

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Monografia

Avaliação da fotólise de ciprofloxacino e enrofloxacino por  
cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas  
(LC-ESI-QToF/MS)

Amanda Hikari Imamura

Orientador: Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto

São Carlos

Novembro, 2015.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, principalmente aos meus pais, Emerson e Cláudia, que sempre me incentivaram a me dedicar aos estudos, fizeram o possível e o impossível para me proporcionar as oportunidades que tive e terei no futuro, e à minha irmã Saory, que sempre esteve comigo mesmo na distância. Muito obrigada pelo amor, apoio e pela família linda que nós somos;

Ao meu namorado Lucas, que aguentou ouvir meus desabafos e desesperos, sempre me incentivou ao longo da graduação para que fizesse o meu melhor e me alegrou inúmeras vezes quando estava desanimada. Muito obrigada pela paciência, compreensão, companhia e amor;

Ao professor Álvaro José dos Santos Neto, que desde o primeiro ano de graduação, como tutor, me orientou na pesquisa e na vida acadêmica;

Às minhas queridíssimas amigas Victória, Tomie, Aline, Júlia, Larissa, Jéssica, Lidia e Juliana que foram a minha família nesses 4 anos em São Carlos. Com vocês, a graduação foi mais “fácil” e divertida. Muito obrigada pela amizade;

À Tanare, que me guiou no projeto e com quem compartilhei grande parte das minhas experiências na pesquisa. Muito obrigada pela paciência e pela orientação;

À Dona Alzira e às meninas do pensionato, principalmente à Carol. Muito obrigada pela convivência;

Aos professores do IQSC, que compartilharam conhecimento e possibilitaram a minha formação;

À FAPESP pela bolsa de iniciação científica concedida para desenvolvimento do projeto.

## RESUMO

A presença de alguns contaminantes derivados de compostos farmacêuticos em ambiente aquático pode resultar em desequilíbrios ambientais. Por exemplo, antibióticos podem causar resistência bacteriana e alguns fármacos são conhecidos como interferentes endócrinos nos organismos vivos. A ineficácia dos tratamentos convencionais de efluentes na remoção desses poluentes impulsionou o desenvolvimento de processos alternativos mais eficazes na degradação. Neste trabalho, avaliou-se por LC-ESI-QToF/MS a fotodegradação de ciprofloxacino e enrofloxacino, antibióticos da classe das fluoroquinolonas, quanto aos produtos formados e à eficiência do processo simulando as condições de um efluente (matriz complexa e baixa concentração do poluente). Primeiramente, efetuou-se a fotólise do fármaco a  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , para permitir a análise dos subprodutos formados. Para cada fármaco, foram identificados 10 intermediários resultantes da fotólise, formados principalmente por reações de substituição do átomo de flúor, abertura e oxidação simples do anel piperazínico, abertura do anel ciclopropílico, descarboxilação e, especialmente para o enrofloxacino, reações de oxidação no grupo etila do anel piperazínico e remoção deste grupo, formando o próprio ciprofloxacino. Alguns produtos de degradação do ciprofloxacino foram mais facilmente detectados apenas após a pré-concentração da amostra, indicando a importância dessa etapa. A fim de avaliar a fotólise do fármaco em menor concentração, foi desenvolvido um método de extração em fase sólida (SPE) com o objetivo de pré-concentrar as amostras e permitir a sua análise cromatográfica. Na triagem do método de SPE, foram avaliadas as combinações de cinco fases sólidas (Oasis HLB, Strata-X, Strata-XA, Chromabond HR-X e Chromabond HR-XA) com seis solventes (ACN, ACN ácida, ACN alcalinizada, MeOH, MeOH ácido e MeOH alcalinizado). Como a fase Oasis HLB com eluição de ACN apresentou melhor recuperação para a amostra contendo o ciprofloxacino e seus produtos, o protocolo desenvolvido consistiu no uso dessa fase com eluição sequencial de ACN acidificada, ACN pura e ACN alcalinizada. Em contrapartida, os valores das recuperações do enrofloxacino e seus intermediários foram bastante dispersos, dificultando a escolha do melhor sorvente e eluente. O protocolo desenvolvido consistiu no acoplamento dos cartuchos contendo a fase Oasis HLB seguida pela fase Chromabond-HRX com eluição sequencial usando-se ACN e MeOH. Para se analisar o perfil de degradação dos fármacos a  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ , submeteram-se as amostras aos protocolos de SPE antes da análise cromatográfica. Os fármacos apresentaram diferentes comportamentos na fotólise. O ciprofloxacino estava abaixo do limite de detecção após 20 minutos de fotólise mesmo em matriz de efluente, enquanto que para o enrofloxacino,

os perfis de degradação em água e esgoto *labmade* foram distintos, sendo de 20 e 40 minutos respectivamente o tempo em que o enrofloxacino não era mais detectado. Além disso, alguns subprodutos do enrofloxacino não foram degradados mesmo após 1 hora sob radiação UV, e é constatada na literatura a toxicidade do produto persistente identificado com  $m/z$  nominal 374. Para o ciprofloxacino, a fotólise mostrou-se eficiente na degradação do ciprofloxacino. Para o enrofloxacino, no entanto, estudos sobre ecotoxicidade dos subprodutos, além da fotodegradabilidade dos mesmos em água e do enrofloxacino em matriz complexa devem ser realizados.

## ABSTRACT

Pharmaceuticals as contaminants might result damages in the environment. For example, antibiotics may cause resistance in bacterial population and some pharmaceuticals are known as endocrine disruptors in animals. As those compounds are not biodegradable in wastewater treatment plants, alternatives processes have been developed to remove those contaminants from effluents. In this work, the photodegradation of two fluoroquinolones, ciprofloxacin and enrofloxacin, were evaluated by LC-ESI-QToF/MS. The degradation products formed and the process efficiency in samples simulating the conditions of wastewater (pollutant low concentration and complex matrix) were analyzed. First, photolysis of 10 mg L<sup>-1</sup> drug concentration were performed to analyze photodegradation products. For each fluoroquinolone, ten products were detected and their structures were identified. They were formed by replacement of fluorine atom, piperazinyl ring cleavage and oxidation, cyclopropyl ring cleavage, decarboxylation and, especially for enrofloxacin, piperazinyl ring ethyl group oxidation and removal, forming ciprofloxacin itself. Some ciprofloxacin photodegradation products were easier detected after sample pre-concentration, evidencing the importance of this step. Before low concentration photolysis evaluation, solid-phase extraction (SPE) methods were developed to pre-concentrate the samples and allow their chromatographic analyzes. In screening the best SPE method, combinations of five extraction phases (Oasis HLB, Strata-X, Strata-XA, Chromabond HR-X and Chromabond HR-XA) with six solvents (pure ACN, acid ACN, alkalized ACN, pure MeOH, acid MeOH and alkalized MeOH) were evaluated. For ciprofloxacin degraded sample, the protocol consisted of Oasis HLB phase and sequential elution with acid ACN, pure ACN and alkalized ACN. For enrofloxacin, despite being difficult selecting the solid phase and eluent due to the heterogeneity of recuperation values, the protocol based on coupling Oasis HLB and Chromabond HR-X cartridges and sequential elution with ACN and MeOH. The degraded samples at 0.01 mg L<sup>-1</sup> of fluoroquinolone were extracted by the protocols developed and then analyzed by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. Ciprofloxacin was below detection limit after 20 minutes of photolysis even in labmade wastewater matrix, while degradation profiles of enrofloxacin in water and wastewater were different. In the first matrix, it took 20 minutes to enrofloxacin not being detected and in the complex matrix 40 minutes. Also some enrofloxacin products were not degraded after one hour of UV irradiation and the persistent product identified with nominal *m/z* 374 is related to toxicity. Ciprofloxacin degradation by

photolysis demonstrated efficiency; however, more studies about enrofloxacin products toxicity and photodegradability, especially in complex matrix, are needed.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>DESENVOLVIMENTO.....</b>	<b>10</b>
	CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
	CAPÍTULO 2 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	17
	2.2.1 Padrões e Reagentes .....	17
	2.2.2 Execução da fotólise.....	17
	2.2.3 Avaliação da fotólise do fármaco em alta concentração .....	18
	2.2.4 Procedimento da extração em fase sólida.....	18
	2.2.5 Avaliação da fotólise do fármaco em baixa concentração .....	21
	2.2.6 Análise em LC-ESI-QToF/MS.....	21
	2.2.7 Análise em LC-Orbitrap/MS .....	22
	CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
	2.3.1 Fotólise do fármaco em alta concentração .....	23
	2.3.2 Triagem do método de SPE.....	36
	2.3.3 Fotólise do fármaco em baixa concentração .....	42
<b>3</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>47</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>49</b>
	<b>ANEXO A - Espectros de MS e/ou MS/MS do ciprofloxacino e dos intermediários. ....</b>	<b>53</b>
	<b>ANEXO B - Espectros de MS e/ou MS/MS do enrofloxacino e dos intermediários.....</b>	<b>63</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico proporcionou para a sociedade, à primeira análise, uma melhor qualidade de vida, oferecendo conforto e maior expectativa de vida. Por outro lado, esse desenvolvimento foi acompanhado de inúmeros problemas contemporâneos, como as mudanças climáticas, os desastres ambientais, o esgotamento de bens naturais e fontes energéticas, a escassez da água potável, a geração e o despejo de poluentes tóxicos no ambiente. Tendo em conhecimento tais consequências nocivas ao meio ambiente, um novo conceito de desenvolvimento econômico foi elaborado, o desenvolvimento sustentável, no qual a preservação do meio ambiente é considerada. Deve-se ainda reconhecer o limite dos recursos naturais e planejar o seu uso de modo a não comprometer as gerações futuras.

A água é um recurso natural imprescindível, que além de essencial aos organismos vivos, ela é necessária economicamente na agropecuária, na indústria e na geração de energia elétrica. Devido à sua importância, estudos quanto à qualidade da água e sua preservação estão sendo desenvolvidos, propondo processos industriais mais eficientes, com menor consumo de água, e reúso, minimização e tratamento dos resíduos líquidos. Apesar do avanço nessas pesquisas, ações básicas quanto ao consumo consciente da água ainda são negligenciadas. Além do desperdício da água tanto no consumo doméstico quanto no uso industrial, em diversas regiões ainda não há tratamento adequado do efluente, que é descartado diretamente em corpos d'água, propagando a poluição.

Com o avanço da química orgânica de síntese, diversas moléculas foram sintetizadas, muitas delas com aplicações interessantes à atividade humana, como os pesticidas, que aumentam a produtividade das culturas, fármacos, que possibilitam a prevenção e o tratamento de muitas doenças, polímeros, que constituem inúmeros materiais do dia a dia. Concomitantemente, surgiram novos poluentes denominados contaminantes emergentes, cujos efeitos ecotoxicológicos ainda estão sendo estudados e por isso não estão incluídos na rotina de monitoramento pelos órgãos regulamentadores. No entanto, é compreensível que o consumo de água contendo resíduos de poluentes farmacêuticos, por exemplo, possa resultar em efeitos adversos ao organismo. Futuramente, com dados concretos sobre potenciais riscos ao meio ambiente e à saúde humana, pode haver regulamentação quanto o monitoramento desses contaminantes em matrizes ambientais.

A fim de preservar o meio ambiente e os organismos dos efeitos nocivos, deve ser tomado um conjunto de ações por toda a sociedade. A educação ambiental da população é o

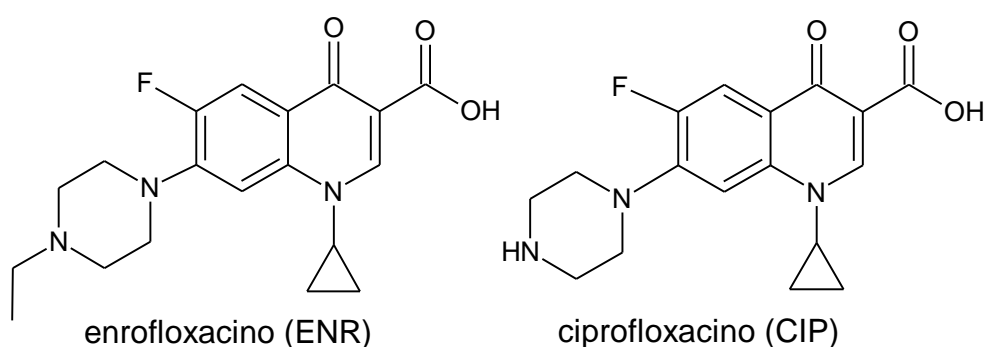


primeiro passo para reduzir a poluição. Deve-se ainda considerar a poluição já existente e investigar seu tratamento adequado, além de substituir substâncias tóxicas por aquelas que não o são. Esses aspectos devem ser abordados simultaneamente de modo que realmente haja a remediação da poluição.

A principal fonte de emissão de poluentes farmacêuticos no meio ambiente aquático é o efluente doméstico, que passa por tratamentos ineficazes na degradação de tais compostos. O reúso da água tratada nas estações, apesar de ser uma solução adequada para o gerenciamento sustentável da água, propicia uma fonte de contaminação direta desses poluentes aos consumidores. Assim, processos específicos de remoção desses poluentes devem ser desenvolvidos e inseridos nas estações de tratamento. No entanto, é evidente que a implementação desses processos poderá levar a um aumento do custo do tratamento de efluente.

Dentro desse contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a fotólise como método alternativo de degradação de ciprofloxacino (CIP) e enrofloxacin (ENR), representados na Figura 1, ambos antibióticos da classe das fluoroquinolonas. Analisaram-se por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-ESI-QToF/MS) os subprodutos formados ao longo da fotólise e a eficiência do processo em matriz complexa, simulando um efluente real. Foi desenvolvido também um método de extração em fase sólida (SPE) da amostra contendo os produtos de degradação para permitir a análise cromatográfica.

Figura 1 - Estruturas químicas do enrofloxacin e ciprofloxacino.



## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

A Química Verde, cujo movimento iniciou-se no início dos anos 1990, tem como objetivo viabilizar processos e produtos de modo a eliminar ou minimizar os impactos negativos ao meio ambiente, por meio de estudos que visam aumentar a segurança dos processos e contribuem para solucionar questões contemporâneas como mudança climática, produção de energia, disponibilidade de recursos hídricos, produção de alimentos e emissão de substâncias tóxicas ao meio ambiente.(1) Resumidamente, os 12 princípios da Química Verde abrangem o consumo de fontes renováveis ou recicladas de matéria-prima, o aumento da eficiência energética ou o uso de menos energia para produzir a mesma ou maior quantidade de produto de interesse e evitar o uso de substâncias persistentes, bioacumulativas e tóxicas.(2) Estudos que tangem a preservação ambiental, desde a diminuição da geração de resíduos nos processos até o reúso e tratamento dos resíduos gerados, vêm-se tornando mais frequentes.

O desenvolvimento da química analítica instrumental proporcionou instrumentos mais sofisticados e sensíveis, o que possibilitou estudos quanto à presença de poluentes antes não detectáveis na água. Os primeiros estudos referentes à presença de compostos farmacêuticos no meio ambiente datam da década de 1970. Hignite e Azarnoff (3) detectaram a presença de metabólitos ativos de clofibrato e da aspirina em esgoto por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Desde então diversos estudos foram realizados, detectando esses poluentes em uma variedade de matrizes como rios, lagos, lençóis freáticos e inclusive em água potável em diversos países. Seifrtová et al.(4) compilaram os métodos de preparo de amostra e de extração de diferentes grupos farmacológicos em uma variedade de matriz que foram relatados na literatura. Predominantemente a técnica de preparo de amostras empregada foi a extração em fase sólida (SPE), sendo a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa sequencial usada na etapa de separação e detecção.

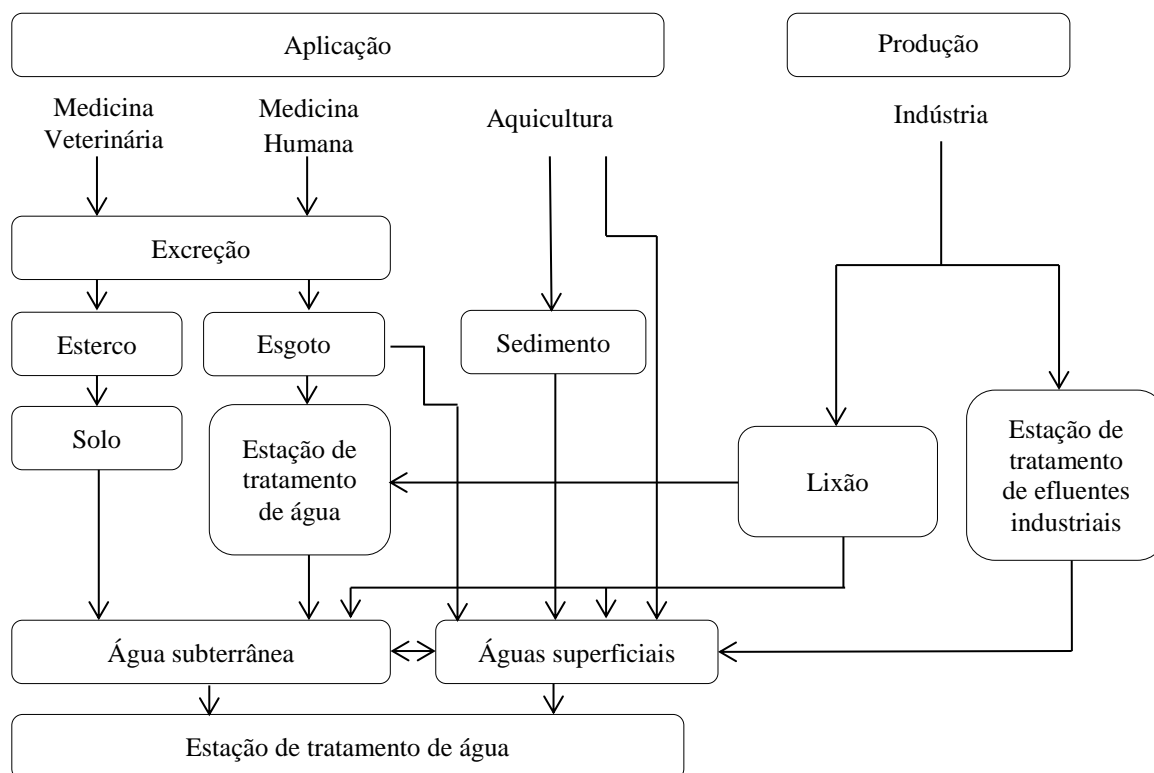
Esses micropoluentes, também conhecidos como emergentes, são na maioria compostos orgânicos sintéticos, como os fármacos, cujo comportamento, distribuição e efeitos no meio ambiente ainda não são totalmente compreendidos, apresentando risco ao ambiente e ao ser humano. Além disso, tais poluentes são considerados persistentes e podem estar relacionados à bioacumulação no meio ambiente, visto que apresentam estruturas químicas complexas e atividade biológica, dificultando a sua degradação.

Apesar de serem detectados em baixas concentrações (na ordem de  $\text{ng L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), esses poluentes podem provocar desequilíbrios ambientais devido à atividade biológica que apresentam. Muitos desses poluentes são conhecidos como interferentes endócrinos, que podem alterar o sistema endócrino. Sabe-se ainda que a presença de antibióticos no meio ambiente pode causar a resistência bacteriana, dificultando o tratamento de doenças e exigindo doses mais elevadas ou o uso de antibióticos mais potentes.(5) De fato, um estudo realizado no Japão detectou em um rio de Osaka a presença de um gene resistente ao antibiótico da classe das fluoroquinolonas.(6)

A introdução de compostos farmacêuticos no meio ambiente deve-se a diversas rotas, como ilustradas na Figura 2. Uma das principais rotas de contaminação é o efluente doméstico.(7) Além do medicamento descartado incorretamente nos lixos comuns e vaso sanitário, a urina pode conter o composto ativo inalterado juntamente com seus metabólitos, visto que o organismo não é capaz de absorvê-lo completamente. O efluente doméstico muitas vezes é diretamente lançado em corpos d'água devido à ausência de estações de tratamento de efluentes. Quando são submetidos aos tratamentos, que se baseiam em processos físico-químicos e degradação biológica, esses xenobióticos não são totalmente degradados, pois alguns processos físico-químicos apenas transferem o poluente da fase líquida à fase sólida e a complexidade das estruturas químicas e atividade biológica desses compostos dificultam a ação dos microrganismos.(8) Göbel et al. (9) avaliaram a remoção dos antimicrobianos macrolídeos, sulfonamidas e trimetopim por tratamentos convencionais de efluentes e verificou-se uma baixa eliminação de 20 %. Outros estudos investigaram a eficiência de alguns métodos físico-químicos, como clarificação, coagulação, floculação, sedimentação e filtração, na remoção de diversos antimicrobianos e obtiveram a mesma baixa eficiência.(10)

Outra fonte de contaminação provém da utilização de medicamentos na agricultura e na criação animal para tratamento de doenças ou como agentes profiláticos. Os dejetos animais muitas vezes são aplicados diretamente no solo como fertilizantes e os metabólitos presentes podem ser transferidos ao sedimento ou a corpos d'água.(7) Além disso, o efluente indústrias farmacêuticas pode conter compostos farmacêuticos persistentes aos tratamentos, e serem lançados nas águas superficiais.

Figura 2 - Rotas de contaminação de compostos farmacêuticos.



Fonte: Adaptado de BILA, D. M., 2003.(7)

No Brasil, apesar de ser estabelecido o limite máximo de resíduo de drogas veterinárias que diversos alimentos de origem animal podem conter (11), não há legislação referente à presença desses resíduos em efluentes a serem lançados no meio ambiente e, portanto, não há controle sobre esse tipo de contaminação. No entanto, em 2011 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a resolução RDC N° 20/2011 que proíbe a venda de antimicrobianos sem prescrição médica, com intuito de controlar o desenvolvimento da resistência bacteriana.(12)

Visando eliminar esses poluentes dos efluentes, processos alternativos de degradação estão sendo desenvolvidos. Devido à persistência desses compostos, foram propostos os processos oxidativos avançados (POAs), que se baseiam na geração *in situ* de radicais hidroxilas ( $\bullet\text{OH}$ ), pouco seletivos e altamente oxidantes com potencial de redução de 2,73 V (em relação ao eletrodo-padrão de hidrogênio, EPH), valor muito acima de oxidantes convencionais. Esses radicais podem ser produzidos via fotólise, fotólise de peróxido de hidrogênio, ozonização, fotocatalise heterogênea, Fenton, foto-Fenton, entre outros.(8) Vasconcelos et al. (13) avaliaram a eficiência na remoção de ciprofloxacino de efluente hospitalar por meio de diferentes POAs, como oxidação fotoinduzida, fotocatalise

heterogênea, ozonização e peroxônio (ozônio com peróxido de hidrogênio). Todos os processos mostraram-se bastante eficientes, com degradação quase total do antimicrobiano e de forma mais rápida do que os tratamentos convencionais. Os POAs podem não levar a mineralização total dos antibióticos nos efluentes, no entanto seus produtos de degradação podem ser mais suscetíveis à biodegradação, e quando combinados ambos os métodos, pode-se obter a sua remoção, como foi verificado por Malato et al.(14) Em seu trabalho, o processo foto-Fenton solar foi combinado com o tratamento biológico e a degradação total do ácido nalidíxico foi obtida com 90% de mineralização, concluindo que, nas condições experimentais em que se foi realizado o estudo, a aplicação de foto-Fenton antecedendo o tratamento biológico induziu no aumento da biodegradabilidade do efluente.

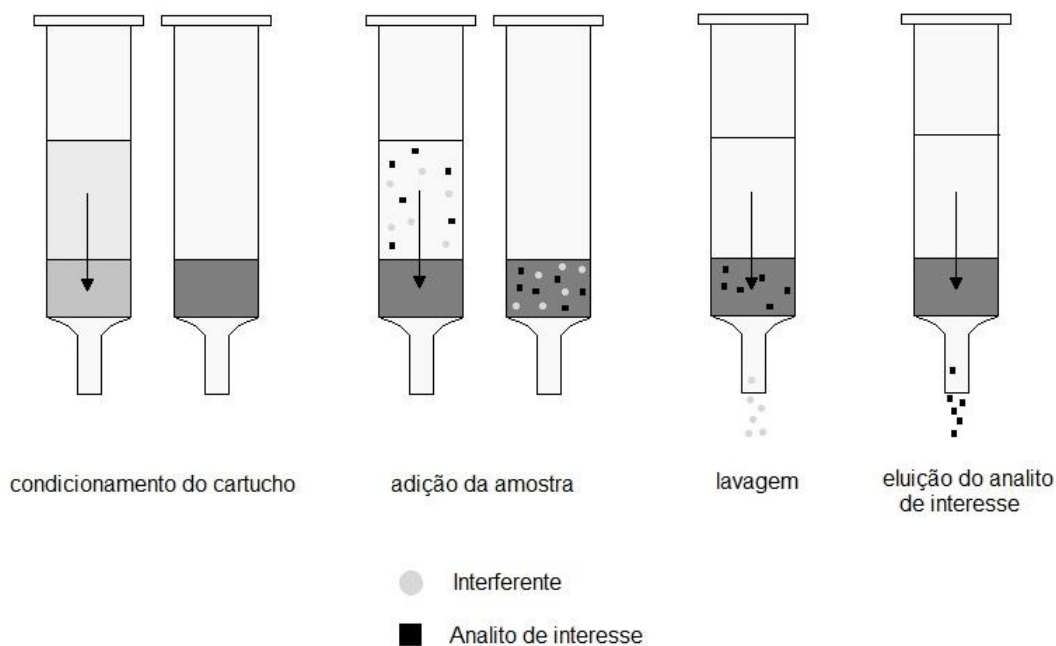
Em contrapartida, alguns trabalhos constataram o aumento da ecotoxicidade do efluente após o tratamento por POAs, indicando que os produtos de degradação podem reter a atividade funcional do composto original, bem como apresentar maior ecotoxicidade.(13) Assim, torna-se importante avaliar não somente a eficiência da remoção do fármaco, mas também os intermediários formados ao longo do processo.

Embora existam diversos estudos referentes à degradação de fármacos por POAs, são poucos aqueles que reproduzem as baixas concentrações e a complexidade matricial em que são encontrados. Quando a matriz real não é reproduzida, perdem-se informações referentes às interações entre o poluente e os componentes da matriz, que podem influenciar no comportamento do poluente ao longo do processo. A degradação em alta concentração é conveniente para verificar a eficiência do processo e na caracterização de produtos formados. No entanto, a concentração do composto farmacêutico a ser degradado influencia em diversos parâmetros reacionais, alterando a cinética de reação e podendo até resultar em diferentes subprodutos de degradação. A degradação em baixa concentração gera intermediários em níveis de detecção não traçáveis convencionalmente, e a matriz complexa pode apresentar muitos interferentes analíticos. Empregando-se técnicas de preparo de amostra, o problema pode ser contornado fortificando-se a amostra e removendo possíveis interferentes da matriz em que o analito está presente.

A extração em fase sólida (SPE) é uma técnica de preparo de amostra que se baseia nos mecanismos de separação da cromatografia líquida clássica. Em geral, as etapas envolvidas na SPE, ilustradas na Figura 3, são condicionamento do cartucho, adição da amostra, remoção dos interferentes e eluição do analito. O condicionamento do cartucho consiste na ativação da fase sólida por meio de um solvente, que pode variar para cada

material extrator. Após a adição da amostra, usa-se um solvente que não tenha força de eluição capaz de eluir os analitos de interesse, para remover os interferentes presentes na matriz. Para eluição do analito, emprega-se um solvente de maior interação com o composto, mas que não arraste simultaneamente os interferentes que não foram retirados do cartucho na etapa anterior.(15)

Figura 3 - Etapas da SPE.



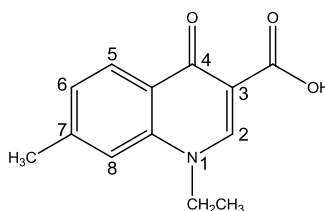
Fonte: Adaptado de LANÇAS, F. M. (15)

Os mecanismos de separação estão associados às interações químicas e físicas atuantes entre as moléculas do analito, da fase sólida e do solvente. As principais interações são do tipo ligação de hidrogênio, forças iônicas e forças de dispersão, e são derivadas das propriedades físico-químicas das moléculas.(15) Portanto se a estrutura química da molécula do analito é conhecida, simplifica-se a escolha de fase sólida e solvente apropriados. Por outro lado, se a amostra contém uma diversidade de analitos desconhecidos, como no caso de uma amostra contendo diversos subprodutos de degradação, a extração torna-se mais complexa, visto que pode necessitar de diferentes tipos de interações.

As fluoroquinolonas (FQs) são agentes antimicrobianos de amplo espectro de ação contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas bastante utilizadas na medicina humana e veterinária. São empregadas no tratamento de infecções no trato urinário e também em casos em que a infecção é resistente à maioria dos antibióticos já estabelecidos. Por exemplo, os

microrganismos que adquiriram resistência à penicilina são passíveis a ações das FQs, por atuarem de modo distinto. O primeiro antibiótico da classe das quinolonas foi sintetizado nos anos 60, o ácido nalidíxico, cuja estrutura química está representada na Figura 4. Como os microrganismos rapidamente adquiriram resistência a esse composto, novos análogos foram sintetizados. Descobriu-se que a adição de um átomo de flúor na posição 6 aumenta a atividade antimicrobiana e de um anel piperazínico na posição 7 aumenta a absorção via oral, distribuição e estabilidade metabólica. O mecanismo de ação das FQs baseia-se na inibição da enzima topoisomerase, que atua nos processos de empacotamento e replicação do DNA. (16,17)

Figura 4 - Estrutura química do ácido nalidíxico.



Em alguns estudos sobre o padrão de consumo de antimicrobianos nos hospitais brasileiros, constatou-se que a FQ é uma das classes mais consumidas.(18,19) As FQs são excretadas inalteradas pelo organismo (geralmente uma parcela menor que 25 % é metabolizada) e portanto a sua ocorrência no meio ambiente é esperada. Como a principal fonte de emissão de fármacos no meio ambiente é o efluente doméstico e hospitalar, a presença desses antibióticos nas águas superficiais está correlacionada à densidade populacional. A presença de FQs foi constatada em diversos países europeus, asiáticos e americanos.(20)

Lydy et al. (21) avaliaram a ecotoxicidade desses compostos e as FQs mostraram-se tóxicas a algumas espécies de cianobactérias e plantas aquáticas. Embora as FQs não tenham se mostrado tóxicas para peixes mesmo em elevada concentração, eles apresentaram aumento de peso, pois essas substâncias agem como promotores de crescimento, reduzindo a quantidade de bactérias prejudiciais. Desse modo, muitas aquiculturas empregam as FQs como promotores de crescimento (21) e nesses casos, os antibióticos são diretamente lançados na água.

Assim como para a maioria dos fármacos, o tratamento convencional de efluentes é ineficaz na degradação das FQs, que apresentam resistência à hidrólise e ao aquecimento devido à estabilidade química do anel heterocíclico, tornando-as contaminantes altamente

persistentes. No entanto, a classe é bastante suscetível a processos fotolíticos e a irradiação promove a remoção do flúor e a oxidação da amina na cadeia lateral.(20) Assim, foi proposta a fotólise do ciprofloxacino e enrofloxacino, duas FQs bastante empregadas na medicina humana e veterinária respectivamente, como método alternativo de sua degradação.



## CAPÍTULO 2 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 2.2.1 Padrões e Reagentes

Os padrões de ciprofloxacino ( $\geq 98\%$ ) e de enrofloxacin ( $\geq 99\%$ ) foram adquiridos de Sigma Aldrich, os solventes acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH), ambos de grau HPLC, de Tedia, o ácido fosfórico P.A. de Synth e hidróxido de amônio P.A. de Chemis. A água utilizada foi purificada em sistema Milli-Q de Millipore.

O esgoto *labmade* trata-se de um substrato sintético simulando as características de um esgoto sanitário real. Esse meio foi preparado como descrito por Torres (22), tendo a sua composição descrita na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição do esgoto *labmade* (substrato sintético simulando esgoto sanitário)

Composição	Quantidade para 1 L
Sacarose	35,0 mg
Amido	114,0 mg
Extrato de carne	208,0 mg
Óleo de soja	51,0 mg
NaCl	250,0 mg
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	7,0 mg
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	4,5 mg
NaHCO <sub>3</sub>	200,0 mg
Detergente	3 gotas

Fonte: Torres (1992). (22)

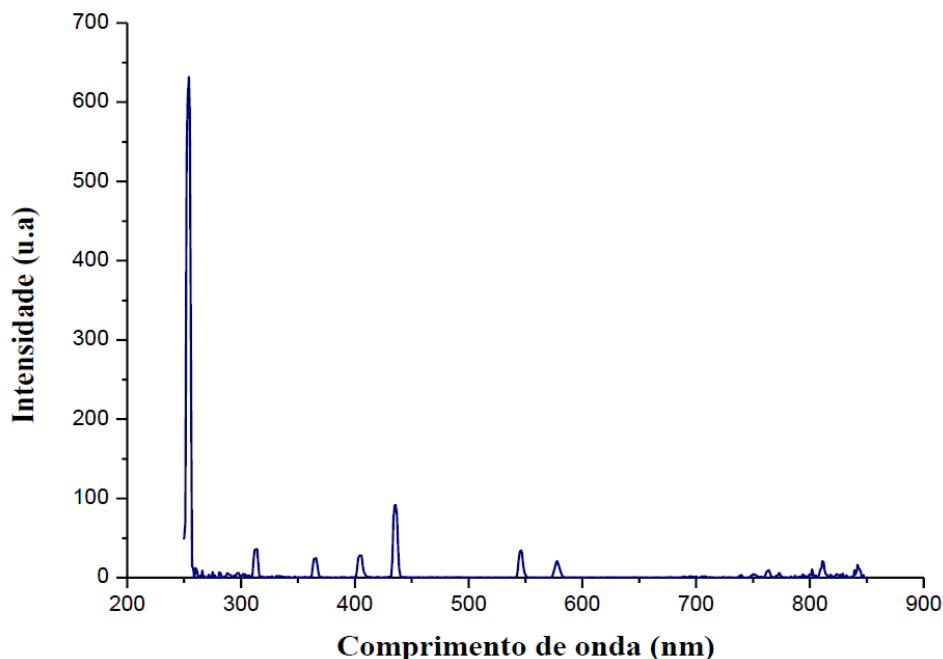
Os sorventes Strata-X e Strata-XA foram adquiridos de Phenomenex, os sorventes Chromabond HR-X e Chromabond HR-XA de Macherey-Nagel e o sorvente Oasis HLB de Waters. Os filtros (*frits*) de polietileno foram adquiridos de Analítica.

### 2.2.2 Execução da fotólise

As fotólises foram efetuadas em reator de capacidade de 250 mL, encamisado e acoplado a um sistema de recirculação, que manteve a temperatura constante em 25 °C. A solução esteve em constante agitação por meio de um agitador magnético. A fonte de radiação ultravioleta consistiu em lâmpada de vapor de mercúrio UV-C 9 W, cujo espectro de emissão

está ilustrado na Figura 5.(23) O ciprofloxacino e enrofloxacino absorvem na região de 230 a 350, com comprimento de onda máximo em 274 nm.(24)

Figura 5. Espectro de emissão da lâmpada utilizada no trabalho.



Fonte: Ferreira, T. C. R., 2014. (23)

### 2.2.3 Avaliação da fotólise do fármaco em alta concentração

Como estudo inicial da fotólise do ciprofloxacino e enrofloxacino, 250 mL de solução 10 mg L<sup>-1</sup> do fármaco em água ultrapurificada Milli-Q foram submetidos a 6 horas de fotólise. Retiraram-se alíquotas de 1,5 mL nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 30 min, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas, e estas foram armazenadas em frascos âmbar sob refrigeração. Análises cromatográficas foram realizadas nessas amostras, permitindo a observação do perfil da fotólise e a identificação de possíveis intermediários. A solução degradada até o tempo em que o fármaco e os intermediários coexistissem em níveis de concentração mais elevados foi escolhida para se efetuar a triagem do método de SPE.

### 2.2.4 Procedimento da extração em fase sólida

Os cartuchos de extração foram preparados adicionando sequencialmente um *frit*, 100 mg da fase extratora e, novamente, outro *frit*. Em todas as extrações realizadas, primeiramente condicionou-se a fase estacionária adicionando-se 5 mL de MeOH e 5 mL de solução ácida de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> em pH 3,4, e em seguida, introduziu-se a amostra. Nestas etapas, evitou-se a secagem

da fase extratora, pois o contato com o ar poderia levar à formação de caminhos preferenciais ao longo da fase estacionária, prejudicando a extração. (15)

Após introduzir a amostra, esperou-se a fase extratora secar para em seguida efetuar a eluição. As frações eluídas foram secas a 80 °C em banho térmico com fluxo de gás nitrogênio e depois ressuspensas em 1 mL de água com 5 % de ACN. As amostras foram armazenadas em frascos âmbar e posteriormente foram analisadas por LC-ESI-QToF/MS.

#### • Triagem do melhor método de SPE

A partir do perfil de degradação da solução de 10 mg L<sup>-1</sup> do fármaco, determinou-se o tempo de fotólise em que a solução apresentasse, em concentrações detectáveis, todos os intermediários formados e o fármaco. Para o ciprofloxacino, a amostra submetida às extrações por SPE foi degradada por 20 minutos e para o enrofloxacin, uma mistura contendo amostra degradada por 10 minutos e por 30 minutos. O volume da amostra para ambos os fármacos foi de 25 mL.

Foram avaliadas 5 fases extradoras previamente conhecidas por apresentar uma boa recuperação para fármacos polares: Oasis HLB, Strata-X, Strata-XA, Chromabond HR-X e Chromabond HR-XA. Para a eluição, avaliaram-se os seguintes solventes: ACN pura, ACN contendo 5 % de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, ACN contendo 5 % de NH<sub>4</sub>OH, MeOH puro, MeOH contendo 5 % de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e MeOH contendo 5 % de NH<sub>4</sub>OH. As combinações de fases extradoras e eluentes que foram avaliadas são apresentadas na Tabela 2. A melhor combinação de sorvente e eluente foi utilizada para a avaliação da fotólise do fármaco a baixa concentração em água e em esgoto *labmade*.

Tabela 2 - Combinações de sorventes e eluentes.

<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="transform: rotate(-45deg); transform-origin: center;">Sorvente</div> <div style="transform: rotate(45deg); transform-origin: center;">Eluente</div> </div>		A	B	C	D	E
		Oasis HLB	Strata-X	Strata-XA	Chromabond HR-X	Chromabond HR-XA
1	ACN	A1	B1	C1	D1	E1
2	ACN 5 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	A2	B2	C2	D2	E2
3	ACN 5 % NH <sub>4</sub> OH	A3	B3	C3	D3	E3
4	MeOH	A4	B4	C4	D4	E4
5	MeOH 5 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	A5	B5	C5	D5	E5
6	MeOH 5 % NH <sub>4</sub> OH	A6	B6	C6	D6	E6

- **Método de SPE para amostras de ciprofloxacino degradadas**

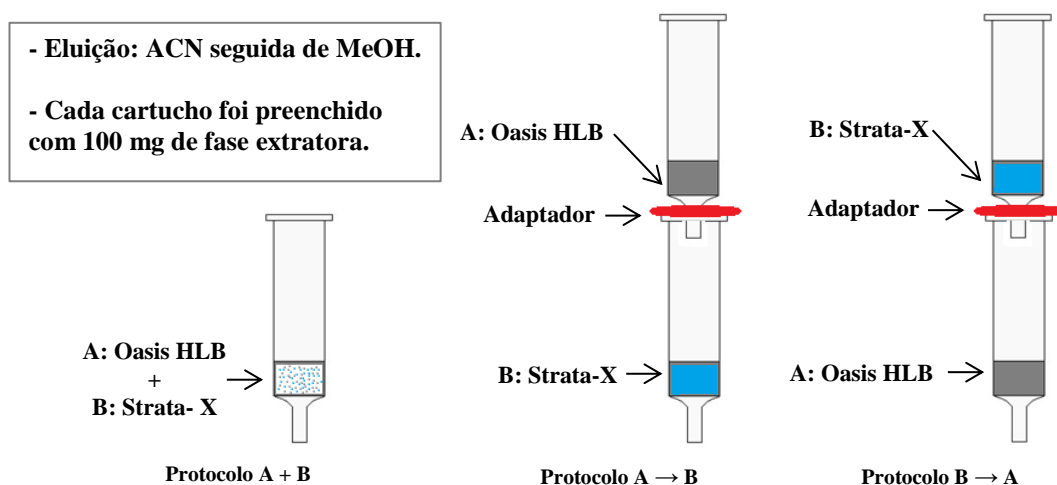
A extração consistiu na fase extratora Oasis HLB e na eluição sequencial de 3 mL de ACN com 5 % de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 3 mL de ACN pura e 3 mL de ACN com 5 % de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , sendo os primeiros 6 mL coletados em frasco diferente da porção ácida para evitar a formação do sal  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$  insolúvel em ACN. Após a secagem, cada porção foi ressuspensa com 0,5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  com 5 % de ACN e as duas porções foram reunidas para a análise cromatográfica.

- **Método de SPE para amostras de enrofloxacinó degradadas**

Como a estrutura química do enrofloxacinó assemelha-se à do ciprofloxacino (Figura 1), o protocolo de SPE desenvolvido para o ciprofloxacino foi aplicado nas soluções de enrofloxacinó. As recuperações não foram satisfatórias à maioria dos analitos. Deste modo, tornou-se necessária a avaliação de todas as combinações de fases extratoras e solventes (etapa de triagem). As combinações de fase Oasis HLB com ACN pura (A1), e de Strata-X com MeOH puro (B4) apresentaram recuperações consideráveis e a fim de obter melhor recuperação a todos os analitos, avaliou-se a associação dessas duas combinações.

Um protocolo proposto consistiu na mistura das fases extratoras em um mesmo cartucho com eluição sequencial de ACN e MeOH, e os outros dois métodos propostos foram acoplamento dos cartuchos, cada um contendo uma fase, em ordens diferentes. A Figura 6 ilustra os protocolos avaliados.

Figura 6 - Protocolos de SPE avaliados para ENR e seus produtos.



Nesta etapa, as amostras consistiram de 100 mL de solução contendo uma fração de solução  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de enrofloxacinó degradada até 10 minutos e a outra fração até 30 minutos,

a fim de que todos os analitos estivessem presentes. O protocolo  $A \rightarrow B$  apresentou melhor recuperação e foi aplicado na etapa de avaliação da fotólise em baixa concentração.

### 2.2.5 Avaliação da fotólise do fármaco em baixa concentração

Primeiramente, avaliou-se o efeito do meio da amostra e do volume na extração, variando-se de 25 mL utilizados na etapa de triagem para 100 mL. Prepararam-se 250 mL de solução  $10 \text{ mg L}^{-1}$  do fármaco e degradou-a pelo tempo em que o fármaco e seus intermediários coexistem em níveis de maior concentração, determinado anteriormente (para o ciprofloxacino, 20 minutos, e para o enrofloxacino, uma mistura contendo fração degradada por 10 minutos e outra por 30 minutos). Essa solução foi diluída 100 vezes para uma solução de 100 mL e foi submetida ao método de SPE de melhor recuperação dos analitos. A diluição foi feita tanto em água como em esgoto *labmade*. As extrações foram feitas em triplicatas.

Para verificar a fotólise do fármaco em baixa concentração, a análise cromatográfica foi precedida pela etapa de SPE, a fim de fortificar a amostra com os analitos de interesses. No esgoto *labmade*, além da fortificação, a SPE removeu os possíveis interferentes presentes nessa matriz.

As amostras a serem pré-concentradas consistiram de 100 mL de solução  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  do fármaco degradado até os tempos de 0, 5, 10, 20, 40 e 60 min. A fotólise foi efetuada em triplicata e em soluções de água Milli-Q e de esgoto *labmade*. As amostras foram submetidas ao protocolo de SPE desenvolvido na etapa de triagem e em triplicata.

### 2.2.6 Análise em LC-ESI-QToF/MS

O sistema LC-ESI-QToF/MS é constituído de um cromatógrafo HPLC Shimadzu serie 20A e de um espectrômetro de massas Bruker micrOTOF-Q II. A coluna cromatográfica utilizada foi Kinetex XB-C18 (100 mm x 2,1 mm; 2,6  $\mu\text{m}$ ) da Phenomenex. As fases móveis constituíram de 0,1 % de ácido fórmico em água ultrapura como eluente A e 0,1 % de ácido fórmico em acetonitrila como eluente B no modo de eluição em gradiente com vazão de  $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ . A eluição em gradiente seguiu a seguinte programação: 0-3 min, 5 % de A; 3-12 min, 5-60 % de A; 12-14 min, 60-95 % de A; 14-20 min, 95 % de A; 20-22 min, 95-5 % de A; 22-26 min, 5 % de A. A temperatura do forno da coluna foi mantida a 40 °C.

A análise foi efetuada por *electrospray* operando no modo positivo nas seguintes condições: temperatura de dessolvatação de 200 °C, voltagem do capilar de 4,5 kV, vazão do gás de secagem de 8 L min<sup>-1</sup>, pressão do gás de nebulização a 4 bar. A faixa monitorada foi de 50 a 3000 *m/z*, com taxa de aquisição de espectros a 2 Hz no modo *full MS*.

### **2.2.7 Análise em LC-Orbitrap/MS**

O sistema LC-Orbitrap/MS é constituído de um espectrômetro de massas de Thermo Scientific modelo LTQ Velos e de um cromatógrafo Accela do mesmo fabricante. As condições do cromatógrafo foram as mesmas descritas no item anterior.

As análises foram realizadas utilizando uma interface *heated electrospray* (HESI), aquecida a 350 °C no modo positivo nas seguintes condições: gás cortina e auxiliar em 35 e 10 unidades arbitrárias, respectivamente; temperatura do capilar de 350 °C, voltagem do capilar (*electrospray*) de 3,7 kV. A faixa monitorada de *m/z* foi de 95 a 600, com taxa de aquisição de espectros a 2 Hz no modo *full MS* e um poder de resolução de massas nominal de 60.000 (FWHM).

## CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

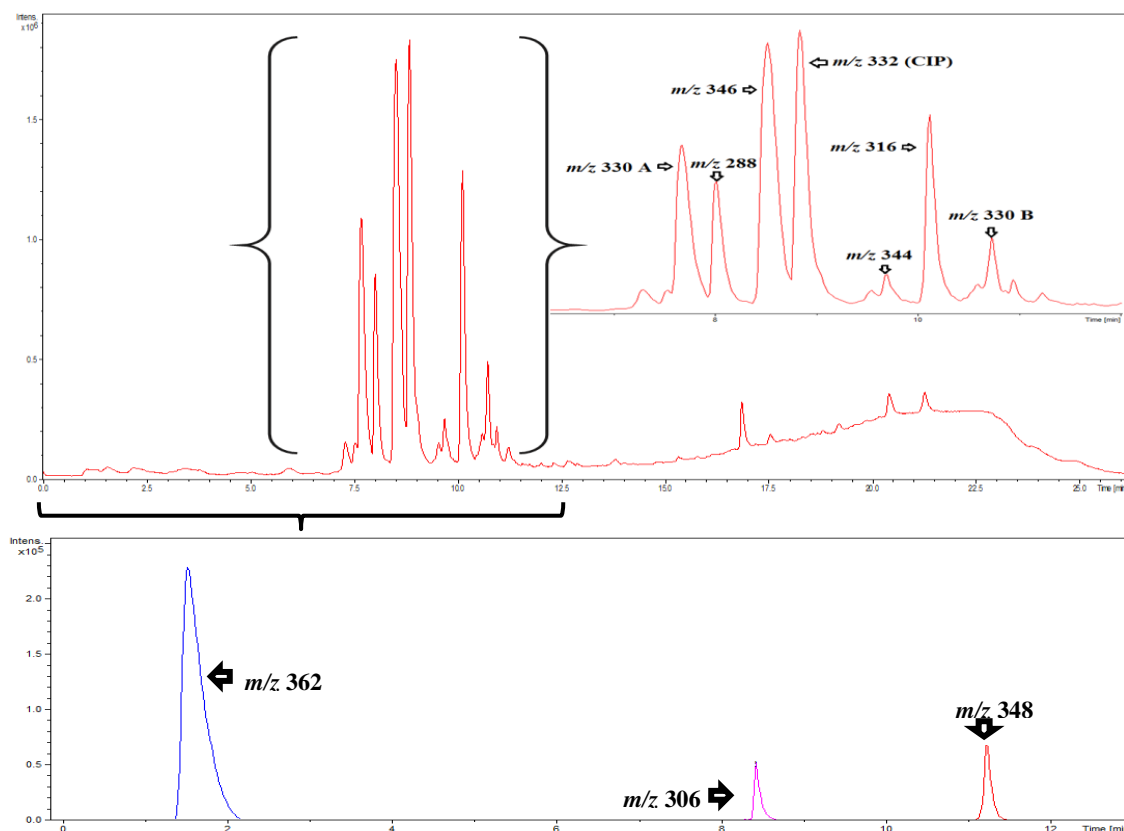
### 2.3.1 Fotólise do fármaco em alta concentração

As alíquotas coletadas ao longo da fotólise do fármaco em alta concentração foram analisadas por LC-ESI-QToF/MS, possibilitando identificar os produtos de degradação, bem como descrever os perfis de formação dos produtos e de degradação do fármaco.

#### 2.3.1.1 Avaliação dos intermediários

Para o ciprofloxacino, foram identificados dez intermediários. A Figura 7 ilustra o cromatograma de íon total (TIC) da amostra de ciprofloxacino fotodegradada por 20 minutos. e notam-se sete picos principais, que correspondem ao próprio ciprofloxacino ( $m/z$  332) e aos intermediários de  $m/z$  330,1445 (A); 288,1340; 346,1411; 344,1255; 316,1292; 330,1463 (B). Os subprodutos de  $m/z$  306,1239; 348,1342; 362,1385 foram detectados com menor intensidade. O pico correspondente do produto de  $m/z$  263,0817 não está presente no cromatograma, pois se encontrava em níveis não detectáveis e sua presença foi somente detectada na etapa de triagem do método de SPE, evidenciando a importância dessa etapa na

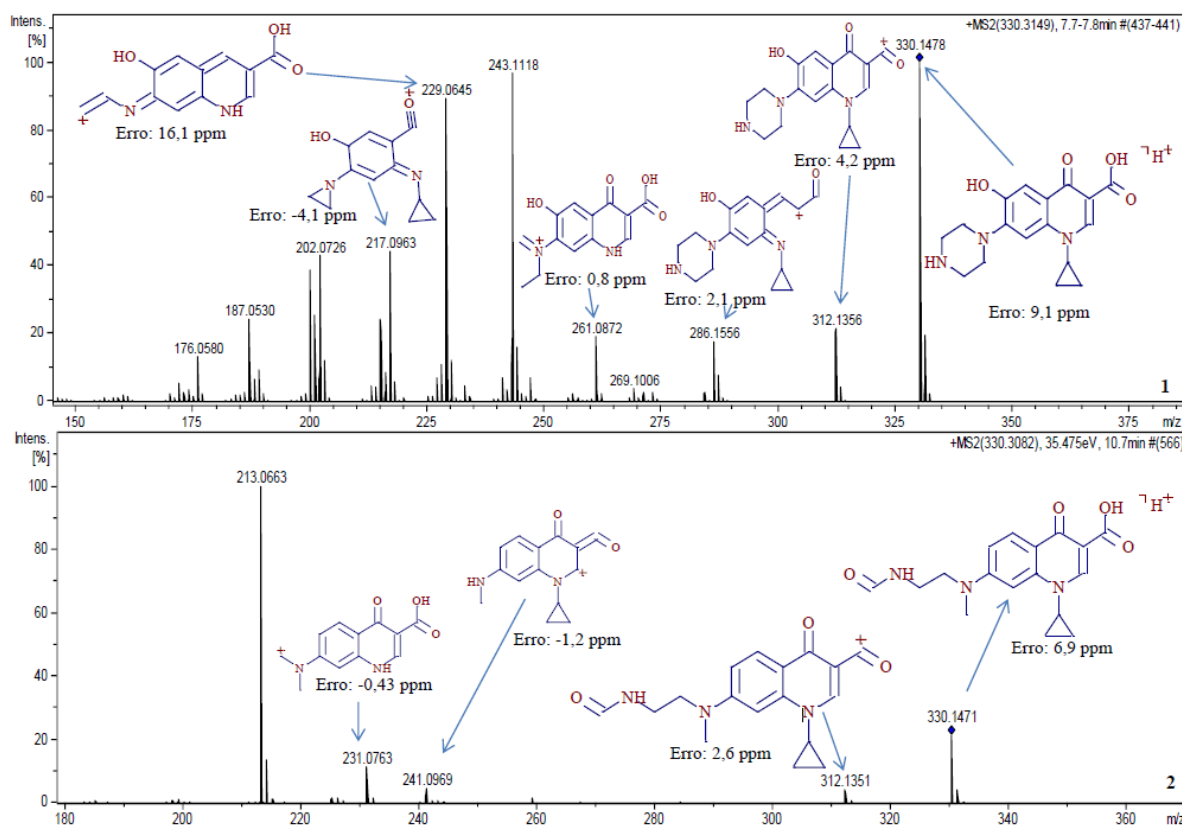
Figura 7 - TIC da amostra de CIP degradado por 20 minutos.



análise de intermediários.

Foram detectados dois subprodutos de  $m/z$  330 de fórmula molecular  $C_{17}H_{19}N_3O_4$ , sendo portanto isômeros entre si. Os diferentes tempos de retenção indicam estruturas químicas distintas e, de fato, os espectros de MS/MS dos compostos (Figura 8) ilustram diferentes fragmentos. As identificações 330 A e 330 B foram designadas respectivamente aos isômeros de menor e maior tempo de retenção. A formação do intermediário de  $m/z$  330 A consistiu na substituição do flúor por uma hidroxila na molécula de ciprofloxacino, enquanto que para a formação do  $m/z$  330 B houve, além da perda do flúor, a abertura e oxidação do anel piperazínico.

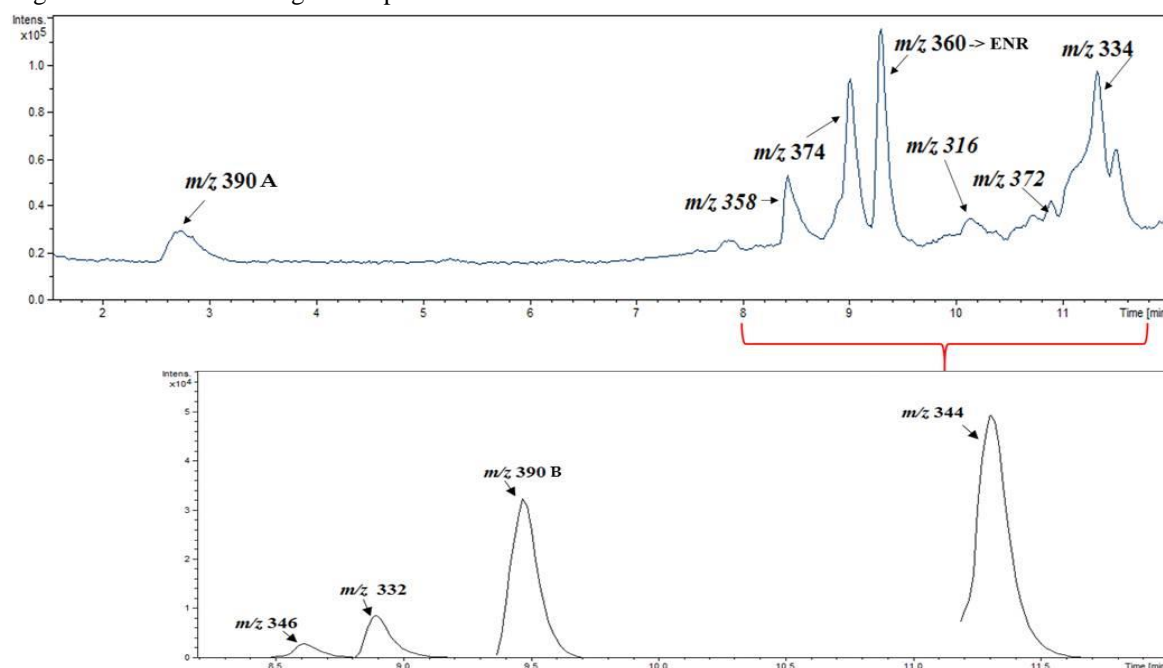
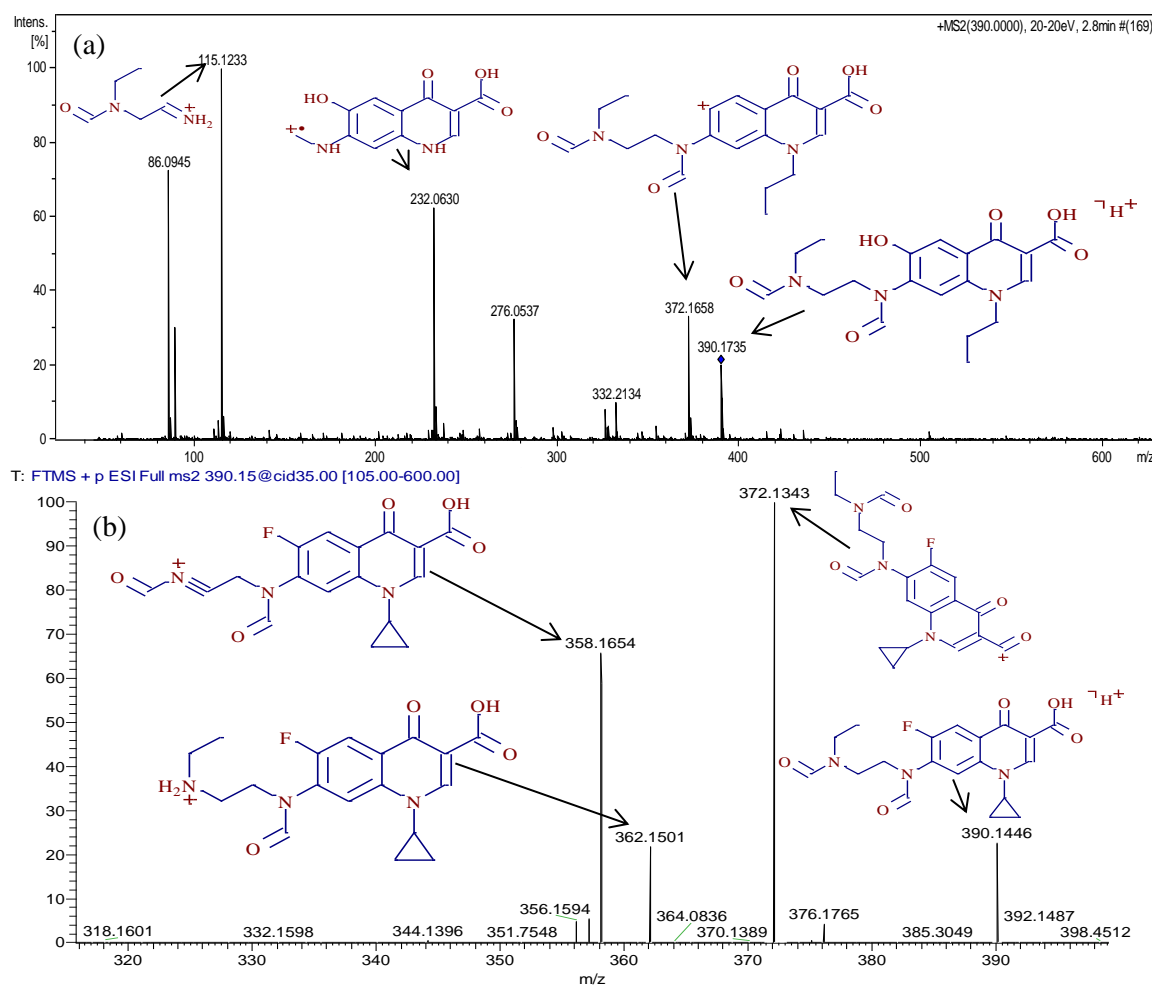
Figura 8 - Espectros de MS/MS dos subprodutos de  $m/z$  330 A (1) e 330 B (2).



Foram detectados também dez subprodutos para o enrofloxacino. O cromatograma de íon extraído da solução degradada por 15 minutos (Figura 9) ilustra os picos dos intermediários de  $m/z$  316,1664; 332,1419; 334, 1584; 344, 1621; 346,1401; 358,1701; 372,1576; 374,1748; 390,1470 e 390,1676. Diferentemente dos subprodutos  $m/z$  330 do ciprofloxacino, os intermediários de  $m/z$  390 não são isômeros entre si por distinguirem-se pela massa exata. O  $m/z$  390,1676 apresenta menor tempo de retenção e foi designado como  $m/z$  390 A, enquanto o  $m/z$  390,1470 de maior tempo de retenção como  $m/z$  390 B.



Figura 9 - TIC do ENR degradado por 15 min.

Figura 10 - Espectro de massas dos subprodutos (a)  $m/z$  390 A: (20 eV) - LC-QToF (ESI (+) MS/MS); e (b)  $m/z$  390 B: (35 eV) - Orbitrap (ESI (+) MS/MS).

Por meio dos espectros de MS/MS dos produtos de  $m/z$  390 A e B, que estão apresentados na Figura 10, foi possível inferir as diferentes estruturas e fórmulas moleculares. Para formação dos intermediários  $m/z$  390 A e B, houve a abertura do anel piperazínico. Para o  $m/z$  390 A, além dessa alteração, houve a substituição do átomo de flúor por um grupo hidroxila e abertura do anel ciclopropílico.

Com base no que foi encontrado na literatura e nas análises por espectrometria de massas, foram propostas as estruturas químicas dos subprodutos do ciprofloxacino e enrofloxacinó apresentadas na Tabela 3 e Tabela 4 respectivamente. Posteriormente, essas estruturas foram confirmadas em análise por LC-Orbitrap/MS, os espectros de MS/MS encontram-se no ANEXO A e ANEXO B. Exceto para o intermediário de  $m/z$  362, que não foi detectado pelo equipamento, sua estrutura foi proposta por análise em LC-QToF e seus espectros de MS e MS/MS encontram-se na Figura 11.

Guo et al. (25) avaliaram os produtos de degradação do ciprofloxacino formados por fotólise (UV) e fotólise de peróxido de hidrogênio (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), identificando quatro e 16

Figura 11 - Espectro de massas do subproduto  $m/z$  362 (a) MS; (b) MS/MS.

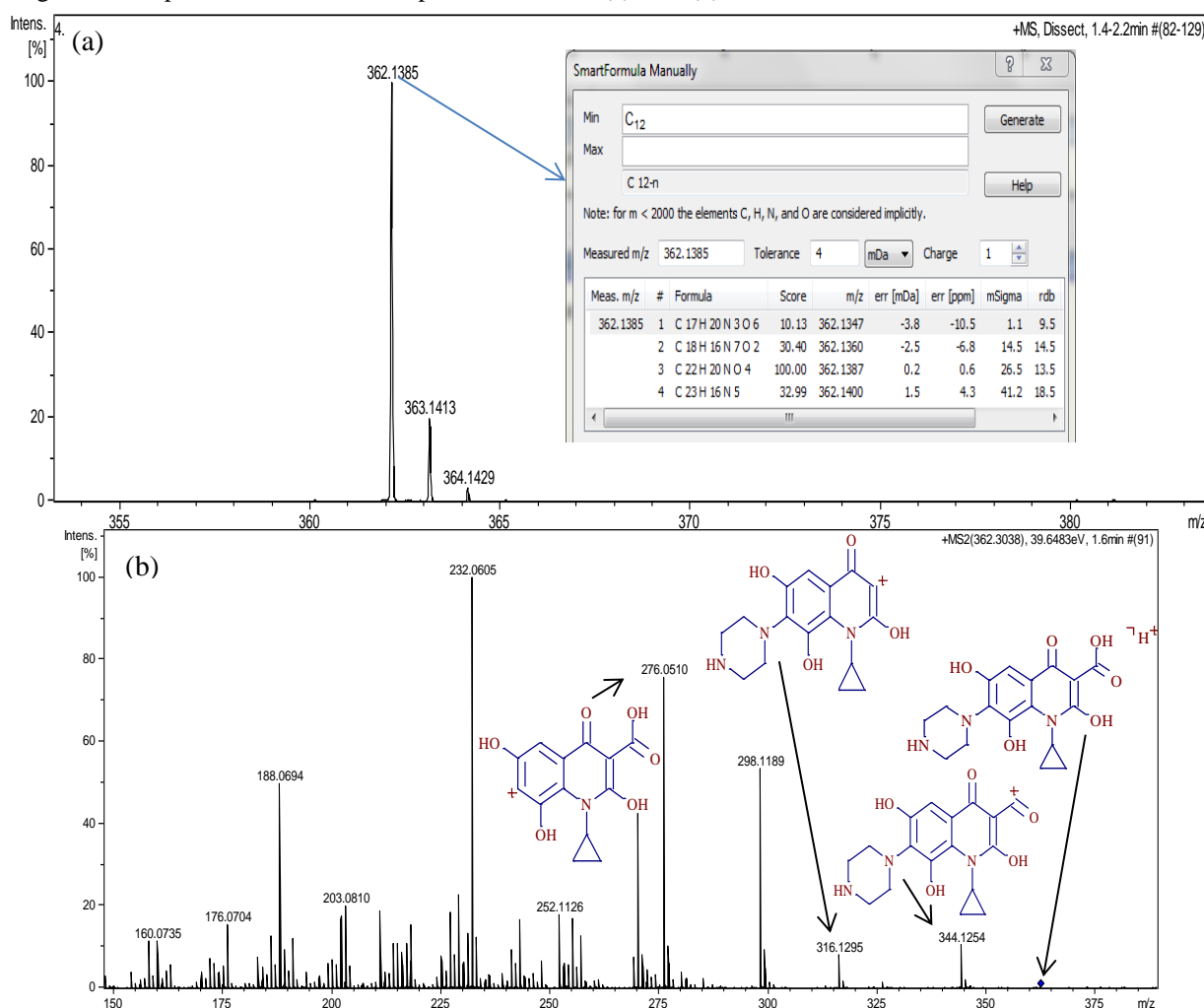


Tabela 3 - Estruturas químicas dos subprodutos de CIP.

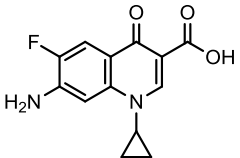
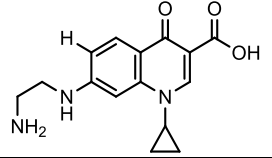
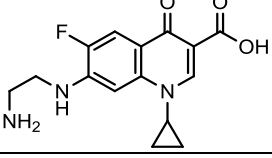
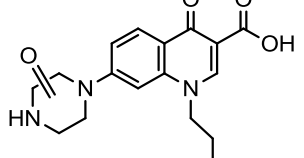
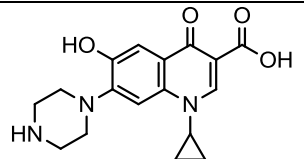
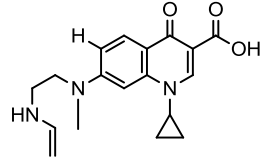
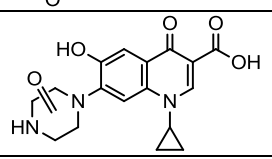
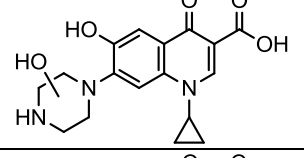
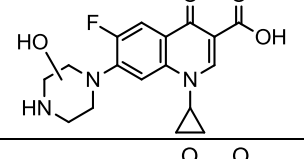
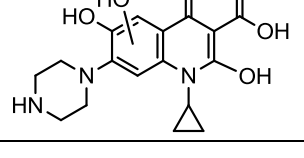
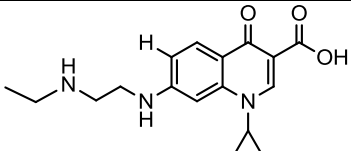
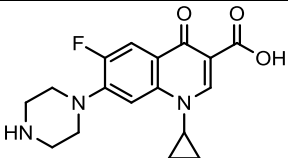
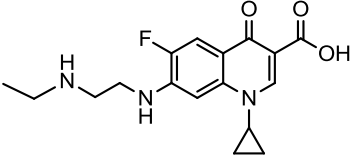
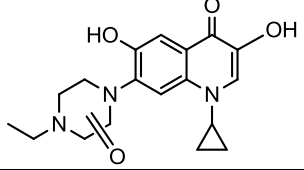
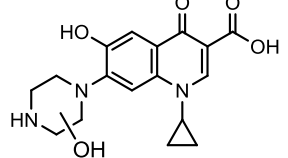
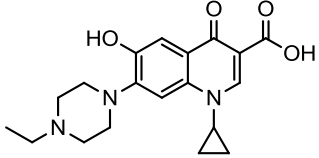
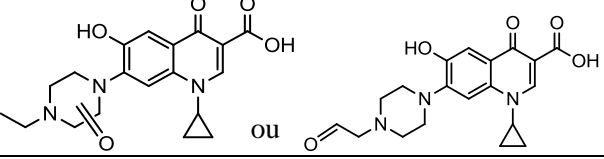
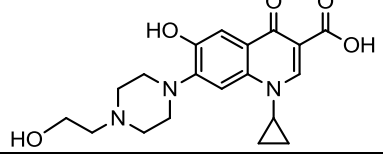
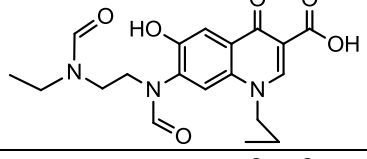
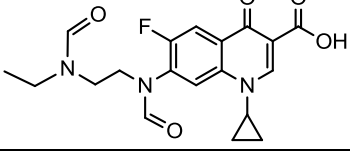
$m/z$	Fórmula molecular	Diferença com o CIP ( $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ )	Estrutura proposta	Ref.
263	$C_{13}H_{11}FN_2O_3$	$-C_4H_7N$		(25) (26)
288	$C_{15}H_{17}N_3O_3$	$-C_2H_1, -F$		(26) (27) (28)
306	$C_{15}H_{16}FN_3O_3$	$-C_2H_2$		(26) (25) (27) (28)
316	$C_{16}H_{17}N_3O_4$	$-CH, -F, +O$		
330 A	$C_{17}H_{19}N_3O_4$	$-F, +O, +H$		(25) (26) (27) (28)
330 B	$C_{17}H_{19}N_3O_4$	$-F, +O, +H$		(26) (27)
344	$C_{17}H_{17}N_3O_5$	$-H, -F, +2 O$		(25)
346	$C_{17}H_{19}N_3O_5$	$-F, +H, +2 O$		
348	$C_{17}H_{18}FN_3O_4$	$+OH$		
362	$C_{17}H_{19}N_3O_6$	$+ H, -F, + 3 O$		

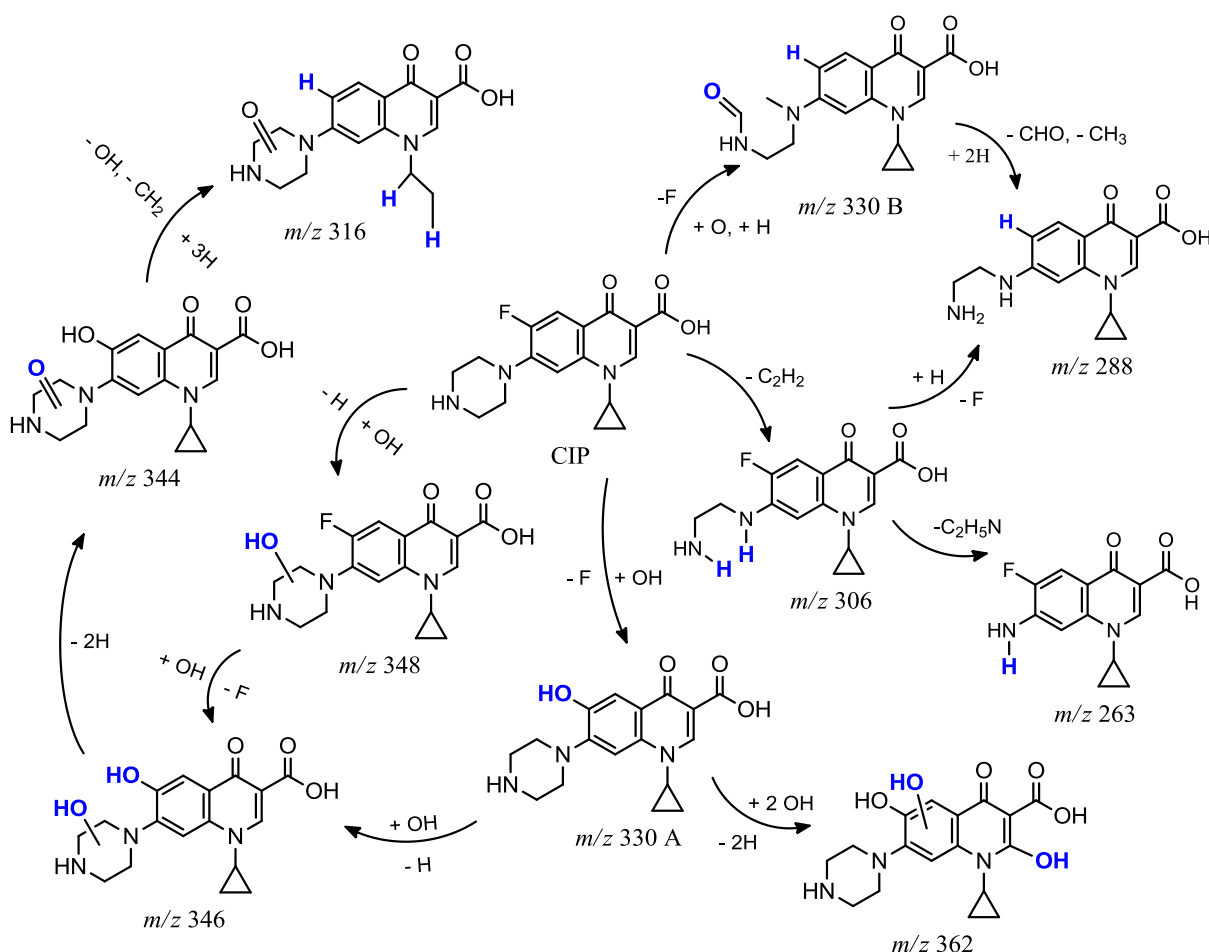
Tabela 4 - Estruturas químicas dos subprodutos de ENR.

$m/z$	Fórmula molecular	Diferença com o ENR (C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> )	Estrutura proposta	Ref.
316	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	-C <sub>2</sub> H; -F		(28) (29)
332	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>		(28) (29) (30)
334	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>		(28)
344	C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	-CH; -F; +O		
346	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	-C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> ; -F; +2O		
358	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	-F; +OH		(28) (29)
372	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	-H; -F; +2O		
374	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	-F; -H; +2OH		(29)
390 A	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	+1H; -F; +3O		
390 B	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	-2H; +2O		

produtos respectivamente. Alguns produtos gerados pelo processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentaram as mesmas estruturas químicas propostas pelo presente estudo dos intermediários de *m/z* 263, 306, 330 A e 344.

A partir das estruturas químicas dos subprodutos, elaborou-se possíveis rotas de degradação do ciprofloxacino e enrofloxacino, ilustradas na Figura 12 e Figura 13 respectivamente.

Figura 12 - Proposta de rota de degradação do CIP.



Observando-se os intermediários, a degradação baseou-se: (i) o estado excitado tripleto do anel quinolona resulta na substituição do átomo de flúor pela hidroxila ou hidrogênio (27); (ii) ruptura do anel piperazínico pela formação do radical (27); (iii) oxidação simples no anel piperazínico; (iv) abertura do anel do substituinte ciclopropílico; (v) descarboxilação; (vi) e especialmente para o enrofloxacino, reações de oxidação no grupo etila do anel piperazínico e a sua remoção, levando ao *m/z* 332, o próprio ciprofloxacino. A relação completa dos subprodutos e suas reações de formação está ilustrada na Tabela 5.

Figura 13 - Proposta de rota de degradação do ENR.

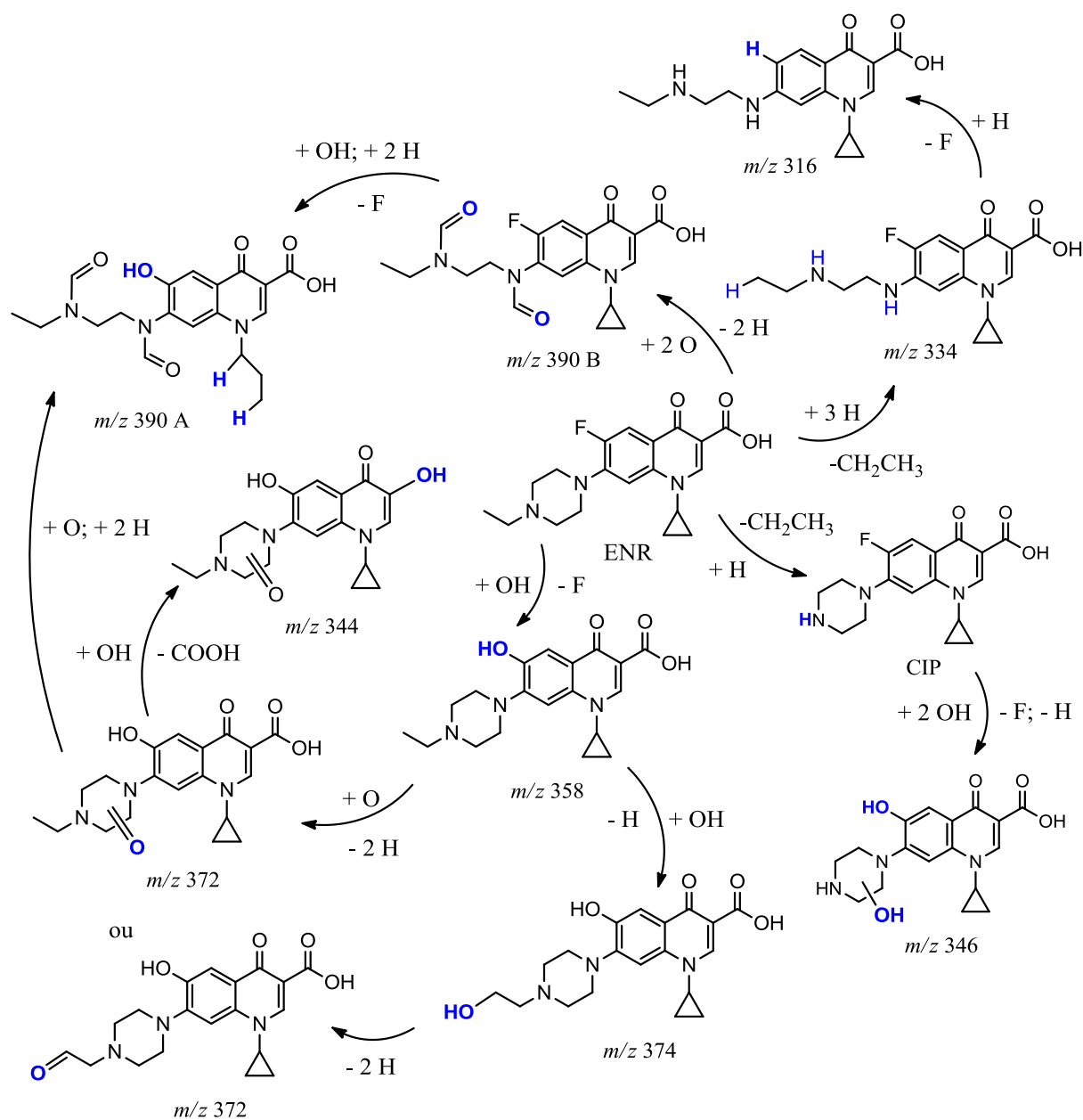
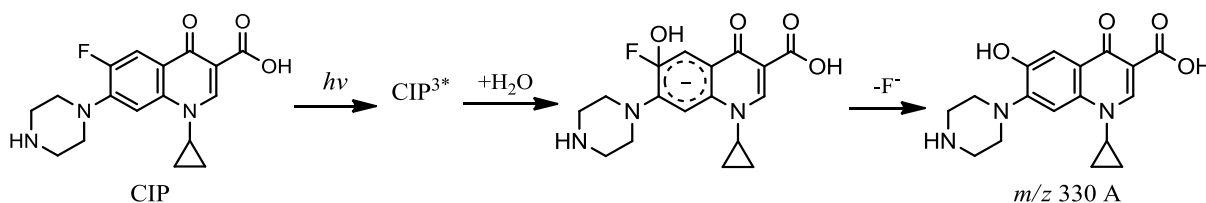


Tabela 5 - Produtos e suas reações de formação.

Reações de formação dos produtos	Produtos do CIP ( $m/z$ )	Produtos do ENR ( $m/z$ )
(i)	288, 330 A, 330 B	316, 346, 358, 390 A
(ii)	288, 306, 330 B	334, 390 A e B
(iii)	316, 344, 346, 348	346, 372
(iv)	316	390 A
(v)	—	344
(vi)	—	332, 372 e 374

Estudos sobre a fotólise do ciprofloxacino em meio alcalino, reproduzindo o pH de um efluente hospitalar, foram realizados por Kümmerer et al.(27). Apesar das diferentes condições reacionais, quatro intermediários de mesma razão  $m/z$  encontrados neste trabalho ( $m/z$  288, 306, 330 A e 330 B) também foram detectados. Exceto para o  $m/z$  330 A, os autores propuseram um mecanismo de formação dos subprodutos mediado por íons  $\text{OH}^-$  como doadores de elétrons, e tal fato pode explicar a baixa quantidade em que esses produtos foram formados (vide item 2.3.1.2) na condição experimental (meio neutro) deste trabalho. Segundo autores, a formação do intermediário  $m/z$  330 A ocorre pela formação do estado excitado tripleto do ciprofloxacino e consequente adição de água ao anel e perda do flúor (Figura 14), e como não há participação dos íons hidroxilas, esse intermediário foi detectado em maior quantidade que os demais. A formação do subproduto do enrofloxacin de  $m/z$  358 ocorre pelo mesmo mecanismo, visto que é observada a substituição do flúor por uma hidroxila.

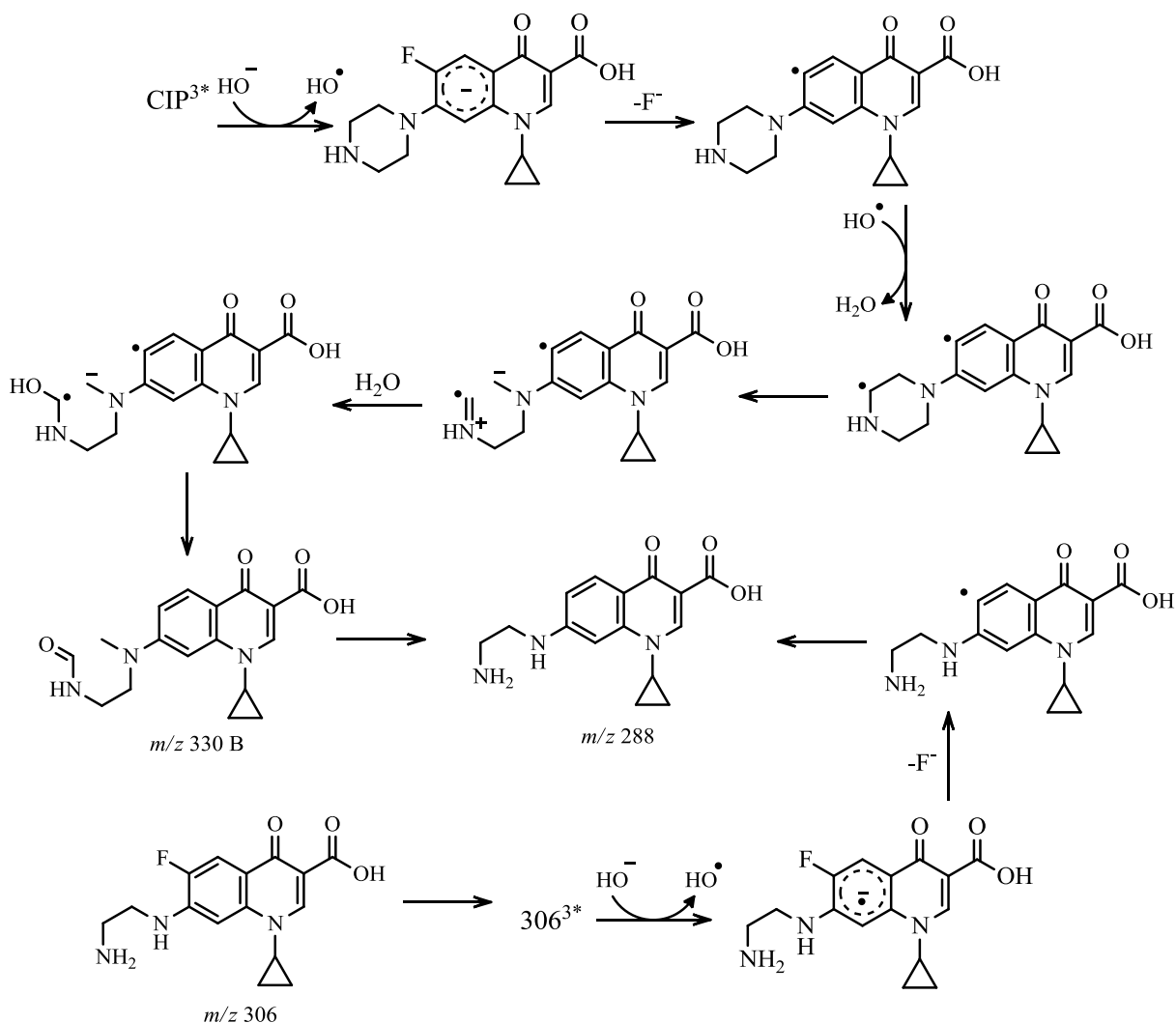
Figura 14 - Mecanismo de formação do  $m/z$  330 A (CIP) proposto por Kümmerer et al e do  $m/z$  358 (ENR).



Fonte: Adaptado de Kümmerer et al.(27)

Como o ciprofloxacino é susceptível à fotólise, Sturini et al. (28) analisaram a sua degradação fotocatalítica induzida pela radiação solar auxiliada por  $\text{TiO}_2$ . Segundo autores, a fotocatalise favoreceu a degradação oxidativa da cadeia lateral amina, levando a abertura do anel piperazínico. No presente estudo, houve a ruptura do anel apenas para 3 produtos do ciprofloxacino ( $m/z$  288, 306 e 330 B), que foram detectados em pequenas concentrações, indicando que a presença de um catalisador pode propiciar essa rota. Na fotólise, o rompimento do anel dá-se pela abstração do hidrogênio por um radical ( $\bullet\text{OH}$ ), como foi sugerido em diversos estudos.(26–28) A formação do birradical pela abstração de um hidrogênio da cadeia lateral por um radical resulta na ruptura do anel e, seguida pela adição da água, leva ao intermediário de  $m/z$  330 B e uma degradação mais adiante, ao de  $m/z$  288 (Figura 14). As quinolonas sem o anel piperazínico ainda podem ser excitadas a um estado tripleto.(28) Assim após o rompimento do anel gerando o subproduto de  $m/z$  306, este atinge o estado excitado e seguindo um mecanismo similar ao de formação do  $m/z$  330 A ocorre a formação do  $m/z$  288 (Figura 15).

Figura 15 - Mecanismo de formação dos subprodutos de  $m/z$  330 B e 288.



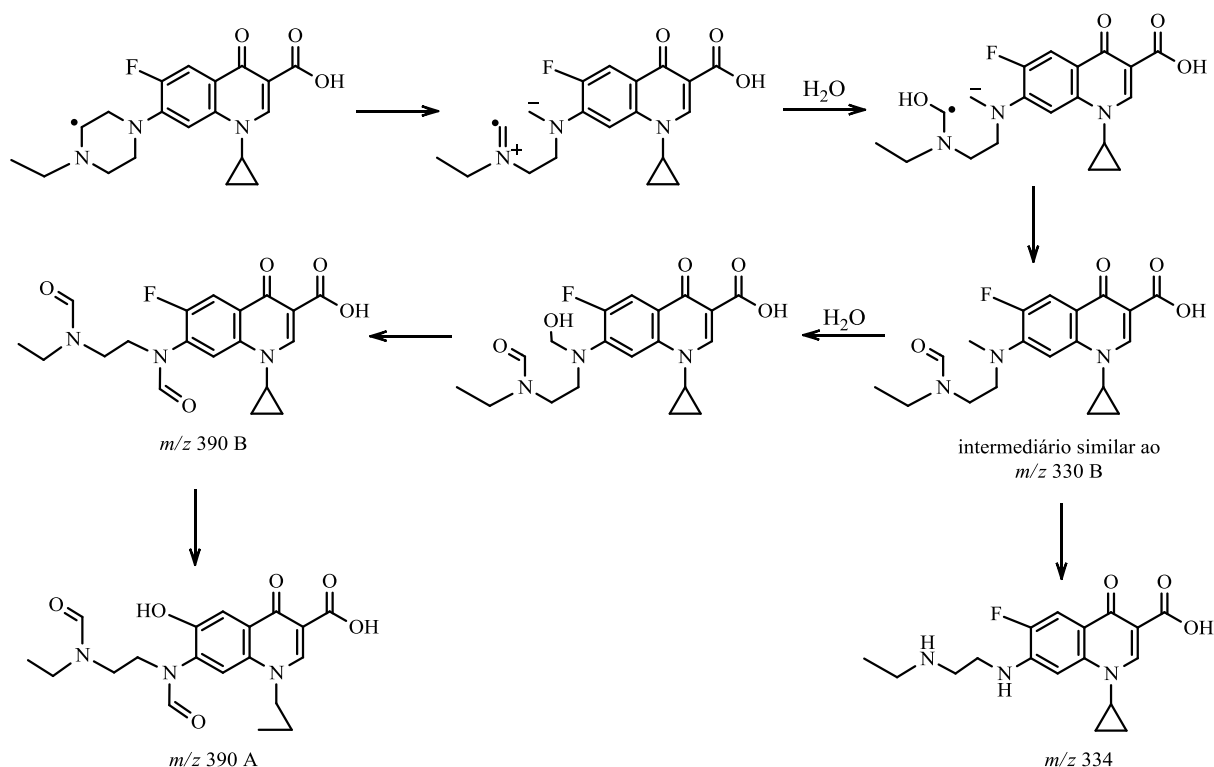
Fonte: Adaptado de Albini et al. e Kümmerer et al.(26,27)

Os produtos do enrofloxacinó que apresentaram anel piperazínico aberto foram  $m/z$  334, 390 A e B. A formação dos intermediários  $m/z$  390 pode ter sido via mecanismo semelhante ao de formação do  $m/z$  330 B (produto do ciprofloxacinó), em que dois grupos hidroxilas são adicionados e posteriormente oxidados a aldeídos (Figura 16). A degradação adiante do intermediário similar ao  $m/z$  330 B pode ter levado à formação do produto  $m/z$  334, como ocorre na formação do  $m/z$  288.

Apesar da similaridade estrutural entre os dois fármacos, apenas um produto de degradação foi comum aos dois, o  $m/z$  346, além do próprio ciprofloxacinó. Esse fato explica por que o protocolo de SPE desenvolvido para a amostra de ciprofloxacinó não obteve sucesso testando-se na solução degradada de enrofloxacinó.

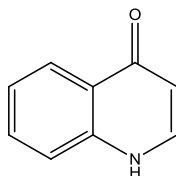


Figura 16 - Mecanismos de formação dos produtos m/z 334, 390 A e 390 B.



Como não houve a abertura do anel da quinolona (Figura 17) em nenhum subproduto detectado, espera-se que a atividade antimicrobiana persista no meio onde a fluoroquinolona e seus intermediários estão presentes. No entanto, a perda do átomo de flúor e abertura do anel piperazínico em alguns produtos sugerem a perda parcial da atividade. Nos trabalhos de Li et al.(25) e Kümmerer et al. (27), a avaliação da atividade biológica dos produtos da fotólise do ciprofloxacino baseou-se na inibição da bioluminescência em *V. qinghaiensis* e *V. fischeri* respectivamente. Em ambos os estudos, houve a diminuição da ecotoxicidade da solução contendo o ciprofloxacino ao longo da exposição à luz UV, que pode ser explicado pela diminuição da concentração do fármaco e formação de produtos menos tóxicos.

Figura 17 - Estrutura do anel quinolona.



Em contrapartida, constatou-se a ecotoxicidade dos produtos de degradação do enrofloxacin em *V. fischeri*. (30) Ao longo da irradiação, houve aumento da inibição da bioluminescência, implicando na maior ecotoxicidade dos produtos em relação ao fármaco de origem. Sendo o ciprofloxacino um de seus produtos, seria esperada a ecotoxicidade da

amostra de enrofloxacino degradada. Os produtos originaram-se pela remoção de grupos funcionais da molécula de enrofloxacino, o que resultou em menor impedimento estérico e maior facilidade em adentrar nas células das bactérias luminescentes, causando maior ecotoxicidade. Em um outro estudo, em que se avaliou qualitativamente a atividade antimicrobiana dos subprodutos de degradação em *E. coli*, atribuiu-se parte da ecotoxicidade da amostra degradada ao produto de  $m/z$  374, visto que o valor de  $EC_{50}$  de ciprofloxacino é próximo ao de enrofloxacino, o ciprofloxacino não poderia ser o único responsável pela maior ecotoxicidade da amostra degradada.(29) Nota-se porque a diminuição da concentração do fármaco em uma amostra não garante estritamente a eliminação da atividade biológica. No entanto, Li et al. (30) verificaram que os produtos também eram degradados, o que sucedeu na redução da ecotoxicidade da amostra.

### 2.3.1.2 Avaliação da fotólise

Para verificar o avanço da degradação dos fármacos e da formação dos subprodutos, traçou-se uma curva das áreas dos picos normalizados em porcentagem em função do tempo de fotólise (Figura 18 e Figura 19). As áreas normalizadas dos picos foram calculadas dividindo-se a área dos picos cromatográficos dos subprodutos pela área inicial do pico referente ao fármaco.

As Figuras 18.a e 19.a ilustram os perfis de degradação do ciprofloxacino e enrofloxacino respectivamente e de formação dos subprodutos ao longo de 6 horas. As concentrações máximas dos produtos de degradação são significativamente menores que a concentração inicial do fármaco. O intermediário de  $m/z$  374 apresentou a maior concentração entre os subprodutos do enrofloxacino, sendo o máximo da área normalizada de 24,6 % da área inicial do fármaco ( $A_0$ ). Fica evidente, portanto, que para análises da degradação em menores concentrações serão importantes tratamentos dessas amostras antes da análise cromatográfica. A curva representada na Figura 18.b e 19.b mostra a eficiência da fotólise na degradação dos fármacos a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  em água. Em uma hora, as concentrações do ciprofloxacino e do enrofloxacino foram reduzidas respectivamente em 93,5 % e 96,8 %.

Pelas curvas da Figura 18.c, nota-se que no tempo de fotólise de 20 min (0,33 horas) a maioria das concentrações dos analitos de interesse encontrava-se em seus ápices e por isso escolheu-se esse tempo de fotólise para a etapa de avaliação dos métodos de extração para o ciprofloxacino. Como a presença dos intermediários de  $m/z$  nominal 263, 306, 348, e 362 foi

somente detectada na etapa de triagem do método de SPE, a Figura 18 não ilustra os perfis de formação desses. Para o enrofloxacino, a determinação do tempo de fotólise da amostra a ser submetida à próxima etapa foi dificultada pela gama dos produtos de degradação e dispersão das concentrações em que se formaram (Figura 19.c). A amostra para a triagem da SPE consistiu de uma fração degradada por 10 minutos e outra por 30 minutos, a fim de que todos os intermediários estivessem presentes na amostra.

Embora a fotólise tenha se mostrado efetiva na degradação dos fármacos, não se conhece seu desempenho em casos nos quais o fármaco encontra-se em baixas concentrações e em uma matriz mais complexa, o que ocorre em uma situação real. A avaliação da fotólise

**Figura 18 - Perfil da fotodegradação do CIP ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) (a) CIP e subprodutos; (b) Apenas CIP; (c) Apenas subprodutos.**

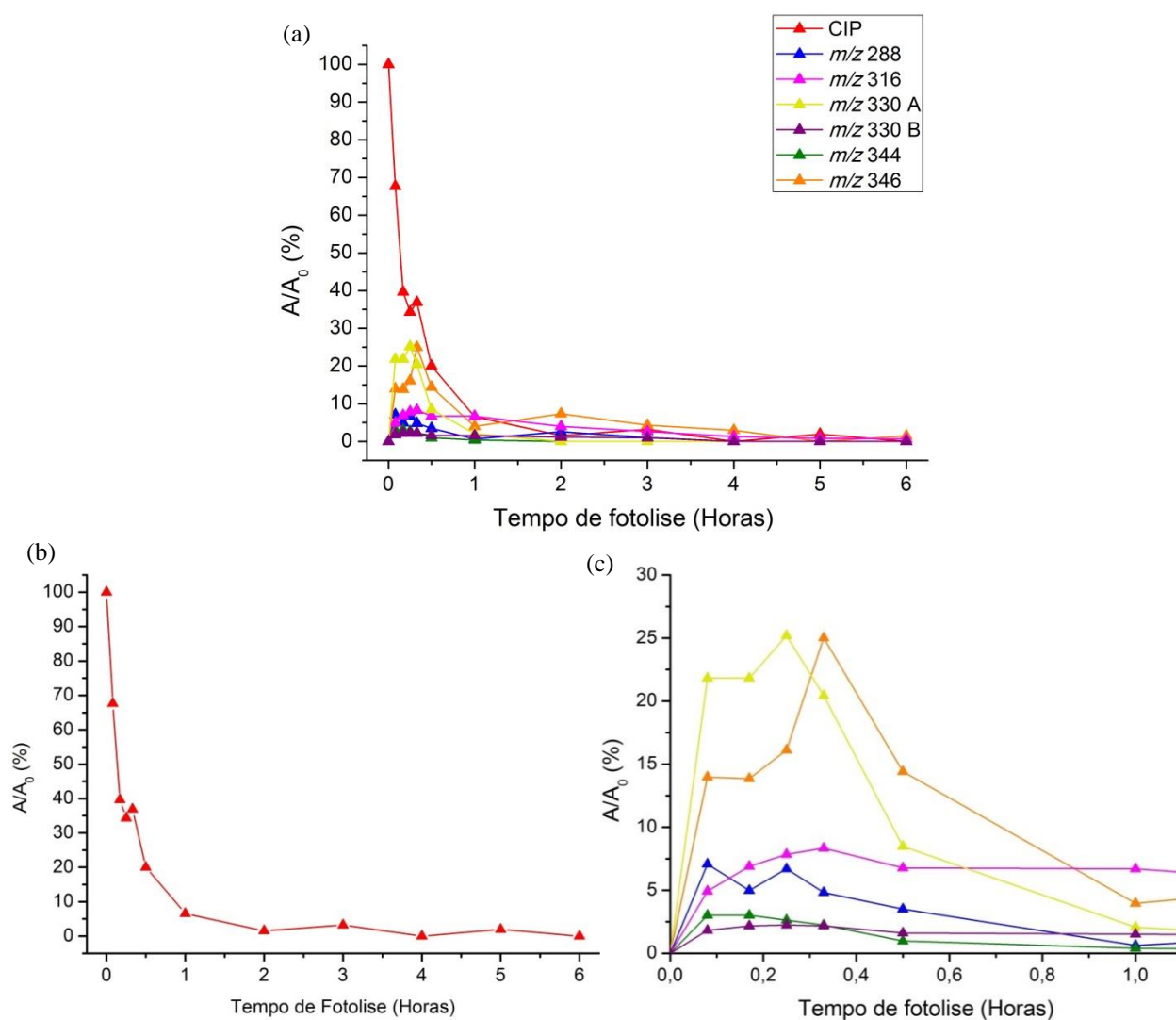
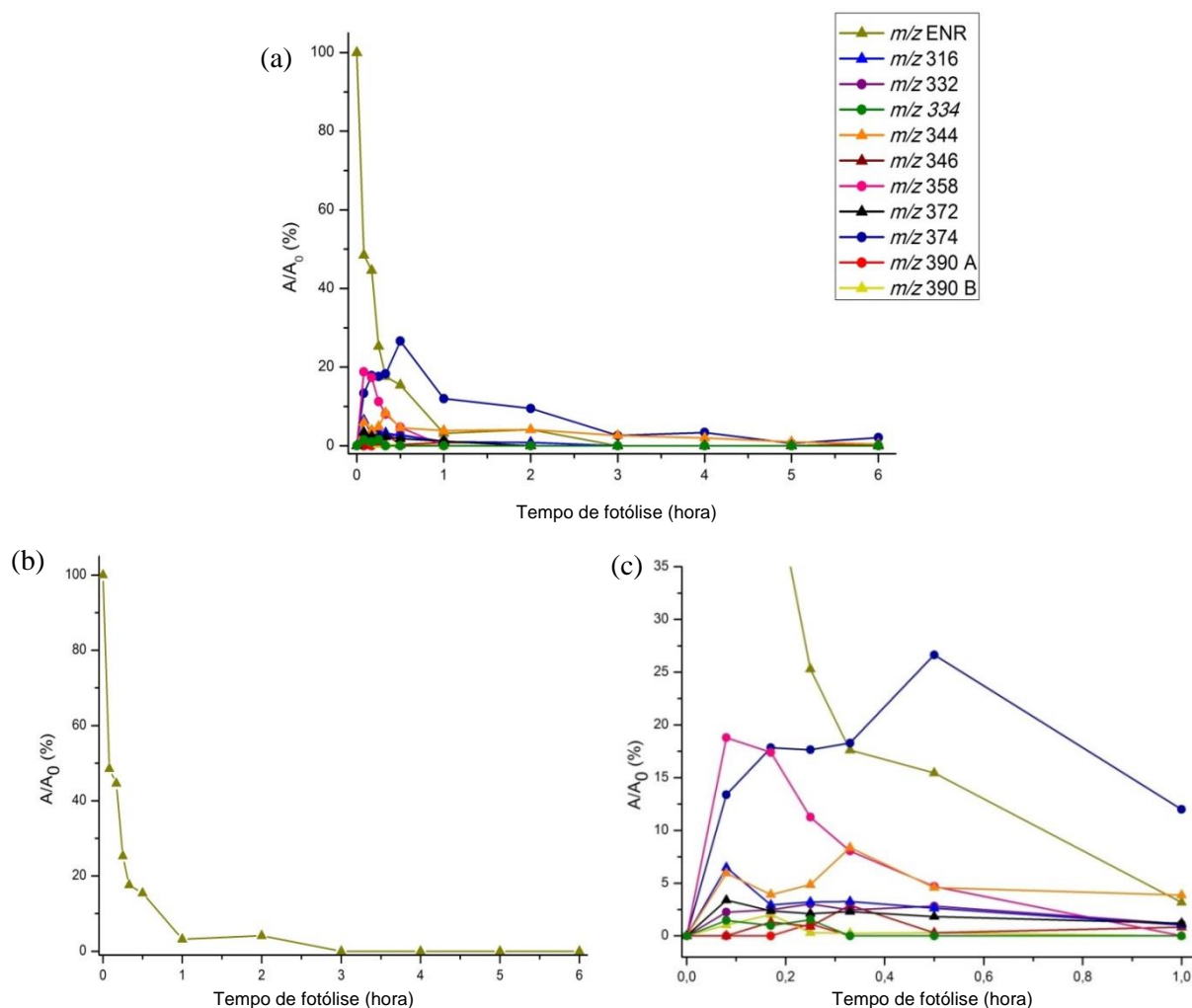


Figura 19 - Perfil da fotodegradação do ENR (10 mg L<sup>-1</sup>) (a) ENR e subprodutos; (b) Apenas ENR; (c) Apenas subprodutos.



do fármaco em alta concentração permitiu, no entanto, identificar os produtos formados, o que não seria possível se a degradação fosse efetuada em concentrações menores. Essa dificuldade de análise em baixas concentrações deve-se à falta de sensibilidade dos métodos analíticos, como foi possível observar para os intermediários que foram apenas detectados após o tratamento da amostra. Para se conhecer o real potencial desse método como alternativa à degradação de fármacos, foi efetuada a fotólise das FQs em baixas concentrações e em esgoto *labmade* e as amostras foram submetidas à SPE.

### 2.3.2 Triagem do método de SPE

Diferentes combinações de fase extratora e solvente foram avaliadas por LC-ESI-QToF/MS quanto à recuperação dos analitos nas amostras de ciprofloxacino e enrofloxacin submetidas à radiação UV. Os desempenhos relativos em porcentagem de cada combinação

sorvente-eluyente para todos os subprodutos identificados, além do próprio fármaco foram calculados. Para cada analito, considerou-se como 100 % a maior área obtida no cromatograma do íon extraído e as outras áreas proporcionais a essa.

### 2.3.2.1 Ciprofloxacino

Na Tabela 6 estão representados os valores das recuperações relativas da amostra de ciprofloxacino degradada. Os valores acima de 80% estão em azul, enquanto que os valores nulos estão em vermelho.

Tabela 6 - Recuperação do CIP e seus produtos para as combinações de fase extratora e solvente.

<i>m/z</i> *Combinação	332 (CIP)	263	288	306	316	330 A	330 B	344	346	348	362
A1	71,5	87,7	0,9	7,5	88,9	31,5	39,3	5,0	36,8	50,8	0
A2	99,7	85,5	78,6	17,8	88,7	49,4	40,0	14,7	76,3	51,2	81,0
A3	94,9	96,5	57,9	100,0	93,1	37,4	45,9	15,7	17,7	94,2	20,0
A4	96,8	100,0	71,4	10,7	90,3	33,5	43,4	17,3	26,6	49,4	0
A5	73,8	49,3	25,1	6,1	62,4	15,4	25,7	16,6	17,9	35,0	58,0
A6	88,9	96,9	92,7	22,2	92,2	38,4	44,0	15,5	18,9	52,4	13,0
B1	81,3	74,2	73,2	10,6	92,2	39,2	40,3	15,9	32,5	52,6	0
B2	98,3	67,3	87,4	17,6	85,1	49,6	41,3	12,9	100,0	54,0	0
B3	85,1	77,6	86,5	14,2	100,0	27,2	46,7	16,6	19,3	75,6	0
B4	71,0	59,4	76,9	8,3	65,1	53,0	33,8	11,8	46,3	33,9	0
B5	94,1	64,6	100,0	13,9	83,0	46,9	39,3	15,8	92,4	55,9	0
B6	77,4	79,5	78,7	25,9	91,3	18,7	41,2	16,2	11,4	46,5	0
C1	51,1	33,8	14,7	7,6	29,7	18,3	25,8	0,3	6,5	8,0	100,0
C2	87,2	72,9	50,0	10,7	92,5	24,6	41,6	16,1	87,9	47,3	1
C3	9,0	0,0	7,8	0,0	4,6	0,0	2,6	0,0	0,0	0,0	0
C4	67,8	81,4	27,3	8,7	81,9	15,5	39,8	0,5	34,9	24,9	0
C5	85,6	72,0	38,1	9,3	69,4	21,6	34,8	2,9	65,8	42,7	13,0
C6	23,7	7,2	12,6	11,4	7,1	0,3	1,3	2,8	2,3	3,4	0
D1	87,0	68,8	66,1	9,2	40,4	45,6	93,5	100,0	9,7	54,4	0
D2	99,9	79,3	79,8	14,8	36,3	98,3	100,0	76,7	9,3	58,0	0
D3	92,3	76,2	83,3	14,5	39,9	8,6	59,6	82,7	8,9	100,0	28,0
D4	87,1	71,7	54,1	9,9	36,4	86,3	92,9	84,1	9,1	49,8	0
D5	100,0	92,2	71,4	14,1	40,3	100,0	95,1	75,9	9,3	51,4	0
D6	96,5	86,0	94,0	19,4	38,4	22,9	67,2	89,3	8,8	48,1	0
E1	51,6	26,5	20,5	3,6	19,5	39,1	28,0	44,0	1,0	14,4	49,0
E2	49,2	73,6	22,9	6,0	36,8	30,2	26,8	83,7	9,2	48,0	34,0
E3	13,2	25,0	13,7	6,2	14,6	0,3	2,4	37,5	0,6	5,8	0
E4	52,0	72,7	24,7	4,7	42,2	56,5	31,1	79,1	5,2	47,3	7,0
E5	50,6	87,4	20,9	4,5	38,5	52,6	28,7	82,9	7,3	47,3	10,0
E6	27,8	24,4	12,9	3,3	4,1	3,7	0,9	29,5	3,4	12,4	0

\*Codificação conforme Tabela 2.

O ciprofloxacino apresenta duas constantes principais de ionização, associados ao grupo carboxílico do anel quinolona ( $pK_a = 5,76$ ) e ao grupo amina secundária do anel piperazínico ( $pK_a = 8,68$ ). Assim em meio neutro, o ciprofloxacino apresenta-se na forma de zwitterión. A presença da carga positiva no grupo amina pode ter diminuído a retenção do composto nas fases de troca aniônica Strata-XA (série C) e Chromabond HR-XA (série E), nas quais apresentaram a menor recuperação. Para essas fases, o solvente acidificado resultou em melhores recuperações devido à protonação do composto, interrompendo a interação eletrostática e eluindo-o. Com o solvente alcalinizado, o grupo carboxílico permanece ionizado e a molécula retida na fase extratora. Dentre os sorventes de fase reversa (Oasis HLB, Strata-X e Chromabond HR-X - série A, B e C respectivamente), o ciprofloxacino foi melhor recuperado em Chromabond HR-X.

O subproduto  $m/z$  362 foi pouco recuperado em todas as fases, sendo as melhores recuperações obtidas para as fases de troca aniônica. A estrutura química sugerida para o composto apresenta além do grupo carboxílico três grupos hidroxilas. Para o Strata-X, o intermediário não foi recuperado com nenhum solvente, indicando a ausência de interação entre o composto e a fase. De fato, a especificação do produto diz reter preferencialmente compostos neutros. Para as fases de troca aniônica, a eluição com acetonitrila (C1-C3, E1-E3) resultou em melhores recuperações do que com metanol (C4-C6, E4-E6). A ionização de ácidos neutros é governada pelas interações soluto-solvente e principalmente interações eletrostáticas. O aumento da proporção de solvente orgânico na fase móvel reduz a constante dielétrica do meio, o que perturba a ionização dos ácidos neutros. Assim, ocorre um aumento do  $pK_a$  do ácido em solventes orgânicos.(31) Comparando-se esse efeito entre os solventes acetonitrila e metanol, o  $pK_a$  obtido em metanol puro é menor que em acetonitrila pura, visto que o metanol apresenta solvatação dos íons similar à da água (ligação de hidrogênio).(32) Portanto, com a passagem de acetonitrila, espera-se que a forma protonada do composto seja a mais favorável pelo maior  $pK_a$ , o que interrompe a interação entre cargas, resultando na sua eluição. Da mesma forma que o ciprofloxacino, esse composto não foi recuperado com eluição em solvente alcalino. Apesar das recuperações serem calculadas em relação a cada analito individualmente, pode-se fazer uma comparação qualitativa entre o ciprofloxacino e os produtos  $m/z$  330 A e 362. Observando a rota de degradação do ciprofloxacino até a formação do  $m/z$  362 (Figura 12) passando pelo  $m/z$  330 A, nota-se aumento da polaridade dos compostos e diminuição nos valores de recuperação. De um modo geral, as melhores

recuperações são obtidas para o ciprofloxacino, composto menos polar, visto que as extrações baseiam-se no mecanismo de fase reversa.

Pela diversidade de compostos, é difícil traçar um perfil geral do comportamento dos analitos na retenção nas diferentes fases extratoras avaliadas e na eluição.

As combinações de fase extratora e eluente que não foram capazes de recuperar algum analito, isto é, apresentaram recuperação nula, foram eliminadas como candidatos a testes posteriores, como foi o caso do cartucho Strata-X (série B), para o qual não se observou a recuperação do intermediário de  $m/z$  362 para nenhum eluente. De modo geral, as fases trocadores aniônicos apresentaram as menores recuperações.

O cartucho Oasis HLB foi eficaz na recuperação da maioria dos analitos, tendo recuperações nulas quando combinadas com solventes neutros (A1 e A4). Quando utilizada a acetonitrila, os analitos foram melhor eluídos. Para alguns, foi mais eficiente a condição ácida, A2, e para outros a condição básica, A3, cujas recuperações estão em destaque na Tabela 6. Portanto, a eluição sequencial com diferentes condições ácidas e básicas dos eluentes pode levar a maior recuperação a todos os analitos.

No entanto, experimentalmente foi verificado que o sal  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ , resultado da reação ácido-base entre  $\text{H}_3\text{PO}_4$  e  $\text{NH}_4\text{OH}$ , é pouco solúvel em ACN, já que ocasionou uma precipitação. Portanto, acrescentou-se a eluição com ACN neutra após a eluição com ACN básica para eliminar possíveis traços básicos na fase extratora, impedindo que houvesse a precipitação do sal no solvente. E para não ocorrer a adsorção dos analitos no sal, coletou-se a fração ácida em frasco diferente da fração básica, a fim de impedir a precipitação. Após secagem, a ressuspensão das frações foi feita em conjunto, em meio aquoso.

#### 2.3.2.2 Enrofloxacino

Pela similaridade estrutural entre o enrofloxacino e o ciprofloxacino, avaliou-se para o primeiro o mesmo método de SPE desenvolvido para o último. O desempenho desse método encontra-se na Tabela 7. O valor da recuperação representa a razão das áreas do analito sem a extração e após a extração. Os valores das recuperações dos analitos estão bastante dispersos, evidenciando a heterogeneidade dos compostos. Este protocolo apresentou baixa recuperação para o próprio fármaco e seu intermediário principal,  $m/z$  374. Assim, avaliaram-se todas as fases extratoras e todos os eluentes para obter o método de extração de maior eficiência para o

ENR e seus intermediários. Na Tabela 8 está presente o desempenho relativo de cada combinação sorvente-eluente para cada analito.

Tabela 7 - Recuperação do ENR e seus intermediários para Oasis HLB e eluição sequencial de ACN.

<i>m/z</i>	<b>360 (ENR)</b>	<b>374</b>	<b>390 A</b>	<b>390 B</b>	<b>346</b>	<b>358</b>	<b>332</b>	<b>316</b>	<b>334</b>	<b>372</b>	<b>344</b>
Recuperação (%)	39,1	20,6	0,0	0,0	112,9	200,3	70,2	65,0	0,0	156,3	224,5

Tabela 8 - Recuperação do ENR e seus produtos para as combinações de fase extratora e solvente.

<i>m/z</i> *Combinação	<b>360 (ENR)</b>	<b>374</b>	<b>390 A</b>	<b>390 B</b>	<b>346</b>	<b>358</b>	<b>332 (CIP)</b>	<b>316</b>	<b>344</b>	<b>372</b>	<b>334</b>
<b>A1</b>	92,3	79,2	0,0	100,0	45,0	89,0	100,0	23,5	5,5	69,7	50,3
<b>A2</b>	52,8	11,2	0,0	40,1	0,0	54,2	6,7	65,7	15,0	0,0	52,1
<b>A3</b>	94,6	19,6	1,2	0,0	0,0	58,1	9,7	29,5	58,3	79,1	100,0
<b>A4</b>	79,9	20,2	0,0	0,0	0,0	99,7	15,8	52,2	56,4	48,9	84,5
<b>A5</b>	69,8	37,9	0,0	0,0	32,3	86,0	9,1	100,0	4,8	0,0	78,5
<b>A6</b>	57,4	26,1	9,2	0,0	0,0	17,9	7,2	17,4	17,9	31,0	52,6
<b>B1</b>	68,7	50,6	100,0	0,0	82,8	81,7	4,8	23,3	48,6	40,6	0,0
<b>B2</b>	47,0	0,0	0,0	0,0	0,0	53,8	5,7	68,1	11,3	0,0	50,0
<b>B3</b>	90,6	29,1	0,0	0,0	0,0	77,5	9,6	32,2	83,5	60,1	0,0
<b>B4</b>	59,2	76,7	33,7	75,1	92,3	57,1	3,0	18,1	51,6	38,5	33,0
<b>B5</b>	70,0	36,6	0,0	0,0	0,0	85,4	10,7	75,9	14,2	15,5	54,4
<b>B6</b>	77,0	42,6	5,4	0,0	0,0	62,6	13,3	32,6	88,1	64,8	87,5
<b>C1</b>	86,6	21,3	2,3	0,0	60,9	100,0	9,2	29,1	47,1	34,0	49,8
<b>C2</b>	48,6	0,0	0,0	0,0	0,0	51,7	4,8	37,5	32,5	0,0	32,0
<b>C3</b>	62,0	17,9	8,0	0,0	0,0	36,0	7,7	16,1	51,0	12,5	0,0
<b>C4</b>	67,1	44,5	20,5	0,0	37,9	93,3	8,9	20,0	93,4	52,5	49,2
<b>C5</b>	77,8	50,4	0,0	0,0	32,7	71,9	0,0	90,2	4,7	0,0	0,0
<b>C6</b>	3,9	0,0	0,0	0,0	0,0	14,6	3,4	8,7	10,0	13,7	15,2
<b>D1</b>	100,0	100,0	8,6	54,4	37,3	82,1	2,9	21,8	86,9	51,0	31,8
<b>D2</b>	55,4	18,1	0,0	0,0	0,0	49,0	7,4	1,2	12,8	0,0	57,4
<b>D3</b>	76,0	48,9	0,0	0,0	0,0	71,3	12,6	32,5	35,3	56,5	0,0
<b>D4</b>	70,9	78,5	10,2	73,4	43,2	90,3	0,0	24,7	45,0	55,3	38,6
<b>D5</b>	66,5	63,4	0,0	0,0	100,0	94,1	0,0	10,9	39,1	14,4	53,1
<b>D6</b>	78,4	31,0	10,5	0,0	0,0	59,7	8,8	26,6	60,9	61,3	56,9
<b>E1</b>	97,2	57,1	3,3	0,0	31,4	63,9	3,2	15,9	84,9	42,4	35,5
<b>E2</b>	54,3	14,8	0,0	18,6	0,0	38,5	3,8	57,9	6,6	0,0	45,2
<b>E3</b>	58,8	17,3	7,5	0,0	0,0	20,6	3,7	9,3	100,0	20,3	0,0
<b>E4</b>	84,5	73,0	32,9	0,0	24,5	80,3	3,2	12,3	85,5	100,0	35,3
<b>E5</b>	61,8	75,1	0,0	0,0	0,0	46,3	0,0	48,1	21,5	0,0	59,2
<b>E6</b>	23,7	10,1	5,3	0,0	0,0	3,4	3,4	6,6	16,8	15,8	0,0

\*Codificação conforme Tabela 2.



Nota-se uma grande dispersão dos valores do desempenho da combinação sorvente-eluyente para os analitos, mostrando que os compostos apresentam diferentes características físico-químicas.

O enrofloxacino também possui em sua estrutura o grupo carboxílico e o grupamento amina, os quais estão associados às constantes de ionização de 5,69 e 6,68 respectivamente. Em meio neutro, o ácido carboxílico do composto estará na forma dissociada e diferentemente do ciprofloxacino, o grupo amina não estará protonado. Desse modo, a interação com a fase trocadora de ânions estará favorecida devido à ausência da carga positiva na molécula, o que explica as melhores recuperações de enrofloxacino nessas fases.

Comparando-se as recuperações do ciprofloxacino como molécula precursora e como produto de degradação, nota-se discrepância dos valores, sendo bem menores na amostra de enrofloxacino degradada. Tal fato pode ser explicado pela menor concentração, visto que é um intermediário nessa amostra, e competição pelos sítios ativos da fase extratora. O enrofloxacino e o ciprofloxacino apresentam características distintas na retenção em fase reversas.(33) O grupo etila ligado ao anel piperazínico presente no enrofloxacino contribui para a retenção desse composto nas fases apolares pela diminuição da polaridade.

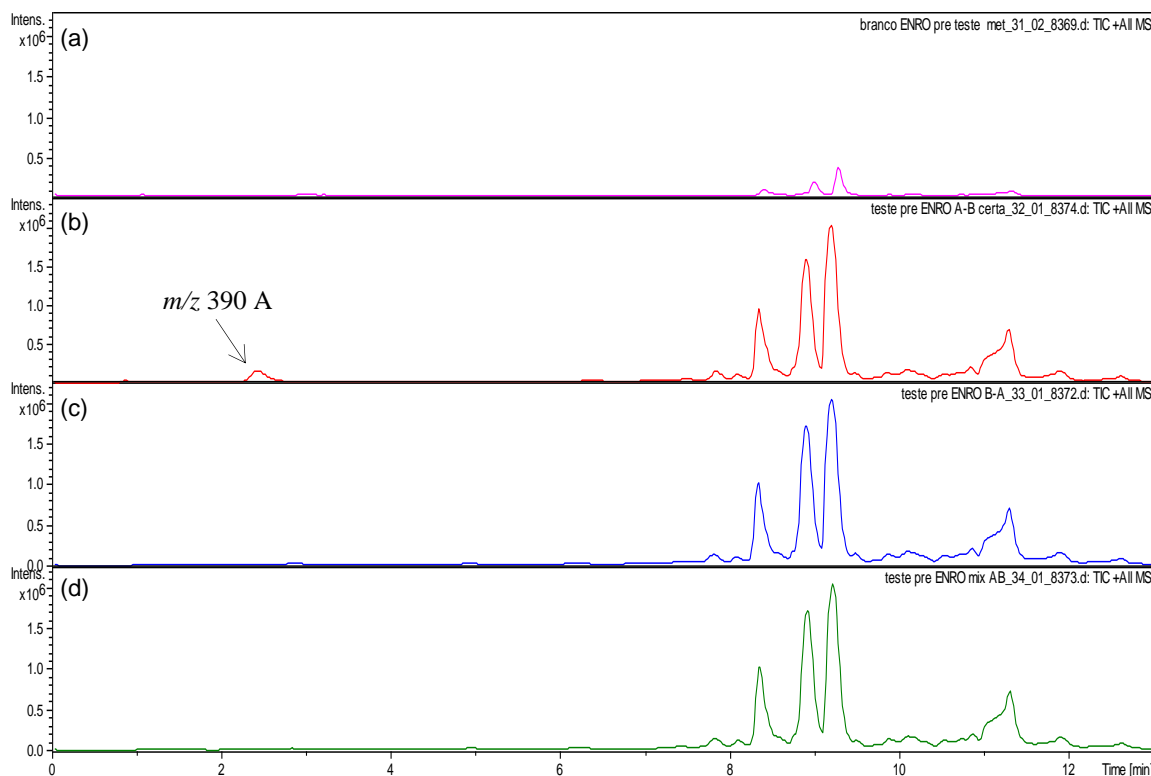
Os subprodutos de  $m/z$  316 e 334 que resultaram da abertura do anel piperazínico e remoção do grupo etila apresentaram recuperações consideráveis. O grupamento amina desses intermediários pode contribuir na retenção dos analitos na fase pela interação dipolar com o grupo pirrol da fase extratora Oasis HLB. Para os subprodutos de  $m/z$  390 A e 390 B, a presença dos grupos aldeídos pode ter influenciado nas baixas recuperações, principalmente para o  $m/z$  390 B, que apresentou recuperação nula a todas as combinações com a fase de troca aniônica Strata-XA.

As combinações A1 e B4 apresentaram recuperações consideráveis. A fim de obter uma melhor recuperação para todos os analitos, realizou-se extrações associando-se as combinações A1 e B4.

Os cromatogramas da Figura 20 foram obtidos a partir da análise por LC-ESI-QToF/MS na avaliação da recuperação dos analitos para cada protocolo proposto. Os cromatogramas evidenciam a importância da etapa de pré-concentração, visto que os picos do cromatograma referente à amostra sem tratamento apresentaram intensidades muito abaixo das amostras que se submeteram à SPE. Os protocolos propostos apresentaram recuperações semelhantes exceto ao intermediário de  $m/z$  390 A, que foi somente detectado para o

protocolo A  $\rightarrow$  B. Assim, este protocolo foi selecionado para anteceder a análise cromatográfica das amostras de ENR em baixa concentração submetidas à fotólise.

Figura 20 - Cromatogramas de íon total (TIC) dos protocolos de SPE para ENR e seus produtos. (a) Amostra sem SPE. (b) Amostra submetida ao protocolo A  $\rightarrow$  B. (c) Amostra submetida ao protocolo B  $\rightarrow$  A. (d) Amostra submetida ao protocolo A + B.



### 2.3.3 Fotólise do fármaco em baixa concentração

A fim de avaliar o real potencial da fotólise, efetuaram-se degradações do fármaco em baixa concentração em água e em esgoto *labmade*, simulando as condições em que o fármaco encontra-se como poluente em efluente. Antes da análise por LC-ESI-QToF/MS, as amostras foram submetidas às extrações a fim de pré-concentrar e remover possíveis interferentes da matriz de esgoto *labmade* que poderiam prejudicar a análise. Para a amostra degradada de ciprofloxacino empregou-se Oasis HLB como sorvente e eluição sequencial de ACN básica, ACN pura e ACN ácida. Para o enrofloxacino, as amostras sucederam ao protocolo A  $\rightarrow$  B.

Primeiramente, avaliou-se o efeito do volume da amostra na etapa de extração, variando-se o volume da amostra de 25 mL utilizado na etapa de triagem do melhor método de SPE para 100 mL. A solução do fármaco em alta concentração foi degradada e posteriormente dilui-a 100 vezes para então ser submetida à extração. Os valores da

recuperação de cada analito, apresentados na Tabela 9 e Tabela 10, correspondem à razão das áreas dos picos cromatográficos da amostra pré-concentrada e da amostra sem SPE.

Tabela 9 - Recuperação de CIP e intermediários em água e esgoto *labmade*.

	Analitos ( <i>m/z</i> )	CIP	263	288	306	316	330 A	330 B	344	346	348	362
<b>Água Milli-Q</b>	Recuperação (%)	94,6	94,7	75,9	98,0	74,1	49,6	78,7	59,8	19,6	89,9	79,1
	Erro (+/-)	3,0	4,3	4,7	5,1	4,8	3,2	4,4	6,3	2,3	6,2	5,1
<b>Esgoto labmade</b>	Recuperação (%)	90,7	93,7	96,6	18,5	50,7	55,8	89,6	50,0	31,0	57,1	12,0
	Erro (+/-)	4,2	6,2	9,9	2,8	6,7	4,2	4,0	6,9	3,9	3,6	1,4

Tabela 10 - Recuperação de ENR e seus produtos em água e esgoto *labmade*.

	Analitos ( <i>m/z</i> )	ENR	374	390 A	390 B	346	358	332	316	344	372	334
<b>Água Milli-Q</b>	Recuperação (%)	93,7	42,3	112,2	0	59,2	47,1	47,4	70,1	81,9	89,9	55,1
	Erro (+/-)	5,4	3,7	7,8	-	3,2	3,2	2,9	5,0	7,3	8,4	4,2
<b>Esgoto labmade</b>	Recuperação (%)	76,4	15,7	0	0	0	62,6	77,1	60,3	63,1	80,9	47,2
	Erro (+/-)	6,1	2,2	-	-	-	4,5	5,2	5,9	6,2	7,7	3,9

O método desenvolvido para a amostra do ciprofloxacino obteve uma boa recuperação geral dos analitos da amostra diluída em água, apresentando uma menor eficiência na extração dos intermediários de *m/z* 330 A, 344 e 346. O meio de esgoto *labmade* não alterou significativamente a eluição dos intermediários *m/z* 263, 330 A, 344 e do ciprofloxacino. Entretanto, as recuperações dos intermediários *m/z* 288, 330 B e 346 foram favorecidas e dos *m/z* 306, 316, 348 e 362 foram prejudicadas pelo esgoto *labmade*.

O protocolo A → B mostrou-se mais eficaz na recuperação dos analitos em meio aquoso. O intermediário *m/z* 390 B não foi recuperado em nenhum dos meios, indicando que o volume da amostra interferiu na sua extração. Em esgoto *labmade*, os intermediários de *m/z* 390 A e 346 não foram recuperados e os de *m/z* 374, 316, 344, 372, 334 e o próprio enrofloxacinol apresentaram menor recuperação, evidenciando a interferência da matriz no processo de pré-concentração.

Os perfis de formação dos produtos e de degradação do ciprofloxacino e enrofloxacinol em água e em esgoto *labmade* estão representados nas Figura 21 e Figura 22 respectivamente.

As curvas foram traçadas considerando-se a área relativa, ou seja, a razão da área do pico cromatográfico do analito pela área do pico do fármaco em tempo zero de reação.

As curvas de formação dos intermediários nas diferentes matrizes apresentam diferenças evidentes. Entre os produtos do ciprofloxacino, o intermediário, cuja concentração em que se forma é a mais elevada na água, é de  $m/z$  316 e, no esgoto *labmade*, o intermediário de  $m/z$  346. No entanto, pela Tabela 9, observa-se que o intermediário  $m/z$  316 é mais bem recuperado em água e o  $m/z$  346, em esgoto *labmade*. Logo não é possível afirmar se as diferenças nos perfis de formação dos produtos devem-se à interferência da matriz na degradação, na extração, na ionização em MS ou na combinação destas. Na amostra do enrofloxacino, em meio aquoso o intermediário  $m/z$  374 se formou em maior concentração e, em esgoto *labmade*, o intermediário  $m/z$  332. Além disso, após uma hora de reação, alguns intermediários ( $m/z$  374, 390 A, 344 e 316) ainda foram detectados em meio aquoso. Pela Tabela 10, esses intermediários foram melhores recuperados em meio aquoso do que em esgoto *labmade*. No entanto, na fotólise em alta concentração do enrofloxacino, os intermediários de  $m/z$  344 e 374 foram detectados mesmo após 6 horas sob radiação ultravioleta, indicando que estes são persistentes ao processo. Visto que os intermediários podem reter a atividade antibacteriana, principalmente o produto de  $m/z$  374, como foi constatado por Wammer et al. (29), a solução final pode se apresentar tóxica.

Apesar dos perfis das curvas dos intermediários terem sido diferentes, os perfis da degradação do ciprofloxacino assemelharam-se bastante. Como as recuperações do fármaco em água e em esgoto *labmade* apresentaram valores aproximados, deduz-se que a fotólise no segundo meio foi tão eficaz quanto em água. Em ambas as condições, não se detectava a presença do fármaco após 20 minutos de reação, mostrando a eficiência do processo em concentrações baixas do fármaco e em esgoto *labmade*.

Em contrapartida, o enrofloxacino não foi mais detectado em 20 minutos de reação em meio aquoso, enquanto que em esgoto *labmade*, em 40 minutos. Visto que a recuperação do enrofloxacino em água foi maior do que em esgoto *labmade*, pode-se concluir que a fotólise perde eficiência em matriz mais complexa, cujos componentes podem competir pelos fótons com o enrofloxacino.

Figura 21 - Perfil da fotólise do CIP a 0,1 mg L<sup>-1</sup> em (a) água e (b) esgoto *labmade*.

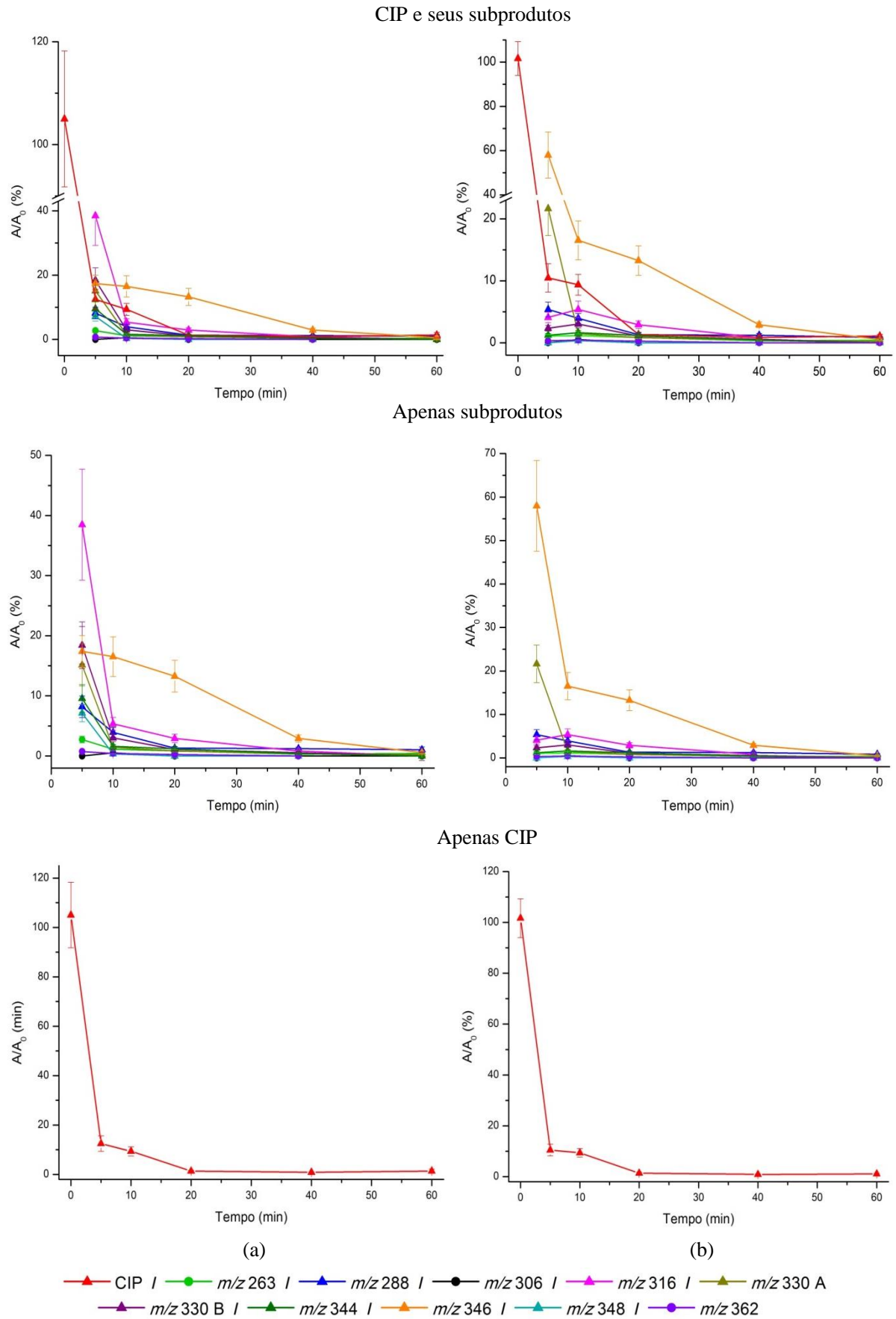
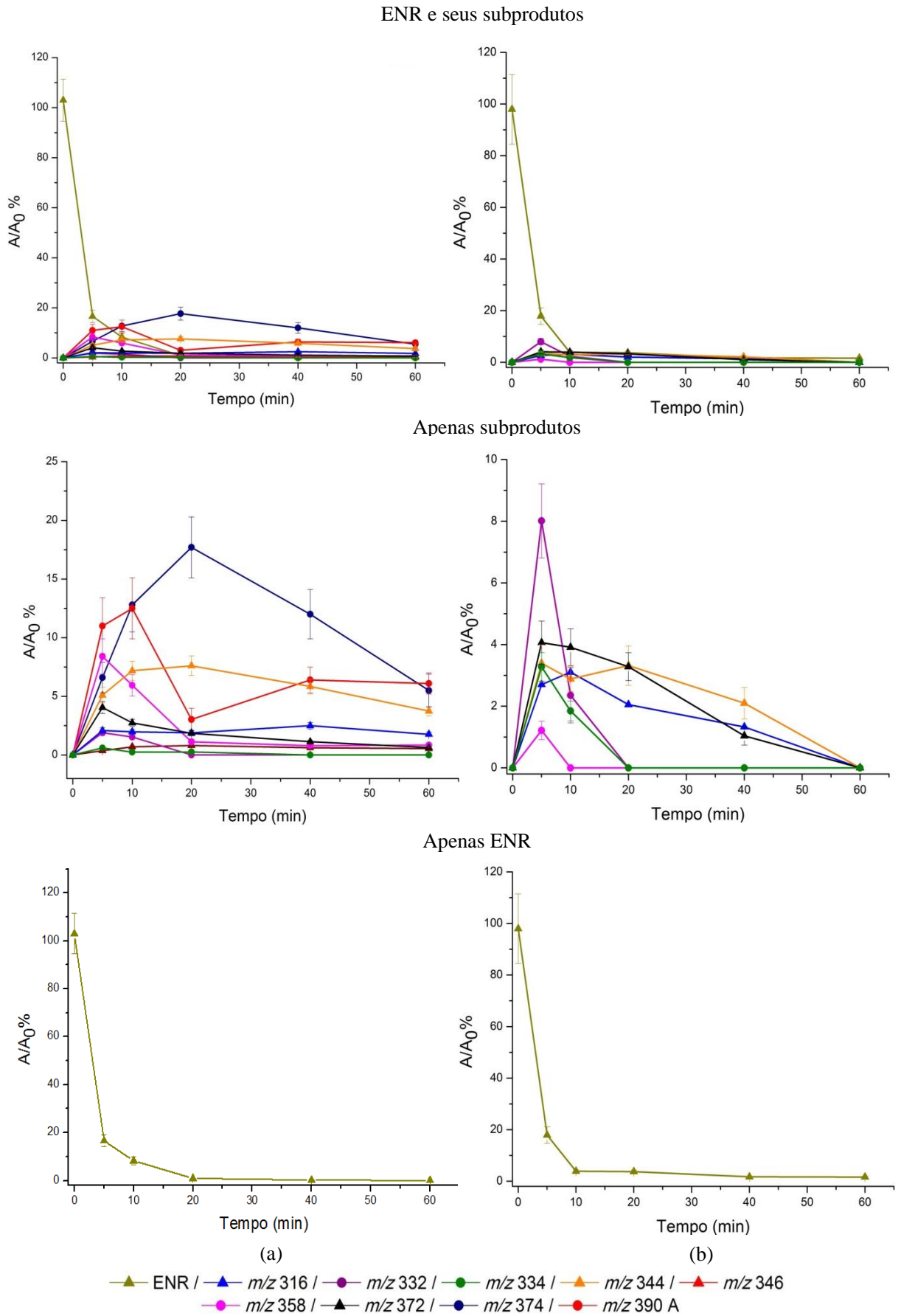


Figura 22 - Perfil da fotólise do ENR a  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  em (a) água e (b) esgoto *labmade*.



### 3 CONCLUSÃO

A fotólise do fármaco em alta concentração foi uma etapa importante para se analisar os produtos de degradação formados e desenvolver método eficiente de extração da amostra contendo os intermediários e o próprio fármaco. Foi possível identificar dez subprodutos para cada fármaco, no entanto mais produtos poderiam estar presentes em níveis abaixo do limite de detecção do equipamento. A baixa concentração em que o fármaco geralmente se encontra no efluente pode levar a formação de produtos em níveis ainda menores. E como constatado no trabalho, alguns produtos foram mais facilmente detectados após a extração, evidenciando a importância dessa etapa para analisar os subprodutos apesar dos procedimentos da SPE serem exaustivos.

Apesar da similaridade estrutural dos fármacos estudados, o ciprofloxacino e o enrofloxacinol apresentaram comportamentos distintos na extração, sendo necessário desenvolver métodos de SPEs diferentes às amostras degradadas de cada fármaco. Para o ciprofloxacino, o método de SPE consistiu na fase extratora Oasis HLB e eluição sequencial de ACN básica, ACN pura e ACN ácida. E para amostra de enrofloxacinol degradada foi proposto o acoplamento das fases Oasis HLB e Strata-X, com a amostra passando primeiramente pela Oasis HLB e em seguida pela Strata-X, e eluição de ACN seguida por MeOH. Além disso, os subprodutos também apresentaram recuperações diferentes ao do próprio fármaco. Caso fossem aplicados nas amostras degradadas os procedimentos de SPE para os fármacos já estabelecidos na literatura, poderia haver perda dos produtos.

Há muitos estudos referentes à degradação de fármacos na literatura, entretanto são poucos aqueles que reproduzem as condições em que esses poluentes se encontram em efluentes, como a concentração na faixa de  $\text{ng L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$  e matriz complexa. A fim de evitar a variabilidade das características de um efluente real, foi realizada fotólise em matriz de esgoto *labmade* para verificar se de fato os componentes da matriz poderia influenciar no processo. Nas condições experimentais em que foram realizadas as fotólises, verificou-se que o procedimento é eficaz na degradação do ciprofloxacino em ambos os meios em que se processou a reação. Após 20 minutos de reação, a presença do ciprofloxacino não era mais detectada. Os perfis de formação dos intermediários diferiram-se bastante no meio aquoso e no esgoto *labmade*, indicando que o meio pode influenciar tanto na degradação quanto na etapa de extração.

De modo geral, a degradação do enrofloxacino por fotólise apresentou mais problemas que para o ciprofloxacino. A fotólise gerou produtos com atividade antimicrobiana ( $m/z$  332 e 374) e alguns produtos não foram degradados após 1 hora de reação em baixa concentração do fármaco e mesmo após 6 horas submetidas à luz UV na fotólise em alta concentração. Em matriz de efluente *labmade*, o enrofloxacino foi detectado após 40 minutos de reação, enquanto que em água em 20 minutos a sua presença não era mais detectada. Os componentes da matriz podem ter interferido na absorção da energia luminosa pela molécula do enrofloxacino. Assim, mais estudos sobre a real ecotoxicidade dos produtos, além da fotodegradabilidade dos mesmos em água e do enrofloxacino em matriz complexa devem ser realizados.

Para introdução da fotólise nas estações de tratamento de efluente como processo complementar na degradação desses poluentes, ainda devem ser feitos estudos quanto à eficiência em uma matriz de esgoto real e aos custos na implementação do processo.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 LENARDÃO, E.J.; DABDOUB, M.J.; FREITAG, R. A.; SILVEIRA, C. C. "Green Chemistry" - Os 12 princípios da Química Verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Quim. Nova**, v. 26, n. 1, p. 123–9, 2003.
  
- 2 ROMANO, P. N.; SOUSA-AGUIAR, E. F.; ALMEIDA, J. M. A. R.; FERNANDES, R. P.; CARVALHO, Y. Química Verde: A evolução de um conceito. **Quim. Nova**, v. 37, n. 7, p. 1257–61, 2014.
  
- 3 HIGAITE, C.; AZARNOFF, D.L. Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. **Life Sci.**, v. 20, n. 3, p. 337–42, 1977.
  
- 4 SEIFRTOVÁ, M.; NOVÁKOVÁ, L.; LINO, C.; PENA, A.; SOLICH, P. An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. **Anal. Chim. Acta**, v. 649, n. 2, p. 158–79, 2009.
  
- 5 WISE, R. Antimicrobial resistance: priorities for action. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 49, p. 585–6, 2002.
  
- 6 ADACHI, F.; YAMAMOTO, A.; TAKAKURA, K.; KAWAHARA, R. Occurrence of FQ and FQ-resistance genes in the aquatic environment. **Science of the Total Environment**, v. 444, p. 508–14, 2013.
  
- 7 BILA, D. M.; DEZOTTI, M.. Fármacos no meio ambiente. **Quim. Nova**, v. 26, n. 4, p. 523–30, 2003.
  
- 8 NOGUEIRA, R.F.P.; MELO, S.A.S.; TROVÓ, A. G.; BAUTITZ, I. R. Degradação de Fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Quim. Nova**, v. 32, n. 1, p. 188–97, 2009.

9 GÖBEL, A.; MCARDELL, C.S.; JOSS, A.; SIEGRIST, H.; GIGER W. Fate of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment technologies. **Sci. Total Environ.**, v. 372, p. 361–71, 2007.

10 HOMEM, V.; SANTOS, L. Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices - a review. **J. Environ. Econ. Manage.**, v. 92, n. 10, p. 2304–47, 2011.

11 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa Nº 42 de 20 de dezembro de 1999**. Brasília, 1999. 51 p. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/CRC/IN%2042-1999.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2042-1999.pdf)> Acesso em: 16 dez. 2014.

12 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução - RDC Nº 20 de 5 de maio de 2011**. Brasília, 2011. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/sngpc/Documentos2012/RDC%2020%202011.pdf?jornal=...%28Acessadol>> Acesso em: 16 dez. 2014.

13 VASCONCELOS, T.G.; KÜMMERER, K.; HENRIQUES, D. M.; MARTINS, A. F. Ciprofloxacin in hospital effluent: degradation by ozone and photoprocesses. **J. Hazard. Mater.**, v. 169, p. 1154–8, 2009.

14 MALATO, S.; SIRTORI, C.; ZAPATA, A; OLLER, I. GERNJAK, W. AGÜERA, A. Decontamination industrial pharmaceutical wastewater by combining solar photo-Fenton and biological treatment. **Water Res.**, v. 43, n. 3, p. 661–8, 2009.

15 LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. 1. ed. Campinas: Editora Átomo, 2009. 384p.

16 PATRICK, G. L. Antibacterial Agents. In: *An Introduction to Medicinal Chemistry*. New York: Oxford University Press Inc., 1995. v. 1, p. 145-204.

17 PUPO, M.T.; GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L. S. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–79, 2010.

18 RODRIGUES, A.; BERTOLDI, A.D. Perfil da utilização de antimicrobianos em um hospital privado. **Ciênc. Saúde Coletiva**, v. 15, n. supl.1, p. 1239–47, 2010.

19 CAMARGO, A. L.; ONZI, P. S.; HOFFMAN, S. P. Avaliação do consumo de antimicrobianos injetáveis de um hospital privado no ano de 2009. **R. Bras. Farm. Hosp. Serv. Saúde São Paulo**, v. 2, n. 2, p. 20–5, 2011.

20 SPELTINI, A.; STURINI, M.; MARASCHI, F.; PROFUMO, A. Fluoroquinolone antibiotics in environmental waters: sample preparation and determination. **J. Sep. Sci.**, v. 33, p. 1115–31, 2010.

21 LYDY, M.; ROBINSON, A. A; BELDEN, J. B. Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 24, n. 2, p. 423–30, 2005.

22 TORRES, P. **Desempenho de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgoto sanitário sob diferentes condições de operação**. 1992. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

23 FERREIRA, Tanare Cambraia Ribeiro. **Identificação e pré-concentração dos produtos da fotodegradação de antimicrobianos**. 2014. Tese (Doutorado em Química Analítica e Inorgânica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75135/tde-12022015-112950/>>. Acesso em: 2015-11-19.

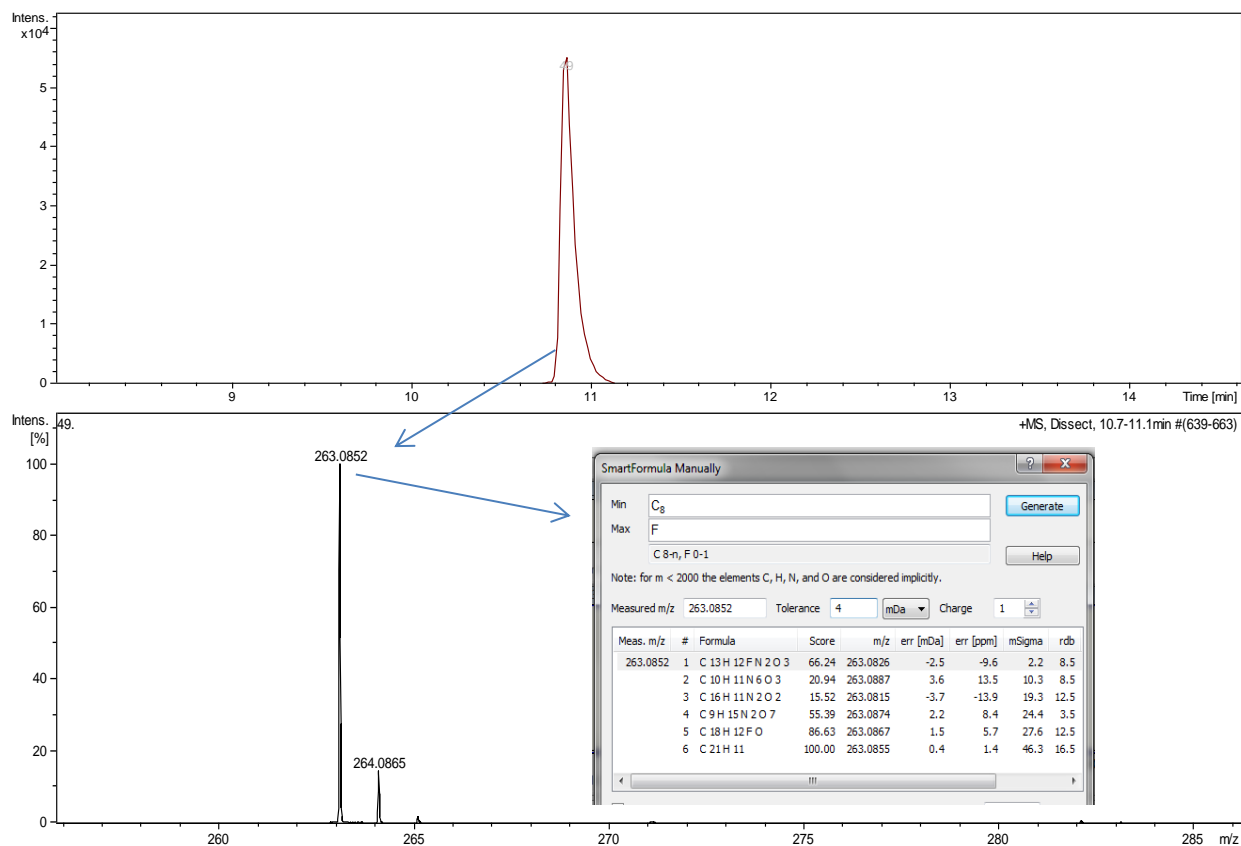
24 BANI-YASEEN, A. D.; HAMMAD, F.; GHANEM, B. S.; MOHAMMAD, E. G. On the photophysicochemical properties of selected fluoroquinolones: solvatochromic and fluorescence spectroscopy study. **J. Fluoresc.**, v. 23, n. 1, p. 93–101, 2013.

25 GUO, H.-G.; GAO, N.-Y.; CHU, W.-H. Photochemical degradation of ciprofloxacin in UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process: kinetics, parameters, and products. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 20, n. 5, p. 3202–13, 2013.

- 26 ALBINI, A.; MELLA, M.; FASANI, E. Photochemistry of 1-Cyclopropyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-7- ( piperazin-1-yl ) quinoline-3-carboxylic Acid ( = Ciprofloxacin ) in Aqueous Solutions. **Helv. Chim. Acta**, v. 84, p. 2508–2519, 2001.
- 27 KÜMMERER, K.; VASCONCELOS, T.G.; HENRIQUES, D. M.; KÖNIG, A.; MARTINS, A. F. Photo-degradation of the antimicrobial ciprofloxacin at high pH: Identification and biodegradability assessment of the primary by-products. **Chemosphere**, v. 76, n. 4, p. 487–93, 2009.
- 28 STURINI, M.; SPELTINI, A.; MARASCHI, F. PROFUMO, A.; PRETALI, L.; IRASTORZA, E. A.; FASANI, E.; ALBINI, A. Environmental Photolytic and photocatalytic degradation of fluoroquinolones in untreated river water under natural sunlight. **Appl. Catal. B-Environ.**, v. 119-120, p. 32–9, 2012.
- 29 WAMMER, K.H.; KORTE, A.R.; LUNDEEN, R. A.; SUNDBERG, J. E.; MCNEILL, K.; ARNOLD, W. A. Direct photochemistry of three fluoroquinolone antibacterials: norfloxacin, ofloxacin, and enrofloxacin. **Water Res.**, v. 47, n. 1, p. 439–48, 2013.
- 30 LI, Y.; NIU, J.; WANG, W. Photolysis of Enrofloxacin in aqueous systems under simulated sunlight irradiation: Kinetics, mechanism and toxicity of photolysis products. **Chemosphere**, v. 85, n. 5, p. 892–7, 2011.
- 31 GRUSHKA, E.; GRINBERG, N. **Advances in Chromatography**. CRC Press, 2012, 465 p., v. 50.
- 32 ROSÉS, M. Determination of the pH of binary mobile phases for reversed-phase liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 1037, p. 283–98, 2004.
- 33 AMPARO, Maura Roquete. **Desenvolvimento e validação de métodos SPE-LC-MS e MEPS-LC-MS para quantificação de fluoroquinolonas em matrizes aquosas**. 2013. Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75135/tde-30072013-091333/>>. Acesso em: 2015-10-27.

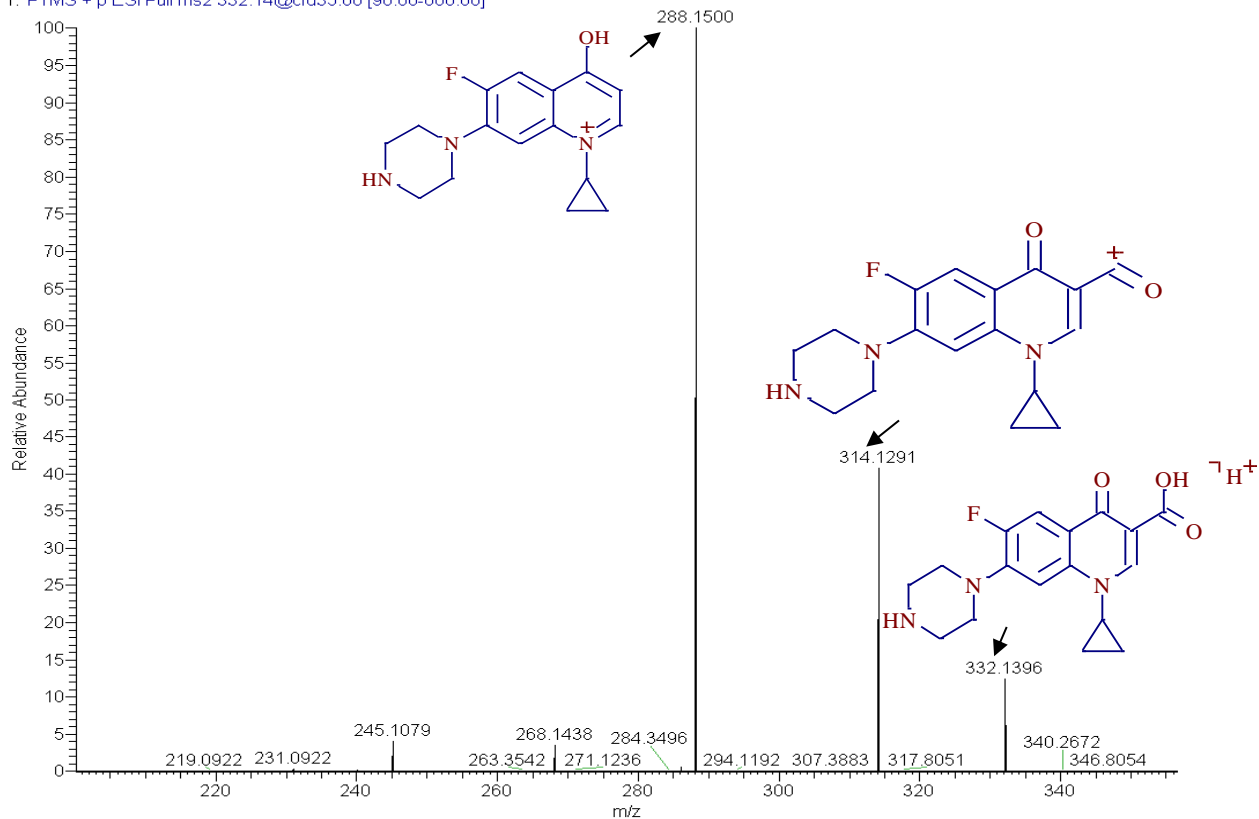
## ANEXO A - Espectros de MS e/ou MS/MS do ciprofloxacino e dos intermediários.

**Espectro 1-** Espectro de MS obtido em análises no LC-QqToF (ESI (+) MS) para o  $m/z$  263



**Espectro 2-** Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o  $m/z$  332 (Ciprofloxacino)

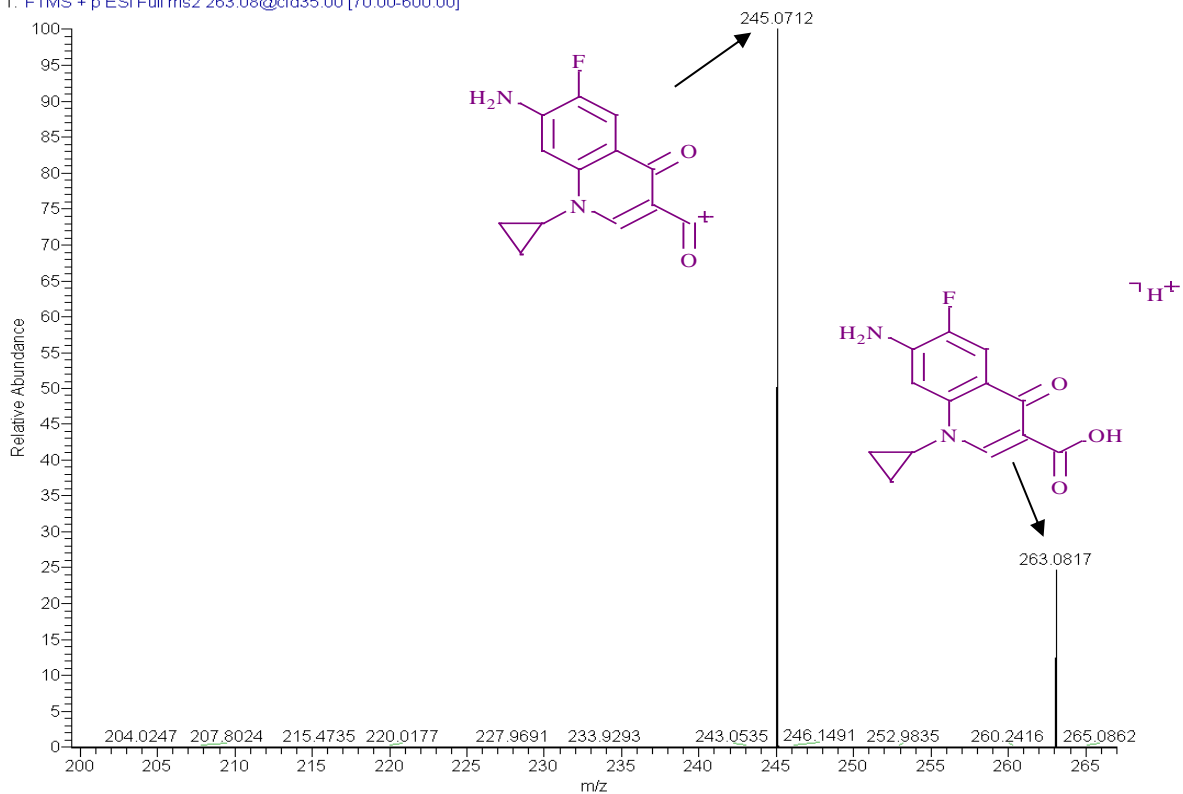
T: FTMS + p ESI Full ms2 332.14@cid35.00 [90.00-600.00]


 Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 2 ( $m/z$  332)

$m/z$ (calculado)	$m/z$ (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
332,1405	332,1396	$C_{17}H_{19}FN_3O_3^+$	-2,7
314,1299	314,1291	$C_{17}H_{17}FN_3O_2^+$	-2,5
288,1507	288,1500	$C_{16}H_{19}FN_3O^+$	-2,4

**Espectro 3**-Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT- Orbitrap para o  $m/z$  263

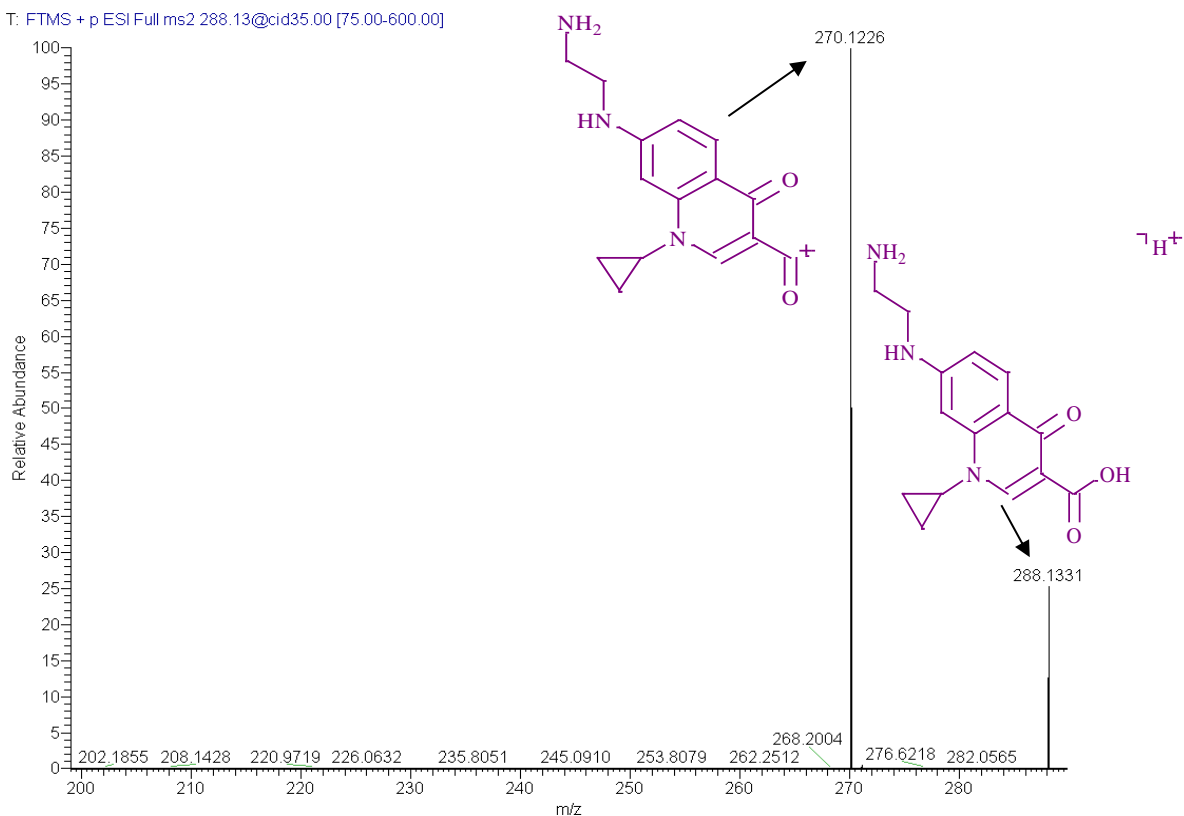
T: FTMS + p ESI Full ms2 263.08@cid35.00 [70.00-600.00]


 Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 3 ( $m/z$  263)

$m/z$ (calculado)	$m/z$ (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
263,0826	263,0817	$\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{FN}_2\text{O}_3^+$	-3,4
245,0721	245,0712	$\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{FN}_2\text{O}_2^+$	-3,7

**Espectro 4**-Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o  $m/z$  288

T: FTMS + p ESI Full ms2 288.13@cid35.00 [75.00-600.00]

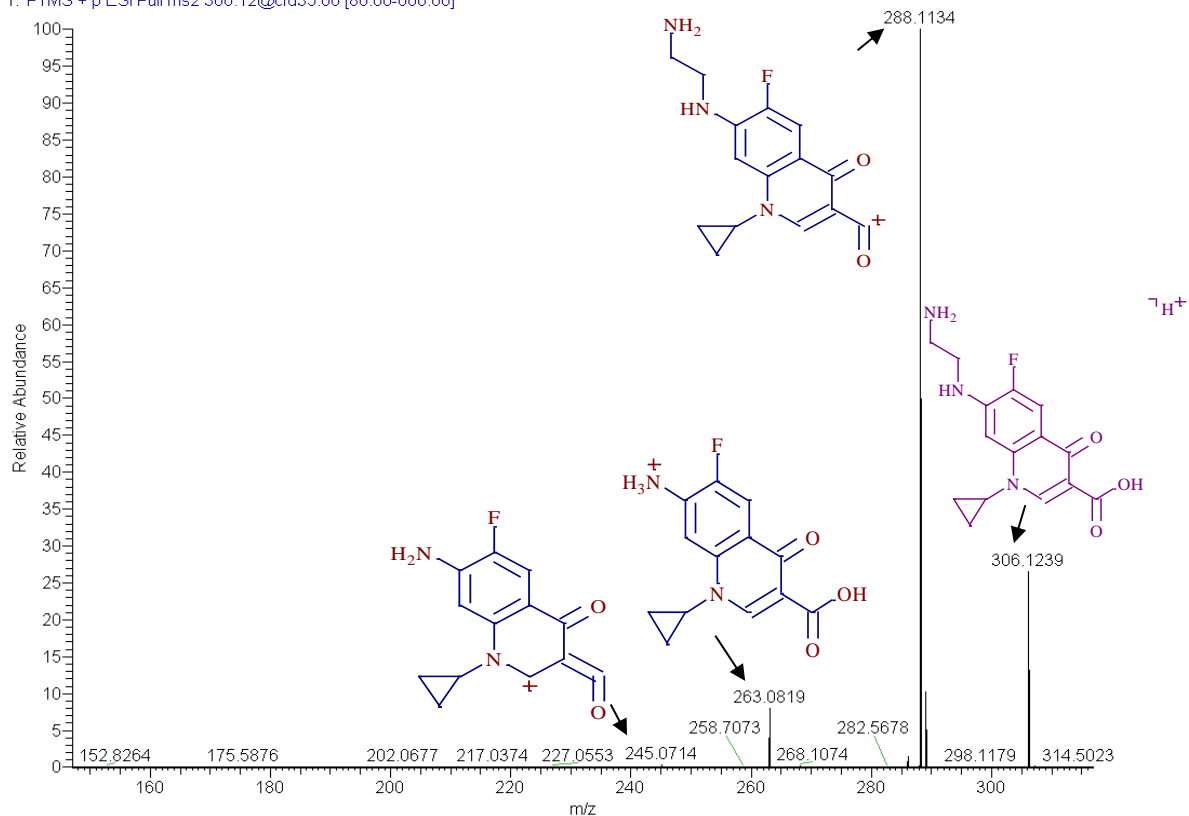

 Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 4 ( $m/z$  288)

$m/z$ (calculado)	$m/z$ (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
288,1343	288,1331	$C_{15}H_{18}N_3O_3^+$	-4,2
270,1237	270,1226	$C_{15}H_{16}N_3O_2^+$	-4,1



**Espectro 5-** Espectro de MS/MS obtido em análises no Orbitrap para o  $m/z$  306

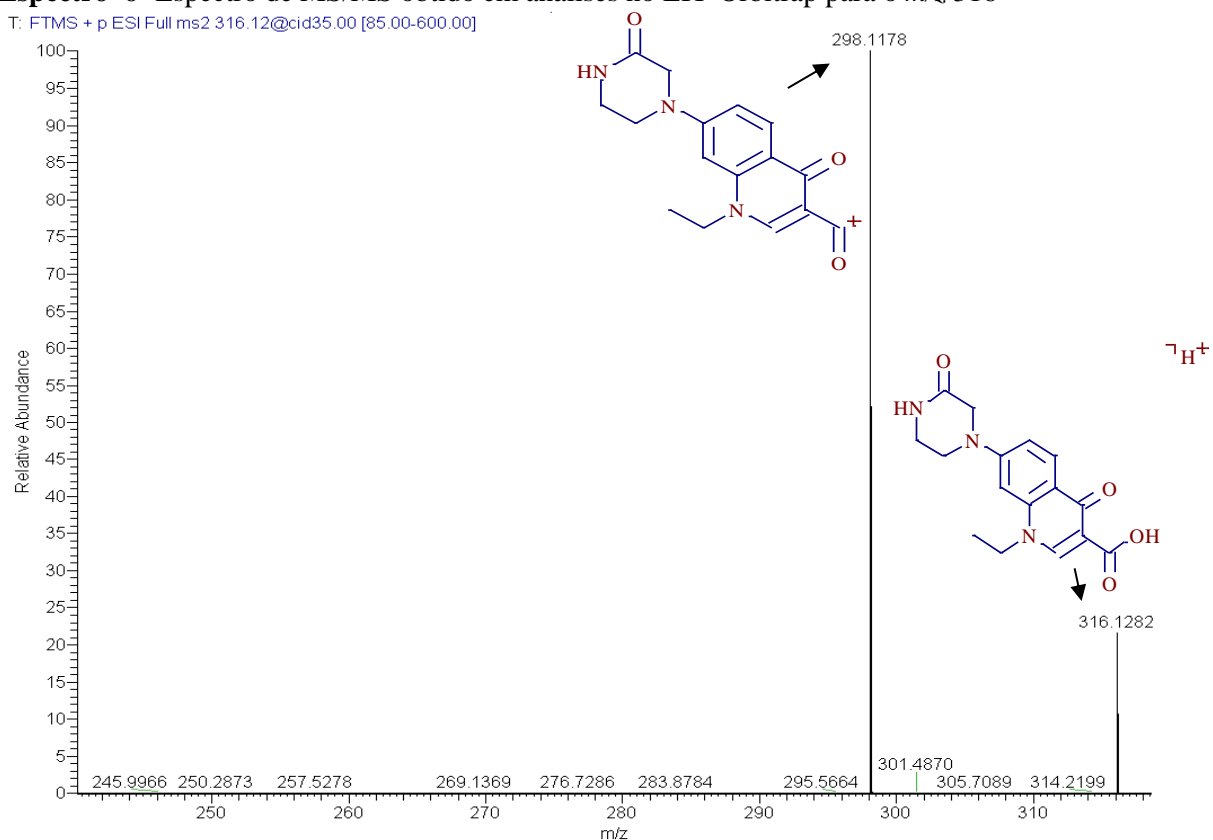
T: FTMS + p ESI Full ms2 306.12@cid35.00 [80.00-600.00]


 Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 5 ( $m/z$  306)

$m/z$ (calculado)	$m/z$ (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
306,1248	306,1239	$C_{15}H_{17}FN_3O_3^+$	-2,9
288,1143	288,1134	$C_{15}H_{15}FN_3O_2^+$	-3,1
263,0826	263,0819	$C_{13}H_{12}FN_2O_3^+$	-2,7
245,0721	245,0714	$C_{13}H_{10}FN_2O_2^+$	-2,9

**Espectro 6-** Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o  $m/z$  316

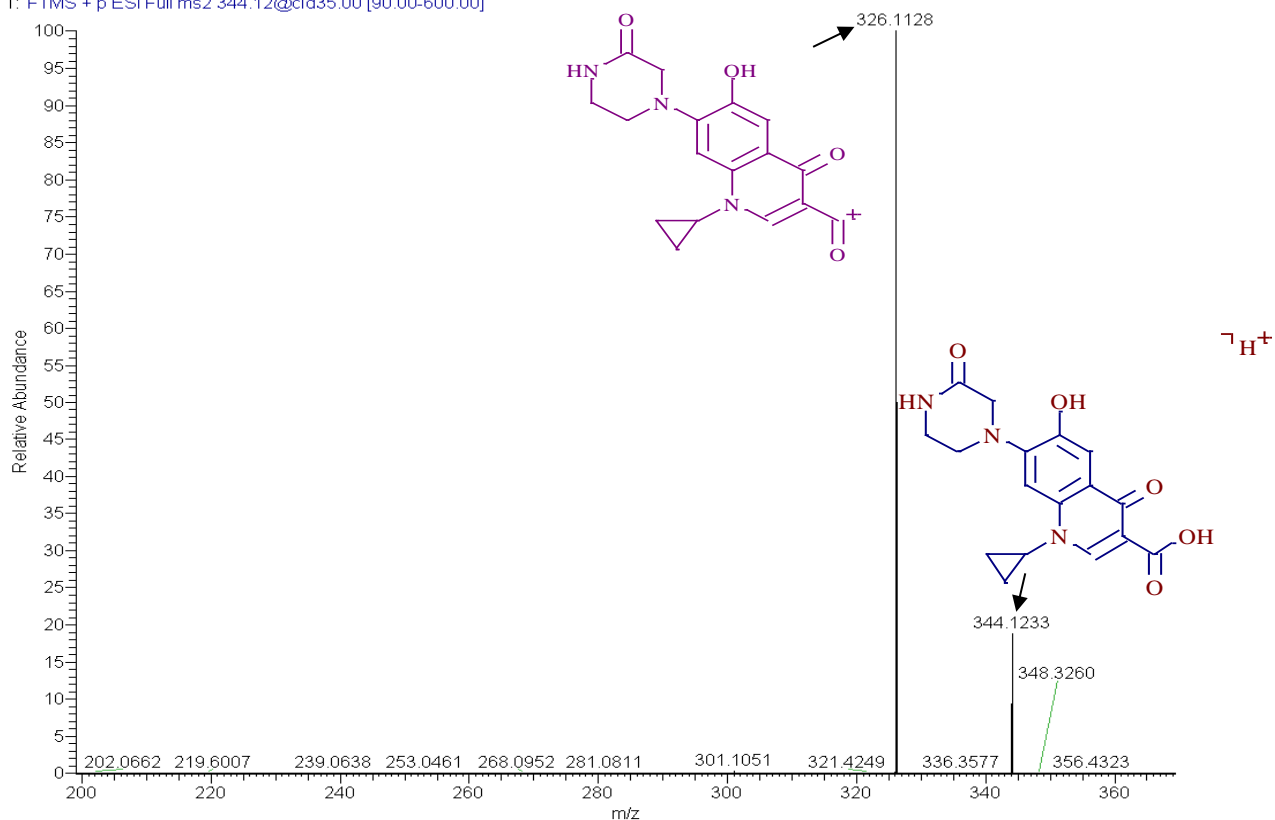
T: FTMS + p ESI Full ms2 316.12@cid35.00 [85.00-600.00]

Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 6 ( $m/z$  316)

$m/z$ (calculado)	$m/z$ (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
316,1292	316,1282	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_4^+$	-3,2
298,1186	298,1178	$\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_3^+$	-2,6

### Espectro 7- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o $m/z$ 344

T: FTMS + p ESI Full ms2 344.12@cid35.00 [90.00-600.00]

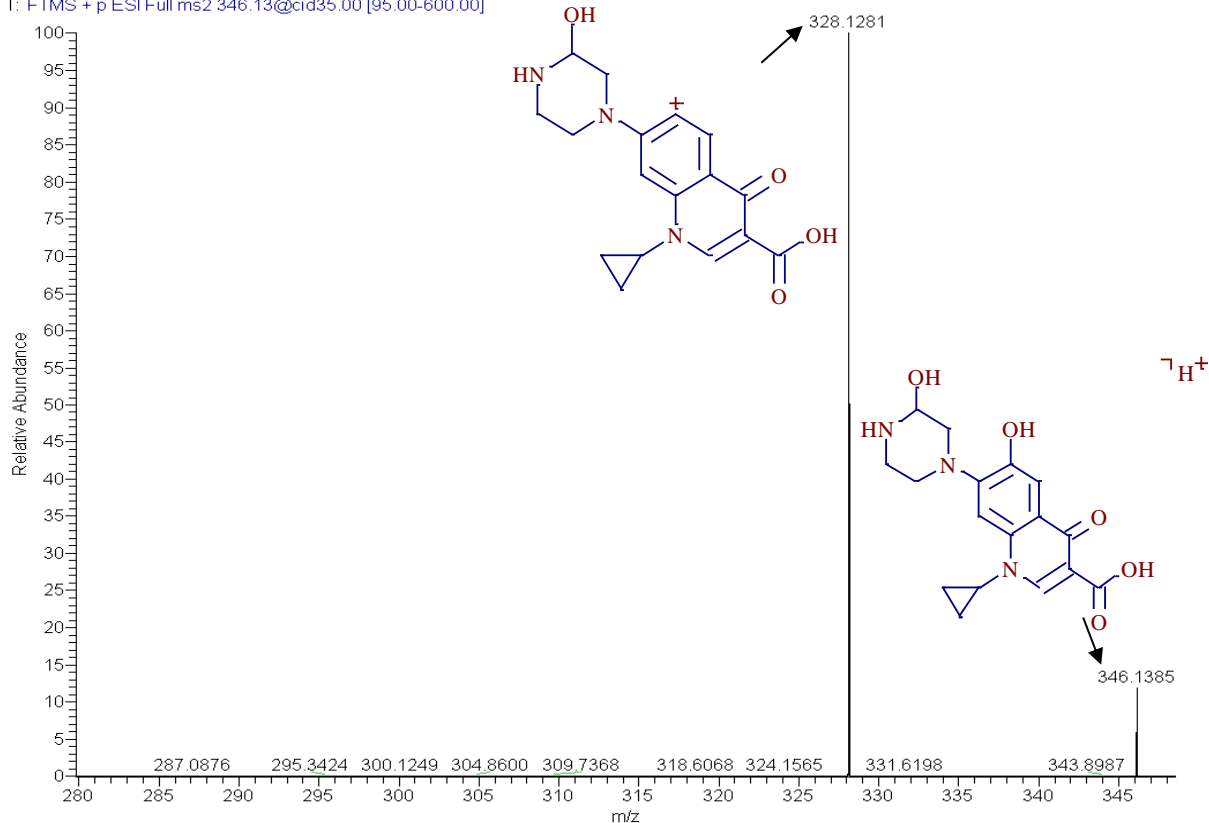


Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 7 ( $m/z$  344)

$m/z$ (calculado)	$m/z$ (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
344,1241	344,1233	$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_5^+$	-2,3
326,1135	326,1128	$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_4^+$	-2,1

### Espectro 8- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o $m/z$ 346

T: FTMS + p ESI Full ms2 346.13@cid35.00 [95.00-600.00]

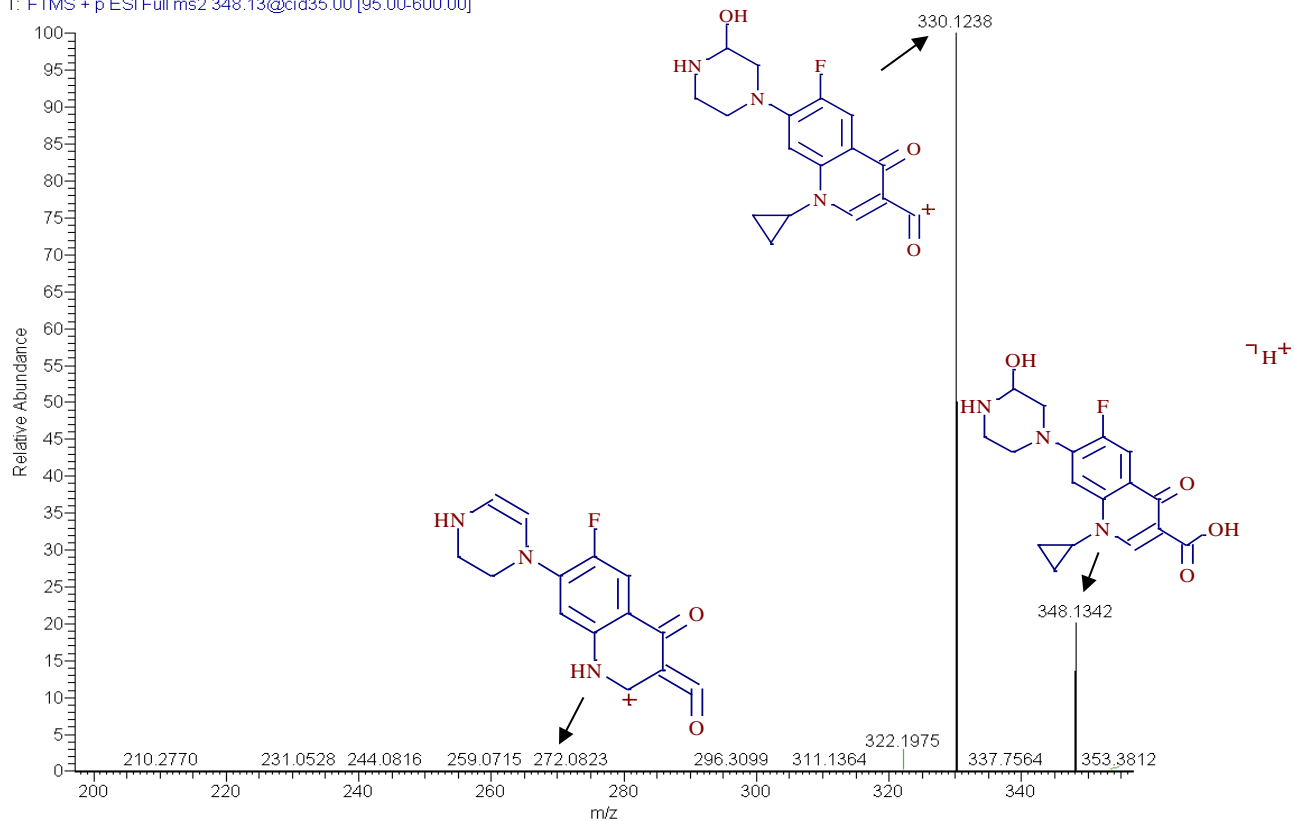


Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 8 ( $m/z$  346)

$m/z$ (calculado)	$m/z$ (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
346,1397	346,1385	$C_{17}H_{20}N_3O_5^+$	-3,5
328,1292	328,1281	$C_{17}H_{18}N_3O_4^+$	-3,4

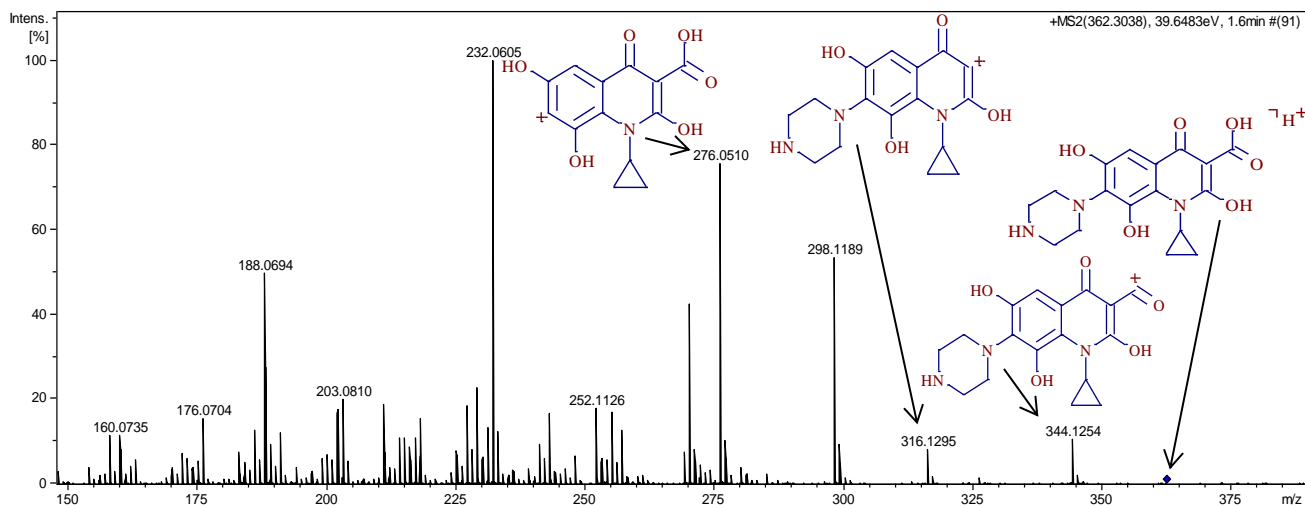
### Espectro 9- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o $m/z$ 348

T: FTMS + p ESI Full ms2 348.13@cid35.00 [95.00-600.00]



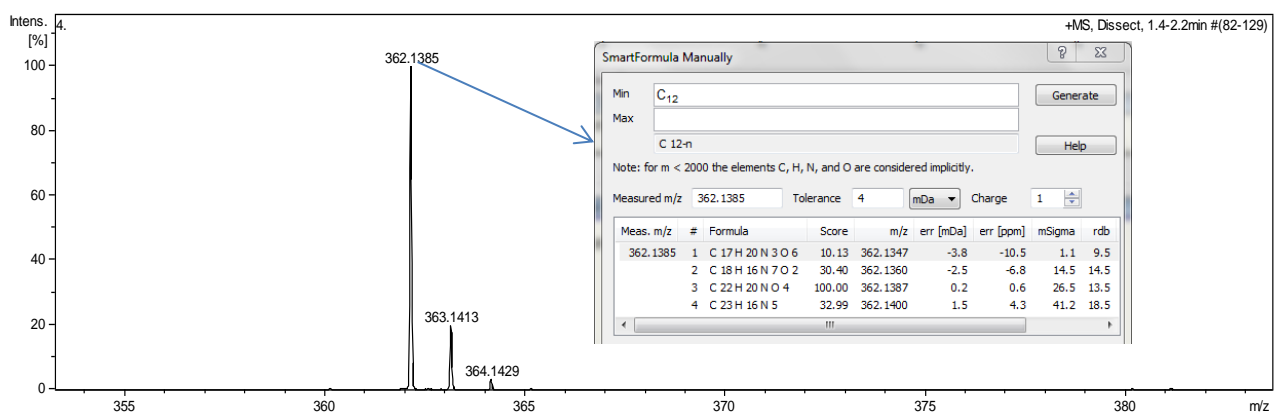
Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 9 ( $m/z$  348)

$m/z$ (calculado)	$m/z$ (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
348,1354	348,1342	$C_{17}H_{19}FN_3O_4^+$	-3,4
330,1248	330,1238	$C_{17}H_{17}FN_3O_3^+$	-3,0
272,0830	272,0823	$C_{14}H_{11}FN_3O_2^+$	-2,6

**Espectro 10-** Espectro de MS/MS obtido em análises no QqTOF para o  $m/z$  362


Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 10 ( $m/z$  362)

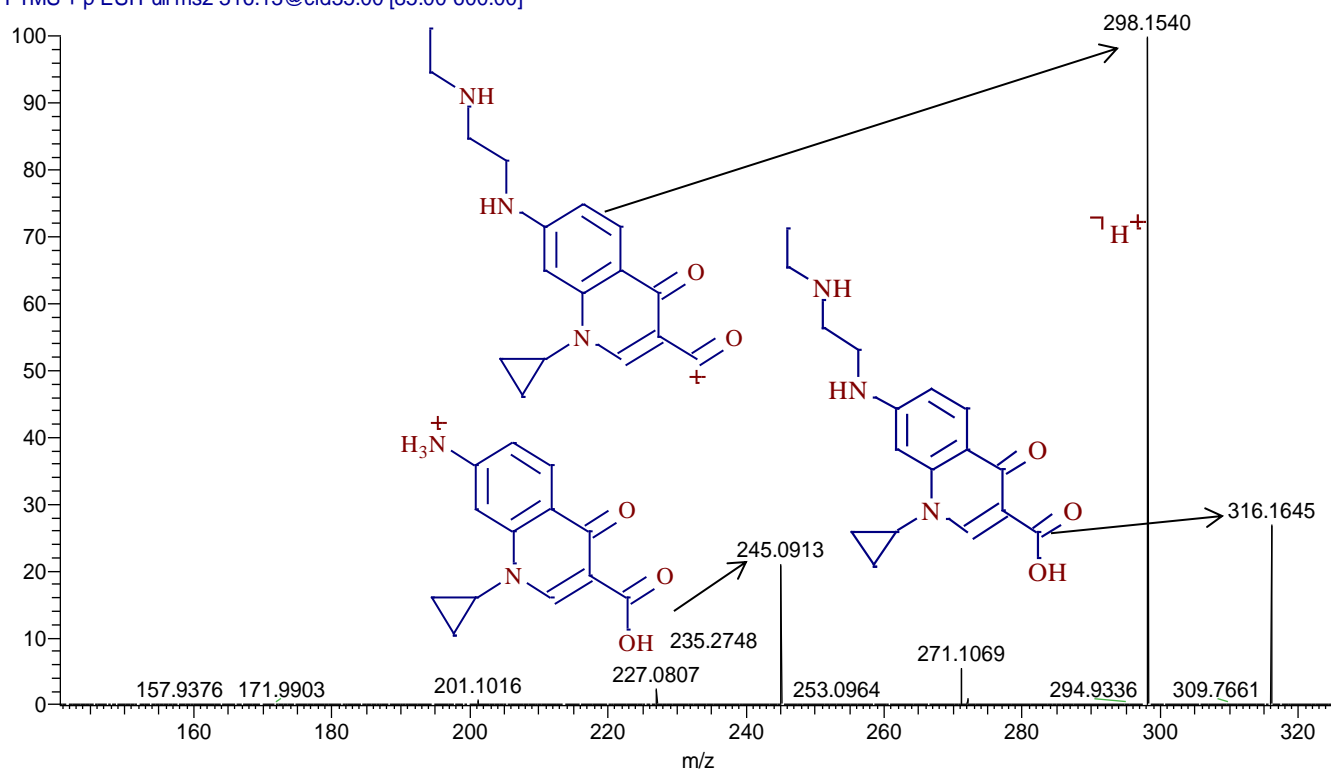
$m/z$ (calculado)	$m/z$ (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
362,1347	362,1385	$C_{17}H_{20}N_3O_6^+$	10,5
344,1241	344,1254	$C_{17}H_{18}N_3O_5^+$	3,8
316,1292	316,1295	$C_{16}H_{18}N_3O_4^+$	0,95
276,0503	276,0510	$C_{13}H_{10}NO_6^+$	2,5

**Espectro 11-** Espectro de MS obtido em análises no LC-QqToF (ESI (+) MS) para o  $m/z$  362


## ANEXO B - Espectros de MS e/ou MS/MS do enrofloxacinol e dos intermediários.

### Espectro 12- Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o $m/z$ 316

T: FTMS + p ESI Full ms2 316.13@cid35.00 [85.00-600.00]

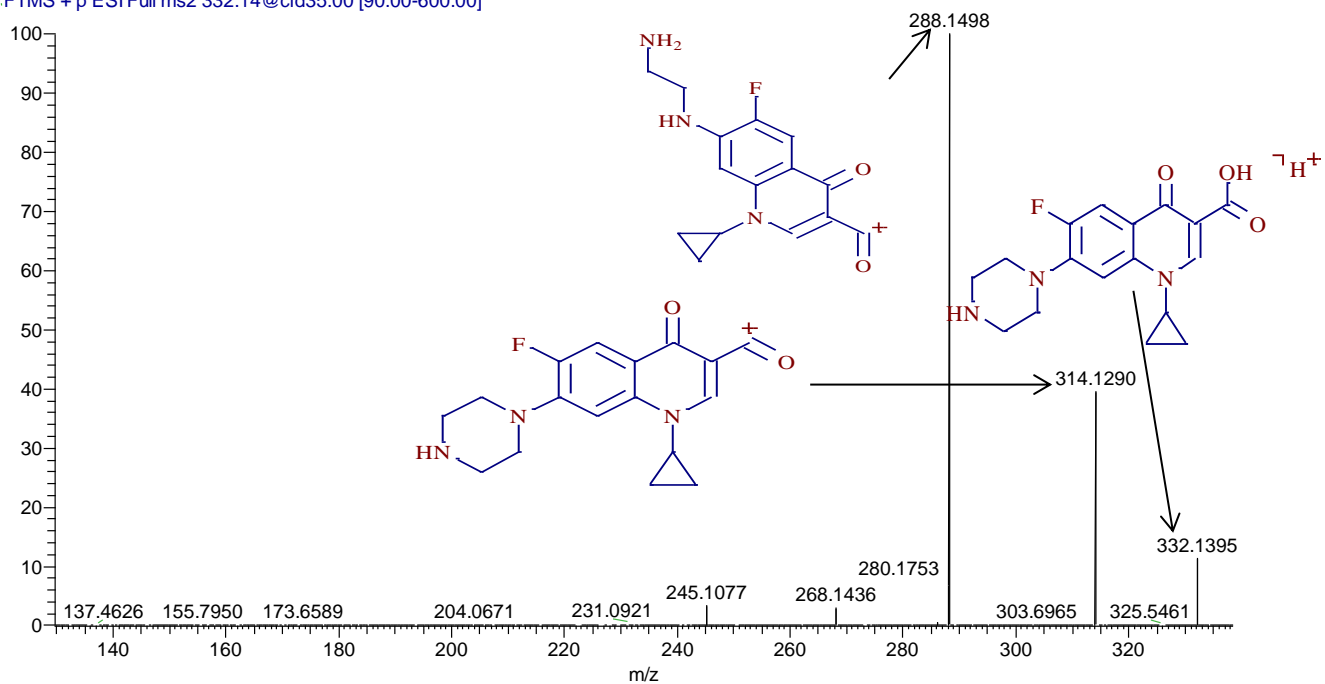


Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 12 ( $m/z$  316)

$m/z$ (calculado)	$m/z$ (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
316,1656	316,1645	$C_{17}H_{22}N_3O_3^+$	-3,5
298,1550	298,1540	$C_{17}H_{20}N_3O_2^+$	-3,4
245,0921	245,0913	$C_{13}H_{13}N_2O_3^+$	-3,3

**Espectro 13-** Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT- Orbitrap para o  $m/z$  332 (CIP)

T: FTMS + p ESI Full ms2 332.14@cid35.00 [90.00-600.00]

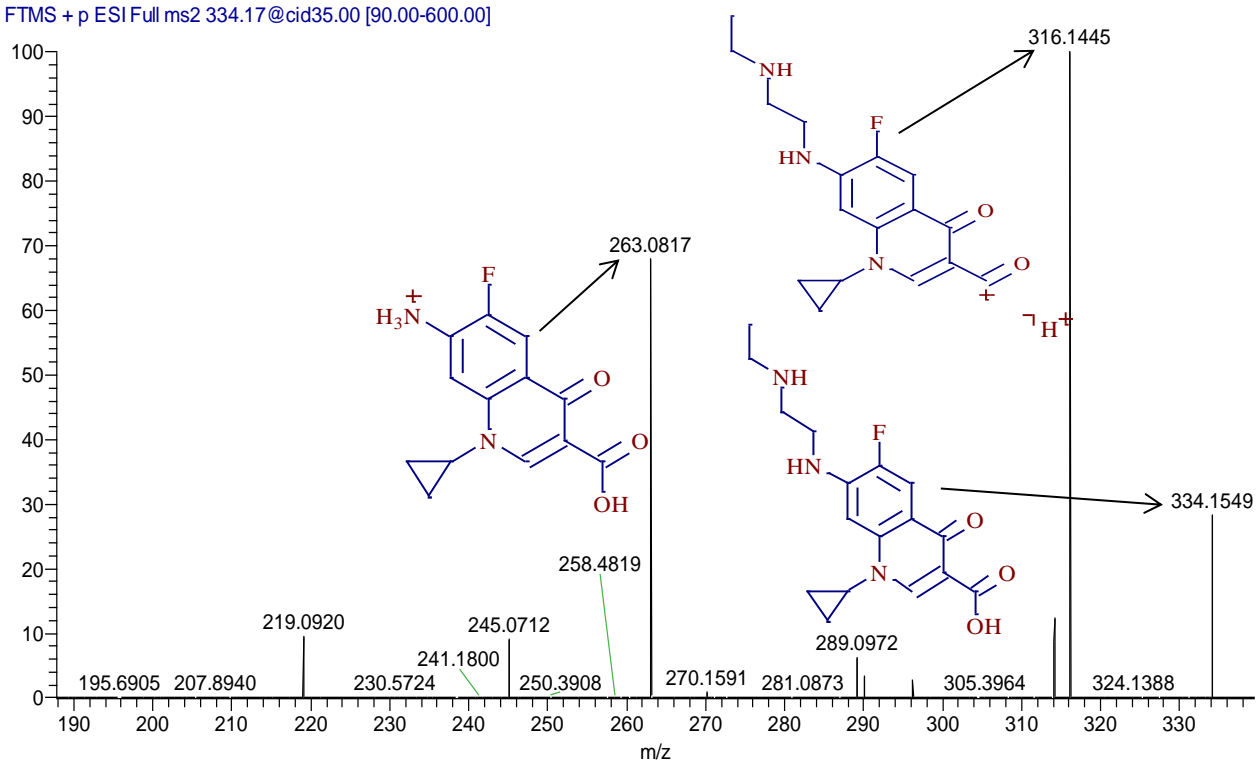

 Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 13 ( $m/z$  332)

$m/z$ (calculado)	$m/z$ (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
332,1405	332,1395	$C_{17}H_{19}FN_3O_3^+$	-3,0
314,1299	314,1290	$C_{17}H_{17}FN_3O_2^+$	-2,8
288,1507	288,1498	$C_{16}H_{19}FN_3O^+$	-3,1



**Espectro 14-** Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT- Orbitrap para o  $m/z$  334

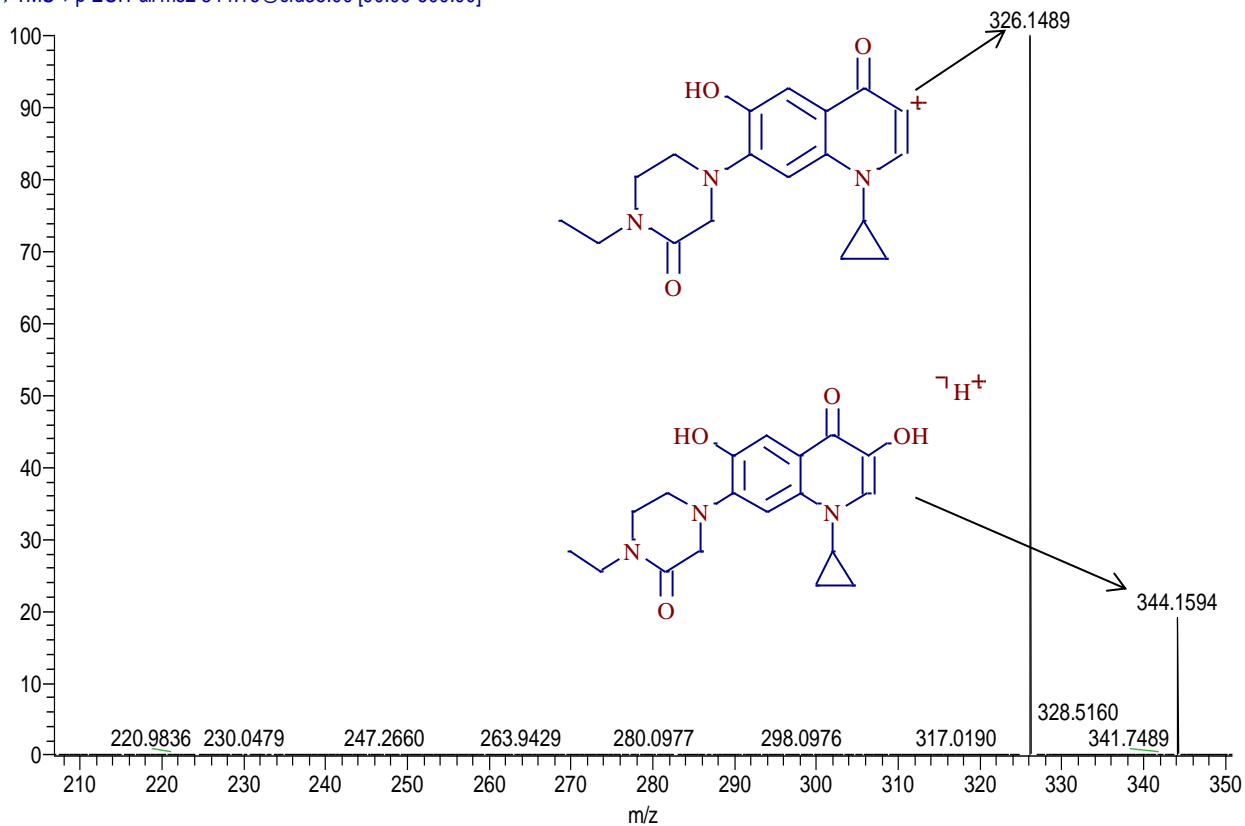
T: FTMS + p ESI Full ms2 334.17@cid35.00 [90.00-600.00]


 Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 14 ( $m/z$  334)

$m/z$ (calculado)	$m/z$ (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
334,1561	334,1549	$C_{17}H_{21}FN_3O_3^+$	-3,6
316,1456	316,1445	$C_{17}H_{19}FN_3O_2^+$	-3,5
263,0826	263,0817	$C_{13}H_{12}FN_2O_3^+$	-3,4

**Espectro 15-** Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o  $m/z$  344

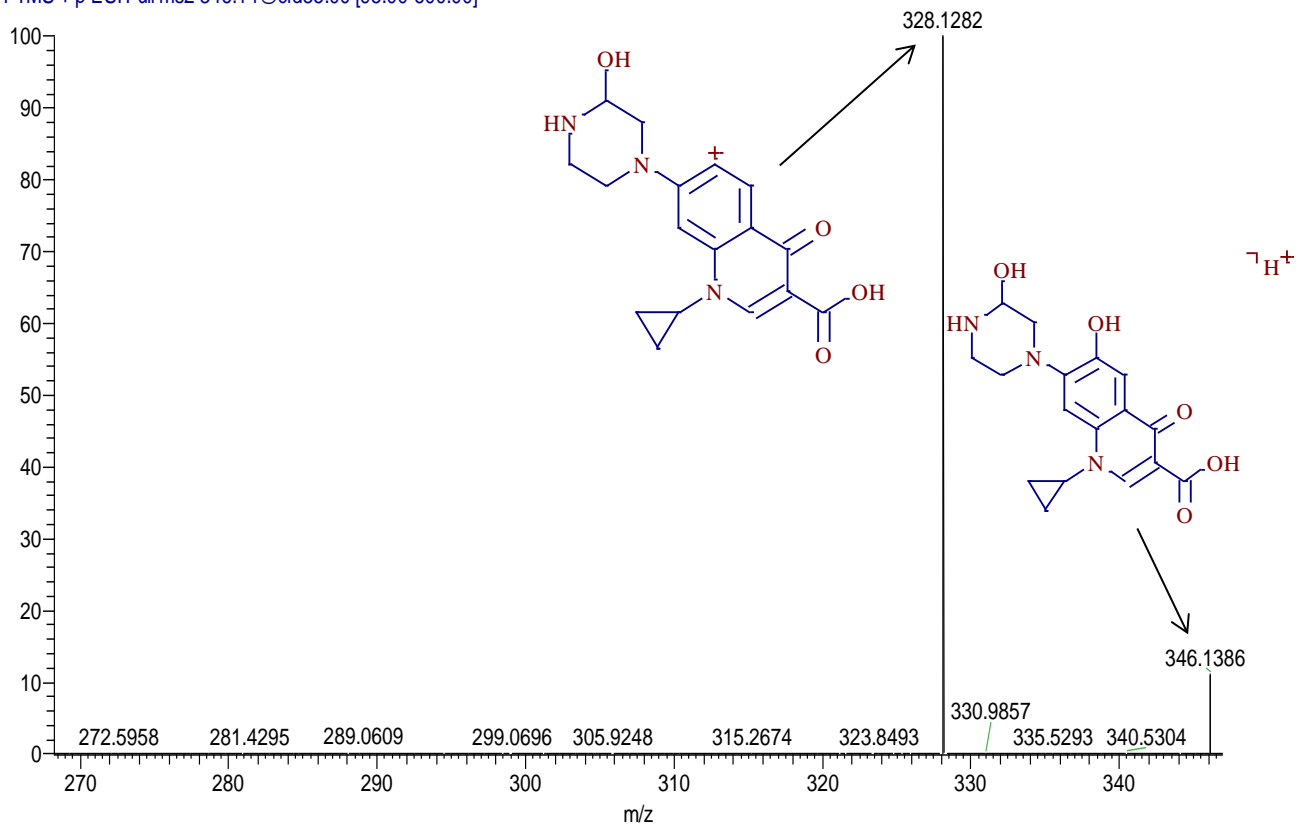
T: FTMS + p ESI Full ms2 344.16@cid35.00 [90.00-600.00]


 Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 15 ( $m/z$  344)

$m/z$ (calculado)	$m/z$ (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
344,1605	344,1594	$C_{18}H_{22}N_3O_4^+$	-3,2
326,1499	326,1489	$C_{18}H_{20}N_3O_3^+$	-3,1

**Espectro 16-** Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o  $m/z$  346

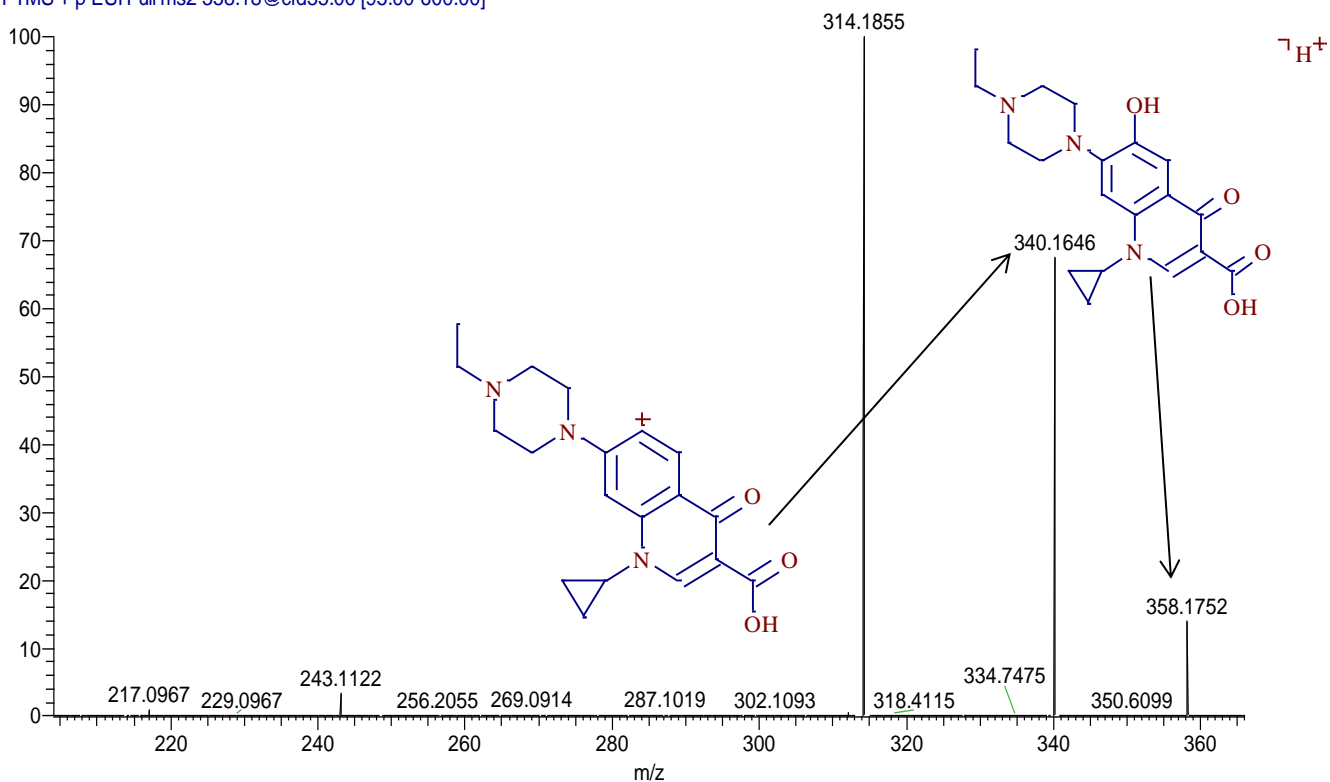
T: FTMS + p ESI Full ms2 346.14@cid35.00 [95.00-600.00]


 Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 16 ( $m/z$  346)

$m/z$ (calculado)	$m/z$ (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
346,1397	346,1386	$C_{17}H_{20}N_3O_5^+$	-3,2
328,1292	328,1282	$C_{17}H_{18}N_3O_4^+$	-3,0

**Espectro 17-** Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o  $m/z$  358

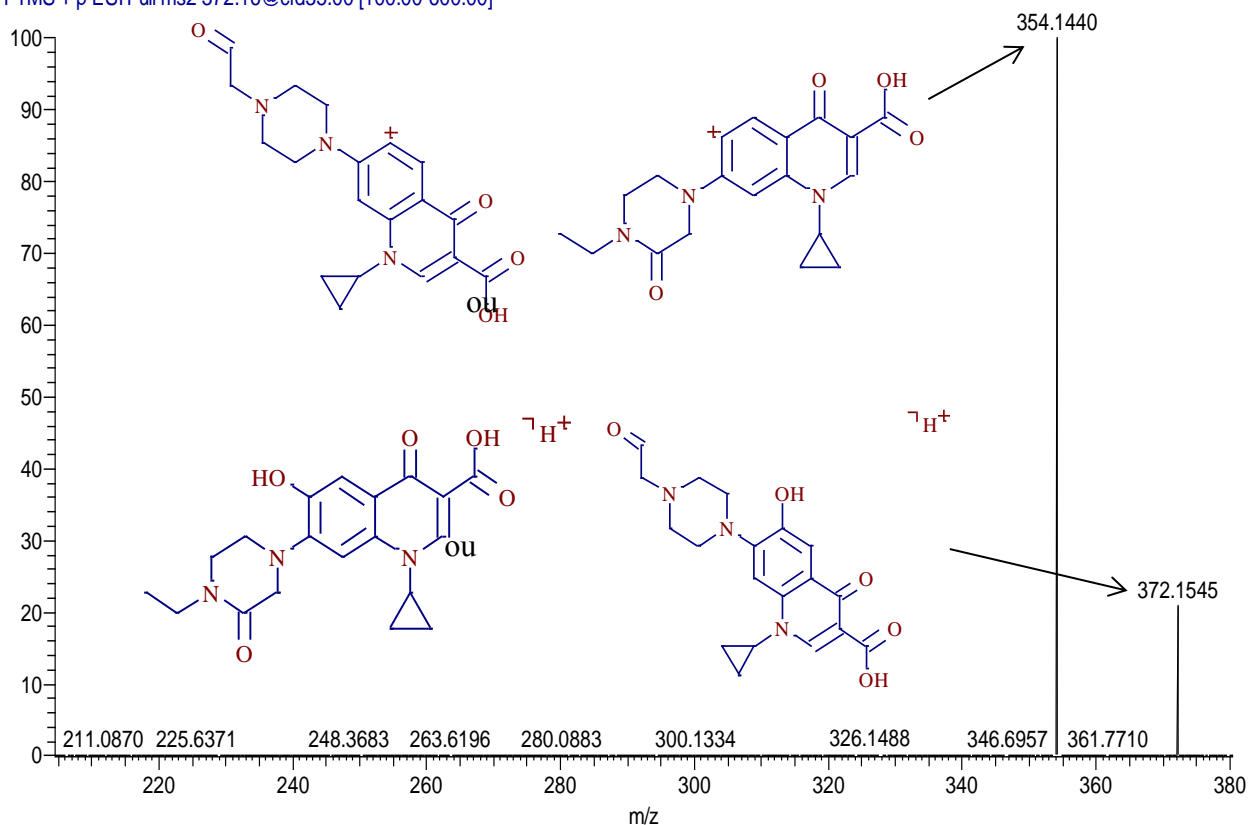
T: FTMS + p ESI Full ms2 358.18@cid35.00 [95.00-600.00]


 Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 17 ( $m/z$  358)

$m/z$ (calculado)	$m/z$ (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
358,1761	358,1752	$C_{19}H_{24}N_3O_4^+$	-2,5
340,1656	340,1646	$C_{19}H_{22}N_3O_3^+$	-2,9

**Espectro 18-** Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o  $m/z$  372

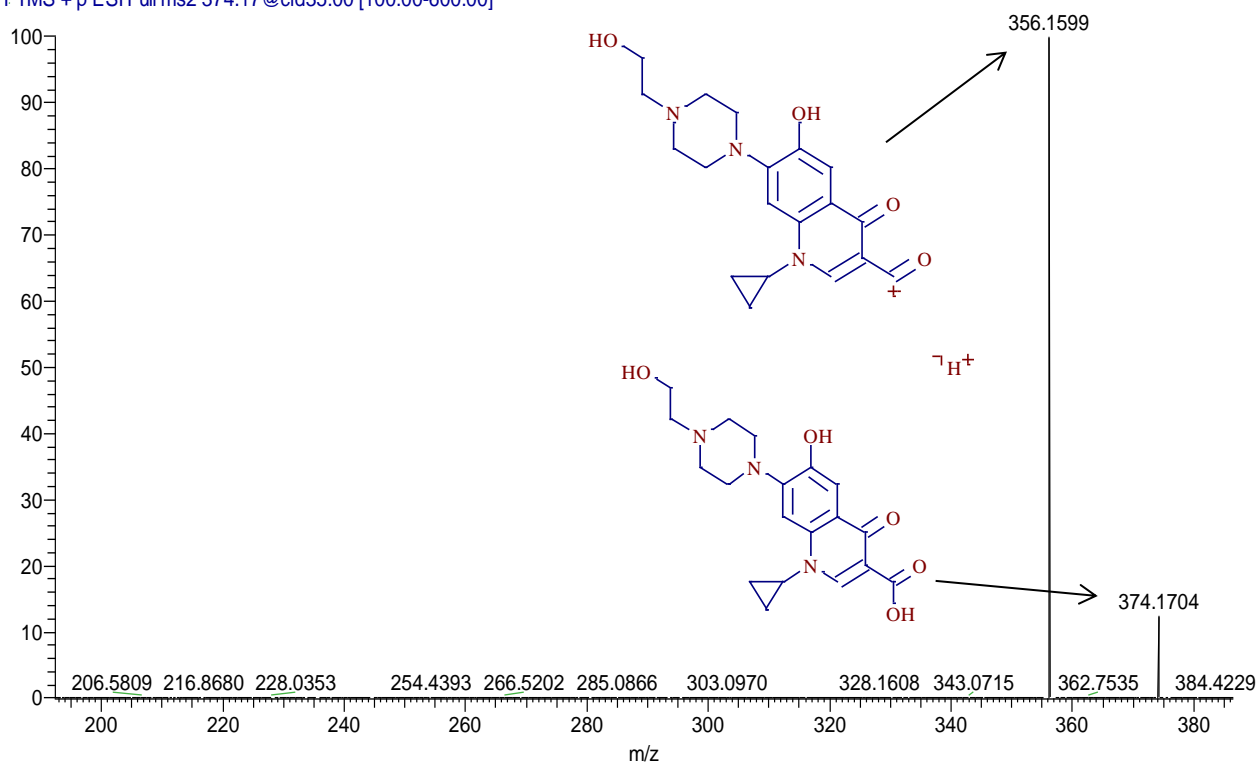
T: FTMS + p ESI Full ms2 372.16@cid35.00 [100.00-600.00]

Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 18 ( $m/z$  372)

$m/z$ (calculado)	$m/z$ (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
372,1554	372,1545	$\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_5^+$	-2,4
354,1448	354,1440	$\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_4^+$	-2,3

**Espectro 19-** Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o  $m/z$  374

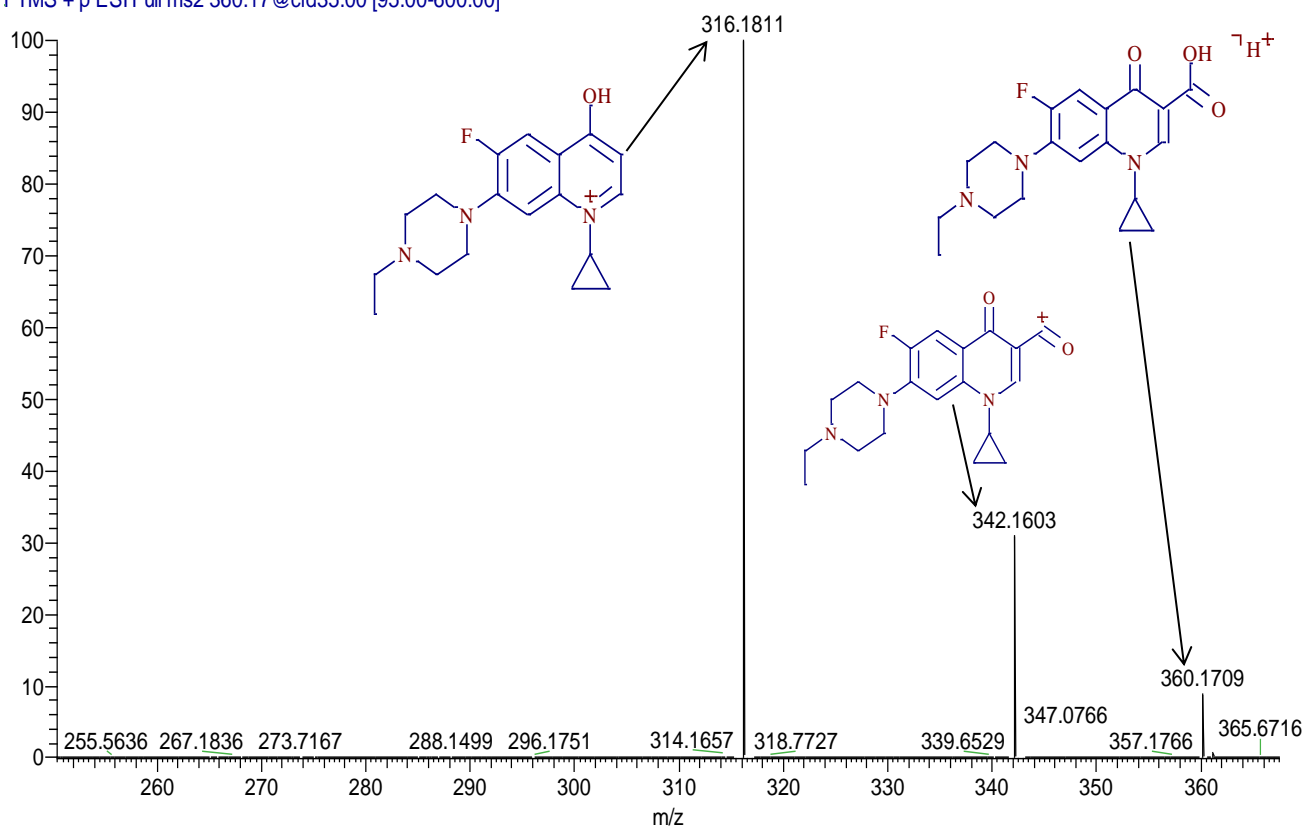
T: FTMS + p ESI Full ms2 374.17@cid35.00 [100.00-600.00]

Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 19 ( $m/z$  374)

$m/z$ (calculado)	$m/z$ (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
374,1710	374,1704	$C_{19}H_{24}N_3O_5^+$	-1,6
356,1605	356,1599	$C_{19}H_{22}N_3O_4^+$	-1,7

**Espectro 20-** Espectro de MS/MS obtido em análises no LIT-Orbitrap para o  $m/z$  360 (Enrofloxacino)

T: FTMS + p ESI Full ms2 360.17@cid35.00 [95.00-600.00]



Cálculo do erro atribuído a cada estrutura proposta para o espectro 20 ( $m/z$  360)

$m/z$ (calculado)	$m/z$ (medido)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)
360,1718	360,1709	$C_{19}H_{23}FN_3O_3^+$	-2,5
342,1612	342,1603	$C_{19}H_{21}FN_3O_2^+$	-2,6
316,1820	316,1811	$C_{18}H_{23}FN_3O^+$	-2,8