



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Diana Maria Lourenço Marques

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS
CATALÍTICOS OXIDATIVOS EM QUÍMICA DE
FLUXO CONTÍNUO PARA DEGRADAÇÃO DE
FÁRMACOS**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química, com área de especialização em Química Avançada e Industrial orientada pelo Professor Doutor Mário José Ferreira Calvete e co-orientada pelo Doutor Fábio Manuel Santos Rodrigues e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2022

Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS CATALÍTICOS OXIDATIVOS EM QUÍMICA DE FLUXO CONTÍNUO PARA DEGRADAÇÃO DE FÁRMACOS

Diana Maria Lourenço Marques

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química, com área de especialização em Química Avançada e Industrial orientada pelo Professor Doutor Mário José Ferreira Calvete e co-orientada pelo Doutor Fábio Manuel Santos Rodrigues e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Agradecimentos

Desde o meu ingresso no ensino superior, em 2016, deparei-me com vários desafios e obstáculos. No entanto, foram anos de crescimento, aprendizagem e desenvolvimento não só a nível académico, mas também pessoal. Ao longo deste percurso, várias foram as pessoas que me acompanharam e contribuíram para o meu sucesso e que permitiram que eu conseguisse chegar a este momento.

Em primeiro lugar, agradeço à Professora Doutora Mariette Pereira pela oportunidade de pertencer ao Grupo de Catálise e Química Fina durante o estágio de licenciatura e agora de mestrado. Agradeço toda a sua disponibilidade, orientação e conhecimentos científicos que me foi transmitindo ao longo destes anos.

Ao Doutor Mário Calvete, meu orientador, queria expressar a minha gratidão pela enorme ajuda ao longo da realização deste trabalho e pela permanente disponibilidade e orientação. Agradeço a enorme paciência que teve comigo ao longo deste ano na discussão de vários assuntos.

Ao meu co-orientador, o Doutor Fábio Rodrigues, gostaria de agradecer toda a orientação, apoio e conhecimento científico, principalmente na área da química de fluxo contínuo. Agradeço a tua incansável paciência e disponibilidade para o esclarecimento das minhas inúmeras questões e dúvidas e por fomentares o meu espírito crítico, dando-me ferramentas para solucionar vários problemas. Obrigada por todo apoio, companheirismo, palavras de ânimo e por teres acreditado sempre em mim e nas minhas capacidades.

À Professora Doutora Ermelinda Eusébio agradeço a disponibilidade na utilização dos equipamentos do grupo Termodinâmica e Química do Estado Sólido e à Professora Doutora Teresa Roseiro pela colaboração e disponibilidade na obtenção das análises termogravimétricas. Ao Professor Doutor Sérgio Seixas de Melo e à Carla Cunha agradeço a disponibilidade em fornecer a água Milli-Q dispensada ao longo deste ano imprescindível nas análises de HPLC.

A todos os funcionários do Departamento de Química da FCTUC, deixo aqui uma palavra de agradecimento, em especial ao Sr. Jorge, à D^a Lurdes e ao Sr. António Manuel pelo incansável esforço na manutenção de equipamentos e pela boa disposição.

Agradeço ao Instituto Português de Oncologia de Coimbra pela colaboração e autorização de recolha da amostra de água residual nas suas instalações que viabilizou este projeto. Um especial agradecimento ao Engenheiro Victor Neto Vaz por toda a disponibilidade e acompanhamento prestado.

A todos os meus colegas do Grupo de Catálise e Química Fina agradeço todo o companheirismo, convívio diário, bons momentos, ensinamentos e toda a ajuda prestada: Sara Pinto, Rui Carrilho, Rafael Aroso, Giusi Piccirillo, Andreia Gonzalez, Zoé Arnaut, Alexandre Felgueiras, Daniela Teixeira, Iúri Tavares, Madalena Silva, Vitaliy Masliy, Carolina Domingos, Inês Cruz, Carolina Neto e Yaroslav Hryhoryev. Gostaria de dar uma palavra de agradecimento especial a alguns amigos e colegas que me acompanharam ao longo desta jornada.

À Giusi, a minha querida tutora, um grande obrigado por todo o apoio, disponibilidade, amparo, amizade e conhecimentos transmitido. Foste o meu grande apoio, tendo acreditado sempre em mim e nas minhas capacidades mesmo quando eu própria não acreditava. Com o teu incentivo e palavras de coragem, nunca me deixaste desistir fazendo-me acreditar que tudo tinha uma solução. Sempre estiveste presente e pronta para me ajudar mesmo quando era demasiado “piquinha” e sempre esclareceste todas as minhas questões por mais estranhas que fossem.

À Daniela, a minha companheira de laboratório, gostaria de agradecer a amizade, companhia e as nossas longas conversas e desabafos. Obrigada por ficares sempre à minha espera para irmos para casa mesmo quando dizia que estava pronta para ir em 10 minutos quando na realidade demorava o dobro do tempo.

À Carolina Domingos, a minha pupila preferida do laboratório, que, por seres tão stressada quanto eu, consegues facilmente compreender os meus momentos de pânico e por isso agradeço todas as nossas conversas e palavras de incentivo que culminavam com risadas, boa disposição e alma mais leve.

Ao Rafael, o “deus” do nosso laboratório, um enorme obrigada por toda a tua ajuda, partilha de conhecimentos, risadas e boa disposição. Obrigada por teres sempre uma solução para aqueles meus problemas que vão surgindo no dia-a-dia no laboratório.

Às minhas queridas amigas, Babi, Maria, Catarina, Sophie e Gabi, pelo constante apoio, amizade e pelos bons momentos que até agora partilhámos e que iremos continuar a partilhar.

A toda a minha família, em especial aos meus pais, pelo apoio incondicional ao longo da minha vida, por acreditarem sempre em mim e por me incentivarem e ajudarem a seguir sempre os meus sonhos. A pessoa que sou hoje e da qual me orgulho deve-se a vocês. À minha irmã, agradeço toda a paciência e a companhia, na partilha de vivências diárias. À minha segunda família e amigos da Mealhada e Luso, que sempre se preocuparam comigo e estiveram dispostos a ouvir-me falar sobre o meu dia-a-dia no laboratório, apesar de não perceberem nada de química.

Por último, mas não menos importante, um especial agradecimento ao meu querido Zé Pedro, por seres sempre o meu porto de abrigo, por celebrares as minhas vitórias e conquistas quase tanto quanto eu e pelo apoio incondicional ao longo destes 6 anos.

Um obrigado gigante a todos vós.

Índice

Índice	i
Abreviaturas e Siglas	iii
Resumo	vii
Abstract	ix
Nomenclatura	xi
Capítulo 1 – Introdução	1
1.1. Antibióticos: benefícios e consequências da utilização	1
1.1.1. Consumo de antibióticos na medicina humana e veterinária	4
1.1.2. Consumo de antibióticos em Portugal e consequências	4
1.1.3. Presença de antibióticos nos ambientes aquáticos	8
1.2. Abordagens para a remoção de antibióticos das águas residuais	9
1.2.1. Processos Avançados de Oxidação no tratamento de águas	10
1.3. Metaloporfirinas como catalisadores na degradação oxidativa de antibióticos	11
1.4. Química de fluxo contínuo como aproximação no tratamento de águas em grande escala	20
1.5. Objetivos	24
1.6. Referências	26
Capítulo 2 – Síntese e caracterização estrutural de catalisadores metaloporfirinas	37
2.1. Síntese de porfirinas	38
2.2. Síntese e caracterização do catalisador metaloporfirina	40
2.3. Preparação e caracterização da metaloporfirina imobilizada num suporte inorgânico	41
2.4. Referências	48
Capítulo 3 – Degradação oxidativa de antibióticos	51
3.1. Análise e seleção do antibiótico alvo	51
3.2. Degradação oxidativa de Trimetoprim em condições <i>batch</i>	53

3.3. Degradação oxidativa homogénea de TMP em fluxo contínuo	56
3.4. Degradação oxidativa heterogénea de TMP em fluxo contínuo	62
3.5. Referências	70
Capítulo 4 – Conclusão	71
Capítulo 5 – Experimental	75
5.1. Reagentes e solventes	75
5.2. Técnicas e instrumentação	75
5.3. Síntese dos compostos e procedimentos referentes ao Capítulo 2	79
5.3.1. Síntese do catalisador homogéneo (CAT 1)	79
5.3.2. Síntese do catalisador heterogéneo (CAT 2)	82
5.4. Procedimentos referentes ao Capítulo 3	84
5.4.1. Degradação de TMP em condições <i>batch</i>	84
5.4.2. Degradação de TMP em fluxo contínuo	85
5.5. Referências	88
Anexo 1	89

Abreviaturas e Siglas

ϵ	Coeficiente de absorvidade molar
λ_{abs}	Comprimento de onda de absorção
δ	Desvio químico
$[M+H]^+$	Íon molecular protonado
A	Absorvância
ACN	Acetonitrilo
AMR	Resistência antimicrobiana (do inglês, <i>Antimicrobial resistance</i>)
AOPs	Processos Avançados de Oxidação (do inglês, <i>Advanced Oxidation Processes</i>)
APIs	Ingrediente farmacêutico ativo (do inglês, <i>Active Pharmaceutical Ingredient</i>)
c	Concentração
CAT	Catalisador
CIP	Ciprofloxacina
d	Dupleto
DDDs	Doses diárias definidas
DCM	Diclorometano
di	Diâmetro interno
ESBL	β -lactamas de amplo espectro (do inglês, <i>Extended Spectrum Beta-Lactamase</i>)
ESI	Ionização por <i>electrospray</i> (do inglês, <i>Electrospray Ionization</i>)
ETARs	Estações de tratamento de águas residuais
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HRMS	Espectrometria de massa de alta resolução (do inglês, <i>High-resolution mass spectrometry</i>)
ICP - OES	Espectrometria de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente (do inglês, <i>Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry</i>)
IUPAC	União Internacional da Química Pura e Aplicada (do inglês, <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
KPMS	Peroximonossulfato de potássio

LCMS-DI	Cromatografia líquida com espectrometria de massa – injeção direta (do inglês, <i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry - Direct Injection</i>)
LEV	Levofloxacina
m	Multiplete
m-CPBA	Ácido <i>m</i> -cloroperoxibenzoico (do inglês, <i>meta-Chloroperoxybenzoic acid</i>)
MnTDCPPSO ₃ H	Acetato de 5,10,15,20-tetraquis(2,6-dicloro-3(5)-sulfofenil)porfirina de manganês (III)
MOF	Estrutura orgânica metálica (do inglês, <i>Metal Organic Framework</i>)
MPs	Metaloporfirinas
MP	Metaloporfirina
n.d.	Não definido
NOR	Norfloxacina
nZVI	Nanopartículas de ferro de valência zero (do inglês, <i>zero-valent iron nanoparticles</i>)
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PMS	Peroximonossulfato
PVD	Deposição física de vapor (do inglês, <i>Physical Vapor Deposition</i>)
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de próton
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês, <i>Reactive Oxygen Species</i>)
rpm	Rotações por minuto (do inglês, <i>Revolutions Per Minute</i>)
R _v	Razão volumétrica
s	Singuleto
SA	Sulfacetamida
SEM	Microscopia eletrônica de varrimento (do inglês, <i>Scanning electron microscope</i>)
SMT	Sulfametazina
SMX	Sulfametoxazol
ST	Solução de trabalho
STZ	Sulfatiazol

TDCPP	5,10,15,20-tetra(2,6-diclorofenil)porfirina
TDCPPSO ₂ Cl	5,10,15,20-tetra(2,6-dicloro-3-clorossulfofenil)porfirina
TDCPPSO ₃ H	5,10,15,20-tetra(2,6-dicloro-3-sulfofenil)porfirina
TLC	Cromatografia de camada fina (do inglês, <i>Thin Layer Chromatography</i>)
TMS	Tetrametilsilano
TMP	Trimetoprim
TOC	Carbono orgânico total (do inglês, <i>Total Organic Carbon</i>)
TOF	Tempo de voo (do inglês, <i>Time of flight</i>)
t _R	Tempo de residência
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

Resumo

Face ao aumento do consumo de antibióticos tanto na medicina humana como veterinária, têm-se observado a presença de quantidades significativas destes fármacos em ambientes aquáticos. Como consequência desta persistência no ambiente, têm surgido bactérias resistentes aos antibióticos, pelo que o desenvolvimento de métodos aplicados à degradação de antibióticos presentes em águas residuais torna-se um tópico de enorme importância no combate à resistência antimicrobiana. A utilização de metaloporfirinas aplicadas à degradação oxidativa de antibióticos tem demonstrado resultados promissores na resolução deste problema. No entanto, a implementação destes sistemas em *batch* torna-se impraticável numa situação de mundo real. Como resposta a esta limitação, o uso de processos em fluxo contínuo aliado à utilização de metaloporfirinas como catalisadores na degradação oxidativa de antibióticos na presença de H₂O₂, apresenta elevado potencial no que diz respeito à transposição de uma escala laboratorial para aplicação no tratamento de águas residuais hospitalares.

No Capítulo 1 são abordados dados e factos relevantes associados ao consumo de antibióticos e aparecimento de bactérias resistentes no mundo e em particular, em Portugal. Seguidamente, é apresentada uma revisão crítica da literatura focada na utilização de metaloporfirinas aplicadas à degradação oxidativa de antibióticos. Discute-se, também, a utilização de fluxo contínuo como uma aproximação mais adequada ao mundo real no tratamento de águas residuais, por exemplo, hospitalares.

No Capítulo 2 descreve-se a síntese de uma porfirina *meso*-tetrasubstituída com grupos volumosos 2,6-diclorofenilo, através de duas vias sintéticas para a obtenção dos catalisadores para aplicação na degradação de antibióticos. Inicialmente, procedeu-se à síntese de uma metaloporfirina solúvel em água, através da clorossulfonação da respetiva porfirina, seguida de uma reação de hidrólise e consequente complexação de forma a obter uma metaloporfirina passível de ser aplicada em reações de oxidação homogéneas, em meio aquoso. Para a obtenção do catalisador heterogéneo, realizou-se de igual modo a clorossulfonação da mesma porfirina halogenada de partida, seguida de uma reação nucleofílica com sílica funcionalizada com grupos 3-aminopropilo utilizada como suporte inorgânico. Através de análise termogravimétrica obteve-se uma

quantidade de $3,4 \times 10^{-5}$ mol de parte orgânica imobilizada por *g* de material sólido. Tendo em conta que a parte ativa do catalisador se centra no metal de manganês, o material foi avaliado por ICP-OES tendo revelado um valor de Mn (III) de 1,7% (m/m), traduzindo-se numa quantidade de metaloporfirina de $3,1 \times 10^{-5}$ mol por *g* de material.

No Capítulo 3 são referidos os aspetos que motivaram a escolha do trimetoprim como antibiótico alvo a aplicar no sistema desenvolvido. Também é efetuada a avaliação catalítica das metaloporfirinas sintetizadas no capítulo anterior quando aplicadas na reação de degradação oxidativa do trimetoprim em meios homogéneo e heterogéneo, tanto em *batch* como em fluxo contínuo. Em condições *batch* obteve-se percentagens de degradação de 94% e 97% em 150 minutos, na presença de catalisador homogéneo e heterogéneo, respetivamente. Em relação às reações realizadas em fluxo contínuo em meio homogéneo, observa-se uma dependência da degradação face à percentagem de H₂O₂ utilizada, sendo que, utilizando H₂O₂ 3% e razões volumétricas de TMP/H₂O₂ mais elevadas, obteve-se taxas de degradação mais elevadas. Outro fator importante que apresenta ligação direta com a degradação obtida é o tempo de residência, sendo que com o aumento do tempo de residência de 8,6 minutos para 45,5 minutos, obteve-se 40% e 87% de degradação, respetivamente. No caso das reações realizadas em fluxo contínuo em meio heterogéneo, obteve-se 97% de degradação de trimetoprim em apenas 10 minutos. Adicionalmente, com o objetivo da transposição deste sistema para o tratamento de águas residuais, procedeu-se também à avaliação do sistema de degradação do trimetoprim em modo contínuo durante 8 horas. Através da análise de amostras de 1 em 1 hora, a percentagem de degradação manteve-se sempre acima de 87% o que evidencia a eficiência e estabilidade do catalisador ao longo do tempo de trabalho.

No Capítulo 4 estão presentes as principais conclusões dos resultados obtidos e apresentados nesta dissertação.

No Capítulo 5 encontram-se descritos todos os procedimentos experimentais, técnicas e instrumentação, bem como a caracterização dos compostos sintetizados.

Palavras-chave: Metaloporfirinas; Manganês; Oxidação; Peróxido de hidrogénio; Fluxo contínuo.

Abstract

Given the increase of antibiotics consumption both in human and veterinary medicine, the presence of significant amounts of these drugs in aquatic environments has been observed. Because of their environment persistence, antibiotics resistant bacteria have emerged. For this reason, the development of methods applied to the degradation of antibiotics in wastewater became a topic of huge importance in the fight against antimicrobial resistance. The use of metalloporphyrins applied to the oxidative degradation of antibiotics has shown promising results in solving this problem. However, the implementation of these methods in *batch* systems becomes impractical in a real-world situation. To overcome, the use of continuous flow processes combined with the application of metalloporphyrins as catalysts, in the oxidative degradation of antibiotics in the presence of non-pollutant oxidant H_2O_2 shows great potential regarding the transposition from a laboratory scale for application in the treatment of hospital wastewater.

In Chapter 1, relevant data and facts associated with the consumption of antibiotics and the emergence of resistant bacteria in the world and particularly in Portugal are presented. Then, a critical review of the literature focused on the use of metalloporphyrins applied to the oxidative degradation of antibiotics is also given. The use of continuous flow is further discussed as a more suitable approach to the real-world situation in the treatment of wastewater, such as hospitals' wastewater.

In Chapter 2 aiming to obtain catalysts for application in the degradation of antibiotics, the synthesis of a *meso*-tetrasubstituted porphyrin bearing 2,6-dichlorophenyl bulky groups using two synthetic routes is described. At first, a water-soluble metalloporphyrin was synthesized through the chlorosulfonation of the corresponding porphyrin, followed by a hydrolysis reaction and subsequent metalation with manganese(III), to obtain a metalloporphyrin that can be applied in homogeneous oxidation reactions in an aqueous medium. To obtain the heterogeneous catalyst, chlorosulfonation of the same initial halogenated porphyrin was carried out in the same way, followed by a nucleophilic reaction with 3-aminopropyl functionalized silica gel, which was used as inorganic support. By thermogravimetric analysis, an amount of

3.4×10^{-5} mol of immobilized organic part *per g* of solid material was determined. Considering that the manganese metal is the active part of the catalyst, the material was analysed by ICP-OES and revealed a Mn(III) value of 1.7% (w/w), which translates into an amount of 3.1×10^{-5} mol of metalloporphyrin *per g* of material.

In Chapter 3, the aspects that motivated the choice of trimethoprim as the target antibiotic to be applied in the developed system are disclosed. Then, the catalytic evaluation of the catalysts synthesized in the previous chapter in the oxidative degradation reaction of trimethoprim in homogeneous and heterogeneous media, both in *batch* and in continuous flow is carried out. Under *batch* conditions, 94% and 97% degradation were obtained after 150 minutes in the presence of homogeneous and heterogeneous catalyst, respectively. Regarding the reactions carried out in continuous flow in a homogeneous medium, a direct influence of the H₂O₂ percentage used was observed in the degradation of the antibiotic. Using 3% H₂O₂ and higher volumetric TMP/H₂O₂ ratios resulted in higher degradation rates. Another important factor is the direct relation between the degradation and residence time. With the increase of the residence time from 8.6 minutes to 45.5 minutes, 40% and 87% of degradation were obtained, respectively. For reactions carried out in continuous flow in a heterogeneous medium, 97% of trimethoprim degradation was obtained in just 10 minutes. Additionally, with the objective of transposing this system to the treatment of wastewater, the evaluation of the degradation system of trimethoprim was also carried out in continuous mode for 8 hours. Through the analysis of samples every 1 hour, the degradation was always above 87%, which demonstrates the efficiency and stability of the catalyst for the working time used.

Chapter 4 presents the main conclusions regarding the results obtained and presented in this dissertation.

In Chapter 5 all experimental procedures, techniques, instrumentation, as well as the characterization of the synthesized compound are described.

Keywords: Metalloporphyrins; Manganese; Oxidation; Hydrogen peroxide; Continuous flow.

Nomenclatura

Nesta dissertação, para a numeração e nomeação dos compostos, foram seguidas as recomendações descritas pela União Internacional da Química Pura e Aplicada (do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry – IUPAC*).

De acordo com a nomenclatura IUPAC^{1, 2}, os carbonos do macrociclo tetrapirrólico são numerados de forma sequencial de 1 a 20 e os carbonos externos foram numerados de acordo com a **Figura I**.

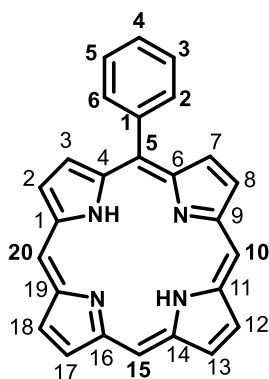


Figura I. Numeração de macrociclos tetrapirrólicos de acordo com a nomenclatura IUPAC.

Ao longo desta dissertação, algumas das porfirinas tetra-substituídas sintetizadas são compostas por uma mistura de isômeros, estando estas devidamente assinaladas. Relativamente à nomenclatura atribuída para os respetivos complexos metálicos dos macrociclos tetrapirrólicos foram seguidas as recomendações de nomenclatura da IUPAC.³

Referências

- [1] G. P. Moss. Nomenclature of Tetrapyrroles *Pure & Appl. Chem.* 1987. **59**. 779-832.
- [2] A. C. Fernandes, B. Herold, H. Maioa, A. P. Rauter e J. A. R. Rodrigues. *Guia IUPAC para a Nomenclatura de Compostos Orgânicos*. LIDEL. 2002.
- [3] A. Tomé. *Introdução à Nomenclatura de Compostos Orgânicos*. Escolar Editora. 2010.

CAPÍTULO 1

Introdução

1.1. Antibióticos: benefícios e consequências da utilização

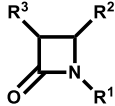
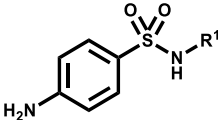
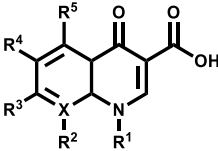
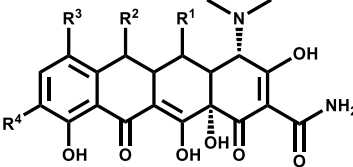
Os antibióticos são fármacos que permitem melhorar a saúde pública e a qualidade de vida. Antes destes surgirem, a Humanidade estava exposta a inúmeras infeções, sendo que doenças como meningite, pneumonia ou tuberculose eram muito difíceis e, por vezes, impossíveis de tratar, refletindo-se em elevadas taxas de mortalidade.^{1, 2} Com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928, os antibióticos têm permitido o tratamento eficaz dessas e de inúmeras outras doenças infecciosas.^{3, 4} Alguns dos procedimentos cirúrgicos e médicos invasivos como transplantes de órgãos, cirurgias ortopédicas e excisões de tumores não seriam possíveis sem a disponibilidade de antibióticos devido ao elevadíssimo risco de infeção.⁵⁻⁷ Um antibiótico pode ser uma substância natural produzida por microrganismos ou uma substância sintética preparada em laboratório. Para ser considerado clinicamente eficaz, deve, em baixas concentrações, levar à destruição ou inibição do crescimento de bactérias.^{8,9}

Os antibióticos são amplamente utilizados não só em contexto hospitalar, mas também em centros de cuidados paliativos e creches e aplicados a uma grande variedade de pacientes, principalmente, recém-nascidos, imunossuprimidos e idosos.¹⁰ São ainda fundamentais para o controlo de infeções bacterianas em meios comunitários, pelo que a sua descoberta foi considerada uma das conquistas mais importantes da história da medicina.^{5,10}

Existem várias classes de antibióticos, sendo que estes podem ser classificados tendo como base vários parâmetros, tais como o seu mecanismo de ação, a sua estrutura química e a via de administração. De entre estas classificações, o parâmetro

que mais se destaca é o seu mecanismo de ação, pelo que as classes mais comuns de antibióticos são: as β -lactamas, sulfonamidas, quinolonas, macrolídeos e tetraciclina. A **Tabela 1.1** contém informações sobre estas classes, nomeadamente, as suas estruturas químicas, os antibióticos mais prescritos, o alvo de infeção e o modo de ação.

Tabela 1.1. Informações sobre as classes mais comuns de antibióticos.

Entrada	Classe de antibióticos	Estrutura química	Mais prescritos	Alvo de infecção	Modo de ação
1	β -Lactamas ¹¹⁻¹⁵		Penicilina V Amoxicilina, Ampicilina Dicloxacilina, Nafcilina, Oxacilina Ácido clavulânico + Amoxicilina	Espécies de <i>Streptococcus</i> e anaeróbios da cavidade oral Bactérias Gram-negativas: <i>Escherichia coli</i> e <i>Haemophilus influenzae</i> Espécies de <i>Streptococcus</i> e <i>Staphylococcus</i> resistentes à penicilina Combate à resistência de β -lactamas em bactérias Gram-negativas	Inibe a síntese da parede celular
2	Sulfonamidas ^{8, 16}		Sulfisoxazol Sulfadiazina, Sulfadoxina	Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas: <i>Escherichia coli</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> , espécies de <i>Salmonella</i> e <i>Klebsiella</i>	Inibe o crescimento da célula
3	Quinolonas ¹⁷⁻²⁰	 X = C: quinolonas X = N: naftiridonas R ⁴ = F: fluoroquinolonas	Ciprofloxacina, Levofloxacina, Norfloxacina, Moxifloxacina	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , bactérias Gram-negativas e algumas Gram-positivas incluindo <i>Staphylococcus aureus</i>	Inibe a síntese de DNA
4	Macrolídeos ^{21, 22}	Diversidade de estruturas	Azitromicina, Eritromicina, Claritromicina	Bactérias Gram-positivas: espécies de <i>Staphylococcus</i> e <i>Streptococcus</i> ; atividade limitada para bactérias Gram-negativas	Inibe a síntese de proteínas
5	Tetraciclinas ^{23, 24}		Doxiciclina, Oxitetraciclina, Tetraciclina, Minociclina	Ampla espectro de bactérias Gram-positivas (p.e. <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Enterococcus faecalis</i>) e Gram-negativas (p.e. <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	Inibe a síntese de proteínas
6	Outros ²⁵	-----	Rifampicina Trimetoprim/ Sulfametoxazol ^{26, 27}	Tratamento da tuberculose e bactérias Gram-positivas Ampla espectro de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas: <i>Escherichia coli</i> , <i>Haemophilus parasuis</i> e espécies de <i>Streptococcus</i>	Inibe a RNA polimerase bacterial Inibe a síntese do ácido fólico bacteriano

1.1.1. Consumo de antibióticos na medicina humana e veterinária

Os antibióticos são amplamente utilizados na medicina humana, contudo, apesar da sua existência contribuir para uma melhoria da qualidade de vida e da saúde pública, tem-se observado um consumo excessivo desta classe de fármacos. Entre 2000 e 2015, o consumo global de antibióticos aumentou significativamente, sendo que a taxa de consumo de antibióticos aumentou 39%, de 11,3 para 15,7 doses diárias definidas (DDDs) por 1.000 pessoas.^{28, 29} Contudo, em alguns países, 50-80% dos antibióticos são aplicados na produção de gado, cerca de 5% é empregado em colheitas, animais de estimação e aquicultura e apenas a restante parte é usada em terapia humana.³⁰

Inicialmente, os antibióticos eram utilizados no tratamento de infeções em animais de criação (aves, suínos, bovinos) para alimentação, como nos casos de mastite em vacas em lactação e doenças respiratórias em bezerros.^{31, 32} Contudo, atualmente, a aplicação de antibióticos tem vindo a generalizar-se, não só para tratar animais doentes individualmente, mas também para controlar surtos de doenças em rebanhos ou manadas, prevenindo doenças através da alimentação. Além deste uso inadequado de antibióticos, a comunidade de criação de gado observou que ocorria um aumento do peso diário do animal com o uso de baixas doses de antibióticos. Embora as razões para este aumento de peso fossem e continuem a ser mal compreendidas, esta prática levou ao uso indiscriminado dessas moléculas também como promotores de crescimento.^{31,}

³²

1.1.2. Consumo de antibióticos em Portugal e consequências

Em 2020, Portugal encontrava-se entre os 10 principais países europeus com maior consumo de antibióticos, com 21–25 DDDs por 1.000 habitantes por ano.^{30, 33} De 26 a 28 de janeiro de 2015 realizou-se na Caparica a 1ª Conferência Internacional da Caparica em Resistência aos Antibióticos com o objetivo de abordar temas como o aumento da resistência a antibióticos, saúde pública, controlo de infeções resistentes e estratégias alternativas para superar o problema da resistência aos antimicrobianos.³⁴ De notar que, a partir de 2015, observou-se um decréscimo no consumo de antibióticos, sendo este de 17,7 de DDDs por 1000 habitantes nesse ano (**Figura 1.1**).³⁵

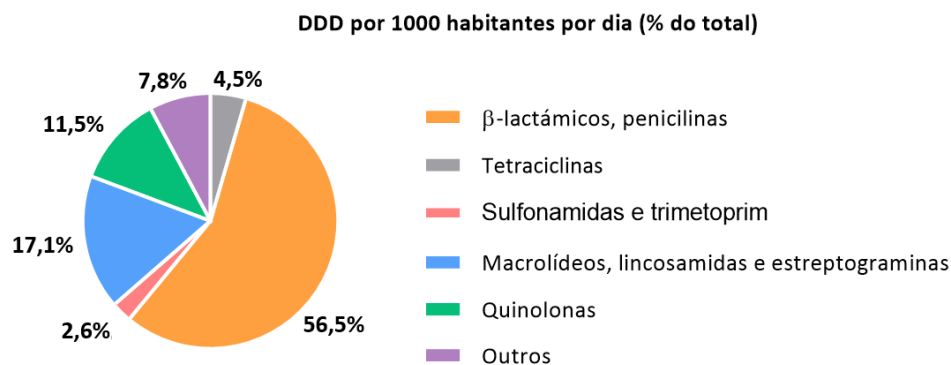


Figura 1.1. Doses Diárias Definidas por 1000 habitantes em Portugal em 2015 (Adaptado).³⁵

Em 2014, um relatório de Almeida *et al.*³⁶ identificou que, no ano de 2011, o consumo de antibióticos na medicina humana foi de 85.931 toneladas e na medicina veterinária de 162.562 toneladas, o que significa que cerca de dois terços dos antibióticos consumidos foram aplicados na medicina veterinária. Como se pode observar na **Figura 1.2**, a classe das penicilinas é a mais prevalente na medicina humana e a classe das tetraciclinas na medicina veterinária.

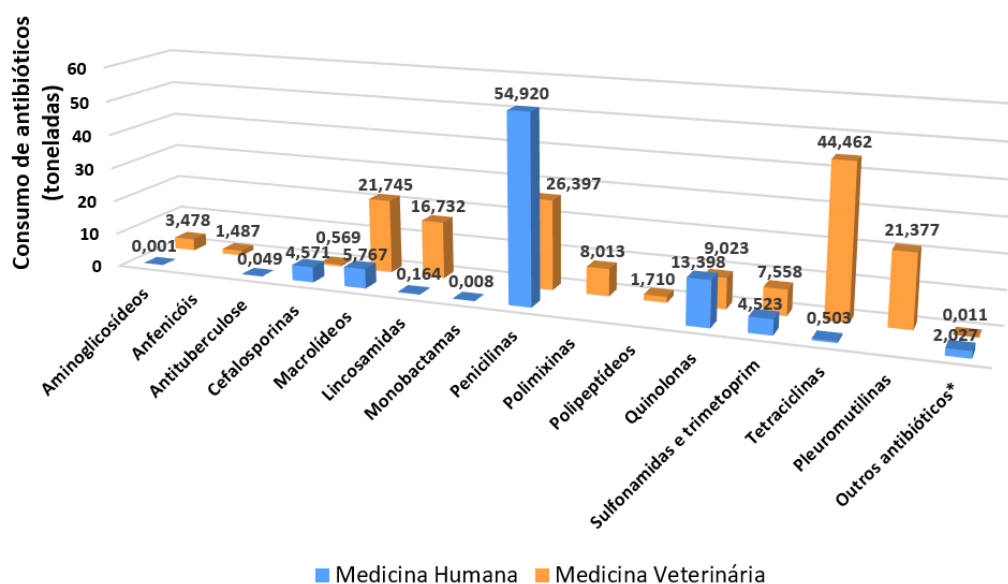


Figura 1.2. Comparação entre o consumo de antibióticos (toneladas) em 2011 na medicina humana (azul) e veterinária (cor de laranja). *Antibióticos como ácido fusídico e rifaximina (Adaptado).³⁶

O uso massivo e abusivo de antibióticos na medicina humana e veterinária resultou na aquisição de uma resistência alarmante por parte das bactérias a estes

fármacos.^{37, 38} Esta relação entre o consumo de antibióticos e a resistência adquirida pelas bactérias encontra-se documentada em hospitais, lares de idosos, unidades de cuidados intensivos e até a nível comunitário.³⁹

A resistência aos antibióticos é considerada quando um medicamento perde a sua capacidade de inibir eficazmente o crescimento bacteriano quando administradas doses previamente terapêuticas. As bactérias, quando se conseguem replicar mesmo na presença dos antibióticos, são chamadas de bactérias resistentes.⁴⁰ Recentemente, foram relatados e destacados por organizações de saúde globais, vários patógenos multirresistentes a medicamentos antibacterianos frequentemente usados no tratamento de infeções:⁴¹

- *Escherichia coli*: resistência a ESBL e às fluoroquinolonas;
- *Klebsiella pneumoniae*: resistência às cefalosporinas, incluindo resistência conferida por ESBL;
- *Staphylococcus aureus*: resistência à meticilina;
- *Streptococcus pneumoniae*: resistência à penicilina;
- *Salmonella typhimurium*: resistência às fluoroquinolonas;
- *Neisseria gonorrhoeae*: diminuição da suscetibilidade às cefalosporinas.

Em Portugal, já foram detetados alguns patógenos com resistência adquirida a antibióticos. Em 2017, verificou-se que a *Escherichia coli* apresentava uma taxa de resistência a antibióticos da classe das aminopenicilinas e fluoroquinolonas de 56% e 27%, respetivamente. No caso da *Staphylococcus aureus*, este patógeno apresentava uma taxa de resistência à meticilina de 39%.⁴²

Em 2019, a Organização Mundial de Saúde (OMS) considerou a resistência antimicrobiana como uma das dez principais ameaças à saúde global.⁴³ Atualmente, a resistência aos antibióticos é responsável por mais de 2 milhões de infeções e pelo menos 23.000 mortes anualmente nos EUA e cerca de 33.000 mortes na Europa.^{44, 45} Em 2050 estima-se que as mortes humanas causadas por microrganismos resistentes aos medicamentos possam aumentar de aproximadamente 700.000 por ano para 10 milhões por ano em 2050.⁴⁶

Em 2015, a Assembleia Geral da ONU apresentou a “Agenda 2030 para o desenvolvimento sustentável” que consiste em 17 objetivos (**Figura 1.3**) e 169 metas, em resposta ao aumento da preocupação relacionada com a sustentabilidade da humanidade a longo prazo.⁴⁷



Figura 1.3. Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) (Adaptado).⁴⁸

A resistência antimicrobiana (AMR) é uma ameaça cada vez mais preocupante para as conquistas já alcançadas em relação à saúde comunitária. Desta forma, esta resistência pode comprometer o cumprimento dos ODS, na medida em que afeta a segurança sanitária, o bem-estar, o crescimento económico e a segurança alimentar. Portanto, é necessário tomar ações de forma a mitigar, prevenir e controlar a AMR.⁴⁹

De entre estas ações, salienta-se o desenvolvimento de métodos de destruição de antibióticos em meios aquosos, que constitui o objetivo central dos estudos desenvolvidos e apresentados no Capítulo 3 desta dissertação.

1.1.3. Presença de antibióticos nos ambientes aquáticos

A dose administrada do antibiótico raramente é totalmente decomposta ou metabolizada no corpo humano ou animal, pelo que uma fração entre 20% a 90% dessa substância é excretada pela urina e fezes. Estas frações excretadas, tanto no caso do composto ativo como dos seus metabolitos, são libertadas no sistema de saneamento. No caso da área da pecuária, as fezes dos animais que poderão conter resíduos farmacêuticos são, frequentemente, utilizadas em campos agrícolas e pastagens como fertilizante, provocando a libertação direta de fármacos em águas subterrâneas ou águas abertas através do escoamento superficial.⁵⁰⁻⁵²

O uso extensivo de antibióticos na medicina humana, mas principalmente na medicina veterinária, levou à deteção de níveis significativos de resíduos de antibióticos em estações de tratamento de águas residuais (ETARs). Apesar de os antibióticos serem detetados em concentrações baixas (ng/L a µg/L), estes fármacos podem persistir no meio ambiente por um longo tempo.⁵³ Como por exemplo, um estudo reportado em 2020 enumera vários antibióticos detetados em amostras de águas recolhidas em 2017 no Rio Leça, em Portugal. Alguns dos antibióticos detetados foram: ciprofloxacina (0,34 µg/L), claritromicina (0,27 µg/L), ofloxacina (0,12 µg/L) e trimetoprim (0,11 µg/L).⁵⁴

Os antibióticos presentes em ambientes aquáticos são ameaças potencialmente graves para a saúde humana e ecossistemas, uma vez que a sua persistência no ambiente está associada a uma resistência adquirida pelos patógenos bacterianos a determinados antibióticos.⁵⁴

Desta forma, todos estes fatores têm contribuído para a formação de um ciclo negativo e alarmante (**Figura 1.4**), pelo que existe uma grande necessidade urgente de desenvolver métodos e/ou estratégias para a degradação de antibióticos, a fim de diminuir a sua quantidade nos ambientes aquáticos.

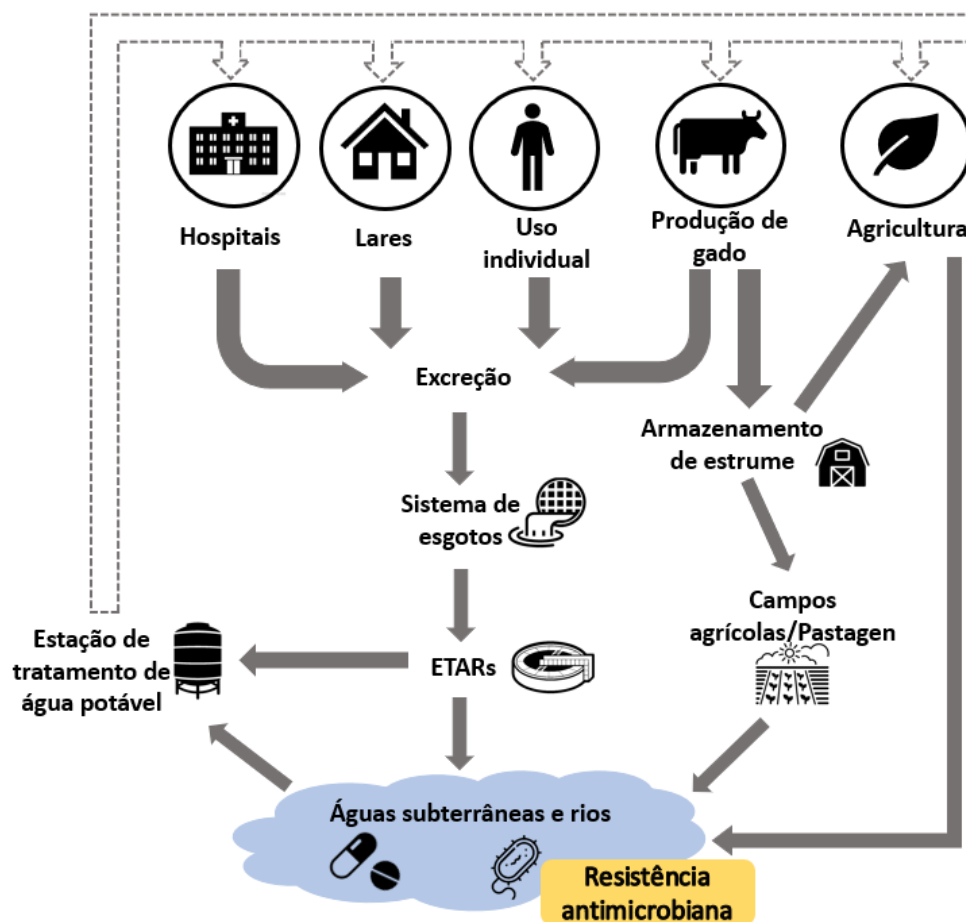


Figura 1.4. Ilustração esquemática do ciclo dos antibióticos e dos seus metabolitos desde as fontes de consumo até à sua presença nos ambientes aquáticos.

1.2. Abordagens para a remoção de antibióticos das águas residuais

As estações de tratamento de águas residuais (ETARs) têm como função a remoção de diferentes contaminantes, como substâncias orgânicas e inorgânicas e agentes patogénicos presentes na água, com o objetivo de fornecer água potável à comunidade dentro da regulamentação legal. Para tal, existem várias técnicas para remover contaminantes farmacêuticos de água e efluentes, estando estes divididos em convencionais e não convencionais.⁵⁵

Os tratamentos convencionais aplicados à água dependem, maioritariamente, das suas características físicas, químicas e bacteriológicas, sendo os mais comuns e utilizados nas ETARs são a coagulação, floculação, sedimentação, filtração e

desinfecção.⁵⁶ Contudo, vários estudos descrevem a ineficácia destes processos convencionais de tratamento na eliminação de antibióticos presentes nas águas.^{57, 58} Recentemente têm surgido novas tecnologias e abordagens com o objetivo de remover os antibióticos ou bactérias resistentes a antibióticos de águas residuais e efluentes. Entre estes destacam-se os processos de oxidação/desinfecção,^{59, 60} os processos avançados de oxidação,⁶¹ o recurso a carvão ativado^{62, 63} e processo de separação por membranas^{64, 65} (Figura 1.5).

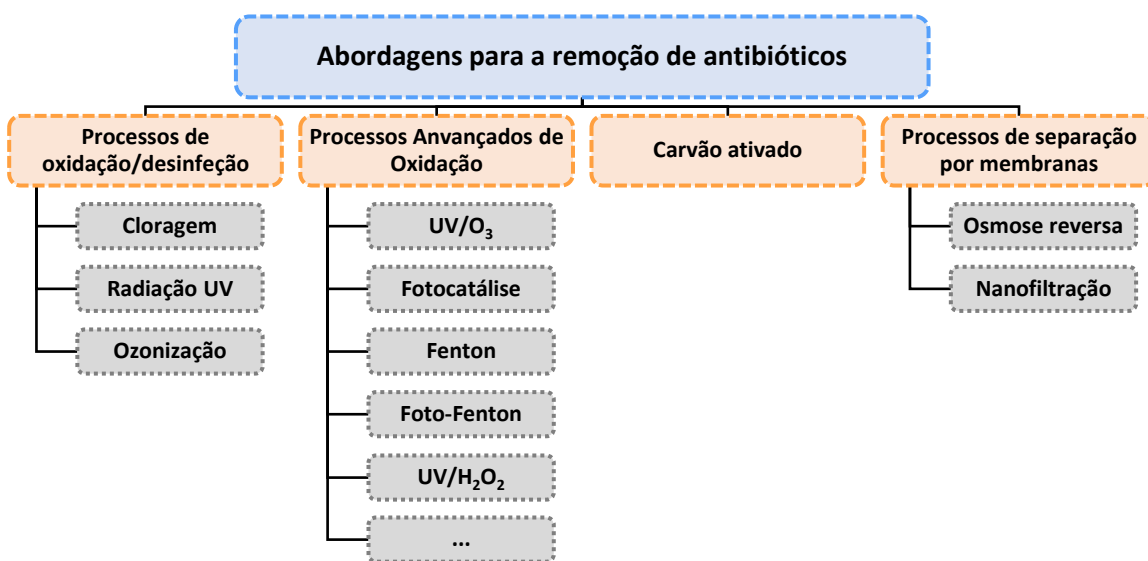


Figura 1.5. Abordagens mais comuns para a remoção de antibióticos de águas residuais.

1.2.1. Processos Avançados de Oxidação no tratamento de águas

Para combater este problema ambiental e de saúde pública, os Processos de Oxidação Avançados (do inglês *Advanced Oxidation Processes* - AOPs) têm sido descritos como métodos eficazes para oxidar e degradar antibióticos. Estes processos têm a capacidade de gerar espécies reativas de oxigénio (do inglês *Reactive Oxygen Species* - ROS), nomeadamente o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o oxigénio singleto (1O_2), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o radical hidroxilo (OH^{\bullet}).

Em termos de classificação dos diferentes métodos de AOPs, estes podem ser divididos em métodos fotoquímicos e métodos não fotoquímicos. Em relação aos métodos fotoquímicos, a destruição completa dos antibióticos pode ser alcançada

através da combinação com radiação fotónica. Estes incluem a ozonização combinada com radiação ultravioleta (O_3/UV), a ozonização com peróxido de hidrogénio e radiação ultravioleta ($O_3/H_2O_2/UV$), o sistema foto-Fenton ($Fe^{2+}/H_2O_2/UV$) e fotocatalise, entre outros. Os métodos não fotoquímicos não requerem energia para formar radicais OH^\bullet , e incluem os métodos ozonização (O_3), ozonização combinada com peróxido de hidrogénio (O_3/H_2O_2), ozonização catalítica ($O_3/catalisadores$), sistemas Fenton (Fe^{2+}/H_2O_2) e oxidação catalisada por complexos metálicos em presença de oxidantes, entre outros.⁶⁶ A título demonstrativo, a ozonização,⁶⁷⁻⁶⁹ a reação de Fenton^{70, 71} e a fotocatalise⁷²⁻⁷⁴ têm sido alguns dos métodos mais investigados para aplicação no tratamento de águas.^{75, 76}

1.3. Metaloporfirinas como catalisadores na degradação oxidativa de antibióticos

A implementação de AOPs, como referido anteriormente, pode ser catalisada por complexos metálicos na presença de oxidantes. De entre esses complexos, as metaloporfirinas são aqueles que apresentam maior potencial nesta área.

As porfirinas e seus derivados são uma classe de compostos macrocíclicos tetrapirrólicos de ocorrência natural com cor intensa. Estes compostos, têm sido extensivamente estudados devido ao papel fundamental desempenhado em alguns processos da vida biológica, nomeadamente no transporte de oxigénio.⁷⁷ As porfirinas possuem um sistema de 18π eletrões conjugados que é responsável pelo seu comportamento aromático e a sua cavidade de tamanho limitado permite a acomodação de catiões metálicos.⁷⁸ O estudo das atividades das metaloporfirinas (MPs) surgiram em 1747 quando Menghini demonstrou pela primeira vez a presença de ferro no sangue, ou seja, o grupo heme, que contém um complexo ferro-porfirina, coordenando o oxigénio e o dióxido de carbono sendo responsável pela respiração celular.⁷⁷

Devido ao aparecimento de novas metaloporfirinas sintéticas utilizadas como catalisadores em reações de oxidação, Dolphin e Traylor propuseram, em 1997, uma classificação para muitas MPs utilizadas em catálise com base nas suas estruturas

antimicrobiana, têm surgido vários estudos utilizando metaloporfirinas em catálise oxidativa de antibióticos.

Os oxidantes mais utilizados em catálise oxidativa na presença de metaloporfirinas são o ácido *m*-cloroperoxibenzoico (*m*-CPBA), monoperoxissulfato de potássio (KPMS ou Oxone®), iodossilbenzeno (PhIO), diacetato iodobenzeno (PhI(OAc)₂), peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e os seus derivados como hidroperóxido de *tert*-butilo (*t*-BuOOH).^{81, 83-85} Estes oxidantes atuam através de mecanismos que produzem radicais, incluindo o radical hidroxilo, o radical superóxido, entre outros.⁸⁶ Contudo, muitos destes oxidantes são altamente poluentes e dão origem a produtos residuais altamente indesejáveis, e visto que são utilizados em quantidades excessivas, é necessário evitar o seu uso. A exceção é o peróxido mais simples, o H₂O₂, um oxidante benigno, cuja sua decomposição origina oxigénio e água sendo o menos prejudicial do ponto de vista ambiental.⁸⁷

A utilização de AOPs com peróxido de hidrogénio (H₂O₂) como oxidante benigno tem sido bastante discutida. Tal como referido anteriormente, o peróxido de hidrogénio pode ser combinado com radiação UV e/ou com iões Fe²⁺ dando origem aos processos conhecidos como H₂O₂/UV, Fenton (Fe²⁺/H₂O₂) e Foto-Fenton (Fe²⁺/H₂O₂/UV).⁸⁸ Para além disso, o peróxido de hidrogénio pode, ainda, ser combinado com catalisadores metálicos, nomeadamente, metaloporfirinas, para aplicação na degradação/oxidação química de antibióticos.⁸⁹

Em catálise oxidativa aplicada à degradação de antibióticos, a metaloporfirina tem a capacidade de ativar o agente oxidante, formando complexos que permitem oxidar os fármacos em estudo. A **Figura 1.6** apresenta as vias possíveis para a ativação do agente oxidante.

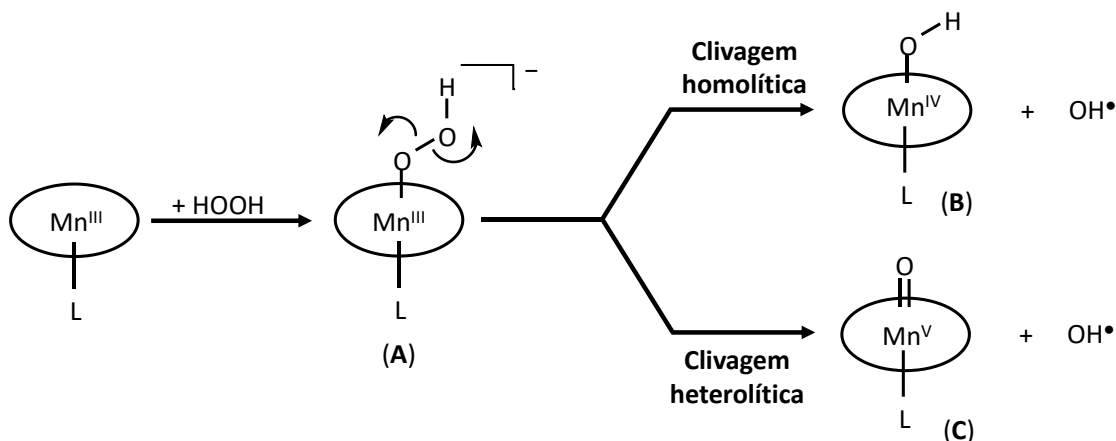
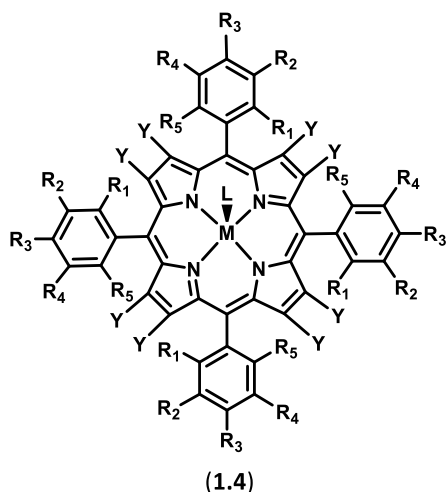


Figura 1.6. Esquema do mecanismo de ativação do agente oxidante por uma metaloporfirina (Adaptado).^{81, 90}

Inicialmente, o íon metálico da metaloporfirina encontra-se no estado de oxidação +3, podendo coordenar um dador de oxigênio, neste caso H_2O_2 , ocorrendo a clivagem homolítica ou heterolítica da ligação O–O da espécie hidroperoxo (**Espécie A, Figura 1.6**) dando origem às espécies *oxo*. A clivagem homolítica da ligação O–O dá origem à espécie [Porfirina- M^{IV} -OH] (**Espécie B, Figura 1.6**), onde o metal apresenta o estado de oxidação +4, levando também à formação de radicais OH^\bullet . Por outro lado, a clivagem heterolítica da ligação O–O leva à formação das espécies [Porfirina- $M^V=O$] (**Espécie C, Figura 1.6**) e radicais OH^\bullet .⁹¹ Usando H_2O_2 como oxidante, o mecanismo de clivagem depende dos substituintes no macrociclo da porfirina e do contra-íon (L), sendo que a presença de grupos de atratores de elétrons no macrociclo da porfirina promove o processo heterolítico.⁹² Na presença de solventes apróticos ou próticos ocorre preferencialmente a formação da espécie [Porfirina- $M^V=O$], resultante da clivagem heterolítica.⁹³ Contudo, a formação de uma outra espécie também depende do metal central presente na porfirina. Metaloporfirinas com ferro (III) como metal central favorecem a formação de espécies hidroperoxo (**Espécie A, Figura 1.6**), enquanto metaloporfirinas com manganês (III) como metal central favorecem a formação de espécies *oxo*.^{81, 90}

Na **Tabela 1.2** apresentam-se os estudos reportados na literatura relativos à degradação de antibióticos recorrendo a catálise oxidativa na presença de metaloporfirinas (**1.4**) como catalisadores (**Esquema 1.2**).



- 1.4a:** $R_1 - R_5 = H$; $Y = H$; $M = Mn(III)$; $L = Cl$
1.4b: $R_3 = CO_2Me$; $R_1, R_2, R_4, R_5 = H$; $Y = H$; $M = Mn(III)$; $L = Cl$
1.4c: $R_3 = CO_2Me$; $R_1, R_2, R_4, R_5 = H$; $Y = Br$; $M = Mn(III)$; $L = Cl$
1.4d: $R_3 = COOH$; $R_1, R_2, R_4, R_5 = H$; $Y = H$; $M = Mn(III)$; $L = n.d.$
1.4e: $R_3 = COOH$; $R_1, R_2, R_4, R_5 = H$; $Y = Br$; $M = Mn(III)$; $L = n.d.$
1.4f: $R_1 = Cl$; $R_2 = Cl$; $R_3, R_4, R_5 = H$; $Y = H$; $M = Mn(III)$; $L = Cl$
1.4g: $R_1 = Cl$; $R_5 = F$; $R_2, R_3, R_4 = H$; $Y = H$; $M = Mn(III)$; $L = Cl$
1.4h: $R_1, R_5 = Cl$; $R_2 = SO_2H$; $Y = H$; $M = Mn(III)$; $L = OAc$

Esquema 1.2. Metaloporfirinas (MPs) como catalisadores na catálise oxidativa de antibióticos reportadas na literatura.

Tabela 1.2. Resultados reportados na literatura do uso de metaloporfirinas em catálise oxidativa antibióticos.

Entrada	Agentes Oxidativos	Catalisador	Antibiótico	Condições experimentais	Resultados e Observações
1 ⁹⁴	H ₂ O ₂ m-CPBA PhIO	1.4a 1.4b 1.4c	Ciprofloxacina (CIP)	<ul style="list-style-type: none"> - Catalisador: 1.4a; 1.4b; 1.4c (homogéneo) - Cat:Oxidante:CIP = 1:100:10 - [Catalisador] = 3,0 x 10⁻⁶ M - [Oxidante] = 3,0 x 10⁻⁴ M - [CIP] = 3,0 x 10⁻⁵ M (13,1 µg/mL) - Solvente: ACN - 24h a 25 °C 	<ul style="list-style-type: none"> - Testagem de outros solventes (metanol, água e etanol) mas ACN revelou-se o melhor solvente - Melhores taxas de degradação de CIP para PhIO como oxidante: <ul style="list-style-type: none"> • Processo não catalisado: 38% em 24h • 1.4a: 56% em 24h • 1.4b: 76% em 24h • 1.4c: 72% em 24h - Proposta mecanística de degradação de CIP
2 ⁹⁵	H ₂ O ₂ m-CPBA PhIO PhI(OAc) ₂	1.4d 1.4e	Ciprofloxacina (CIP) Levofloxacina (LEV)	<ul style="list-style-type: none"> - Catalisador: 1.4d; 1.4e (homogéneo) - Cat:Oxidante:Antibiótico = 1:100:10 - [Catalisador] = 3,0 x 10⁻⁶ M - [Oxidante] = 3,0 x 10⁻⁴ M - [Antibiótico] = 3,0 x 10⁻⁵ M (CIP: 13,1 µg/mL; LEV: 10,8 µg/mL) - Sistemas de solventes: <ul style="list-style-type: none"> • ACN • PB:ACN = 85:15 (pH = 2,5) - 24 h a 25 °C 	<ul style="list-style-type: none"> - Realizados ensaios de controlo (presença de oxidante e ausência de catalisador) - 1.4e/PhIO/PB:ACN foi o sistema mais eficiente na degradação de CIP: 100% em 24h - Proposta mecanística de degradação de CIP - 1.4d/PhIO/ACN foi o sistema mais eficiente na degradação de LEV: 97% em 24h - Proposta mecanística de degradação de LEV
3 ⁹²	H ₂ O ₂ t-BuOOH Oxone®	1.4a 1.4f 1.4g	Norfloxacina (NOR)	<ul style="list-style-type: none"> - Catalisador: 1.4a; 1.4f; 1.4g (homogéneo) - Cat:Oxidante:NOR = 1:100:10 - [Catalisador] = 4,1 x 10⁻⁶ M - [Oxidante] = 4,1 x 10⁻⁴ M - [NOR] = 4,1 x 10⁻⁵ M (9,94 µg/mL) - Solvente: ACN - 24h a 25 °C 	<ul style="list-style-type: none"> - H₂O₂ na degradação de NOR na presença de: <ul style="list-style-type: none"> • 1.4a: 34% em 24h • 1.4f: 49% em 24h • 1.4g: 33% em 24h - Degradação de NOR mais eficiente com KPMS: 57-61% em 24 h - Destruição do catalisador determinada por UV-Vis - Proposta mecanística de degradação de NOR
4 ⁹⁶	H ₂ O ₂	1.4h	Trimetoprim (TMP)	<ul style="list-style-type: none"> - Catalisador: 1.4h@SiO₂ (heterogéneo) - Cat:TMP = 1:500 - Catalisador = 9,0 x 10⁻⁸ mol - [TMP] = 4,5 x 10⁻⁴ M (130,6 µg/mL) - Solvente: 100 mL de água destilada - Adição de 30 µL H₂O₂ (30% w/w) sucessivas de 15 em 15 min até V_{total} = 300 µL 	<ul style="list-style-type: none"> - Eficiência de imobilização de 37% - Degradação TMP: 95% em 150 min - Reutilização de 5 ciclos (sem perda significativa de eficiência) - TOC de 24% ao fim de 150 min - Produtos de degradação identificados por UPLC-MS - Estudos de toxicidade revelaram que os produtos de degradação apresentam toxicidade semelhante ao TMP - Proposta mecanística de degradação de TMP

Um estudo realizado por Lage *et al.*⁹⁴ descreve o uso de metaloporfirinas de manganês de 1ª, 2ª e 3ª geração como catalisadores na degradação de ciprofloxacina (CIP) na presença de vários oxidantes (H₂O₂, *m*-CPBA e PhIO) (**Tabela 1.2, Entrada 1**). Foram testados metanol, água, etanol e ACN como solventes, contudo, para os três primeiros verificou-se que CIP é apenas moderadamente solúvel nestes, o que motivou a utilização de ACN como solvente preferencial. Comparando os três oxidantes em estudo, verificou-se que o PhIO apresenta as melhores taxas de degradação (entre 56% e 76%), sendo que, no processo não-catalisado, realizado na presença de PhIO obteve-se 38% de degradação. Analisando a eficiência catalítica dos três catalisadores **1.4a**, **1.4b** e **1.4c** na presença de PhIO observa-se uma taxa de degradação de 56%, 76%, 72%, respectivamente. De acordo com os autores, o catalisador **1.4b** apresenta um melhor desempenho que **1.4a** porque contém grupos metil éster (-CO₂Me) atratores de elétrons nas posições *para* dos substituintes *meso*-aril da metaloporfirina promovendo a formação da espécie [Porfirina-Mn^V=O]. No caso do catalisador **1.4c**, este contém oito átomos de bromo nas posições β-pirrólicas do macrociclo, pelo que devem aumentar a acidez do ião de manganês levando facilmente à formação de espécies ativas. Contudo, este fator não foi suficiente para ocorrer um aumento da eficiência deste catalisador de 3ª geração quando comparado com o de 2ª geração. Apesar da degradação ter ocorrido em todas as MPs, os autores verificaram que no caso da MPs de 3ª geração este acontecimento ocorreu mais rapidamente quando comparado com as reações realizadas na presença de MPs de 2ª geração, o que poderá justificar a diminuição da degradação de CIP. Este acontecimento, já descrito na literatura, deve-se à baixa estabilidade de MPs de 3ª geração como catalisadores.^{80, 81}

Outro estudo reportado pelo mesmo grupo de investigação⁹⁵ teve como objetivo a comparação de metaloporfirinas de manganês de 2ª e 3ª geração como catalisadores homogêneos na degradação de fluoroquinolonas na presença de diversos agentes oxidativos (H₂O₂, PhIO, PhI(OAc)₂ e *m*-CPBA) (**Tabela 1.2, Entrada 2**). As reações de degradação foram realizadas em dois tipos distintos de solvente: *i*) apenas acetonitrilo (ACN) e *ii*) buffer de fosfato:acetonitrilo (PB:ACN). No caso da degradação de CIP, verificou-se que, com ambos os solventes, a degradação foi completa ou quase

completa, na presença do oxidante PhIO (PB:ACN ligeiramente mais eficiente). No caso da degradação de levofloxacina (LEV), os autores observaram que ambos os catalisadores foram eficientes (~97% degradação), usando PhIO como oxidante e ACN como solvente.

Na sequência, o mesmo grupo⁹² relatou o desempenho de três porfirinas de manganês na degradação da norfloxacin (NOR), comparando H₂O₂, *t*-BuOOH e Peroximonsulfato de potássio (KPMS) como oxidantes, em meio aquoso (**Tabela 1.2, Entrada 3**). Estes três agentes oxidantes foram escolhidos uma vez que são baratos, solúveis em água, estáveis à temperatura ambiente e, exceto o H₂O₂ que não é tóxico, por formarem subprodutos menos tóxicos quando comparados com oxidantes mais clássicos e altamente poluentes, como o PhI(OAc)₂ e PhIO. Analisando a eficiência das metaloporfirinas em estudo na presença de H₂O₂, observou-se que no caso da MPs de 1ª geração (**1.4a**) o valor da degradação de NOR (34%) foi relativamente mais elevado quando comparado com o ensaio na ausência de metaloporfirina (20%). Este resultado foi atribuído à formação de radicais OH• resultantes da clivagem homolítica da ligação O–O. No caso da MPs de 2ª geração (**1.4f**), esta foi o catalisador com melhor eficiência de degradação (49%). A presença de átomos de cloro na periferia desta metaloporfirina favorece a clivagem heterolítica de H₂O₂ para gerar a espécie [Porfirina-Mn^V=O]. Em relação aos agentes oxidantes estudados, observou-se que KPMS foi o oxidante que proporcionou maiores valores de degradação de NOR quando comparado com os restantes oxidantes. O facto de se obterem valores inferiores de degradação de NOR na presença de peróxidos (33%-49%, no caso de H₂O₂ e 13%-19%, no caso de *t*-BuOOH), poderá dever-se a reações secundárias dos mesmos, como por exemplo, autodecomposição.⁹⁷ No caso do KHSO₅ (Oxone®) este permite gerar radicais hidroxilo (OH•) e radicais sulfato (SO₄^{•-}) sendo que o potencial *redox* dos radicais sulfato (2,5–3,1 V) é maior quando comparado com os radicais hidroxilo (1,8–2,4 V) o que permite que ocorra uma oxidação mais rápida e eficaz, traduzindo-se em valores de degradação mais elevados (57-61%), apesar do maior risco ambiental, quando comparado com o uso de peróxido de hidrogénio.

As metaloporfirinas têm sido mais utilizadas como catalisadores homogêneos, contudo, a sua separação e recuperação é um processo extremamente difícil, pelo que a utilização de suportes sólidos, orgânicos ou inorgânicos tem sido também uma abordagem bastante discutida para ultrapassar este problema,^{81, 82, 98} sendo este um dos objetivos principais desta dissertação.

De entre as várias possibilidades, a sílica é considerada um sólido inorgânico versátil, uma vez que é inerte e estável, térmica e quimicamente, em diferentes condições. Pode ser potencialmente aplicada em várias reações catalíticas, devido à sua simplicidade e segurança no seu manuseamento, pelo que não representa um obstáculo no desenvolvimento de processos em meios aquosos, podendo também ser funcionalizada, o que permite imobilizar uma ampla gama de espécies catalíticas.⁹⁹ A preparação deste tipo de catalisadores imobilizados em sílica permite uma recuperação fácil e eficaz do catalisador através de processos como filtração ou centrifugação do meio reacional, podendo este ser reutilizado posteriormente.¹⁰⁰

Um exemplo da aplicação da sílica funcionalizada na imobilização de catalisadores homogêneos foi descrita num estudo publicado pelo grupo de Catálise e Química Fina do Centro de Química de Coimbra,⁹⁶ no qual a metaloporfirina **1.4h** foi imobilizada em sílica funcionalizada, sendo então, posteriormente, aplicada como catalisador na degradação heterogênea de trimetoprim (TMP), na presença de H₂O₂ como oxidante, em meio aquoso. Neste estudo, obteve-se uma taxa de degradação de TMP de 95% em 150 minutos, com uma remoção de TOC de 24% (**Tabela 1.2, Entrada 4**).

Desta forma, tendo em conta os estudos enunciados, pode concluir-se que as metaloporfirinas oferecem resultados promissores na degradação de antibióticos na presença de diversos agentes oxidantes e serão também utilizadas como catalisadores nos estudos desenvolvidos neste trabalho.

1.4. Química de fluxo contínuo como alternativa no tratamento de águas

Os processos catalíticos de degradação de antibióticos discutidos na seção anterior têm como denominador comum, o facto de terem sido efetuados em reatores ou vasos reacionais estáticos, ou seja, em batelada (em inglês, como é normalmente definido, *batch*). Contudo, mais recentemente, e resultante do desenvolvimento tecnológicos de equipamentos, tem surgido um crescente interesse na substituição de reações e processos químicos normalmente realizados em condições *batch* para processos que ocorram de forma contínua.¹⁰¹ A aplicação de processos de forma contínua, isto é, em fluxo contínuo, apresenta várias vantagens face aos métodos convencionais em *batch*, nomeadamente na utilização de volumes de reação menores, um maior controlo de temperatura e a possibilidade de utilização de pressões mais elevadas com maior segurança,^{102, 103} sendo esta estratégia muito próxima, também na aplicação em remediação ambiental, e particularmente em processos catalíticos oxidativos.

Na **Figura 1.7** está representado um esquema típico de um processo em fluxo contínuo. De uma forma geral, os reagentes são introduzidos no sistema com a utilização de bombas. Seguidamente, as diferentes correntes de reagentes entram em contacto através de misturadores, imediatamente antes de entrarem no reator. Dependendo do fluxo combinado da mistura (F_t) e do volume do reator utilizado, os reagentes permanecem um dado tempo dentro do reator nas condições de reação desejadas (tempo que uma dada secção de fluído demora desde que entra até que sai do reator), designado de tempo de residência (t_r). Este tempo é determinado pelo volume do reator (V_r) e pelo fluxo total (F_t) utilizado durante o processo, sendo $t_r = V_r/F_t$. De seguida, a mistura reacional resultante do processo é recolhida e posteriormente analisada. O processo pode ser operado de forma contínua até se esgotarem os reagentes.¹⁰⁴

Durante a operação de processos em fluxo contínuo, a concentração em qualquer ponto ao longo do reator é invariante com o tempo, atingindo-se um estado estacionário (*steady-state*). Para garantir que o *steady-state* seja alcançado, o sistema deve ser operado aproximadamente 1,5 volumes de reator e por pelo menos cinco

rotações volumétricas para garantir que se alcança este estado estacionário. Os resíduos experimentais inicialmente produzidos antes de se atingir o *steady-state* devem ser descartados. Após atingir-se este estado estacionário a mistura bruta é colhida. As amostras de saída devem ser recolhidas, se possível, em intervalos de tempo regulares e então analisadas para demonstrar o desempenho ao longo do tempo de operação.¹⁰²

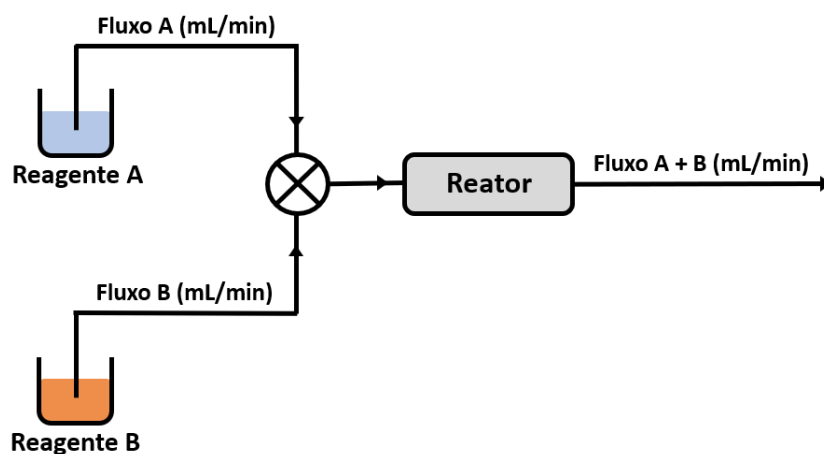


Figura 1.7. Ilustração esquemática de processo em fluxo contínuo.

Desta forma, devido às vantagens associadas aos processos em fluxo contínuo face aos métodos convencionais, existe uma maior facilidade de transposição para grande escala um sistema de degradação de antibióticos presente em água residuais. A sua natureza tecnológica assente no movimento de fluídos torna a química de fluxo contínuo numa abordagem promissora para aplicação na remediação ambiental, nomeadamente no que diz respeito ao tratamento águas residuais à saída de unidades hospitalares.¹⁰⁵

Atualmente, a nível comercial, já existem vários equipamentos de sistemas em fluxo contínuo aplicados no tratamento de águas residuais industriais que permitem o tratamento de águas de forma constante. Dependendo do tipo de indústria, é possível realizar diversos tratamentos como remoção de metais pesados, remoção de fosfato, neutralização de pH, entre outros.^{106, 107} Contudo, a utilização de processos em fluxo contínuo nas ETARs e à saída de unidades hospitalares é um desafio devido à elevada quantidade de água a tratar quando comparada ao tratamento de águas residuais industriais. Desta forma, tendo em vista a aplicação de processos contínuos em ETARs

alguns estudos são descritos na literatura que relatam a otimização de processos em fluxo para uma potencial aplicação em ETARs.^{108, 109} No que diz respeito à degradação de fármacos, o desenvolvimento e implementação de um sistema de fluxo contínuo direcionado para o tratamento de águas residuais de unidades hospitalares constituirá um passo importante na degradação de antibióticos e consequentemente no combate à resistência antimicrobiana, sendo que a sua simulação à escala laboratorial é um dos objetivos, numa escala temporal mais alargada.

Na literatura foram reportadas metodologias aplicando AOPs para a degradação de antibióticos em fluxo contínuo. Entre estas destacam-se o sistema Fenton^{110, 111}, eletro-Fenton^{112, 113}, ozonização^{114, 115}, catálise enzimática¹¹⁶, processos eletroquímicos^{117, 118} e métodos usando agentes oxidativos.

Entre os estudos reportados na literatura, os estudos de Du *et al.*¹¹⁹ descreveram a preparação de um catalisador de cobalto/cobre. Este catalisador foi aplicado na degradação de sulfametoaxol (SMX), na qual o agente oxidante utilizado foi o peroximonossulfato (PMS), em condições *batch* e em fluxo contínuo. Em *batch* foi utilizado PMS (0,1 mM), [catalisador]₀ = 90 µg/mL em 50 mL de solução aquosa de SMX ([SMX] = 5,0 µg/mL), tendo-se observado uma degradação de 97% de SMX ao fim de 10 min. Foi estudada a eficiência de degradação de SMX sob irradiação de luz visível e verificou-se que a sua influência não contribuiu para a degradação do SMX tendo em conta os valores semelhantes de degradação sob a ausência de luz e na presença de luz visível. O TOC observado foi de 20% e 61% após 10 min e 120 min de reação, respetivamente, em condições *batch*, o que indica uma apreciável mineralização. A reutilização do catalisador também foi estudada, tendo-se observado uma diminuição da eficiência do catalisador nas sucessivas reutilizações, sendo necessário mais tempo de reação para se obter a mesma percentagem de degradação inicialmente obtida. Observou-se, também, a lixiviação de Co e Cu, durante a 1ª e sucessivas reações. A possível aplicação deste sistema no tratamento de águas residuais via fluxo contínuo foi estudado com o empacotamento do catalisador num reator em coluna. O tempo de retenção controlado por bombas peristálticas foi de 10 minutos e a concentração do agente oxidante PMS foi ajustado no sistema para 0,1 mM. Com este sistema não foi

observado uma diminuição significativa da eficiência de degradação durante 64 horas. Procederam ainda ao estudo de uma solução aquosa contendo uma matriz de vários antibióticos sulfonamidas, entre estes sulfametozaxol (SMX), sulfacetamida (SA) e sulfametazina (SMT), com concentrações 1,5 mg/mL. Observou-se uma degradação de ~90% para os três antibióticos, tendo-se constatado, novamente, a lixiviação de Co e Cu. Estes estudos demonstram a relevância do desenvolvimento de catalisadores eficientes e estáveis tendo em vista a aplicação destes na degradação de antibióticos presentes em águas residuais.

Outro exemplo da degradação de antibióticos em fluxo contínuo foi descrito por Fornazari *et al.*¹¹⁰. A degradação de sulfametazina (SMT), sulfatiazol (STZ) e norfloxacin (NOR) foi obtida com a utilização de nanopartículas de ferro de valência zero (nZVI) e a reação de Fenton, usando H₂O₂ como oxidante. Uma solução contendo SMT, STZ ou NOR (1,0 µg/mL) foi bombeada para um reator em coluna (80 mL) que contém cinco camadas: lã de vidro, 2 g de areia, 100 mg de nZVI em 4 g de areia, 2 g de areia e novamente lã de vidro. Após o reator em coluna, a solução entra num recipiente de mistura onde é bombeado H₂O₂ (1 mM). Através de design fatorial, observou-se uma tendência no aumento da degradação através da diminuição do fluxo e do pH. Contudo, o sistema está limitado a um fluxo de 20 mL/min e pH = 3,0. Desta forma, para estas condições enumeradas anteriormente, obteve-se uma degradação de SMT, STZ e NOR de 55%, 77% e 69%, respetivamente. As análises foram realizadas após se alcançar o *steady-state*, tendo este sido alcançado após 15 min de operação, mantendo-se constante durante 6 horas. Durante o *steady-state* observou-se lixiviação de ferro na ordem de 6-9 µg/mL, desta forma, após a passagem pelo reator em coluna, adicionou-se mais H₂O₂ (1 mM) de forma a aproveitar o ferro residual dissolvido e realizar-se o processo de Fenton, degradando ainda mais os antibióticos. Desta forma, ao acoplar os processos nZVI e Fenton, durante o *steady-state* observou-se uma degradação superior a 96%.

Contudo, salienta-se mais uma vez a falta de estabilidade dos catalisadores utilizados, o que impede claramente a sua reutilização e transposição para o mundo real.

1.5. Objetivos

Os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável têm como propósito dar resposta ao aumento da preocupação relacionada com a sustentabilidade a longo prazo da humanidade.⁴⁷ Desta forma, é de salientar que este trabalho encontra-se perfeitamente alinhado com o 3º e 6º objetivos de desenvolvimento sustentável, na medida em que tem como objetivo o desenvolvimento de uma abordagem sustentável para o tratamento de águas a fim de diminuir/eliminar a presença de antibióticos, levando a uma diminuição do problema da resistência antimicrobiana, contribuindo, assim, para uma melhoria da saúde humana.

Tal como referido anteriormente, na literatura existem vários artigos que fazem referência ao uso de metaloporfirinas como catalisadores eficientes na degradação de antibióticos, contudo, estes sistemas apenas foram estudados em *batch*, o que está longe da realidade do tratamento de águas em grande escala.

No caso da degradação de antibióticos, o desenvolvimento e a implementação de um sistema de fluxo contínuo no tratamento de águas residuais de um hospital seria um passo importante na degradação de antibióticos e no combate à resistência antimicrobiana. Desta forma, tendo em vista o desenvolvimento e implementação de um sistema viável na degradação de fármacos em contexto hospitalar, esta dissertação tem como objetivo a síntese de um catalisador sustentável baseado numa metaloporfirina imobilizada num suporte sólido e sua avaliação na degradação de antibióticos em processos de fluxo contínuo usando H_2O_2 como agente oxidativo benigno (**Figura 1.8**).

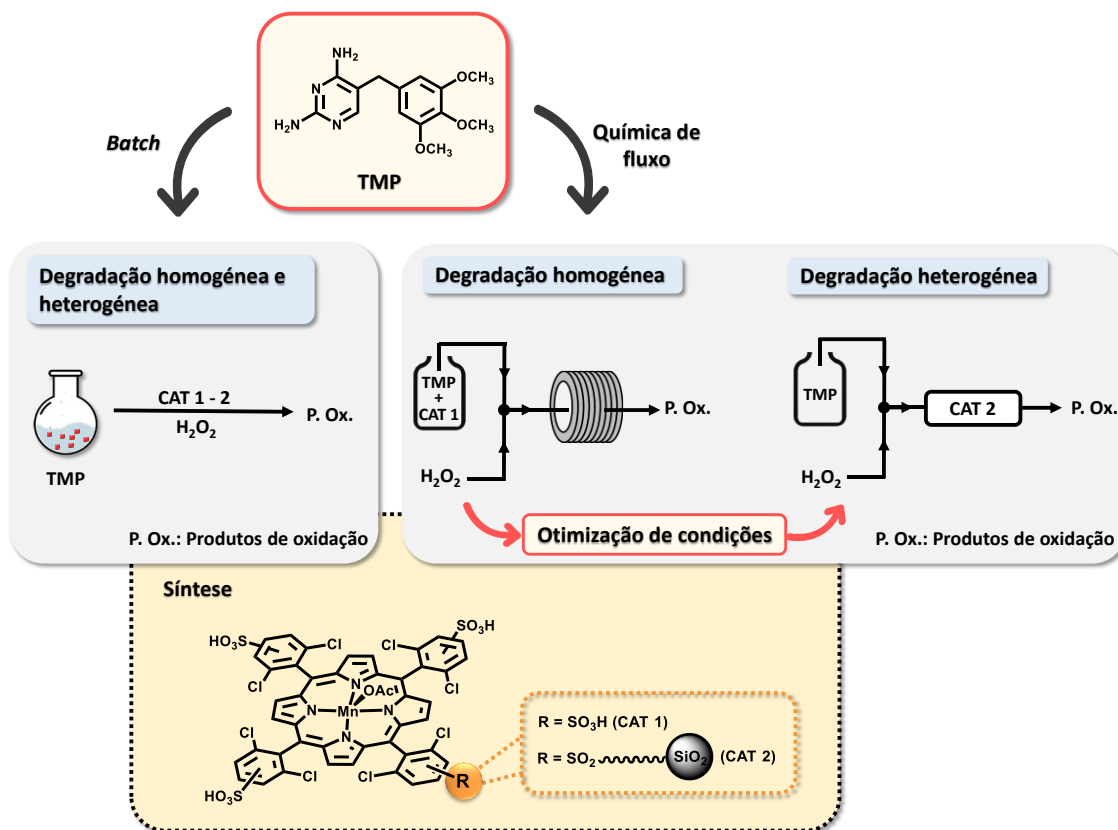


Figura 1.8. Esquema da proposta de trabalho apresentada nesta dissertação.

1.6. Referências

- [1] S. Dhingra, N. A. A. Rahman, E. Peile, M. Rahman, M. Sartelli, M. A. Hassali, T. Islam, S. Islam e M. Haque. Microbial Resistance Movements: An Overview of Global Public Health Threats Posed by Antimicrobial Resistance, and How Best to Counter. *Front. Public Health*. 2020. **8**. 535668.
- [2] D. M. Shlaes e P. A. Bradford. Antibiotics-From There to Where?: How the antibiotic miracle is threatened by resistance and a broken market and what we can do about it. *Pathog. Immun*. 2018. **3**. 19-43.
- [3] B. L. Phoon, C. C. Ong, M. S. M. Saheed, P. L. Show, J. S. Chang, T. C. Ling, S. S. Lam e J. C. Juan. Conventional and emerging technologies for removal of antibiotics from wastewater. *J. Hazard. Mater*. 2020. **400**. 122961.
- [4] G. A. Durand, D. Raoult e G. Dubourg. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2019. **53**. 371-382.
- [5] M. I. Hutchings, A. W. Truman e B. Wilkinson. Antibiotics: past, present and future. *Curr. Opin. Microbiol*. 2019. **51**. 72-80.
- [6] G. Subramaniam e M. Girish. Antibiotic Resistance - A Cause for Reemergence of Infections. *Indian J. Pediatr*. 2020. **87**. 937-944.
- [7] N. Sabtu, D. A. Enoch e N. M. Brown. Antibiotic resistance: what, why, where, when and how? *Br. Med. Bull*. 2015. **116**. 105-113.
- [8] E. Etebu e I. Ariekpar. Antibiotics : Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res*. 2016. **4**. 90-101.
- [9] L. Kourkouta, C. H. Kotsiftopoulos, M. Papageorgiou, C. H. Iliadis e A. Monios. The Rational Use of Antibiotics Medicine. *J. Healthc. Commun*. 2017. **2**. 27.
- [10] J. F. Prescott. The resistance *tsunami*, antimicrobial stewardship, and the golden age of microbiology. *Vet. Microbiol*. 2014. **171**. 273-278.
- [11] C. L. Tooke, P. Hinchliffe, E. C. Bragginton, C. K. Colenso, V. H. A. Hirvonen, Y. Takebayashi e J. Spencer. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J. Mol. Biol*. 2019. **431**. 3472-3500.
- [12] K. Bush. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *ASM*. 2018. **62**. e01076-01018.
- [13] R. Fernandes, P. Amador e C. Prudêncio. β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Rev. Med. Microbiol*. 2013. **24**. 7-17.
- [14] K. B. Holten e E. M. Onusko. Appropriate prescribing of oral beta-lactam antibiotics. *Am. Fam. Physician*. 2000. **62**. 611-620.
- [15] D. Carcione, C. Siracusa, A. Sulejmani, V. Leoni e J. Intra. Old and New Beta-Lactamase Inhibitors: Molecular Structure, Mechanism of Action, and Clinical Use. *Antibiotics*. 2021. **10**. 995.

- [16] *Sulfonamides em LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]*. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. 2012. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548382/>. (acedido a 21 setembro 2021).
- [17] R. Aura, I. Silvia, M. Eleonora e H. Gabriel. Quinolone Antibacterials: Commentary and Considerations Regarding UV Spectra and Chemical Structure. *Acta Med. Marisiensis*. 2015. **61**. 328-336.
- [18] J. Fedorowicz e J. Sączewski. Modifications of quinolones and fluoroquinolones: hybrid compounds and dual-action molecules. *Monatsh. Chem*. 2018. **149**. 1199-1245.
- [19] T. D. M. Pham, Z. M. Ziora e M. A. T. Blaskovich. Quinolone antibiotics. *Med. Chem. Commun*. 2019. **10**. 1719-1739.
- [20] N. Adriaenssens, R. Bruyndonckx, A. Versporten, N. Hens, D. L. Monnet, G. Molenberghs, H. Goossens, K. Weist e S. Coenen. Consumption of quinolones in the community, European Union/European Economic Area, 1997–2017. *J. Antimicrob. Chemother*. 2021. **76**. 37-44.
- [21] G. P. Dinos. The macrolide antibiotic renaissance. *Br. J. Pharmacol*. 2017. **174**. 2967-2983.
- [22] K. D. Lenz, K. E. Klosterman, H. Mukundan e J. Z. Kubicek-Sutherland. Macrolides: From Toxins to Therapeutics. *Toxins*. 2021. **13**. 347.
- [23] F. Nguyen, A. L. Starosta, S. Arenz, D. Sohmen, A. Dönhöfer e D. N. Wilson. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biol. Chem*. 2014. **395**. 559-575.
- [24] F. van Bambeke, M. P. Mingeot-Leclercq, Y. Glupczynski e P. M. Tulkens. *Mechanisms of Action em Infectious Diseases*. Elsevier. 4ª edição. 2017. 1162-1180.
- [25] S. Coenen, N. Adriaenssens, A. Versporten, A. Muller, G. Minalu, C. Faes, V. Vankerckhoven, M. Aerts, N. Hens, G. Molenberghs e H. Goossens. European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient use of tetracyclines, sulphonamides and trimethoprim, and other antibacterials in Europe (1997-2009). *J. Antimicrob. Chemother*. 2011. **66**. vi57–vi70.
- [26] C. C. B. Coelho. *Trimethoprim-Sulfamethoxazole Resistance in Staphylococcus Aureus in Africa: Distribution on Resistance Genes and Evaluation of the Success of Major Mrsa Clones*. Tese de Mestrado em Microbiologia Aplicada. Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa. 2016. <https://repositorio.ul.pt/handle/10451/27322>. (acedido a 21 setembro 2021).
- [27] República Portuguesa: Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural. *Anexo I: Resumo das Características do Mecanismo*. Direção Geral de Alimentação e Veterinária. 2018.

- https://medvet.dgav.pt/medvet_dgav/static/RCM/Metaxol_20-100.pdf. (acedido a 23 setembro 2021).
- [28] The Center for Disease Dynamics, Economics & Policy. *The State of the World's Antibiotics 2021 - A Global Analysis of Antimicrobial Resistance and Its Drivers*. 2021. <https://cddep.org/blog/posts/the-state-of-the-worlds-antibiotics-report-in-2021/>. (acedido a 24 setembro 2021).
- [29] E. Y. Klein, M. Milkowska-Shibata, K. K. Tseng, M. Sharland, S. Gandra, C. Pulcini e R. Laxminarayan. Assessment of WHO antibiotic consumption and access targets in 76 countries, 2000–15: an analysis of pharmaceutical sales data. *Lancet Infect. Dis.* 2020. **21**. 107-115.
- [30] C. M. Marinho, T. Santos, A. Gonçalves, P. Poeta e G. Igrejas. A Decade-Long Commitment to Antimicrobial Resistance Surveillance in Portugal. *Front. Microbiol.* 2016. **7**. 1650.
- [31] B. González-Zorn e J. A. Escudero. Ecology of antimicrobial resistance: humans, animals, food and environment. *Int. J. Microbiol.* 2012. **15**. 101-109.
- [32] M. E. Dillon. *The Impact of Restricting Antibiotic Use in Livestock: Using a 'One Health' Approach to Analyze Effects of the Veterinary Feed Directive*. Degree of Master of Liberal Arts in Extension Studies. Universidade de Harvard. 2020. <https://dash.harvard.edu/handle/1/37365628>. (acedido a 21 setembro 2021).
- [33] K. Hede. Antibiotic resistance: An infectious arms race. *Nature*. 2014. **509**. S2-S3.
- [34] Nova School of Science and Technology - Department of Chemistry. 26 a 28 de Janeiro – 1ª Conferência Internacional da Caparica em Resistência de Antibióticos. <https://www.dq.fct.unl.pt/eventos/2015/01/26-28-de-janeiro-%E2%80%93-1%C2%AA-conferencia-internacional-da-caparica-em-resistencia-de-antibioticos>. (acedido a 19 setembro 2021).
- [35] World Health Organization. *WHO Report non Surveillance of Antibiotic Consumption (2016 - 2018)*. 2018. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241514880>. (acedido a 19 setembro 2021).
- [36] A. Almeida, S. Duarte, R. Nunes, H. Rocha, A. Pena e L. Meisel. Human and Veterinary Antibiotics Used in Portugal - A Ranking for Ecosurveillance. *Toxics*. 2014. **2**. 188-225.
- [37] G. Kapoor, S. Saigal e A. Elongavan. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.* 2017. **33**. 300-305.
- [38] R. Laxminarayan, A. Duse, C. Wattal, A. K. M. Zaidi, H. F. L. Wertheim, N. Sumpradit, E. Vlieghe, G. L. Hara, I. M. Gould, H. Goossens, C. Greko, A. D. So, M. Bigdeli, G. Tomson, W. Woodhouse, E. Ombaka, A. Q. Peralta, F. N. Qamar, F. Mir, S. Kariuki, Z. A. Bhutta, A. Coates, R. Bergstrom, G. D. Wright, E. D. Brown e O. Cars. Antibiotic resistance - the need for global solutions. *Lancet Infect. Dis.* 2013. **13**. 1057-1098.

- [39] E. Y. Klein, T. P. Van Boeckel, E. M. Martinez, S. Pant, S. Gandra, S. A. Levin, H. Goossens e R. Laxminarayan. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *PNAS*. 2018. **115**. e3463-e3470.
- [40] S. B. Zaman, M. A. Hussain, R. Nye, V. Mehta, K. T. Mamun e N. Hossain. A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. *Cureus*. 2017. **28**. e1403.
- [41] World Health Organization. *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. Geneva. 2014. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241564748>. (acedido a 21 setembro 2021).
- [42] Direção-Geral da Saúde. *Infeções e Resistências aos Antimicrobianos: Relatório Anual do Programa Prioritário*. 2018. <https://www.arscentro.min-saude.pt/ppcira/relatorios/>. (acedido a 21 setembro 2022).
- [43] World Health Organization. Ten threats to global health in 2019. <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>. (acedido a 22 setembro 2021).
- [44] A. Auta, M. A. Hadi, E. Oga, E. O. Adewuyi, S. N. Abdu-Aguye, D. Adeloye, B. Strickland-Hodge e D. J. Morgan. Global access to antibiotics without prescription in community pharmacies: A systematic review and meta-analysis. *J. Infect.* 2019. **78**. 8-18.
- [45] J. Robertson, V. Vlahović-Palčevski, K. Iwamoto, L. D. Högberg, B. Godman, D. L. Monnet, S. Garner e K. Weist. Variations in the Consumption of Antimicrobial Medicines in the European Region, 2014–2018: Findings and Implications from ESAC-Net and WHO Europe. *Front. Pharmacol.* 2021. **12**. 639207.
- [46] J. O'Neill. *Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations: The Review on Antimicrobial Resistance*. Government of the United Kingdom. 2016. <https://amr-review.org/>. (acedido a 22 setembro 2022).
- [47] N. Chams e J. García-Blandón. On the importance of sustainable human resource management for the adoption of sustainable development goals. *Resour. Conserv. Recycl.* 2019. **141**. 109-122.
- [48] United Nations. *Sustainable Development Goals*. Department of Economic and Social Affairs. 2015. https://www.dev-practitioners.eu/media/key_documents/SDGs_Booklet_Web_En.pdf. (acedido a 22 setembro 2021).
- [49] World Health Organization. *Fact sheets on sustainable development goals: health targets - Antimicrobial Resistance*. 2017. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/340814>. (acedido a 22 setembro 2021).
- [50] L. Wöhler, G. Niebaum, M. Krol e A. Y. Hoekstra. The grey water footprint of human and veterinary pharmaceuticals. *Water Res.* 2020. **7**. 100044.
- [51] P. Viana, L. Meisel, A. Lopes, R. de Jesus, G. Sarmento, S. Duarte, B. Sepodes, A. Fernandes, M. M. C. dos Santos, A. Almeida e M. C. Oliveira. Identification of

- Antibiotics in Surface-Groundwater. A Tool towards the Ecopharmacovigilance Approach: A Portuguese Case-Study. *Antibiotics*. 2021. **10**. 888.
- [52] J. N. Russell e C. K. Yost. Alternative, environmentally conscious approaches for removing antibiotics from wastewater treatment systems. *Chemosphere*. 2021. **263**. 128177.
- [53] N. A. Sabri, S. van Holst, H. Schmitt, B. M. van der Zaan, H. W. Gerritsen, H. H. M. Rijnaarts e A. A. M. Langenhoff. Fate of antibiotics and antibiotic resistance genes during conventional and additional treatment technologies in wastewater treatment plants. *Sci. Total Environ*. 2020. **741**. 140199.
- [54] M. J. Fernandes, P. Paíga, A. Silva, C. P. Llaguno, M. Carvalho, F. M. Vázquez e C. Delerue-Matos. Antibiotics and antidepressants occurrence in surface waters and sediments collected in the north of Portugal. *Chemosphere*. 2020. **239**. 124729.
- [55] G. Singh, A. Singh, P. Singh, A. Gupta, R. Shukla e V. K. Mishra. *Sources, fate, and impact of pharmaceutical and personal care products in the environment and their different treatment technologies* em *Microbe Mediated Remediation of Environmental Contaminants*. Woodhead Publishing. 2021. 391-407.
- [56] A. R. B. Iria. *Efeitos da presença de antibióticos nas origens de água. Contribuição para o estudo da sua remoção através de sistemas de tratamento de águas*. Tese de Mestrado em Engenharia do Ambiente. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. 2018. <https://run.unl.pt/handle/10362/56274>. (acedido a 24 setembro 2021).
- [57] T. Nguyen, C. P. Huang, R.-a. Doong, C.-W. Chen e C.-D. Dong. Visible-light photodegradation of sulfamethoxazole (SMX) over Ag-P-codoped g-C₃N₄ (Ag-P@UCN) photocatalyst in water. *Chem. Eng. J.* 2020. **384**. 123383.
- [58] S. Gao, Z. Zhao, Y. Xu, J. Tian, H. Qi, W. Lin e F. Cui. Oxidation of sulfamethoxazole (SMX) by chlorine, ozone and permanganate - A comparative study. *J. Hazard. Mater.* 2014. **274**. 258-269.
- [59] M. Jin, L. Liu, D. Wang, D. Yang, W. Liu, J. Yin, Z. Yang, H. Wang, Z. Qiu, Z. Shen, D. Shi, H. Li, J. Guo e J. Li. Chlorine disinfection promotes the exchange of antibiotic resistance genes across bacterial genera by natural transformation. *ISME J.* 2020. **14**. 1847-1856.
- [60] J. Oh, D. E. Salcedo, C. A. Medriano e S. Kim. Comparison of different disinfection processes in the effective removal of antibiotic-resistant bacteria and genes. *J. Environ. Sci.* 2014. **26**. 1238-1242.
- [61] M. Z. Akbari, Y. Xu, Z. Lu e L. Peng. Review of antibiotics treatment by advance oxidation processes. *Environ. Adv.* 2021. **5**. 100111.
- [62] J. Berges, S. Moles, M. P. Ormad, R. Mosteo e J. Gómez. Antibiotics removal from aquatic environments: adsorption of enrofloxacin, trimethoprim, sulfadiazine, and amoxicillin on vegetal powdered activated carbon. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2021. **28**. 8442-8452.

- [63] Y. Li, L. Wang, F. Chai, H. Jing, Z. Gao, Q. Zhang e X. Zhao. Highly effective removal of antibiotics from aqueous solution by magnetic ZnFe₂O₄/activated carbon composite. *Water Sci. Technol.* 2020. **82**. 877-886.
- [64] F. Yin, S. Lin, X. Zhou, H. Dong e Y. Zhan. Fate of antibiotics during membrane separation followed by physical-chemical treatment processes. *Sci. Total Environ.* 2021. **759**. 143520.
- [65] K. Košutić, D. Dolar, D. Ašperger e B. Kunst. Removal of antibiotics from a model wastewater by RO/NF membranes. *Sep. Purif. Technol.* 2007. **53**. 244-249.
- [66] I. M. F. Cardoso, R. M. F. Cardoso e J. C. G. E. da Silva. Advanced Oxidation Processes Coupled with Nanomaterials for Water Treatment. *J. Nanomater.* 2021. **11**. 2045.
- [67] I. C. Iakovides, I. Michael-Kordatou, N. F. F. Moreira, A. R. Ribeiro, T. Fernandes, M. F. R. Pereira, O. C. Nunes, C. M. Manaia, A. M. T. Silva e D. Fatta-Kassinos. Continuous ozonation of urban wastewater: Removal of antibiotics, antibiotic-resistant *Escherichia coli* and antibiotic resistance genes and phytotoxicity. *Water Res.* 2019. **159**. 333-347.
- [68] J. Lu, Q. Sun, J. Wu e G. Zhu. Enhanced ozonation of antibiotics using magnetic Mg(OH)₂ nanoparticles made through magnesium recovery from discarded bischofite. *Chemosphere.* 2020. **238**. 124694.
- [69] O. A. Alsager, M. N. Alnajrani, H. A. Abuelizz e I. A. Aldaghmani. Removal of antibiotics from water and waste milk by ozonation: kinetics, byproducts, and antimicrobial activity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2018. **158**. 114-122.
- [70] H. Guo, Z. Li, Z. Xie, J. Song, L. Xiang, L. Zhou, C. Li, L. Liuni, J. Li e H. Wang. Accelerated Fenton reaction for antibiotic ofloxacin degradation in discharge plasma system based on graphene-Fe₃O₄ nanocomposites. *Vacuum.* 2021. **185**. 110022.
- [71] F. Wang, Y. Zhang, H. Ming, L. Wang, Z. Zhao, Y. Wang, J. Liang e Y. Qin. Degradation of the ciprofloxacin antibiotic by photo-Fenton reaction using a Nafion/iron membrane: role of hydroxyl radicals. *Environ. Chem. Lett.* 2020. **18**. 1745-1752.
- [72] Y. Q. Zong, S. S. Ma, J. M. Gao, M. J. Xu, J. J. Xue e M. X. Wang. Synthesis of Porphyrin Zr-MOFs for the Adsorption and Photodegradation of Antibiotics under Visible Light. *ACS Omega.* 2021. **6**. 17228-17238.
- [73] Y. Q. He, H. X. Lv, Y. C. Daili, Q. Yang, L. Binnah, D. J. Liu, H. Y. Liu e Z. Y. Ma. Construction of a new cascade photogenerated charge transfer system for the efficient removal of bio-toxic levofloxacin and rhodamine B from aqueous solution: Mechanism, degradation pathways and intermediates study. *Environ. Res.* 2020. **187**. 109647.
- [74] M. Gaeta, G. Sanfilippo, A. Fraix, G. Sortino, M. Barcellona, G. O. Conti, M. E. Fragala, M. Ferrante, R. Purrello e A. D'Urso. Photodegradation of Antibiotics by

- Noncovalent Porphyrin-Functionalized TiO₂ in Water for the Bacterial Antibiotic Resistance Risk Management. *Int. J. Mol. Sci.* 2020. **21**. 3775.
- [75] M. J. F. Calvete, G. Piccirillo, C. S. Vinagreiro e M. M. Pereira. Hybrid materials for heterogeneous photocatalytic degradation of antibiotics. *Coord. Chem. Rev.* 2019. **395**. 63-85.
- [76] H.-Y. Ma, L. Zhao, L.-H. Guo, H. Zhang, F.-J. Chen e W.-C. Yu. Roles of reactive oxygen species (ROS) in the photocatalytic degradation of pentachlorophenol and its main toxic intermediates by TiO₂/UV. *J. Hazard. Mater.* 2019. **369**. 719-726.
- [77] J. C. Barona-Castaño, C. C. Carmona-Vargas, T. J. Brocksom e K. T. de Oliveira. Porphyrins as Catalysts in Scalable Organic Reactions. *Molecules*. 2016. **21**. 310.
- [78] M. Imran, M. Ramzan, A. K. Qureshi, M. A. Khan e M. Tariq. Emerging Applications of Porphyrins and Metalloporphyrins in Biomedicine and Diagnostic Magnetic Resonance Imaging. *Biosensors*. 2018. **8**. 95.
- [79] S. Nakagaki, G. K. Ferreira, G. M. Ucoski e K. A. D. de Freitas Castro. Chemical reactions catalyzed by metalloporphyrin-based metal-organic frameworks. *Molecules*. 2013. **18**. 7279-7308.
- [80] A. M. R. Gonsalves e M. M. Pereira. State of the art in the development of biomimetic oxidation catalysts. *J. Mol. Catal. A. Chem.* 1996. **113**. 209-221.
- [81] M. J. F. Calvete, M. Piñeiro, L. D. Dias e M. M. Pereira. Hydrogen Peroxide and Metalloporphyrins in Oxidation Catalysis: Old Dogs with Some New Tricks. *ChemCatChem*. 2018. **10**. 3615-3635.
- [82] M. M. Pereira, L. D. Dias e M. J. F. Calvete. Metalloporphyrins: Bioinspired Oxidation Catalysts. *ACS Catal.* 2018. **8**. 10784-10808.
- [83] A. S. Guimarães, B. Schmitberger, A. M. Meireles, D. C. d. S. Martins e G. de Freitas-Silva. An eco-friendly approach to the cyclohexane oxidation catalyzed by manganese porphyrins: Green and solvent-free systems. *Polyhedron*. 2019. **163**. 144-152.
- [84] M. G. de Araujo Tôrres, V. S. da Silva, Y. M. Idemori e G. DeFreitas-Silva. Manganese porphyrins as efficient catalysts in solvent-free cyclohexane oxidation. *Arab. J. Chem.* 2020. **13**. 1563-1574.
- [85] V. S. da Silva, Y. M. Idemori e G. de Freitas-Silva. Biomimetic alkane oxidation by iodosylbenzene and iodobenzene diacetate catalyzed by a new manganese porphyrin: Water effect. *Appl. Catal. A. Gen.* 2015. **498**. 54-62.
- [86] A. L. Almeida Lage, J. M. Ribeiro, E. M. de Souza-Fagundes, M. F. Brugnera e D. C. d. S. Martins. Efficient atrazine degradation catalyzed by manganese porphyrins: Determination of atrazine degradation products and their toxicity evaluation by human blood cells test models. *J. Hazard. Mater.* 2019. **378**. 120748.
- [87] A. Goti e F. Cardona. *Hydrogen Peroxide in Green Oxidation Reactions: Recent Catalytic Processes em Green Chemical Reactions*. Springer. 2006.

- [88] E. M. Cuerda-Correa, M. F. Alexandre-Franco e C. Fernández-González. Advanced Oxidation Processes for the Removal of Antibiotics from Water. An Overview. *Water*. 2020. **12**. 102.
- [89] V. M. F. d. C. Homem. *Tecnologias Alternativas de Remoção de Antibióticos de Águas Contaminadas*. Doutorado em Engenharia do Ambiente. Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto. 2011. <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/63373/1/000149246.pdf>. (acedido a 26 setembro 2022).
- [90] S. L. H. Rebelo, M. M. Pereira, M. M. Q. Simões, M. G. P. M. S. Neves e J. A. S. Cavaleiro. Mechanistic studies on metalloporphyrin epoxidation reactions with hydrogen peroxide: evidence for two active oxidative species. *J. Catal.* 2005. **234**. 76-87.
- [91] M. Linhares. *Síntese Biomimética e Caracterização de Novos Derivados da Acridina*. Tese de mestrado em Química. Departamento de Química e Bioquímica, Universidade do Porto. 2013. https://sigarra.up.pt/fcup/pt/pub_geral.pub_view?pi_pub_base_id=24337. (acedido a 28 setembro 2021).
- [92] A. M. Meireles, A. L. A. Lage, J. M. Ribeiro, M. A. N. da Silva, E. M. de Souza-Fagundes e D. C. D. Martins. Synthetic Mn(III) porphyrins as biomimetic catalysts of CYP450: Degradation of antibiotic norfloxacin in aqueous medium. *Environ. Res.* 2019. **177**. 108615.
- [93] M. Y. Hyun, Y. D. Jo, J. H. Lee, H. G. Lee, H. M. Park, I. H. Hwang, K. B. Kim, S. J. Lee e C. Kim. Remarkable Solvent, Porphyrin Ligand, and Substrate Effects on Participation of Multiple Active Oxidants in Manganese(III) Porphyrin Catalyzed Oxidation Reactions. *Chem. Eur. J.* 2013. **19**. 1810-1818.
- [94] A. L. A. Lage, A. M. Meireles, A. C. Marciano, J. M. Ribeiro, E. M. de Souza-Fagundes e D. C. D. Martins. Ciprofloxacin degradation by first-, second-, and third-generation manganese porphyrins. *J. Hazard. Mater.* 2018. **360**. 445-451.
- [95] A. L. A. Lage, A. C. Marciano, M. F. Venancio, M. A. N. da Silva e D. C. D. Martins. Water-soluble manganese porphyrins as good catalysts for cipro- and levofloxacin degradation: Solvent effect, degradation products and DFT insights. *Chemosphere*. 2021. **268**. 129334.
- [96] G. Piccirillo, M. Moreira-Santos, M. Valega, M. E. S. Eusebio, A. M. S. Silva, R. Ribeiro, H. Freitas, M. M. Pereira e M. J. F. Calvete. Supported metalloporphyrins as reusable catalysts for the degradation of antibiotics: Synthesis, characterization, activity and ecotoxicity studies. *Appl. Catal. B. Environ.* 2021. **282**. 119556.
- [97] W. Lohmann e U. Karst. Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008. **391**. 79-96.
- [98] M. J. F. Calvete, M. Silva, M. M. Pereira e H. D. Burrows. Inorganic helping organic: recent advances in catalytic heterogeneous oxidations by immobilised

- tetrapyrrolic macrocycles in micro and mesoporous supports. *RSC Adv.* 2013. **3**. 22774-22789.
- [99] S. Nakagaki, G. K. B. Ferreira, A. L. Marcalb e K. J. Ciuffi. Metalloporphyrins Immobilized on Silica and Modified Silica as Catalysts in Heterogeneous Processes. *Curr. Org. Synth.* 2014. **11**. 67-88.
- [100] M. Miceli, P. Frontera, A. Macario e A. Malara. Recovery/Reuse of Heterogeneous Supported Spent Catalysts. *Catalysts.* 2021. **11**. 591.
- [101] M. Baumann, T. S. Moody, M. Smyth e S. Wharry. A Perspective on Continuous Flow Chemistry in the Pharmaceutical Industry. *Org. Process Res. Dev.* 2020. **24**. 1802-1813.
- [102] C. A. Hone e C. O. Kappe. Towards the Standardization of Flow Chemistry Protocols for Organic Reactions. *Chem. Methods.* 2021. **1**. 454-467.
- [103] M. B. Plutschack, B. Pieber, K. Gilmore e P. H. Seeberger. The Hitchhiker's Guide to Flow Chemistry. *Chem. Rev.* 2017. **117**. 11796-11893.
- [104] F. Darvas, G. Gorman e V. Hessel. *Flow Chemistry – Fundamentals*. De Gruyter. 2014.
- [105] D. Cambié, C. Bottecchia, N. J. W. Straathof, V. Hessel e T. Noël. Applications of Continuous-Flow Photochemistry in Organic Synthesis, Material Science, and Water Treatment. *Chem. Rev.* 2016. **116**. 10276-10341.
- [106] Advanced Chemical Systems. Continuous Flow Wastewater Treatment. <https://advancedchemsys.com/continuous-flow-wastewater-treatment/>. (acedido a 18 julho 2022).
- [107] W. W. E. Systems. WESCOR Wastewater & Environmental Systems. Continuous Flow Treatment System. <http://www.wes-cor.ca/equipment/continuous-flow-system/>. (acedido a 18 julho 2022).
- [108] D. G. Ebsa e W. T. Dibaba. Assessment of drinking water treatment and disinfection by-products. *S. Afr. J. Chem. Eng.* 2022. **41**. 85-92.
- [109] G. Tchobanoglous, J. Kenny e H. Leverenz. Rationale for constant flow to optimize wastewater treatment and advanced water treatment performance for potable reuse applications. *Water Environ. Res.* 2021. **93**. 1231-1242.
- [110] A. L. Fornazari, V. F. Labriola, B. F. da Silva, L. F. Castro, J. R. Perussi, E. M. Vieira e E. B. Azevedo. Coupling Zero-Valent Iron and Fenton processes for degrading sulfamethazine, sulfathiazole, and norfloxacin. *J. Environ. Chem. Eng.* 2021. **9**. 105761.
- [111] C. Y. Zhou, H. Y. Zhou, Y. Yuan, J. L. Peng, G. Yao, P. Zhou e B. Lai. Coupling adsorption and *in-situ* Fenton-like oxidation by waste leather-derived materials in continuous flow mode towards sustainable removal of trace antibiotics. *Chem. Eng. J.* 2021. **420**. 130370.
- [112] H. F. Tang, Z. Y. Zhu, Q. Shang, Y. H. Tang, D. Y. Zhang, Y. Du, M. J. Liu, K. Yin e C. B. Liu. Highly Efficient Continuous-Flow Electro-Fenton Treatment of Antibiotic

- Wastewater Using a Double-Cathode System. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2021. **9**. 1414-1422.
- [113] Z. Z. Li, C. S. Shen, Y. B. Liu, C. Y. Ma, F. Li, B. Yang, M. H. Huang, Z. W. Wang, L. M. Dong e S. Wolfgang. Carbon nanotube filter functionalized with iron oxychloride for flow-through electro-Fenton. *Appl. Catal. B. Environ.* 2020. **260**. 118204.
- [114] Q. Cao, L. Sang, J. C. Tu, Y. S. Xiao, N. Liu, L. D. Wu e J. S. Zhang. Rapid degradation of refractory organic pollutants by continuous ozonation in a micro-packed bed reactor. *Chemosphere*. 2021. **270**. 128621.
- [115] Q. Cao, F. Y. Lou, N. Liu, J. S. Zhang e L. D. Wu. Continuous Catalytic Ozonation of Antibiotics Using Mn and Cu Oxides on gamma-Al₂O₃ Pellets in a Micropacked Bed Reactor. *ACS ES&T Water*. 2021. **1**. 1911-1920.
- [116] S. Ahmad, W. Sebai, M. P. Belleville, N. Brun, A. Galarneau e J. Sanchez-Marcano. Enzymatic monolithic reactors for micropollutants degradation. *Catal. Today*. 2021. **362**. 62-71.
- [117] S. N. Yang, Y. B. Liu, C. S. Shen, F. Li, B. Yang, M. H. Huang, M. Yang, Z. W. Wang e W. Sand. Rapid decontamination of tetracycline hydrolysis product using electrochemical CNT filter: Mechanism, impacting factors and pathways. *Chemosphere*. 2020. **244**. 125525.
- [118] R. S. Rocha, R. B. Valim, L. C. Trevelin, F. L. Silva, J. R. Steter, M. Zaiat e M. R. V. Lanza. New operational mode of an electrochemical reactor and its application to the degradation of levofloxacin. *J. Environ. Chem. Eng.* 2017. **5**. 4441-4446.
- [119] A. F. Du, H. F. Fu, P. Wang, C. Zhao e C. C. Wang. Enhanced catalytic peroxymonosulfate activation for sulfonamide antibiotics degradation over the supported CoS_x-CuS_x derived from ZIF-L (Co) immobilized on copper foam. *J. Hazard. Mater.* 2022. **426**. 128134.

CAPÍTULO 2

Síntese e caracterização estrutural de catalisadores metaloporfirinas

Como mencionado anteriormente, existe um grande interesse na utilização de metaloporfirinas como catalisadores na degradação de antibióticos, na presença de um oxidante, como por exemplo peróxido de hidrogénio, um oxidante verde, barato, abundante e seguro.¹ Na presença de um oxidante do tipo peróxido é possível ocorrer a clivagem homolítica ou heterolítica da ligação O–O, que levam à formação de espécies hidroperoxo e espécies *oxo*, respetivamente. A formação de espécies hidroperoxo são normalmente favorecidas quando o macrociclo da porfirina apresenta grupos alquilos como substituintes. Por outro lado, a formação de espécies *oxo* é favorecida pela presença de grupos atratores de eletrões no macrociclo.² Contudo, as porfirinas contendo átomo halogénio em posições *orto* nos grupos *meso*-arilo são considerados mais eficientes e estáveis, quando comparados com porfirinas sem esses grupos.³⁻⁹ Além disso, com a utilização do peróxido de hidrogénio como oxidante, a escolha do metal central a introduzir na cavidade da porfirina recai sobre o Fe(III) e Mn(III) como os metais mais adequados para que exista uma produção eficaz de espécies reativas de oxigénio.^{5,}

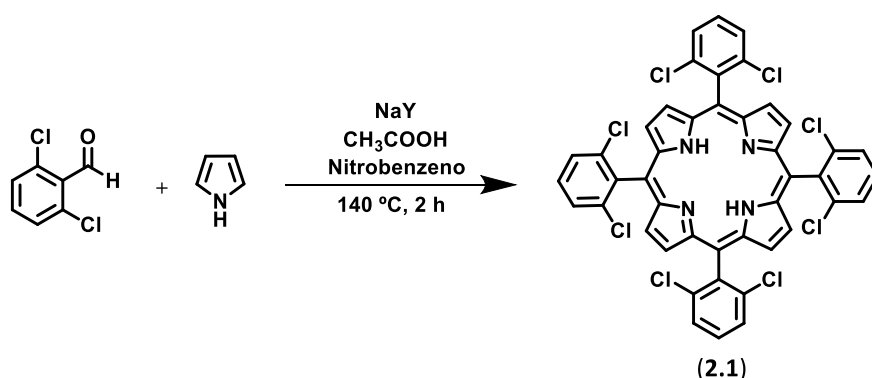
7, 10, 11

Trabalhos realizados anteriormente no Laboratório de Catálise e Química Fina do Centro de Química de Coimbra, demonstraram o potencial da utilização de metaloporfirinas halogenadas como catalisadores eficientes na degradação de antibióticos.⁹ Por esse motivo, os estudos iniciaram-se com a preparação de uma porfirina contendo halogéneos (grupos cloro) nas posições *orto* dos grupos *meso*-arilo das porfirinas. Com vista a obtenção de uma porfirina solúvel em água, a estratégia sintética consistiu na reação de clorossulfonação da porfirina halogenada, seguida de

uma reação de hidrólise. Por outro lado, de forma a obter um catalisador heterogéneo através da imobilização da porfirina contendo grupos cloro num suporte sólido proceder-se-á à sua clorossulfonação seguida de uma reação de substituição nucleofílica com sílica funcionalizada com grupos 3-aminopropilo para a obtenção de um catalisador imobilizado heterogéneo. Finalmente, as porfirinas de base livre serão complexadas com um sal de manganês(II), de modo a obter os respetivos complexos metálicos de manganês(III).

2.1. Síntese de porfirinas

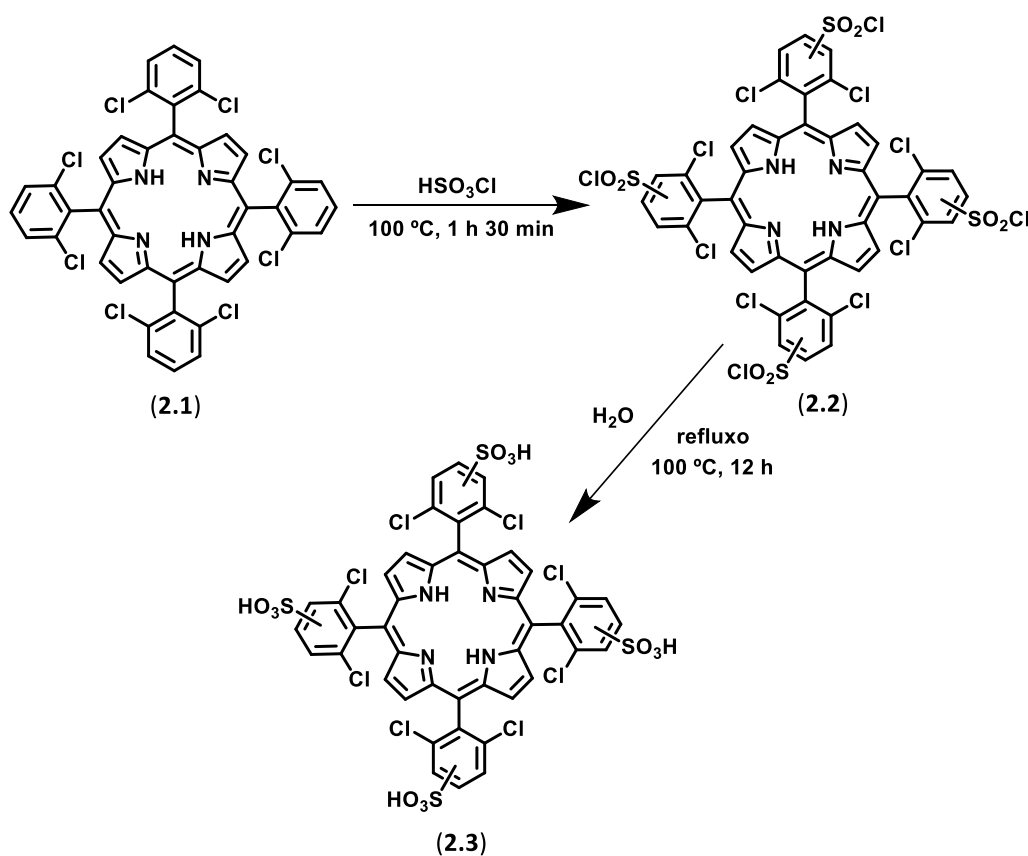
Desta forma, efetuou-se a síntese da 5,10,15,20-tetra(2,6-diclorofenil) porfirina, utilizando o método descrito por *Pereira*^{12, 13}, designado por método de nitrobenzeno/NaY. Num balão de fundo redondo colocou-se ácido acético/nitrobenzeno (2:1), de seguida adicionou-se NaY e 2,6-diclorobenzaldeído (60 mmol). A mistura foi aquecida até aos 140 °C, seguida da adição de pirrol (60 mmol) gota a gota. A mistura permaneceu em agitação magnética a 140 °C durante 2 horas. Após arrefecimento da mistura, o NaY foi removido por filtração e adicionou-se metanol para promover a precipitação do composto pretendido (**Esquema 2.1**). A porfirina **2.1** obtida foi isolada com um rendimento de 4%, estando este valor e a sua caracterização, concordantes com os dados reportados na literatura.^{14, 15}



Esquema 2.1. Síntese de 5,10,15,20-tetra(2,6-diclorofenil)porfirina (**2.1**).

Tendo como objetivo modular as características da porfirina, procedeu-se à reação de clorossulfonação de **2.1**. Seguidamente, para obter uma porfirina solúvel em

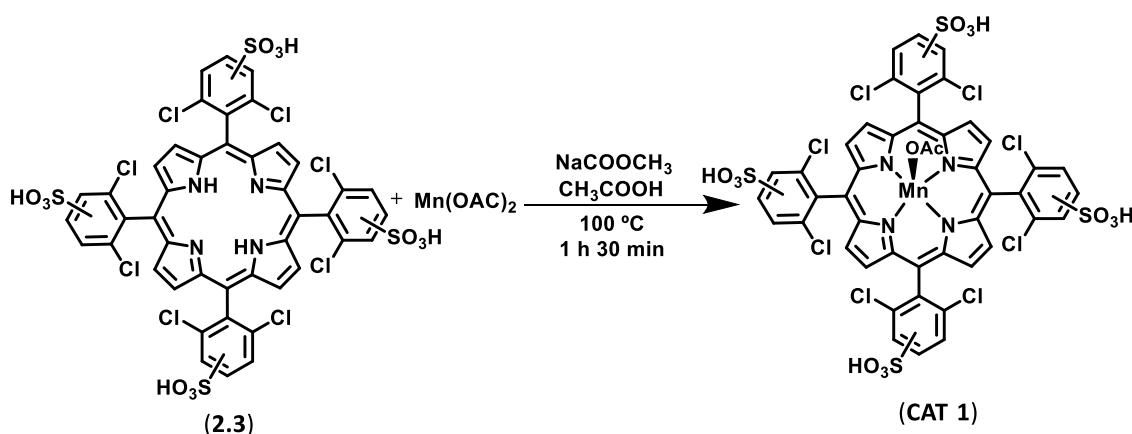
meio aquoso, promoveu-se a hidrólise de **2.2** obtendo-se uma porfirina sulfonada **2.3** (TDCPPSO₃H) (**Esquema 2.2**). Estes processos foram realizados de forma sequencial sem isolar os produtos intermediários obtidos, de forma a minimizar as perdas de composto e otimizar o processo de síntese da porfirina sulfonada **2.3**. Para tal, seguindo procedimentos descritos na literatura,¹⁴ procedeu-se à reação de clorossulfonação da TDCPP (**2.1**) (0,23 mmol) dissolvida num excesso de ácido clorossulfónico. A reação foi colocada a 100 °C durante 1 h e 30 min. Após arrefecimento, adicionou-se clorofórmio ao crude de reação de forma a diluir os ácidos presentes e, desta forma, permitir a realização de uma lavagem com água, em contínuo. Após a neutralização do ácido remanescente com adições de solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio, seguida de uma extração da fase orgânica, a solução orgânica de **2.2**. foi evaporada, tendo-se prosseguido para a sua respetiva hidrólise sem isolamento, em 100 mL de água e colocada em refluxo a 100 °C durante 12h. Após este tempo, evaporou-se a água e isolou-se o composto, tendo-se obtido a porfirina **2.3** com um rendimento de 74%, estando este valor de acordo com os dados reportados na literatura.^{14, 16, 17}



Esquema 2.2. Síntese de TDCPPSO₃H (**2.3**).

2.2. Síntese e caracterização do catalisador metaloporfirina

Tendo em consideração que o objetivo deste trabalho se centra na degradação de antibióticos via catálise oxidativa, é necessário realizar-se a complexação da porfirina **2.3** com manganês (II), por forma a obter-se a respetiva metaloporfirina. A complexação foi realizada de acordo com os procedimentos descritos na literatura⁹ (**Esquema 2.3**). Desta forma, para a obtenção da metaloporfirina desejada recorreu-se a uma reação de complexação da porfirina **2.3**. (0,12 mmol) com 6 equivalentes de acetato de manganês (II) e 4 equivalentes de acetato de sódio, dissolvidos em 6 mL de ácido acético. A mistura foi colocada a 100 °C durante 1 h 30 min, tendo sido controlada por espectroscopia UV-Vis. Após o seu procedimento de purificação, obteve-se o **CAT 1** com um rendimento de 86%, cuja caracterização está de acordo com a literatura.¹⁴



Esquema 2.3. Síntese de MnTDCPPSO₃H (**CAT 1**).

A **Figura 2.1** apresenta os espectros de UV-Visível da porfirina **2.3** e a sua respetiva metaloporfirina (**CAT 1**). No caso do espectro de **2.3** observa-se o espectro característico de uma porfirina de base livre, sendo que esta apresenta uma banda de elevada intensidade a 413 nm correspondente à banda *Soret*. Após a complexação com o sal de manganês (II), observa-se o desvio batocrómico da banda *Soret* passando a apresentar um máximo de absorção a 464 nm. Observa-se, também, no espectro de **CAT 1** as bandas de transferência de carga Metal-Ligando (do inglês, *Metal to Ligand charge transfer* - MLCT) e transferência de carga Ligando-Metal (do inglês, *Ligand to Metal charge transfer* - LMCT).

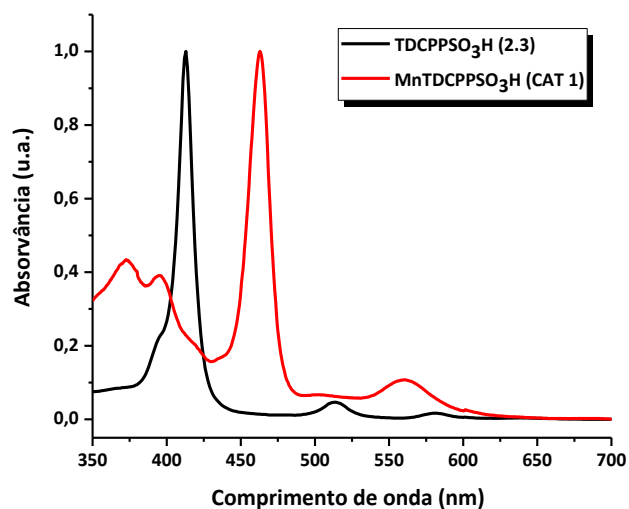


Figura 2.1. Espectros normalizados de UV-Visível registados em água destilada de TDCPPSO₃H (preto) e **CAT 1** (vermelho).

Desta forma, obteve-se uma metaloporfirina que irá ser aplicada em estudos como catalisador homogêneo em reações de degradação oxidativa de antibióticos em *batch* e fluxo contínuo.

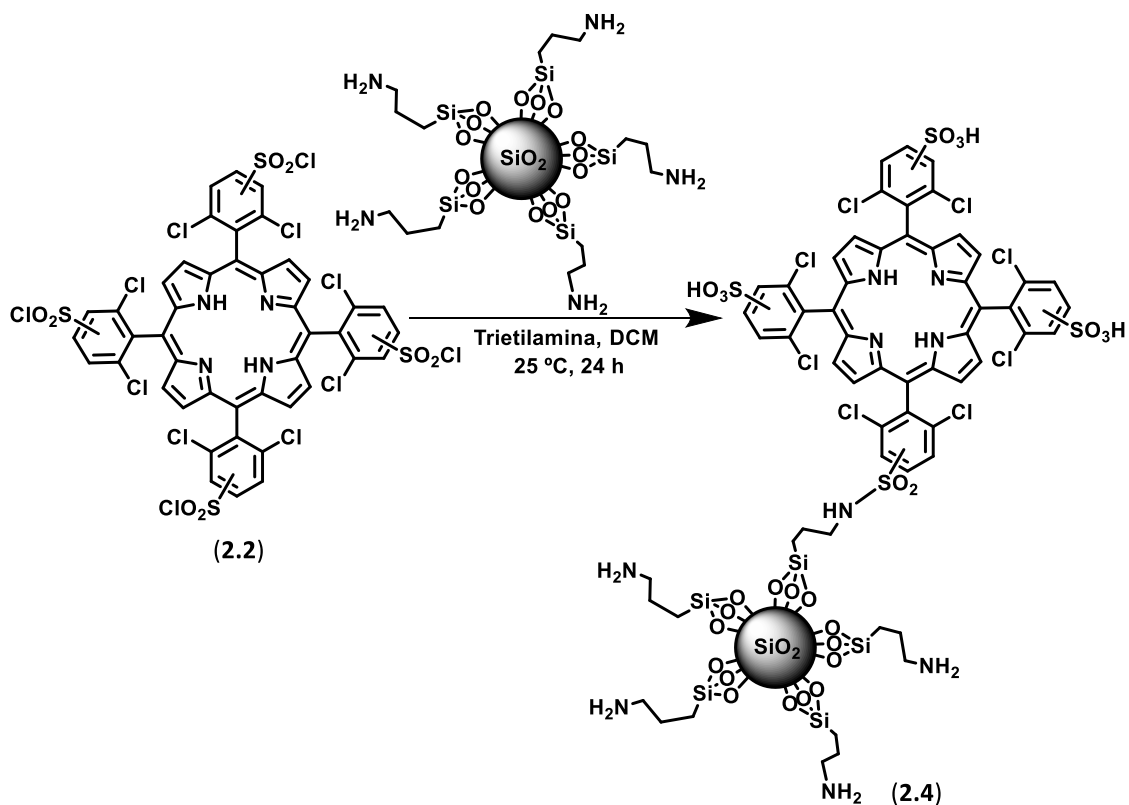
2.3. Preparação e caracterização da metaloporfirina imobilizada num suporte inorgânico

Tal como referido anteriormente, o objetivo deste trabalho centra-se na síntese de um catalisador do tipo metaloporfirina, contudo, a utilização de um catalisador homogêneo aplicado à remediação ambiental apresenta algumas desvantagens destacando a impossibilidade de recuperação e reutilização do catalisador. Neste sentido, a imobilização da metaloporfirina **CAT 1** num suporte inorgânico torna-se um ponto importante permitindo a realização de estudos de degradação em meio heterogêneo e a possível reutilização do catalisador. A imobilização de metaloporfirinas em materiais sólidos permite conjugar a capacidade da formação de ROS que levam à degradação de poluentes e a possível reutilização deste material orgânico-inorgânico.¹⁰

Uma das abordagens para a imobilização de porfirinas é a utilização de sílica gel como suporte, uma vez que esta é considerada um sólido inorgânico versátil, inerte e estável térmica e quimicamente em diferentes condições.¹⁸

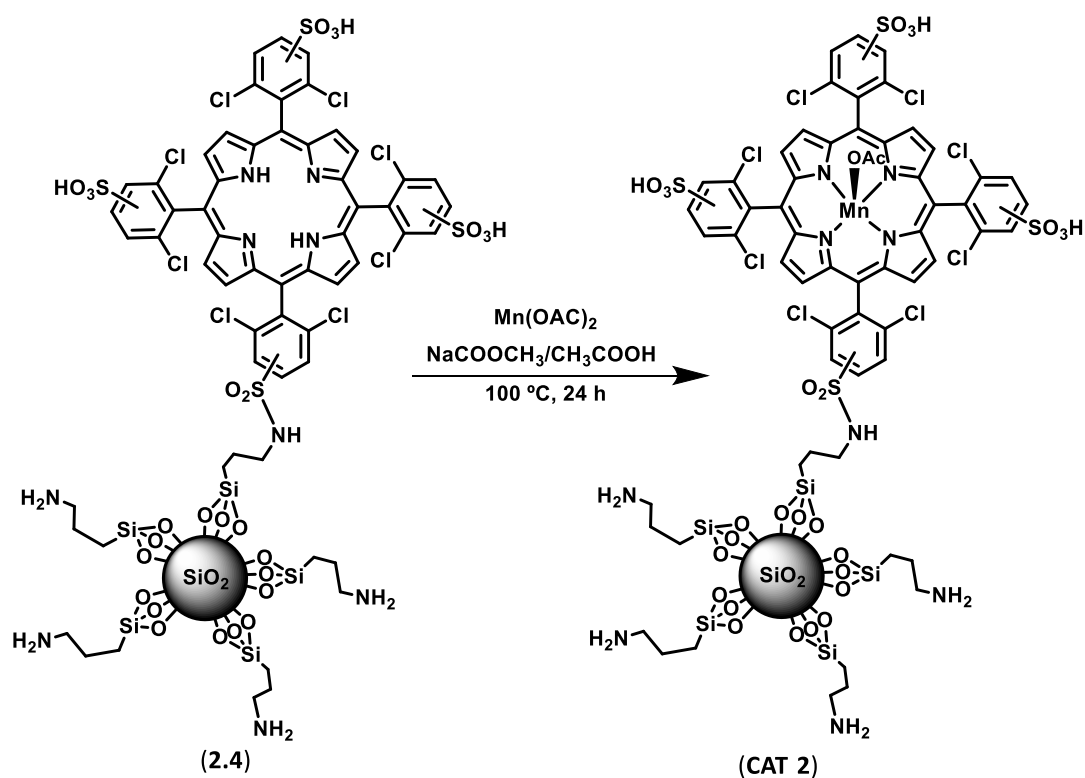
Desta forma, partindo da porfirina diclorada clorossulfonada **2.2**, procedeu-se a uma reação de substituição nucleofílica utilizando sílica funcionalizada com grupos 3-aminopropilo (**Esquema 2.4**).

A síntese do catalisador híbrido teve como base o procedimento experimental descrito na literatura.⁹ Iniciou-se esta síntese pela realização da clorossulfonação de **2.1** (0,23 mmol), obtendo-se a porfirina **2.2** à qual, sem isolamento foi adicionada sílica funcionalizada com grupos 3-aminopropilo (3 g, 1 mmol de NH₂ por grama) e trietilamina (42mL, 0,30 mol). A mistura reacional foi deixada sob agitação à temperatura ambiente durante 24 horas. Após as 24 horas de reação, procedeu-se à recuperação e realização de sucessivas lavagens do material sólido resultante por centrifugação a fim de remover quaisquer reagentes/solventes da mistura reacional, particularmente a porfirina **2.2** que não se ligou covalentemente à sílica funcionalizada.



Esquema 2.4. Síntese de TDCPPSO₂@NHpropil-SiO₂ (**2.4**).

Finalmente, de forma a obter o catalisador heterogêneo desejado, procedeu-se à complexação do material TDCPPSO₂@NHpropil-SiO₂ (**2.4**) com um sal de manganês. Num balão de fundo redondo colocou-se 850 mg de **2.4**, Mn(OAc)₂ (260 mg, 1,8 mmol) e 20 mL de solução saturada de NaCH₃COO em CH₃COOH. A mistura foi colocada a 100 °C durante 24 h. Após este tempo, a reação foi arrefecida até à temperatura ambiente e procedeu-se à lavagem do material obtido com álcool isopropílico a fim de remover quaisquer sais de manganês ainda presentes (**Esquema 2.5**).



Esquema 2.5. Síntese de MnTDCPPSO₂@NHpropil-SiO₂ (**CAT 2**).

Após a secagem do material obtido, procedeu-se à aquisição do espectro UV-Visível de estado sólido para o **CAT 2**. Na **Figura 2.2** apresentam-se os dois espectros UV-Vis, do **CAT 2** em estado sólido e da metaloporfirina **CAT 1** em solução, por forma a comparar a absorção dos dois compostos e demonstrar a presença da metaloporfirina **CAT 1** na sílica funcionalizada.

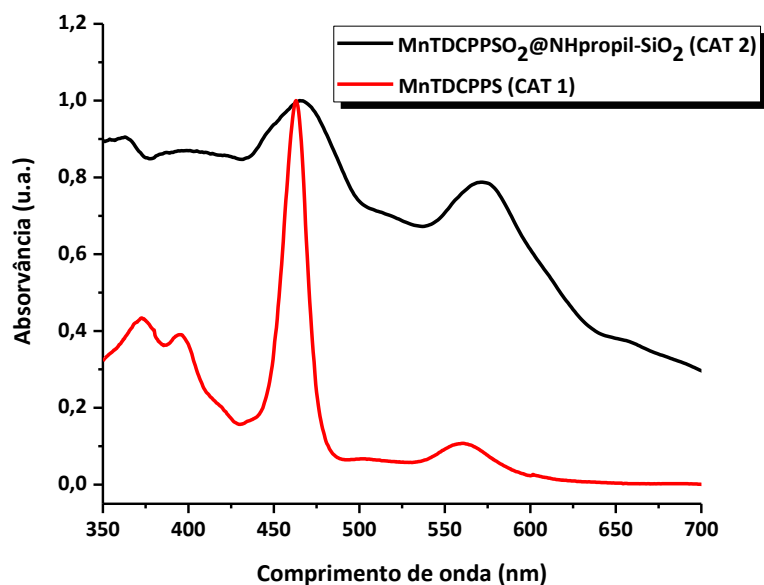


Figura 2.2. Espectros normalizados de UV-Visível de estado sólido e em solução de **CAT 2** (preto) e **CAT 1** (vermelho), respectivamente. O espectro de **CAT 1** foi registrado em água destilada.

Comparando os espectros de UV-Visível do catalisador híbrido **CAT 2** com a metaloporfirina **CAT 1**, observa-se um ligeiro deslocamento batocrômico na banda *Soret*, com o deslocamento de 464 nm para 466 nm. No caso das bandas Q, estas sofreram um maior deslocamento com a passagem de uma absorvância máxima a 562 nm para 570 nm. No caso do espectro de metaloporfirina registrado em solução é possível observar as bandas de transferência de carga Metal-Ligando (do inglês, *Metal to Ligand charge transfer* - MLCT) e transferência de carga Ligando-Metal (do inglês, *Ligand to Metal charge transfer* - LMCT).

O **CAT 2** foi também caracterizado por análise termogravimétrica de forma a quantificar diretamente a metaloporfirina que se encontra covalentemente ligada à sílica funcionalizada (**Figura 2.3**).

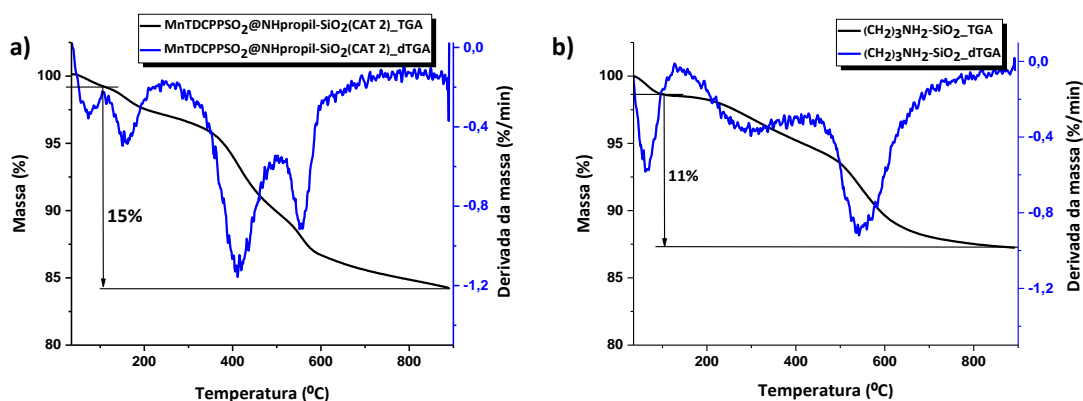


Figura 2.3. Termogramas de perda de massa (preto) e derivada da perda de massa (azul) em função da temperatura de **a) CAT 2** e **b) (CH₂)₃NH₂-SiO₂**.

As análises termogravimétricas foram todas realizadas num intervalo de aquecimento de 35 °C a 900 °C com uma taxa de velocidade de aquecimento de 20 °C/min. Analisando o termograma obtido para **CAT 2 (Figura 2.3a)** observa-se uma perda de massa, entre 35 °C e 120 °C que corresponde à perda de água. Com o aumento da temperatura, observa-se uma perda de massa gradual através da existência de três passos de perda de massa, resultando numa perda de massa total de 15%. A curva da derivada da massa revela dois primeiros passos de perda de massa, entre 130 °C e 450 °C, sendo estes atribuídos à degradação da parte orgânica associada à porfirina. Observando o perfil do termograma de sílica funcionalizada com grupos 3-aminopropil (**Figura 2.3b**), observa-se uma perda de massa associada à degradação dos grupos aminopropilsilicatos, entre 500 °C até 900 °C. Desta forma, a curva da derivada da massa para **CAT 2** apresenta uma perda de massa entre 500 °C até 900 °C, que se deve à degradação dos grupos aminopropilsilicatos. Considerando a diferença entre a perda de massa de **CAT 2** e da sílica funcionalizada com grupos 3-aminopropilo obteve-se um valor de 4%. Este valor corresponde à massa de porfirina covalentemente ligada ao suporte inorgânico. A partir deste valor percentual e da massa molecular da componente orgânica, foi determinada uma quantidade de $3,4 \times 10^{-5}$ mol de porfirina imobilizada por g de sílica funcionalizada. Tendo em conta o processo sequencial de clorossulfonação de **2.1** ($2,3 \times 10^{-4}$ mol) em **2.2**. e sua respetiva imobilização em 3 g de sílica funcionalizada, assume-se uma quantidade teórica de $7,7 \times 10^{-5}$ mol por g de suporte inorgânico. Desta forma, o rendimento de imobilização obtido foi de 44%.

De forma a quantificar a quantidade de metaloporfirina ligada covalentemente à sílica, procedeu-se à análise por ICP-OES. Esta análise direta revelou um valor de Mn (III) de 1,7% (m/m), obtendo-se uma quantidade de $3,1 \times 10^{-5}$ mol de metaloporfirina por g de material. Este valor é muito semelhante ao valor obtido por termogravimetria, sendo corroborado pela inexistência da banda *Soret* característica da porfirina não metalada no espectro UV-Visível de estado sólido. Portanto, obteve-se um rendimento da reação de complexação de 84% o que se traduz numa quantidade de $3,1 \times 10^{-5}$ mol de metaloporfirina imobilizada por g de sílica funcionalizada.

De forma a analisar a diferença da morfologia entre a superfície de sílica funcionalizada e a superfície do **CAT 2**, procedeu-se a análise por microscopia eletrónica de varrimento (do inglês, *Scanning electron microscope* - SEM) de ambos os materiais. Na **Figura 2.4a** observa-se que as partículas de sílica apresentam tamanhos entre 40 e 60 μm , sendo estes tamanhos confirmados pela companhia *Sigma Aldrich* à qual se adquiriu o composto. No caso da **Figura 2.4b** do **CAT 2** observa-se uma diminuição do tamanho das partículas para tamanhos entre 5 e 35 μm que poderá estar associada à fragmentação das partículas pelo processo de homogeneização com recurso a agitadores magnéticos durante a reação de imobilização.

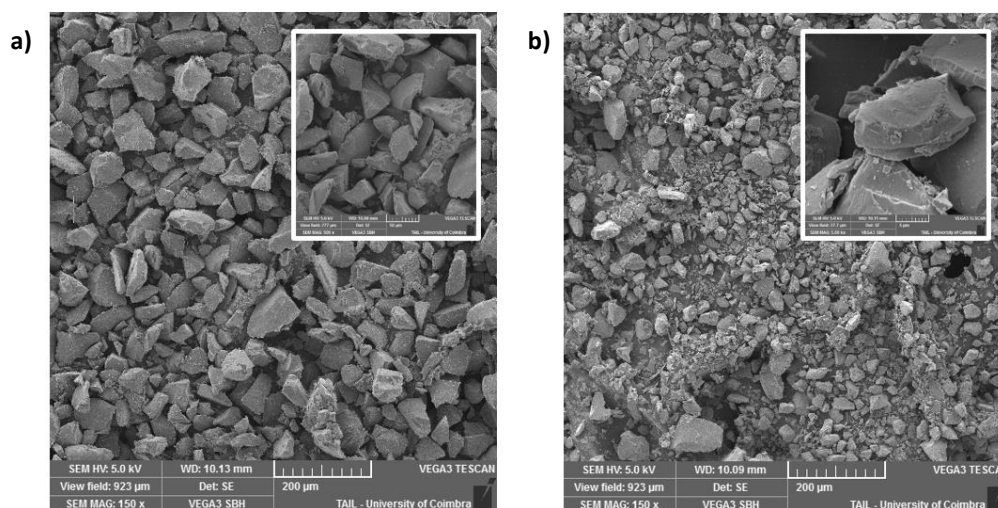


Figura 2.4. Imagens obtidas por SEM de **a)** sílica funcionalizada com grupos 3-aminopropilo (ampliação = 150 \times ; zoom: ampliação = 500 \times) e **b)** catalisador MnTDCPPSO₂@NHpropil-SiO₂ (ampliação = 150 \times ; zoom: ampliação = 5000 \times).

Em suma, neste capítulo foram desenvolvidas rotas sintéticas para a obtenção de dois catalisadores metaloporfirinas, partindo de uma porfirina diclorada. O **CAT 1**,

um catalisador solúvel em meio aquoso que permite a realização de reações em meio homogêneo, e o **CAT 2**, um catalisador metaloporfirina imobilizado num suporte inorgânico o que possibilita a sua reutilização.

Os complexos metálicos obtidos foram avaliados como catalisadores em reações de degradação oxidativa de antibióticos em meio homogêneo e heterogêneo em *batch* e fluxo contínuo, estando os resultados obtidos descritos no Capítulo 3 desta dissertação.

2.4. Referências

- [1] A. Goti e F. Cardona. *Hydrogen Peroxide in Green Oxidation Reactions: Recent Catalytic Processes em Green Chemical Reactions*. Springer. 2006.
- [2] A. M. Meireles, A. L. A. Lage, J. M. Ribeiro, M. A. N. da Silva, E. M. de Souza-Fagundes e D. C. D. Martins. Synthetic Mn(III) porphyrins as biomimetic catalysts of CYP450: Degradation of antibiotic norfloxacin in aqueous medium. *Environ. Res.* 2019. **177**. 108615.
- [3] A. C. Serra, E. C. Marçalo e A. M. d. A. Rocha Gonsalves. A view on the mechanism of metalloporphyrin degradation in hydrogen peroxide epoxidation reactions. *J. Mol. Catal. A. Chem.* 2004. **215**. 17-21.
- [4] D. Dolphin, T. G. Traylor e L. Y. Xie. Polyhaloporphyrins: Unusual Ligands for Metals and Metal-Catalyzed Oxidations. *Acc. Chem. Res.* 1997. **30**. 251-259.
- [5] A. M. R. Gonsalves e M. M. Pereira. State of the art in the development of biomimetic oxidation catalysts. *J. Mol. Catal. A. Chem.* 1996. **113**. 209-221.
- [6] E. I. G. Azenha, A. C. Serra, M. Pineiro, M. M. Pereira, J. Seixas de Melo, L. G. Arnaut, S. J. Formosinho e A. M. R. Gonsalves. Heavy-atom effects on metalloporphyrins and polyhalogenated porphyrins. *J. Chem. Phys.* 2002. **280**. 177-190.
- [7] S. L. H. Rebelo, M. M. Pereira, M. M. Q. Simões, M. G. P. M. S. Neves e J. A. S. Cavaleiro. Mechanistic studies on metalloporphyrin epoxidation reactions with hydrogen peroxide: evidence for two active oxidative species. *J. Catal.* 2005. **234**. 76-87.
- [8] J. Haber, L. Matachowski, K. Pamin e J. Poltowicz. The effect of peripheral substituents in metalloporphyrins on their catalytic activity in Lyons system. *J. Mol. Catal. A. Chem.* 2003. **198**. 215-221.
- [9] G. Piccirillo, M. Moreira-Santos, M. Valega, M. E. S. Eusebio, A. M. S. Silva, R. Ribeiro, H. Freitas, M. M. Pereira e M. J. F. Calvete. Supported metalloporphyrins as reusable catalysts for the degradation of antibiotics: Synthesis, characterization, activity and ecotoxicity studies. *Appl. Catal. B. Environ.* 2021. **282**. 119556.
- [10] M. J. F. Calvete, M. Piñeiro, L. D. Dias e M. M. Pereira. Hydrogen Peroxide and Metalloporphyrins in Oxidation Catalysis: Old Dogs with Some New Tricks. *ChemCatChem*. 2018. **10**. 3615-3635.
- [11] X. Huang e J. T. Groves. Oxygen Activation and Radical Transformations in Heme Proteins and Metalloporphyrins. *Chem. Rev.* 2018. **118**. 2491-2553.
- [12] A. M. R. Gonsalves, J. M. T. B. Varejão e M. M. Pereira. Some new aspects related to the synthesis of *meso*-substituted porphyrins. *J. Heterocycl. Chem.* 1991. **28**. 635-640.
- [13] M. Silva, A. Fernandes, S. S. Bebiano, M. J. F. Calvete, M. F. Ribeiro, H. D. Burrows e M. M. Pereira. Size and ability do matter! Influence of acidity and pore size on

- the synthesis of hindered halogenated *meso*-phenyl porphyrins catalysed by porous solid oxides. *ChemComm*. 2014. **50**. 6571-6573.
- [14] A. M. R. Gonsalves, R. A. W. Johnstone, M. M. Pereira, A. M. P. de SantAna, A. C. Serra, A. Sobral e P. A. Stocks. New procedures for the synthesis and analysis of 5,10,15,20-tetrakis(sulphophenyl)porphyrins and derivatives through chlorosulphonation. *Heterocycles*. 1996. **43**. 829-838.
- [15] E. Silva, M. M. Pereira, H. D. Burrows, M. E. Azenha, M. Sarakha e M. Bolte. Photooxidation of 4-chlorophenol sensitised by iron *meso*-tetrakis(2,6-dichloro-3-sulfophenyl)porphyrin in aqueous solution. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004. **3**. 200-204.
- [16] C. J. P. Monteiro, M. M. Pereira, S. M. A. Pinto, A. V. C. Simões, G. F. F. Sá, L. G. Arnaut, S. J. Formosinho, S. Simões e M. F. Wyatt. Synthesis of amphiphilic sulfonamide halogenated porphyrins: MALDI-TOFMS characterization and evaluation of 1-octanol/water partition coefficients. *Tetrahedron*. 2008. **64**. 5132-5138.
- [17] C. J. P. Monteiro, M. M. Pereira, M. E. Azenha, H. D. Burrows, C. Serpa, L. G. Arnaut, M. J. Tapia, M. Sarakha, P. Wong-Wah-Chung e S. Navaratnam. A comparative study of water soluble 5,10,15,20-tetrakis(2,6-dichloro-3-sulfophenyl)porphyrin and its metal complexes as efficient sensitizers for photodegradation of phenols. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2005. **4**. 617-624.
- [18] S. Nakagaki, G. K. B. Ferreira, A. L. Marcalb e K. J. Ciuffi. Metalloporphyrins Immobilized on Silica and Modified Silica as Catalysts in Heterogeneous Processes. *Curr. Org. Synth.* 2014. **11**. 67-88.

CAPÍTULO 3

Degradação oxidativa de antibióticos

3.1. Análise e seleção do antibiótico alvo

Tal como mencionado, a presença de antibióticos nos ambientes aquáticos acarreta inúmeros problemas, sendo o principal a resistência antimicrobiana. Desta forma, torna-se urgente desenvolver metodologias para a degradação de antibióticos presentes nas águas residuais. O objetivo deste trabalho consiste no desenvolvimento de uma abordagem possível para a resolução deste problema.

Na literatura é referido que o trimetoprim (TMP) é um dos antibióticos mais frequentemente detetados em águas residuais municipais e rurais e águas superficiais com concentrações entre 0,01 µg/L e 800 µg/L.¹ No caso de Portugal, estudos relatam o aparecimento de TMP em rios com concentrações entre 0,06 µg/L e 0,1 µg/L.^{2,3} O TMP é um antibiótico frequentemente utilizado no tratamento de vários tipos de infeções bacterianas como por exemplo, infeções do trato urinário, bronquites, pneumonias e otites.^{4,5} Apesar da sua importância na medicina humana, o TMP é dos antibióticos mais utilizados para fins veterinários, nomeadamente na profilaxia de doenças bacterianas mas também como medicamento administrado em rações em doses elevadas para promoção do crescimento animal.⁶

Sabendo que há a possibilidade de existirem vários antibióticos frequentemente detetados em efluentes hospitalares, estabeleceu-se um protocolo de colaboração com o Instituto Português de Oncologia de Coimbra, no qual foi realizada uma colheita de uma amostra de água residual, em fevereiro de 2022. Esta amostra foi analisada por um laboratório externo acreditado (ALS-Portugal)⁷ para determinação dos compostos

farmacêuticos existentes por LCMS-DI (**Anexo 1**). Na **Tabela 3.1**, estão presentes alguns dos medicamentos encontrados nessa amostra de água residual hospitalar.

Tabela 3.1. Compostos farmacêuticos detetados por LCMS – DI presentes na amostra de água residual hospitalar.

Composto farmacêutico	Concentração (µg/L)
Iopromide	100
Hidroclorotiazida	0,074
Ciclobenzaprina	2,20
Anastrozol	0,542
Tramadol	1,44
Oxazepam	0,202
Furosemida	21,7
Carbamazepina	0,280
Valsartan	0,142
Paracetamol	4,81
Citalopram	0,397
Serytalina	0,046
Indometacina	0,012
Paclitaxel	0,364
Loperamida	0,012
Gabapentina	2,80
Trimetoprim	0,115

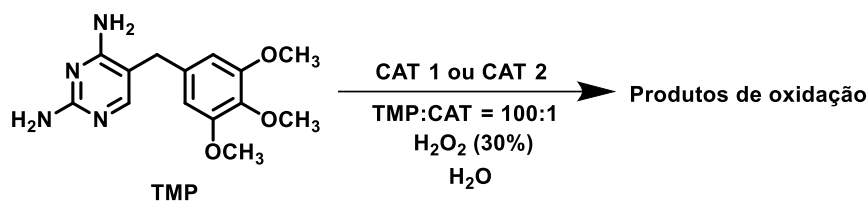
Através do relatório obtido constata-se que o trimetoprim (TMP) foi o único antibiótico detetado entre os diferentes compostos farmacêuticos presentes na amostra, o que motivou a escolha deste antibiótico como sendo o alvo do estudo aqui apresentado nesta dissertação. Nesta amostra de água residual, o TMP foi detetado com uma concentração de 0,115 µg/L.

A utilização de metaloporfirinas aplicadas à degradação de antibióticos tem sido descrita como uma abordagem promissora na degradação destes fármacos, sendo que no caso do TMP, estudos prévios realizados no grupo de Catálise e Química Fina do Centro de Química de Coimbra descreveram a utilização destes catalisadores na catálise oxidativa com H₂O₂.⁸ Deste modo, este trabalho pretende dar continuidade a esses estudos de degradação de TMP na presença de um catalisador reutilizável, permitindo

uma aproximação efetiva ao mundo real, utilizando, para isso, processo em fluxo contínuo. Desta forma, tendo como base o sistema desenvolvido em condições *batch*, procedeu-se a uma transposição seguida das necessárias otimizações para condições em fluxo contínuo. Esta abordagem tem como objetivo a utilização de processos de fluxo contínuo na degradação oxidativa de TMP, utilizando catálise heterogénea com uma metaloporfirina imobilizada num suporte inorgânico. Os resultados encontram-se em detalhe nas secções seguintes.

3.2. Degradação oxidativa de Trimetoprim em condições *batch*

Os estudos de degradação de TMP iniciaram-se com a utilização do catalisador homogéneo **CAT 1** e heterogéneo **CAT 2** aplicado à degradação oxidativa de TMP, em meio aquoso e condições *batch*, seguindo a otimização dos procedimentos descritos no grupo de Catálise e Química Fina do Centro de Química de Coimbra.⁸ Importa referir que foram consideradas como condições *batch* as que são utilizadas numa reação convencional, na qual é usado um vaso reacional de vidro, onde o substrato/reagentes são introduzidos na sua totalidade antes do início da reação, num volume reacional constante. Sendo assim, numa experiência tipo, adicionou-se 20 mL de uma solução-stock de TMP ($[TMP] = 66,8 \mu\text{g/mL}$, $2,3 \times 10^{-4} \text{ M}$) e **CAT 1** ou **CAT 2** para uma relação TMP:CAT 100:1. A mistura foi colocada em agitação à temperatura ambiente durante 15 min e deu-se início à reação com a adição de 30 μL de H_2O_2 (30% m/m) seguida de adições sucessivas de 15 em 15 minutos até se atingir um volume total de 300 μL (2,6 mmol) (**Esquema 3.1**). Para proceder ao controlo da evolução da reação, foram retiradas alíquotas no tempo inicial, ou seja, antes da adição de H_2O_2 e de 15 em 15 minutos, imediatamente antes de cada adição de H_2O_2 . De forma a observar a influência de H_2O_2 na reação catalítica, realizou-se uma reação de controlo utilizando a solução de stock de TMP na ausência de catalisador apenas com a adição sucessiva de H_2O_2 seguindo o protocolo descrito anteriormente. No final de cada reação realizou-se o *quenching* do H_2O_2 com a adição de bissulfito de sódio (NaHSO_3) para impedir a evolução da reação após a experiência.



Esquema 3.1. Degradação oxidativa de TMP em condições *batch* com **CAT 1** e **CAT 2**.

As percentagens de degradação de TMP foram calculadas com recurso a uma reta de calibração obtida por HPLC (detalhes no Capítulo 5 – Experimental, Secção 5.2.XI). Através da reta de calibração foi possível efetuar o cálculo da concentração de TMP no tempo inicial (C_0) e final da reação (C_f), cuja degradação (%) foi calculada de acordo com a **Equação 3.1**.

$$\text{Degradação (\%)} = \frac{C_0 - C_f}{C_0} \times 100$$

Equação 3.1

Na **Tabela 3.2** e **Figura 3.1** estão representados os valores de degradação em percentagem e respetivos cromatogramas, obtidos para a degradação oxidativa de TMP em *batch* na presença dos catalisadores **CAT 1** e **CAT 2**.

Tabela 3.2. Degradação de TMP obtida em condições *batch*, usando H_2O_2 como oxidante, em meio aquoso.

Entrada ^{a)}	Catalisador ^{b)}	Degradação (%) ^{c)}
1	CAT 1 (homogénea)	94
2	CAT 2 (heterogénea)	97
3	-----	5

^{a)} Adição 30 μL de H_2O_2 (30%) de 15 em 15 min até $V(H_2O_2)_{\text{total}} = 300 \mu\text{L}$, temperatura ambiente; tempo de reação = 150 min. ^{b)} TMP:CAT=100:1 mol:mol. ^{c)} valores médios de reações realizadas em triplicado.

Na degradação de TMP em *batch* obtiveram-se taxas de degradação de TMP elevadas. Com a utilização do **CAT 1** observou-se uma degradação de 94% (**Tabela 3.2, Entrada 1**), enquanto com o **CAT 2** (**Tabela 3.2, Entrada 2**) se observou um valor de degradação de 97%. Os valores obtidos estão de acordo com os valores reportados na

literatura.⁸ Realizou-se, também, uma reação na ausência de catalisador, tendo-se obtido uma degradação de 5%, o que evidencia a elevada atividade dos catalisadores do tipo Mn(III)-Porfirina na ativação de H₂O₂ para promover reações de catálise oxidativa.

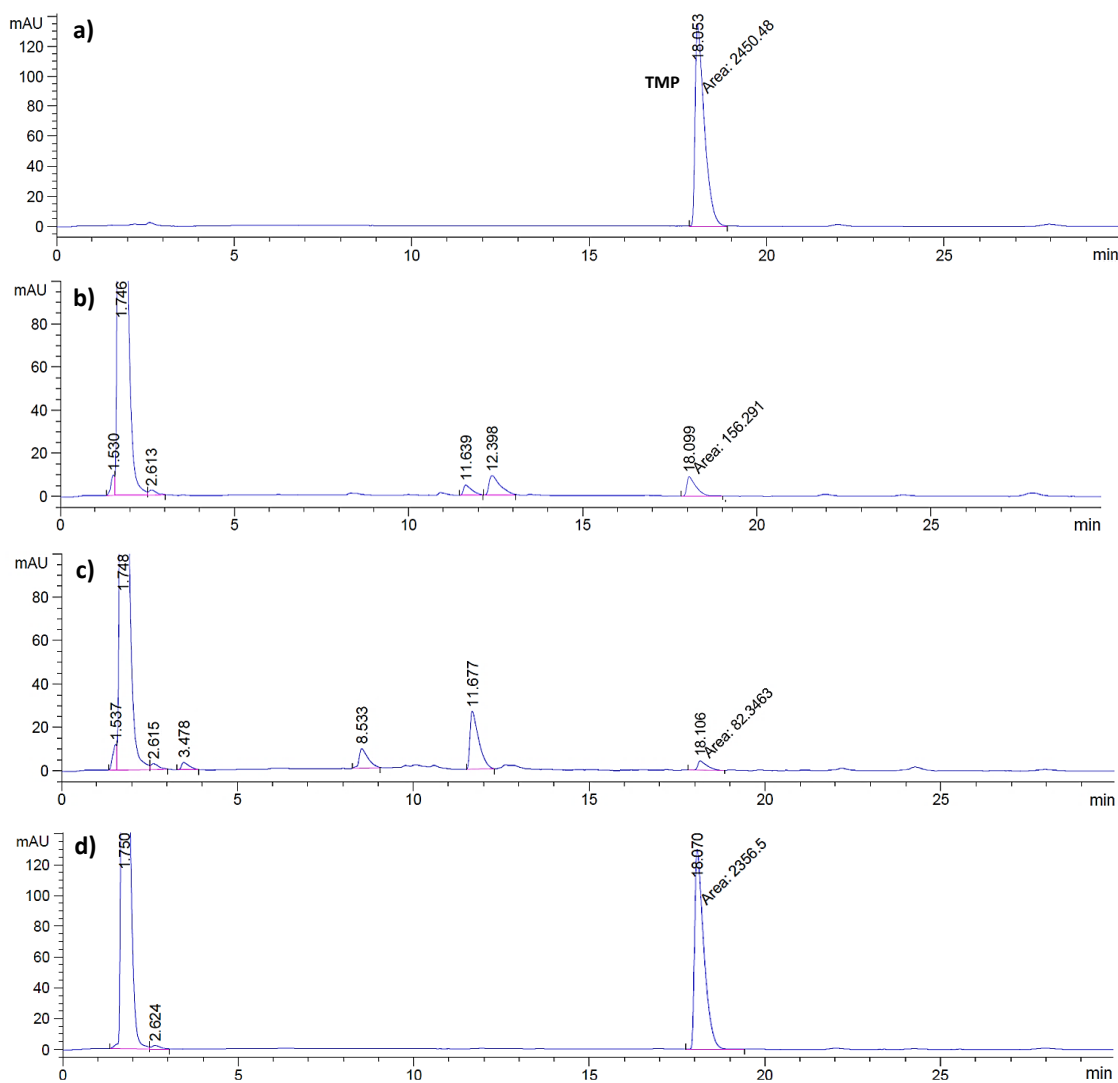


Figura 3.1. Cromatogramas obtidos por HPLC para as reações de degradação oxidativa de TMP na presença de H₂O₂ como oxidante, em condições *batch*: **a)** no tempo 0 min; **b)** após 150 min de reação homogênea utilizando **CAT 1**; **c)** após 150 min de reação heterogênea utilizando **CAT 2**, **d)** reação controle, realizada na ausência de catalisador.

Analisando o cromatograma, obtido por HPLC, para o tempo inicial das reações (Figura 3.1a), observa-se apenas um pico com um tempo de retenção de 18,1 min que é atribuído ao TMP. Após 150 min de reação, com a adição de 300 µL de H₂O₂, na presença de **CAT 1** (Figura 3.1b) observa-se a diminuição da área de TMP e a detecção de

novos picos, o que demonstra a formação de produtos de degradação durante a reação de oxidação catalítica. O mesmo sucede quando a reação é realizada na presença de **CAT 2 (Figura 3.1c)**. No caso da reação de controlo, ou seja, na ausência de catalisador (**Figura 3.1d**) apenas se observa o pico de TMP. É de salientar que o pico que surge com um tempo de retenção de cerca de 1,7 min, e com uma intensidade relativa elevada, corresponde ao NaHSO_3 utilizado como *quencher* (supressor) de H_2O_2 , em todas as reações.

Tendo em conta os resultados obtidos em condições *batch* e encontrando-se estes de acordo com a literatura,⁸ estes catalisadores apresentam elevada atividade oferecendo resultados promissores na degradação de TMP. Dessa forma, os estudos prosseguiram com a implementação de um processo em sistema de fluxo contínuo aplicando estes catalisadores na degradação oxidativa do mesmo antibiótico alvo também na presença de H_2O_2 como oxidante não poluente.

3.3. Degradação oxidativa homogénea de TMP em fluxo contínuo

A otimização das condições em fluxo contínuo na degradação oxidativa de TMP na presença de H_2O_2 foram iniciadas com os estudos das condições homogéneas em meio aquoso, nas quais foi utilizado o catalisador **CAT 1** ($\text{MnTDCPPSO}_3\text{H}$) e uma solução-stock [TMP] = 6,68 $\mu\text{g/mL}$, tendo em vista a aproximação às concentrações de TMP em águas residuais. É de salientar que estes valores de concentrações utilizadas são 10 × inferiores aos usados em estudos realizados em *batch*. Para tal, foi necessário proceder-se à otimização de certos parâmetros intrínsecos à química de fluxo, tais como o tempo de residência e a razão volumétrica das soluções de entrada (solução de TMP + **CAT 1** e solução de H_2O_2), como a concentração da solução de H_2O_2 utilizada. Na **Figura 3.2** está representado o equipamento de fluxo contínuo utilizado na degradação oxidativa de TMP em meio homogéneo.

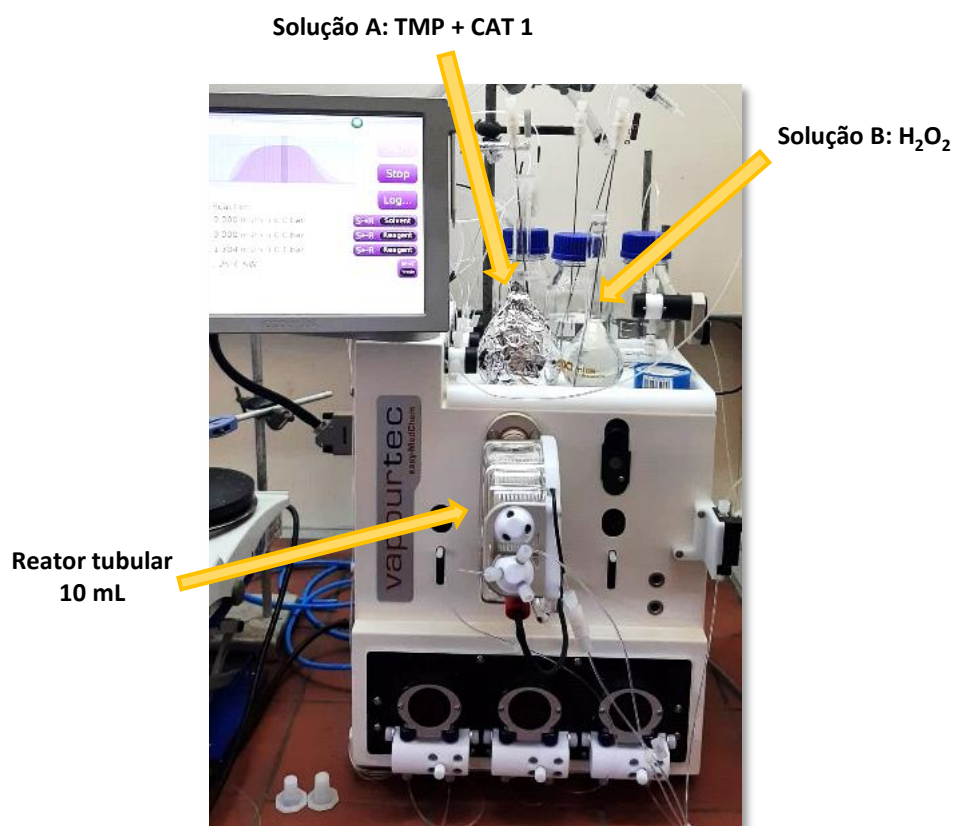
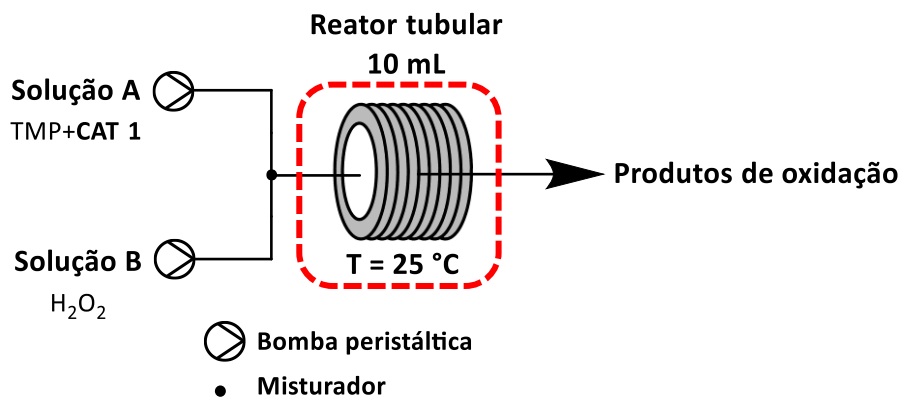


Figura 3.2. Equipamento de fluxo contínuo Vapourtec® utilizado na degradação oxidativa de TMP em meio homogêneo.

Tendo em conta os resultados obtidos para a degradação de TMP em *batch* já otimizados, de forma a transpor este sistema para um processo de fluxo contínuo teve-se em conta algumas considerações, nomeadamente, a concentração de H_2O_2 a utilizar (detalhes no Capítulo 5 – Experimental, Secção 5.4.2).

Tendo como base as condições de reação otimizadas para condições *batch* e atendendo às características do equipamento de fluxo, foi utilizada uma concentração de H_2O_2 de 3% (m/m), a ser bombeada a 0,150 mL/min e uma solução de TMP (6,68 $\mu\text{g/mL}$) + **CAT 1** com fluxo de 1 mL/min como as condições iniciais na qual foi iniciado este estudo em fluxo contínuo (**Esquema 3.2**).



Esquema 3.2. Representação esquemática do sistema de fluxo contínuo aplicado à degradação oxidativa de TMP na presença de **CAT 1**.

Tendo em conta a razão volumétrica entre os fluxos da solução **A** (TMP) e solução **B** (H_2O_2) é de 1:0,15, respetivamente, e com a utilização de um reator tubular de 10 mL, de acordo com a **Equação 3.2** é possível calcular o tempo de residência. Desta forma, com estes parâmetros, obteve-se um tempo de residência de 8,7 min.

$$\text{Tempo de residência (min)} = \frac{\text{Volume do reator (mL)}}{\text{Fluxo total (mL/min)}}$$

Equação 3.2

Desta forma, na degradação oxidativa de TMP em meio homogêneo, preparou-se uma solução **A** para TMP:**CAT 1** = 100:1, contendo TMP ($6,68 \mu\text{g/mL}$, $2,3 \times 10^{-5} \text{ M}$) e **CAT 1** ($1,15 \times 10^{-7} \text{ M}$). No caso da solução **B**, foram preparadas soluções com diferentes percentagens de H_2O_2 através da diluição de H_2O_2 35%. As reações foram todas realizadas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. De forma a obter a amostra correspondente ao tempo inicial para análise por HPLC, no início de cada reação foi retirada uma alíquota da solução de trabalho e realizada a respetiva diluição face à razão volumétrica em estudo (detalhes no Capítulo 5 – Experimental, Secção 5.4.2). No final de cada reação, foi também retirada uma alíquota do meio reacional e realizou-se o *quenching* do H_2O_2 com NaHSO_3 . As amostras de tempo inicial e final foram posteriormente analisadas por HPLC com o objetivo de determinar a percentagem de degradação de TMP. Na **Tabela 3.3** encontram-se os resultados de degradação de TMP obtidos em função da razão

volumétrica entre a solução TMP+**CAT 1** e solução H₂O₂ e os diferentes tempos de residência utilizados.

Tabela 3.3. Degradação de TMP obtida em fluxo contínuo com **CAT 1** em função de diferentes razões volumétricas e tempos de residência.

Entrada	H ₂ O ₂ (%)	Tempo de residência (min) ^{a)}	Razão volumétrica (TMP+CAT 1:H ₂ O ₂) ^{b)}	Degradação (%) ^{c)}
1	3	8,7	1:0,15	2
2	3		1:0,3	7
3	3		1:0,6	12
4	3	45,5	1:1,2	40
5	3		1:1,2	87
6	3	0,3	1:1,2 ^{d)}	13
7	0,3		1:1,2	32

^{a)} Volume reator 10 mL; Temperatura ambiente. ^{b)} Solução **A** ([TMP] = 6,68 µg/mL); Solução **B** (H₂O₂). TMP:**CAT 1** = 100:1 ^{c)} Valores médios de reações realizadas em triplicado. ^{d)} Ausência de catalisador.

Tal como referido anteriormente, o estudo da degradação de TMP via fluxo contínuo foi iniciado com um tempo de residência de 8,7 min e uma razão volumétrica entre os fluxos de 1:0,15 mL/min (TMP+**CAT 1**:H₂O₂). Contudo, nestas condições não se observou uma degradação significativa de TMP (**Tabela 3.3, Entrada 1**) pelo que outras razões volumétricas foram estudadas. Desta forma, procedeu-se à realização de ensaios experimentais utilizando razões volumétricas entre **A:B** de 1:0,3, 1:0,6 e 1:1,2, respetivamente. Estes resultados demonstram uma dependência da degradação face à razão volumétrica utilizada, sendo que se atinge um valor de 40% de degradação para a razão volumétrica entre as soluções **A** e **B** de 1:1,2 (**Tabela 3.3, Entrada 4**). A utilização de razões volumétricas inferiores levam à obtenção de percentagens de degradação significativamente inferiores (**Tabela 3.3, Entrada 1-3**). Numa tentativa de aumentar a percentagem de degradação de TMP, procedeu-se à realização de uma experiência com um tempo de residência máximo permitido para a razão volumétrica entre **A:B** de 1:1,2. Desta forma, com o aumento do tempo de residência de 8,7 min para 45,5 min, obteve-se um valor de degradação de TMP de 87% (**Tabela 3.3, Entrada 5**).

De forma a observar a importância do catalisador em estudo neste sistema, realizou-se uma reação de controlo utilizando as mesmas condições onde se obteve maior taxa de degradação (**Tabela 3.3, Entrada 5**). Verifica-se que, na ausência de catalisador, obteve-se apenas 13% de degradação de TMP (**Tabela 3.3, Entrada 6**), o que evidencia a necessidade da utilização do catalisador neste sistema.

Outro fator importante a ter em consideração é a percentagem de agente oxidante utilizado. Desta forma, procedeu-se também à realização de uma reação utilizando uma solução de 0,3% de H₂O₂ para observar a eficiência deste sistema na presença de uma menor percentagem de oxidante. Desta forma, nas melhores condições obtidas para este sistema, ou seja, razão volumétrica entre **A** e **B** de 1:1,2 e 45,5 min de tempo de residência (**Tabela 3.3, Entrada 7**), observou-se uma degradação de apenas 32%. Este baixo valor obtido evidencia a importância do agente oxidante neste sistema pelo que baixas percentagens e razões volumétricas de H₂O₂ resultam em baixas percentagens de degradação de TMP.

Tendo como objetivo analisar a estabilidade do catalisador ao longo da reação, todas as reações foram seguidas por espectroscopia UV-Visível (**Figura 3.3**). A título de exemplo, na amostra correspondente ao tempo inicial de reação para razão volumétrica entre **A** e **B** de 1:1,2, observa-se a presença da banda *Soret* característica de **CAT 1** a 464 nm. Após realizada a reação para a mesma razão volumétrica com 45,5 minutos de tempo de residência e H₂O₂ 3% (**Tabela 3.3, Entrada 5**), observa-se um decréscimo significativo da intensidade da banda *Soret* de **CAT 1**. Esta degradação pode estar associada ao excesso de H₂O₂ face ao catalisador que foi utilizado durante os ensaios levando à degradação do catalisador ao longo da reação, tal como referido na literatura.⁹

No caso da reação realizada na presença de H₂O₂ 0,3% com R_v (TMP+**CAT 1**:H₂O₂) = 1:1,2 e 45,5 minutos de tempo de residência (**Tabela 3.3, Entrada 7**), observa-se que com uma menor percentagem de H₂O₂ ocorre menos degradação do catalisador quando comparado com as reações realizadas na presença de 3% de H₂O₂. No entanto, obteve-se apenas 32% de degradação de TMP. Desta forma, conclui-se, que para reações com

menor percentagem de oxidante, apesar de se obter uma menor degradação do catalisador, obtêm-se menores percentagens de degradação do antibiótico.

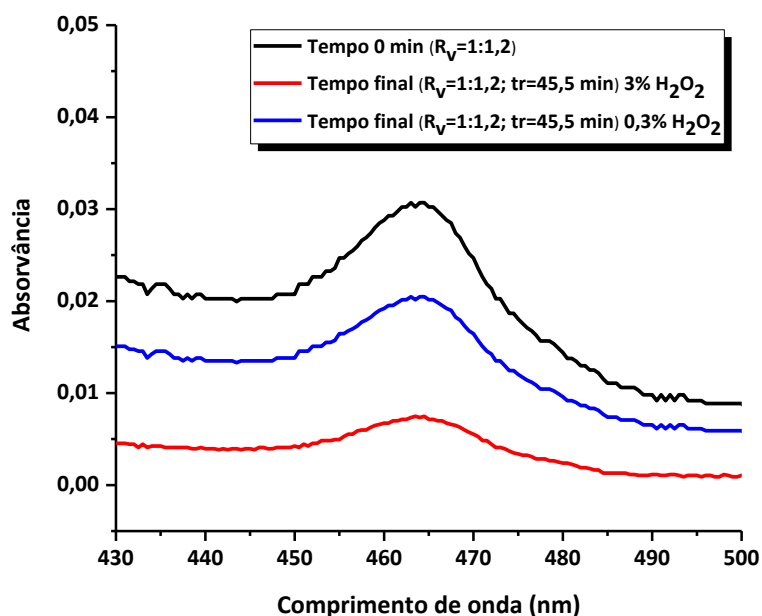


Figura 3.3. Espectros de UV-Vis registados em água destilada da solução de tempo inicial (preto), a solução do tempo final de reação com 3% H_2O_2 (vermelho) e a solução do tempo final de reação com 0,3% H_2O_2 (azul).

As reações realizadas em *batch* revelaram uma percentagem de degradação de TMP mais elevadas do que as que foram efetuadas em sistema de catálise homogênea em fluxo contínuo. Contudo, é de referir que os valores de degradação obtidos em condições *batch* foram resultantes de 150 minutos, enquanto em fluxo contínuo obteve-se 87% de degradação em apenas 45 minutos.

No entanto, tal como referido anteriormente o objetivo deste trabalho centra-se essencialmente no desenvolvimento de catalisadores heterogêneos para aplicação em sistemas de fluxo contínuo (simulação de sistemas reais de tratamento de efluentes hospitalares). Desta forma, os estudos prosseguiram com a avaliação de catalisadores heterogêneos em sistemas de fluxo contínuo, tendo em conta o estudo efetuado em meio homogêneo, como base de trabalho.

3.4. Degradação oxidativa heterogénea de TMP em fluxo contínuo

Como já mencionado anteriormente, a recuperação e reutilização de um catalisador é bastante importante não só do ponto de vista económico, mas também ambiental. Desta forma, a catálise heterogénea apresenta uma aproximação mais sustentável quando comparado com a catálise em meio homogéneo.^{10, 11} Nas reações realizadas em *batch* a recuperação do catalisador heterogéneo centra-se, geralmente, no uso de processos físicos para a recolha do catalisador, incluindo a decantação, precipitação ou centrifugação. No caso dos equipamentos de fluxo contínuo, estes permitem o empacotamento do catalisador num reator em coluna permitindo a passagem dos reagentes pelo catalisador, facilitando a sua reutilização e evitando potencial lixiviação. Este é o pressuposto para a uma aproximação ao mundo real, no qual o catalisador heterogéneo desenvolvido (**CAT 2**) é incorporado num reator tubular fixo, promovendo a passagem de soluções contendo os poluentes, nomeadamente o antibiótico em estudo, o TMP, juntamente com o oxidante não poluente, o H₂O₂, evitando assim a necessidade de recuperação e reativação do catalisador, bem como a sua eventual perda por lixiviação.

Desta forma, procedeu-se à avaliação do catalisador MnTDCPPSO₂@NHpropil-SiO₂ (**CAT 2**) na reação de degradação de TMP em fluxo contínuo utilizando um reator em coluna para a incorporação do catalisador no sistema. Após os processos de síntese de **CAT 2** e sua respetiva caracterização, obteve-se 3,1x10⁻⁵ mol de metaloporfirina imobilizada por g de material. Portanto, com o empacotamento da coluna com 1,5 g de **CAT 2** obteve-se 4,7x10⁻⁵ mol de catalisador ativo presente na coluna preparada. O espaço intersticial (volume morto) foi obtido através da diferença de massa entre a coluna seca e a coluna compactada com água, obtendo-se uma diferença de 2,2 g. A água foi escolhida como solvente no procedimento de compactação, uma vez que seria o meio reacional utilizado nas reações de degradação. Desta forma, considerando a densidade da água ($\rho = 1 \text{ g/mL}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$), o volume de reator obtido foi de 2,2 mL. Na **Figura 3.4** está representado o equipamento de fluxo contínuo utilizado na degradação oxidativa de TMP em meio heterogéneo.

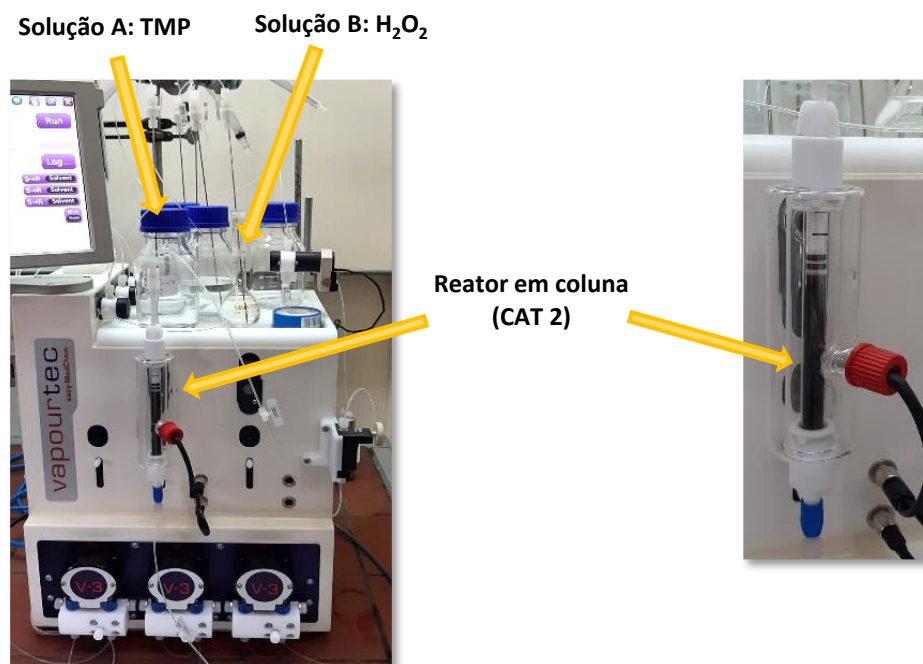
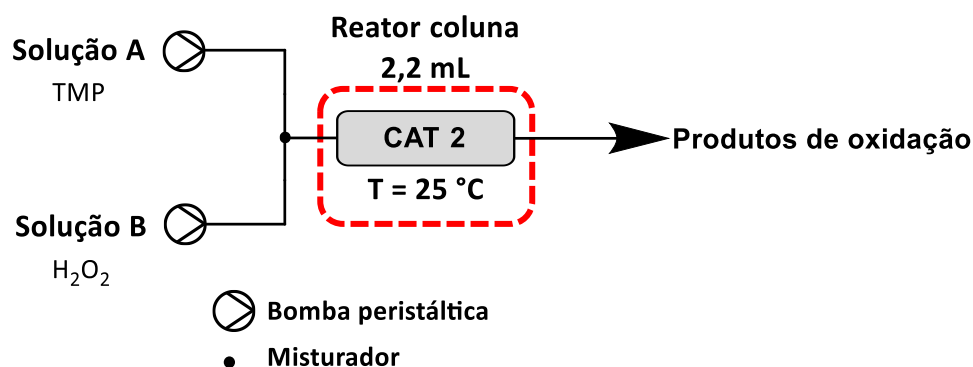


Figura 3.4. a) Equipamento de fluxo contínuo Vapourtec® utilizado na degradação oxidativa de TMP em meio heterogêneo; b) Reator em coluna contendo o catalisador MnTDCPPSO₂@NHpropil-SiO₂ (CAT 2).

Desta forma, na degradação oxidativa de TMP em meio heterogêneo, começou por se preparar uma solução **A** de TMP (6,68 µg/mL, 2,3x10⁻⁵ M). No caso da solução **B**, foram preparadas soluções com diferentes percentagens de H₂O₂ através da diluição de H₂O₂ 35%. As reações foram todas realizadas à temperatura ambiente. No início cada reação retirou-se uma alíquota da solução de TMP e realizando a respetiva diluição face à razão volumétrica em estudo, que neste caso manteve-se constante ($R_v(\mathbf{A}:\mathbf{B})=1:1,2$), obteve-se a amostra correspondente ao tempo inicial (detalhes no Capítulo 5 – Experimental, Secção 5.4.2). No final de cada ensaio, foi retirado uma alíquota do volume recolhido e realizou-se o *quenching* do H₂O₂ com NaHSO₃. Estas amostras foram analisadas por HPLC para determinação da percentagem de degradação de TMP.

No **Esquema 3.3** está presente uma ilustração esquemática da reação de degradação de TMP na presença de **CAT 2** e H₂O₂ como agente oxidativo.



Esquema 3.3. Representação esquemática do sistema de fluxo contínuo aplicado à degradação oxidativa de TMP na presença de **CAT 2**.

A degradação do TMP foi calculada de acordo com a **Equação 3.1**, e os resultados estão representados na **Tabela 3.4**.

Tabela 3.4. Degradação de TMP obtida em fluxo contínuo com **CAT 2** na presença de diferentes percentagens de H_2O_2 , diferentes tempos de residência (t_r) e diferentes concentrações de TMP iniciais.

Entrada	H_2O_2 (%)	t_r (min) ^{a)}	[TMP] ($\mu\text{g/mL}$)	Degradação (%) ^{b)}
1	3	10	6,68	96
2	0,3	10	6,68	97
3	0,3	5	6,68	90
4	0,3	10	66,8	96

^{a)} Volume reator 2,2 mL; R_v (A:B) = 1:1,2; Temperatura ambiente. ^{b)} Valores médios de reações realizadas em triplicado.

Na otimização das condições em meio homogêneo observou-se que a utilização de uma razão volumétrica de 1:1,2 conduziu a maiores percentagens de degradação do que anteriormente descrito em fase homogênea. Estes resultados podem ser interpretados com base na maior estabilidade do catalisador imobilizado. Portanto, os estudos em meio heterogêneo foram realizados com esta razão volumétrica, na presença de diferentes concentrações da solução de H_2O_2 , 3% e 0,3% com um tempo de residência de 10 min a 25 °C. Desta forma, para a reação realizada na presença de com 3% H_2O_2 obteve-se uma degradação de 96% (**Tabela 3.4, Entrada 1**). No caso da reação com 0,3% H_2O_2 , a degradação de TMP obtida foi de 97% (**Tabela 3.4, Entrada 2**). Face a

este resultado e de forma a minimizar a degradação do catalisador com a utilização excessiva de H_2O_2 , os estudos seguintes foram realizados com apenas 0,3% H_2O_2 .

Na reação de degradação de TMP em fluxo contínuo, o tempo de residência é um fator que pode influenciar a degradação. Na reação com um tempo de residência de 10 minutos, a degradação de TMP foi de 97%, enquanto a reação realizada com metade do tempo de residência a degradação de TMP diminuiu, obtendo-se uma taxa de degradação de 90% (**Tabela 3.4, Entrada 3**). Tal como observado na degradação de TMP em meio homogêneo, o tempo de residência é um fator crucial neste sistema, uma vez que é necessário a coordenação de H_2O_2 ao metal que está presente no centro da metaloporfirina para formar as espécies *oxo* responsáveis pela degradação do antibiótico.

Realizou-se ainda a medição do pH da solução inicial e final e verificou-se que a solução inicial de TMP apresentava um valor de pH de 7,4 enquanto a solução final apresentava um valor de pH de 5,3, um valor expectável, dado o facto de esta reação ser conduzida em água destilada. A libertação de prótons para a água durante a reação de oxidação vai provocando um aumento da acidez do meio levando à diminuição do pH, como verificado anteriormente em outros trabalhos.^{8, 12}

Na **Figura 3.5** estão representados os cromatogramas das reações enunciadas na **Tabela 3.4**. Analisando o cromatograma obtido por HPLC para o tempo inicial das reações (**Figura 3.5a**), observa-se a presença do pico característico do TMP com um tempo de retenção de 17,99 min. Observando os cromatogramas das reações realizadas com 3% de H_2O_2 (**Figura 3.5b**) e 0,3% de H_2O_2 (**Figura 3.5c**) observa-se semelhanças entre estes, nomeadamente a diminuição da área e intensidade do pico do TMP e o aparecimento de picos de degradação. Muitos destes picos de degradação não são possíveis de integrar devido à baixa concentração de TMP inicial utilizada nas reações o que levará à formação de produtos de degradação não detetáveis pelo equipamento. O mesmo acontece ao analisar o cromatograma da reação realizada com um tempo de residência de 5 min (**Figura 3.5d**). Tal como observado nos cromatogramas obtidos para

as reações realizadas em *batch*, o pico com um tempo de retenção de aproximadamente 1,7 min e com uma intensidade relativa elevada corresponde ao NaHSO_3 .

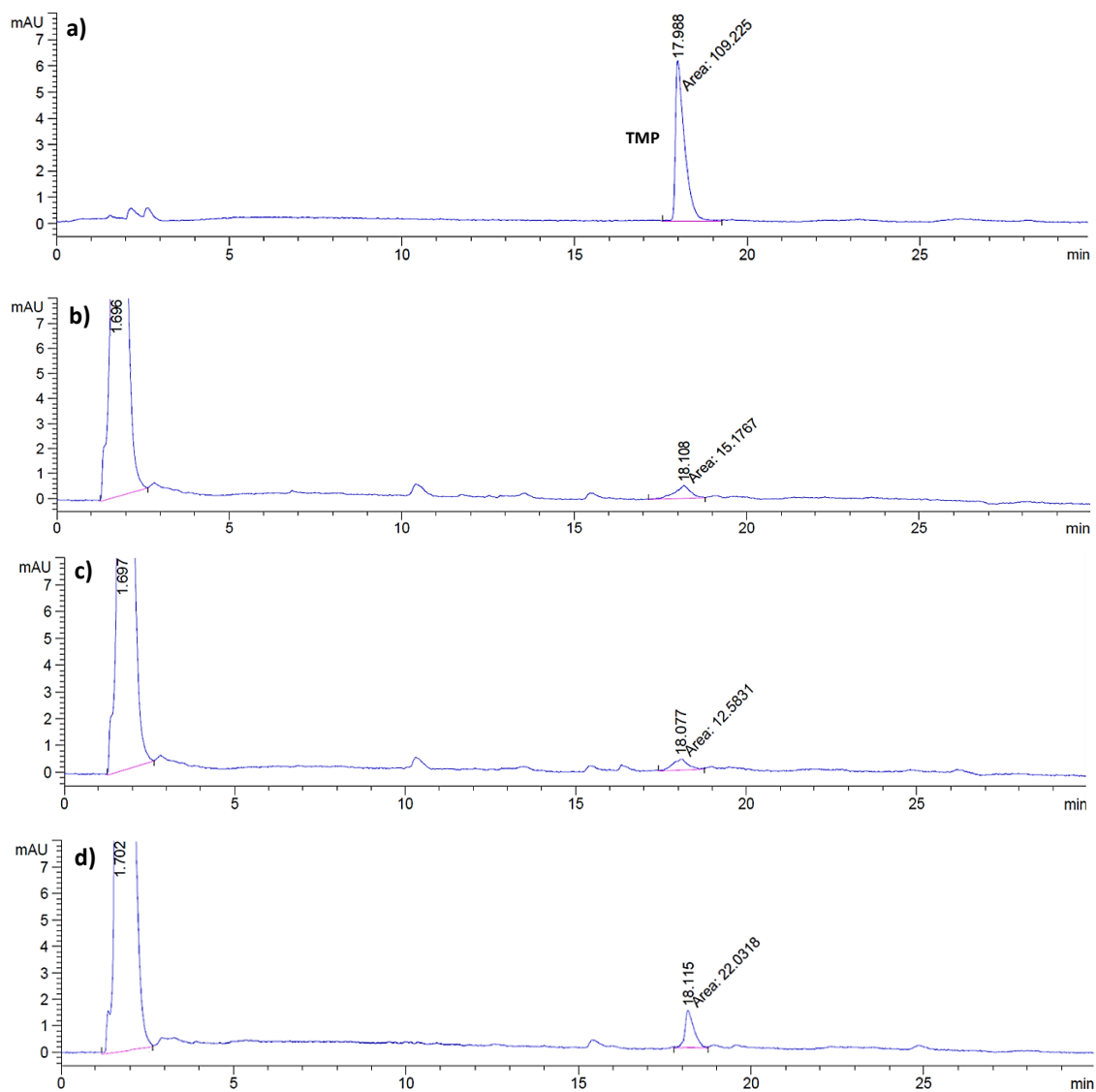


Figura 3.5. Cromatogramas obtidos por HPLC para as reações de degradação oxidativa heterogénea de TMP na presença de **CAT 2** em fluxo contínuo com $R_v(\text{A:B}) = 1:1,2$: **a)** no tempo 0 min; **b)** após reação usando H_2O_2 3% e tempo de residência 10 min; **c)** após reação usando H_2O_2 0,3% e tempo de residência 10 min; **d)** após reação usando H_2O_2 0,3% e tempo de residência 5 min.

De forma a testar este sistema em condições extremas de concentração de antibiótico, procedeu-se à realização de uma reação de degradação de TMP com concentração inicial 10 vezes superior ($66,8 \mu\text{g}/\text{mL}$) nas condições otimizadas descritas na **Tabela 3.4, Entrada 2**. Nesta reação, obteve-se também uma degradação de TMP de 96% (**Tabela 3.4, Entrada 4**). Estes resultados são semelhantes aos obtidos na **Tabela**

3.4, Entrada 2 pelo que se verifica que o sistema em estudo é robusto e válido para várias concentrações de TMP iniciais.

Analisando os cromatogramas obtidos por HPLC, no tempo inicial de reação observa-se apenas o pico característico do TMP com um tempo de retenção de 18,1 min (**Figura 3.6a**). Após a reação com 10 minutos de tempo de residência e uma razão volumétrica entre TMP (66,8 µg/mL) e H₂O₂ (0,3%) de 1:1,2, respetivamente, observa-se o pico de TMP com uma intensidade relativa muito menor e o aparecimento de novos picos característicos de produtos de degradação (**Figura 3.6b**). Comparando o cromatograma da **Figura 3.6b** com o cromatograma obtido para as reações realizadas em *batch*, observa-se o aparecimento de alguns picos de produtos de degradação com os mesmos tempos de retenção.

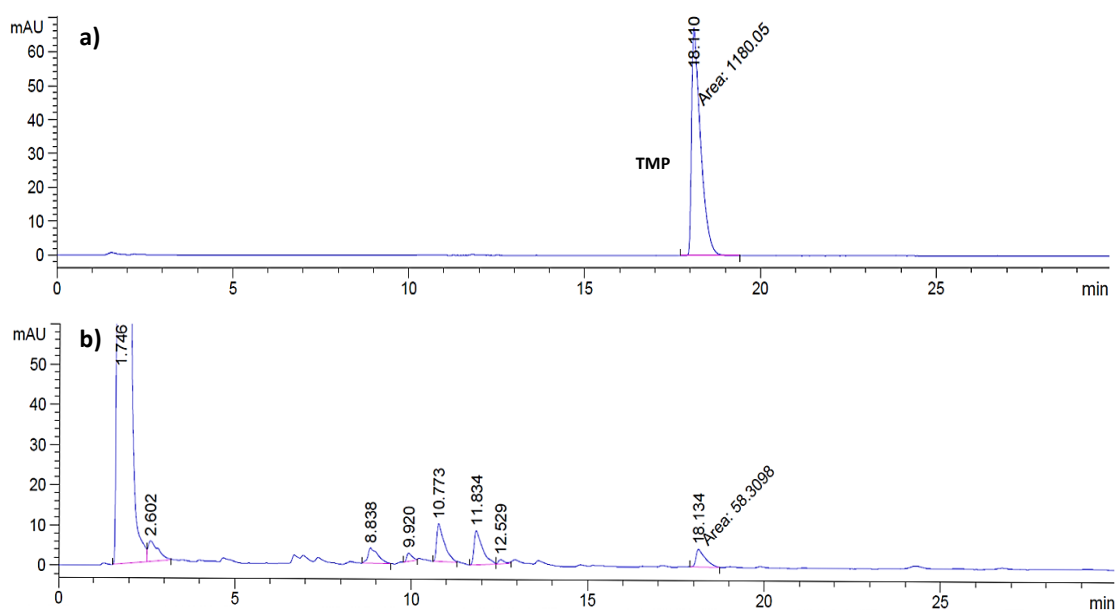


Figura 3.6. Cromatogramas obtidos por HPLC para as reações de degradação oxidativa de TMP na presença de **CAT 2** em fluxo contínuo, usando H₂O₂ 0,3% com R_v(A:B) = 1:1,2: **a)** no tempo 0 min; **b)** após reação com tempo de residência 10 min.

O desenvolvimento de processos em fluxo contínuo aplicados à remediação ambiental, nomeadamente na degradação de fármacos, é crucial e a sua importância tem sido bastante discutida ao longo desta dissertação. Contudo, para uma possível aplicação num sistema real, um processo de fluxo contínuo tem de manter uma eficiência contínua ao longo do tempo. Desta forma, tendo em conta este objetivo,

procedeu-se à utilização do sistema mencionado anteriormente aplicado à degradação de TMP, no qual a concentração inicial de TMP é 66,8 µg/mL em modo contínuo durante 8 horas para observar a sua eficiência. Inicialmente, foram retiradas amostras de 5 em 5 minutos até se atingir o *steady-state* da reação aos 40 min e, posteriormente foram recolhidas amostras de 1 em 1 hora de forma monitorizar a percentagem de degradação obtida ao longo do tempo (**Figura 3.7**).

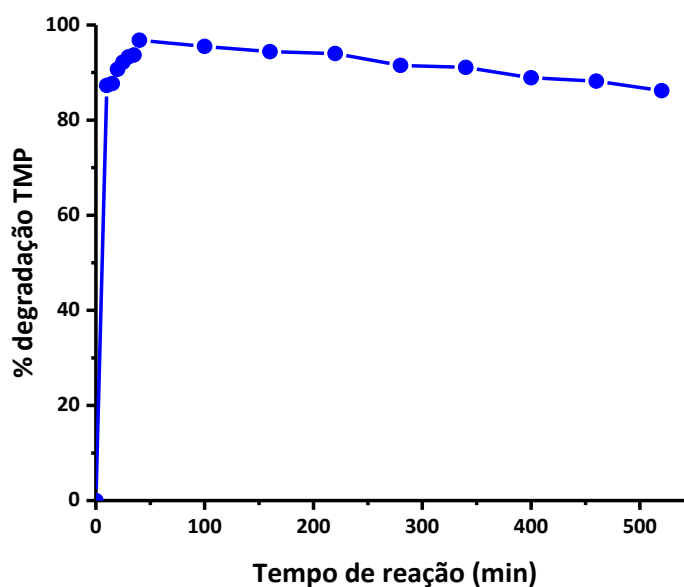


Figura 3.7. Gráfico da degradação de TMP (%) obtida por HPLC em função do tempo de reação, em minutos. Condições: Solução A ([TMP] = 66,8 µg/mL); Solução B (H₂O₂ 0,3%); R_v(A:B)=1:1,2; Volume reator 2,2 mL; Fluxo (A) = 0,100 mL/min; Fluxo (B) = 0,120 mL/min; Temperatura ambiente.

Analisando a percentagem de degradação de TMP ao longo do tempo de reação em modo contínuo, observa-se que quando se atinge o *steady-state* aos 40 min e nas 3 primeiras horas de reação, a degradação de TMP situa-se acima dos 93%. O catalisador vai sofrendo uma ligeira perda de atividade, sendo que se registou 86% de degradação de TMP ao fim de 8 horas, desde o início do *steady-state*. Esta diminuição da taxa de degradação de TMP ao longo do tempo poderá estar associada ao aparecimento de algumas bolhas de ar observadas na coluna, principalmente entre o vidro da coluna e o catalisador empacotado. Desta forma, os reagentes atravessariam mais facilmente o reator passando entre o vidro da coluna e o catalisador e não pelo interior do catalisador

empacotado, o que poderá levar à diminuição da área de contacto, podendo eventualmente justificar a diminuição da degradação, ainda que ligeiramente.

Procedeu-se, ainda à análise por HPLC de uma amostra da solução final do processo em contínuo ao longo das 8 horas de trabalho constante, pelo que se observou 91% de degradação de TMP. Verificou-se que, após este tempo de trabalho, o catalisador manteve-se estável, quer por ICP-OES (análise do catalisador heterogéneo), que indicou a presença da mesma quantidade de Mn, quer por espectroscopia UV-Visível (da solução após a reação), que indicou não existir vestígios de porfirina em solução (detalhes no Capítulo 5 – Experimental, Secção 5.4.2).

3.5. Referências

- [1] T. Thiebault. Sulfamethoxazole/Trimethoprim ratio as a new marker in raw wastewaters: A critical review. *Sci. Total Environ.* 2020. **715**. 136916.
- [2] M. J. Fernandes, P. Paíga, A. Silva, C. P. Llaguno, M. Carvalho, F. M. Vázquez e C. Delerue-Matos. Antibiotics and antidepressants occurrence in surface waters and sediments collected in the north of Portugal. *Chemosphere.* 2020. **239**. 124729.
- [3] M. O. Barbosa, A. R. Ribeiro, N. Ratola, E. Hain, V. Homem, M. F. R. Pereira, L. Blaney e A. M. T. Silva. Spatial and seasonal occurrence of micropollutants in four Portuguese rivers and a case study for fluorescence excitation-emission matrices. *Sci. Total Environ.* 2018. **644**. 1128-1140.
- [4] S. Oros-Ruiz, R. Zanella e B. Prado. Photocatalytic degradation of trimethoprim by metallic nanoparticles supported on TiO₂-P25. *J. Hazard. Mater.* 2013. **263P**. 28-35.
- [5] T. R. Kemnic e M. Coleman. StatPearls. Trimethoprim-Sulfamethoxazole. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513232/>. (acedido a 18 julho 2022).
- [6] S. A. Kools, A. B. Boxall, J. F. Moltmann, G. Bryning, J. Koschorreck e T. Knacker. A ranking of European veterinary medicines based on environmental risks. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 2008. **4**. 399-408.
- [7] ALS Portugal. <https://www.alsglobal.pt/>. (acedido a 18 julho 2022).
- [8] G. Piccirillo, M. Moreira-Santos, M. Valega, M. E. S. Eusebio, A. M. S. Silva, R. Ribeiro, H. Freitas, M. M. Pereira e M. J. F. Calvete. Supported metalloporphyrins as reusable catalysts for the degradation of antibiotics: Synthesis, characterization, activity and ecotoxicity studies. *Appl. Catal. B. Environ.* 2021. **282**. 119556.
- [9] A. M. Meireles, A. L. A. Lage, J. M. Ribeiro, M. A. N. da Silva, E. M. de Souza-Fagundes e D. C. D. Martins. Synthetic Mn(III) porphyrins as biomimetic catalysts of CYP450: Degradation of antibiotic norfloxacin in aqueous medium. *Environ. Res.* 2019. **177**. 108615.
- [10] A. Corma e H. Garcia. Silica-Bound Homogenous Catalysts as Recoverable and Reusable Catalysts in Organic Synthesis. *Adv. Synth. Catal.* 2006. **348**. 1391-1412.
- [11] M. M. Pereira, L. D. Dias e M. J. F. Calvete. Metalloporphyrins: Bioinspired Oxidation Catalysts. *ACS Catal.* 2018. **8**. 10784-10808.
- [12] M. J. Mitchell, O. E. Jensen, K. A. Cliffe e M. M. Maroto-Valer. A model of carbon dioxide dissolution and mineral carbonation kinetics. *Proc. R. Soc.* 2010. **466**. 1265-1290

CAPÍTULO 4

Conclusão

O aumento do consumo de antibióticos na medicina humana e veterinária tem estado associado à deteção de quantidades significativas destes fármacos em efluentes aquáticos. Com esta presença prolongada dos antibióticos no meio ambiente, tem-se observado uma resistência adquirida pelas bactérias a determinados antibióticos. Face a esta problemática, o objetivo deste trabalho centrou-se no desenvolvimento de catalisadores do tipo metaloporfirinas para aplicação na degradação oxidativa de antibióticos na presença de H_2O_2 como oxidante não poluente em meio aquoso. Tendo em vista a aproximação ao mundo real, nomeadamente no tratamento de águas residuais hospitalares, pretendeu-se utilizar processos em fluxo contínuo na presença de um catalisador heterogéneo como uma abordagem mais focada e passível, idealmente, de ser aplicada no tratamento de efluentes hospitalares.

Inicialmente, foram desenvolvidos dois catalisadores para aplicação na degradação de antibióticos em sistemas *batch* e em fluxo contínuo. A síntese de uma porfirina com grupos halogenados em posições *orto*, dos grupos *meso*-arilo, seguida da sua clorossulfonação, hidrólise e respetiva complexação com um sal de manganês, permitiu a obtenção de uma metaloporfirina de manganês(III), solúvel em meio aquoso e passível de ser utilizada com catalisador em meio homogéneo, sendo necessária para um estudo completo da reação de catálise oxidativa. Naturalmente, e tendo em conta a necessidade de desenvolver catalisadores que permitam a sua recuperação e reutilização, procedeu-se à síntese da mesma porfirina *meso*-substituída com grupos clorossulfónicos, seguida da promoção de uma reação nucleofílica com sílica funcionalizada com grupos 3-aminopropilo, com vista à sua imobilização covalente. Esta reação teve como base alguns trabalhos já realizados no Grupo de Catálise e Química Fina do Centro de Química de Coimbra nesta área. O catalisador heterogéneo obtido foi

caracterizado através de diferentes técnicas. Através de espectroscopia UV-Visível de estado sólido foi possível observar a presença da banda *Soret* a 466 nm, característica da metaloporfirina em estudo. Procedeu-se, também, à análise termogravimétrica para a determinação da quantidade de parte orgânica imobilizada no suporte inorgânico ($3,4 \times 10^{-5}$ mol de parte orgânica/g de sílica funcionalizada) e à análise ICP-OES para a determinação da quantidade de metal presente no material sólido ($3,1 \times 10^{-5}$ mol de metaloporfirina/g de catalisador sólido). Os catalisadores, baseados em metaloporfirinas de manganês(III) sintetizadas neste Capítulo 2, foram avaliados em reações de degradação oxidativa de antibióticos em *batch* e fluxo contínuo, na presença de H_2O_2 como oxidante não poluente.

No Capítulo 3 foram aplicados os catalisadores previamente sintetizados em reações de degradação oxidativa de antibióticos em *batch* e fluxo contínuo. As reações realizadas em *batch* revelaram taxas de degradação elevadas (96% e 97%) para a degradação de TMP em meio homogêneo e heterogêneo na presença de H_2O_2 como agente oxidante. Testou-se também a relevância do catalisador na reação, pelo que se observou que na ausência deste a reação de degradação não ocorria, o que demonstra a sua importância neste sistema. Para uma aproximação a um mundo real, nomeadamente no tratamento de águas residuais hospitalares, procedeu-se a uma transposição das condições otimizadas em *batch* para um sistema de fluxo contínuo. Inicialmente, efetuaram-se algumas otimizações em meio homogêneo, como a razão volumétrica entre a solução de TMP e H_2O_2 , tempo de residência e concentração de H_2O_2 inicial.

Observou-se uma dependência da percentagem de degradação de TMP obtida face a estes parâmetros, sendo que valores de razões volumétricas, tempos de residência e concentração de H_2O_2 mais elevados traduziam-se em taxas de degradação mais elevadas. Obteve-se um máximo de degradação (87%) para 45,5 minutos de tempo de residência, razão volumétrica mais elevada e concentração de H_2O_2 3%. Tendo como base estes resultados, procedeu-se ao estudo da reação de degradação de TMP na presença do catalisador heterogêneo. Os resultados obtidos revelaram taxas de degradação de 97%, sendo estes valores semelhantes aos obtidos em *batch*. Contudo,

foram realizadas com tempos de reação de 10 minutos, ou seja, muito inferiores às reações realizadas em *batch*. Devido à necessidade de avaliar a estabilidade e eficiência do catalisador ao longo do tempo para a possível aplicação ao mundo real no tratamento de efluentes hospitalares, realizaram-se adicionalmente experiências em fluxo contínuo durante 8 horas. Observou-se que ao fim dessas 8 horas de trabalho em processo contínuo, a percentagem de degradação manteve-se em valores superiores a 87%. Após a reação realizada de forma contínua durante 8 horas, através de espectroscopia UV-Visível e ICP-OES, verificou-se que não ocorreu lixiviação do catalisador heterogêneo.

Face aos resultados e conclusões descritas nesta dissertação, este sistema desenvolvido apresenta elevado potencial para aplicação em degradação de antibióticos presentes em águas residuais. Realça-se, também, a inexistência de qualquer estudo na literatura que refira o uso de metaloporfirinas como catalisadores aplicados à degradação oxidativa de antibióticos em fluxo contínuo, pelo que este estudo pioneiro nesta área apresenta elevada relevância. Contudo, por uma questão temporal, não foi possível a realização de mais experiências para uma melhor compreensão deste sistema. Deste modo, como perspectivas futuras, existe a necessidade de se proceder à identificação dos produtos de oxidação obtidos, bem como a realização de testes biológicos para investigar a existência ou não de resistência antimicrobiana associada aos produtos de degradação obtidos. Outro estudo com importante relevância neste tipo de sistemas de degradação é a quantidade de carbono obtida no final da reação, pelo que o pináculo desejado é a conversão total em CO₂ e H₂O.

Com o objetivo da implementação deste sistema a um mundo real, o passo fulcral envolverá a aplicação deste sistema desenvolvido na amostra de água residual hospitalar recolhida nas instalações do Instituto Português de Oncologia de Coimbra. Com esta investigação e desenvolvimento pretende-se assim produzir simultaneamente conhecimento fundamental, bem como conhecimento aplicativo, contribuindo para uma solução para o aumento significativo de antibióticos detetados em efluentes, principalmente em efluentes hospitalares, e conseqüentemente, ter um papel ativo no combate à resistência antimicrobiana, que constitui uma das maiores ameaças à saúde pública.

CAPÍTULO 5

Experimental

Neste capítulo é fornecida toda a informação relativa aos reagentes, solventes, técnicas e instrumentação utilizadas no decorrer deste trabalho, bem como os procedimentos de síntese, reações de catálise e a caracterização dos compostos químicos sintetizados.

5.1. Reagentes e solventes

Os reagentes e os solventes utilizados foram adquiridos à *Sigma-Aldrich*, *TCI*, *Alfa Aesar*, *Fluorochem* ou *Acros Organics*. Os reagentes foram utilizados como fornecidos sem a necessidade de purificação adicional. Todos os solventes usados no decorrer deste trabalho foram purificados e/ou secos seguindo os métodos referidos na literatura.¹

5.2. Técnicas e instrumentação

I. Cromatografia de camada fina

O controlo da evolução das reações químicas foi efetuado por cromatografia em camada fina (TLC). Foram utilizadas placas *ALUGRAM® Xtra SIL G* da *Machery-Nagel* com revelação UV₂₅₄. A composição eluente utilizada variou tendo em conta a polaridade dos compostos em análise.

II. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear de protão (RMN ¹H) e flúor (RMN ¹⁹F) foram obtidos num espectrómetro *Bruker Avance 400MHz* e *376MHz* do

Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade de Coimbra, respetivamente. Os desvios químicos (δ) apresentados são expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em hertz (Hz). O padrão interno utilizado para o RMN ^1H foi o sinal do solvente residual. Os dados apresentados encontram-se indicados pela seguinte ordem: núcleo (frequência do aparelho, solvente): (δ , ppm): desvio químico (multiplicidade do sinal, intensidade relativa (nH, sendo n o número de prótons).

III. Espectroscopia de absorção UV-vis

Os espectros de UV-Vis foram adquiridos num espectrofotómetro *Scimadzu 2100* utilizando uma célula de quartzo *Hellma Analytics* com um comprimento ótico de 10 mm. A determinação dos coeficientes de absorvidade molar no comprimento de onda de absorção máxima ($\epsilon_{\lambda_{\text{máx}}}$) foi realizada aplicando a lei de Beer-Lambert. Esta lei estabelece uma proporcionalidade direta entre a absorvância de uma amostra (A) e a sua concentração (c), absorvidade molar (ϵ) e comprimento ótico (l) de acordo com a **Equação 5.1**.

$$A = \epsilon c l$$

Equação 5.1

Para cada determinação, preparou-se duas soluções entre 1 e 2 mg de amostra no respetivo solvente, destas soluções, foram obtidas por diluição 6-7 soluções de trabalho por diluição, com concentrações na ordem dos 10^{-5} a 10^{-6} M. Para cada determinação do coeficiente de absorvidade molar, procedeu-se à realização de 3 ensaios, sendo que o valor reportado corresponde à média dos valores de coeficiente de absorvidade molar obtidos de cada ensaio.

IV. Espectroscopia de absorção UV-vis estado sólido

Os espectros de absorção de UV-Visível de estado sólido foram registados através do modo *scattering* por um espectrofotómetro Cary 5000 DRA. Utilizou-se Politetrafluoretileno (PTFE) como referência para a correção do background e com

bloqueio do feixe de forma a obter a linha de base com 100% e 0% de transmitância, respetivamente.

V. Espectrometria de massa

Os espetros de massa foram obtidos por ionização eletrospray (ESI) foram realizados num espectrómetro Bruker Microtofn (Unidade de Massas e Proteómica, Universidade de Santiago de Compostela, Espanha).

VI. Termogravimetria (TG)

As análises termogravimétricas foram realizadas num aparelho TG-DSC *Perkin-Elmer*, modelo STA6000. A análise dos compostos em estudo foi realizada com recurso a cadinhos de alumina utilizando um intervalo de temperatura entre 30 °C e 900 °C com velocidade de aquecimento de 20 °C/min e com um fluxo de azoto de 20 mL/min (Departamento de Física, Universidade de Coimbra).

VII. Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

As análises SEM foram realizadas num FESEM Zeiss–GEMINI II operado a uma tensão de aceleração de 2 kV, com recurso a um detetor de eletrões secundários. As amostras analisadas por SEM foram cobertas com uma camada monomérica de ouro por deposição física de vapor (do inglês, *Physical vapor deposition* - PVD).

VIII. Espectrometria de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES)

As amostras analisadas por ICP – OES foram realizadas num espectrómetro Joben Yvon Activa M (Universidade de Aveiro).

IX. Centrifugadora

Os processos de centrifugação foram realizados numa centrifugadora Centromix-BLT (Departamento de Química, Universidade de Coimbra).

X. Equipamento de fluxo contínuo

As reações em fluxo contínuo foram realizadas num equipamento easy-MedChem Vapourtec® E-Series equipado com 3 bombas peristálticas Vapourtec® V-3. Nos estudos realizados em meio homogéneo foi utilizado um reator tubular de capacidade de 10 mL Vapourtec®, nos estudos em meio heterogéneo, foi utilizado um reator de coluna ajustável de 6,6 mm de diâmetro interno e 100 mm de comprimento Omnifit® contendo o catalisador **CAT 2**.

XI. Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

As análises por cromatografia líquida de alta performance foram realizadas num equipamento Agilent modelo G1315D com um detetor matriz de díodos e injetor automático. Utilizou-se uma coluna empacotada de fase reversa (Agilent® Poroshell 4 µm C18 120 Å, 4,6 x 150 mm). Os comprimentos de onda de aquisição do detetor DAD foram fixos a 254,4 nm, 270,2 nm, 210,8 nm, 230,3 nm, 280,2 nm, 220,8 nm e 310,2 nm.

De forma a calcular a percentagem de degradação do TMP para cada reação, procedeu-se à realização de uma reta de calibração para concentrações de TMP contidas entre 0,1 µg/mL a 100 µg/mL (9 pontos). A **Equação 5.2** apresenta a reta de calibração obtida para a média de 3 injeções de cada amostra com diferentes concentrações.

$$A (TMP) = 1,0 \times 10^7 \cdot [TMP] + 12,353$$

Equação 5.2

A concentração de TMP no tempo inicial e final após os ensaios experimentais foram calculadas por análise HPLC e seguindo a **Equação 5.2** e a degradação (%) foi calculada de acordo com a **Equação 5.3**.

$$Degradação (\%) = \frac{C_0 - C_f}{C_0} \times 100$$

Equação 5.3

Todas as análises de HPLC foram efetuadas de acordo com o seguinte método:

min	ACN (%)	CH ₃ COONH ₄ buffer (pH=9,4) (%)
0	5	95
15	20	80
30	20	80

Fluxo: 1,000 mL/min, modo gradiente, temperatura do forno coluna: 30 °C

5.3. Síntese dos compostos e procedimentos referentes ao Capítulo 2

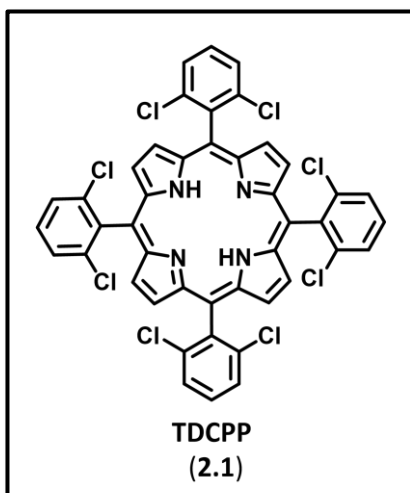
Nesta secção, são descritos os procedimentos utilizados e a caracterização dos compostos referentes ao Capítulo 2.

5.3.1. Síntese do catalisador homogéneo (CAT 1)

O catalisador **CAT1** foi preparado através de uma rota sintética iniciada com a preparação de **TDCPP 2.1**, seguida da sua reação de clorossulfonação de forma ao obter **2.2** e hidrólise **2.3**. Por fim, procedeu-se à reação de complexação com acetato de manganês (II) tendo se obtido 5,10,15,20-tetraquis(2,6-dicloro-3(5)-sulfofenil)porfirina de manganês (III) (**CAT 1**).

5,10,15,20-tetra(2,6-diclorofenil)porfirina (TDCPP, 2.1)

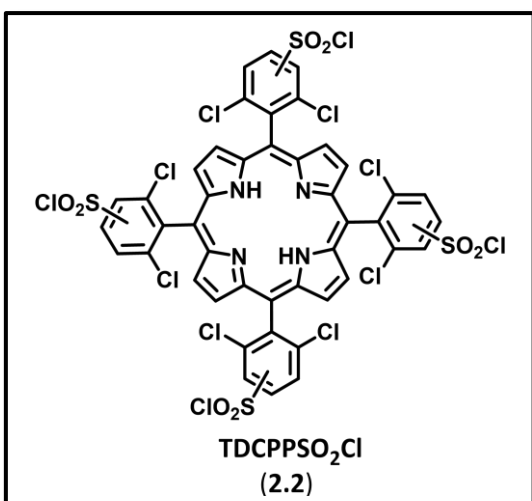
A porfirina **2.1** foi sintetizada de acordo com os métodos reportados na literatura.^{2,3} Num balão de fundo redondo de 2 L colocou-se 650 mL de ácido acético e 325 mL de nitrobenzeno, 30 g de NaY e 2,6-diclorobenzaldeído (10,73 mg, 60 mmol), tendo-se deixado a mistura aquecer até os 140 °C. Seguidamente adicionou-se pirrole (4,2 mL, 60 mmol), gota a gota. Após a adição de pirrole, a mistura reacional permaneceu em agitação magnética a 140 °C durante 2 horas. Após este tempo, o NaY foi removido por filtração e lavado com 100 mL de THF. Ao filtrado foi adicionado 200 mL de MeOH e o balão de fundo redondo foi colocado num banho de gelo. Após a formação de um precipitado procedeu-se à sua filtração com auxílio de MeOH de forma a isolar o composto pretendido. Obteve-se a porfirina **2.1** (TDCPP) com um rendimento de 4%, estando este valor e a sua respetiva caracterização de acordo com a literatura.⁴



RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ, ppm: 8,65 (s, 8H, β-H); 7,83-7,61 (m, 12H, Ar-H); -2,58 (s, 2H, NH).

UV-Vis λ_{abs}, nm (ε (M⁻¹ cm⁻¹)) (CH₂Cl₂): 417 (3,4x10⁵), 512 (2,2x10⁴), 588 (6,9x10³), 657 (6,2x10³).

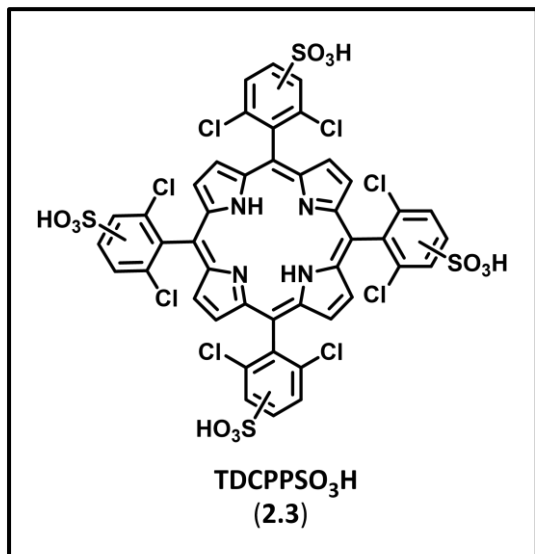
5,10,15,20-tetra(2,6-dicloro-3(5)-clorossulfofenil)porfirina (TDCPPSO₂Cl, 2.2)



A porfirina **2.2** foi sintetizada de acordo com os métodos reportados na literatura.⁴ Num balão de fundo redondo de 200 mL colocou-se TDCPP **2.1** (201 mg, 0,23 mmol) dissolvida em 13 mL de ácido clorossulfônico. A reação foi deixada em refluxo durante 1 h 30 min a 100 °C. Após arrefecimento, adicionou-se 200 mL de clorofórmio ao crude de reação.

Seguidamente, procedeu-se a uma extração contínua com água, sob agitação, até à neutralização do ácido. A fase orgânica foi lavada com hidrogenocarbonato de sódio e procedeu-se uma extração com diclorometano e *brine*. Posteriormente, foi adicionado agente secante para remoção de vestígios de água. O composto **2.2** não foi isolado, tendo-se prosseguido para a sua respetiva hidrólise.

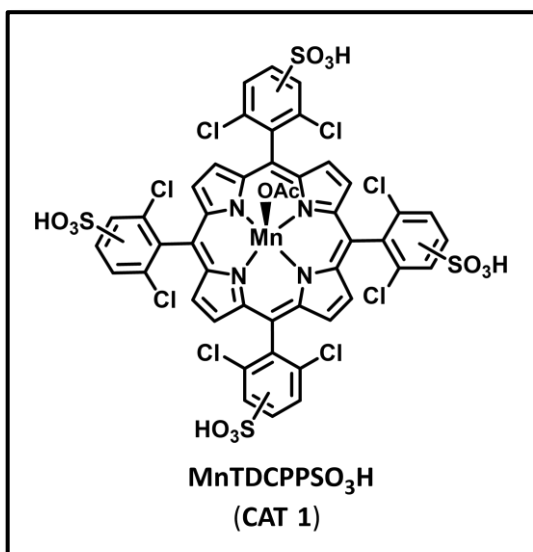
5,10,15,20-tetra(2,6-dicloro-3(5)-sulfofenil)porfirina (TDCPPSO₃H, 2.3)



A síntese de **2.3** foi realizada de acordo com os métodos descritos na literatura.⁴ A solução obtida anteriormente de **2.2** foi suspensa em 100 mL de água e deixada em refluxo durante 24 h a 100 °C. Após este tempo, evaporou-se a água, isolando-se o composto, obtendo-se TDCPPSO₃H (**2.3**) com um rendimento de 92%. O rendimento obtido está de acordo com a literatura.^{4, 6, 7}

Acetato de 5,10,15,20-tetra(2,6-dicloro-3(5)-sulfofenil)porfirina de manganês (III) (CAT 1)

A síntese do **CAT 1** foi realizada de acordo com os procedimentos descritos na literatura.⁸ Num balão de fundo redondo de 50 mL, colocou-se **2.2** (150 mg, 0,12 mmol), 6 equivalentes de acetato de manganês (II) (125 mg, 0,72 mmol) e 4 equivalente de acetato de sódio (39,4 mg, 0,48 mmol) numa mínima quantidade de ácido acético glacial (~6 mL). A mistura foi deixada em refluxo durante 1 h 30 min a 100 °C. Após o arrefecimento, foi adicionado acetato de etilo (250 mL) para promover a precipitação da porfirina metalada. A mistura foi filtrada a vácuo e o sólido obtido foi lavado com álcool isopropílico para remoção da porfirina de base livre. O composto isolado foi obtido com um rendimento de 86%.⁴



UV-Vis λ_{abs} , nm ($\log \epsilon$ (M⁻¹ cm⁻¹)) (H₂O): =
464 (6,7x10⁴), 516 (2,2x10³), 562 (6,6x10³).

HRMS (ESI-TOF): m/z obtido 1262,6796

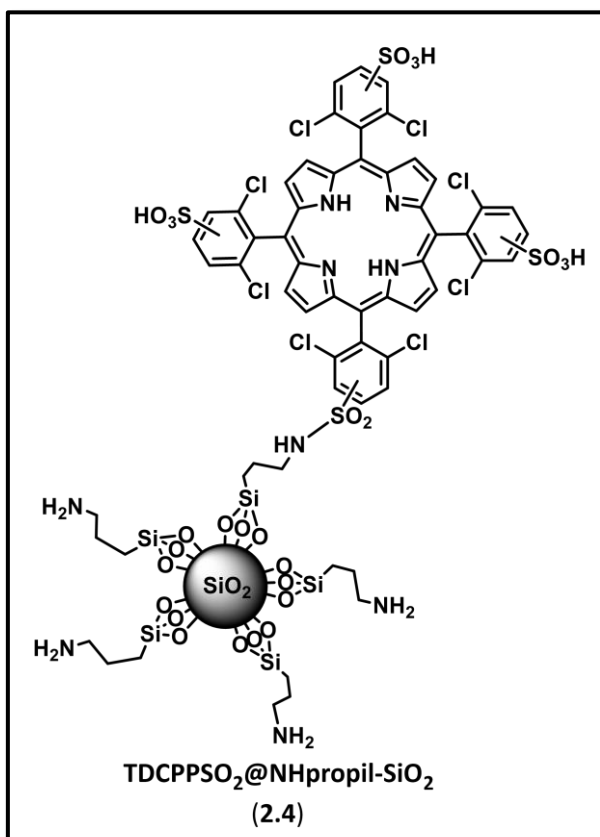
[M+H]⁺; calculado para

[C₄₆H₂₃Cl₈MnN₄O₁₀S₄]: 1321,6923.

5.3.2. Síntese do catalisador heterogéneo (CAT 2)

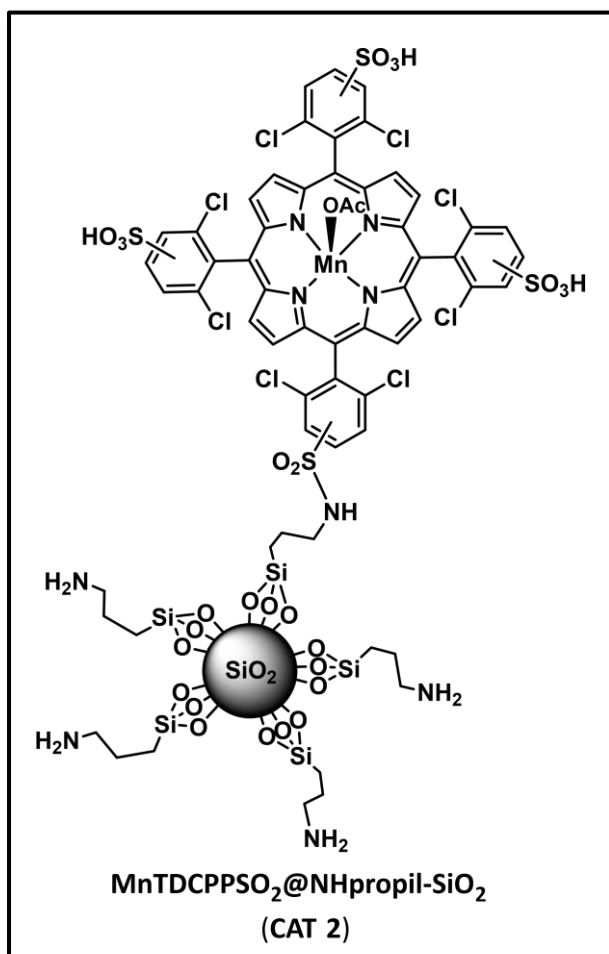
O catalisador heterogéneo **CAT2** foi preparado através da clorossulfonação de TDCPP **2.1**, obtendo-se **2.2**, seguida da sua respetiva imobilização em sílica funcionalizada com grupos 3-aminopropilo. Por fim, procedeu-se à reação de complexação com acetato de manganês (II) tendo-se obtido MnTDCPPSO₂@NHpropil-SiO₂ (**CAT 2**).

TDCPPSO₂@NHpropil-SiO₂ (2.4)



A preparação de TDCPPSO₂@NHpropil-SiO₂ (2.4) foi baseada em procedimentos descritos na literatura.⁸ Iniciou-se pela clorossulfonação de 2.1, obtendo-se 2.2 e, sem o seu isolamento, procedeu-se à adição de 3 g sílica funcionalizada com grupos 3-aminopropilo (0,30 mmol NH₂/g) e 42 mL de trietilamina (0,30 mol). Colocou-se a reação em agitação à temperatura ambiente durante 24 h em atmosfera inerte. Após o tempo de reação, procedeu-se à lavagem do material resultante por centrifugação

(4000 rpm). O material foi lavado 3 vez com água destilada, 4 vezes com etanol, 2 vezes com ACN e 2 vezes com acetona.

MnTDCPPSO₂@NHpropil-SiO₂ (CAT 2)

A complexação de **2.4** para a obtenção de **CAT 2** foi realizada tendo em conta procedimentos descritos na literatura.^{8,9} Num balão de fundo redondo de 50 mL colocou-se 850 mg de **2.4**, 20 equivalentes de Mn(OAc)₂ (260 mg, 1,8 mmol) e 20 mL de solução saturada de NaCH₃COO em CH₃COOH. A mistura foi colocada em refluxo, sob agitação magnética durante 24 h a 100 °C. Procedeu-se à lavagem do material obtido com álcool isopropílico a fim de remover quais quer sais ainda presentes. O composto obtido (**CAT 2**) foi caracterizado por UV-Visível de estado sólido, termogravimetria e

microscopia eletrónica de varrimento, estado esta caracterização concordante com a literatura.⁸

5.4. Procedimentos referentes ao Capítulo 3

Nesta secção, são descritos os procedimentos referentes ao Capítulo 3.

5.4.1. Degradação de TMP em condições *batch*

Numa experiência típica de degradação de TMP em condições *batch*, colocou-se 20 mL de solução-stock de TMP de concentração 66,8 µg/mL num balão de fundo redondo de 50 mL coberto com papel de alumínio. Seguidamente, dependendo da reação realizada em meio homogéneo ou heterogéneo e para uma razão TMP:**CAT 1-2** = 100:1, adicionou-se 40 µL de uma solução-stock de **CAT 1** (1,15x10⁻³ M) ou 1,52 mg de

CAT 2, respetivamente. A mistura foi deixada em agitação durante 15 min e, após este tempo, retirou-se uma alíquota correspondente ao tempo inicial e começou-se a adicionar 30 µL de H₂O₂ (30% m/m) de 15 em 15 minutos até perfazer um volume total de H₂O₂ de 300 µL, sendo retirada uma alíquota antes de cada adição de H₂O₂ para posterior análise por HPLC. No final de cada reação adicionou-se 700 µL de NaHSO₃ como *quenching* do H₂O₂.

5.4.2. Degradação de TMP em fluxo contínuo

A transposição para o sistema em fluxo contínuo foi realizada tendo em conta as condições otimizadas em *batch*. Neste caso, a razão de volumes entre a solução de TMP (20 mL, [TMP] = 66,8 µg/mL) e o volume total adicionado de H₂O₂ 30% (m/m) (0,3 mL) é a mesma de 66,7. Desta forma, transpondo para um sistema fluxo e mantendo como referência um fluxo constante de 1 mL/min para a solução de TMP, seria necessário utilizar um fluxo de 0,015 mL/min para uma solução de H₂O₂ 30% (m/m). Contudo, o equipamento de fluxo contínuo não permite a utilização de fluxos inferiores a 0,100 mL/min. Tendo em conta esta característica do equipamento, com a utilização de um fluxo 10 vezes superior a 0,015 mL/min, utiliza-se uma solução de H₂O₂ 10 vezes mais diluída com o objetivo de manter as condições semelhantes às utilizadas em *batch*.

Meio homogéneo

A degradação oxidativa de TMP em fluxo contínuo em meio homogéneo foi realizada utilizando um reator tubular de 10 mL. Para tal, preparou-se uma solução de trabalho contendo TMP (6,68 µg/mL) e **CAT 1** numa razão molar de 100:1. Num balão de diluição de 250 mL adicionou-se 50 µL de **CAT 1** de uma solução-stock (1,15x10⁻³ M), perfazendo-se o restante volume com TMP de uma solução-stock de concentração 6,68 µg/mL. Preparou-se, também, uma solução de 50 mL de 3% ou 0,3% H₂O₂ com a adição de 4,29 mL e 0,43 mL de H₂O₂ 35%, respetivamente, tendo sido o restante volume perfazido com água destilada. De forma a promover a degradação eficiente do TMP foram otimizados os parâmetros de concentração da solução de H₂O₂, razão volumétrica solução TMP/solução de H₂O₂ e tempo de residência.

De forma a obter-se uma amostra do tempo inicial para posterior análise por HPLC, para cada reação realizada foi retirada uma alíquota da solução de trabalho (ST) e realizada a respetiva diluição face à razão volumétrica (R_v) em estudo com a adição de água destilada. As amostras de tempo inicial foram, então, preparadas da seguinte forma:

- R_v (TMP+**CAT 1**:H₂O₂) = 1:0,15: 1 mL ST + 0,15 mL H₂O
- R_v (TMP+**CAT 1**:H₂O₂) = 1:0,3: 1 mL ST + 0,30 mL H₂O
- R_v (TMP+**CAT 1**:H₂O₂) = 1:0,6: 1 mL ST + 0,60 mL H₂O
- R_v (TMP+**CAT 1**:H₂O₂) = 1:1,2: 0,5 mL ST + 0,60 mL H₂O

Para cada reação realizada, foi recolhida uma alíquota da mistura reacional após se atingir o *steady-state* da reação, sendo realizado, de seguida, o *quenching* de H₂O₂ com 300 µL de NaHSO₂ e a posterior análise por HPLC.

Meio heterogéneo

Antes de iniciar os estudos de degradação de TMP em meio heterogéneo foi necessário preparar o reator de coluna contendo o catalisador **CAT 2**. Desta forma, uma coluna ajustável da omnifit® (150 mm x 6,6 mm di), foi carregada com 1,5 g de **CAT 2** ($4,7 \times 10^{-5}$ mol de catalisador ativo). Seguidamente, colocou-se o reator no equipamento de fluxo contínuo e, utilizado água destilada em fluxo inverso, procedeu-se ao empacotamento do catalisador e à remoção do ar contido no interior da coluna. Após o procedimento de empacotamento, a coluna foi novamente pesada e através da diferença direta o peso da coluna molhada e seca, determinou-se o peso do solvente presente na coluna. Com o valor da densidade do solvente, foi possível determinar que o reator em coluna apresenta um volume morto de 2,2 mL, sendo este valor utilizado para o cálculo do tempo de residência.

Numa experiência típica de degradação oxidativa de TMP em fluxo contínuo em meio heterogéneo, utilizou-se uma solução-stock de TMP de concentração 6,68 µg/mL ou 66,8 µg/mL e preparou-se uma solução de 50 mL de 3% e 0,3% H₂O₂ com a adição de 4,29 mL e 0,43 mL de H₂O₂ 35%, respetivamente, tendo sido o restante volume perfazido com água destilada.

De forma a promover a degradação eficiente do TMP foram otimizados os parâmetros de tempo de residência, concentração da solução de TMP e concentração da solução de H₂O₂. Para cada reação realizada, foi recolhida uma alíquota da mistura reacional após se atingir o *steady-state* da reação, sendo realizado de seguida o *quenching* de H₂O₂ com 300 µL de NaHSO₂ e a posterior análise por HPLC.

No ensaio realizado com operação contínua de 8 horas, foram recolhidas alíquotas da solução resultante do processo de degradação, antes de se atingir o *steady-state*, de 5 em 5 minutos entre os 10 min e os 40 min de processamento. Após a marca dos 40 minutos de processamento, o *steady-state* foi atingido e as amostras passaram a ser recolhidas de 1 em 1 hora. Para cada amostra foi realizando o seu *quenching* e posterior análise por HPLC como descrito anteriormente. De forma a avaliar a estabilidade do catalisador, a solução de trabalho após a reação foi analisada por UV-Visível, tendo-se observado a inexistência da banda *Soret* característica da porfirina e/ou da sua respetiva metaloporfirina (**Figura 5.1**), concluindo-se que não ocorreu lixiviação.

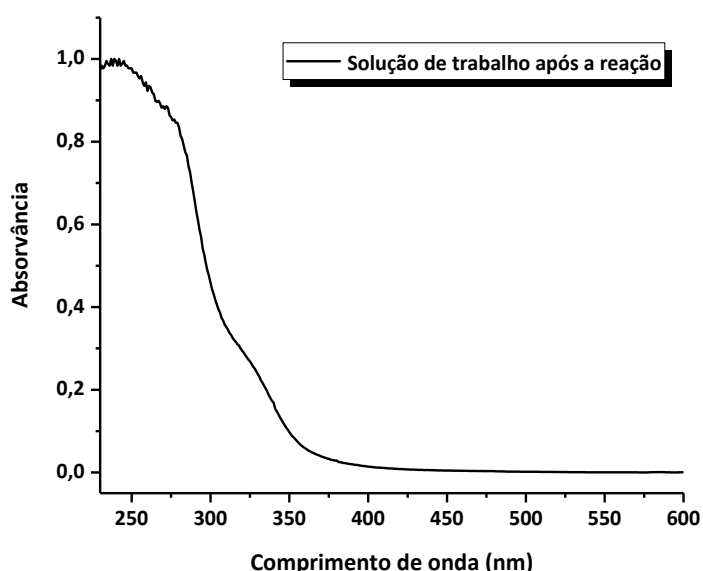


Figura 5.1. Espectro normalizado de UV-Visível da solução de trabalho final após 8 horas de operação contínua.

5.5. Referências

- [1] W. L. F. Armarego. *Purification of Laboratory Chemicals*. Butterworth-Heinemann. 2017.
- [2] A. M. R. Gonsalves, J. M. T. B. Varejão e M. M. Pereira. Some new aspects related to the synthesis of *meso*-substituted porphyrins. *J. Heterocycl. Chem.* 1991. **28**. 635-640.
- [3] M. Silva, A. Fernandes, S. S. Bebiano, M. J. F. Calvete, M. F. Ribeiro, H. D. Burrows e M. M. Pereira. Size and ability do matter! Influence of acidity and pore size on the synthesis of hindered halogenated *meso*-phenyl porphyrins catalysed by porous solid oxides. *ChemComm*. 2014. **50**. 6571-6573.
- [4] A. M. R. Gonsalves, R. A. W. Johnstone, M. M. Pereira, A. M. P. de SantAna, A. C. Serra, A. Sobral e P. A. Stocks. New procedures for the synthesis and analysis of 5,10,15,20-tetrakis(sulphophenyl)porphyrins and derivatives through chlorosulphonation. *Heterocycles*. 1996. **43**. 829-838.
- [5] E. Silva, M. M. Pereira, H. D. Burrows, M. E. Azenha, M. Sarakha e M. Bolte. Photooxidation of 4-chlorophenol sensitised by iron *meso*-tetrakis(2,6-dichloro-3-sulfophenyl)porphyrin in aqueous solution. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004. **3**. 200-204.
- [6] C. J. P. Monteiro, M. M. Pereira, S. M. A. Pinto, A. V. C. Simões, G. F. F. Sá, L. G. Arnaut, S. J. Formosinho, S. Simões e M. F. Wyatt. Synthesis of amphiphilic sulfonamide halogenated porphyrins: MALDI-TOFMS characterization and evaluation of 1-octanol/water partition coefficients. *Tetrahedron*. 2008. **64**. 5132-5138.
- [7] C. J. P. Monteiro, M. M. Pereira, M. E. Azenha, H. D. Burrows, C. Serpa, L. G. Arnaut, M. J. Tapia, M. Sarakha, P. Wong-Wah-Chung e S. Navaratnam. A comparative study of water soluble 5,10,15,20-tetrakis(2,6-dichloro-3-sulfophenyl)porphyrin and its metal complexes as efficient sensitizers for photodegradation of phenols. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2005. **4**. 617-624.
- [8] G. Piccirillo, M. Moreira-Santos, M. Valega, M. E. S. Eusebio, A. M. S. Silva, R. Ribeiro, H. Freitas, M. M. Pereira e M. J. F. Calvete. Supported metalloporphyrins as reusable catalysts for the degradation of antibiotics: Synthesis, characterization, activity and ecotoxicity studies. *Appl. Catal. B. Environ.* 2021. **282**. 119556.
- [9] S. M. A. Pinto, M. J. F. Calvete, M. E. Ghica, S. Soler, I. Gallardo, A. Pallier, M. B. Laranjo, A. M. S. Cardoso, M. M. C. A. Castro, C. M. A. Brett, M. M. Pereira, É. Tóth e C. F. G. C. Geraldes. A biocompatible redox MRI probe based on a Mn(II)/Mn(III) porphyrin. *Dalton Trans.* 2019. **48**. 3249-3262.

Anexo 1



ALS LIFE SCIENCES PORTUGAL, S.A.

Relatório nº 83181/2022 Pg 1/3

Data Emissão: 17-03-2022

N.º de Análise: QH / 4199 / 22
Data Colheita: -
Data Receção: 25-02-2022
Data Início Ensaio: 26-02-2022
Data Fim Ensaio: 17-03-2022
Código Cliente: 4417

Exmo(s) Sr(s):
Universidade de Coimbra
Rua Larga, R/Ch Esq. do Edifício FMUC
Coimbra
3004-504
Coimbra

Unidade: Universidade de Coimbra

Identificação da Amostra:

64185 / 22

Produto: *Efluente*

Acondicionamento: frasco

A colheita de amostra não foi efectuada pelo laboratório.

Laboratório Externo

Ensaio/Método	Resultado	U	Unidade
(a) Compostos farmacêuticos por LCMS - DI CZ_SOP_D06_03_201.A (US EPA 1694)			
Sulfametoxazol	<0.010 (LQ)		µg/L
Buprenorfina	<0.010 (LQ)		µg/L
Iopromide	707	30.0%	µg/L
lomeprol	<0.030 (LQ)		µg/L
Hidroclorotiazida	0.074	30.0%	µg/L
Enalapril	<0.010 (LQ)		µg/L
Ciclobenzaprina	2.20	30.0%	µg/L
Capecitabina	<0.010 (LQ)		µg/L
Butorfanol	<0.010 (LQ)		µg/L
Azatioprina	<0.010 (LQ)		µg/L
Anastrozol	0.542	30.0%	µg/L
Zolpidem	<0.010 (LQ)		µg/L
Metronidazol	<0.010 (LQ)		µg/L
Tramadol	1.44	30.0%	µg/L
Oxazepam	0.202	30.0%	µg/L
Salbutamol	<0.010 (LQ)		µg/L
Piroxicam	<0.010 (LQ)		µg/L
Micofenolato de mofetil	<0.010 (LQ)		µg/L
Metoprolol	<0.010 (LQ)		µg/L
Cetoprofeno	<0.010 (LQ)		µg/L
Iopamidol	<0.030 (LQ)		µg/L
lohexol	<0.030 (LQ)		µg/L
Furosemida	21.7	40.0%	µg/L
Diclofenaco	<0.010 (LQ)		µg/L
Carbamazepina	0.280	35.0%	µg/L
Cafeína	111	40.0%	µg/L
Valsartan	0.142	30.0%	µg/L
Naproxeno	<0.010 (LQ)		µg/L
Thebain	<0.010 (LQ)		µg/L
Paracetamol (acetaminofeno)	4.81	30.0%	µg/L
Flutamida	<0.010 (LQ)		µg/L

Tondela
Zona Industrial Tondela
ZIM II Lote 2 e 6
3460-070 Tondela
Telef.: 232 817 817

Lisboa
Rua das Azenhas, nº 34 B
2730 - 270 Barcarena

Castelo Branco
Zona Industrial
Rua S, Lote 41
6000-459 Castelo Branco
Telef.: 272 347 326

Madeira
Caminho da Igreja nº 35
9125-259 Caniço
Telef.: 291 934 931

Eugénia Silva

Técnica Superior de Laboratório
Eugénia Silva



ALS LIFE SCIENCES PORTUGAL, S.A.

Relatório nº 83181/2022 Pg 2/3

Data Emissão: 17-03-2022

N.º de Análise: QH / 4199 / 22
Data Colheita: -
Data Receção: 25-02-2022
Data Início Ensaio: 26-02-2022
Data Fim Ensaio: 17-03-2022
Código Cliente: 4417

Exmo(s) Sr(s):
Universidade de Coimbra
Rua Larga, R/Ch Esq. do Edifício FMUC
Coimbra
3004-504 Coimbra

Unidade: Universidade de Coimbra

Identificação da Amostra:

64185 / 22

Produto: *Efluente*

Acondicionamento: frasco

A colheita de amostra não foi efectuada pelo laboratório.

Ensaio/Método	Resultado	U	Unidade
Ciprofloxacina	<0.030 (LQ)		µg/L
Ácido clofibrico	<0.010 (LQ)		µg/L
Citalopram	0.397	30.0%	µg/L
Sertraline	0.046	30.0%	µg/L
Indomethacin	0.012	30.0%	µg/L
Paclitaxel	0.364	35.0%	µg/L
Fluoxetine	<0.010 (LQ)		µg/L
Diazepam	<0.010 (LQ)		µg/L
Loperamida	0.012	35.0%	µg/L
Ifosfamida	<0.010 (LQ)		µg/L
Gabapentin	2.80	30.0%	µg/L
Chloramphenicol	<0.010 (LQ)		µg/L
Lincomycin	<0.010 (LQ)		µg/L
Gemfibrozil	<0.020 (LQ)		µg/L
Sulfamethazine	<0.010 (LQ)		µg/L
Ciclofosfamida	<0.010 (LQ)		µg/L
Atenolol	<0.010 (LQ)		µg/L
Varfarina	<0.010 (LQ)		µg/L
Trimetoprim	0.115	30.0%	µg/L
Terbutalina	<0.010 (LQ)		µg/L
Sotalol	<0.010 (LQ)		µg/L
Propranolol	<0.010 (LQ)		µg/L
Bezafibrate	<0.010 (LQ)		µg/L

Tondela
Zona Industrial Tondela
ZIM II Lote 2 e 6
3460-070 Tondela
Telef.: 232 817 817

Lisboa
Rua das Azenhas, nº 34 B
2730 - 270 Barcarena

Castelo Branco
Zona Industrial
Rua S, Lote 41
6000-459 Castelo Branco
Telef.: 272 347 326

Madeira
Caminho da Igreja nº 35
9125-259 Caniço
Telef.: 291 934 931

Eugénia Silva

Técnica Superior de Laboratório
Eugénia Silva



Data Emissão: 17-03-2022

N.º de Análise: QH / 4199 / 22
 Data Colheita: -
 Data Receção: 25-02-2022
 Data Início Ensaio: 26-02-2022
 Data Fim Ensaio: 17-03-2022
 Código Cliente: 4417

Exmo(s) Sr(s):
 Universidade de Coimbra
 Rua Larga, R/Ch Esq. do Edifício FMUC
 Coimbra
 3004-504 Coimbra

Unidade: Universidade de Coimbra

Identificação da Amostra:**64185 / 22****Produto:** *Efluente***Acondicionamento:** frasco

A colheita de amostra não foi efectuada pelo laboratório.

Notas

Lista de abreviaturas: NE- Número estimado; UFC- Unidades formadoras de colónias; LQ – Limite de quantificação; LD – limite de detecção; V.L. – Valor Limite; V.R. – Valor Recomendado; VP - Valor Paramétrico; C - Conforme; A - Aceitável; NC - Não Conforme; Unid. - Unidade; DO - Densidade óptica; Av. C. - Avaliação de Conformidade; NMP- Número Mais Provável; PFC - Propósito de Formação de Colónias; U – Incerteza expandida.

O ensaio assinalado com (s) foi contratado e não é acreditado.

O ensaio assinalado com (a) foi contratado e é acreditado.

Nos resultados assinalados com (k) os microrganismos estão presentes, mas inferiores a 3xdiluição (quando aplicável).

Nos resultados assinalados com (y) os microrganismos estão presentes, mas inferiores a 4xdiluição.

Para os ensaios assinalados por técnicas de cálculo a metodologia seguida pode ser disponibilizada a pedido.

Os dados a sublinhado e itálico foram fornecidos pelo cliente e não são da responsabilidade do laboratório.

Este Relatório de Ensaio refere-se apenas às amostras analisadas.

Proibida a reprodução parcial deste documento.

Os resultados deste relatório de ensaio aplicam-se à amostra conforme rececionada.

Incerteza "U" - corresponde à incerteza expandida calculada com um fator de expansão k=2, correspondendo a um nível de confiança aproximadamente igual a 95%. As incertezas apresentadas em % encontram-se em valor relativo e as restantes em valor absoluto.

A incerteza do ensaio não inclui incerteza da colheita. A combinação da incerteza da colheita (quando apresentada) e do ensaio pode ser obtida através da fórmula 1 (*U* combinada expressa em %) quando a incerteza do ensaio se encontra apresentada em valor relativo ou através da fórmula 2 (*U* combinada expressa em %) quando a incerteza do ensaio se encontra apresentada em valor absoluto. Para colheitas efetuadas segundo a ISO 5667-5:2006 e IGL 16 a incerteza combinada (colheita e ensaio) para o ensaio pH é de 0.27 unidades de pH.

Microbiologia de Alimentos: A incerteza reportada foi estimada de acordo com a ISO19036:2019 e considerada igual ao desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial e apresenta-se sob a forma de intervalo e com o valor de U em % (quando aplicável).

Microbiologia de Águas: A incerteza reportada foi estimada de acordo com a ISO29201:2012 e apresenta-se sob a forma de intervalo e com o valor de U em % (quando aplicável).

Microbiologia de Atividades médicas, Produtos farmacêuticos, Têxteis e acessórios de vestuário, Antissépticos, Desinfetantes, Sabões, Detergentes e Cosméticos: A incerteza reportada foi estimada de acordo com a ISO 19036:2019 e considerada igual ao desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial e apresenta-se sob a forma de intervalo.

$$U_{\text{combinada}} (\%) = \sqrt{(U_{\text{colheita,relativa}})^2 + (U_{\text{ensaio,relativa}})^2} \quad \text{Fórmula 1}$$

$$U_{\text{combinada}} (\%) = \sqrt{(U_{\text{colheita,relativa}})^2 + \left(\frac{U_{\text{ensaio,absoluta}}}{\text{resultado,ensaio}} \times 100\right)^2} \quad \text{Fórmula 2}$$

Tondela
 Zona Industrial Tondela
 ZIM II Lote 2 e 6
 3460-070 Tondela
 Telef.: 232 817 817

Lisboa
 Rua das Azenhas, nº 34 B
 2730 - 270 Barcarena

Castelo Branco
 Zona Industrial
 Rua S. Lote 41
 6000-459 Castelo Branco
 Telef.: 272 347 326

Madeira
 Caminho da Igreja nº 35
 9125-259 Caniço
 Telef.: 291 934 931

Técnica Superior de Laboratório
 Eugénia Silva

