concentração de antibiótico na matriz aquosa face à sua respectiva remoção</i>	67
<i>Figura 6.iii - Representação gráfica da concentração de antibiótico na matriz aquosa face à sua respectiva remoção usando 500 mg de casca de noz</i>	68
<i>Figura 6.iv - Representação gráfica da concentração de antibiótico na matriz aquosa face à sua respectiva remoção usando 1000 mg de casca de noz</i>	68
<i>Figura 6.v - Cinética de adsorção segundo o modelo pseudo-primeira ordem para 100 e 300 mg de casca de noz</i>	69
<i>Figura 6.vi - Cinética de adsorção segundo o modelo pseudo-primeira ordem para 500 e 600 mg de casca de noz</i>	69
<i>Figura 6.vii - Cinética de adsorção segundo o modelo pseudo-primeira ordem para 1000 mg de casca de noz</i>	69
<i>Figura 6.viii - Cinética de adsorção de acordo com modelo de pseudo-segunda ordem para 100 e 300 mg de casca de noz</i>	70

Figura 6.ix - Cinética de adsorção de acordo com modelo de pseudo-segunda ordem para 500 e 600 mg de casca de noz 70

Figura 6.x - Cinética de adsorção de acordo com modelo de pseudo-segunda ordem para 1000 mg de casca de noz 70

Figura 6.xi - Isotérmica de Langmuir do cloranfenicol em casca de noz..... 71

Figura 6.xii - Isotérmica Linear do cloranfenicol em casca de noz 71

Figura 6.xiii - Isotérmica de Freundlich do cloranfenicol em casca de noz 71

Figura 6.iv - Gráfico da concentração de antibiótico versus remoção usando 50 e 100 mg de cinza de casca de noz 73

Figura 6.v - Gráfico da concentração de antibiótico versus remoção usando 300 e 500 mg de cinza de casca de noz 73

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1.1 - Propriedades Físicas e Químicas do Cloranfenicol.</i>	<i>10</i>
<i>Tabela 2.1 - Métodos de quantificação e detecção do cloranfenicol estudados. ...</i>	<i>24</i>
<i>Tabela 3.1 - Tempo de permanência dos matrizes no agitador orbital.</i>	<i>31</i>
<i>Tabela 3.2 - Quantidade de adsorvente utilizada nos ensaios de adsorção.</i>	<i>32</i>
<i>Tabela 3.3 - Quantidade de adsorvente por cada matraz com 10 mL de cloranfenicol com concentração 1 mg · L⁻¹</i>	<i>32</i>
<i>Tabela 4.1- Grupos Funcionais presentes no FTIR obtido da casca de noz.</i>	<i>35</i>
<i>Tabela 4.2 - Propriedades Físicas da Casca de noz.</i>	<i>36</i>
<i>Tabela 4.3 - Parâmetros calculados da recta de calibração.</i>	<i>38</i>
<i>Tabela 4.4 - Parâmetros do modelo de cinética Pseudo-segunda ordem.</i>	<i>41</i>
<i>Tabela 4.5 - Parâmetros do modelo de Freundlich.</i>	<i>42</i>
<i>Tabela 4.6 - Parâmetros calculados dos ensaios de Oxidação.</i>	<i>43</i>
<i>Tabela 1.i - Volume de solução de concentração 11,03 mg L⁻¹ utilizado</i>	<i>43</i>
<i>Tabela 1.ii - Volume de solução intermédia utilizado.</i>	<i>56</i>
<i>Tabela 4.i - Tempos de retenção e área obtida por HPLC para cada padrão.</i>	<i>60</i>
<i>Tabela 4.ii - Condições de cada corrida</i>	<i>61</i>
<i>Tabela 5.i - Dados obtidos para a recta de calibração</i>	<i>60</i>
<i>Tabela 5.ii - Parâmetros calculados para o estudo da linearidade do equipamento HPLC</i>	<i>60</i>
<i>Tabela 5.iii - Parâmetros calculados dos ensaios de precisão intermédia</i>	<i>60</i>
<i>Tabela 5.iv - Parâmetros calculados dos ensaios de repetibilidade, em dois dias consecutivos</i>	<i>60</i>
<i>Tabela 6.i - Resultados obtidos dos cromatogramas para diferentes quantidades de cinza</i>	<i>72</i>
<i>Tabela 6.ii - Resultados obtidos dos cromatogramas para diferentes quantidades de cinza</i>	<i>72</i>
<i>Tabela 7.i - Características dos Reagentes utilizados na Oxidação</i>	<i>74</i>

Notação e Glossário

A	Área	m^2
$\overline{\text{Área}}$	Área média	m^2

Letras gregas

μ	micro
-------	-------

Índices

*	variável adimensional
<i>i</i>	índice ou contador

Lista de Siglas

q	Concentração de adsorvato na fase adsorvida	$mg \cdot g^{-1}$
C	Concentração de adsorvato na fase líquida	$mg \cdot L^{-1}$
K	Constante de Henry	$L \cdot g^{-1}$
q_0	Concentração máxima de cobertura da única camada	$mg \cdot g^{-1}$
b	Constante de equilíbrio de Langmuir	$L_{\text{solução}} \cdot mg^{-1}$
q_{eq}	Concentração no adsorvente no equilíbrio	$mg \cdot g^{-1}$
C_{eq}	Concentração na solução no equilíbrio	$mg \cdot L^{-1}$
K_F	<i>Constante de Freundlich</i>	*
n	<i>Constante de Freundlich</i>	*
q_e	Capacidade de adsorção no equilíbrio	$mg \cdot g^{-1}$
q	Capacidade individual num certo tempo	$mg \cdot g^{-1}$
k_1	Constante de primeira ordem	min^{-1}
k_2	Constante de segunda ordem	$g \cdot (mg^{-1} \cdot min^{-1})$
t	Tempo	min
b	Declive na origem	
a	Ordenada na origem	
s_b	Desvio padrão do declive	
s_a	Desvio padrão na origem	

IC _b	Intervalo de confiança b	
IC _a	Intervalo de confiança a	
CV	Coeficiente de variação	
$\overline{Conc.}$	Concentração média	mg · L ⁻¹
$\frac{S_y}{x}$	Desvio padrão residual	
LD	Limite de detecção	μV · L ⁻¹
S	Desvio padrão	
C ₀	Concentração do soluto na solução inicial	mg · L ⁻¹
V	Volume da solução	L
m	Massa de adsorvente	g
ETAR's	Estações de Tratamento de Águas Residuais	
DECO	Associação de Defesa do Consumidor	
mRNA	RNA mensageiro	
tRNA	RNA transferência	
MRL	Limite máximo de resíduo	
CQO	Carência química de oxigênio	
PAHs	Hidrocarbonetos cíclicos arom	
ESI- LC/MS/MS	Ressonância Magnética Nuclear	
LC-ESI-MS-MS	Cromatografia líquida acoplada à ionização “eletrospray” e espectrometria de massa em série	
HPLC-UV	Cromatografia líquida de alta pressão com detector ultravioleta	
GC-ECD	Cromatografia gasosa com detector captura electrónica	
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Pressão com detector <i>Diode Array</i>	
LC-MS/MS	MS cromatografia líquida de espectrometria de massas em serie	
GS/MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa	
GC-ECD	Cromatografia gasosa com detector captura electrónica	
HPLC/MS	Cromatografia líquida de alta pressão acoplada à espectrometria de massa	
DAD	Detector diodo array	
UV	Radiação ultravioleta	
MEKC	Cromatografia electrocinética micelar	
MIP	Molecularly imprinted polymer	
cloran	Cloranfenicol	
FTIR	Fourier transform Infrared spectroscopy	
r.p.m.	Rotações por minuto	

PTFE Politetrafluoretileno

Ref.^a Referência

1 Introdução

1.1 Enquadramento e Apresentação do Projecto

A água é um bem indispensável para a vida e, por conseguinte, é fundamental a sua qualidade. A principal preocupação com a água passou das condições de higiene, aquando do seu tratamento, para o fenómeno que é a sua contaminação.

Os problemas ambientais, nos últimos anos, têm estado bastante em voga. A perda de qualidade do ar, da água e do solo são derivados do aumento de químicos tóxicos. É prioritário o desenvolvimento de medidas com vista a restabelecer o equilíbrio.

A poluição de águas superficiais e subterrâneas tem como causas: o abuso de adubos e pesticidas nas actividades agrícolas, a deposição de resíduos industriais que podem ser dissolvidos e arrastados por águas de infiltração em terrenos vulneráveis, deposição de excreções animais resultantes de actividades pecuárias e, até mesmo de excreções domésticas, entre outras [1].

A deposição e libertação de numerosos poluentes emergentes nas águas superficiais, resultado de descargas industriais, agrícolas e domésticas, têm suscitado um intenso trabalho de investigação. Devido à sua toxicidade, os poluentes tendem a acumular-se nos sedimentos e águas do meio, permanecendo, assim, ao longo da cadeia alimentar.

Hoje em dia, há a preocupação de inovar e desenvolver métodos analíticos rigorosos na determinação de fármacos e o interesse na procura de resultados satisfatórios no processo de remoção/degradação destes [2]. Vários estudos realizados sugerem que a adsorção de poluentes em partículas sólidas, os processos membranares e o processo de oxidação avançada sejam os processos fulcrais na eliminação destes poluentes dos sistemas aquáticos [3].

Este projecto tem como objectivo o estudo de tecnologias alternativas de remoção de produtos farmacêuticos em matrizes aquosas. No caso concreto, o produto farmacêutico em estudo é o antibiótico cloranfenicol. Apesar de ser estritamente proibido, continua a ser administrado em animais e, por conseguinte, a contaminar as águas.

Foram objectivos no decorrer do projecto, a adsorção em *batch* do cloranfenicol em casca de noz, com intuito de determinar o tempo de equilíbrio e as isotérmicas de adsorção; a sua degradação com Reagente de Fenton e a validação do método de análise por HPLC-DAD.

1.2 Poluentes Emergentes

Os poluentes emergentes são químicos bioactivos, como os produtos farmacêuticos e de higiene pessoal, a gasolina, os desinfectantes, etc [4].

Na terminologia farmacêutica, uma substância química utilizada para fins medicinais denomina-se de fármaco. É o caso dos antibióticos, dos anestésicos, das hormonas, dos anti-inflamatórios, entre outros. Estas substâncias são persistentes e fundamentais no tratamento de doenças tanto nos seres humanos como nos animais. A sua acção pode consistir na alteração de uma actividade biológica, ou matar e impedir a proliferação de agentes patogénicos.

No caso dos produtos farmacêuticos e, em especial, dos antibióticos, a sua utilização na medicina humana e veterinária é preocupante, uma vez que os organismos não absorvem, na totalidade, os antibióticos administrados, sendo uma grande percentagem excretada [5]. De acordo com Mulroy (2001), 50 e 90% da quantidade de fármaco é excretado sem alterações para o ambiente [1].

O uso prolongado de antibióticos é uma das principais preocupações, visto que estes compostos entram na água residual e proporcionam o aumento de estirpes bacteriológicas resistentes nos ecossistemas.

É nas Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR's) que grande parte dos produtos farmacêuticos são eliminados. A água é filtrada e os poluentes são digeridos por bactérias. Contudo, pode não ocorrer a purificação completa, sendo libertados para o meio.

No caso particular da medicina veterinária (criação de gado, aquicultura, e produção suína e avícola), os fármacos utilizados são encaminhados directamente para o meio ambiente, sem tratamento prévio. Antibióticos como o cloranfenicol e o oxitetraciclina são detectados em sedimentos marinhos, quando usados na cultura de peixes [3,5]. Teuver (1999) e Olsen *et al.* (2001) verificaram a libertação para o ambiente de compostos antimicrobianos, por processos de aquicultura.

No caso da medicina humana, Kummerer (2001) constatou que os antibióticos usados entram no ambiente, através de efluentes hospitalares e águas residuais municipais [6].

A utilização indevida de medicamentos e químicos suscita o agravamento do ambiente e, por conseguinte, da saúde pública.

De diversos estudos conclui-se que a contaminação química é um problema genérico e que, apesar dos baixos níveis de fármacos no meio ambiente, significa uma grande preocupação para a saúde do Homem e do nosso Globo [7].

A região do Alentejo e a sua vulnerabilidade foi tema de notícia, em 2007, uma vez que o elevado consumo de fármacos originários da elevada taxa de população idosa são factores que, aliados à grande produção e aos poucos recursos agrícolas, acarretam sérios problemas para o ambiente. É, deste modo, importante a consciencialização de todos para este problema e o melhoramento da remoção de tais poluentes no ambiente [7].

1.2.1 Fármacos no meio ambiente

A libertação de fármacos no ambiente apresenta muitos aspectos adversos no domínio do ambiente, podendo originar a resistência bacteriana, ou seja, os microrganismos ficam imunes aos antibióticos, pois alteram o seu material genético. Isto origina a ineficácia desses mesmos fármacos no tratamento de doenças. Ocorre mutação espontânea e recombinação genética.

Através da grande percentagem de medicamentos que entra nos efluentes das ETAR's pode haver a contaminação das lamas produzidas nestas estações. Por sua vez, as lamas, quando aplicadas para enriquecimento dos solos, contaminam os aquíferos (formações rochosas permeáveis capazes de armazenar quantidades significativas de água.

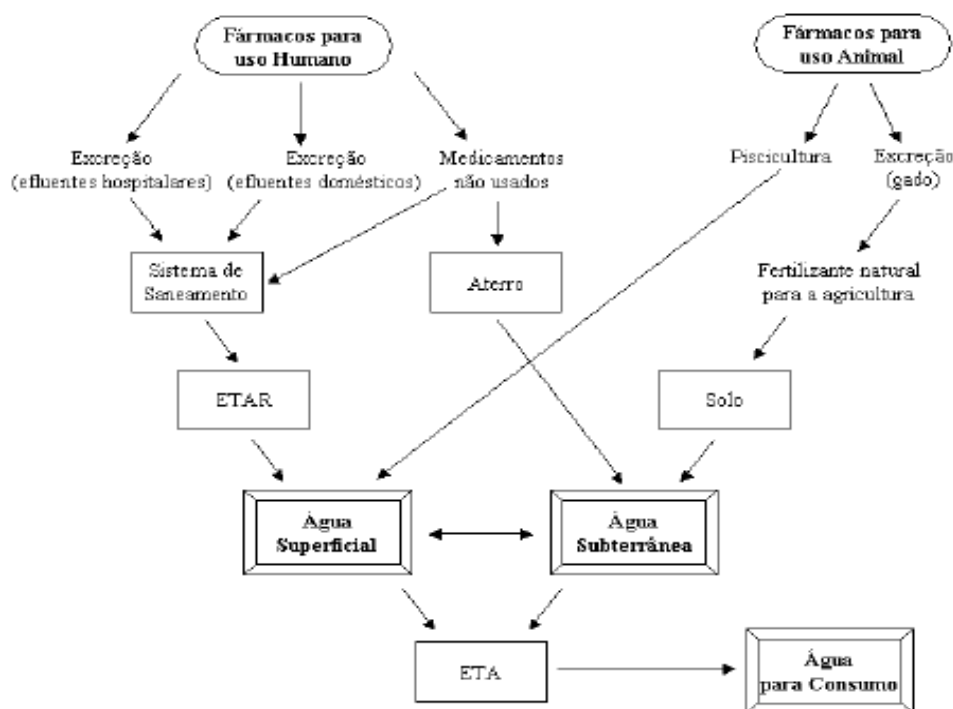


Figura 1.1 - Percursos dos Fármacos no Ambiente (adaptado de [8]).

Com o intuito de avaliar o impacto ambiental de fármacos, vários pesquisadores investiram no desenvolvimento e estudo de eventuais efeitos de toxicidade e na concepção de métodos para a degradação de fármacos no ambiente e no meio aquático [9]. Abaixo são realçados alguns dos estudos.

Miranda *et al.* (1998) indagaram a resistência microbiana numa espécie de *Aeromonas* isolada do meio aquático, concluindo-se que tal resistência ocorreu em antibióticos como o cloranfenicol, sulfametoxazol e tetraciclina [10].

Van der Bogaard *et al.* (2000) analisaram amostras fecais na Suécia e na Holanda e constataram a existência de bactérias resistentes a antibióticos [9].

Kolpin *et al.* (2002) verificaram a presença de antibióticos, como por exemplo: tetraciclina, sulfonamidas e fluoroquinolonas em amostras de águas superficiais nos Estados Unidos [4].

Vários investigadores estudaram os efeitos, no ambiente, do uso de antibióticos na aquicultura, constatando que há desenvolvimento de bactérias em sedimentos marinhos [11].

Stuer-Lauridsen *et al.* (2000) realizaram um estudo de análise de risco ambiental evidenciando os vinte fármacos mais usados na Dinamarca [12].

Boxall *et al.* (2002) investigaram a adsorção de antibióticos e sulfonamidas no solo e a facilidade dessas substâncias em serem transportadas para as águas de subsolo e superficiais [13].

São poucos os estudos sobre a mobilidade dos antibióticos no solo. Alder *et al.* (2001) relataram a contaminação de águas superficiais após lixiviação de antibióticos nos solos [14].

Uma notícia recente refere o desagrado de descargas suínicas em Leiria, na ribeira de Milagres [15].

The New York Times noticiou as descargas, por parte das indústrias de tratamento de esgotos, para os rios. Com efeito, em 1999, amostras de rios foram objecto de pesquisa, verificando-se a presença de resíduos de medicamentos [16].

1.2.2 Fármacos nos alimentos

O abuso de medicamentos em animais que são fonte de alimentos é uma inquietação para a sociedade, visto que a resistência a agentes antimicrobianos associada ao animal é transmitida aos seres humanos. Assim, o tratamento com antibióticos é, de certa forma, contraproducente.

Dixon (2001) confirmou existir transferência de resistência a antibióticos presente nos animais, que são produtores de alimentos, entre os quais as sulfonamidas e o cloranfenicol [17].

Foram estudados antibióticos como o cloranfenicol e os nitrofuranos em camarões que crescem em viveiros. Concluiu-se que há grandes riscos para os seres humanos [18].

Foi notícia, em 2005, pela Associação de Defesa do Consumidor (DECO), a presença do antibiótico cloranfenicol em três marcas de geleia. Segundo uma técnica alimentar desta mesma associação, este antibiótico não funciona em termos de intoxicação alimentar. O seu efeito é visível a longo prazo. É de salientar que já em 2003, este antibiótico tinha sido detectado em amostras de mel vendidos em Portugal [19].

Embora o cloranfenicol seja exemplo de um antibiótico proibido em muitos países, a investigação de amostras de leite pasteurizado, comercializado no Brasil, permitiram concluir a presença deste antibiótico. É necessário a monitorização de resíduos, com vista a evitar contaminação e garantir a qualidade da saúde humana [20].

Em 2007 foi publicada uma lista de fármacos utilizados no leite, há cerca de duas décadas, entre eles o formol, a soda cáustica, a tetraciclina e o cloranfenicol [21].

1.3 Antibiótico

O antibiótico é uma substância química originada a partir de microrganismos, capazes de impedir, em pequenas doses, o crescimento de agentes patogénicos. São compostos administrados para tratamento de doenças. Actualmente já existem as drogas sintéticas e semi-sintéticas com efeito semelhante ao dos antibióticos [22].

Desde os meados da década de 50 que os antibióticos têm sido utilizados na pecuária, no tratamento de doenças, infecções, mas também no melhoramento a nível alimentar [9].

Os antibióticos classificam-se: em aminoglicosidos, β -lactamas, macrólido, sulfonamidas, tetraciclinas, entre outras.

Os antibióticos apresentam características como:

- a Toxicidade selectiva - relacionada com a capacidade de actuar, de modo selectivo, sobre o microrganismo, sem provocar danos no hospedeiro.
- o Espectro de acção - relacionado com a diversidade dos organismos que podem ser afectados pelos agentes antimicrobianos.

- a Síntese - Microbiana: correspondem a produtos de metabolismo secundário.
 - Química: sulfonamidas, cloranfenicol, entre outros.
 - Semi-Sintética: antibióticos naturais, alterados pela adição de grupos químicos, que os torna menos aptos à inativação pelos microrganismos [23].

As etapas metabólicas, mais importantes, dos agentes antimicrobianos estão esquematizadas na figura seguinte:

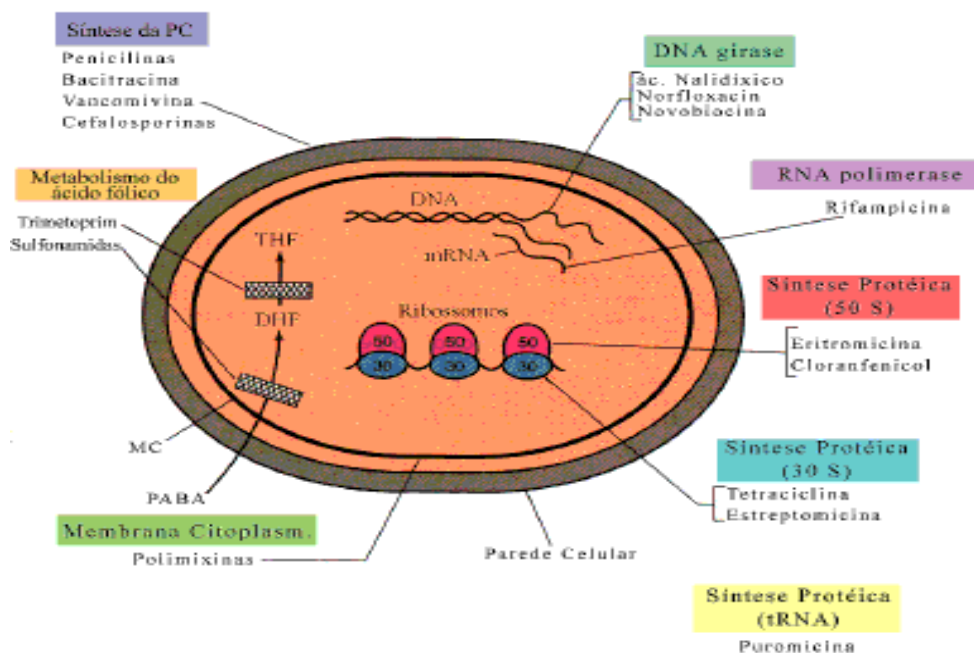


Figura 1.2 - Etapas metabólicas afetadas por antibióticos [24].

As etapas metabólicas são:

- Inibição da síntese da parede celular pelos agentes antimicrobianos mais selectivos. Exemplos disso são as penicilinas, ampicilina e cefalosporinas. Têm na sua estrutura um anel lactâmico que actua com proteínas “Penicillin Binding Protein”, inibindo a enzima responsável pela ligação entre as cadeias de tetrapeptídeos do peptideoglicano. Desta forma, há a perda de rigidez da parede celular.
- Ligação à membrana citoplasmática: os agentes antimicrobianos apresentam um menor grau de toxicidade selectiva.
- Inibição da síntese de ácidos nucleicos.

- Inibição da fase tradução. Este processo consiste na produção de cadeias polipeptídicas a partir do mRNA que se liga ao ribossoma. No caso do cloranfenicol, este liga-se ao ribossoma e inibe a ligação do tRNA e da peptidil transferase, inibindo a elongação. Esta etapa corresponde à formação da cadeia polipeptídica, isto é, à síntese de ligações peptídicas entre aminoácidos ordenados de acordo com a informação transmitida pelo mRNA [25].

Os agentes bacterianos alcançam resistências face aos antibióticos:

- por mutação a nível genético que é transmissível à descendência.
- por transdução - quando ocorre reprodução, o DNA bacteriano é transportado de uma bactéria para outra, através de bacteriófagos (nome dado aos vírus que infectam as bactérias) [26].
- por conjugação - transferência de material genético (DNA plasmidial e/ou do cromossoma) entre duas bactérias através de um tubo de conjugação. Ocorre fundamentalmente nas bactérias Gram negativas e Gram positivas [18,26].

Os mecanismos bioquímicos de resistência a antibióticos podem ocorrer:

- a nível estrutural - as proteínas responsáveis pela parede celular da bactéria assim como a estrutura dos ribossomas são modificadas, tornando a afinidade com os antibióticos menor.
- inactivação enzimática - no caso do cloranfenicol, este sofre inactivação da enzima acetiltransferase. Esta enzima transfere dois grupos acetil para o cloranfenicol, impedindo-o de se ligar ao ribossoma, neutralizando a sua acção.
- resistência cruzada - a resistência a um antibiótico conduz à resistência a outro [27].

Desde 1998, os antibióticos, no ambiente, têm sido alvo de estudo bem como a concepção e desenvolvimento de alternativas à sua degradação. Os métodos de análise e detecção de diversos antibióticos nas águas residuais e em matrizes aquosas são cada vez mais importantes e a sua investigação mais intensiva [23].

1.4 Cloranfenicol

O Cloranfenicol (cloran) é uma substância que foi isolada do organismo *Streptomyces venezuelae* (encontrado em amostra de terra recolhida na Venezuela), em 1948, por Ehrlich *et al.* [28,29,30].

O Cloranfenicol é também denominado de (D(-)-treo-1-(*p*-nitrofenil)-2,2-dicloroacetamido-1,3-propanodiol) ou acetamina.

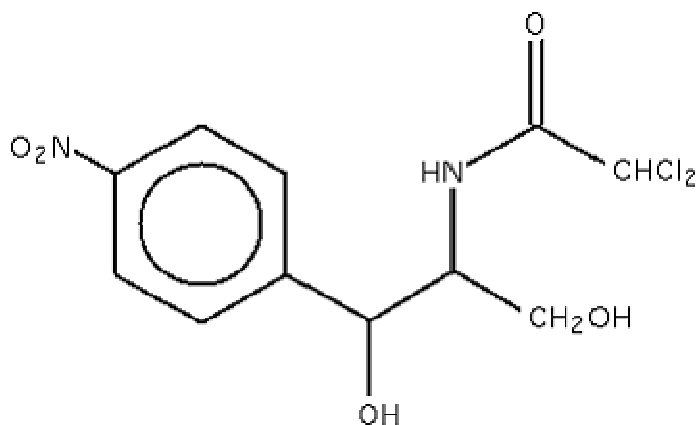


Figura 1.3 - Estrutura química do Cloranfenicol.

Este antibiótico apresenta uma cor amarela pálida, de forma cristalina, sem odor mas como gosto muito amargo. É um composto solúvel em água, clorofórmio e éter. É um composto muito solúvel em propilenoglicol, metanol, etanol. É estável e polar [29].

Em solução, sofre lentamente diversas reações hidrolíticas. Na presença de luz induzida, estas reações dependem do pH, do calor e da luz, e são exemplo as reações ácido-base catalisadas pela hidrólise da amida, originando 1-(*p*-nitrofenil)-2-aminopropano-1,3-diol e ácido dicloroacético, e pela hidrólise alcalina de grupos α -cloro formando derivados α - α -di-hidroxi [29].

É caracterizado por um anel benzênico e por três cadeias de carbono substituídas. O grupo nitro é facilmente reduzido ao grupo amina.

Quando libertado para a atmosfera, o cloranfenicol vai existir, primeiramente, como um aerossol. Se libertado na água irá funcionar como um composto não volátil. Se libertado no solo, gera-se grande mobilidade do composto [31].

Trata-se de um antibiótico com classificação bacteriostática de amplo espectro. É um composto lipossolúvel que se difunde na membrana celular, ligando-se, reversivelmente, à subunidade proteica 50 S do ribossoma das células de procariontes. A

sua fixação evita a transferência de aminoácidos do tRNA, que contém o ácido aminado, a um dos locais de ligação do ribossoma [30].

A resistência das bactérias gram-negativas deve-se à presença de um acetiltransferase específica que acetila o cloranfenicol [30]. Depois de acetilado, o cloranfenicol fica impossibilitado de se ligar ao ribossoma bacteriano.

Quando é administrado nos seres humanos, este antibiótico é usado para o tratamento de infecções graves por bactérias [9,32]. Simultaneamente, a sua acumulação também confere alguns efeitos colaterais adversos nomeadamente ao nível do sangue, como a diminuição dos glóbulos vermelhos no sangue da medula óssea, provocando anemia aplástica em pessoas susceptíveis, assim como náuseas, vômitos e diarreia, e aumento do risco de sarcomas [31]. Também pode ser utilizado em dermatologia e oftalmologia, podendo provocar irritações na pele e nos olhos [33,34].

Trata-se de uma droga que interfere numa das fases de síntese protéica de forma reversível, isto é, com a formação de peptídeos com actividade enzimática. Possuem, também, efeito bacteriostático [35].

É administrado, normalmente, pela via oral. Contudo, nos ruminantes é inactivo na flora ruminal. Aparece em grande parte dos tecidos após meia hora da sua administração [35]. Difunde-se nos líquidos cerebrospinal e pleural, atravessa a placenta, etc.

O uso de antibióticos na agricultura teve início na década de 50. Hoje em dia, são usados e seleccionados com objectivo de tratar doenças e para promover o crescimento. Em 1980 foi estimado que cerca de 60% dos animais utilizados na produção de alimentos, eram expostos a antibióticos. Actualmente, e no caso específico do cloranfenicol, este é considerado o mais utilizado na medicina veterinária [36], na aquicultura ou como desinfectante, para prevenir e controlar doenças. (Brown, 1989 e Subasighe *et al.*, 1996) [37,38,39,40,41].

Foi proibido pela União Europeia, em 1994, uma vez que, quando administrado, poderia advir o risco da sua presença nos alimentos [42,43]. Da presença de resíduos de cloranfenicol no leite pode advir efeitos tóxicos na população humana [44].

Em 2001 e 2002, a Comunidade Europeia verificou a presença do antibiótico em camarão, produtos da piscicultura e mel, levando à proibição e comercialização dos mesmos em países em desenvolvimento como a Ásia [40,45].

Investigações recentes, com o intuito de verificar a existência de resíduos de cloranfenicol no leite pasteurizado comercializado no Brasil, vieram comprovar a

contaminação do leite com cloranfenicol e, por conseguinte, evidenciar o uso indevido e proibido da administração desta droga em animais para o consumo humano. Há uma necessidade em seguir, atentamente, os resíduos de drogas utilizadas na medicina veterinária e destinadas aos alimentos, com o objectivo de garantir qualidade na saúde [45].

Mottier *et al.* (2003) e Vinci *et al.* (2005) identificaram, com êxito, uma quantidade de cloranfenicol numa amostra de carne por cromatografia líquida acoplada à ionização “eletrospray” e espectrometria de massa em série [42].

Após detecção de resíduos de cloranfenicol, em 2001, em alimentos como o caso do camarão, carnes de capoeira, proveniente da China, a Comunidade Europeia proibiu a sua importação [32].

Na tabela 1.1. apresentam-se as propriedades físicas do cloranfenicol.

Tabela 1.1 - Propriedades Físicas e Químicas do Cloranfenicol.

Nome	Fórmula Química	Massa Molecular (g mol ⁻¹)	Ponto de Fusão (°C)
Cloranfenicol	C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	323,13	149

1.4.1 Limites Legais do Cloranfenicol

A China, os Estados Unidos e a Comissão Europeia proibiram, de forma drástica, o uso do cloranfenicol em animais na produção de alimentos [35].

O Regulamento (CE) número 1430/94 da Comissão, de Junho de 1994, que altera os anexos I, II, III e IV do Regulamento (CEE) no 2377/90 do Conselho, prevê o estabelecimento de limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal e incluiu o cloranfenicol no anexo IV - lista das substâncias interditas.

O limite máximo de resíduo (MRL) permitido que foi estabelecido foi zero $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ em tecidos comestíveis, uma vez que foram comprovados os seus efeitos colaterais para a saúde humana [32,46]. Este limite designa a concentração máxima de resíduos de uma substância farmacologicamente activa que pode ser autorizada nos alimentos de origem animal [47].

O limite mínimo de desempenho requerido relaciona-se com os limites que o método analítico utilizado de detecção de substâncias como o cloranfenicol que devem ser satisfeitos. No caso do cloranfenicol é $0,3 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ em matrizes como o leite, carne, ovo,

urina, produtos de aquicultura, mel. Este valor é estabelecido e corresponde às substâncias proibidas do anexo II do regulamento 90/2377/CEE [44].

1.5 Liberação controlada de antibióticos

A Nanotecnologia é um campo no qual o trabalho molecular e atômico constitui um grande passo na criação de estruturas com propriedades cruciais da matéria que tem vindo a adquirir um controlo e precisão bastante importantes para as aplicações tecnológicas.

A Nanotecnologia promete grandes transformações ao nível de sectores como a medicina, o ambiente, a alimentação, a informática e o meio ambiente. Tendo como base a Física, a Química, a Biologia e com o objectivo de manipular e agregar os átomos e as moléculas, criam-se nanopartículas que permitem a liberação controlada de fármacos e a bioencapsulação.

A liberação controlada e progressiva de fármacos constitui um grande passo de inovação da saúde humana. Há imensos benefícios como sejam:

- Diminuição da toxicidade - menor impacto ambiental;
- Administração sem reacções inflamatórias e menor número de doses;
- Maior eficácia terapêutica - direccionamento específico;
- Não há ocorrência de decomposição do antibiótico;
- Liberação lenta e gradual, evitando grandes quantidades de produto excretado [48].

As nanoesferas e as nanocápsulas garantem propriedades novas como o armazenamento de substâncias para a sua liberação controlada como é o caso dos medicamentos, cosméticos, os quais não se liberam até entrar em contacto com tecidos humanos, animais ou plantas [49].

Os nanomateriais biodegradáveis são uma mais-valia, hoje em dia, uma vez que não são tóxicos e podem ser excretados pelo corpo sob fracções de menores dimensões.

A liberação controlada pode fazer-se:

- Por difusão:
 - o fármaco forma uma partícula interna envolvida numa membrana de difusão inerte.
 - o fármaco é disperso num polímero monolítico e inerte.

- Por bioerosão polimérica - conversão do material insolúvel em água em material solúvel, ocorrendo a adsorção de resíduos pelo organismo. Também pode haver libertação do fármaco por acção de enzimas [48].

1.6 Métodos de Remoção de poluentes

Os efluentes que derivam da actividade farmacêutica apresentam características diferentes [50]. Contudo, todos têm a parte orgânica e compostos refractários, os quais são eliminados por tratamentos biológicos já implementados [50].

Uma vez que a toxicidade dos poluentes gera ambientes nocivos para a saúde pública, faz-se sentir a preocupação do tratamento antecipado das águas, com vista ao melhoramento e redução da poluição das matrizes aquosas.

Existem algumas desvantagens no procedimento de determinados métodos como o facto de serem métodos dispendiosos e possibilidade de formação de compostos tóxicos secundários [51,52].

Neste trabalho seleccionou-se a remoção por adsorção e a oxidação com Reagente de Fenton para o estudo de remoção/degradação de cloranfenicol.

1.6.1 Oxidação Avançada

A oxidação química de substâncias tóxicas e perigosas corresponde aos métodos de tratamento com base na criação de radicais hidroxilo muito oxidantes, aptos para reagir com compostos orgânicos e inorgânicos, presentes em águas. São tratamentos bastante eficientes para resolver o problema da poluição ambiental. Ocorre transferência de electrões em meio aquoso que pode gerar espécies reactivas como os radicais hidróxido ($\cdot\text{OH}$) e superóxidos ($\text{O}_2^{\cdot-}$).

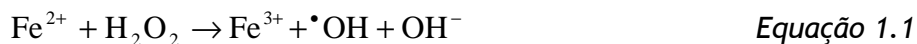
Os agentes oxidantes convencionais podem ser: o ozono, o peróxido de hidrogénio, o permanganato, o dióxido de cloro, o cloro, o ácido hipocloroso [53]. Estes agentes são capazes de destruir ou hidrolisar os poluentes [54,55].

Processo com Reagente de Fenton

A oxidação com reagente de Fenton consiste na oxidação química com peróxido de hidrogénio [56]. Este processo começou a ser utilizado em 1990 [57,58].

O reagente de Fenton é utilizado na decomposição de poluentes orgânicos, por meio de oxidantes muito reactivos, permitindo a diminuição da toxicidade e o aumento da biodegradabilidade. Tal ocorre devido à produção de radicais hidroxilo, gerados pelo

reagente de Fenton e, portanto, resultantes da reacção entre o ião Fe^{2+} e o peróxido de hidrogénio, de acordo com a equação 1.1. [54,55,59]. O radical livre cria um ataque biológico ao composto, sendo capaz de decompor quimicamente compostos orgânicos e inorgânicos [60].



Uma vez que o catalisador da reacção é o ferro (II), é necessário que a quantidade deste, durante a reacção, seja satisfatória.

É uma reacção altamente exotérmica mas também favorecida pelo aumento de temperatura. Assim, é crucial o controlo da temperatura, quer por razões a nível económico, quer a nível de segurança. Para temperaturas superiores a 40 °C, ocorre decomposição do peróxido em água e oxigénio, ocorrendo diminuição da eficiência do processo. A eficiência do peróxido de hidrogénio diminui. Entre os 20 e os 40 °C torna-se possível grande parte das aplicações [54,55].

Os factores que fazem variar a reacção são: a concentração de ferro (II), a concentração de peróxido de hidrogénio, a temperatura e o pH da reacção, entre outros.

Normalmente o catalisador aparece sob a forma de FeSO_4 . Assim, a degradação dos compostos poluentes aumenta com o aumento da quantidade de ferro na reacção [57]. Contudo, esta relação ocorre até uma velocidade máxima a partir da qual, a adição de ferro não altere os resultados.

O pH óptimo é entre os 3 e os 6. Na zona básica, há um decréscimo na eficiência devido a influência do ião ferro. A adição de FeSO_4 faz decrescer o pH da água.

A diminuição do pH é reflexo da oxidação dos compostos orgânicos em ácidos orgânicos. Por sua vez, o pH diminui, quando há adição de peróxido.

No caso do peróxido de hidrogénio, o seu aumento leva a uma diminuição do carbono orgânico dissolvido, até que a toxicidade da amostra residual vai diminuindo rapidamente. Isto sucede-se pois a quantidade de oxidante é suficiente para se elevar à quantidade de poluente e ferro. Um excesso de peróxido pode originar reacções secundárias de consumo de radicais hidroxilo [57].

Para Wlassics *et al.* (1995), a etapa limitante da reacção traduz-se na formação dos radicais hidroxilo a partir do peróxido de hidrogénio e do ferro II. Estes radicais são responsáveis pela oxidação dos compostos orgânicos que constam nas águas residuais, originado ferro III e o radical. O ferro III é reduzido a ferro II.

Trata-se de um método com algumas vantagens relativamente aos outros processos oxidativos, entre elas, o facto do equipamento usado ser de baixo custo e do facto do peróxido ser decomposto em substâncias não nocivas.

Segundo Bigda (1995), a velocidade da reacção com reagente de Fenton é limitada pela velocidade de formação do radical hidroxilo [61].

De acordo com Campos e Spahr (1995), a precipitação de compostos parcialmente oxidados leva à redução de parte da carência química de oxigénio (CQO - análise que permite quantificar a matéria orgânica de uma amostra). A precipitação é fruto da combinação da matéria orgânica com óxidos de ferro, os quais formam complexos organometálicos insolúveis [62].

Segundo Kelley *et al.* (1990), a aplicação do reagente de Fenton em solos contaminados com PAHs foi dita com sucesso.

1.6.2 Adsorção

A Adsorção é um processo essencialmente físico-químico e de permuta, no qual as moléculas ou os iões presentes numa fase tendem a condensar-se e concentrar-se à superfície de outra fase. De acordo com *Danielson (1973)*, neste processo há adesão de moléculas do adsorvido ao adsorvente. Esta adesão deve-se a ligações de van der waals [63].

Trata-se de um processo exotérmico de separação física e purificação, no qual o material é adsorvido e não é alterado quimicamente. Utiliza-se para remover contaminantes como os compostos orgânicos e os metais pesados. O adsorvente deve ser tratado posteriormente.

A adsorção pode ser afectada por vários factores:

- Natureza do adsorvente como a área específica, a sua porosidade, o tamanho e distribuição dos poros.

Um aumento da área superficial traduz-se num aumento dos centros activos, levando a uma maior adsorção. De acordo com a IUPAC, os poros são classificados por:

- Microporos (2 nm),
- Mesoporos (de 2 a 50 nm),
- Macroporos (superiores a 50 nm).

- Natureza do adsorvato pois, quanto maior a solubilidade no solvente, menor é a adsorção [64].

- Tempo de residência: quanto maior for este, mais completa deverá ser a adsorção.
- Temperatura: uma vez que se trata de um processo exotérmico, a uma menor temperatura, maior poderá ser a adsorção. É de notar que pequenas oscilações na temperatura correspondem a diferenças significativas neste processo.
- pH do meio: tem grande influência nos compostos especialmente os que apresentam características ácidas e básicas.

Garcia-Mendieta *et al.* (2003) constataram que a adsorção depende do volume do poro e da área superficial do adsorvente. A adsorção aumenta com a área superficial do adsorvente.

Já tem sido alvo de estudo a Nanotecnologia, como aplicação ao método de adsorção, com vista a aumentar a transferência de calor e massa. Com efeito, diversas pesquisas acerca de nanofluidos foram realizadas e permitem constatar um aumento de quantidade adsorvida por nanomateriais [65]. Em virtude da baixa afinidade de compostos orgânicos polares com alguns adsorventes, como a sílica, tem existido o desenvolvimento de novos materiais poliméricos. Destaca-se um estudo recente que permitiu testar a adsorção de nanotubos de carbono para a extracção de grupos muito polares como: as cefalosporinas, as sulfonamidas e os compostos fenólicos, concluindo-se serem bastante eficientes [66].

A adsorção ocorre quer por mecanismos químicos quer por mecanismos físicos, ou por permuta.

A adsorção física envolve a ligação entre o adsorvato (material que é adsorvido) e o adsorvente, por forças de van der Waals - de dispersão de London e forças electrostáticas entre dipolos permanentes - entre as moléculas (forças dipolo-dipolo e forças de polarização envolvendo dipolos induzidos). Não há alterações das moléculas adsorvidas e o calor de adsorção é pequeno [63]. As forças intermoleculares atractivas entre moléculas do adsorvato e do adsorvente são superiores às de forças de atracção entre próprias moléculas do adsorvente. Os contaminantes adsorvidos não se fixam em centros activos, podendo formar-se sucessivas camadas [67].

A adsorção química traduz um processo de transferência de electrões, resultante de forças mais intensas que originam a formação de ligações químicas entre o adsorvato e o adsorvente, podendo formar-se uma monocamada acima da superfície [68,69]. Quando completa, a capacidade de adsorção termina. Estas forças, responsáveis por tais ligações covalentes e por pontes de hidrogénio, tornam os átomos mais juntos.

A adsorção de permuta iónica corresponde a atracções electrostáticas entre o adsorvente e a superfície. Regra geral, os iões com cargas superiores são atraídos para locais de carga contrária [67].

Nem sempre aspectos como o equilíbrio e as isotérmicas podem ser viáveis ao nível da indústria [70]. Através de ensaios de adsorção em coluna fica-se com uma maior sensibilidade da tecnologia no mundo real. A adsorção em coluna é realizada em meio laboratorial com vista a adquirir a curva de saturação. De acordo com o tempo, o efluente passa na coluna e é analisado. A substância a remover, ao passar pela coluna, preenche os locais activos e a concentração do composto aumenta. Assim, quase todos os centros activos estão preenchidos ocorrendo saturação.

Para eliminar poluentes, o uso de produtos naturais excedentários, como a casca de pinheiro, a casca de amêndoa e casca de noz, tem sido bastante utilizados. Estes traduzem-se alternativas eficazes para a adsorção com carvão activado [64] e, deste modo, há a valorização de recursos naturais em paralelo com a protecção ambiental a baixo custo [43].

1.7 Isotérmicas de Adsorção

Alguns autores sugeriram diversos modelos empíricos para descrever o processo de adsorção - a relação de equilíbrio entre a quantidade de substâncias adsorvida e a concentração da fase líquida, a uma dada temperatura. A esta relação atribuiu-se o nome de isotérmica de adsorção [71,72].

A Lei de Henry denomina a etapa de adsorção de moléculas na qual a fase adsorvida é tão diluída que não há competição por locais activos nem interacções entre moléculas adsorvidas. É dada pela expressão:

$$q = K \cdot C \quad \text{Equação 1.2}$$

sendo q a concentração de adsorvato na fase adsorvida e C a concentração de adsorvato na fase líquida. K denomina a constante de Henry.

A expressão 1.2 traduz a situação mais simples - Isotérmica Linear.

As isotérmicas mais utilizadas são as isotérmicas de Langmuir e de Freundlich, sendo as explicadas neste trabalho.

A Isotérmica de Langmuir corresponde a adsorção em superfícies homogéneas com interacção reduzida entre as moléculas adsorvidas. Este modelo de adsorção afirma ser a superfície do adsorvente repleta de centros activos homogeneamente distribuídos, os quais

podem adsorver moléculas. A adsorção é completa quando todos os sítios são ocupados formando-se uma monocamada na superfície [68]. Neste modelo assume-se não existir interacção entre as moléculas adsorvidas.

A expressão da isotérmica de Langmuir é dada pela equação 1.3.

$$q_{eq} = \frac{q_0 \cdot b \cdot C_{eq}}{1 + b \cdot C_{eq}} \quad \text{Equação 1.3}$$

sendo q_0 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$), a concentração máxima de cobertura da única camada e b ($\text{L}_{\text{solução}} \cdot \text{mg}^{-1}$), a constante de equilíbrio de Langmuir; q_{eq} ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$), a concentração no adsorvente, no equilíbrio; C_{eq} ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), a concentração na solução, no equilíbrio.

Linearizando o modelo de Langmuir:

$$\frac{C_{eq}}{q_{eq}} = \frac{1}{b \cdot q_0} + \frac{C_{eq}}{q_0} \quad \text{Equação 1.4}$$

$$\frac{1}{q_{eq}} = \frac{1}{q_0} + \frac{1}{b \cdot q_0} \cdot \frac{1}{C_{eq}} \quad \text{Equação 1.5}$$

Segundo Weber (1972), o uso da equação de Langmuir depende da gama e dispersão dos dados obtidos.

Assim, quando o termo $b \cdot C_{eq}$ é muito menor que 1, a adsorção é reduzida.

A Isotérmica de Freundlich corresponde à adsorção em multicamadas. Este modelo empírico não limita a quantidade adsorvida e é aplicado abaixo da saturação. A expressão é:

$$q_{eq} = K_F \cdot C_{eq}^{\frac{1}{n}} \quad \text{Equação 1.6}$$

Sendo q_{eq} ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$), a quantidade adsorvida na fase sólida, C_{eq} ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), a concentração no equilíbrio, K_F e n são constantes. Esta última constante indica se adsorção é ou não favorável [73]. Os parâmetros desta equação são determinados através de:

$$\log(q_e) = \log(K_F) + \frac{1}{n} \cdot \log(C_{eq}) \quad \text{Equação 1.7}$$

Para valores de n superiores a 1, considera-se uma isotérmica favorável.

Para valores de n inferiores a 1, a isotérmica diz-se desfavorável. K_F tende a aumentar com o aumento da concentração da solução. Para o valor de n igual a 1, a isotérmica é linear.

Calvet *et al.* (1980) constataram ser a isotérmica de Freundlich melhor no ajuste de analitos de adsorção de pesticidas [67].

1.8 Cinética de Adsorção

A cinética de adsorção relaciona o tempo de equilíbrio com o processo de adsorção.

É importante o estudo da velocidade do processo de adsorção com objectivo de entender a retenção do antibiótico em questão - cloranfenicol - no adsorvente e, também, o tempo de equilíbrio.

A cinética pode ser determinada:

- em sólidos pouco porosos pela difusão externa, isto é, a difusão das moléculas através do filme que rodeia os constituintes sólidos;
- superficial;
- em sólidos porosos pela difusão interna - difusão das moléculas nos poros do adsorvente;
- adsorção e interacção nos centros activos [74].

Existem vários modelos de cinética, entre eles, o modelo de cinética de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem [75].

- O Modelo de Lagergran de primeira ordem é expresso por:

$$q = q_e [1 - \exp(-k_1 \cdot t)] \quad \text{Equação 1.8}$$

que linearizando

$$\text{Log}(q_e - q) = \text{Log}(q_e) - \frac{k_1 \cdot t}{2,303} \quad \text{Equação 1.9}$$

- Modelo de Ho e McKay de segunda ordem:

$$q = q_e \cdot \frac{k_2 \cdot q_e \cdot t}{1 + k_2 \cdot q_e \cdot t} \quad \text{Equação 1.10}$$

que linearizando - equação 1.10 - permite determinar os parâmetros q_e e k_2 ,

$$\frac{t}{q} = \frac{1}{k_2 \cdot q_e^2} + \frac{1}{q_e} \cdot t \quad \text{Equação 1.11}$$

sendo q_e a capacidade de adsorção no equilíbrio e q , a capacidade individual num certo tempo. k_2 ($g \cdot (mg^{-1} \text{ min}^{-1})$) e k_1 (min^{-1}), são constantes de segunda e primeira ordem, respectivamente; t , o tempo em min.

1.9 Adsorventes

Os adsorventes são “substâncias” capazes de adsorver outras substâncias. São utilizados na remoção de poluentes, como os metais pesados, e os compostos orgânicos tóxicos e são escolhidos, de acordo com determinados factores, como sendo a eficácia de adsorção do soluto, a facilidade na sua obtenção, o custo e a possibilidade de regeneração [39].

Os adsorventes até então utilizados são: o carbono activado, os produtos naturais excedentários, entre outros. McKay and Porter (1997) propuseram estes últimos como alternativos e de crescente interesse relativamente ao carbono activado [76]. Trata-se de desperdícios agrícolas utilizados na adsorção correspondentes a materiais produzidos assiduamente [77,78]. Exemplos destes biomateriais são: a casca de noz, a casca de amêndoa, a lá, a casca de coco, a casca de arroz, os caroços de azeitonas, etc.

O carvão activado é o adsorvente preferido e dos mais eficazes na remoção; contudo, de elevado preço e apresenta necessidades de regeneração. Exibe características extremamente vantajosas, como a elevada área superficial e porosa e grande capacidade de adsorção.

Alguns estudos relativos aos carvões activados dos produtos excedentários levam a concluir a sua importância em métodos de remoção, como adsorção. Constatou-se terem os carvões produzidos, a partir dos excedentes agrícolas, propriedades análogas às dos carvões comercializados.

A casca de noz, em particular, já foi utilizada como adsorvente para remoção de metais pesados de soluções aquosas [79]. Trata-se de um dos subprodutos naturais baratos e funcionais para remoção de compostos orgânicos [78].

1.10 Métodos de Detecção de Resíduos de Medicamentos em Matrizes Aquosas

O uso de substâncias, como o cloranfenicol, são proibidas na União Europeia. Em muitos casos, os resíduos contaminam os alimentos, tornando-se numa ameaça para os consumidores. Podem causar efeitos nefastos e tóxicos na saúde dos seus consumidores. Pode actuar na flora intestinal do ser humano, elemento este essencial da fisiologia humana, que actua como barreira no crescimento de bactérias patogénicas.

Para a detecção de fármacos na água, os métodos especificados na bibliografia baseiam-se na extracção, em fase sólida, associada a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GS/MS), à electroforese capilar, cromatografia líquida de alta pressão acoplada à espectrometria de massa (HPLC/MS), entre outros.

P. Guy *et al.* (2004) investigaram a presença de cloranfenicol no leite, por LC-ESI-MS-MS [80]. A determinação do antibiótico no leite revelou-se positiva, tornando-se um processo de quantificação possível e válido na monitorização contra níveis inaceitáveis de resíduos de cloranfenicol.

H. Shen e H. Jiang (2005) fizeram a triagem e determinação de cloranfenicol em comida a saber: marisco, a carne e o mel, desenvolvendo métodos de cromatografia como: a cromatografia líquida de alta pressão com detector ultravioleta (HPLC-UVD), a cromatografia gasosa com detector captura electrónica (GC-ECD), entre outros. Os métodos de cromatografia líquida e gasosa já tinham sido usados na determinação de cloranfenicol em produtos de origem animal. Em traços gerais constatou-se que, para quantidades acima de $10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, o HPLC seria o mais eficaz; para resíduos de cloranfenicol na gama $1\text{-}10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, o GC-ECD seria o mais utilizado [81].

Recentemente foi recomendado o uso de LC-MS/MS para detecção de resíduos de cloranfenicol em camarão e mel, com limite mínimo de detecção de $0,3 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, no cumprimento de decisões recentes da comissão 2003/181/EC [45,46].

1.11 Método Analítico seleccionado para a Determinação do Cloranfenicol em Matrizes Aquosas

Neste projecto utilizou-se a cromatografia líquida de alta pressão com detector *diode array*. O detector escolhido é um detector espectrométrico, através do qual é possível detectar e quantificar os constituintes do analito em estudo [82]. Este método cromatógrafo permite uma alta resolução, a monitorização contínua do eluente, as

análises repetitivas e reproduzíveis com a mesma coluna e ainda o simples manuseamento dos dados, como é o caso da sua detecção em diferentes comprimentos de onda [83].

A cromatografia líquida de alta pressão é um método físico de separação rápida de componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis: a fase móvel e a fase estacionária. A fase móvel corresponde ao líquido que percorre a coluna, denominando-se eluente. A fase estacionária é a fase que consta dentro da coluna. Permite a identificação e quantificação dos seus componentes mas também a possível degradação do analito. A separação e a capacidade de distinguir as várias fracções relativas a uma amostra, sob análise, depende de diferenças na interacção entre os solutos e as fases móvel e estacionária, entre outras [83].

Na cromatografia líquida a amostra entra numa coluna com enchimento de partículas por meio de um líquido (fase móvel) a elevada pressão. Ocorre retardamento da amostra devido a interacções físico-químicas com a fase estacionária à medida que avança na coluna. O tempo de retenção obtido corresponde à saída de um dado componente analisado da coluna. Este método ocorre a alta pressão pois a velocidade aumenta e, como os componentes estão menos tempo na coluna, não há tanta difusão na coluna. Os solventes utilizados neste trabalho foram a água e o acetronitrilo.

É importante uma boa escolha da fase móvel. O poder de eluição da fase móvel é determinado pela sua polaridade, pela polaridade da fase estacionária e dos componentes da amostra. Um aumento da polaridade do solvente traduz-se num aumento do poder de eluição [83].

1.12 Contributos do Trabalho

Este projecto de desenvolvimento em ambiente académico permite determinar e quantificar a presença de substâncias poluentes em matrizes aquosas, investigando alternativas que possam ser viáveis na realidade a fim de combater os efeitos nefastos no ambiente.

E execução deste trabalho permitiu a aprendizagem de várias tecnologias da área da Engenharia Química, nomeadamente:

Ter um conhecimento mais aprofundado das técnicas cromatográficas (e respectivos detectores) e sensibilidade para a sua escolha consoante os analitos em causa;

Compreender a utilidade e as vantagens ambientais da utilização de adsorventes excedentários, podendo aliar os benefícios ambientais à utilização de desperdícios agrícolas.

Avaliar a utilização/aplicação de oxidação com Reagente de Fenton de forma a entender o potencial na sua utilização como método de degradação de poluentes ambientais.

1.13 Organização da Tese

No capítulo 2 são descritos estudos científicos e experimentais seleccionadas com este projecto encontrados na literatura.

No capítulo 3 é descrito todo um procedimento experimental realizado, com vista a responder aos objectivos propostos.

O capítulo 4 apresenta os resultados obtidos e discussão dos mesmos.

No capítulo 5 constam as conclusões de todo o trabalho efectuado.

O capítulo 6 traduz uma breve avaliação do projecto e ao seu conteúdo.

No capítulo 7 estão detalhadas as referências bibliográficas pesquisadas e utilizadas para desenvolvimento da escrita.

2 Estado da Arte

Diversos estudos têm sido realizados com o objectivo de determinar soluções a implementar para uma menor poluição ambiental. Contudo, os estudos laboratoriais são limitados, devido a factores ambientais nomeadamente, em alterações na concentração, pH, humidade, temperatura [84].

No caso de resíduos do antibiótico em estudo, os métodos disponíveis para a sua quantificação incluem métodos microbiológicos, enzimáticos, cromatográficos. Na tabela seguinte encontram-se algumas metodologias estudadas e encontradas na literatura, correspondentes a diversas matrizes alimentares e aquosas [35].

Nas tabelas 2.1 e 2.2 encontram-se descritos os métodos de detecção do cloranfenicol pesquisados na literatura.

Na tabela 2.3 estão descritos alguns dos métodos de remoção/degradação do cloranfenicol encontrados na literatura. É de salientar o facto de não existir muita bibliografia relativa à remoção deste antibiótico, nomeadamente no que diz respeito ao processo de oxidação do cloranfenicol.

Tabela 2.1 - Métodos de quantificação e detecção do cloranfenicol estudados.

<i>Autor</i>	<i>Método utilizado</i>	<i>Conclusão</i>	<i>Ref.^a</i>
L. Pezza <i>et al.</i>	Quantificação e separação de cloranfenicol de amostras de leite bovino, através da técnica de eletroforese capilar, e por cromatografia electrocinética micelar (MEKC).	<ul style="list-style-type: none"> - Método simples e eficaz na determinação de resíduos de antibiótico. - Limite de detecção entre 4,3-5,3 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. 	[85]
C. Schirmer, H. Meisel	Extracção na fase sólida (pré-concentração) de cloranfenicol de amostras de mel com adsorvente “molecularly imprinted polymer” (MIP) seguido do método analítico LC-MS/MS.	<ul style="list-style-type: none"> - Para a relação metanol/água (V/V) - 10/90, a remoção é próxima da totalidade dos resíduos de cloranfenicol. - Método validado de acordo com critérios da União Europeia para análise de resíduos de drogas veterinárias. 	[86]
Xizhi Shi <i>et al.</i>	Extracção na fase sólida de resíduos de cloranfenicol, em comida, por adsorvente SPE “MIP” acoplada à análise em HPLC-UV.	<ul style="list-style-type: none"> - Em camarão e leite, atinge-se recuperações de cerca de 90% de cloranfenicol. 	[35]
R. Nicolich <i>et al.</i>	Determinação de cloranfenicol no leite por HPLC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> - Válido para gama de concentrações entre 0,30-3,00 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. 	[44]
H. Júnior <i>et al.</i>	Determinação de resíduos de cloranfenicol de amostras de leite e mel, a partir de espectrometria de massas em “Tandem” com ionização por “electrospray” análise em HPLC.	<ul style="list-style-type: none"> - Permite analisar baixa quantidade de resíduos em matrizes alimentares - 0,05-1,00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ no leite e 0,20 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ no mel. - Obtiveram-se valores de recuperação entre 91-101% para amostras de leite e 83% para as amostras de mel. - Alta especificidade. 	[87]

Tabela 2.1 - Métodos de quantificação e detecção do cloranfenicol estudados (continuação).

<i>Autor</i>	<i>Método utilizado</i>	<i>Conclusão</i>	<i>Ref.^a</i>
P. Vinas <i>et al.</i>	Determinação de cloranfenicol em alimentos por cromatografia líquida com detector foto-diodo array.	- Limite de detecção obtido de $0,7 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, para carne.	[88]
M. Akhtar <i>et al.</i>	Desenvolvimento de cromatografia gasosa para detectar e quantificar o cloranfenicol em produtos alimentares como os ovos.	- Método visto com grande potencial na rotina de detecção de cloranfenicol em ovos e amostras biológicas. - Limite de detecção de 0,5 ppb.	[39]
S. Wei-Wei <i>et al.</i>	Determinação imuno-voltaica de resíduos de cloranfenicol no leite.	- Grande recuperação e baixo limite de detecção ($0,064 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$).	[41]
A. Forti <i>et al.</i>	Desenvolvimento de resíduos de cloranfenicol em mel, por cromatografia líquida de espectrometria de massas em “Tandem” (LC-MS/MS), usando ionização “electrospray”, de acordo com Lei em vigor.	- Limite de detecção de $0,07 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ e capacidade de detecção de $0,10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. - Método adequado para analisar resíduos de antibiótico.	[46]
P. Mottier <i>et al.</i>	Determinação do antibiótico na carne e marisco por LC-MS/MS, usando ionização “electrospray”.	- Método robusto e adequado para controlo de qualidade. - Limite de detecção de $0,01 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ e a capacidade de detecção de $0,02 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$.	[89]
J. Huang <i>et al.</i>	Técnica de microextração com um polímero monolítico com HPLC-MS para detecção de cloranfenicol em mel, leite e ovos.	- Recuperação do antibiótico entre 85-102%. - Limite de detecção de $0,02 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, $0,04 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $0,04 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, respectivamente.	[90]

Tabela 2.1 - Métodos de remoção/degradação.

Autor	Método utilizado	Conclusão	Ref.^a
A. Chatzitakis <i>et al.</i>	Degradação fotocatalítica oxidativa	<ul style="list-style-type: none">- Inibição da actividade do antibiótico e sua remoção.- Método economicamente viável; uma solução para tratamento residual de águas que contêm componentes de produtos farmacêuticos.	[36]
W. Weifen <i>et al.</i>	Remoção/adsorção em cascas de camarão Detecção por HPLC.	<ul style="list-style-type: none">- Rápida remoção dos resíduos de cloranfenicol.	[91]

3 Descrição Técnica

Os processos de remoção mais utilizados no tratamento e remoção de poluentes de águas são: a Oxidação Química e a Adsorção.

Com efeito, estes foram os métodos seleccionados neste projecto, nomeadamente:

- adsorção com casca de noz;
- oxidação com Reagente de Fenton.

Para avaliar a capacidade de remoção/degradação deste método foi, também, desenvolvido o método de análise HPLC-DAD.

3.1 Quantificação de cloranfenicol por HPLC-DAD

Este trabalho experimental foi realizado com o antibiótico Cloranfenicol. Trata-se de um produto requerido através da companhia Sigma-Alrich com sucursal em Portugal.

Preparou-se a solução-mãe, assim como duas soluções intermédias para posterior preparação de seis padrões, utilizados nos ensaios iniciais.

Os objectivos iniciais consistiram na obtenção dos tempos de retenção e das áreas de cada padrão. Foram realizadas corridas cuja razão água/acetonitrilo (eluente escolhido) se alterava, com o objectivo de garantir a razão óptima do solvente e a redução do tempo de cada corrida - rentabilização do tempo.

3.1.1 Método de Análise

Para concluir sobre a eficiência do método de remoção, utilizou-se o método de análise a Cromatografia Líquida de Alta Pressão com um detector *diode array* (HPLC/DAD), que permite obter separações de misturas e identificação dos seus componentes. O detector usado possibilita a escolha do comprimento de onda apropriado para o analito em questão.

Este equipamento é composto por:

- Detector diode array, Merck HITACHI, L-7450 A;
- Bomba L-7100, Merck HITACHI;
- Injector Rheodyne 7725 I, 100 µL;
- Coluna de Separação CC250/4, Nucleosil 100-5, MaCherey-Nagel.



Figura 3.1 - Equipamento de HPLC-DAD.

A análise das amostras, por cromatografia líquida, ocorreu nas seguintes condições:

- fluxo de fase móvel $0,8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;
- razão água/acetonitrilo: 70/30 (%);
- pH da fase aquosa 2,50;
- 10 minutos de duração de cada corrida.

As injeções foram realizadas em duplicado para cada amostra e injectadas manualmente.

O equipamento de HPLC-DAD utilizado é composto por uma bomba, um injetor, uma coluna cromatográfica, um detector e um sistema de aquisição de dados. O funcionamento deste equipamento é descrito, de forma linear, no anexo 3.

Antes de fazer a análise das amostras com cromatografia líquida, é imprescindível retirar, previamente, as amostras do frio, deixá-las repousar à temperatura ambiente e na ausência de luz. Quando as amostras advêm do processo de adsorção, é necessário garantir a remoção de impurezas e/ou de resíduos do material adsorvente. Para tal, as amostras são novamente filtradas com filtros de porosidade $0,45 \mu\text{m}$ e com membrana do polímero politetrafluoretileno (PTFE).

Os resultados foram adquiridos para o comprimento de onda de 278 nm, que corresponde ao comprimento de onda máximo de detecção do cloranfenicol.

3.1.2 Recta de Calibração

Foram realizados os ensaios, em duplicado, para todos os padrões. As condições de operação foram: pH da fase aquosa 2,49; fase móvel de 70% água e 30% acetonitrilo; caudal foi de $0,8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ e corridas de 14 minutos.

Foi obtida a recta de calibração (concentração entre $0,04 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e $0,40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e procedeu-se a ensaios com o intuito de verificar parâmetros como a repetibilidade e a precisão intermédia/reprodutibilidade.

3.1.3 Validação do Método Analítico

Após obtenção da recta de calibração (concentração entre $0,04 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e $0,40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), foram realizados ensaios para os padrões de maior, menor, e concentração intermédia, $0,40$; $0,04$ e $0,10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente, com o intuito de verificar parâmetros como a repetibilidade e a precisão intermédia/reprodutibilidade. Foram feitos seis ensaios para cada padrão e em dois dias consecutivos ao dia da recta de calibração.

Também foi considerada a linearidade do método, através da realização da recta de calibração, e obtenção dos intervalos de confiança e limites de detecção.

3.2 Adsorção em *Batch* utilizando casca de noz

Neste projecto foram efectuados os ensaios de adsorção, utilizando como adsorventes a casca de noz e a cinza de casca de noz, com o intuito de determinar o tempo de equilíbrio e as isotérmicas de adsorção/dessorção.

3.2.1 Tratamento e Caracterização da casca de noz

O adsorvente utilizado foi a casca de noz previamente preparada, como é descrito abaixo:

- Moagem em moinho de lâminas Retsch KG SK1;
- 24 horas na estufa a $70 \text{ }^\circ\text{C}$;
- Moagem em moinho Retsch ZM 100 com crivo de 2 milímetros (mm) e de 1 mm;

- Peneiração e separação por tamanho com peneiros Retsch, do tipo ASTM, com granulometria 707, 425 e 250 micrómetros (μm) e agitador de peneiros Retsch - AS 200 basic, Iso 9001.

Para a obtenção da cinza de casca de noz, procedeu-se à queima da casca de noz numa mufla, a 700 °C durante 2 horas.

A casca de noz foi caracterizada quer física quer quimicamente. Procedeu-se à caracterização dos principais grupos funcionais, através da técnica FTIR. Também foi estudada a distribuição granulométrica, a densidade e porosidade por meio do Coulter LS Particle Size Analyzer, do picnómetro de hélio e do porosímetro de mercúrio.

3.2.2 Tempo de equilíbrio

Para determinar o tempo de equilíbrio da adsorção do cloranfenicol foram realizados ensaios *batch*, em duplicado.

Para tal, colocaram-se 22 balões de Erlenmeyer com 100 mg de casca de noz moída e 10 mL de uma solução padrão, previamente preparada, de concentração $9,88 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, à excepção de 2 balões, nos quais foi colocada igual quantidade de adsorvente mas 10 mL de água destilada - ensaio branco.

A casca de noz utilizada tinha 250 μm de diâmetro e foi pesada numa balança analítica Mettler toledo - AG245. A solução padrão foi previamente preparada, pipetando-se 2,27 mL da solução intermédia 1 de concentração $110,3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, num balão volumétrico de 250 mL, perfazendo-se o volume com água destilada.

Todos os matrizes foram colocados num agitador orbital à temperatura de 30 °C e à velocidade de rotação de 150 rotações por minuto (r.p.m.), como a figura seguinte apresenta.



Figura 3.2 - Incubadora orbital.

Os matrizes foram sendo retirados da orbital, consecutivamente, de acordo com a tabela abaixo indicada.

Tabela 3.1 - Tempo de permanência dos matrizes no agitador orbital.

Tempo (min)	0	15	30	45	60	120	240	480	1440	2880	4320
-------------	---	----	----	----	----	-----	-----	-----	------	------	------

Nota: É de realçar que o branco foi retirado aos 240 minutos.

Foram submetidas a uma filtração do adsorvente, por filtro de pregas, e recolhidas em frascos devidamente rotulados, selados com parafilme e guardados no frigorífico, para posterior análise no HPLC-DAD.

Concluiu-se que se tratava de uma solução padrão com uma concentração muito elevada para se obter resultados fiáveis e reprodutíveis.

Foi então dada continuidade à execução de ensaios de adsorção e respectiva análise em HPLC-DAD, utilizando a solução padrão de cloranfenicol de concentração $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

As variáveis em estudo foram:

- o adsorvente - casca de noz com um diâmetro médio de $250 \mu\text{m}$ e a cinza da casca de noz;
- a massa de adsorvente.

As amostras foram diluídas na proporção 1:2 para a análise cromatográfica, de modo a garantir os resultados dentro da gama da recta de calibração (concentrações entre $0,04$ e $0,4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e sem aumento significativo da incerteza adjacente.

Com vista no aumento da percentagem de remoção do antibiótico e optimização da quantidade de adsorvente utilizado (sempre com mesma granulometria), foram sendo realizados ensaios de adsorção em *batch* e respectiva análise em HPLC-DAD, ao longo do projecto, para igual concentração da solução padrão de cloranfenicol. Na tabela seguinte encontram-se as quantidades de adsorvente usadas.

Tabela 3.2 - Quantidade de adsorvente utilizada nos ensaios de adsorção.

Adsorvente	Massa (mg)					
	50	100	300	500	600	1000
Casca de Noz		✓	✓	✓	✓	✓
Cinza de Casca de Noz	✓	✓	✓	✓		

O pH das amostras e da solução padrão foi medido (entre 5 e 6), a fim de verificar possíveis alterações significativas do pH da solução aquando da adição do adsorvente.

3.2.3 Isotérmica de Adsorção

Para a determinação da isotérmica de adsorção procedeu-se a ensaios em todo semelhantes aos ensaios de adsorção batch, utilizando apenas o adsorvente casca de noz.

Nos matrizes foram colocados 10 mL da solução de cloranfenicol de concentração $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ mas diferentes quantidades de massa de adsorvente. A quantidade de cascas de noz usadas variou entre 50 mg e 1000 g, com granulometria de $250 \mu\text{m}$. Estes foram colocados na orbital.

Tabela 3.3 - Quantidade de adsorvente por cada matraz com 10 mL de cloranfenicol com concentração $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Amostra (em duplicado)	Massa de Casca de Noz (mg)
1	50
2	100
3	200
4	300
5	500
6	550
7	600
8	650
9	850
10	1000

As amostras foram retiradas da orbital ao fim de 12 horas, filtradas com papel de filtro e recolhidas em frascos devidamente rotulados, selados com parafilme e guardados no frigorífico, para posterior análise no HPLC.

O tempo de permanência considerado - 12 horas - traduz-se num tempo aproximado, por excesso, ao tempo de equilíbrio.

3.2.4 Isotérmica de Dessorção

Após ensaios de adsorção, procedeu-se aos ensaios de dessorção. Para isso, as cascas de noz, dos ensaios de adsorção, são secas ao ar cerca de 24 horas, sendo reutilizadas para determinar as isotérmicas de dessorção. Para os ensaios, são colocadas em contacto com 100 mL de água destilada nos matrizes, na orbital também cerca de 12 horas. As amostras são filtradas e analisadas no HPLC-DAD.

3.3 Oxidação com Reagente de Fenton

Procedeu-se a um único ensaio de oxidação com Reagente de Fenton, a fim de verificar se poderia ser um bom método de remoção do antibiótico da solução e na tentativa de comparar com o método de adsorção. Por limitações de tempo, só foi possível executar uma experiência.

Num gobelé de 250 mL foram colocados cerca de 100 mL da solução de cloranfenicol de concentração $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ com pH previamente acertado. O pH utilizado foi 3,5, valor este resultante da optimização noutro projecto. Para o acerto, utilizaram-se as soluções H_2SO_4 e NaOH , ambas de concentração $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. O gobelé foi colocado num reactor com camisa, o qual estava ligado a um agitador magnético, e a um banho termoestático, cuja temperatura foi regulada para $40 \text{ }^\circ\text{C}$.



Figura 3.3 - Oxidação com Reagente de Fenton.

Foi adicionado 0,55 mg de sulfato de ferro hepta hidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) de concentração 1 M ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), deixando dissolver-se bem à temperatura do banho.

O $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ funcionou como catalisador homogéneo para a transferência de electrões entre a molécula de peróxido e o catalisador.

Adicionou-se 123 μL de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) de concentração 1 M e, dando-se início à contagem do tempo, foi retirado logo 1 mL da solução. Esta amostra corresponde ao tempo zero. Foram recolhidas amostras de 1 mL, de 15 em 15 minutos, até perfazer 90 minutos desde o início da contagem. A cada amostra recolhida foram adicionadas 1 a 2 gotas de H_2SO_4 com o objectivo de parar a reacção e, portanto, a formação de radicais OH^\cdot . Caso contrário, a reacção continuava a dar-se nos vials. As amostras recolhidas são devidamente rotuladas, seladas com parafilme e guardados no frigorífico, para posterior análise no HPLC-DAD.

No anexo 7 são apresentados os cálculos relativos às quantidades utilizadas neste ensaio.

3.4 Regras de Segurança

É necessário usar as medidas de segurança aquando da manipulação dos compostos químicos. No caso do antibiótico em estudo, as frases de risco e segurança a ter em consideração são: frase R 45: Pode provocar cancro; S 53-45: Evitar a exposição - ter cuidados especiais antes de utilizar. Em caso de acidente ou mal-estar, consultar um médico imediatamente (se possível mostrar o rótulo do produto) [34].

De um modo geral, no manuseamento, com cuidado, com os restantes reagentes é útil o uso de luvas. Devem ser utilizados em locais com boa ventilação.

O material utilizado foi lavado com água corrente, passado por acetona e posteriormente, por água destilada. Após lavagem, era colocado numa estufa a 50 °C.

Após todo o processo de adsorção é necessário ser consciente e ter em conta a etapa da regeneração do adsorvente, antes de ponderar a sua destruição ou deposição em aterros. Assim, o adsorvente utilizado no processo de adsorção foi colocado num frasco, devidamente rotulado, para posterior tratamento.

Métodos como a regeneração térmica, através de uma corrente de vapor, extracção de solventes ou oxidação química são exemplos em uso.

4 Resultados e Discussão

4.1 Caracterização da Casca de Noz

A casca de noz foi caracterizada, após tratamento de moagem, por forma a facilitar o entendimento entre a natureza das interações entre o adsorvente e o antibiótico.

Efectuou-se a análise de FTIR (Espectroscopia de infravermelho associado a transformadas de Fourier) da casca de noz, obtendo-se o espectro que é possível ser visualizado no anexo 2.

Os grupos funcionais presentes na amostra estão na tabela seguinte.

Tabela 4.1- Grupos Funcionais presentes no FTIR obtido da casca de noz.

Valores de Frequência (cm ⁻¹)	Significado
3446	O-H distensão
2928 e 2858	C-H distensão
1743	C=O
1627	C=C
1461 e 1376	C-H flexão (do CH ₃ e CH ₂)
1052	C-O distensão

Da análise do espectro verifica-se a presença de grupos funcionais importantes como por exemplo: grupo hidroxilo (O-H); carbonilo (C=O); éter (C-O); além da ligação C=C.

A presença destes grupos funcionais prova que na casca de noz deverá existir celulose, hemi-celuloses, lenhina.

Como na estrutura do cloran - figura 1.3 - também existem grupos funcionais semelhantes, nomeadamente O-H, C=C, C=O, C-O, é fácil entender as boas percentagens de remoção (adsorção) destes compostos, devido ao tipo de interações possíveis (ligações de hidrogénio, etc).

Procedeu à granulometria através do Coulter - LS Particle Size Analyzer que é possível visualizar na figura abaixo.

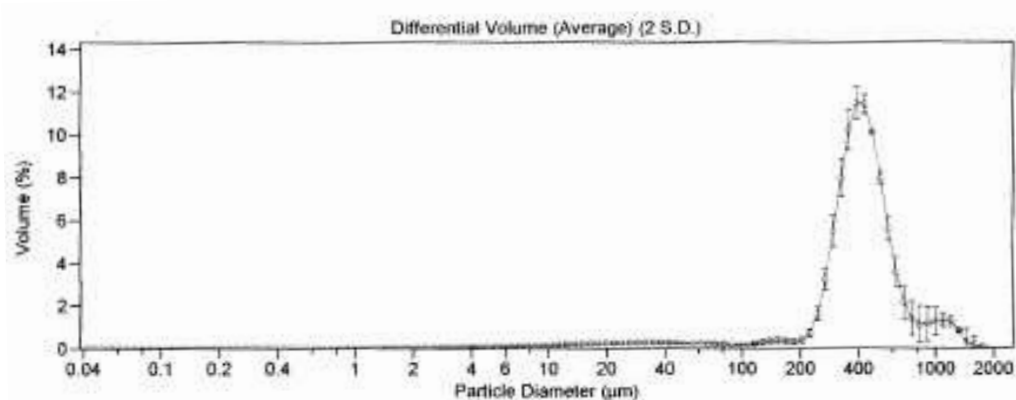


Figura 4.1 - Distribuição de tamanhos das partículas da casca de noz.

As partículas da casca de noz apresentam um tamanho médio de 407,9 μm . A gama de diâmetro está entre 213,7 e 679,9 μm .

Por meio do picnômetro de hélio e o porosímetro de mercúrio foram obtidas as propriedades físicas que constam da tabela abaixo.

Tabela 4.2 - Propriedades Físicas da Casca de noz.

Propriedades	Valores
Densidade real ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)	1,420
Densidade aparente ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)	1,089
Área Superficial Total ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	16,866
Porosidade Total Interparticular (%)	5,412
Porosidade Total Intraparticular (%)	18,152
Porosidade Total (%)	23,564
Gama de diâmetro dos poros (μm)	$3,573 \times 10^{-3} - 10,518$
Diâmetro médio dos poros (μm)	$3,707 \times 10^{-3}$

Da análise da tabela 4.2 pode concluir-se que se trata de um aglomerado de partículas constituído por microporos e mesoporos.

4.2 Validação do Método Analítico

A validação do método corresponde a parâmetros como linearidade, precisão limites de detecção e quantificação. Deste modo constata-se se o método é apropriado e rigoroso.

Pela análise dos cromatogramas, foram obtidos os tempos de retenção e respectiva área do antibiótico em estudo, que permitiram o traçado da recta de calibração, que se encontram no anexo 5.1.

A recta de calibração obtida apresenta-se na figura 4.2. Utilizaram-se 6 padrões com concentrações entre 0,04 e 0,40 mg · L⁻¹.

A recta de calibração é obtida pela expressão:

$$A = (b \pm ts_b) \cdot C + (a \pm ts_a) \quad \text{Equação 4.1}$$

sendo A a área do pico; C a concentração do cloranfenicol; b o declive na origem; a a ordenada na origem; s_b o desvio padrão do declive; s_a o desvio padrão na origem; t o t de student.

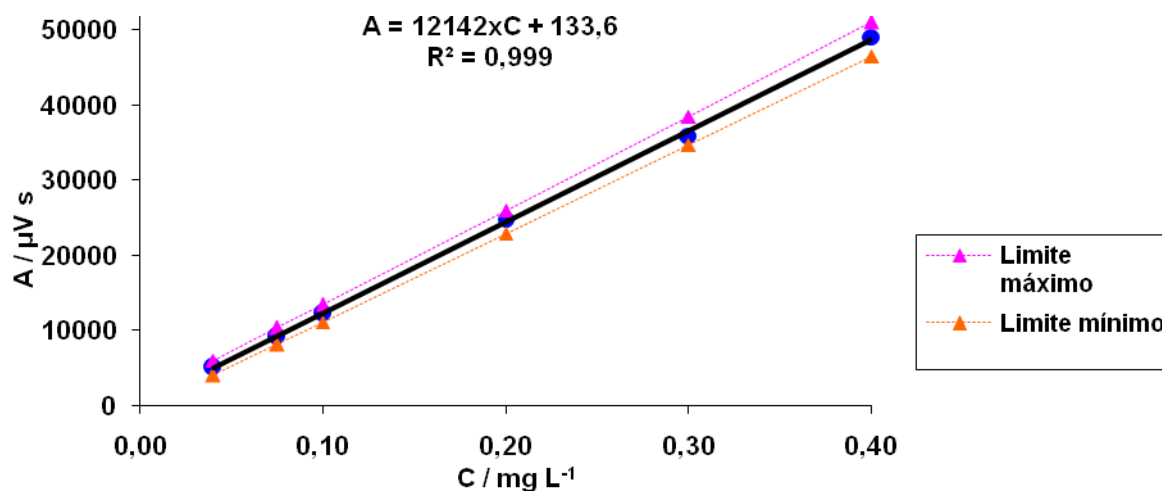


Figura 4.2 - Recta de Calibração obtida para o antibiótico cloranfenicol, por HPLC-DAD. (— Recta de calibração; ----- Intervalo de confiança da recta de calibração)

$$\text{Assim, } A = (12142 \pm 3638) \cdot x + (133,6 \pm 823)$$

Por ajuste linear foram calculados os parâmetros apresentados na tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Parâmetros calculados da recta de calibração.

Declive, b	12142
Desvio padrão do declive, s_b	1310
Ordenada na origem, a	133,6
Desvio padrão da ordenada na origem, s_a	297
Intervalo de confiança b, IC_b	3638
Intervalo de confiança de a, IC_a	823
$\frac{sb}{b} / \%$	1,08
s_y	414
r	0,999
LD / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	6,2

Nota: Os intervalos de confiança foram determinados para o t_{student} com $n-2$ graus de liberdade e um nível de confiança de 95 %.

A recta de calibração cumpre as condições pretendidas. A origem está contida na gama entre o seu intervalo de confiança.

Com o intuito de verificar parâmetros, como a repetibilidade e a precisão intermédia/reprodutibilidade, foram efectuados seis ensaios de cada padrão de maior, menor e intermédia concentrações, e durante dois dias diferentes e consecutivos.

Os dados foram expressos relativamente ao coeficiente de variação (CV) que expressa a precisão intermédia, visíveis nas tabelas do anexo 5.1.2. Pela equação 4.2., este corresponde ao quociente do desvio padrão pela média da área.

$$CV(\%) = \frac{S}{\bar{A}} \times 100 \quad \text{Equação 4.2}$$

Os valores de CV obtidos são aceitáveis, uma vez que são inferiores a 10%. Trata-se de resultados concordantes, que não indicia problemas de contaminação.

4.3 Adsorção em *Batch*

Foram realizados ensaios de adsorção para determinar o tempo de equilíbrio e as isotérmicas de adsorção, usando como adsorvente a casca de noz moída e a cinza obtida da queima da casca de noz moída.

Contudo, o adsorvente cinza de casca de noz não foi muito explorado visto que, apesar de serem obtidas remoções praticamente completas do antibiótico da matriz aquosa, esta matéria advém de queima e, portanto, não é de todo benéfico ou saudável para o ambiente e ser humano. Encontram-se no anexo 6.2, os dados relativos a esta análise.

Seguidamente apresentam-se os resultados obtidos, usando como adsorvente a casca de noz moída.

4.3.1 Tempo de equilíbrio

Com o intuito de determinar o tempo de equilíbrio da adsorção do cloranfenicol, procedeu-se a ensaios de adsorção em *batch* com casca de noz.

Começou-se a estudar variáveis como a massa de adsorvente. A massa de adsorvente utilizada foi 100 mg com um diâmetro médio de 250 μm . Após alguns estudos, fazendo variar a concentração, concluiu-se ser a concentração da solução padrão de antibiótico utilizada, de $1,00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, ideal para a obtenção de resultados fiáveis e detectáveis.

As amostras foram retiradas ao fim de 15, 30, 45 e 60 minutos; 2, 4, 8, 24, 48 e 72 horas da incubadora orbital.

Pelos ensaios com 100 mg de casca de noz, constatou-se ser o tempo de permanência das amostras na orbital incubadora (cerca de 3 dias) elevado e, por conseguinte, desnecessário, uma vez que a percentagem de remoção do antibiótico não aumentava sucessivamente com o tempo de agitação. Isto é, por mais tempo que permanecesse em agitação, a remoção do cloranfenicol da amostra não iria aumentar.

Deste modo, as amostras seguintes foram retiradas no máximo até 24 horas.

Nota: Verificou-se ser crucial a pré-diluição das amostras, na proporção 1:2, de modo a garantir que os resultados provenientes do HPLC estejam dentro da gama da recta de calibração (concentrações entre $0,04$ e $0,40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

Nos ensaios posteriores de adsorção, a variável em estudo correspondeu a massa de adsorvente utilizada - casca de noz com um diâmetro médio de 250 μm : 300, 500 e 1000 mg.

O gráfico que se segue corresponde às concentrações de antibiótico existentes na solução aquosa e, respectiva, remoção em matriz aquosa. Trata-se do caso em que se utilizou 600 mg de adsorvente e se obteve uma maior eficácia na eliminação do poluente. As restantes representações gráficas encontram-se no anexo 6.1.1.

A figura 4.3 representa os resultados para os ensaios de adsorção com 600 mg de adsorvente.

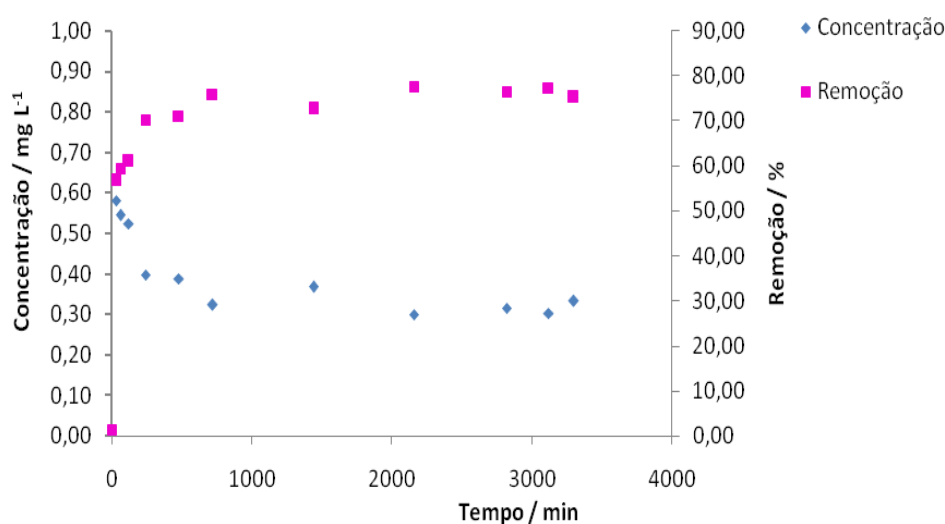


Figura 4.3 - Gráfico da concentração de cloranfenicol presente na matriz aquosa face à sua respectiva remoção.

Pelos resultados apresentados podemos aferir que um aumento de quantidade de adsorvente usado nos ensaios traduz-se numa diminuição de antibiótico na solução aquosa e, por conseguinte, uma boa remoção. Constata-se, também, pelo gráfico patente no anexo 6.1.1, que o excesso de quantidade superior a 600 mg não irá corresponder a uma maior remoção do poluente, podendo ser resultado de saturação da casca com o composto. Assim, a eficiência otimizada do adsorvente corresponderá a 600 mg de casca de noz moída. Também se pode inferir que ocorreu formação de pequenos aglomerados, para os ensaios de adsorção em *batch* com 1000 mg de casca de noz moída, o que se traduz numa menor área superficial.

O tempo necessário para atingir o equilíbrio foi de 8 horas. A fase de adsorção até ao tempo de equilíbrio corresponde a uma fase inicial rápida. A partir daqui, ocorre formação de um patamar, que corresponde a uma estabilização da quantidade adsorvida; a superfície do adsorvente fica mais saturada, atingido mais depressa o equilíbrio.

4.3.2 Cinética de Adsorção

Procedeu-se aos cálculos referentes à velocidade do processo. Os dados experimentais da cinética de adsorção foram analisados. Pelo ajuste aos modelos de cinética, já citados na introdução, constatou-se que a equação de Lagergren de segunda ordem é mais adequada. Através dos dados experimentais foram determinados os parâmetros tabelados abaixo.

Tabela 4.4 - Parâmetros do modelo de cinética Pseudo-segunda ordem.

Parâmetro Massas (mg)	k_2	q_e	R^2
100	$9,101 \times 10^3$	0,010	0,964
300	$5,341 \times 10^4$	0,004	0,993
500	$2,816 \times 10^4$	0,006	0,996
600	$1,077 \times 10^4$	0,010	0,994
1000	$2,509 \times 10^4$	0,006	0,999

Os parâmetros calculados indicam, segundo Ozacar e Sengil (2005), que as ligações entre o soluto e o adsorvente ocorrem em meio reaccional. Assim, a etapa limitante será a adsorção química. Irá ocorrer uma reacção de segunda ordem.

4.3.3 Isotérmica de Adsorção/Dessorção

Foi representada, graficamente, a concentração de antibiótico presente em solução e a quantidade de cloranfenicol removida em função da variação de massa de adsorvente usada.

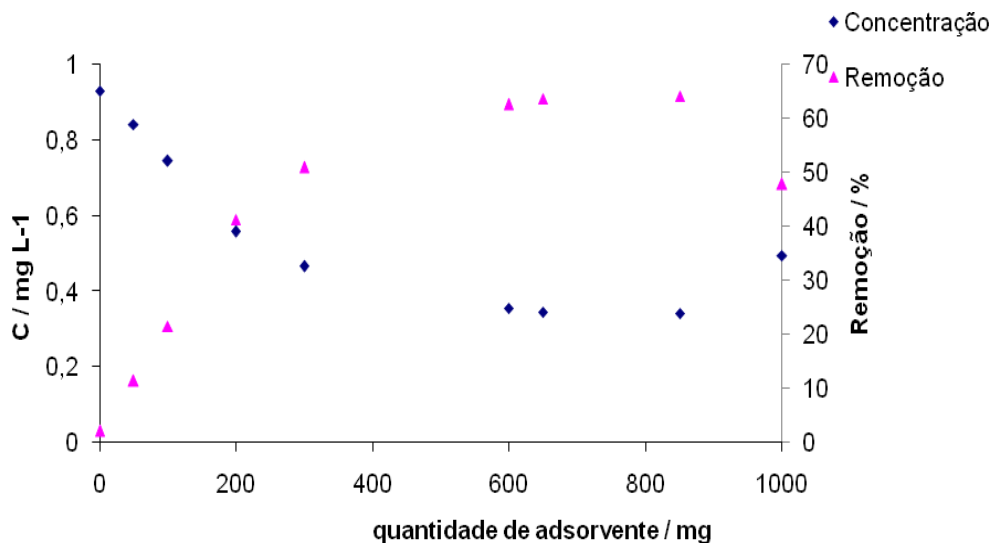


Figura 4.4 - Concentração e Remoção de Cloranfenicol versus quantidade de adsorvente.

Ajustando os resultados dos ensaios aos modelos das isotérmicas Linear, de Langmuir e de Freundlich, obtiveram-se as representações gráficas presentes no anexo 6.1.3. Estes modelos foram os efectivamente considerados, em virtude de grande parte dos estudos optarem por estes mecanismos.

Constatou-se que a isotérmica de Langmuir não se aplica aos ensaios experimentais de adsorção. Tal pode ser explicado pelo facto da adsorção não se traduzir numa camada única e, por conseguinte, um comportamento de transferência de electrões, resultante de forças mais intensa que origina a formação de ligações químicas entre o adsorvato e o adsorvente.

Os dados de adsorção foram ajustados à isotérmica de Freundlich. Contudo, tal foi possível desprezando alguns pontos experimentais, podendo ser observado na figura 6.xiii do anexo 6.1.3.

A tabela seguinte apresenta os resultados satisfatórios para os parâmetros segundo o modelo de Freundlich.

Tabela 4.5 - Parâmetros do modelo de Freundlich.

k_F	$\frac{1}{n}$	R^2
0,025	1,059	0,834

O parâmetro $\frac{1}{n}$ permite constatar que o coeficiente de adsorção, k_F , aumenta com o aumento da concentração do adsorvato. Tal pode ser devido ao aumento no carácter hidrófobo da superfície após completos os centros activos da monocamada.

Apesar de se tratar de um modelo empírico, uma vez que é o que mais se adequa, pode dizer-se que se trata de um adsorvente heterogéneo.

Relativamente aos ensaios de dessorção foi possível concluir que a casca de noz moída é um bom adsorvente, uma vez que não ocorre dessorção em água. Pode afirmar-se que há uma forte interacção entre as moléculas de cloranfenicol e a casca de noz.

4.4 Oxidação com Reagente de Fenton

Alguns métodos de remoção de poluentes de águas têm sido concebidos com vista ao melhoramento da eficácia deste objectivo. Entre eles os processos de oxidação avançados têm sido uma actualidade.

Na tabela 4.6 encontram-se os resultados obtidos do Processo com Reagente de Fenton.

Tabela 4.6 - Parâmetros calculados dos ensaios de Oxidação.

Tempo / min	$\overline{Conc.}$ / $mg \cdot L^{-1}$	Degradação / %
*	0,93	1,21
0	0,79	15,75
15	0,89	5,47
30	0,90	4,58
45	0,88	6,52
60	0,85	9,30
75	0,87	7,85
90	0,75	20,08

* Corresponde a amostra antes da reacção ser iniciada.

Pelo ensaio realizado verifica-se uma evolução temporal da quantidade removida. No entanto, para as condições atingidas, esta remoção é pouco significativa. Pode-se,

contudo, remeter para a tendência de remoção gradual de cloranfenicol com o aumento do tempo.

5 Conclusões

A protecção de fontes de recursos ambientais, bem como a criação de animais saudáveis que asseguram uma melhor fonte de proteínas, seriam uma realidade, caso não existisse abuso excessivo de antibióticos.

Com vista a reduzir os problemas ambientais, a investigação de alternativas de remoção de antibióticos, como o cloranfenicol, tende a ser uma constante.

O objectivo essencial deste projecto consistiu no estudo da remoção do cloranfenicol da água e verificar se o adsorvente - casca de noz - seria um bom exemplo de adsorvente excedentário na remoção.

O método de análise - HPLC-DAD mostrou-nos um bom método de quantificação do cloranfenicol. Foi ainda possível verificar, ser este método expedito na resposta estável que cria, tornando os resultados fiáveis.

O adsorvente foi caracterizado fisicamente e relativamente aos seus grupos funcionais. Concluiu-se que a casca é constituída por microporos e mesoporos. A presença de certos grupos funcionais confere interações químicas para adsorver o cloranfenicol. Os grupos funcionais O-H e C=C da casca de noz podem possibilitar ligações de hidrogénio com as moléculas de cloranfenicol, e ligações hidrofóbicas (C=C).

Foram realizados ensaios adsorção/dessorção em *batch* concluindo que há uma remoção bastante significativa, cerca 65%, para uma concentração de antibiótico de $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. O processo de adsorção atinge o equilíbrio ao fim de 8 horas. No caso da dessorção, os ensaios não permitiram o ajuste da isotérmica, visto que o adsorvente é bom e, portanto, não permite a dessorção do antibiótico em água.

Conjecturou-se que o aumento da quantidade de adsorvente, mantendo a concentração de antibiótico inicial na solução, permite o aumento da remoção por adsorção em *batch*. Contudo, para quantidade de casca de noz na ordem dos 1000 mg, verificou-se uma diminuição da quantidade de cloranfenicol removido e, então, uma maior concentração deste na solução aquosa.

A título conclusivo, pode-se indicar que a área superficial do adsorvente é um factor importante na adsorção.

A escolha deste adsorvente traduz-se numa boa alternativa aos métodos dispendiosos retratados na introdução.

6 Avaliação do trabalho realizado

6.1 Objectivos Realizados

Com vista a eliminar a poluição ambiental, gerada pela deposição e dispersão de resíduos poluentes, surgem os adsorventes no tratamento e inactivação destes. Assim, o presente projecto teve como objectivos o desenvolvimento de alternativas de remoção do antibiótico cloranfenicol.

Foram realizados ensaios de adsorção/dessorção com a casca de noz como adsorvente. Foi determinado o tempo necessário para o processo de adsorção e também a isotérmica e a cinética de adsorção que melhor se ajusta aos dados experimentais.

Foi efectuado um ensaio de oxidação com Reagente de Fenton, de modo a verificar ser uma alternativa eficaz que garantisse grande percentagem de remoção do composto.

6.2 Limitações e Trabalho Futuro

As limitações encontradas residiam no facto do equipamento HPLC-DAD ser por injeção manual, factor esse que não permite uma maior rapidez na obtenção de resultados. Além disso, este equipamento estava, também, a ser utilizado por outra colega, o que obrigou a uma boa gestão da sua utilização.

A título futuro, seria importante fazer variar diferentes condições, nomeadamente a concentração do cloranfenicol na matriz aquosa e o diâmetro das partículas do adsorvente. Numa fase posterior, o estudo da adsorção em contínuo permitiria conclusões mais exactas, no que diz respeito ao comportamento do antibiótico, face à superfície do adsorvente, pois corresponde a um estudo à escala piloto ou laboratorial, que permite optimização da operação.

Com a utilidade dada a este tipo de adsorventes, um trabalho árduo e contínuo de investigação irá permitir resultados bastante úteis no processo de tratamento de águas poluídas.

No caso dos ensaios oxidativos com Reagente de Fenton dever-se-ia aprofundar o estudo e optimização das condições futuras como sejam - concentração de H_2SO_2 e ferro; pH; razão Fe: H_2SO_2 - que podem ser significativas, tornando mais eficaz este processo.

Outro factor que pode ser avaliado, futuramente, apela para o acompanhamento no contínuo do potencial redox do meio.

O investimento neste processo oxidativo não implica equipamentos complexos e, por exemplo, o emprego do H_2SO_2 não constitui problemas a nível de resíduos químicos para o ambiente.

6.3 Apreciação final

Trata-se de um projecto considerado motivador, interessante e apelativo. É um projecto ambicioso, com frutos bastante pertinentes para a sociedade actual, na qual a qualidade de vida é um objectivo a defender, com todas as forças, em prol de um ambiente mais limpo e de uma qualidade de vida superior à que temos tido. Há que defender a saúde do planeta não só para nós mas também para os vindouros.

7 Referências

- [1] - Mulroy, A. *Water Environment. Technology.*, **13**, 32 (2001).
- [2] - Bila, D., Dezotti, M. *Fármacos no meio ambiente*, Química Nova, **26**, 523-530 (2003).
- [3] - Chien, Y. H., Lai, H. T., Liu, S. M., *Science Total Environment*, **81**, 239 (1999).
- [4] - Kolpin, D. W.; Furlog, E. T.; Meyer, M. T.; Thurman, E. M.; Zaugg, S. D.; Barber, L. B.; Buxton, H. T. *Environment Science Technology*, **36**, 1202 (2002).
- [5] - Smith, P., Samuelsen, O. B. *Aquaculture*, **17**, 144 (1996).
- [6] - Kummerer, K., *Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by ecological indicators*, Review of 1-13 hospitals in relation to other sources, *Chemosphere*, **45**, 957-969 (2001a).
- [7] - *Podem os medicamentos prejudicar o ambiente?*, Jornal de Notícias, 7 de Julho de 2007.
- [8] - Costa, C., Dordio, A. *Podem os medicamentos que usamos prejudicar o meio ambiente?*, Universidade de Évora.
- [9] - Kemper, N. *Review Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment*, Elsevier (2007).
- [10] - Miranda, C. D., Castillo, G., *Science Total Environment*, **167**, 224 (1998).
- [11] - Witte, W. *Int. J. Antimicrobial Agents*, **14**, 321 (2000).
- [12] - Stuer-Lauridsen, F., Birkved, M., Hansen, L. P., Holten Lützhof, H. C., Halling-Sorensen, B. *Chemosphere*, **40**, 783 (2000).
- [13] - Boxall, A. B. A., Blackwell, P., Cavallo, R., Kay, R. P., Tolls, J. *Toxicology Lett.*, **131**, 319 (2002).
- [14] - Alder, A.C., Mc Ardell, C.S., Golet, E.M., Ibrić, S., Molnar, E., Nipales, N.S., Giger, W. *Occurrence and Fate of Fluoroquinolone, Macrolide, and Sulfanamide Antibiotics During Wastewater Treatment and in Ambient Waters in Switzerland*, American Chemical Society, **791**, 56-69 (2001).
- [15] - *Água poluída dos Milagres lançada à porta da Câmara*, Leiria, 15 de Junho de 2005.

- [16] - Dean, C. *Poluentes são encontrados na água. Faz diferença?*, The New York Times (2004).
- [17] - Dixon, B. *La Biología de la resistencia antibiótica*, Panorama Aquícola, **6**, 24-26 (2001).
- [18] - Toro, C. *Uso de bacterias lácticas probióticas na alimentação de camarões Litopenaeus vannamei como inibidores de microrganismos e estimulantes do sistema imune* (2005).
- [19] - Deco detecta antibiótico proibido em geleia real, Diário de Notícias, Agosto de 2005.
- [20] - Oliveira, R., Bando, E., Junior, M. *Ocorrência de cloranfenicol em amostras de leite pasteurizado comercializadas no Estado do Paraná*, I Congresso de Farmácia de Maringá Brasil (2007).
- [21] - Bernardes, L. *Erro que se repete*, O Tempo, 11 de Novembro de 2007.
- [22] - H. Takeru, Lawrence, K. US Patent 3, 787, 571 (22 de Janeiro de 1974).
- [23] - www.unb.br/ib/ce/microbiologia/antibioticos/antibioticos, consultado em 18 de Janeiro de 2008.
- [24] - Madigan et al., *Brock Biology of Microorganisms* (2003).
- [25] - Cooper, G. *A Célula*, Arimed Editora, 2ª Ed., 297-312 (2005).
- [26] - http://www.libertaria.pro.br/antibioticos_intro.htm#3, consultado em 24 de Janeiro de 2008.
- [27] - Mandell, G. I., Petri Jr., W. A. *Antimicrobial agents: general considerations*, Hardman, J.G. and Limbird, L.E.: Goodman and Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics, International Edition, 9ª Ed., New York, 1223 (1996).
- [28] - Ehrlich, J., Smith, R. M., Penner, M. A. US Patent 2, 483, 892 (1949).
- [29] - Wilson and Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry, Ed. Robert F. Doerge, J.B. Lippincott Company, Chapter 7 - Antibiotics, 289-290 (1982).
- [30] - Guimarães, S., Moura, D., Silva, P. *Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas*, Porto Editora, 5ª Ed. (2006).
- [31] - *Chloramphenicol*, Report on Carcinogens, 11th Ed.

- [32] - Peng, L., Yueming, Q., Huixa, C., Yingzhang, T., Daning, W. Simultaneous Determination of Chloramphenicol, Thiamphenicol, and Florfenicol Residues in Animal Tissues by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, *Chinese Journal of Chromatography*, **24** (Janeiro 2006).
- [33] - <http://www.infarmed.pt/prontuario/index.php>, consultado em 24 de Janeiro de 2008.
- [34] - Folha de dados de Segurança do Produto, Sigma-Aldrich (2006).
- [35] - Shi, X., Wu, A., Zheng, S., Li, R., Zhang, D. *Molecularly imprinted polymer microspheres for solid-phase extraction of chloramphenicol residues in foods*, *Journal of Chromatography B* **850**, 24-30 (2007).
- [36] - Catzitakis, A., Berberidou, C., Kyriakou, G., Sklaviadis, T., Poullos, I. *Photocatalytic degradation and drug activity reduction of Chloramphenicol*, Elsevier (2007).
- [37] - Brown, JH. *Antibiotics: their use and abuse in aquaculture*, *World Aquacult*, **20**, 34-43 (1989).
- [38] - Subasighe, RP, Shariff, M. *Major fish and shimp diseases in Asia aquaculture: current management, future prospects*, *Perspectives in Asian fisheries*, Ed. De Silva SS, 409-428 (1996).
- [39] - Akhtar, M., Danis, C., Sauve, A., Barry, C. *Gas chromatographic determination of incurred chloramphenicol residues in eggs following optimal extraction*, *Journal of Chromatography A*. **696**, 123-130 (1995).
- [40] - Bononi, M., Tateo, F. *Liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis of chloramphenicol in propolis extracts available on the Italian market*, *Journal of Food Composition and Analysis*, **21**, 84-89 (2008).
- [41] - Wei-Wei, S., Ming-Xing, D., Nuo-Wei, Z., Hai-Feng, L., Ming-Gang, X., Guo-Yan, L., Chun-Yan, C. *Immuno-voltammetric Determination of Chloramphenicol Residues in Milk*, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, **35**, 1731-1735 (2007).
- [42] - Reig, M., Toldrá, F. *Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection*, *Meat Science*, **78**, 60-67 (2008).
- [43] - Frimmel, F., Assenmacher, M., Sorensen, M., Abbt-Braun, G., Grabe, G. *Removal of hydrophilic pollutants from water with organic adsorption polymers. Part I. Adsorption behaviour of selected model compounds*, *Chemical Engineering and Processing*, **38**, 601-610 (1999).

- [44] - Nicolich, R., Werneck-Barroso, E., Marques, M. *Food safety evaluation: Detection and confirmation of chloramphenicol in milk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, *Analytica Chimica Acta* **565**, 97-102 (2006).
- [45] - Shakila, R., Saravanakumar, R., Vyla, S., Jeyasekaran, G. *An improved microbial assay for the detection of chloramphenicol residues in shrimp tissues*, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **8**, 515-518 (2007).
- [46] - Forti, A., Campana, G., Simonella, A., Multari, M., Scortichini, G. *Determination of chloramphenicol in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, *Analytica Chimica Acta* **529**, 257-263 (2005).
- [47] - <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1999:060:0016:0052PT>, consultado em 13 de Fevereiro de 2008 - Regulamento (CE) N.º 508/1999 da Comissão de 4 de Março de 1999, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* (1999).
- [48] - Dumitriu, S. *Polymeric biomaterials*, Marcel Dekker: New York (1994).
- [49] - LIM, F. *Biomedical Application of Microencapsulation*, CRC Press, Inc.: Boca Raton, USA (1985).
- [50] - Arslan-Alaton, I., Balcioglu, A. *Arch. Environment Contamination Toxicology*, **43**, 425 (2002).
- [51] - Yu, M. H. *Environmental Toxicology: Biological and Health Effects of Pollutants*, CRC Press, Inc.: Boca Raton, 2nd Ed. (2005).
- [52] - Manaham, S. E. *Environmental Chemistry*, CRC Press, Inc.: Boca Raton, 7th Ed. (2000).
- [53] - Metcalf and Eddy, *Wastewater Engineering - Treatment and reuse*, McGraw-Hill - International Edition, 4th Ed., U.S.A. (2004).
- [54] - Chamarro, E., Marco A., Esplugas, S. *Use of Fenton reagent to improve organic chemical biodegradability*, *Water Research*, **35**, 1047-1051 (2001).
- [55] - Dutta, K., Mukhopadhyay, S., Bhattacharjee, S., Chaudhuri, B. *Chemical oxidation of metilene blue using a Fenton-like reaction*, *Journal of Hazardous Materials*, **84**, 57- 71 (2001).
- [56] - Liou, M., Lu, M. *Catalytic degradation of nitroaromatic with Fenton's reagent*, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **277**, 155-163 (2007).
- [57] - Pignatello, J. *Environment Science Technology*, **26**, 944-951 (2001).
- [58] - Sun, Y., Pignatello, J. *Environment Science Technology.*, **27**, 304-310 (1993).

- [59] - Namkung, K., Burgess, A., Bremner, D., Staines, H. Advanced Fenton processing of aqueous phenol solutions: A continuous system study including sonication effects, *Ultrasonics Sonochemistry*, **15**, 171-176 (2008).
- [60] - Benitez, F., Beltran-Heredia, J., Acero, J., Rubio, F. *Contribution of free radicals to chlorophenols decomposition by several advanced oxidation processes*, *Chemosphere*, **41**, 1271-1277 (2000).
- [61] - Bigda, J. *Consider Fenton's Chemistry for Wastewater Treatment*, Chemical Engineering Program, 62-66 (1995).
- [62] - Campos, D., Spahr, V. *The Precipitation Component in the Removal of Organics by the Fenton Process*, *Chemical Oxidation-Technologies For The Nineties*, **5**, 139-158 (1995).
- [63] - Figueiredo, J., Órfão, J. *Laboratórios de Catálise e Materiais*, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Portugal.
- [64] - Mezzari, I. Utilização de carvões adsorventes para o tratamento de efluentes contendo pesticidas, Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis (2002).
- [65] - Kim, J., Jung, J., Kang, Y. *Adsorption performance enhancement by nano-particles and chemical surfactants in binary nanofluidos*, *International Journal of Refrigeration*, **30**, 50-57 (2007).
- [66] - Niu, H., Cai, Y., Shi, Y., Wei, F., Liu, J., Mou, S., Jiang, G. *Evaluation of carbon nanotubes as a solid-phase extraction adsorbent for the extraction of cephalosporins antibiotics, sulfonamides and phenolic compounds from aqueous solution*, *Analytica Chimica Acta* **594**, 81-92 (2007).
- [67] - Sawyer, N., McCarty, L., Parkin, F. *Chemistry for Environmental Engineers*, McGraw-Hill, Inc, International Editions, 4th Ed., 93-98, 268-271, 629-636 (1994).
- [68] - P. W. Atkins, *Físico-Química*, LTC Editora, **3** (1999).
- [69] - Aveyard, R., Haydon, D., *An Introduction to the Principles of Surface Chemistry*. Cambridge University Press (1973).
- [70] - Garcia-Mendieta, A., Solache-Ríos, M., Olguín, M. T., *Comparison of Phenol and 4-Chlorophenol adsorption in activated carbon with different physical properties*, *Separation Science and Technology*, **38**, 2565-2578 (2003).
- [71] - Suzuki, M. *Adsorption Engineering*, Chemical Engineering Monographs. Elsevier (1990).
- [72] - Ruthven, D. M. *Principles of Adsorption and Adsorption Process*, John Wiley and Sons, U.S.A. (1984).

- [73] - Ciola, R. *Fundamentos da Catálise*, Ed. Moderna (1981).
- [74] - Dabrowski, A. Adsorption - from theory to practice, *Advances in Colloid and Interface Science*, 135-224 (2001).
- [75] - Rodríguez, E., Encinas, A., Masa, F., Beltrán, F. *Influence of resorcinol chemical oxidation on the removal of resulting organic carbon by activated carbon adsorption*, *Chemosphere*, **70**, 1366-1374 (2008).
- [76] - McKay, G., Porter, J.F. *Equilibrium parameters for the sorption of copper, cadmium and zinc ions onto peat*, *J. Chemical Technology Biotechnology* **69**, 309-320 (1997).
- [77] - Dakiky, M., Khamis, M., Manassra, A., Mer'eb, M. *Selective adsorption of chromium (VI) in industrial wastewater using low-cost abundantly available adsorbents*, *Advances in Environmental Research*, **6**, 533-540 (2002).
- [78] - Estevinho, B., Ratola, N., Alves, A., Santos, L. *Pentachlorophenol removal from aqueous matrices by sorption with almond shell residues*, *Journal of Hazardous Materials B* **137**, 1175-1181 (2006).
- [79] - Brasil, J., Vagheti, J., Royer, B., Jr, A., Simon, N., Pavan, F., Dias, S., Lima, *Planejamento Estatístico de Experimentos como uma ferramenta para otimização das condições de biossorção de Cu(II) em batelada utilizando-se casca de nozes peca como biossorvente*, *Quimica Nova*, **30**, 548-553 (2007).
- [80] - Guy, P., Royer, D., Mottier, P., Gremaud, E., Perisset, A., Stadler, R. *Quantitative determination of Chloramphenicol in milk powders by isotope dilution liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*, *Journal of Chromatography A* **1054**, 365-371 (2004).
- [81] - Shen, H., Jiang, H. *Screening, determination and confirmation of chloramphenicol in seafood, meat and honey using ELISA, HPLC-UVD, GC-ECD, GC-MS-EI-SIM and GCMS-NCI-SIM methods*, *Analytica Chimica Acta* **535**, 33-41 (2005).
- [82] - <http://www.farmacopeia.org.br/>, consultado em 29 de Janeiro de 2008.
- [83] - Mendhan, J., Denney, R.C., Barnes, J.D., Thomas, M. *Análise Química Quantitativa*, Vogel, LTC Editora, 6ª Ed. (2002).
- [84] - Ingerslev, F., Halling-Sørensen, B. *Biodegradability of metronidazole, olaquinox, and tylosin and formation of tylosin degradation products in aerobic soil-manureslurries*, *Endotoxicology Environment Safe*, **48**, 311-320 (2001).

- [85] - Pezza, L. *Determinação simultânea de resíduos de cloranfenicol, tiafenicol e florfenicol em leite bovino por cromatografia electrocinética micelar*, Quimica Nova, **29**, 926-931 (2006).
- [86] - Schirmer, C., Meisel, H. *Synthesis of a molecularly imprinted polymer for the selective solid-phase extraction of chloramphenicol from honey*, Journal of Chromatography A **1132**, 325-328 (2006).
- [87] - Júnior, H., Bustillos, O., Pires, M. *Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massas e “tandem”*, Quimica Nova, **29**, 586-592 (2006).
- [88] - Vinas, P., Balsalobre, N., Hernández-Córdoba, M. *Determination of chloramphenicol residues in animal feeds by liquid chromatography with photo-diode array detection*, Analytica Chimica Acta **558**, 11-15 (2006).
- [89] - Mottier, P., Parisod, V., Gremaud, E., Guy, P., Stadler, R. *Determination of the antibiotic chloramphenicol in meat and seafood products by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry*, Journal of Chromatography A **994**, 75-84 (2003).
- [90] - Huang, J., Zhang, H., Feng, Y. *Chloramphenicol Extraction from Honey, Milk, and Eggs Using Polymer Monolith Microextraction Followed by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Determination*, Journal of agricultural and food chemistry, **54**, 9279-9286 (2006).
- [91] - Weifen, W., Hong, L., Changhu, X., Jamil, K. *Elimination of chloramphenicol, sulphamethoxazole and oxytetracycline in shrimp, Penaeus chinensis following medicated-feed treatment*, Environment International **30**, 367- 373 (2004).

Anexo 1

1.1 Preparação da Solução-mãe e Soluções Intermédias de Cloranfenicol

Para a preparação da solução-mãe de cloranfenicol, o antibiótico foi retirado do frigorífico e foi estabilizado à temperatura ambiente dentro de um exsiccador. Procedeu-se à pesagem de 55,17 mg de cloranfenicol, na balança Mettler Toledo AG245. Dissolveu-se esta massa em metanol num balão volumétrico de 50,00 mL. A concentração obtida foi:

$$[\text{Cloran}] = \frac{55,17}{0,050} = 1103,4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$[\text{Cloran}] \approx 1103 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$$

sendo a primeira uma diluição da solução-mãe na proporção 1:10 e a segunda uma diluição, de igual proporção, da solução intermédia 1 tendo, deste modo, como concentrações $110,3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e $11,03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente.

No caso da solução intermédia 1, foi retirado 1000,00 μL da solução mãe e utilizado água como solvente para perfazer o volume total do balão de 10,000 mL. No caso da solução intermédia 2, esta corresponde a uma diluição na proporção 1:10 da solução intermédia 1. Colocou-se 1000,00 μL da solução intermédia 1, de concentração $110,3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ num balão de 10,000 mL e perpez-se também com água.

Estas soluções foram utilizadas na preparação dos padrões utilizados nos ensaios preliminares e obtenção da recta de calibração, bem como nas soluções usadas nos ensaios de adsorção em *batch*.

1.2 Preparação das Soluções-padrão

Na tabela está indicado o volume (V) utilizado de solução intermédia 2, de concentração $11,03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, para a preparação dos padrões. É de referir que estas soluções foram preparadas em água destilada e purificada, em balões volumétricos de 10,000 mL.

Tabela 1.i - Volume de solução de concentração 11,03 mg·L⁻¹ utilizado.

Solução-padrão	Conc. (mg·L ⁻¹)	Volume pipetado (µL)
1	0,40	363
2	0,30	272
3	0,20	181
4	0,10	90,7
5	0,075	68
6	0,040	36,3

Para os ensaios de adsorção *batch*, foi utilizada uma solução de cloranfenicol de 250,00 mL de concentração 9,88 mg·L⁻¹. Uma vez que se tratava de uma concentração bastante elevada, foi preparada outra de concentração 1 mg·L⁻¹, concentração esta utilizada durante todo o procedimento experimental.

Tabela 1.ii - Volume de solução intermédia utilizado.

Solução-padrão	Conc. (mg·L ⁻¹)	Volume pipetado (µL)
1	9,88	2270* ¹
2	1,00	272* ²

*¹ - solução usada com concentração 1103 mg·L⁻¹.

*² - solução usada com concentração 110,3 mg·L⁻¹.

Anexo 2 Caracterização da Casca de Noz

O espectro foi feito nas seguintes condições: 22 scans/min., resolução de 4 cm^{-1} e foi expresso em transmitância, numa gama compreendida $4000\text{-}450\text{ cm}^{-1}$.

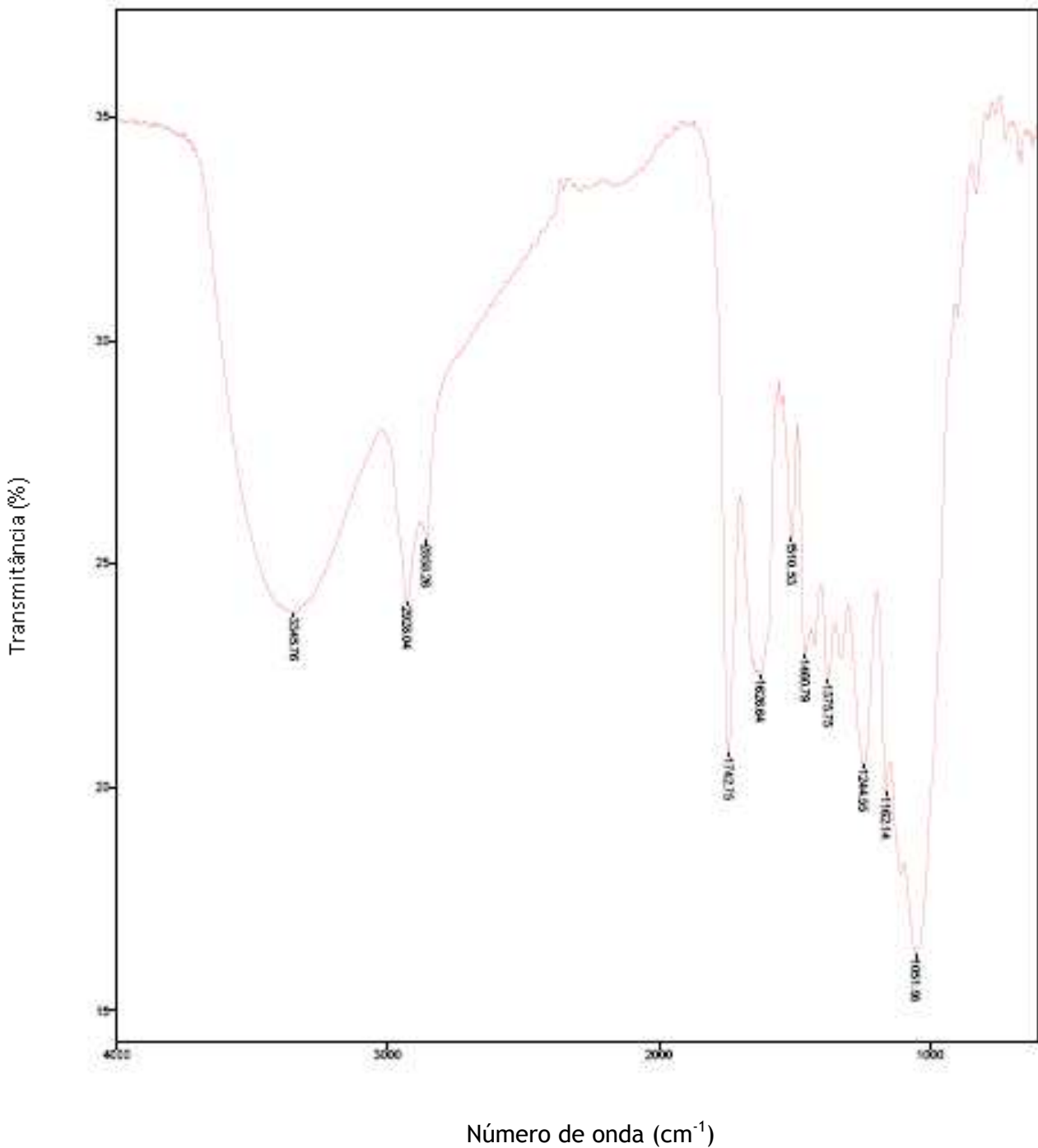


Figura 2.i - Espectro da análise da casca de noz através da técnica de FTIR.

Anexo 3 Funcionamento do HPLC

Para o funcionamento do equipamento HPLC é fundamental:

- Ligar o equipamento: detector da marca Merck Hitachi, L-7450A e bomba Merck Hitachi, L-7100;
- Purgar o equipamento;
- Limpar o equipamento antes de o desligar.

Para tal, é necessário purificar água destilada com ajuda de uma bomba de vácuo, conforme a figura 3.i, e corrigir o seu pH para 2,5 e, também, desgaseificar, com hélio, a mesma água e também o acetonitrilo.



Figura 3.i - Procedimento para purificar a água destilada.

Mergulha-se os dois filtros do detector nos dois frascos que contêm a água e o acetonitrilo - a fase móvel. É de realçar que é fundamental tapar os frascos com parafilme e papel de alumínio, a fim de evitar o contacto dos líquidos dos frascos das duas fases móveis com o ar.

É importante ter cuidado e verificar possíveis bolhas de ar nos frascos da fase móvel, uma vez que as bolhas de ar podem ser traduzidas em variações repentinas no

cromatograma. Uma medida para evitar a formação de bolhas de ar é a prévia degaseificação das soluções, aquando da utilização e realização de análises.

Após ligar o detector, a bomba e o computador que adquire os dados, é necessário purgar o equipamento, a fim de verificar possíveis bolhas de ar na tubagem ou nos frascos. O programa de aquisição é ligado e procede-se à estabilização da linha de base.

A injeção é realizada na posição *load* e, aquando do loop cheio, coloca-se na posição *inject* e faz-se start no equipamento.

O HPLC fornece a área e o tempo de retenção de cada componente, separado das amostras e solução padrão. Por vezes, é necessária a integração correcta (new baseline) do pico obtido. A figura abaixo corresponde a um exemplo de cromatograma obtido em cada análise por HPLC-DAD, sendo o pico do antibiótico em estudo cerca de 8,9 min.

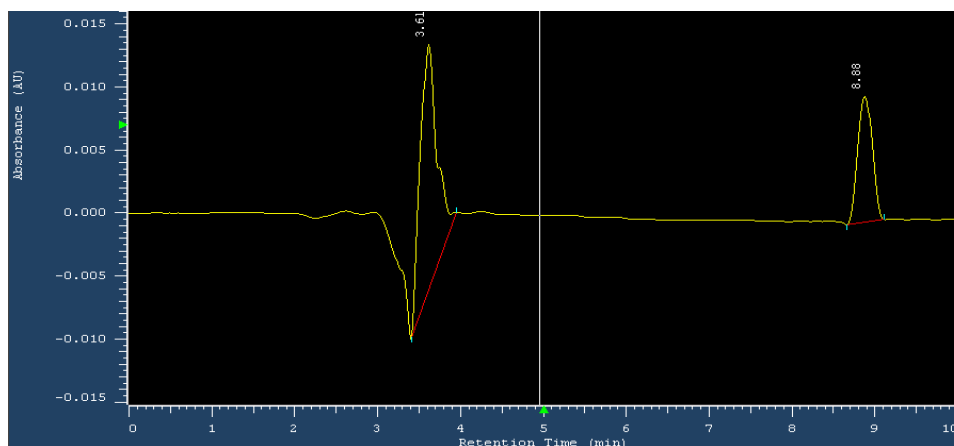


Figura 3.ii - Cromatograma obtido por análise de HPLC-DAD.

Para desligar o equipamento, faz-se passar o acetonitrilo pela coluna; desliga-se a bomba após ter sido diminuída a pressão, gradualmente, através da diminuição do caudal que circula na coluna. Desliga-se o detector e a bomba do equipamento e substitui-se o frasco de água por outro com água destilada purificada e degaseificada no momento final de trabalho.

Uma vez que houve crescimento de fungos no tubo do frasco de uma fase móvel - a água, o modo de desligar o equipamento foi alterado em alguns momentos. Como tal, substituiu-se o frasco de água purificada por um frasco de acetonitrilo degaseificado. Ligou-se, novamente, a bomba e a válvula da purga, com baixo caudal, cerca de dez minutos, e purgou-se mais dois minutos. Desligou-se a purga e a bomba e, por fim, a válvula da purga.

Anexo 4 Ensaios Preliminares

Os objectivos iniciais consistiram na obtenção dos tempos de retenção e das áreas de cada padrão.

Os dados obtidos dos ensaios em HPLC foram obtidos para um comprimento de onda de 278 nm, visto ser este o comprimento de onda máximo para o antibiótico em estudo.

Na tabela 4.i, estão patentes os tempos de retenção e respectivas áreas obtidas para cada padrão, realizados preliminarmente.

Tabela 4.i - Tempos de retenção e área obtida por HPLC para cada padrão.

Solução-padrão	Conc. (mg · L ⁻¹)	Tempo de retenção (min)	Área (μV · s ⁻¹)
1	0,40	24,61	51360
2	0,30	24,48	39086
3	0,20	24,72	25772
4	0,10	24,60	13196
5	0,075	24,64	9366
6	0,04	25,89	5064

A análise das amostras, por cromatografia líquida, ocorreu nas seguintes condições:

- fluxo de fase móvel 0,8 mL · min⁻¹;
- razão água/acetonitrilo: 90/10 (%);
- pH da fase aquosa 2,50;
- 40 minutos de duração de cada corrida.

O programa utilizado, inicialmente, tinha sido desenvolvido noutro projecto. No entanto, partindo de injeções do padrão de maior concentração, realizaram-se corridas cuja razão água/acetonitrilo (eluente escolhido) se alterava. Após garantir a razão óptima dos solventes, procedeu-se à redução do tempo de cada corrida, com vista a rentabilização do tempo.

Na tabela seguinte encontram-se exemplos de alterações que foram efectuadas no tempo de cada corrida, de modo a encurtar o tempo.

Tabela 4.ii - Condições de cada corrida.

Conc. (mg · L ⁻¹)	Tempo de retenção (min)	Área (μV · s ⁻¹)	% água/acetonitrilo	Tempo (min)
	-	-	90/10	30
	38,47	42541	85/15	45
			85/15	30
	-	-	80/20	14
	8,36	49443	70/30	40
0,40	7,93	48985	70/30	20
	8,71	49204	70/30	14
	8,32	49336	70/30	14
	8,33	49727	70/30	12
	8,32	49136	70/30	12

Anexo 5 Validação do Método Analítico

5.1 Recta de Calibração

Os dados para obtenção da curva de calibração encontram-se na tabela 5.i. Foram realizados dois brancos.

Tabela 5.i - Dados obtidos para a recta de calibração.

Conc. (mg · L ⁻¹)	Tempo de retenção (min)	Área (μV · s ⁻¹)	Desvio Padrão (μV · s ⁻¹)	CV (%)
0,04	8,40	5083	325,27	6,40
	8,39			
0,075	8,45	9133	197,28	2,20
	8,52			
0,10	8,47	12269	17,68	0,10
	8,39			
0,20	8,40	24770	446,18	1,80
	8,37			
0,30	8,36	35903	108,90	0,30
	8,35			
0,40	8,48	49036	424,26	0,90
	8,45			

Foi efectuado um ajuste linear e determinados os parâmetros abaixo mencionados.

A ordenada na origem e o declive são calculados através das expressões, respectivamente:

$$a = \frac{\sum_i (x_i - x_{\text{médio}}) \cdot (y_i - y_{\text{médio}})}{\sum_i (x_i - x_{\text{médio}})^2} \quad \text{Equação i}$$

$$b = \frac{\sum_i y_i}{n} - a \cdot \frac{\sum_i x_i}{n} \quad \text{Equação ii}$$

sendo x_i a concentração do padrão; y_i a área; $y_{\text{médio}}$ a média dos valores das áreas; n o número de pontos experimentais.

Para o cálculo dos desvios padrões, quer da ordenada, quer do declive, utilizaram-se as expressões:

$$s_{\frac{y}{x}} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - y)^2}{n - 2}} \quad \text{Equação iii}$$

$$s_a = \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \cdot \sum_i (x_i - x_{\text{médio}})^2}} \quad \text{Equação iv}$$

$$s_b = \frac{s_{\frac{y}{x}}}{\sqrt{\sum_i (x_i - x_{\text{médio}})^2}} \quad \text{Equação v}$$

Sendo $s_{\frac{y}{x}}$ o desvio padrão residual.

Os intervalos de confiança do declive e da ordenada na origem são dados pelas expressões:

$$IC_b = t \cdot s_b \quad \text{Equação vi}$$

$$IC_a = t \cdot s_a \quad \text{Equação vii}$$

Para verificar a linearidade de resposta do detector HPLC/DAD é fundamental que haja as seguintes condições:

- $\frac{sb}{b} < 5\%$
- O intervalo de confiança da ordenada deve conter a origem (0,0) → a ± sa
- O coeficiente de correlação, $r > 0,995$.

Este parâmetro foi calculado através da expressão:

$$r = \frac{\sum_i (x_i - x_{\text{médio}}) \cdot (y_i - y_{\text{médio}})}{\sqrt{\sum_i (x_i - x_{\text{médio}})^2 \cdot \sum_i (y_i - y_{\text{médio}})^2}} \quad \text{Equação viii}$$

Pela recta de calibração pode-se determinar o limite de detecção e de quantificação.

O limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito na amostra que pode ser detectada em determinadas condições. Contudo, não é necessariamente quantificada. Foi calculado por:

$$LD = 3 \times s_a \quad \text{Equação ix}$$

5.1.1 Parâmetros de Linearidade

Procedeu-se a um estudo da linearidade. A tabela seguinte apresenta os cálculos efectuados para a determinação dos parâmetros de linearidade.

Tabela 5.ii - Parâmetros calculados para o estudo da linearidade do equipamento HPLC.

Solução Padrão	x_i	y_i	$(x_i - x_{\text{médio}})^2$	$y_i - y_{\text{médio}}$	$y_{\text{calculado}}$	$(y_i - y_{\text{calculado}})^2$
1	0,40	49036	0,045867361	26337	5703,00	425766424
2	0,30	35903	0,013034028	13204	1716,00	131973043
3	0,20	24770	0,000200694	2071	158,00	3658657
4	0,10	12269	0,007367361	-10430	1028,00	131296379
5	0,075	9133	0,012284028	-13566	1625,00	230781000
6	0,040	5083	0,021267361	-17616	2716,00	413381870
Média	0,19	22699	-	-	-	-
Soma	1,12	136193	0,10	0	136192,50	686969,32

5.1.2 Repetibilidade

Nas tabelas 5.iii e 5.iv constam os cálculos efectuados aos ensaios de precisão intermédia e repetibilidade. Foram ensaiados em dois dias consecutivos com o objectivo de verificar reprodutibilidade destes ensaios com o equipamento HPLC, e também, com vista a validar o método analítico.

Tabela 5.iii - Parâmetros calculados dos ensaios de precisão intermédia.

Conc. ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	\bar{A} ($\mu\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$)	Desvio Padrão, S	CV (%)
0,04	4858,08	343,96	7,08
0,10	12163,50	346,56	2,85
0,40	47661,67	2412,96	5,06

Tabela 5.iv - Parâmetros calculados dos ensaios de repetibilidade, em dois dias consecutivos.

Conc. ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Desvio Padrão, S	CV (%)
0,04	233,07	4,63
	362,30	7,74
0,10	257,45	2,08
	303,77	2,54
0,40	1279,89	2,62
	2690,91	5,80

Anexo 6 Ensaios em *Batch*

6.1 Adsorvente - Casca de Noz

6.1.1 Tempo de Equilíbrio

Nas figuras seguintes apresentam-se as concentrações de antibiótico presente na matriz aquosa, face à respectiva remoção da mesma matriz, obtidas dos ensaios de adsorção adjacentes a cada quantidade de adsorvente utilizado.

A figura 6.i representa os ensaios de adsorção com 100 mg de casca de noz.

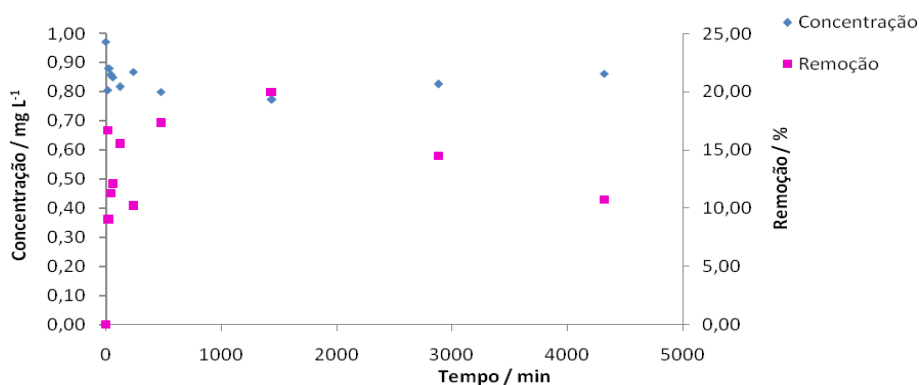


Figura 6.i - Representação gráfica da concentração de antibiótico na matriz aquosa face à sua respectiva remoção.

A figura 6.ii representa os ensaios de adsorção com 300 mg de casca de noz.

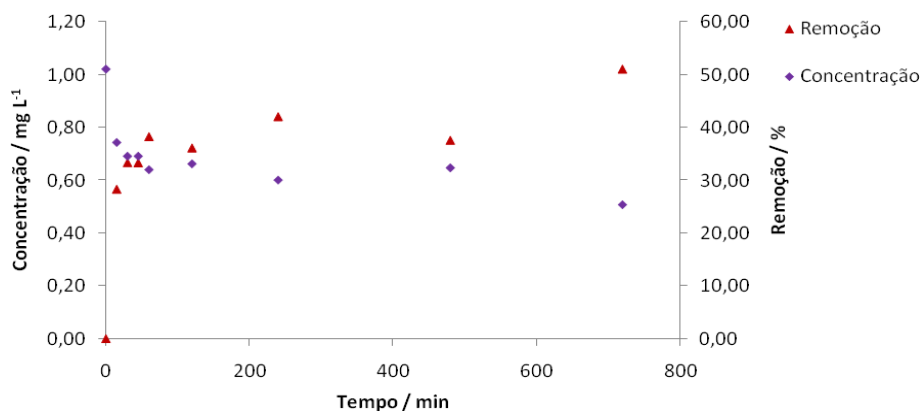


Figura 6.ii - Gráfico da concentração de antibiótico na matriz aquosa face à sua respectiva remoção.

A figura 6.iii representa os ensaios de adsorção com 500 mg de casca de noz.

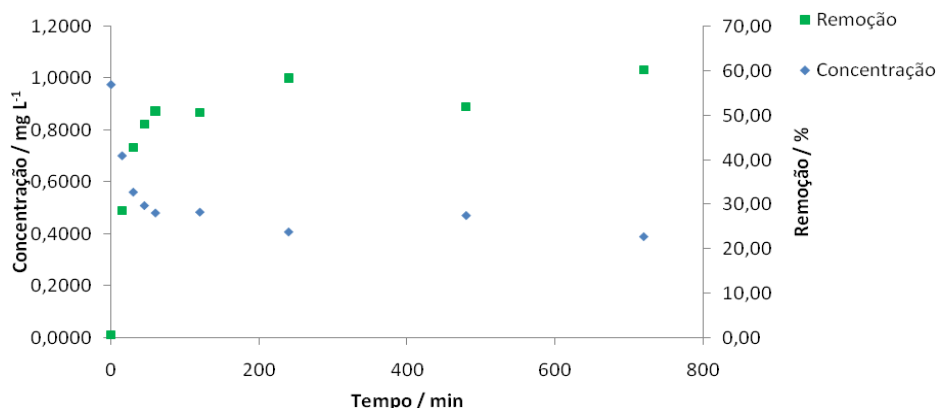


Figura 6.iii - Representação gráfica da concentração de antibiótico na matriz aquosa face à sua respectiva remoção usando 500 mg de casca de noz.

A figura 6.iv representa os ensaios de adsorção com 1000 mg de casca de noz.

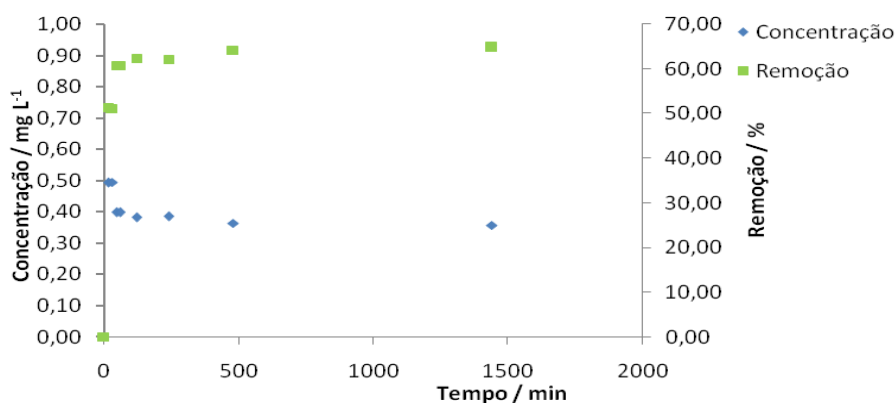


Figura 6.iv - - Representação gráfica da concentração de antibiótico na matriz aquosa face à sua respectiva remoção usando 1000 mg de casca de noz.

6.1.2 Cinética de Adsorção

A capacidade de adsorção do adsorvente foi calculada pela seguinte equação:

$$Q_{eq} = \frac{(C_0 - C_{eq}) \cdot V}{m} \quad \text{Equação x}$$

sendo C_0 , a concentração do soluto na solução inicial; C_{eq} , a concentração do soluto em equilíbrio; V , o volume da solução; m , a massa de adsorvente.

Seguidamente são apresentados os gráficos lineares de $\text{Log}(q_e - q)$ versus t , para a equação de pseudo-primeira ordem, $\frac{t}{q}$ versus t , para a equação de pseudo-segunda ordem.

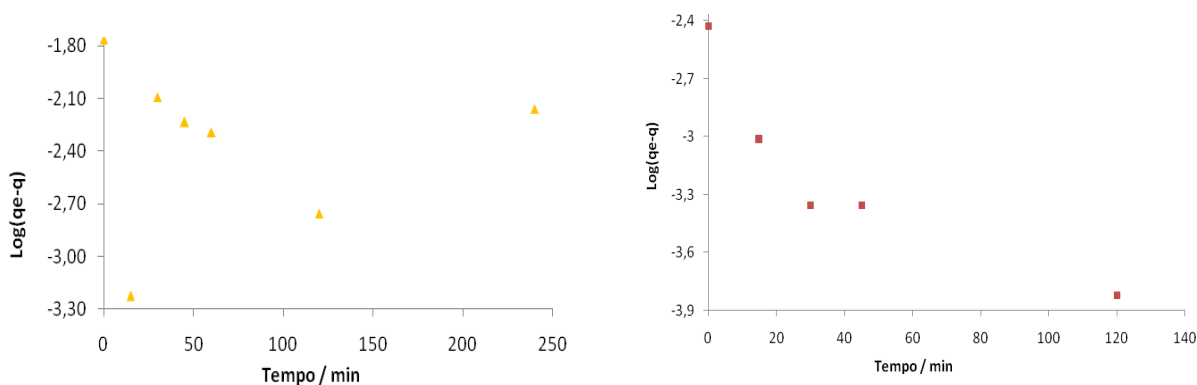


Figura 6.v - Cinética de adsorção segundo o modelo pseudo-primeira ordem para 100 e 300 mg de casca de noz.

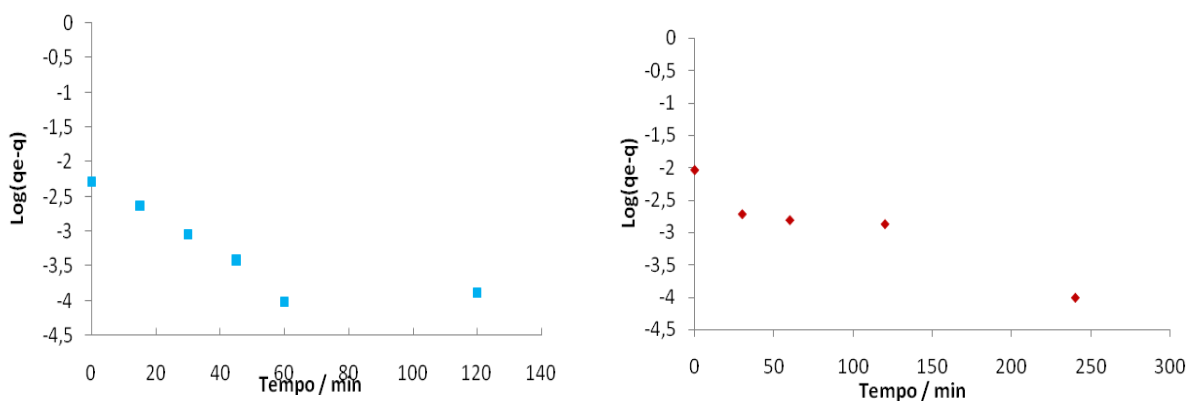


Figura 6.vi - Cinética de adsorção segundo o modelo pseudo-primeira ordem para 500 e 600 mg de casca de noz.

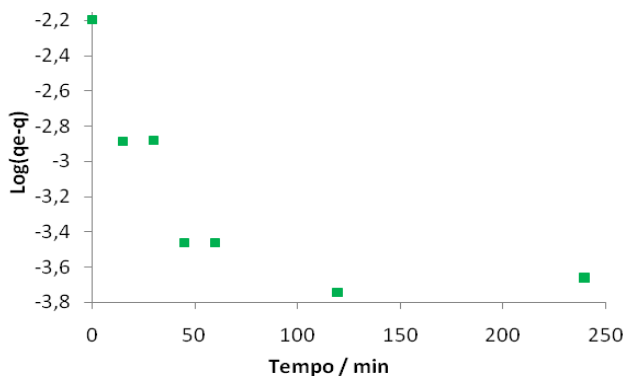


Figura 6.vii - Cinética de adsorção segundo o modelo pseudo-primeira ordem para 1000 mg de casca de noz.

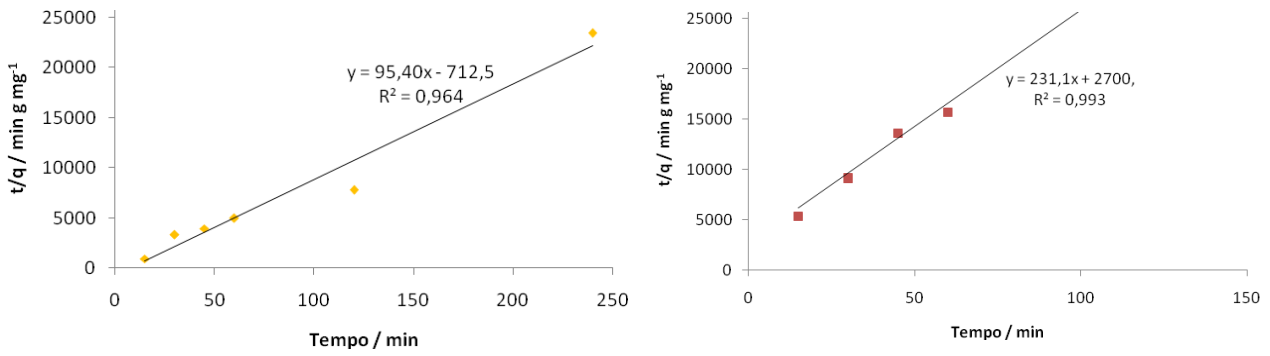


Figura 6.viii - Cinética de adsorção de acordo com modelo de pseudo-segunda ordem para 100 e 300 mg de casca de noz.

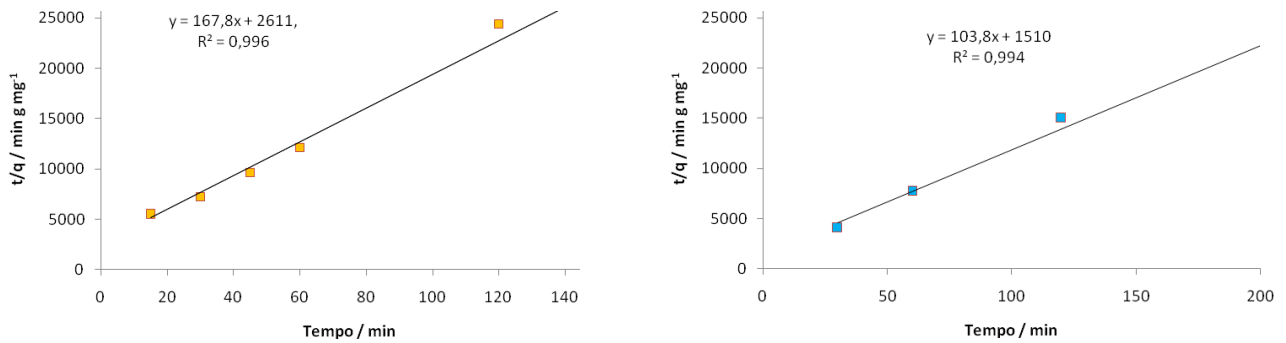


Figura 6.ix- Cinética de adsorção de acordo com modelo de pseudo-segunda ordem para 500 e 600 mg de casca de noz.

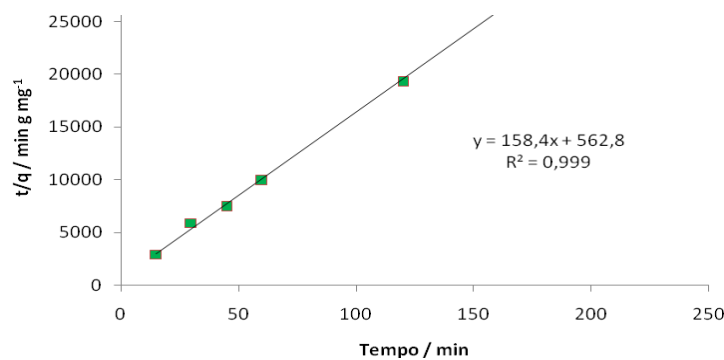


Figura 6.x - Cinética de adsorção de acordo com modelo de pseudo-segunda ordem para 1000 mg de casca de noz.

6.1.3 Isotérmica de Adsorção

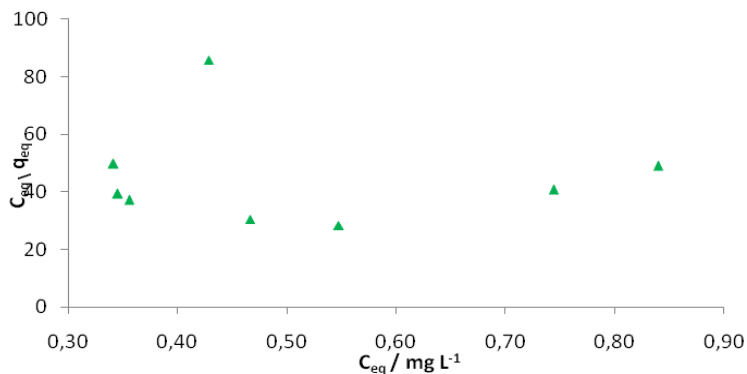


Figura 6.xi - Isotérmica de Langmuir do cloranfenicol em casca de noz.

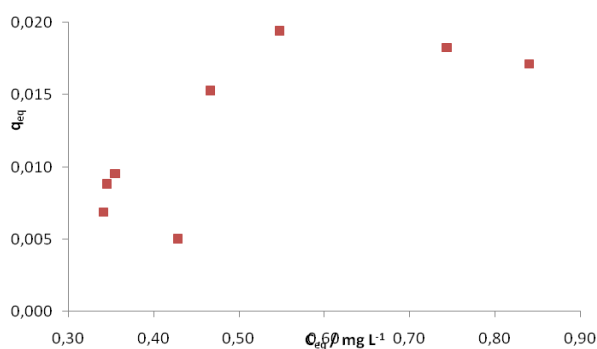


Figura 6.xii - Isotérmica Linear do cloranfenicol em casca de noz.

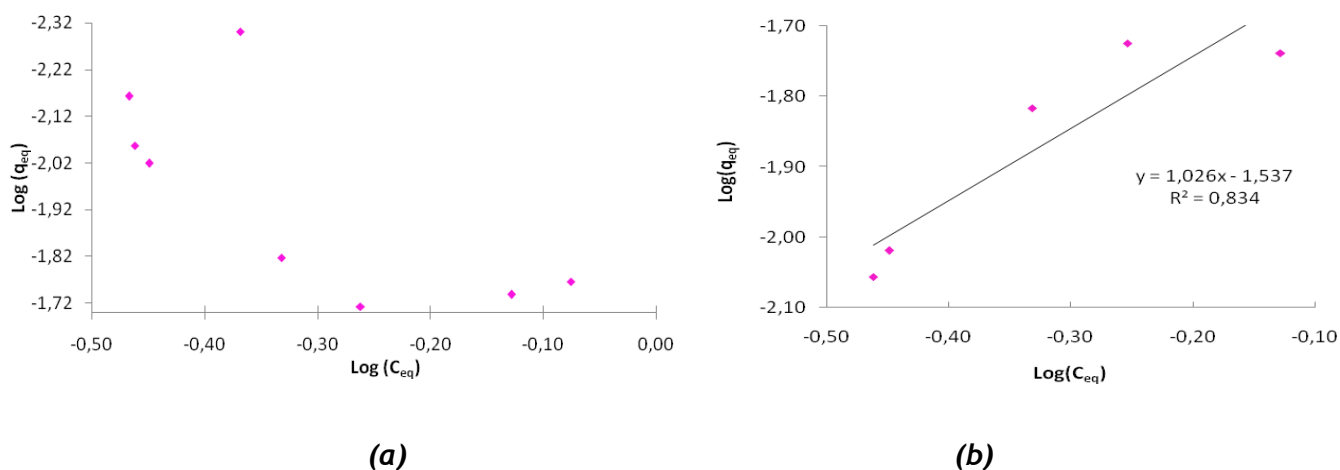


Figura 6.xiii - Isotérmica de Freundlich do cloranfenicol em casca de noz; (a) corresponde a todos os dados experimentais e (b) corresponde ao melhor ajuste da isotérmica, por eliminação de alguns pontos experimentais.

6.2 Adsorvente - Cinza de Casca de Noz

Nas tabelas seguintes encontram-se os resultados de concentração e remoção de antibiótico obtidos, utilizando como adsorvente cinza da casca de noz moída.

Tabela 6.i - Resultados obtidos dos cromatogramas para diferentes quantidades de cinza.

Tempo (min)	50 mg		100 mg	
	$\overline{Conc.}$ (mg · L ⁻¹)	Remoção (%)	$\overline{Conc.}$ (mg · L ⁻¹)	Remoção (%)
0	1,03	0	0,49	49,36
15	0,52	47,54	0,21	78,49
30	0,39	61,16	0,14	85,36
60	0,19	80,72	0,06	94,13
120	0,10	90,24	0,01	98,82
240	0,02	98,07	0,00	100,00
480	0,01	98,97	0,86	11,38
720	-	-	0,03	97,29
1440	-	-	0,83	13,86

Tabela 6.ii - Resultados obtidos para diferentes quantidades de cinza.

Tempo (min)	300 mg		500 mg	
	$\overline{Conc.}$ (mg · L ⁻¹)	Remoção (%)	$\overline{Conc.}$ (mg · L ⁻¹)	Remoção (%)
0	0,96	0,15	1,00	0,38
15	0,01	98,76	0,02	97,95
30	0,01	99,16	0,00	100,00
60	0,03	96,52	0,00	100,00
120	0,04	97,94	0,00	100,00
240	0,03	96,66	0,00	100,00
480	0,00	100,00	0,00	100,00
720	0,00	100,00	0,00	100,00

Seguidamente encontram-se as representações gráficas da concentração de antibiótico na matriz aquosa, face à sua respectiva remoção.

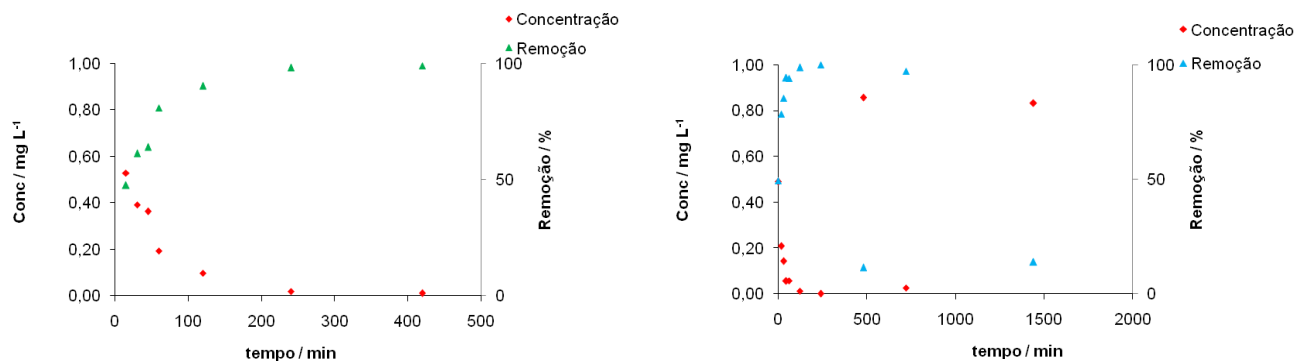


Figura 6.iv - Gráfico da concentração de antibiótico versus remoção usando 50 e 100 mg de cinza de casca de noz.

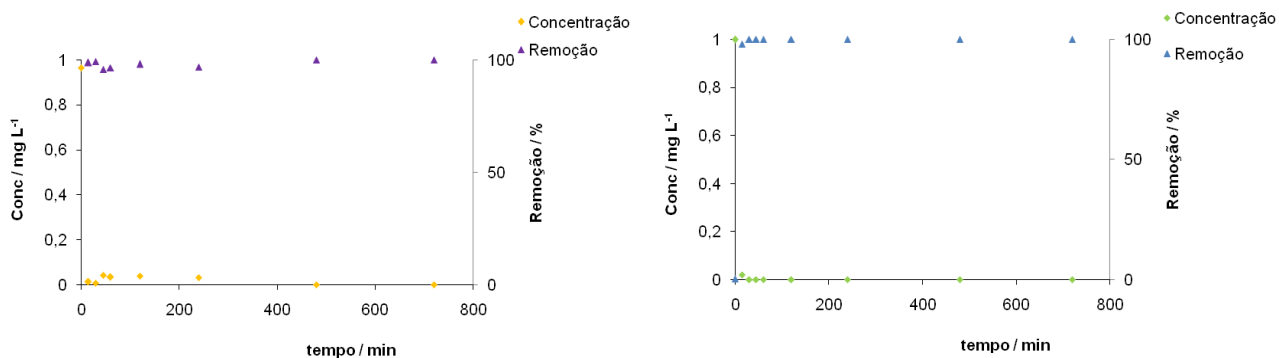


Figura 6.v - Gráfico da concentração de antibiótico versus remoção usando 300 e 500 mg de cinza de casca de noz.

Anexo 7 Oxidação com reagente de Fenton

Na tabela 7.i encontram-se algumas propriedades dos reagentes utilizados.

Tabela 7.i - Características dos Reagentes utilizados na Oxidação.

Reagente	Massa molar ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$)	Conc. ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
H_2O_2	34,00	339
$\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	277,86	-
Fe^{2+}	55,80	-

No instante inicial do reactor:

$$[\text{H}_2\text{O}_2] = 416 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$[\text{Cloran}] = 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$$

O volume de H_2O_2 utilizado para no instante zero do reactor se obter $416 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ é:

$$V = \frac{416 \times \frac{1}{1000} \times 0,1}{339} = 123 \mu\text{L}$$

A massa de $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ adicionada é:

$$m(\text{Fe}^{2+}) = 0,0132 \times m(\text{H}_2\text{O}_2) \Rightarrow m(\text{Fe}^{2+}) = 0,0132 \times 416 \times \frac{1}{1000} \times 0,1 = 0,55 \text{ mg}$$

Esta massa foi determinada com o valor da razão optimizado num projecto já realizado.

$$R = \frac{m(\text{Fe}^{2+})}{m(\text{H}_2\text{O}_2)} = 0,0132$$

Sabendo que $1 \text{ mol Fe}^{2+} = 1 \text{ mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$:

$$\frac{5,5 \times 10^{-4}}{55,8} = \frac{m(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})}{277,86} \rightarrow m(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}) = 2,73 \text{ mg}.$$