

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CURSO DE DOUTORADO EM QUÍMICA – ASSOCIAÇÃO AMPLA

UEL/UEPG/UNICENTRO

ANGÉLICA DE SOUSA HRYSYK

**DEGRADAÇÃO FOTOCATALÍTICA DE POLUENTES
EMERGENTES EMPREGANDO TiO₂ IMOBILIZADO**

PONTA GROSSA – PR

2018

ANGÉLICA DE SOUSA HRYSYK

**DEGRADAÇÃO FOTOCATALÍTICA DE POLUENTES
EMERGENTES EMPREGANDO TiO₂ IMOBILIZADO**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Ponta Grossa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado em Química – Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, para a obtenção do título de Doutora em Química. Área de concentração: Química Inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Toshio Fujiwara

PONTA GROSSA – PR

2018

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor Tratamento da Informação BICEN/UEPG

H873 Hrysyk, Angélica de Sousa
 Degradação fotocatalítica de poluentes emergentes empregando
 TiO₂ imobilizado / Angélica de Sousa Hrysyk. Ponta Grossa, 2018.
 136 f.

 Tese (Doutorado em Química – área de concentração : Química
 Inorgânica), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Universidade
 Estadual de Londrina e Universidade Estadual do Centro-Oeste.

 Orientador: Prof. Dr. Sérgio Toshio Fujiwara

 1. Fotocatálise heterogênea. 2. Micropoluentes orgânicos. 3.
 Processos oxidativos avançados. I. Fujiwara, Sérgio Toshio. II.
 Universidade Estadual de Ponta Grossa, Universidade Estadual de
 Londrina. Universidade Estadual do Centro-Oeste. Doutorado em
 Química. III. T.

CDD : 541.183

TERMO DE APROVAÇÃO

ANGÉLICA DE SOUSA HRYSYK

**"DEGRADAÇÃO FOTOCATALÍTICA DE POLUENTES EMERGENTES
EMPREGANDO TiO_2 IMOBILIZADO".**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientador:


Prof. Dr. Sérgio Toshio Fujiwara
UEPG/PR


Prof.ª Dr.ª Elenise Sauer
UTFPR/PR


Prof.ª Dr.ª Elaine Regina Lopes Tiburtius
UEPG/PR


Prof.ª Dr.ª Eryza Guimarães de Castro
UNICENTRO/PR


Prof.ª Dr.ª Maria Lurdes Felsner
UNICENTRO/PR

Ponta Grossa, 06 de abril de 2018.

DEDICATÓRIA

A minha mãe Roselita, pelo seu amor incondicional, exemplo em minha vida, que sempre ensinou a lutar pelos meus sonhos e objetivos.

Ao meu pai Acir, pelo apoio e carinho.

A tia Terezinha, minha segunda mãe, por seu apoio e incentivo em todos os momentos que mais precisei.

Ao tio Valdir pelo carinho e incentivo.

A minha irmã Natália, companheira de todos os momentos da minha vida.

Ao meu esposo Herlon, presente nos momentos de felicidades e dificuldades, compartilhando sonhos e projetos.

Aos meus avós amados, Leonor e Rafael, que guardarei para sempre na minha memória e em meu coração.

Ofereço a vocês essa conquista!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Sérgio Toshio Fujiwara pela orientação, confiança e compreensão em todos os momentos do trabalho.

A Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG e Associação Ampla UEL/UNICENTRO/ UEPG pela oportunidade.

A Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO, pela possibilidade de desenvolvimento de grande parte do trabalho.

Ao Instituto Federal do Paraná Campus Ivaiporã e Campus Pitanga pelo apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. Fauze Jaco Anaissi por ter me recebido em seu laboratório e, também pelo apoio recebido dos colegas do Labmat da UNICENTRO.

A Prof^a Dr^a Yohandra Reyes Torres e Christiane Schineider Machado Kolc pela ajuda no planejamento, execução e interpretação dos resultados no HPLC e CG/EM.

A Prof^a Dr^a Patrícia Carla Giloni de Lima por sua imensa ajuda na realização dos ensaios ecotoxicológicos e, a Bruna Durat sempre disposta a me ajudar nas análises.

A Prof^a Dr^a Elaine Tiburtius e Prof. Dr. Jarem Raul Garcia pela colaboração e sugestões no exame de qualificação

A Prof^a Dr^a Eryza Castro pelas análises de DRX.

A minha amiga Andréia Stadnik pela parceira de todas as horas.

As minhas amigas queridas Jucimara e Camila Kulek de Andrade pela disponibilidade em me ajudar sempre que precisei.

As amigas Mariane, pelas análises de TG/DTA, e Karine pela parceria e sugestões no trabalho.

A Raquel e Daniela pelas análises de Carbono Orgânico Total no Labmu da UEPG.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para esta conquista.

Muito Obrigada!

RESUMO

Por muito tempo os estudos sobre os tratamentos de resíduos estavam voltados a determinados grupos de poluentes considerados resistentes e tóxicos. Nos últimos anos espécies consideradas micropoluentes, com concentrações da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$, têm recebido atenção, pois muitos destas possuem atividade farmacológica e devido ao seu grande uso e da baixa eficiência de remoção apresentada pelos sistemas de tratamento de esgoto podem contaminar águas superficiais e subterrâneas. Dessa forma, diversas pesquisas têm sido desenvolvidas na busca de novas formas de tratamento, com capacidade para a remoção de antibióticos, analgésicos, antiinflamatórios, entre outros. Os Processos Oxidativos Avançados (POA's) têm apresentado reconhecida importância, pois mostram eficiente degradação desses micropoluentes que, em alguns casos, permitem a sua completa mineralização, ou seja, sua conversão em dióxido de carbono, água e íons inorgânicos. Em função de seu elevado uso pela população e potenciais problemas atribuídos a sua presença no ambiente existe a necessidade de investigação sobre metodologias de remediação para os fármacos amoxicilina (AMX), fluoxetina (FLU) e sinvastatina (SIN). Por isso, neste trabalho, foi estudada a potencialidade da fotocatalise heterogênea empregando dióxido de titânio imobilizado em acetato de celulose (TiO_2/AC) assistido sob radiação ultravioleta (UV) em relação à remediação de matrizes aquosas contendo os fármacos AMX, FLU e SIN. O fotocatalisador sintetizado foi caracterizado por termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA), Microanálise Quantitativa com mapeamento químico por Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDS), Difractometria de Raios X (DRX) e Espectroscopia no Infravermelho (FTIR). Os ensaios de degradação dos fármacos foram conduzidos em reator fotoquímico e as frações provenientes foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência no comprimento de onda de máxima absorção para cada fármaco. Obtiveram-se degradações de 99,1% (SIN em 30 minutos), 85% (FLU em 180 minutos) e 99,0% (AMX em 240 minutos). Ensaios de fotólise foram realizados comprovando a baixa fotossensibilidade dos fármacos, sendo assim, atribui-se a degradação como resultante da interação entre o fotocatalisador TiO_2/AC e a radiação ultravioleta. Análises de Cromatografia Gasosa acoplado ao detector de massas (CG/EM) permitiram quantificar e identificar os produtos de degradação, com resultados de Carbono Orgânico Total (COT) foi

possível determinar a taxa de mineralização de 70, 43 e 15%, para AMX, FLU e SIN, respectivamente. Ensaios ecotoxicológicos realizados com a planta aquática *Lemna aequinoctialis* Welw mostraram-se eficientes para se compreender como os fármacos e seus produtos de degradação podem afetar os organismos aquáticos.

Palavras chave: fotocatalise heterogênea, micropoluentes orgânicos, processos oxidativos avançados.

ABSTRACT

For a long time the studies on the treatment of residues were directed at certain groups of pollutants considered resistant and toxic. In recent years, species considered micropollutants, with concentrations of the order of $\mu\text{g L}^{-1}$, have received attention, since many of them have pharmacological activity and due to their great use and the low removal efficiency presented by sewage treatment systems can contaminate surface waters and underground. In this way, several researches have been developed in search of new forms of treatment, with capacity for the removal of antibiotics, analgesics, anti-inflammatories, among others. The Advanced Oxidative Processes (POAs) have been recognized as important because they show an efficient degradation of these micropollutants, which in some cases allow their complete mineralization, that is, their conversion into carbon dioxide, water and inorganic ions. Due to its high use by the population and potential problems attributed to its presence in the environment there is a need for research on remediation methodologies for the drugs amoxicillin (AMX), fluoxetine (FLU) and simvastatin (SIN). Therefore, the potential of heterogeneous photocatalysis using titanium dioxide immobilized in cellulose acetate (TiO_2/AC) assisted under ultraviolet (UV) radiation in relation to the remediation of aqueous matrices containing the AMX, FLU and SIN drugs was studied. The photocatalyst was characterized by thermogravimetry (TG) and differential thermal analysis (DTA), Quantitative Microanalysis with chemical mapping by X-ray Dispersive Energy Spectroscopy (EDS), X-ray Diffraction (XRD) and Infrared Spectroscopy (FTIR). The drug degradation assays were conducted in a photochemical reactor and the fractions obtained were analyzed by high performance liquid chromatography at the maximum absorption wavelength for each drug. Degradations of 99.1% (SIN in 30 minutes), 85% (FLU in 180 minutes) and 99.0% (AMX in 240 minutes) were obtained. Photolysis assays were performed proving the low photosensitivity of the drugs, thus, degradation is attributed as a result of the interaction between the TiO_2 / AC photocatalyst and ultraviolet radiation. Analysis of Gas Chromatography coupled to the mass detector (GC / MS) allowed to quantify and identify the degradation products, with results of Total Organic Carbon (TOC), it was possible to determine the mineralization rate of 70, 43 and 15% for AMX, FLU and SIN, respectively. Ecotoxicological assays performed with the aquatic plant *Lemna aequinoctialis* Welw

have been shown to be effective in understanding how drugs and their degradation products can affect aquatic organisms.

Keywords: heterogeneous photocatalysis; organic micropollutants; advanced oxidative processes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolução dos parâmetros avaliados pela GDWQ.	22
Figura 2. Possíveis fontes e vias para a ocorrência de resíduos farmacêuticos no ambiente aquático.	30
Figura 3. Principais fontes de poluição de águas superficiais nas regiões do Brasil.	32
Figura 4. Exemplo de cadeia alimentar do ecossistema aquático constituído por representantes de três níveis tróficos (NT).....	42
Figura 5. Esquema representativo do princípio da fotocatalise heterogênea (A: Espécie aceptora; D: Espécie doadora).	46
Figura 6. Estruturas cristalinas para as fases do dióxido de titânio.	50
Figura 7. Estruturas dos fármacos estudados.	57
Figura 8. Estrutura molecular da celulose.	58
Figura 9. Representação das etapas realizadas para obtenção de TiO ₂ /AC.....	63
Figura 10. Representação esquemática das etapas do processo de extração em fase sólida (SPE).	68
Figura 11. Análises TG/DTA para TiO ₂ /AC.....	77
Figura 12. Microanálise Quantitativa do TiO ₂ /AC.	79
Figura 13. Difratoograma do TiO ₂ /AC.....	80
Figura 14. Espectro de Infravermelho obtido para o Acetato de celulose (AC), Dióxido de titânio (TiO ₂) e o material TiO ₂ /AC.....	82
Figura 15. Representação geométrica do planejamento fatorial 2 ² utilizado para investigação do efeito das variáveis pH e massa de TiO ₂ na degradação fotocatalítica para (A) Fluoxetina, (B) Amoxicilina e (C) Sinvastatina.....	85
Figura 16. Representação esquemática do reator fotoquímico: 1. Retirada de amostra com seringa adaptada; 2. Saída de água; 3. Coletor de amostra; 4. Agitador magnético; 5. Bulbo de quartzo; 6. Lâmpada a vapor de mercúrio; 7. Entrada de água (A). Fotografia do reator fotoquímico (B).....	87
Figura 17. Cromatogramas e espectros UV obtidos para (A) AMX, (B) FLU e (C) SIN.	88
Figura 18. Modificação do perfil espectral de (A) AMX, (B) FLU e (C) SIN durante degradação fotocatalítica mediada por TiO ₂ /AC com radiação UV.	89
Figura 19. Cromatogramas obtidos para FLU (A) solução padrão 40 ppm (B) Solução degradada após 15 minutos de reação.	92

Figura 20. Cromatogramas obtidos para SIN (A) solução padrão 40 ppm (B) Solução degradada após 10 minutos de reação.	92
Figura 21. Espectros obtidos para FLU (A) solução padrão 40 ppm (B) Solução degradada após 15 minutos de reação.	93
Figura 22. Espectros obtidos para SIN (A) solução padrão 40 ppm (B) Solução degradada após 10 minutos de reação.	93
Figura 23. Proposta de formação de produtos resultantes da degradação da sinvastatina.	100
Figura 24. Proposta de formação de produtos resultantes da degradação da fluoxetina.	101
Figura 25. Proposta de via de formação de compostos intermediários após irradiação (US), ozonização e US/O ₃ (pH 10, frequência US = 575 kHz, potência US = 75W, [O ₃ (aq)] = 0,15 mg L ⁻¹).	103
Figura 26. Determinação de COT para amostras degradadas de (A) Amoxicilina e (B) Fluoxetina, C ₀ = 100 mg L ⁻¹	105
Figura 27. Tempo de duplicação (g dias ⁻¹) de <i>Lemna aequinoctialis</i> submetidas à fluoxetina (FLU), amoxicilina (AMX) e sinvastatina (SIN) e seus produtos da degradação por fotocatalise.	107
Figura 28. Teor de pigmentos clorofilianos em <i>Lemna aequinoctialis</i> submetidas à fluoxetina (FLU), amoxicilina (AMX) e sinvastatina (SIN) e seus produtos da degradação por fotocatalise.	110
Figura 29. Variação na atividade da Ascorbato peroxidase em <i>Lemna aequinoctialis</i> submetidas à fluoxetina (FLU), amoxicilina (AMX) e sinvastatina (SIN) e seus produtos da degradação por fotocatalise.	112
Figura 30. Variação na atividade da Peroxidase em <i>Lemna aequinoctialis</i> submetidas à fluoxetina (FLU), amoxicilina (AMX) e sinvastatina (SIN) e seus produtos da degradação por fotocatalise.	113
Figura 31. Variação na atividade da Catalase em <i>Lemna aequinoctialis</i> submetidas à fluoxetina (FLU), amoxicilina (AMX) e sinvastatina (SIN) e seus produtos da degradação por fotocatalise.	114

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Principais classes de poluentes emergentes encontrados no meio ambiente.....	28
Quadro 2. Fármacos selecionados para a avaliação de riscos.	33
Quadro 3. Normas brasileiras sobre ensaios ecotoxicológicos.	39
Quadro 4. Principais Processos de Oxidação Avançados.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistema de classificação da toxicidade aguda.	40
Tabela 2. Potenciais de oxidação para diferentes espécies.	43
Tabela 3. Propriedades físico-químicas dos fármacos estudados.....	54
Tabela 4. Concentrações utilizadas nos testes ecotoxicológicos.	74
Tabela 5. Composição porcentual do TiO ₂ /AC obtida via Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDS).	79
Tabela 6. Matriz do planejamento fatorial 2 ² aplicado na degradação dos fármacos Fluoxetina, Amoxicilina e Sinvastatina (100 mg L ⁻¹) a 25°C utilizando a fotocatalise heterogênea.	84
Tabela 7. Efeitos médios calculados e seus erros padrão para o planejamento fatorial 2 ² obtido na degradação dos fármacos Fluoxetina, Amoxicilina e Sinvastatina (100 mg L ⁻¹) pelo processo fotocatalítico.	84
Tabela 8. Taxas de degradação obtidas para AMX, FLU e SIN determinadas por CLAE/DAD.	90
Tabela 9. Dados da análise de regressão linear no nível de 99% de confiança para o estudo de linearidade.	94
Tabela 10. Limites de Detecção e Quantificação.	96
Tabela 11. Parâmetros estatísticos de repetitividade e precisão intermediária obtidos para FLU e SIN.	96
Tabela 12. Parâmetros estatísticos da exatidão.....	97
Tabela 13. Quantificação da FLU por CG/EM.	98
Tabela 14. Quantificação da SIN por CG/EM.	98

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AC – Acetato de celulose

AMX – Amoxicilina

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BET – Área Superficial Específica

CG – Cromatografia em fase Gasosa

CI – Carbono Inorgânico

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

COD – Carbono Orgânico Dissolvido

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

COT - Carbono Orgânico Total

CT – Carbono Total

CV – Coeficiente de Variação

EDS – Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X

EM – Espectrômetro de Massas

EPA – Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)

ETE – Estação de Tratamento de Esgoto

FLU – Fluoxetina

HPLC – Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia

ISO - Organization for Standardization

LC - Liquid Chromatography

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

m/z - razão massa/carga

MeOH – Metanol

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MM – Massa Molecular

MME – Ministério de Minas e energia

MS - Mass Spectrometry

POA – Processo Avançado de Oxidação

PhACs – Pharmaceutically-active Compounds (Compostos com atividade farmacêutica)

RAM - Resistência Antimicrobiana

RENAME - Relação Nacional de Medicamentos Essenciais

SCB - Sistema de Classificação Biofarmacêutica

SIN – Sinvastatina

SPE –Extração em fase sólida Microextração (do inglês, *Solid-phase extraction*)

SUS - Sistema Único de Saúde

TG/DTA – Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial

TOF - Time-of-Flight

US EPA – United States Environmental Protection Agency

UV – Radiação Ultravioleta

UV-Vis - Ultravioleta-visível

WHO – World Health Organization (OMS – Organização Mundial da Saúde)

US - irradiação ultra-sônica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1. A ÁGUA.....	20
2.2. TOXICIDADE E RESISTÊNCIA DE FÁRMACOS	33
2.3. EFEITO DOS FÁRMACOS EM ESPÉCIES AQUÁTICAS.....	35
2.4. ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS.....	38
2.5. PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS (POA's)	43
2.5.1. Sistemas homogêneos	44
2.5.2. Fotocatálise Heterogênea.....	45
2.6. DIÓXIDO DE TITÂNIO	48
2.6.1. Estrutura e propriedades do dióxido de titânio	49
2.6.2. Aplicação do TiO_2 na fotocatálise heterogênea.....	52
2.7. FÁRMACOS EMPREGADOS NAS REAÇÕES DE FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA	54
2.7.1. Amoxicilina	55
2.7.2. Fluoxetina	55
2.7.3. Sinvastatina	56
2.8. ACETATO DE CELULOSE.....	58
2.9. CARBONO ORGÂNICO TOTAL (COT).....	59
2.10. AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS PRODUTOS GERADOS NA DEGRADAÇÃO DOS FÁRMACOS POR CG/EM	61
3. OBJETIVOS	62
3.1. OBJETIVO GERAL.....	62
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	62
4. PARTE EXPERIMENTAL	63
4.1. REAGENTES	63
4.2. SÍNTESE DO MATERIAL TiO_2/AC	63
4.3. CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL	64
4.3.1. Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)	64
4.3.2. Microanálise Quantitativa com mapeamento químico por Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDS)	64

4.3.3. Difractometria de Raios X (DRX).....	64
4.3.4. Espectroscopia no Infravermelho	65
4.4. ANÁLISE DA DEGRADAÇÃO FOTOCATALÍTICA HETEROGÊNEA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE-DAD)	65
4.5. FOTÓLISE.....	66
4.6. ESTUDO DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO CG/EM PARA QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS E IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS FORMADOS NA DEGRADAÇÃO	66
4.6.1 Parâmetros Analíticos da Validação	68
4.6.1.1. Avaliação da Seletividade.....	69
4.6.1.2. Avaliação da Linearidade	69
4.6.1.3. Determinação dos Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)	70
4.6.1.4. Avaliação da Precisão	71
4.6.1.5. Avaliação da Exatidão	71
4.7. CARBONO ORGÂNICO TOTAL (COT).....	72
4.8. AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA	73
4.8.1. Tempo de Duplicação.....	74
4.8.2. Teor de Pigmentos	75
4.8.3. Teor de Proteínas e Atividade Enzimática.....	75
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
5.1. CARACTERIZAÇÃO DO FOTOCATALISADOR	77
5.1.1. Análise termogravimétrica (TG-DTG/DTA)	77
5.1.2. Microanálise Quantitativa com mapeamento químico por Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDS)	78
5.1.3. Difractometria de Raios X.....	79
5.1.4. Espectroscopia no Infravermelho	81
5.2. PLANEJAMENTO FATORIAL	83
5.3. PROCESSO FOTOQUÍMICO.....	86
5.4. ANÁLISE DA DEGRADAÇÃO FOTOCATALÍTICA HETEROGÊNEA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE-DAD)	87
5.5. AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO POR FOTÓLISE	90
5.6. ESTUDO DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO CG/EM PARA QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS.....	91
5.6.1. Seletividade	91

5.6.2. Linearidade	93
5.6.3. Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)	95
5.6.4. Precisão.....	96
5.6.5. Exatidão.....	97
5.7. APLICAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO PARA QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	98
5.8. POSSÍVEIS PRODUTOS GERADOS NA DEGRADAÇÃO DOS FÁRMACOS .	98
5.8.1. Proposta de degradação para a Sinvastatina.....	99
5.8.2. Proposta de degradação para a Fluoxetina.....	101
5.8.3 Proposta para a degradação da Amoxicilina	102
5.9. DETERMINAÇÃO DAS TAXAS DE MINERALIZAÇÃO DAS AMOSTRAS POR COT.....	104
5.10. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS FÁRMACOS E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO	106
5.10.1. Tempo de Duplicação de <i>L. aequinoctialis</i>	107
5.10.2. Pigmentos fotossintéticos	109
5.10.3. Enzimas antioxidantes	111
6. CONCLUSÃO	116
REFERÊNCIAS	118

1. INTRODUÇÃO

A preocupação com a presença de contaminantes em águas superficiais, subterrâneas e rios em todo o mundo é uma questão de extrema importância. Essas substâncias são fármacos de uso humano e veterinário, produtos de higiene pessoal, contraceptivos, hormônios e esteroides, entre outros. A principal preocupação está relacionada com as substâncias que apresentam atividade farmacológica (PhACs, do inglês: *Pharmaceutically active Compounds*) (BENDZ, 2005). Esse grupo de substâncias com atividade farmacológica é denominado “contaminantes emergentes”, são assim classificados, pois ainda não estão inseridos na legislação que regulamenta os parâmetros para avaliação da qualidade da água (PETROVIC, 2006).

Essas substâncias são diariamente eliminadas na rede de esgoto, que ao serem tratados nas estações de tratamento de água e esgoto (ETE's) não as removem completamente, segundo Hernando e colaboradores (2006) a remoção é menor que 10% e muitas vezes o tratamento conduz a leve modificação das estruturas para as formas hidrolisadas ou conjugadas. Mesmo após receberem tratamento esses compostos ainda são encontrados nas águas (BILA e DEZOTTI, 2007; GHISELLI e JARDIM, 2007). Esse problema é agravado quando somente uma pequena parte dos esgotos é tratada, de acordo como os dados do IBGE (2010) 79,8% dos municípios brasileiros não efetuam qualquer tipo de tratamento no esgoto antes de retorná-lo aos rios.

Quando presentes no ambiente esses compostos podem ocasionar diversos efeitos deletérios, principalmente aos organismos aquáticos por serem cumulativos (Daughton e Ternes, 1999; Silva *et al.*, 2016), apresentam impactos no crescimento, desenvolvimento e reprodução (Neuparth *et al.*, 2014; Peters e Granek, 2016), sendo muitas vezes letais a esses organismos (Ribeiro *et al.*, 2015).

Assim, devido a seu grande uso pela população e ineficiência na remoção de fármacos nas ETE's torna-se necessário investir em pesquisas sobre metodologias eficientes para o tratamento desses compostos.

Dessa forma, diversos trabalhos disponíveis na literatura relatam a eficiência no emprego dos Processos Oxidativos Avançados (POAs) na remoção de produtos farmacêuticos e seus metabólitos de águas residuais (FERRANDO-CLIMENT *et al.*, 2017; BRIENZA *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2016a; GIANNAKIS *et al.*, 2015). Os

POAs empregam diferentes substâncias (H_2O_2 + UV, Fenton, Foto-Fenton e Tipo-Fenton), processos baseados em ozônio (O_3 , O_3 + UV) e semicondutores (TiO_2 , ZnO , Fe_2O_3 , SiO_2 e Al_2O_3 , entre outros), todos são fundamentados na geração de um forte agente oxidante radical hidroxila ($\text{HO}\cdot$) (PERA-TITUS *et al.*, 2004).

No presente estudo foi empregado o princípio de POAs sintetizando um fotocatalisador constituído pelo semicondutor TiO_2 imobilizado em acetato de celulose (TiO_2/AC). A vantagem de se utilizar o semicondutor imobilizado, em comparação à forma em suspensão, é devido ao fato de ser recuperado ao fim da reação, não necessitar de etapas adicionais de filtragem e possibilidade de reutilização.

O material sintetizado foi empregado no tratamento de diferentes classes de fármacos: amoxicilina (antibiótico), fluoxetina (antidepressivo) e sinvastatina (lipoproteínas). Apesar de esses fármacos serem importantes e muito consumidos pela população os seus impactos no ambiente ainda são pouco conhecidos, existem relatos que atribuem efeitos prejudiciais a organismos aquáticos (RIBEIRO *et al.*, 2015; NEUPARTH *et al.*, 2014; ELLESAT *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2016), alterações em fetos de animais e de seres humanos (BRUCE *et al.*, 2010) e provocar a indução de bactérias resistentes (PRUDEN, 2014).

De acordo com pesquisa realizada no Portal Capes, até o momento, não foram verificados trabalhos que utilizam o TiO_2/AC para o tratamento de tais fármacos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A ÁGUA

Durante séculos, a água considerada pura era aquela limpa, clara, insípida e sem odor, pois a população não dispunha de tecnologia necessária para reconhecer que, a boa aparência não garantiria a ausência de microrganismos danosos à saúde, portanto não relacionavam a água impura com o aparecimento de doenças. No entanto com o aumento da população e o estabelecimento de comunidades, acentuou-se a contaminação das águas superficial e subterrânea (PROSAB, 2009).

O registro de tratamento de água mais antigo data de 4000 anos a. C., na Índia, onde a água era fervida ou exposta ao sol, submetida filtração e resfriamento em potes cerâmicos. Há 1500 anos, no Egito era utilizado o alumínio para remover sólidos suspensos. Até por volta de 500 anos a. C., os tratamentos eram destinados a melhorar a cor, odor e sabor da água. Somente em 1831, na Inglaterra, após uma epidemia de cólera, houve a preocupação com a qualidade das águas, criando-se a primeira lei sanitária em 1848 (BRITO, 1943).

No século XVII, Francis Bacon, na Inglaterra, publicou trabalhos na qual abordava sobre métodos de tratamento da água como filtração, fervura, destilação e coagulação. Durante o século XVIII, o conhecimento científico acumulado até então possibilitou aos cientistas maior entendimento referente a origem e efeito dos contaminantes presentes nas fontes de água, especialmente aqueles que não eram visíveis a olho nu. Em 1849 foi publicado o primeiro trabalho sobre a cólera “*On the Mode of Communication of Cholera*”, livro de autoria do médico John Snow que descreve a relação entre a água contaminada com a transmissão da doença, sua obra é considerada o primeiro tratado de epidemiologia (HEMPEL, 2013).

Em 1864, o químico e microbiologista francês, Louis Pasteur, considerado um dos mais importantes fundadores da microbiologia médica (Encyclopedia Britannica, 2012), propõe a Teoria Microbiana das Doenças (MWH, 2005), afirmando a associação entre qualidade da água e saúde pública e, também destacando a importância do tratamento de água.

No final do século XIX e início do século XX, o tratamento de água estava centrado na clarificação e a remoção de organismos patogênicos, após esse período novas técnicas de tratamento foram desenvolvidas, tais como, coagulação, floculação, decantação e desinfecção. Até então não havia padrões de qualidade

para a água potável. Somente em 1890, nos Estados Unidos, a *United States Public Health Service* propôs a padronização dos testes bacteriológicos, evoluindo para a primeira edição do “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*” (USPHS, 2009).

A partir de 1950, a World Health Organization - WHO (Organização Mundial da Saúde - OMS) elaborou diretrizes referentes a potabilidade da água originando o documento: “*Standards of Drinking-Water Quality and Methods of Examination Applicable to European Countries e International Standards for Drinking-Water*”. Os padrões mínimos de qualidade estabelecidos pela OMS eram considerados possíveis de serem alcançados por todos os países. No entanto, os países da Europa, devido a posição econômica e tecnológica, estabeleceram padrões mais rigorosos (WHO, 1970).

A primeira regulamentação incluindo padrão bacteriológico de qualidade da água ocorreu em 1914 nos Estados Unidos. Em 1956 surgiu a primeira iniciativa de elaboração de diretrizes relativas à potabilidade da água promovida pela OMS e direcionada ao continente europeu. No Brasil, em 1977, foi elaborada a primeira norma de qualidade da água válida em todo o território nacional. Desde então as normas passam por sucessivas atualizações, aumentando o número de parâmetros regulamentados (PROSAB, 2009).

A OMS publicou, em 1983, pela primeira vez o “*Guidelines for Drinking Water Quality*” (GDWQ), o guia foi direcionado a todos os países e continha orientações referentes a qualidade da água para consumo humano (WHO, 1984). Em 1993 foi publicada a segunda edição do guia, incluindo significativo aumento do número de parâmetros químicos a serem controlados (WHO, 1995). Na terceira edição do guia, em 2000, foram reforçados conceitos e abordagens das edições anteriores, tais como: (i) destaque aos contaminantes microbiológicos; (ii) limitação do número de contaminantes químicos de maior relevância para a saúde; (iii) monitoramento da qualidade da água após o tratamento; (iv) o recurso a ferramentas de avaliação e gerenciamento de risco, como o Plano de Segurança da Água - PSA (WHO, 2004).

O PSA inclui uma avaliação sistemática e detalhada de riscos, além do monitoramento operacional das barreiras ou medidas de controle, sendo composto por pelo menos três componentes básicos: (i) avaliação do sistema de

abastecimento; (ii) identificação de medidas de controle de riscos; (iii) planos gerenciais incorporando planos de comunicação (WHO, 2004).

A Figura 1 resume os três documentos da GDWQ evidenciando o aumento do número de parâmetros avaliados nas edições de 1984, 1995 e 2004.

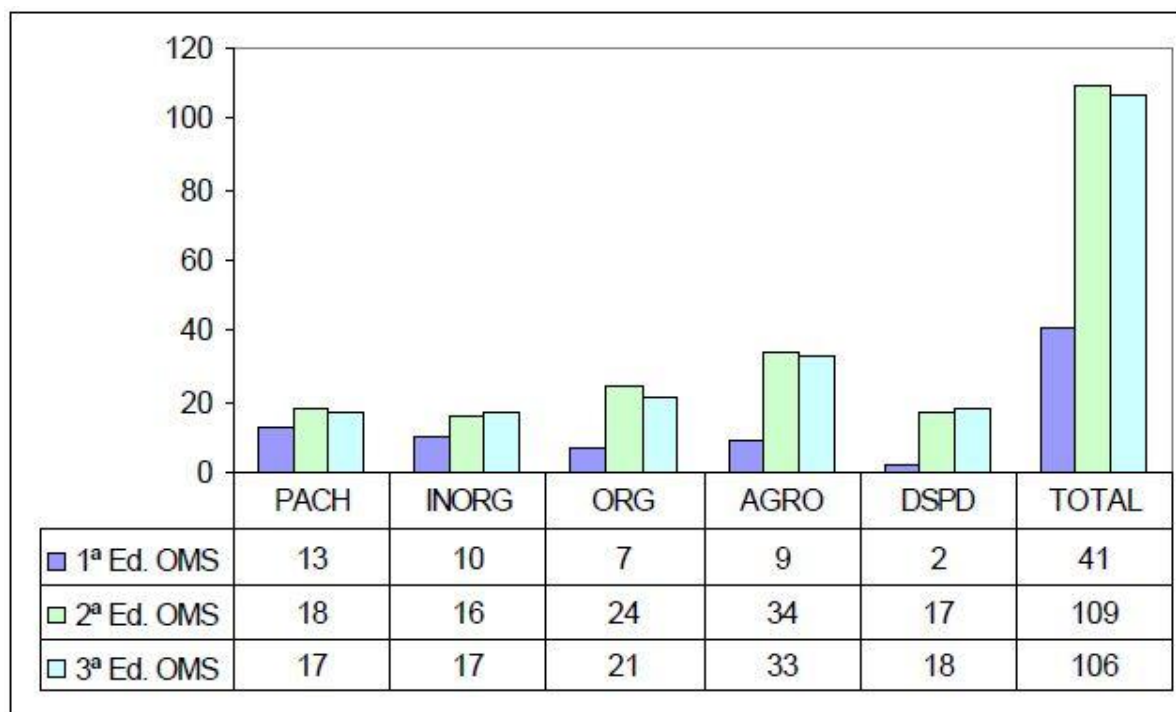


Figura 1. Evolução dos parâmetros avaliados pela GDWQ.

Legenda: PACH: Padrão de aceitação para consumo humano; INORG: Substâncias inorgânicas; ORG: Substâncias orgânicas; AGRO: Agrotóxicos; DSPD: Desinfetantes e produtos secundários da desinfecção.

FONTE: WHO, 2004.

O aumento do número de parâmetros avaliados é em consequência do surgimento de novas substâncias químicas destinadas a indústria e a agricultura, necessitando assim da apropriação de novos métodos de análise da qualidade de água, considerando a toxicidade e a interação dessas substâncias no ambiente.

De 1960 a 1970, com o desenvolvimento agrícola e industrial houve maior produção e usos de novas substâncias químicas, como os agrotóxicos, fármacos e hormônios sintéticos, necessitando desenvolver novas técnicas de tratamento específico para esses microcontaminantes. Desde então, surgiram outras técnicas de tratamento como a adsorção em carvão ativado (CRISTALE *et al.*, 2016), membranas (PENG *et al.*, 2015), degradação biológica (COLLADO *et al.*, 2012; CARR *et al.*, 2011; JOSS *et al.*, 2006), fotólise (GURR; REINHARD, 2006; WENK,

2011), lodos ativados (PEDROUZO *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011), processos Processos Oxidativos Avançados (POLO *et al.*, 2016; KHONGTHON *et al.*, 2016; SOARES *et al.*, 2016; GANIYU *et al.*, 2015).

Com a presença de contaminantes em concentrações cada vez menores houve a necessidade de buscar técnicas de detecção e quantificação mais eficazes, para que assim se possa determinar o risco de tais substâncias em alimentos e na água.

Assim, o limite dessas substâncias na água passou a ser estabelecido com base em valores máximos permitidos (VMP). Para a definição da concentração limite para cada substância são consideradas as seguintes variáveis: massa corporal, fração da IDT atribuída ao consumo de água, consumo diário de água, conforme mostrado na equação 1.

$$\text{VMP} = (\text{IDT} \times \text{mc} \times \text{Fa}) / \text{C} \quad (\text{Eq. 1})$$

Sendo:

VMP: valor máximo permitido (mg/L)

IDT: Ingestão Diária Tolerável (mg/kgmc.d)

mc: massa corporal média (kg)

Fa: Fração da IDT atribuída ao consumo de água

C: consumo diário de água (L/d)

A OMS adota os seguintes valores médios para adultos: mc = 60 kg; Fa = 0,1; C = 2 L (OMS, 2006).

A Ingestão Diária Tolerável (IDT) é a quantidade de uma substância a qual as pessoas poderiam estar expostas sem que ocorresse efeito adverso a saúde (via consumo de alimentos e de água, inalação e a absorção pela pele), trata-se da quantidade de uma substância presente nas diversas formas de exposição que se pode ser absorvida diariamente ao longo da vida (assumindo 70 anos) sem risco considerável para a saúde (mg/kg de massa corporal) (OMS, 2006).

A Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde estabelece VMP para padrões microbiológicos, turbidez, substâncias inorgânicas, orgânicas, agrotóxicos,

desinfetantes e produtos secundários da desinfecção, cianotoxinas, radioatividade, padrão organoléptico de potabilidade (BRASIL, 2011).

A resolução do CONAMA nº 357/05 regulamenta o controle do lançamento de efluentes e qualidade da água nos corpos hídricos, dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento dos corpos de água superficiais, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes nos corpos hídricos. Em 2011, esta resolução foi complementada e alterada pela CONAMA nº 430, que dispõem sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes.

Nestas portarias estão contidas sobre grau de salinidade, poluentes, efeitos tóxicos, ensaios toxicológicos, valores máximos permitidos para organismos, parâmetros para elementos químicos e substâncias, tais como agrotóxicos, produtos de limpeza e higiene.

Desde 1999 Daughton e Ternes já descreviam que, a química ambiental tem se concentrado quase exclusivamente nestas substâncias consideradas como "poluentes convencionais", principalmente agrotóxicos considerados tóxicos e produtos químicos industriais que indicam a persistência no ambiente. Nessa época, outros grupos, como produtos farmacêuticos e ingredientes ativos presentes em produtos de cuidados pessoais, chamados de PPCPs, fragrâncias, agentes de proteção solar, recebiam pouca atenção.

Daughton e Ternes (1999) afirmam também que estes compostos e os seus metabólitos bioativos podem ser continuamente introduzidos no meio aquático como misturas complexas, através de um grande número de rotas. A possibilidade de efeitos contínuos, mas indetectáveis ou despercebidos em organismos aquáticos é particularmente preocupante porque os efeitos podem acumular-se lentamente até que se atinja um alto nível cumulativo, conduzindo a mudanças irreversíveis.

De acordo com as listas de substâncias que constam nas resoluções do CONAMA nº 357/2005 e 430/2011 ainda há poucos compostos com valores máximos permitidos regulamentados para qualidade da água doce, estão presentes 31 substâncias inorgânicas e 53 substâncias orgânicas, que correspondem, basicamente a agrotóxicos, produtos de limpeza e resíduos industriais, ou seja, as mesmas classes de substâncias já descritas por Daughton e Ternes em 1999.

Estudos recentes estimam que em 2011 cerca de dois milhões de toneladas de produtos farmacêuticos foram produzidos apenas na China (Liu e Wong, 2013).

O grande problema está relacionado ao descarte dessas substâncias no meio, pois nas últimas décadas, substâncias biologicamente ativas utilizadas na agricultura, indústria e medicina foram descarregados no meio ambiente sem analisar as possíveis consequências negativas que trazem esta ação. O tipo de substâncias perigosas e variedade de sua concentração no meio podem ser altamente variáveis no ambiente. Nos países integrantes da União Europeia, por exemplo, foram registradas cerca de 100.000 substâncias diferentes, e esse número vem aumentando constantemente. Independentemente dos poluentes prioritários, cujos riscos são bem estabelecidos, a maioria destes compostos orgânicos são pouco estudados e ainda não possuem limites estabelecidos para garantir a qualidade ambiental (GILART *et al.*, 2012).

Segundo Da Cruz e colaboradores (2010), nos últimos anos, essas espécies, consideradas micropoluentes, tem recebido atenção, pois muitos destes possuem atividade farmacológica (termo em inglês, PhACs - *Pharmaceutically-active Compounds*) que devido ao seu grande uso e da baixa eficiência de remoção pelos sistemas de tratamento de esgoto podem contaminar águas superficiais e subterrâneas ocasionando problemas de saúde e ambientais.

As substâncias com atividade farmacológica estão inclusas no grupo dos chamados “contaminantes emergentes”, definido como substâncias que ainda não estão inseridas na legislação que regulamenta parâmetros para a qualidade da água. Dessa forma, são importantes os estudos sobre os efeitos na saúde humana e biota aquática para estabelecer limites para a sua presença em águas (PETROVIC, 2006).

Benz e colaboradores (2005) afirmam que as principais fontes de PHACs no ambiente são provenientes de produtos de uso humano e veterinário introduzidos principalmente através de excreção e posterior transporte pela rede de esgoto. Essas potentes substâncias são desenvolvidas para ter funções farmacológicas e fisiológicas específicas, mas que quando presentes no ambiente podem ocasionar efeitos negativos aos organismos. Apesar de nem todas as substâncias apresentarem uma toxicidade aquática aguda, muitas têm um efeito cumulativo significativo sobre o metabolismo de organismos não-alvo e de todo o ecossistema.

Segundo Heberer (2002) a ocorrência e o destino dos PhACs no ambiente aquático tem sido reconhecida como uma das questões primordiais para a química ambiental. Por esses motivos foram realizados estudos em países como, Áustria,

Brasil, Canadá, Croácia, Inglaterra, Alemanha, Grécia, Itália, Espanha, Suíça, Holanda e os Estados Unidos, que constataram a presença de mais de 80 compostos e metabólicos em ambientes aquáticos. Os PhACs são encontrados em concentrações até $\mu\text{g L}^{-1}$ em amostras de esgoto e efluentes, e também em amostras coletadas nas Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs). Após o seu consumo, os PhACs geralmente chegam as ETEs, onde eles não são completamente removidos, sendo descarregados com águas residuais em efluentes. (JELIC *et al.*, 2011; BUENO *et al.*, 2012; CAMACHO-MUÑOZ *et al.*, 2012).

Existe um número crescente de trabalhos abordando a presença de micropoluentes em águas superficiais, subterrâneas e esgoto. Em estudo realizado por Sodré e colaboradores (2010) investigaram a ocorrência de contaminantes em água de abastecimento na cidade de Campinas - SP. Para isso foram recolhidas amostras de água de torneira e analisadas por SPE-GC-MS para 11 contaminantes que representam preocupação ambiental. Foram detectadas seis substâncias (estigmasterol, colesterol, bisfenol A, cafeína, estrona e 17β -estradiol) consideradas contaminantes emergentes em concentrações que variaram de 0,16 a 0,34 $\mu\text{g L}^{-1}$. Com o resultado do estudo os autores concluíram que, os níveis de contaminantes emergentes presentes na água potável foram maiores do que a média encontrada em amostras ao redor do mundo.

Bila e Dezotti (2007) afirmam que a presença de Desregulares Endócrinos (DE's), tais como, pesticidas, produtos utilizados e produzidos pelas indústrias químicas e estrógenos naturais e sintéticos, em águas de consumo podem afetar a saúde, crescimento e reprodução de animais e seres humanos. Estes podem estar relacionados com o aumento da incidência de anomalias no sistema reprodutivo dos animais, o cancro em seres humanos e redução da fertilidade masculina. Costa e colaboradores (2014) relatam que DE's tais como pesticidas, bisfenol A, ftalatos, dioxinas e fitoestrógenos podem afetar o sistema reprodutivo feminino levando a formação de ovários policísticos, falência ovariana prematura e puberdade precoce.

Camacho-Muñoz e colaboradores (2014) investigam a distribuição dos PhACs conforme variabilidade de horário e sazonalidade de vinte e um produtos farmacêuticos, pertencentes a sete grupos terapêuticos, em águas residuais urbanas e industriais. Em águas provenientes da região urbana foram encontrados principalmente anti-inflamatórios e cafeína e em regiões industriais encontrou-se ácido salicílico atingindo níveis de concentração de até 3295 $\mu\text{g L}^{-1}$. Este fato pode

ser explicado pela sua ampla utilização em vários setores e em produtos domésticos, tais como, cosméticos, produtos de higiene pessoal, conservantes de alimentos (MIKAMI et al., 2002).

Os compostos estudados apresentaram diferentes padrões de distribuição durante os períodos de inverno e verão e de acordo com as horas do dia. Em áreas urbanas, os anti-inflamatórios: carbamazepina, gemfibrozil, propranolol e sulfametoxazol e também a cafeína mostrou um padrão temporal caracterizado por um aumento das concentrações nas primeiras horas de manhã (6h-10h). Esse comportamento pode ser explicado pelos hábitos de consumo e padrões de excreção, pois esses medicamentos são administrados em intervalos de 8 ou 12 horas, e a última ingestão do dia é normalmente durante a noite com excreção pela manhã. No entanto o ácido salicílico apresentou maiores concentrações durante o dia (14h-21h), fato explicado por sua presença em produtos de cuidados pessoais, logo a sua descarga é semelhante ao padrão do consumo de água em áreas urbanas. O ibuprofeno apresentou maior concentração no inverno e o acetaminofeno no período de verão. Estes resultados mostram que a principal fonte de PhACs é de origem urbana, exceto para o ácido salicílico que é liberado principalmente por descargas industriais (Camacho-Muñoz *et al.*, 2014).

Martín e colaboradores (2015) detectaram dezenove compostos PhACs em amostras de lodo recolhidas de dez ETEs localizadas em duas localidades da Espanha. As maiores concentrações foram encontradas para as fluoroquinolonas, seguido de anti-inflamatórios, hormônios, cafeína e reguladores de lípidos. Os anti-inflamatórios foram detectados em concentrações médias de 5,36 a 705 µg/kg dm. O ácido salicílico foi o fármaco que apresentou concentração mais elevada em todas as amostras analisadas, devido ao seu grande emprego em produtos de higiene. As fluoroquinolonas foram encontradas em concentrações elevadas (até 2759, 4328 e 899 µg / kg dm para ciprofloxacina, norfloxacina e ofloxacina, respectivamente), devido ao grande uso de fluoroquinolonas em humanos e medicina veterinária. Enquanto os antibióticos sulfametoxazol e trimetoprim foram encontrados em concentrações até 24,7 e 131 mg / kg dm, respectivamente.

Os estrogénios estrona e 17 α -etinilestradiol foram encontradas nas concentrações mais elevadas (até 887 e 483 mg / kg dm, respectivamente), o que pode ser explicado pela sua elevada tendência para ser acumulado na fase sólida (PATERAKIS *et al.*, 2012). Outros estudos relatam a presença de grupos

terapêuticos (antiepiléptico, estimulante nervoso, p-bloqueadores e os reguladores de lipídeos) em concentrações médias variaram de 0,44-214 µg / kg dm (MARTÍN *et al.*, 2015).

As principais classes de poluentes emergentes encontradas em águas superficiais, subterrâneas, Estações de Tratamento de Esgoto, estão listados no Quadro 1.

Quadro 1. Principais classes de poluentes emergentes encontrados no meio ambiente.

CLASSES	SUBSTÂNCIAS
Fármacos	
Alcalóide	Cafeína, teofilina.
Analgésico	Ácido acetilsalicílico, paracetamol, acetoaminofeno, ibuprofeno, codeína, propifenazona
Antibacteriano	Claritromicina, Lincomicina
Antibiótico (uso humano ou veterinário)	Amoxicilina, ciprofloxacina, clorotetraciclina, eritromicina, lincomicina, norfloxacina, oxitetraciclina, penicilina, roxitrocina, sulfametoxazol, tetraciclina, trimetoprima, tilosina, vancomicina, azitromicina, levofloxacina, claritromicina, cefaclor, moxifloxacina, ofloxacina, sulfadiazina, sulfadimetoxina, cefalexina, cloranfenicol
Anticonvulsivante	Carbamazepina
Antidiabético	Metformina, glibenclamida
Anti-hipertensivo	Enalapril, triantereno, nifedipina, diltiazem, desmetil diltiazem, norverapamil, valsartan, verapamil
Antiinflamatório	Cetoprofeno, diclofenaco, indometacina, ibuprofeno, ketoprofeno, ácido mefenâmico, naproxeno, fenazona
Antilipêmico	Ácido clofibrato, ácido fenofibrato, bezafibrato
Antimicótico	Miconazol
Antimicrobiano	Triclosan
Antiulceroso	Cimetidina, Ranitidina
Contraceptivo	Etinilestradiol, desogestrel, mestranol
Diurético	Furosemida
Drogas de uso psiquiátrico	Diazepam, fluoxetina, carbamazepina, paroxetina, anfetamina, alprazolam, amitriptilina, 10-hidroxi-amitriptilina, meprobamato, sertralina, bupropiona, topiramato, aripiprazol, duloxetina
Meio de contraste de Raios X	Diatrizoato, Iopamidol, Iopromida, Iomeprol
Reguladores lipídicos e seus Metabólitos	benzafibrato, ácido clofibrato, ácido fenofibrato, Furosemida, genfibrozila, hidroclorotiazida, mevastatina, pravastatina, sinvastatina, pravastatina sódica
β – bloqueador (cardiovasculares)	Atenolol, Betaxolol, Bisoprolol, Propanolol, metoprolol, nadolol, sotalol, verapamil, timolol

Continuação do Quadro 1.

Produtos de higiene pessoal	
Antisséptico e antibactericida	Triclosano, clorofeno, triclocarban
Fragrância	Almíscares nitrados, policíclicos e macrocíclicos
Protetor solar	Benzofenonas, parabenos, cânfora, metilbenzilideno
Repelente de inseto	N, N-dietiltoluamida
Interferentes endócrinos	
Dioxinas e Furanos	2,3,7,8-tetracloro- <i>p</i> -dioxina, 2,3,7,8-TCDD
Aditivos de gasoline	Metil- <i>t</i> -butil éter (MTBE)
Aditivos industriais	Ácido etilendiaminotetra-acético (EDTA), ácido nitriloacético (NTA)
Agrotóxicos	Atrazina, simazina, diclorvos, endossulfan, trifluralina, demeton-s-metil, dimetoato, linuron, permetrina, lindano, clordano, dieldrin, hexaclorobenzeno, pentaclorofenol, rifuralin, glifosato, pentaclorofenol, dibromocloropropano, lindano, dieldrin, bifenilas policloradas (PCBs)
Alquilfenóis	Nonilfenol, nonilfenol etoxilado, octilfenol, octilfenol etoxilado.
Bifenilas policloradas (PCB)	3,3',4,4'- tetraclorobifenil (PCB 77), 3,4,4',5-tetraclorobifenil (PCB 81)
Esteróide e hormônio	17 α - Etinilestradiol, 17 β -estradiol, estrona, estriol, progesterona, testosterona, mestranol, dietilestilbestrol, androstenediona, androsterona.
Ftalatos	Dietilftalato, dibutilftalato.
Hidrocarbonetos poliaromáticos (PAH)	Benzo[a]pireno, fluoranteno, antraceno, naftaleno.
Inibidores de corrosão	Benzotriazóis, benzotiazóis.
Retardantes de chama e detergentes	Difenil éteres polibromados (PBDE), tetrabromo bisfenol A, etoxilados de alquilfenol, alquilfenóis (nonifenol e octilfenol), carboxilados de alquilfenol e compostos perfluorados.
Fungicida	Vinclozolin.
Herbicida	Atrazine, simazine, terbutylazine, 2,4-D, 2,4,5-T.
Drogas de abuso	Anfetamina, cocaína, tetra-hidrocanabinol, 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), diacetilmorfina (heroína), benzoylecgonine (metabólito da cocaína).
Anti-incrustante	Tributilestanho.

FONTE: BILA E DEZOTTI, 2003; GHISELLI e JARDIM, 2007; DA SILVA e COLLINS, 2011; DIMPE e NOMNGONGO, 2016; VALCÁRCEL *et al.*, 2011, ESTRADA-ARRIAGA *et al.*, 2016.

Existe uma preocupação relacionada ao nível toxicológico em relação a estas substâncias, pois muitos deles ainda não possuem valores de referência e limites máximos permitidos no ambiente que não ofereçam risco à saúde humana e

a vida aquática. A OMS (2012) e a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA, 2012) estabeleceram recentemente aproximadamente 125 valores de referência legais para contaminantes em água potável, incluindo espécies inorgânicas e radionuclídeos, desinfetantes e seus sub-produtos, espécies orgânicas, herbicidas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (SCHRIKS *et al.*, 2010).

Segundo Bendz e colaboradores (2005) geralmente a contaminação de efluentes por fármacos como produtos de excreção é atribuída as pessoas que passam por tratamento médico. No entanto as via de introdução do PhACs são diversas, provenientes de produtos empregados na agricultura, resíduos de tratamento veterinário, contaminação de aterros sanitários, resíduos industriais e efluente de águas residuais de estações de tratamento de esgoto, atingindo assim diversos compartimentos ambientais (BENDZ *et al.*, 2005; HEREBER, 2002). Na Figura 2 é mostrado as possíveis fontes e vias para a ocorrência de resíduos PhACs no ambiente (BILA e DEZOTTI, 2003).

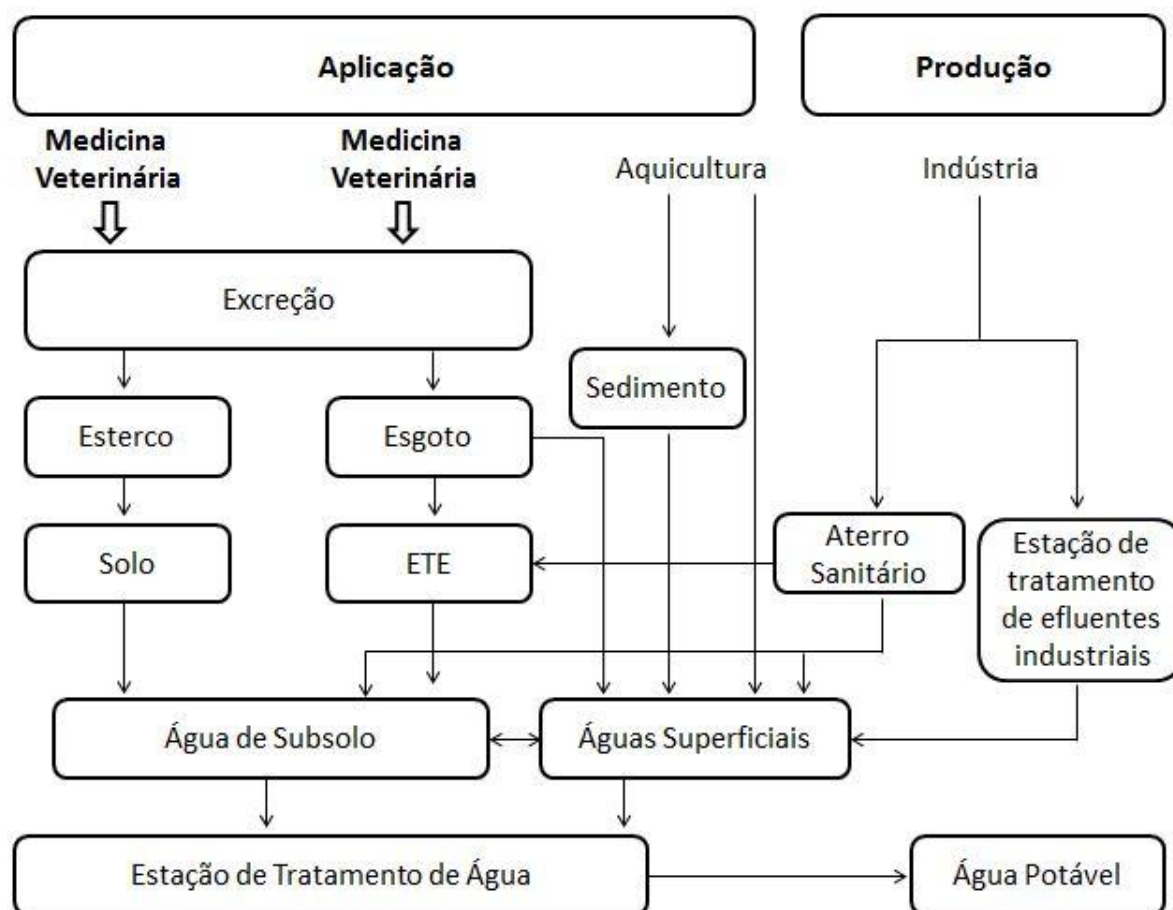


Figura 2. Possíveis fontes e vias para a ocorrência de resíduos farmacêuticos no ambiente aquático.

FONTE: BILA e DEZOTTI, 2003 (adaptado).

De acordo com Bila e Dezotti (2003) após a administração dos fármacos, geralmente ocorre a absorção pelo organismo e estão sujeitos a reações metabólicas. Porém, uma quantidade significativa dessas substâncias originais e seus metabólitos são excretados na urina, fezes ou esterco animal, sendo frequentemente encontrados no esgoto doméstico. Segundo Mulroy (2001) para que os fármacos consigam exercer o seu propósito terapêutico devem manter suas propriedades químicas, dessa forma são desenvolvidos para que sejam persistentes. Assim, cerca de 50% a 90% de uma dosagem do fármaco são excretados inalterados e acabam permanecendo no meio ambiente.

Sodré e colaboradores (2010) afirmam que no Brasil, o lançamento de efluentes domésticos nos rios é uma das principais fontes poluidoras dos ecossistemas aquáticos. Em estudo realizado no rio Atibaia em Campinas-SP foram encontrados seis contaminantes emergentes com níveis superiores a média em outras regiões do mundo. O estigmasterol apresentou a maior concentração média ($0,34 \pm 0,13 \mu\text{g L}^{-1}$), seguido de colesterol ($0,27 \pm 0,07 \mu\text{g L}^{-1}$), a cafeína ($0,22 \pm 0,06 \mu\text{g L}^{-1}$), e bisfenol A ($0,16 \pm 0,03 \mu\text{g L}^{-1}$).

Diferentes estudos avaliaram as taxas de remoção de fármacos de efluentes quando empregados os processos convencionais das estações de tratamento de esgotos (ETE's). De acordo Hernando e colaboradores (2006), muitos fármacos de relevância são apenas parcialmente removidos (remoção menor que 10%) podendo, ainda, ser levemente modificados, sendo liberados na forma hidrolisada ou conjugada.

De acordo com dados do IBGE (2005), no Brasil, a contaminação de águas superficiais, muito utilizadas para o abastecimento público no Brasil, pode estar relacionada ao lançamento de esgotos domésticos, a drenagem de áreas agrícolas e ao despejo de efluentes industriais. Sendo que, o lançamento de esgotos domésticos constitui o principal problema de poluição nos mananciais do país. A criação de animais, o uso de agrotóxicos e fertilizantes e a disposição inadequada de resíduos sólidos no ambiente também são fontes de contaminação das águas (Figura 3).

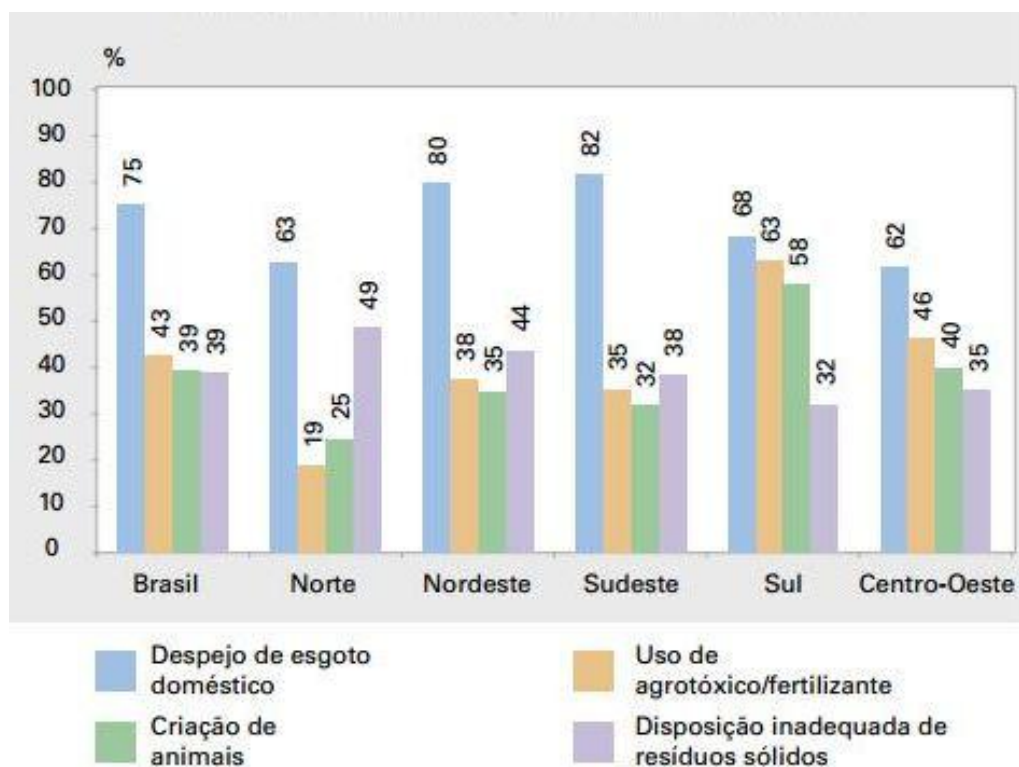


Figura 3. Principais fontes de poluição de águas superficiais nas regiões do Brasil.

FONTE: IBGE, 2005.

Se considerarmos que, no Brasil, grande parte desse esgoto é desaguado nos rios sem receber nenhuma forma de tratamento esse problema é agravado. Estudos recentes sobre saneamento básico têm mostrado deficiência no fornecimento desse serviço no país. Segundo dados do IBGE (2010) 52,2% dos municípios brasileiros possuem sistema de coleta de esgoto, e somente 20,2% desses municípios têm o esgoto tratado, ou seja, 79,8% das cidades não efetuam qualquer tipo de tratamento.

Bila e Dezotti (2003) afirmam que o monitoramento de fármacos tem despertado um grande interesse dos pesquisadores, pois são encontrados em efluentes de Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) e águas naturais, em concentrações variáveis que compreendem de $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} . Inúmeros trabalhos apontam a presença de fármacos no ambiente, por exemplo, desreguladores endócrinos (GHISELLI E JARDIM, 2007), cafeína (CANELA, *et. al.*, 2014), antibióticos e antiinflamatórios (DA CRUZ, 2010), estrogênios (DE LIZ, 2013).

2.2. TOXICIDADE E RESISTÊNCIA DE FÁRMACOS

Bruce e colaboradores (2010) realizaram levantamento do número de fármacos que possuem toxicidade e estão presentes em águas residuais, água potável, água superficial e lençol freático. Os fármacos utilizados no estudo, descritos no Quadro 2, foram selecionados entre os 200 medicamentos mais prescritos em 2003 e os 300 medicamentos mais prescritos em 2004, segundo a RxList – The Internet Drug Index. O critério para a escolha está na probabilidade de presença no ambiente, potencial toxicidade e altas taxas de consumo pela população. Estes medicamentos podem vir a ocasionar efeitos adversos em baixos e altos níveis de exposição, os riscos foram avaliados em: (1) Risco para gravidez categorizados em "B", "C", "D", ou "X" (indicando um potencial de risco para o feto) classificado segundo a Food and Drug Administration (FDA); (2) Evidência de carcinogenicidade em animais ou seres humanos e (3) Evidência de toxicidade na reprodução ou desenvolvimento de animais ou humanos em doses terapêuticas.

Quadro 2. Fármacos selecionados para a avaliação de riscos.

Medicamento	Nome comercial	Classe	Classificação (RxList)	Toxicidade e risco na gravidez (FDA)
Atenolol	Tenormin	Beta-bloqueador	4	Reprodução, desenvolvimento, evidência de carcinogenicidade em roedores, D
Atorvastatina	Lipitor	Antipidêmico	2	Reprodução, desenvolvimento, evidência de carcinogenicidade em roedores, X
Carbamazepina	Tegretol	Anticonvulsivantes	252	Reprodução, desenvolvimento, evidência de carcinogenicidade em roedores, D
Diazepam	Valium	Benzodiazepínicos	117	Reprodução, desenvolvimento, C
Diclofenaco	Cataflam	Antiinflamatório não esteroide	181	Desenvolvimento; C
Enalapril	Vasotec	Anti hipertensivos	122	Reprodução, Desenvolvimento, C e D
Fluoxetina	Prozac	Antidepressivo	34	Desenvolvimento; C
Gemfibrozil	Lopid	Regulador lipídico	126	Desenvolvimento, evidência de carcinogenicidade em roedores, C

Continuação do Quadro 2.

Meprobamato	Equanil	Ansiolítico	Não definido	Reprodução, desenvolvimento, D
Naproxeno	Aleve	Antiinflamatório não esteroideal	73	Desenvolvimento, B
Fenitoína	Dilatim	Anti convulsivante	147	Desenvolvimento, evidência de carcinogenicidade em roedores, D
Risperidona	Risperdal	Antipsicótico	79	Reprodução, desenvolvimento, evidência de carcinogenicidade em roedores, C
Sinvastatina	Zocor	Antipidêmico	15	Reprodução, desenvolvimento, evidência de carcinogenicidade em roedores; X
Sulfametoxazol	Bactrim	Antibiótico	148	Desenvolvimento; C
Trimetropima	Bactrim	Antibiótico	148	Desenvolvimento; C

Legenda: Classificação FDA para risco na gravidez: B (a) estudos com animais não mostram risco para o feto, mas não existem estudos adequados em mulheres grávidas, ou (b) Estudos em animais mostraram risco para o feto, mas estudos em humanos não mostram nenhum risco; C (a) Estudos em animais mostraram efeito adverso no feto, não há estudos em humanos; ou (b) Não há estudos com animais e estudos com humanos são inadequados para julgar risco; D – Estudo com humanos fornecem alguma evidência de risco para o feto; X – Resultado do estudo em animais e seres humanos mostraram anomalias fetais.

FONTE: BRUCE *et al*, 2010 (adaptado).

Dois dos fármacos estudados no presente trabalho estão inseridos no Quadro 2, são considerados potencialmente prejudiciais a saúde de animais e humanos. A fluoxetina apresentou resultado positivo para efeitos adversos nos fetos de animais, no entanto ainda não existem estudos em humanos, já a sinvastatina apresentou resultados na reprodução, desenvolvimento, evidência de carcinogenicidade em roedores e confirmou anomalias fetais em animais e seres humanos.

Em seu estudo Bruce e colaboradores (2010) coletaram as amostras de água destinada ao consumo em 19 estações de tratamento e encontraram os compostos: atorvastatina, fluoxetina e sinvastatina. Relataram que mesmo a um baixo nível de exposição (0,29 mg/kg-d) a fluoxetina pode ocasionar diversos efeitos durante a gravidez (gestação de curta duração, bebê com baixo peso ao nascer e difícil adaptação). Para a atorvastatina e sinvastatina foram encontradas evidências de carcinogenicidade em uma dose máxima tolerada de 100 mg/kg-d.

O terceiro fármaco estudado neste trabalho é o antibiótico amoxicilina, para os antibióticos, além da toxicidade outro fator relevante refere-se a indução de bactérias resistentes, de acordo com Pruden (2014) esse é considerado como o efeito adverso mais significativo de antibióticos. Em relatório publicado sobre a Resistência Antimicrobiana (RAM) a OMS afirma que por décadas a RAM representa uma ameaça crescente ao tratamento eficaz de uma gama cada vez maior de infecções causadas por bactérias, parasitas, vírus e fungos. A resistência resulta na redução da eficácia de fármacos antibacterianos, antiparasitários, antivirais e antifúngicos, tornando o tratamento dos pacientes difícil, oneroso ou mesmo impossível. Muitas vezes levando a morte de pacientes com a saúde mais debilitada, aumentando os gastos com tratamento e internamentos. A OMS destaca a sobre a necessidade de monitoramento global da RAM e adoção de medidas para aumentar a conscientização sobre a iminente crise de saúde pública que causará. Por meio de resoluções ao longo dos anos, tem reforçado a necessidade de vigilância da resistência e a capacidade laboratorial para a sua realização, bem como a redução uso de antimicrobianas (WHO, 2014).

Segundo Barbosa e Levy (2000) o uso intenso e indiscriminado de antibióticos contribui para a elevação do número de bactérias patogênicas resistentes de todo o mundo. Fatores como quantidade e a maneira de utilização dos antibióticos têm contribuído de estirpes resistentes. Quando as bactérias resistentes surgem e evoluem na presença de antibióticos, estas aparecem adquirir "vida própria", elas proliferam e mantêm traços de resistência mesmo na ausência de antibióticos, comprometendo assim, a reversão da resistência bacteriana mesmo na redução do uso de antibióticos.

2.3. EFEITO DOS FÁRMACOS EM ESPÉCIES AQUÁTICAS

A poluição dos ecossistemas aquáticos é um problema atual e global que tem direcionado à necessidade constante de análise e monitoramento da qualidade ecológica da água (BACIAK *et al.*, 2016). A poluição da água afeta o ecossistema em sua totalidade e pode ser causada por diversos produtos oriundos das atividades antropogênicas, tais como: metais, agrotóxicos, esgotos domésticos, produtos químicos e farmacêuticos (ZHANG *et al.*, 2016b).

O efeito específico ou modo de ação de muitos fármacos ainda não é muito bem conhecido, diferentes efeitos foram observados nos organismos expostos a diferentes tipos de fármacos. Entre poluentes emergentes, compostos PhACs têm atraído o interesse mundial devido a sua pseudo-persistência, a sua descarga contínua para o meio ambiente e seu potencial efeitos ecotoxicológicos (CAMACHO-MUÑOZ *et al.*, 2012; RODIL *et al.*, 2012).

Os produtos farmacêuticos ou fármacos estão sendo detectados nos sistemas aquáticos do mundo todo e estes compostos, apesar de biologicamente ativos em humanos, tem revelado exercer efeitos em organismos não-alvo (ROSI-MARSHALL; ROYER, 2012). Os fármacos geralmente são detectados em baixas concentrações, no entanto, a exposição crônica pode afetar organismos sensíveis mesmo em baixas doses, sendo que muito pouco é conhecido sobre os efeitos de poluentes farmacêuticos em organismos aquáticos (ZHANG *et al.*, 2014a).

No presente estudo foram selecionados três compostos considerados contaminante emergentes comumente utilizados pela população estes pertencem a diferentes classes: amoxicilina (antibióticos), fluoxetina (antidepressivo) e sinvastatina (lipoproteínas) (DA SILVA e COLLINS, 2011; DE LA CRUZ, 2012), empregados, respectivamente, nos processos anti-inflamatórios, tratamento da depressão e controle de níveis de colesterol. Os benefícios para a saúde e qualidade de vida das pessoas são inegáveis, no entanto quando presentes em efluentes acarretam diversos efeitos em organismos aquáticos.

O estudo realizado por Ribeiro e colaboradores (2015) avaliou efeitos da toxicidade de diclofenaco, propranolol, sertralina e sinvastatina em ambientes aquáticos contendo embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*) e ouriço do mar (*Paracentrotus lividus*). Dentre os compostos avaliados, a sinvastatina foi considerada a mais tóxica, em uma concentração de 5 mg L⁻¹ verificou-se que a substância é letal para embriões de peixe-zebra e, que embriões de ouriço do mar apresentaram atraso no desenvolvimento e retardo em seu crescimento.

Neuparth e colaboradores (2014) observaram um impacto significativo no crescimento, reprodução e maturação gonadal dos crustáceos Amphipoda (*Gammarus locusta*) quando expostas a sinvastatina na concentração 320 ng L⁻¹. O autor afirma que, os resultados apresentados comprovam a existência de importantes implicações para avaliação dos riscos ambientais e expõe a necessidade de divulgar os efeitos da sinvastatina em ecossistemas aquáticos.

Em outro estudo realizado por Ellesat e colaboradores (2010) foram avaliados efeitos citotóxicos da sinvastatina e atorvastatina em peixes truta arco-íris (*O. mykiss*), nas concentrações 1 a 200 mg L⁻¹ de sinvastatina, foram relatados efeitos tóxicos relacionados com a redução da atividade metabólica e da estabilidade da membrana. Em outro estudo, os adultos de crustáceo (*Nitocra spinipes*) foram expostos à sinvastatina em concentrações de 0,16 a 1,6 mg L⁻¹ durante 96 h, resultando em uma diminuição da taxa de desenvolvimento da espécie.

Silva e colaboradores (2016) avaliaram a acumulação e metabolização da fluoxetina em mexilhões (*Mytilus galloprovincialis*), os animais foram expostos a uma concentração de fluoxetina 75 ng L⁻¹ por 15 dias. Após esse período a fluoxetina e norfluoxetina (principal metabólito da fluoxetina) foram detectadas acumulação em 100% das amostras, com média de concentração de 9,31 e 11,65 ng g⁻¹, respectivamente para a fluoxetina e norfluoxetina.

Peters e Granek (2016) realizaram ensaios com o mexilhão (*Mytilus californianus*) expostos a fluoxetina, com concentração entre 0 e 300 ng L⁻¹, por 107 dias. Constataram que a fluoxetina representa riscos para a vida marinha gerando efeitos crônicos na população e no ecossistema, relacionados ao crescimento e reprodução da espécie. Ansai e colaboradores (2016) estudaram os efeitos comportamentais do peixe Medaka (*Oryzias latipes*), na presença de fluoxetina, foram observadas mudanças comportamentais e interação social entre os indivíduos.

Em função de seu elevado consumo em todo o mundo e por se tratar de um antibiótico, existem na literatura diversos estudos sobre os efeitos da amoxicilina (AMX) em espécies aquáticas. Matozzo e colaboradores (2016) realizaram uma investigação sobre o efeito da amoxicilina no molusco (*Ruditapes philippinarum*) e no mexilhão (*Mytilus galloprovincialis*), com o estudo concluiu-se que AMX afetada os parâmetros dos hemócitos das espécies. Pan e colaboradores (2008) estudaram os seus efeitos tóxicos sobre a fotossíntese da cianobactéria (*Synechocystis sp.*) e, constataram que, quando expostas ao fármaco houve diminuição no desempenho da fotossíntese nessas espécies.

Diferentes estudos avaliaram as taxas de remoção de fármacos de efluentes quando empregados os processos convencionais das estações de tratamento de esgotos (ETE's). De acordo Hernando *et al.* (2006), muitos fármacos de relevância

são parcialmente removidos (remoção menor que 10%) podendo, ainda, ser levemente modificados, sendo liberados na forma hidrolisada ou conjugada.

Se considerarmos que, no Brasil, grande parte desse esgoto é desaguada nos rios sem receber nenhuma forma de tratamento esse problema é agravado. Estudos recentes sobre saneamento básico têm mostrado deficiência no fornecimento desse serviço no país (IBGE, 2010).

2.4. ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS

A ecotoxicologia é o ramo da toxicologia que estuda dos efeitos tóxicos, causados por substâncias naturais ou sintéticas aos organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticas, considerando também a interação dessas substâncias com o meio onde os organismos vivem (Truhaut, 1977). A expressão ecotoxicologia foi sugerida pela primeira vez pelo toxicologista francês Rene Truhaut, uma reunião do *Committee of the International Council of Scientific Unions*, ocorrida em 1969 em Estocolmo/Suécia.

A primeira iniciativa de normatizar os testes foi realizada em 1975, quando o Comitê Técnico de Qualidade das Águas da *International Organization for Standardization* (ISO) promoveu a primeira iniciativa em termos metodológicos empregando ensaio com peixes, nessa ocasião estava presente a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) a convite da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT (ZAGATTO e BERTOLETTI 2006).

Desde então, agências brasileiras, tais como a ABNT e a CETESB vêm desenvolvendo e adaptando normas e métodos de testes ecotoxicológicos, para ensaios de toxicidade aguda e crônica, utilizando alguns grupos e espécies de organismos, conforme descrito no Quadro 3.

Quadro 3. Normas brasileiras sobre ensaios ecotoxicológicos.

Agência	Norma	Descrição
ABNT	NBR 15469:2007	Ecotoxicologia aquática - Preservação e preparo de amostras
ABNT	NBR 12713:2009	Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda – Método de ensaio com <i>Daphnia spp</i> (Crustacea, Cladocera)
ABNT	NBR 13373:2010	Ecotoxicologia aquática - Toxicidade Crônica – Método de ensaio com <i>Ceriodaphnia spp.</i> Crustacea, Cladocera)
ABNT	NBR 15088:2011	Ecotoxicologia aquática – Toxicidade Aguda – Método de ensaio com peixes
ABNT	NBR 15499:2007	Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Crônica de Curta Duração – Método de ensaio com peixes
ABNT	NBR 12648:2011	Ecotoxicologia Aquática – Método de ensaio com algas (Chlorophyceae)
ABNT	NBR 15470:2007	Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade em sedimento – Método de ensaio com <i>Hyalella spp</i> (Amphipoda)
ABNT	NBR 15308:2011	Ecotoxicologia Aquática – Método de ensaio com misídeos (Crustácea)
CETESB	L5.227:2001	Teste de toxicidade com a bactéria luminescente <i>Vibrio fischeri</i> – Método de ensaio
CETESB	L5.228:2001	Teste de toxicidade aguda utilizando <i>Spirillum volutans</i> – Método de ensaio

Os testes de toxicidade são frequentemente empregados para avaliar o potencial de toxicidade de certas substâncias na presença de organismos testes. No Brasil os testes são regulamentados pelas portarias do CONAMA nº 357/05 e 430/2011.

A resolução nº 357/05, artigo 2º, parágrafo XVII estabelece sobre o efeito tóxico agudo como “efeito deletério aos organismos vivos, causado por agentes físicos ou químicos, usualmente letalidade ou alguma outra manifestação que a antecede, em um curto período de exposição”. O parágrafo XVIII define sobre o efeito tóxico crônico como “efeito deletério aos organismos vivos, causado por agentes físicos ou químicos, que afetam uma ou várias funções biológicas dos organismos, tais como a reprodução, o crescimento e o comportamento, em um período de exposição que pode abranger a totalidade de seu ciclo de vida ou parte dele” (CONAMA, 2005).

Sobre a definição de ensaios ecotoxicológicos e toxicológicos os parágrafos XXI e XXII descrevem como “ensaios realizados para determinar o efeito deletério de agentes físicos ou químicos a diversos organismos aquáticos”. E também “(...) visando avaliar o potencial de risco à saúde humana” (CONAMA, 2005).

Em 2011, esta resolução foi complementada e alterada pela CONAMA nº 430, artigo 4º, parágrafo XIII, que complementou os testes de toxicidade como *“métodos utilizados para detectar e avaliar a capacidade de um agente tóxico provocar efeito nocivo, utilizando bioindicadores dos grandes grupos de uma cadeia ecológica”* (CONAMA, 2011).

No artigo 4º, parágrafos II e IV, complementam a resolução 357/05 ao determinar parâmetros para os testes ecotoxicológicos. Assim, é definida a concentração de Efeito Não Observado (CENO) como *“maior concentração do efluente que não causa efeito deletério estatisticamente significativo na sobrevivência e reprodução dos organismos, em um determinado tempo de exposição, nas condições de ensaio”* e também a concentração Letal Mediana (CL₅₀) ou concentração Efetiva Mediana (CE₅₀) como *“a concentração do efluente que causa efeito agudo (letalidade ou imobilidade) a 50 % dos organismos”*. No artigo 18, esta resolução determina que *“o efluente não poderá causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de ecotoxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente”* (CONAMA, 2011).

Para comparar os resultados de avaliação da toxicidade entre diferentes espécies Bulich (1982); Coleman e Quereschi (1985) estabelecerem um sistema de classificação que leva em consideração a porcentagem de sobrevivência das espécies quando submetidas a determinada substância ou efluente, conforme descrito na Tabela 1. No teste de concentração efetiva ou letal (CE₅₀ ou CL₅₀) a concentração das substâncias em água, solo ou de sedimento estima afetar 50% dos organismos de ensaio. O CL₅₀ e seus limites de confiança (95%) são geralmente obtidos a partir da análise estatística (Ronco *et al.*, 2004).

Tabela 1. Sistema de classificação da toxicidade aguda.

GRAU DE TOXICIDADE	
CL₅₀ (% v/v)	Classificação
< 25	Muita tóxica
25 – 50	Moderadamente tóxica
51 – 75	Tóxica
> 75	Levemente tóxica

FONTE: BULICH, 1982; COLEMAN e QUERESCHI, 1985.

Ronco e colaboradores (2004) afirmam que os ensaios biológicos são ferramentas de diagnósticos apropriados para determinar o efeito de agentes físicos e químicos em organismos de teste sob condições experimentais específicas e controladas. A toxicidade é a capacidade de uma substância exercer efeito adverso sobre um organismo, tais como, alteração no crescimento, desenvolvimento, reprodução, podendo o levar a morte. São resultantes da interação entre a substância e o sistema biológico, depende tanto das propriedades químicas e concentração do composto, sua relação com o ciclo de vida do organismo, frequência e períodos de exposição, podendo ser aguda (a concentração letal do agente tóxico é liberada em um único evento e rapidamente absorvida) ou crônica (quando o agente tóxico é liberado em eventos periodicamente repetidos, em concentrações letais, durante um longo período de tempo).

Magalhães e Ferrão (2008) destacam que unicamente os resultados de análises químicas não representam o impacto ambiental causado pelos poluentes no ecossistema, estes são determinados apenas pelos organismos, que quando expostos, podem verificar se determinada substância apresenta ou não efeitos tóxicos, bem como definir o seu grau de toxicidade e consequências para os organismos. Os testes de toxicidade ambiental são cada vez mais amplos, pois sua demanda aumenta conforme a complexidade das transformações químicas no meio.

Ao se realizar os ensaios recomenda-se utilizar mais de uma espécie aquática, de preferência que estejam em diferentes níveis tróficos, onde se enquadram organismos produtores, consumidores primários e consumidores secundários (VALENTIM; DEZOTTI, 2008), conforme representado na Figura 4, tal sugestão é devido a diferença de sensibilidade de cada espécie aquática quando expostas a substâncias químicas ou efluentes (RIBO, 1997; GHERARDI-GOLDSTEIN, 1990).

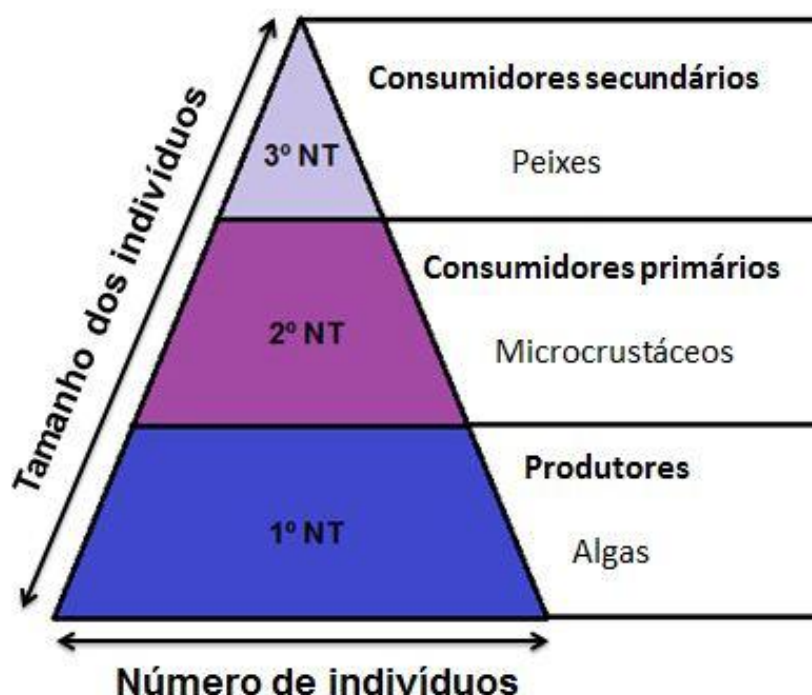


Figura 4. Exemplo de cadeia alimentar do ecossistema aquático constituído por representantes de três níveis tróficos (NT).

FONTE: COSTA *et al.*, 2008 (adaptado).

Os ensaios ecotoxicológicos envolvem normas e procedimentos padronizados que devem ser seguidos para que as respostas sejam consideradas válidas. Como descrito por Ronco e colaboradores (2004), os testes são compostos pelas etapas de diluição, controle negativo e controle positivo. As diluições são realizadas para conhecer em que concentração determinada substância apresenta efeitos ou não sobre a população, permitindo estabelecer limites de tolerância, verificar quais as alterações sofridas pelos organismos e também comparar as substâncias avaliadas conforme sua toxicidade.

Para realizar o controle negativo o organismo é submetido a todas as etapas do teste, mas sem a adição do contaminante, assim é possível verificar os efeitos oriundos da presença do contaminante. No teste com o controle positivo, utiliza-se um agente tóxico de efeito conhecido (uma substância química de referência) para acompanhar a sensibilidade dos organismos no momento em que o material de teste é avaliado (Ronco *et al.*, 2004).

2. 5. PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS (POA's)

A poluição da água tem se tornado um problema ambiental realmente relevante em todo o mundo. Assim, houve a necessidade de desenvolvimento de novos sistemas descontaminação de água mais eficientes e versáteis (SIRTORI *et al.*, 2010).

Dos novos métodos desenvolvidos merece destaque processos oxidativos avançados (POA's) que tem como objetivo remediar águas contaminadas por poluentes persistentes, presentes em baixa concentração. O método se fundamenta na geração de um forte agente oxidante radical hidroxila ($\text{HO}\bullet$). As vantagens mais significativas deste tipo de procedimentos estão representadas pela grande eficiência na degradação de compostos orgânicos tóxicos e persistentes (PERA-TITUS, 2004).

Os POA's são caracterizados por diferentes sistemas reacionais em que o radical hidroxila ($\text{HO}\bullet$) participa como principal agente oxidante. Trata-se de uma espécie muito reativa e pouco seletiva, com elevado poder oxidativo ($E^0 = 2,8 \text{ eV}$ versus EPH), que deve ser produzido *in situ* e que permite a completa mineralização de inúmeras espécies químicas de relevância ambiental, convertendo-as em dióxido de carbono, água e sais inorgânicos, em tempos relativamente curtos (ANDREOZZI *et al.*, 1999). Na Tabela 2 são apresentados os principais agentes oxidantes.

Tabela 2. Potenciais de oxidação para diferentes espécies.

Agentes oxidantes	Potencial Padrão de Redução (eV, 25°C)
Flúor	3,03
Radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$)	2,80
Oxigênio atômico (O)	2,42
Ozônio (O_3)	2,07
Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	1,77
Radical peridroxil ($\bullet\text{O}_2\text{H}$)	1,70
Íon permanganato	1,68
Ácido hipobromoso (HBrO)	1,59
Dióxido de cloro (Cl_2O)	1,50
Ácido hipocloroso (HClO)	1,49
Cloro elementar (Cl_2)	1,36
Oxigênio molecular (O_2)	1,23
Iodo	0,54

FONTE: MATTOS *et al.*, 2003; LEGRINI *et al.*, 1993.

As principais vantagens do uso dos POA's são: (a) a capacidade de mineralização do poluente e não somente a transferência de fase; b) a grande capacidade de oxidação de compostos recalcitrantes e não biodegradáveis; (c) a possibilidade de uso combinado com outros processos de tratamento (pré ou pós tratamento); (d) possuem forte poder oxidante, com cinética de reação elevada; (e) geralmente não necessitam de um pós tratamento ou disposição final; f) tem sido utilizado como oxidante suficiente, mineralizam o contaminante e não formam subprodutos; g) geralmente melhoram as propriedades organolépticas da água tratada (h) a possibilidade de remediação *in situ* (TEIXEIRA e JARDIM, 2004).

Os radicais hidroxilas ($\text{HO}\cdot$) podem ser produzidos através de reações utilizando oxidantes fortes, como ozônio (O_3) ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2), semicondutores, tais como, TiO_2 e ZnO e irradiação ultravioleta (UV). Os processos são classificados como homogêneos ou heterogêneos (MANSILLA *et al.*, 1997). Os principais tipos de POA são descritos no Quadro 4.

Quadro 4. Principais Processos de Oxidação Avançados.

	Sistemas Homogêneos	Sistemas Heterogêneos
Com Irradiação	UV- H_2O_2	Fotocatálise Heterogênea
	Foto-Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$)	Eletrofotográfico
	O_3/UV	
Sem Irradiação	Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$)	Eletro-Fenton
	$\text{O}_3\text{-OH}^-$	Eletroquímico
	$\text{O}_3\text{-H}_2\text{O}_2$	

FONTE: MANSILLA *et al.*, 1997.

2.5.1. Sistemas homogêneos

Os processos que utilizam os catalisadores sólidos são chamados de heterogêneos, e os demais são classificados como homogêneos. Os sistemas homogêneos são constituídos por fotólise direta com radiação ultravioleta e pela geração de radicais hidroxilas (TEIXEIRA E JARDIM, 2004).

Na fotólise direta (radiação ultravioleta) uma fonte a luz é empregada como único método para destruir o poluente. A radiação ultravioleta tem potencial para destruir o poluente, considerada como uma forma de tratamento limpa, contudo apresenta resultados limitados devido a sua baixa eficiência de mineralização

(ZHANG *et al.*, 2016b). Dessa forma, são frequentemente utilizadas as combinações $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$, O_3/UV e $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3/\text{UV}$.

A geração de radicais hidroxilas, com alto poder oxidante, é o responsável pela oxidação dos compostos orgânicos. A sua geração pode ocorrer devido a presença de oxidantes fortes, tais como H_2O_2 e O_3/UV , combinados ou não com irradiação (TEIXEIRA E JARDIM, 2004).

2.5.2. Fotocatálise Heterogênea

Os sistemas heterogêneos são diferentes dos homogêneos, pois utilizam como fonte geradora de radicais hidroxilas os catalisadores semicondutores. Essas substâncias apresentam a capacidade de aumentar a velocidade da reação sem interferir em seu equilíbrio químico, denominadas de reações catalíticas (CIOLA, 1981).

Os fotocatalisadores utilizados são óxidos semicondutores, tais como: TiO_2 , ZnO , Fe_2O_3 , SiO_2 e Al_2O_3 (TANAKA e HISANAGA, 1994); e, também outras espécies menos frequentes como: ZnS , CdS , V_2O_5 e WO_3 (MIHAYLOV *et al.*, 1993). Sendo que o óxido de titânio é amplamente utilizado na degradação de compostos orgânicos, pois apresenta diversas vantagens como o baixo custo, não tóxico, insolúvel em água, fotoestabilidade, estabilidade química (mesmo com variação do pH), pode ser imobilizado em outros sólidos e, ainda tem a possibilidade de ativação por luz solar (TEIXEIRA e JARDIM, 2004).

Os fotocatalisadores semicondutores, tais como TiO_2 , ZnO , apresentam duas regiões energéticas: a região de energia mais baixa é banda de valência (BV), onde os elétrons não possuem movimento e a região de energia mais alta é a banda de condução (BC), onde os elétrons podem se movimentar pela estrutura, produzindo assim condutividade elétrica. Entre essas bandas existe uma diferença de energia, chamada de *bandgap*, definida como a energia mínima para excitar o elétron, promovendo-o da banda de valência para a banda de condução (PARMON *et al.*, 2002). Uma representação esquemática do processo de fotocatalise heterogênea é apresentada na Figura 5.

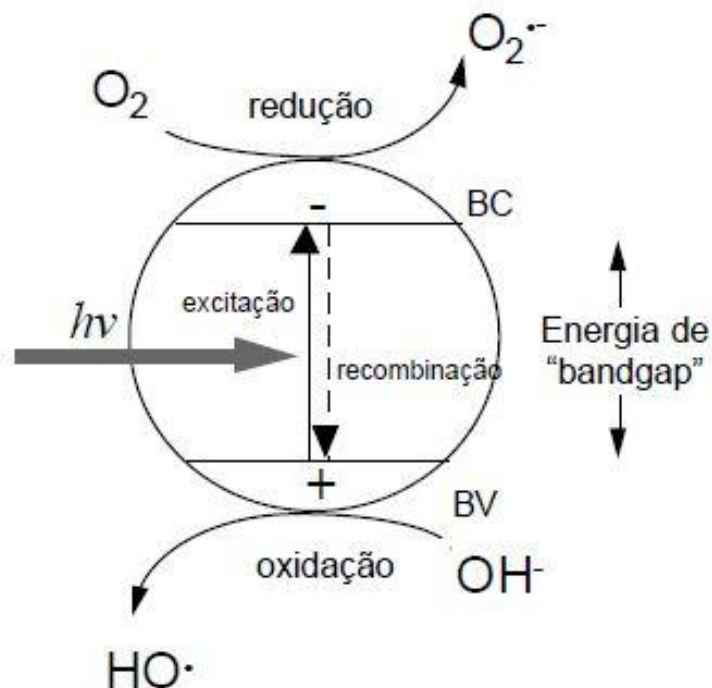


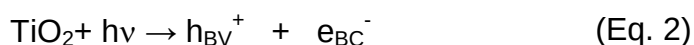
Figura 5. Esquema representativo do princípio da fotocatalise heterogênea (A: Espécie aceptora; D: Espécie doadora).

FONTE: KUNZ *et al.*, 2002.

Ao absorver energia solar ou artificial superior a região de *bandgap* ocorre a promoção de um elétron da banda de menor energia (BV) para a banda de maior energia (BC). Sendo que a sua ativação é dependente do fornecimento de radiação artificial, usualmente proporcionada por uma lâmpada a vapor de mercúrio de baixa pressão (KUNZ *et al.*, 2002).

A absorção de um fóton, com energia igual ou superior à energia do *bandgap* do semicondutor empregado provoca a promoção de um elétron da banda de valência (BV) para a banda de condução (BC), com a consequente geração de um par elétron/lacuna (e^-/h^+), conforme descrito na equação 2 (GRELA *et al.*, 2001):

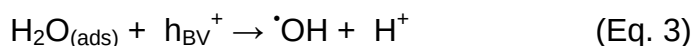
Fotoativação do semicondutor:



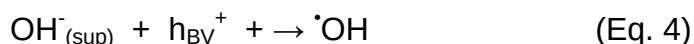
Como a lacuna da banda de valência possui forte caráter oxidante e o elétron da banda de condução é uma espécie redutora, ambos são os responsáveis por reações de óxido-redução ao reagirem com outras espécies químicas (GRELA *et al.*, 2001). Em sistemas aquosos a reação entre lacuna da banda de valência com a

água adsorvida e grupos hidroxila (OH^-) superficiais originam os radicais hidroxila ($\text{HO}\cdot$) na superfície do catalisador (Equações 3 e 4) (MATTHEWS, 1984; AL-EKABI, 1988):

Reação entre a lacuna da banda de valência e a água adsorvida:



Reação entre a lacuna da banda de valência e os grupos OH^- na superfície do semicondutor:



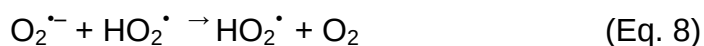
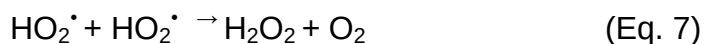
De acordo com Grela (2001) os radicais gerados são altamente reativos com a maioria das moléculas orgânicas e diversas espécies inorgânicas. As reações de degradação podem ocorrer por diversas vias, tais como, abstração de hidrogênio, adição às duplas ligações, ou anéis aromáticos. Ao promoverem a oxidação de substratos por meio da formação de radicais livres que reagem facilmente com o oxigênio dissolvido, formando espécies instáveis que fragmentam até atingir uma possível completa mineralização. Assim, os compostos orgânicos podem ser oxidados e gerar como produtos o dióxido de carbono, água e sais inorgânicos (ANDREOZZI *et al.*, 1999).

Segundo Okamoto e colaboradores (1985) o oxigênio possui um importante papel nas reações envolvendo os semicondutores, pois aprisiona o elétron da banda de condução como o íon radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), assim evitam a recombinação do par elétron-lacuna e podem desencadear uma série de reações, levando a formação e quebra do peróxido de hidrogênio, mostrado nas equações (5 a 11):

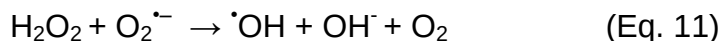
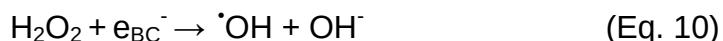
Formação do íon radical superóxido:



Formação de peróxido de hidrogênio:



Geração de radicais hidroxila pela quebra de peróxido de hidrogênio:



2.6. DIÓXIDO DE TITÂNIO

O titânio metálico não é encontrado livre na natureza, porém é o nono elemento químico em abundância na crosta terrestre e está presente na maioria das rochas ígneas e sedimentares. Apresenta brilho prateado, cerca de 45% mais leve que o ferro, apresenta especial resistência à pressão e corrosão, sendo 60% mais pesado que o alumínio, mas duas vezes mais resistente a deformação mecânica. O titânio pode ser obtido de diversos minerais, dentre seus compostos, o de maior uso (95%) é o dióxido de titânio, TiO_2 (Ministério de Minas e Energia – MME, 2010).

De acordo como o MME os minerais que contém óxido de titânio de interesse econômico são: ilmenita, leucoxênio, rutilo e mais recentemente o anatásio e perovskita, todos de origem ígnea.

A ilmenita (FeTiO_2) é o mineral de titânio de ocorrência mais comum e abundante, apresenta coloração preta, cristalização hexagonal, romboédrica. Possui cerca 53% de TiO_2 e 47% de Fe; mas pode conter pequenas quantidades de magnésio e manganês e, em muitos casos, até 6% em peso de Fe_2O_3 . É um mineral opaco, brilho submetálico, dureza entre 5,0 e 6, 0, possui massa específica entre 4,10 e 4,80 g/cm^3 (MME, 2010).

O leucoxênio é geralmente reconhecido como um rutilo ou anatásio possui granulometria muito fina, geralmente contém acima de 60% de TiO_2 . Ocorre com titanita, ilmenita, perovskita ou outros minerais de titânio. O rutilo (TiO_2) é a forma mais estável de dióxido de titânio e o principal minério de titânio, possui variações de coloração de vermelha, castanha avermelhado a preta, cristaliza-se no sistema tetragonal, tem brilho adamantino a submetálico, dureza 6,00 a 6, 50, massa específica 4,18 a 4,25 g/cm^3 . É um mineral subtranslúcido, podendo ser transparente, composto quase que essencialmente de TiO_2 (MME, 2010).

O anatásio (TiO_2), também conhecido como octaedrita, é um produto de alteração do rutilo e da broquita, cristaliza-se no sistema tetragonal, apresenta-se na coloração castanha no estado natural, contém de 98,4 a 99,8% de TiO_2 . A massa específica do anatásio é de 3,9 g/cm^3 , sua dureza varia de 5,5 a 6, 0, tem brilho

adamantino. A perovskita (CaTiO_3) é um mineral isométrico, encontrado usualmente nas rochas metamórficas de alto grau ou em rochas ígneas abissais. Apresenta-se nas cores preta, vermelha ou amarela, contendo de 38 a 58% de TiO_2 , com massa específica igual a $4,01 \text{ g/cm}^3$, cristaliza-se no sistema ortorrômbico ou monoclinico, mas pode ocorrer no sistema pseudoisométrico (MME, 2010).

O dióxido de titânio pertence à família dos óxidos metálicos de transição. A sua produção industrial teve início do século XX passando a substituir óxidos metálicos tóxicos de chumbo, utilizado como pigmentos brancos em tintas. O consumo de TiO_2 como pigmento aumentou nos últimos anos; diversos setores com têxtil, alimentício, farmacêutico e cosmético, têm incorporado este óxido na composição de seus produtos (CARP *et al.*, 2004).

Segundo dados do Ministério de Minas e Energia (MME, 2010), no Brasil, o maior consumo de titânio é destinado à fabricação de tintas, esmaltes vernizes (52%), siderurgia (36%), produção de ferro-ligas (11%) e outras aplicações (1% – indústria de pisos e revestimentos, ânodos para galvanoplastia, produção de papel e pasta de dente, plásticos).

No país, a produção mineral atual está em 130.000 toneladas por ano, mas ainda necessita importar aproximadamente 45 % do dióxido de titânio para atender a demanda de mercado. Na Bahia, está instalada a única planta integrada de TiO_2 da América do Sul, responsável pela produção de 60 mil toneladas por ano de TiO_2 . A produção comercial de minério de titânio no país é liderada pela Millennium Inorganic Chemicals do Brasil S/A (BA e PB), que detém 75,00% da produção nacional, seguida da empresa Titânio de Goiás S/A (GO), responsável por aproximadamente 20,00 % da produção e das Indústrias Nucleares do Brasil S/A (RJ) com 5,00%. A Millennium Inorganic Chemicals do Brasil S/A é principal produtora de concentrados de titânio e a única produtora de dióxido de titânio no país, está incorporada à National Titanium Dioxide Company Ltd. pertencente ao segundo maior conglomerado produtor mundial de TiO_2 e líder mundial na produção de produtos químicos a base de titânio (MME, 2010).

2.6.1. Estrutura e propriedades do dióxido de titânio

O TiO_2 apresenta-se em três formas alotrópicas: rutila (tetragonal), anatase (tetragonal) e broquita (ortorrômbica) (Figura 6). As três estruturas cristalinas diferem

pela distorção do octaedro (TiO_2^{6-}) e organização das cadeias octaédricas. Na forma anatase os octaedros estão ligados pelos seus vértices, em rutila, estão conectados pelas bordas, e em broquita, vértices e arestas são conectados (CARP *et al.*, 2004).

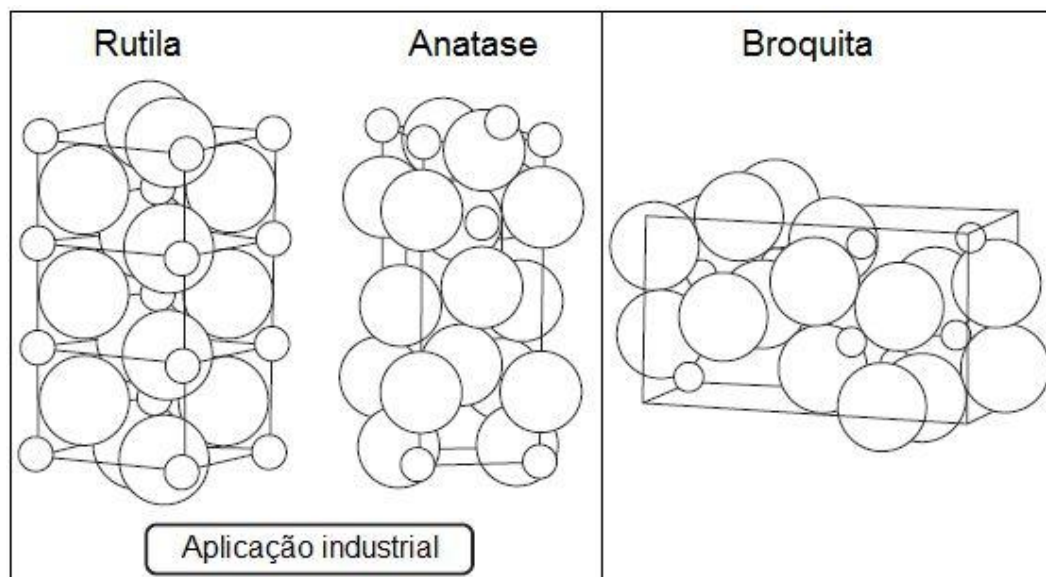


Figura 6. Estruturas cristalinas para as fases do dióxido de titânio.

FONTE: Three Bond Technical News, 2004.

O TiO_2 mais utilizado é fabricado pela Degussa, P25, constituído de 80% anatase e 20% rutila, pois apresenta alta fotoatividade, consequência de sua alta área superficial (cerca de $50 \text{ m}^2/\text{g}$) e, também a sua complexa microestrutura cristalina proveniente de seu método de preparação que promove melhor separação de cargas inibindo assim, a recombinação elétron/lacuna (Nogueira e Jardim, 1998).

A energia do *bandgap* da anatase corresponde a 3,23 eV (384 nm) e da rutila 3,02 eV (411 nm) (RAJESHWAR, 1995). A fase anatase apresenta maior atividade fotocatalítica (CARP *et al.*, 2004), enquanto a fase rutila, devido a baixa capacidade de adsorção de O_2 em sua superfície é considerada pouco eficiente na degradação de contaminantes (LEWIS, 1989).

Segundo descrito no Three Bond Technical News a forma rutila apresenta capacidade para absorver em uma ampla faixa do espectro, mas a anatase possui maior atividade catalítica. Tal fato pode ser atribuído a diferença de energia das duas estruturas. Em ambos os tipos a posição da banda de valência é baixa e a vacância positiva apresenta suficiente poder oxidativo. A banda de condução está posicionada próximo do potencial de redução-oxidação do hidrogênio indicando que,

tanto anatase quanto rutila são considerados relativamente fracos em termos de redução. Considerando que a banda de condução na anatase é mais próxima do negativo do que o tipo rutila e que, o poder de redução da anatase é muito mais forte do que da rutila. Devido à diferença da posição na banda de condução a anatase apresenta alta atividade fotocatalítica comparada a rutila.

A energia do *bandgap* da anatase corresponde a 3,2 eV (388 nm) e da rutila 3,0 eV (411 nm) (RAJESHWAR, 1995). Para o dióxido de titânio uma absorção de radiação igual ou menor de 388 nm já é capaz de promover reações, assim o material apresenta uma grande vantagem da sua utilização, pois não necessita da incidência de raios de alta energia considerados extremamente perigosos para os seres vivos. Assim, as reações podem ser conduzidas com a incidência de raios no ultravioleta próximo que podem ser obtidos tanto da luz solar, quanto de lâmpadas fluorescentes (Three Bond Technical News, 2004).

Zhang e Nosaka (2014) realizaram um estudo acerca das reações fotocatalíticas do TiO_2 nas fases anatase e rutilo. Em seu trabalho eles utilizaram a cumarina para detecção dos radicais $\bullet\text{OH}$ localizados próximos a superfície do TiO_2 e em solução. Quando a cumarina reage com o TiO_2 origina a espécie fluorescente 7-OH cumarina (umbeliferona), a partir da fluorescência emitida é possível determinar a quantidade $\bullet\text{OH}$. Os autores concluíram que o tipo rutila produz uma quantidade muito menor de radicais OH quando comparado com anatase. Em outro estudo Zhang e colaboradores (2014a) também atribuem a maior eficiência da fase anatase em aplicações de fotocatalise. Os resultados indicam que na fase anatase os elétrons e lacunas geradas possuem menor massa o que torna mais rápida a transferência elétron-lacuna. Dessa forma, com menor massa e tamanho, que as fases rutila e broquita, conseguem migrar mais facilmente para a superfície do material para participar de reações fotocatalíticas.

Devido a sua comprovada eficiência a maioria dos estudos sobre o desempenho fotocatalítico são conduzidos com TiO_2 nas fases anatase (ZHANG *et al.*, 2014; KAPLAN *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2014) e rutila (ZHANG *et al.*, 2014; LUTTRELL *et al.*, 2014, ETACHERI, *et al.*, 2015). Sendo a broquita a menos estudada, no entanto um estudo recente de Tran e colaboradores (2016) afirmam que este também é um catalisador promissor para aplicações em processos fotocatalíticos, apresentando eficiência comparada a anatase.

De acordo com Carp e colaboradores (2004) o dióxido de titânio é amplamente empregado devido as suas características importantes no tratamento de efluentes contaminados, tais como:

- Proporciona destruição não seletiva de resíduos orgânicos e inorgânicos;
- A reação ocorre à temperatura e pressão ambiente, em poucas horas, sem a produção de produtos policíclicos;
- Oxidação de poluentes na faixa ppb;
- O uso de oxigênio como o único oxidante;
- O oxigênio necessário para a reação pode ser diretamente obtido a partir de atmosfera;
- Capacidade promover reações de oxidação e redução;
- A fotocatalise é eficaz para substratos inativos, tais como alcanos lineares ou os seus derivados simples, agentes tensoativos e corantes;
- Permite completa oxidação das substâncias em CO_2 e outras espécies inorgânicas.
- O catalisador é barato, inócuo e pode ser reutilizado.
- O catalisador pode ser imobilizado em espécies inertes.
- A energia necessária para a foto-excitação do catalisador pode ser obtido a partir da luz solar.

2.6.2. Aplicação do TiO_2 na fotocatalise heterogênea

A utilização do TiO_2 em reações de fotocatalise recebeu uma grande atenção principalmente devido à sua estabilidade química, não toxicidade e baixo custo. As pesquisas envolvendo POA's tiveram início por volta de 1994 (MASTEN e DAVIES, 1994) e desde então houve aumento significativo de trabalhos sobre o tema. Isso é refletido nas inúmeras publicações de aplicações do TiO_2 nos estudos de degradação de diversos fármacos em água.

Lin e colaboradores (2017) estudaram a degradação de fármacos mediado por TiO_2 imobilizado em óxido de grafeno e monitorado por CLAE, após 180 minutos de irradiação UV foi conseguido 54% de degradação de carbamazepina, 81% de ibuprofeno e 92% de sulfametoxazol.

Alalm e colaboradores (2016) avaliaram a atividade fotocatalítica de TiO_2 em pó e imobilizado em carvão ativado (CA) para a degradação dos produtos farmacêuticos sob irradiação solar e quantificados por CLAE. Em 90 minutos de

reação a amoxicilina e a ampicilina foram completamente degradadas, o diclofenaco obteve 85% e o paracetamol, 70% de degradação utilizando o TiO_2/CA . Utilizando o TiO_2 em suspensão, em 150 minutos de reação, foram obtidas taxas de degradações de 89% para a amoxicilina, 83% para a ampicilina, 68% para o diclofenaco e 57% de paracetamol. Em estudo de He e colaboradores a fotocatalise resultou em altas eficiências de remoção para PhACs pouco biodegradáveis em efluentes de esgoto: 100% de propranolol, 100% para o diclofenaco, e $76 \pm 3\%$ para a carbamazepina, sob irradiação solar, utilizando TiO_2 imobilizado em 200-500 μm de areia empregando o método sol-gel.

Em seu trabalho Simsek (2017) investigou o emprego do TiO_2 dopado com diferentes concentrações de boro: 1,0; 3,0; 5,0 e 8,0%. Após 4 h de irradiação de luz UVA para os catalisadores TiO_2 e 8B- TiO_2 , foram obtidas as degradações para o diclorofenol: 75,7% e 89,7%; bisfenol – A: 97,3% e 99,1%, ibuprofeno: 89,1% e 96% e para flurbiprofeno: 93% e 98%, determinados por CLAE. Os catalisadores TiO_2 e 1B- TiO_2 apresentaram desempenho semelhante para todos os poluentes, enquanto 5B- TiO_2 e 8B- TiO_2 mostraram maior eficiência. Os desempenhos fotocatalíticos foram encontrados na ordem de 8B - $\text{TiO}_2 > 5\text{B-TiO}_2 > 3\text{B-TiO}_2 > 1\text{B-TiO}_2 \approx \text{TiO}_2$.

Sampaio e colaboradores (2013) revestiram anéis de vidro com TiO_2 e empregaram na degradação de fenol usando irradiação de luz solar simulada. Constatou-se que a degradação do fenol aumenta gradualmente com o número de camadas de TiO_2 e com três camadas foi alcançada degradação de 90%.

Khataee e colaboradores (2013) estudaram a degradação fotocatalítica de uma mistura de três fármacos: metronidazol, atenolol e clorpromazina, utilizando TiO_2 imobilizado em placas cerâmicas pelo método sol-gel, sob radiação UV. Os principais intermediários de degradação dos fármacos produzidos nesse processo foram identificados pela técnica CG-EM. A ecotoxicidade crônica de produtos farmacêuticos foi avaliada utilizando espécies aquáticas *Spirodela polyrrhiza* antes e após a fotocatalise. Os resultados do TOC (remoção de 90% após 16 h) e os experimentos ecotoxicológicos revelaram que o processo de fotocatalise pode efetivamente mineralizar e reduzir a ecotoxicidade dos fármacos a partir de suas soluções aquosas.

2.7. FÁRMACOS EMPREGADOS NAS REAÇÕES DE FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA

Em função do elevado consumo, muitos medicamentos merecem particular atenção do ponto de vista da contaminação ambiental, como os medicamentos selecionados para o presente estudo, devido a sua importância e ampla utilização pela população estão na lista oficial de medicamentos a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME, 2015), estabelecida pela política nacional de medicamentos do governo brasileiro e na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2015).

A Política Nacional de Medicamentos regulamentada pela Portaria nº 3.916, de 30 de outubro de 1998, foi o primeiro documento norteador para a Assistência Farmacêutica e política de medicamentos do Sistema Único de Saúde (SUS), que estabeleceu entre suas diretrizes e prioridades a adoção e a revisão permanente da RENAME. Neste documento está presente o conjunto dos medicamentos a serem disponibilizados e ofertados aos usuários no SUS, considerado como ferramenta imprescindível para a promoção do uso racional de medicamentos.

Na RENAME (2015) estão contidos os medicamentos investigados no estudo, bem com a concentração e forma de ingestão recomendada. A sinvastatina é administrada na forma de comprimido nas concentrações de 10, 20 e 40 mg; o cloridrato de fluoxetina em cápsula ou comprimido de 20mg e a amoxicilina em comprimido ou cápsula de 500 mg ou pó para suspensão oral de 50 mg mL⁻¹. Na Tabela 3 estão listados os medicamentos e suas propriedades físico-químicas e na Figura 7 estão representadas as suas estruturas.

Tabela 3. Propriedades físico-químicas dos fármacos estudados.

Substância	Fórmula molecular	MM	Características físicas	PF	Log K _{OW}	S	Pka
Amoxicilina	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	365,4	Sólido branco-amarelado	194	0,87	3,43	7,43
Fluoxetina	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO	309,3	Sólido branco-amarelado	179 a 182	4,05	50,0	9,8
Sinvastatina	C ₂₅ H ₃₈ O ₅	418,5	Sólido branco, cristalino	135 a 138	4,68	0,012	4,21

MM: Massa Molar (g mol⁻¹); PF: Ponto de fusão (°C); Log K_{OW}: coeficiente de partição octanol/água; S: Solubilidade em água a 25°C (mg mL⁻¹); Pka: constante de acidez.

FONTE: Drugbank Database, 2017.

2.7.1. Amoxicilina

A amoxicilina é penicilina semi-sintética introduzida em 1970, trata-se de um antibiótico β -lactâmico de espectro moderado, obtido pela hidroxilação da cadeia fenólica lateral da ampicilina que possui, como todas as penicilinas, uma estrutura essencial que sofre o ataque de microrganismos resistentes, os quais possuem as enzimas β -lactamases que têm a capacidade de clivar o anel β -lactâmico, primordial para a atividade antibacteriana (LEVISON; JAWETZ, 1998).

É um composto estável em meio ácido, que foi projetado para uso oral. Atua por inibição da produção de proteínas da parede celular bacteriana, de modo geral, afetando a síntese de componentes dos peptidoglicanos da parede celular e causando lise osmótica (HARDMAN *et al.*, 2004).

Devido ao seu uso intenso e indiscriminado o medicamento tem contribuído para a elevação do número de bactérias patogênicas resistentes de todo o mundo, fatores como quantidade e a maneira de utilização dos antibióticos contribuem para a estirpes resistentes (BARBOSA; LEVY, 2000).

Devido a isto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, por meio da resolução RDC 44, 26/10/2010 dispõe sobre o controle rigoroso da venda de antibióticos, contendo receita média com identificação de paciente e médico, prescrição médica, com retenção de receita na farmácia. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) mais de 50% das prescrições de antibióticos no mundo são inadequadas. No segundo semestre de 2010 ocorreram, no Brasil, surtos de bactérias produtoras da enzima KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*), levando a algumas mortes. Essa enzima pode ser produzida por enterobactérias, que confere às bactérias uma resistência ainda maior aos antibióticos, podendo inativar a ação de penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (ANVISA, 2010).

2.7.2. Fluoxetina

A fluoxetina é o primeiro agente da classe de antidepressivos conhecido como inibidores seletivos da recaptação da serotonina (SSRIs) foi aprovado pelo US FDA em 1987. O medicamento é composto por uma mistura racêmica dos enantiômeros S- e R-fluoxetina (50/50), ambos são clinicamente ativos (EAP, 1996), indicado para tratar vários distúrbios, como transtorno depressivo maior (MDD), bulimia nervosa moderada a grave, transtorno obsessivo-compulsivo (TOC),

transtorno disfórico pré-menstrual (PMDD), transtorno de pânico e em associação com olanzapina para tratamento resistente ou depressão bipolar (FDA; O'SHEA, B., 1991).

O cloridrato de fluoxetina é comumente conhecido por Prozac®. Como ocorre com outros ISRS, o seu consumo pode produzir uma série de reações adversas. Segundo a OMS (2004), reação adversa é definida como "qualquer resposta a medicamentos que seja nociva e indesejável e que ocorre nas doses utilizadas no homem para profilaxia, diagnóstico, tratamento de doenças, ou para modificação de uma função fisiológica". (MESSIHA, 1993; DRUGBANK).

Os efeitos clínicos do uso do medicamento são o aumento do humor e da diminuição da ansiedade, devido a alterações adaptativas na função neuronal que conduzem a uma neurotransmissão serotoninérgica melhorada. As reações adversas incluem boca seca, náuseas, tonturas, sonolência, disfunção sexual e dor de cabeça. No entanto esses efeitos geralmente ocorrem nas primeiras duas semanas de terapia e geralmente são menos graves e frequentes do que aqueles observados com antidepressivos tricíclicos (DRUGBANK).

2.7.3. Sinvastatina

A sinvastatina está presente no grupo de substâncias denominadas estatinas, esses compostos pertencem a classe de antihiperlipidêmico, e são substâncias frequentemente prescritas para reduzir a mortalidade relacionada à doença cardíaca coronária. O nível de colesterol plasmático elevado e os níveis de colesterol de lipoproteína de baixa densidade têm sido reconhecidos como um importante fator de risco para doença aterosclerótica. Algumas estatinas são produtos naturais, isoladas a partir do metabolismo de fungos como a mevastatina, a lovastatina, a pravastatina e a sinvastatina (derivado semi-sintético), outras são completamente sintéticas como a atorvastatina, a cerivastatina e a fluvastatina (KOCIJAN *et al.*, 2005).

A sinvastatina e a atorvastatina estão entre as estatinas mais potentes, sendo recomendadas pela *Heart Association and the American College of Cardiology* como a terapia de primeira escolha para reduzir os níveis de colesterol plasmáticos. Ao se comparar os efeitos das estatinas na redução do colesterol plasmático constatou-se que a dose de 20 mg de sinvastatina equivale à dose de 10

mg de atorvastatina. Sendo a atorvastatina a estatina mais potente, depois a sinvastatina, a lovastatina e a pravastatina têm potências semelhantes e a fluvastatina a menor (JONES *et al.*, 1998; GOODMAN e GILMAN, 2003).

A sinvastatina é a segunda estatina mais potente e a mais prescrita no Brasil, é um fármaco de baixa solubilidade aquosa e de alta permeabilidade de acordo com o sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) (ANVISA, 2014).

Devido a essas propriedades físico-químicas, a sinvastatina faz parte da classe II do SCB, ou seja, é uma substância de baixa solubilidade e alta permeabilidade (GRAESER *et al.*, 2008). A lovastatina e a sinvastatina são administradas na forma inativa, lactona, e no fígado são hidrolisadas para a forma ativa, o α -hidroxiácido correspondente. As demais estatinas são administradas na forma ativa. A lipofilicidade dos pró-fármacos, lovastatina e sinvastatina, confere aos mesmos maior seletividade pelo fígado, o maior sítio de síntese de colesterol, em comparação com as demais estatinas administradas na forma ativa (MOGHADASIAN, 1999).

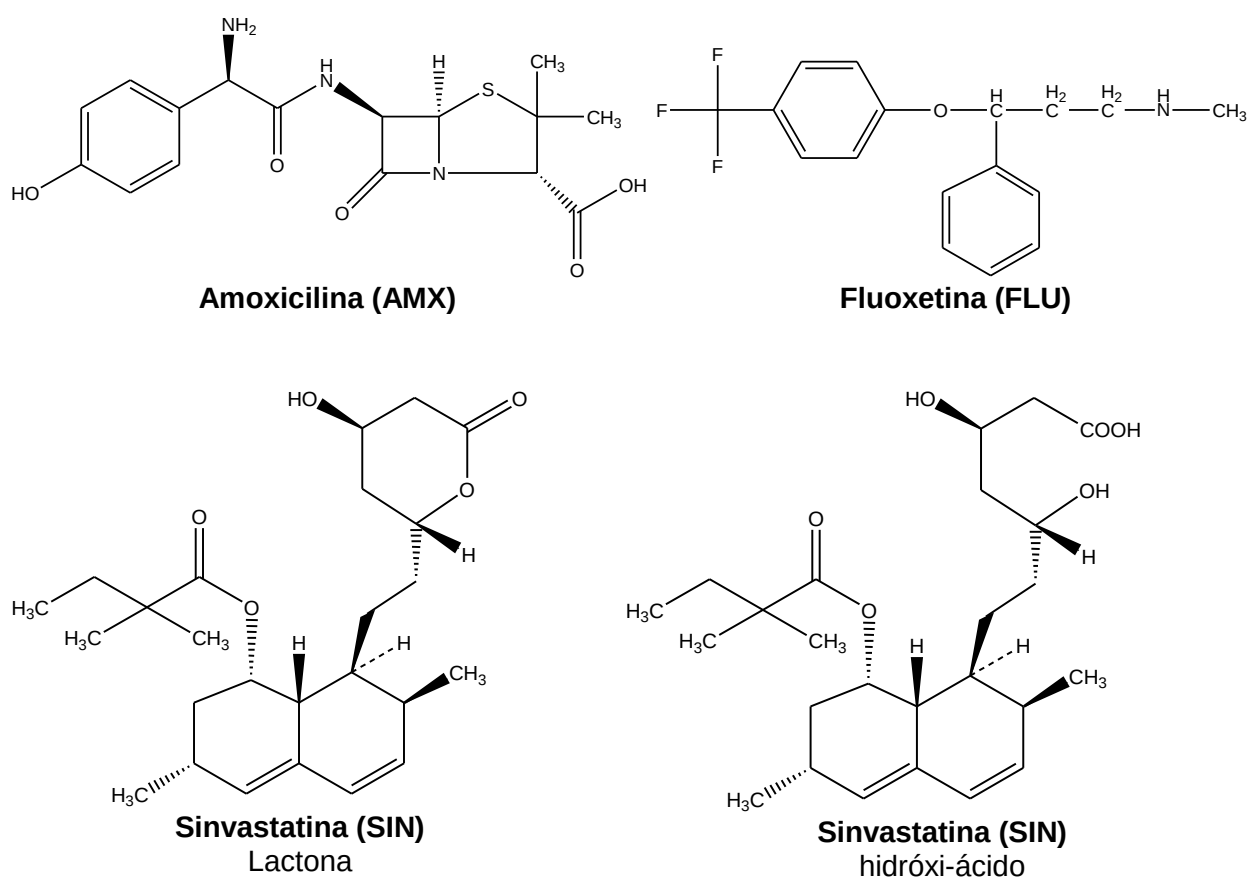


Figura 7. Estruturas dos fármacos estudados.

FONTE: The PubChem Compound Database.

2.8. ACETATO DE CELULOSE

Para realizar a imobilização do TiO_2 foi escolhido como substrato o acetato de celulose. A utilização do material imobilizado apresenta a vantagem, em comparação à forma de suspensão, de ser recuperado ao final da reação, não necessitar de etapas adicionais de filtragem e possibilidade de reutilização.

Os semicondutores podem ser utilizados na forma de suspensão, no entanto, apresentam a necessidade de recuperação ao final da reação, dificultando a sua aplicação em larga escala e aumentando os custos do processo e, ainda o seu descarte nos efluentes é considerado um potencial poluidor ao ambiente (MIRANDA-GARCIA *et al.*, 2010).

A celulose é um polímero de ocorrência natural obtido a partir de fibras de madeira, constituída por unidades repetitivas de glucose que têm a fórmula química $\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_2(\text{OH})_3$ e estrutura molecular representada na Figura 8.

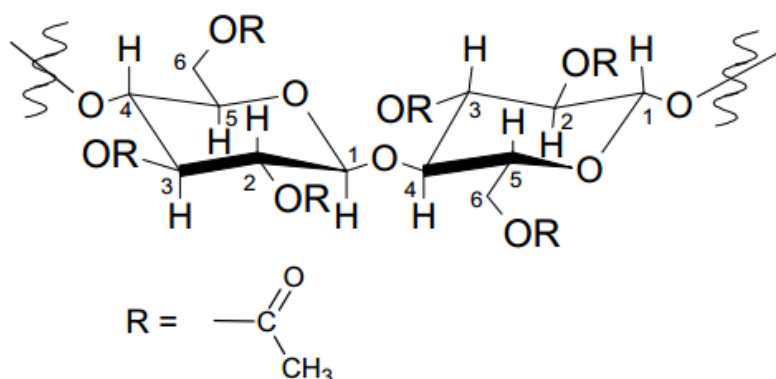


Figura 8. Estrutura molecular da celulose.

FONTE: Enciclopedia Britânica, 2012.

O acetato de celulose é o composto sintético derivado da acetilação da substância vegetal celulose que pode ser transformado em fibras têxteis originando o acetato ou triacetato, utilizado para produzir peças de plástico, como cabos de ferramentas e embalagens. Em estruturas de celulose inalteradas o R na estrutura molecular representa hidrogênio (H), que indica a presença na molécula de grupos de três de hidroxilas (OH). Os grupos OH formam fortes ligações de hidrogênio entre as moléculas de celulose, com o resultado de que as estruturas de celulose não podem ser cedidas pelo calor ou por solventes, sem causar a decomposição química. No entanto, após a acetilação, os hidrogênios nos grupos hidroxila são

substituídos por grupos acetila ($\text{CH}_3\text{-CO}$), resultando no composto acetato de celulose (Enciclopedia Britânica, 2012).

O acetato de celulose pode ser modificado quimicamente através de reações que envolvem os seus grupos acetatos, que permite a imobilização de outros materiais, como o dióxido de titânio, obtendo um material com grande potencial para a degradação, possibilitando a sua reutilização, ressaltando que o acetato é um polímero atóxico, que possibilita a sua utilização sem agredir diretamente o meio ambiente (BOTARO *et al*, 2009).

2.9. CARBONO ORGÂNICO TOTAL (COT)

O Carbono Orgânico Total (COT) é empregado para denominar toda a matéria orgânica contida em amostras aquosas, sua determinação é com frequência empregada para verificar a eficiência do processo de degradação utilizado para promover a mineralização das amostras (SHEN *et al.*, 1995; AFFAM, 2013; BRAZON *et al.*, 2016).

Na natureza o elemento carbono pode ser encontrado de três formas diferentes: 1º) elementar (carbono e grafite), carbono inorgânico (CI), 2º) sais de carbonatos (CO_3^{2-} e bicarbonatos HCO_3^-), como dióxido de carbono (CO_2) dissolvido em água e, 3º) carbono orgânico (CO), definido como todo átomo de carbono ligado covalentemente a uma molécula (EATON *et al.*, 2005; SCHUMACHER, 2002).

Em seu trabalho Diaz e colaboradores (2016) investigaram a degradação de herbicidas empregando hidrodesscloração catalítica (HDC) e fotocatalise (TiO_2 e $\text{Pd/Al}_2\text{O}_3$), obtendo mineralização quase completa para os herbicidas clorado MCPA e 2,4-D e de 87% para o 4-clorofenol.

Yang e colaboradores (2008) estudaram a degradação do paracetamol utilizando TiO_2 , assistida sob irradiação UV, após 80 minutos de reação ocorreu a mineralização de 95% da amostra.

Affam e Chaudhuri (2013) estudaram a degradação de pesticidas (clorpirifos, cipermetrina e clorotalonil) empregando fotólise (irradiação UV) e fotocatalise. A degradação foi considerada insignificante para a fotólise, para TiO_2/UV e $\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ foram obtidas remoções de TOC de 8,45% e 21,54%, respectivamente.

Giri e Golder (2014) estudaram a degradação da dipirona empregando Fenton, foto-Fenton, $\text{UV/H}_2\text{O}_2$ e UV/TiO_2 . As remoções máximas obtidas foram de

94,1; 96,4; 74,4 e 71,2% com COT de 49,3; 58,2; 47 e 24,6%, respectivamente para os processos empregados.

Kuo e colaboradores (2015) realizaram estudo de degradação de metanfetamina utilizando TiO_2/UV . Após 60 minutos de reação, a metanfetamina foi completamente removida e COT indicou a mineralização de 46% da matéria orgânica, depois de 3h a amostra foi completamente mineralizada.

Zabar e colaboradores (2016) realizaram estudo fotocatalítico como TiO_2/UV para investigar a degradação do pesticida 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP). Após 120 minutos de irradiação medições COT revelaram elevada taxa degradação fotocatalítica com mineralização de $53,6 \pm 1,9\%$.

Rivas e colaboradores (2012) investigaram a degradação de nove contaminantes emergentes (Acetaminofeno, norfloxacin, metoprolol, cafeína, antipirina, sulfametoxazol, ceterolaco, hidroxibifenil e diclofenaco) empregando radiação UV, O_3 e TiO_2 e combinações entre eles. A fotólise e ozonização (UV e O_3) conduziram a uma eliminação de COT, após 120 minutos de exposição, em 25 e 30%, respectivamente. A adição do fotocatalisador TiO_2 obteve uma conversão de COT a 60%. A combinação O_3/UV aumentou a geração de radicais hidroxilas e promovem a redução de COT em 85%. O sistema composto por O_3 , TiO_2/UV promoveu maior redução de COT em 95%.

Para as amostras aquosas, somente a quantidade de carbonos orgânicos e inorgânicos é considerada. Assim, o carbono total (CT) refere-se à soma das frações orgânica e inorgânica, pois a quantidade de carbono elementar em amostras aquosas pode ser considerada insignificante (EATON *et al.*, 2005; BISUTTI *et al.*, 2004). Para a determinação de COT o método indireto é o mais utilizado, onde são quantificados os teores de CT, CI e determinada a concentração de COT na amostra pela equação 12 (WALLACE *et al.*, 2002):

$$\text{COT} = \text{CT} - \text{CI} \quad (\text{Eq. 12})$$

Os analisadores de COT realizam a oxidação da amostra gerando CO_2 , a espectrometria no infravermelho é técnica mais utilizada para fazer a sua determinação, pois é de fácil adaptação aos equipamentos automatizados de análise, apresentando alta sensibilidade e baixos limites de detecção (WALLACE *et al.*, 2002).

2.10. AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS PRODUTOS GERADOS NA DEGRADAÇÃO DOS FÁRMACOS POR CG/EM

As análises dos produtos gerados nas reações de degradação dos fármacos foram realizadas utilizando um cromatógrafo a gás acoplado com detector de massas (CG/EM), marca AGILENT, modelo 7890A GCSysstem, com detector de massas MS, modelo 5975C.

As temperaturas da fonte e do quadrupolo do MS foram de 280 °C e 150 °C, respectivamente. Foi empregado o hélio (He) como gás de arraste com vazão de 1 mL/min. A coluna foi mantida a 150 °C por três minutos, aquecida até 250 °C com incrementos de 30 °C/min, mantida por 10 minutos e, posteriormente aquecida a 280 °C com incrementos de 5 °C/min, mantido por 1 minuto. O espectrômetro de massas foi programado para detecção de 40 a 700 unidades de massa atômica, por ionização por elétrons (20 eV). A identificação dos constituintes foi feita por comparação dos espectros de massas obtidos para cada pico cromatográfico com aqueles disponíveis nas bibliotecas de espectros do equipamento (NIST e Demo).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficiência da fotocatalise heterogênea na degradação de amostras aquosas contendo os fármacos amoxicilina, fluoxetina e sinvastatina, utilizando o TiO_2 imobilizado em acetato de celulose.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar o fotocatalisador empregando o TiO_2 imobilizando-o em acetato de celulose;
- Realizar a caracterização estrutural e morfológica do material sintetizado por meio das técnicas de TG/DTA, FTIR, MEV/EDS e DRX.
- Utilizar o material sintetizado na degradação dos fármacos: amoxicilina, fluoxetina e sinvastatina;
- Avaliar a influência de fatores na degradação, tais como, velocidade de reação, pH inicial da solução e concentração inicial do fármaco por meio do planejamento de experimentos;
- Determinar parâmetros de validação para os métodos de degradação, tais como, seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão;
- Quantificar e identificar os produtos de degradação dos fármacos por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia em fase gasosa (CG-EM);
- Compreender a cinética das reações de degradação utilizando os produtos de degradação gerados;
- Determinar as taxas de mineralização das amostras empregando análises de Carbono Orgânico Total (COT);
- Identificar toxicidade das amostras degradadas empregando ensaios ecotoxicológicos.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. REAGENTES

No presente estudo foi utilizado na síntese do material o dióxido de titânio Degussa P25, 99%, com área superficial BET $500 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, (Strem Chemicals), acetato de celulose (Aldrich), acetona P.A-ACS, 99,5% (Synth), ácido acético P.A-ACS, 99,7% (Synth). Os fármacos amoxicilina, fluoxetina e sinvastatina apresentam pureza de 100% e foram utilizados em solução aquosa na concentração de 100 mg L^{-1} .

4.2. SÍNTESE DO MATERIAL TiO_2/AC

Para sintetizar o material dissolveu-se, sob agitação magnética, 5,0 g de acetato de celulose em uma mistura de acetona (40 mL) e ácido acético glacial (10 mL) baseado em Ribeiro (2016). Foi adicionado aos poucos o TiO_2 (0,21g). A solução permaneceu em repouso por uma semana, até a sua completa gelatinização. Após esse período, o material obtido foi moldado manualmente em pequenas esferas e gotejado em água destilada, levando-o a solidificação e o diâmetro médio das esferas foi de $4 \pm 1 \text{ mm}$. O material foi seco ao ar por um dia, após esse período estava pronto para ser utilizado. O esquema de obtenção do material está representado na Figura 9.

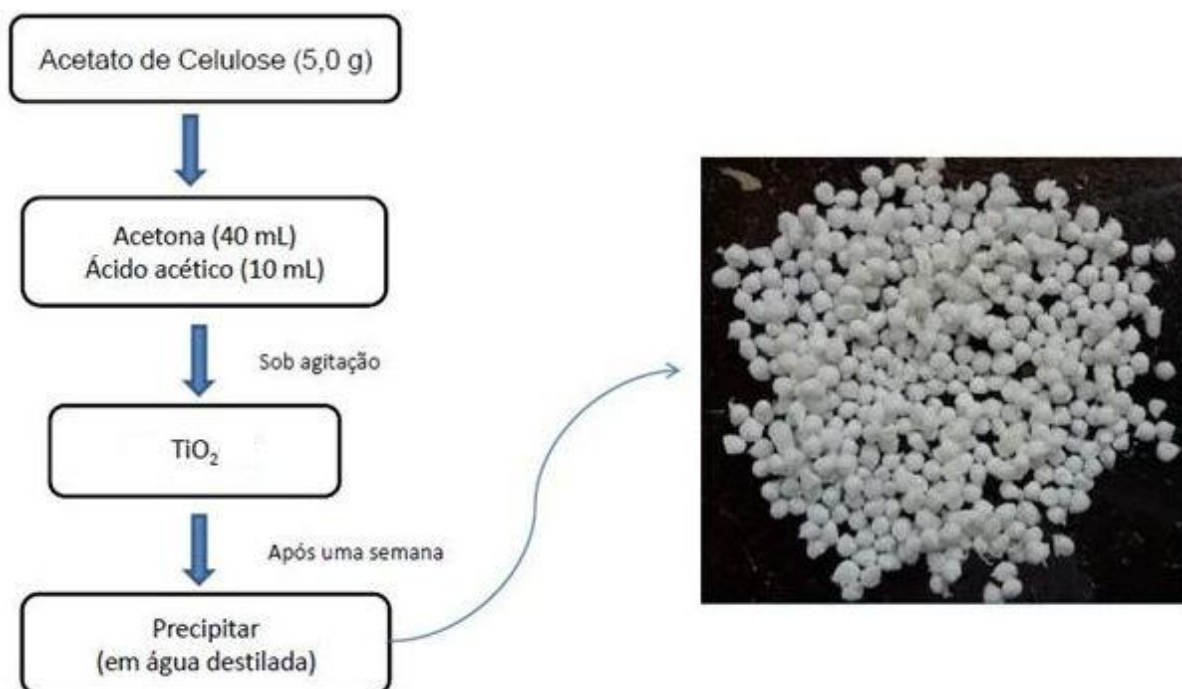


Figura 9. Representação das etapas realizadas para obtenção de TiO_2/AC .

4.3. CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL

O material sintetizado foi caracterizado utilizando Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA), Microanálise Quantitativa com mapeamento químico por Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDS), Difração de Raios X e Espectroscopia no Infravermelho.

4.3.1. Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)

A termogravimetria (TG), a termogravimetria derivada (DTG) e a análise térmica diferencial (DTA) foram as técnicas instrumentais utilizadas na análise do material dióxido de titânio e acetato de celulose (TiO_2/AC), usando o equipamento SEIKO TG/DTG 6300. As condições das medidas foram as seguintes: massa das amostras: 13,192 mg; atmosfera: ar, com fluxo de 200 mL min^{-1} ; temperatura: 30°C a 1100°C ; razão de aquecimento: 10°C/min , cadinho utilizado: platina, referência: α -alumina.

4.3.2. Microanálise Quantitativa com mapeamento químico por Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDS)

A morfologia da superfície do material TiO_2/AC foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), com microscópio eletrônico de varredura da marca Tescan, modelo VEGA3 XMU e EDS acoplado. A composição elementar semi-quantitativa foi determinada por espectroscopia de energia dispersiva (EDS).

4.3.3. Difractometria de Raios X (DRX)

Na caracterização do material foi empregada a técnica de difração de raios X. Utilizou-se um difratômetro Brucker, D2 phase, com radiação de $\text{CuK}\alpha$ ($1.5418 \text{ \AA}$).

4.3.4. Espectroscopia no Infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos utilizando um equipamento modelo Nicolet IR 200 FT-IR. As amostras foram preparadas na forma de pastilha usando KBr como dispersante. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente, com 64 varreduras para cada amostra, na região de 4000 a 500 cm^{-1} .

4.3.5. Planejamento Fatorial

Os planejamentos estatísticos de experimentos são uma ferramenta de grande utilidade na pesquisa científica, pois fornecem com menor quantidade de experimentos, maior quantidade de informações e de indicações sobre a influência de diferentes variáveis e principalmente das implicações das interações dessas variáveis sobre a resposta estudada (Neto *et al.*, 2003).

No presente trabalho foram variados o pH da solução dos fármacos e a quantidade de titânio adicionada ao acetato de celulose, avaliados em dois níveis acrescido de um ponto central realizado em triplicata o que configura um planejamento 2^2 .

4.4. ANÁLISE DA DEGRADAÇÃO FOTOCATALÍTICA HETEROGÊNEA POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE-DAD)

A determinação qualitativa dos substratos dos fármacos em estudo foi realizada em cromatógrafo em fase líquida de alta eficiência Waters 600, com detector de arranjo de diodos DAD e equipado com coluna C18 (SysCroma, 250 mm x 4,6 mm, 5 μm).

O sistema é equipado com bomba recíproca de dois pistões e sistema de gradiente com 4 válvulas proporcionais que misturam até quatro eluentes a baixa pressão. Em linha o sistema possui módulo de desgaseificação com quatro canais simultâneos. Para monitorar os cromatogramas utilizou-se detector de UV por arranjo de diodos (DAD) Waters 2696 com lâmpada de deutério e faixa de operação

entre 190 a 800nm. Para o gerenciamento, controle de módulos do CLAE, aquisição e processamento de dados, encontra-se acoplado ao sistema um microcomputador IBM Pentium IV com o software EMPOWER 2 (Waters Corporation).

Para a determinação dos fármacos foram utilizadas as fases móveis constituídas de metanol e água deionizada, respectivamente, nas proporções 20:80 (AMX); 70:30 (FLU) e 90:10 (SIN); com vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, as condições foram baseadas nos trabalhos de NOVÁKOVÁ *et al.*, 2008; YANG e HWANG, 2006; BUGAMELLI *et al.*, 2004; DOUŠA, M.; HOSMANOVÁ, 2005.

4.5. FOTÓLISE

A fotólise é uma das técnicas usualmente empregadas na degradação de poluentes (AFZAL *et al.* 2016; ABUSALLOUT e HUA, 2016) considerada como uma forma de tratamento limpa, contudo apresenta resultados limitados devido a sua baixa eficiência de remoção (ZHANG *et al.*, 2016).

Com a finalidade de verificar se o processo de fotólise contribui de maneira significativa com a degradação das amostras foi realizado um estudo fotoquímico para cada um dos fármacos estudados. O teste consistiu na utilização do reator fotocatalítico, com a solução do fármaco (100 mg L^{-1}), incidindo radiação UV, sem a presença do fotocalisador (TiO_2/AC). As amostras foram coletadas após um período de 120, 180 e 240 minutos, para SIN, FLU e AMX respectivamente, que posteriormente foram analisados no UV/Vis, comparando-as com as soluções dos fármacos antes do processo.

4.6. ESTUDO DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO CG/EM PARA QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS E IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS FORMADOS NA DEGRADAÇÃO

Com o objetivo de se quantificar os produtos gerados no processo fotocatalítico, nessa etapa do trabalho foi feita um estudo de validação para o método empregado. Para isso foram analisadas as frações provenientes das reações de degradação dos fármacos FLU e SIN no CG/EM. Devido a sua baixa volatilidade não foi possível realizar a quantificação para AMX.

Os produtos gerados nas reações de degradação dos fármacos foram analisados em um cromatógrafo a gás acoplado com detector de massas (CG/EM), marca AGILENT, modelo 7890A GCSystem, com detector de massas MS, modelo 5975C.

Foi utilizado cartucho Agela Cleanert® ODS C18 (500 mg, 6 mL), para a extração do analito da fase aquosa para a fase metanólica (FM). O cartucho foi acondicionado em metanol, metanol/água e água, respectivamente, e em seguida adicionou-se a fração em estudo do fármaco e, metanol para extração, armazenando-o em “vials” de vidro lacrados para posterior análise em CG/EM, conforme esquema representado na Figura 10. A temperatura do injetor foi de 290 °C, operando no modo *splitless*, 1 µL das amostras foram injetadas diretamente no cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas, equipado com uma coluna capilar HP-5MS (5% fenil- 95% dimetilpolisiloxano) da marca Agilent 19091S-433 (temperatura máxima de trabalho: 325 °C) com 30 m de comprimento, 250 µm de diâmetro interno e espessura do filme 0,25 µm.

As temperaturas da fonte e do quadrupolo do MS foram de 230 °C e 150 °C, respectivamente. Foi empregado o hélio (He) como gás de arraste com vazão de 1 mL/min. A coluna foi mantida a 150 °C por três minutos, aquecida até 250 °C com incrementos de 30 °C/min, mantida por 10 minutos e, posteriormente aquecida a 280 °C com incrementos de 5 °C/min, mantido por 1 minuto. O espectrômetro de massas foi programado para detecção de 40 a 700 unidades de massa atômica, por ionização por elétrons (20 eV), as condições experimentais foram baseadas nos trabalhos de Oliveira *et al.*, 2013; Iqbal e Akmal, 2009; Ertürk *et al.*, 2003.

A identificação dos constituintes foi feita por comparação dos espectros de massas obtidos para cada pico cromatográfico com aqueles disponíveis nas bibliotecas do equipamento (NIST e Demo).

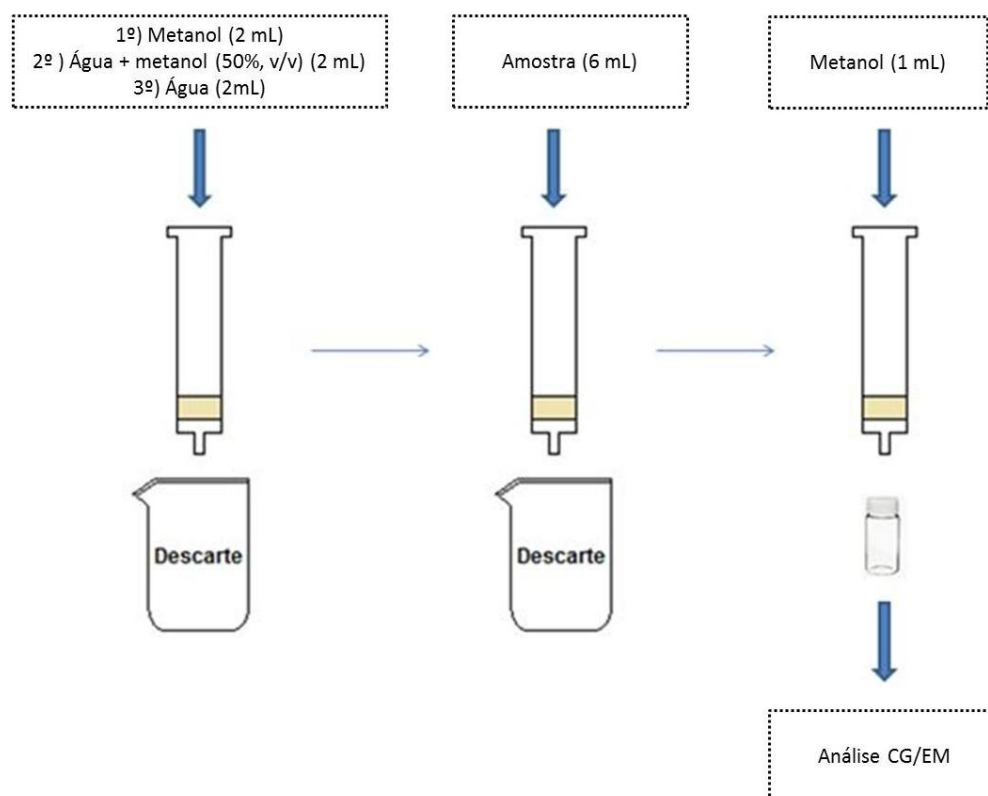


Figura 10. Representação esquemática das etapas do processo de extração em fase sólida (SPE).

Para se verificar as espécies geradas foi feita a identificação dos produtos formados. As frações provenientes das reações de degradação dos fármacos FLU e SIN foram analisadas no CG/EM (modo scan) e comparadas com resultados obtidos na literatura. Devido a sua baixa volatilidade não foi possível a determinação dos produtos de degradação gerados para AMX, no entanto será apresentado uma revisão na literatura sobre os seus possíveis produtos de degradação .

4.6.1 Parâmetros Analíticos da Validação

No presente estudo foram validados os parâmetros analíticos para com o propósito de quantificar os fármacos durante o processo de degradação. No intuito de avaliar a conformidade da metodologia analítica, o estudo de validação foi realizado de acordo com normativas de agências internacionais e nacionais de controle de qualidade (AOAC 2012; ICH 1996; Inmetro 2011).

De acordo com a Resolução RE n. 899, de 29/5/2003 (ANVISA, 2003) o objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. Para isso estabelece os parâmetros que devem ser considerados ao se realizar o estudo de validação de procedimentos analíticos, que devem ser aplicadas a técnicas que façam uso de métodos de cromatografia gasosa (CG) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Para determinação e quantificação dos fármacos foi realizada utilizando os seguintes parâmetros de validação: seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão, de acordo com as diretrizes internacionais e nacionais (ANVISA, 2003, AOAC, 2012, ICH, 1996, INMETRO, 2011).

4.6.1.1. Avaliação da Seletividade

Para a verificação da seletividade do método foram analisadas a solução padrão ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$) e a amostra obtida após 15 minutos de reação para FLU e 10 minutos para SIN, tempos em que se observaram as primeiras degradações. A seletividade foi avaliada pela comparação dos tempos de retenção dos analitos na solução padrão e nas amostras de degradadas e também foi determinada pelo perfil dos espectros CG/EM para o padrão e das amostras dos fármacos em estudo.

4.6.1.2. Avaliação da Linearidade

A linearidade do método corresponde à habilidade do mesmo em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame dentro de uma determinada variação. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes (ANVISA, 2003; ICH, 1995).

Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. Se não houver relação linear, realizar transformação matemática. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,99 (ANVISA, 2003).

A verificação da linearidade da metodologia cromatográfica foi avaliada a partir da curva analítica obtida por calibração de padronização externa na faixa de concentrações de 10 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em onze níveis de concentração para a FLU, e de 20 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em sete níveis de concentração para SIN, todas em triplicatas verdadeiras.

Para o preparo das soluções padrões foram retiradas alíquotas de uma solução estoque de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A análise de regressão linear e o teste de falta de ajuste no nível de confiança de 99% foram aplicados aos dados de calibração usando o software estatístico Minitab versão 16.2.2. Intervalos de confiança e de predição foram construídos no mesmo nível de confiança (Araújo, 2009).

4.6.1.3. Determinação dos Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), que são respectivamente a menor concentração de um analito detectada e quantificada em uma amostra considerando precisão e exatidão, foram obtidos utilizando-se os dados das equações das curvas de calibração elaboradas na faixa de concentração de 10 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para FLU e 10 a 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para SIN e utilizadas para os cálculos de LD e LQ.

O LD foi calculado pela Equação 13 e o LQ pela Equação 14, nas quais a determinação dos limites foi realizada a partir do desvio padrão do intercepto (s) e da inclinação da curva de calibração (b) (ICH 1996; Araújo, 2009 e Ribani *et al.*, 2007).

$$LD = \frac{3s_b}{b} \quad (\text{Eq. 13})$$

$$LQ = \frac{10S_b}{b} \quad (\text{Eq. 14})$$

4.6.1.4. Avaliação da Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em dois níveis: repetitividade e precisão intermediária (ANVISA 2003; ICH, 1995).

O estudo da repetitividade seguiu a recomendação da ANVISA que indica, dentre outras possibilidades, um mínimo de seis determinações. Assim, os dados foram obtidos pela realização de uma sextuplicata experimental em um mesmo dia considerando a amostra obtida em 15 minutos de reação para FLU e 10 minutos de reação para SIN.

Para a precisão intermediária foram considerados ensaios similares realizados em três dias consecutivos com triplicatas amostrais. A avaliação tanto da repetitividade quanto da precisão intermediária ocorreu a partir do cálculo de desvio padrão relativo (RSD ou CV) dado pela Equação 15 (ANVISA, 2012).

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 15})$$

Onde s é o desvio padrão dos valores de concentrações aferidos, $\bar{x}$ a média da concentração do analito na amostra considerando as triplicatas.

4.6.1.5. Avaliação da Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio do estudo de recuperação por adição de padrão externo. Para FLU as amostras foram recolhidas no tempo de 180 minutos e SIN em 30 minutos, em triplicata e fortificadas com a solução estoque obtendo as concentrações finais de 30, 40 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A exatidão foi expressa como porcentagem de recuperação (%) e foi calculada pela equação (AOAC, 2012), equação 16:

$$\%R = \left(\frac{c_1 - c_2}{c_3} \right) \cdot 100 \quad (\text{Eq. 16})$$

Sendo:

C_1 = concentração do analito na amostra fortificada

C_2 = concentração do analito na amostra não fortificada

C_3 = concentração de analito adicionado à amostra fortificada

4.7. CARBONO ORGÂNICO TOTAL (COT)

O Carbono Orgânico Total (COT) é empregado para denominar toda a matéria orgânica contida em amostras aquosas, sua determinação é com frequência empregada para verificar a eficiência do processo de degradação utilizado para promover a mineralização das amostras (SHEN *et al.*, 1995; AFFAM, 2013; BRAZON *et al.*, 2016).

As soluções dos fármacos em estudo (AMX, FLU e SIN) foram preparadas nas concentrações de 20 mg L⁻¹, degradadas em reator fotoquímico, pelo fotocatalisador TiO₂/AC, conforme descrito em 2.4. Coletaram-se frações das amostras degradadas (50 mL) após tempos pré-determinados de reação, para a determinação da taxa de mineralização das amostras e cinética de reação, pela avaliação de Carbono Orgânico Total (COT).

A determinação foi realizada em um analisador modelo TOC – L: Total Organic Carbon Analyzer, da marca Shimadzu controlados por *software* TOC Control-V Shimadzu. O gás de arraste utilizado foi o ar sintético (O₂ e N₂), grau analítico.

O teor de Carbono Orgânico Total (COT) foi determinado a partir dos teores de carbono total (CT) e carbono inorgânico (CI) contidos nas amostras aquosas. Para a determinação do CT foram elaboradas duas curvas de calibração de biftalato de potássio (C₈H₅KO₄) nas concentrações: 0, 5, 10, 50, 100 e 200 mg L⁻¹ (R² = 0,9999) e 0, 5, 10, 25, 40 e 50 mg L⁻¹ (R² = 0,9998). Para a determinação de CI foram preparadas duas curvas com um padrão misto de carbonato e bicarbonato de

sódio (Na_2CO_3 e NaHCO_3), nas concentrações: 0, 5, 10, 50, 100 e 200 mg L^{-1} ($R = 0,9997$) e 0, 5, 10, 25, 40 e 50 mg L^{-1} ($R = 0,9997$).

A cinética de degradação fotocatalítica dos fármacos foi verificada empregando a cinética de pseudo-primeira ordem representado pela Equação 17 (SHEN *et al.*, 1995; AFFAM, 2013; BRAZON, *et al.*, 2016):

$$\ln\left(\frac{C_t}{C_0}\right) = -k \cdot t \quad (\text{Eq. 17})$$

Sendo:

k = constantes pseudo-primeira ordem constante;

t = tempo de irradiação em min;

C_0 = concentração inicial do poluente em solução aquosa;

C = é a concentração residual de poluente no tempo t.

4.8. AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA

As plantas aquáticas do gênero *Lemna spp.* são frequentemente empregadas na avaliação de risco ambiental e pode-se supor que parâmetros sejam confiáveis para avaliar o risco de produtos farmacêuticos (RADIĆ *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2012; USEPA, 2016). A sensibilidade deste gênero a diferentes classes de poluentes, seu fácil cultivo e a possibilidade de avaliação de vários *endpoints* as tornam adequadas para tais investigações (WANG, 1990; KUMMEROVÁ *et al.*, 2016). Os *endpoints* mais utilizados incluem biomassa vegetal, conteúdo de clorofila, estresse antioxidante, entre outros (WANG, 1990).

Dessa forma, o objetivo foi avaliar o efeito dos produtos da degradação fotocatalítica de soluções aquosas de amoxicilina, fluoxetina e sinvastatina no desenvolvimento de *Lemna aequinoctialis* Welw.

Plantas de *L. aequinoctialis* foram obtidas no laboratório de Biologia Aquática da UNICENTRO e aclimatadas em 1L de meio de cultura L. C. Oligo (ABNT, NBR 12648: 2005, p.11) por 48 h.

Na realização dos ensaios foram utilizados os controles negativo e positivo, e também as soluções dos fármacos depois de submetidas ao tratamento fotocatalítico empregando TiO_2 imobilizado em acetato de celulose. O TiO_2 ,

independentemente do tamanho das partículas e da concentração, não causaram efeitos fitotóxicos graves, e podem ser consideradas não prejudiciais à *Lenma minor* (KOCE, 2017).

O controle negativo foi realizado com água destilada, o controle positivo em solução do fármaco antes de tratamento fotocatalítico (100 mg L^{-1}) as diluições foram realizadas para as soluções dos fármacos coletadas após o tratamento fotocatalítico.

As frações provenientes da degradação da amoxicilina (AMX), fluoxetina (FLU) e sinvastatina (SIN), foram recolhidas, respectivamente, após 240, 180 e 120 minutos de reação, e diluídas nas concentrações apresentadas na Tabela 4. A solução obtida na degradação do fármaco foi diluída para simular o que ocorre com o efluente no corpo receptor, uma vez que passará pelo processo de diluição depois do descarte. Ensaios prévios foram realizados para definição da faixa de concentração do fármaco a ser utilizada no ensaio ecotoxicológico.

Tabela 4. Concentrações utilizadas nos testes ecotoxicológicos.

Fármaco	Controle positivo	Controle negativo	Diluições (mg L^{-1})				
Amoxicilina	Solução 100 mg L^{-1}	Água destilada	10	7,5	5,0	2,5	1,0
Fluoxetina	Solução 100 mg L^{-1}	Água destilada	10	7,5	5,0	2,5	1,0
Sinvastatina	Solução 100 mg L^{-1}	Água destilada	24	10	7,5	5,0	2,5

Cada ensaio foi realizado em quintuplicata acondicionado em recipiente plástico contendo 25 mL de solução, 45 μL meio L. C. Oligo e 0,2 g de *L. aequinoctialis*. Os ensaios foram mantido por um período de 7 dias sob fotoperíodo de 12h luz : escuro. Após esse período foram analisados os efeitos de toxicidade dos fármacos (AMX, FLU e SIN) em *L. aequinoctialis*, por meio da análise de crescimento (tempo de duplicação), do teor de pigmentos (clorofila *a* e *b*) e da atividade das enzimas antioxidantes: catalase, peroxidase e ascorbato peroxidase.

4.8.1. Tempo de Duplicação

O tempo de duplicação da biomassa (TD) foi calculado pela equação $TD = (0,301 \cdot t) (\log MF/MF_0)^{-1}$ de acordo com Aziz e Watanabe (1983), sendo *t* o tempo de cultivo, MF_0 a massa inicial da planta e MF a massa final, ao final do período de ensaio.

4.8.2. Teor de Pigmentos

O tempo de duplicação da biomassa (TD) foi calculado pela equação $TD = (0,301 \cdot t) (\log MF/MF_0)^{-1}$ de acordo com Aziz e Watanabe (1983), sendo t o tempo de cultivo, MF_0 a massa inicial da planta e MF a massa final, ao final do período de ensaio.

Após macerado o extrato foi centrifugado, recolhendo-se o sobrenadante, o qual foi analisado por espectrofotometria nos comprimentos de onda: 470; 646,8 e 663,2 nm. Para o cálculo do teor de pigmentos foram utilizadas as fórmulas propostas por Porra *et al.* (1989) e Wellburn (1994).

4.8.3. Teor de Proteínas e Atividade Enzimática

A extração de proteínas foi realizada em tampão fosfato de potássio a 100 mM (pH 7,5) e PVPP (polivinilpolipirrolidona) segundo a metodologia proposta por Azevedo *et al.* (1998). A quantificação do teor de proteínas foi realizada conforme proposto por Bradford (1976).

A atividade de catalase será determinada como descrito por Kraus *et al.* (1995) com algumas modificações propostas por Azevedo *et al.*, (1998). O ensaio foi realizado a 25°C em uma solução contendo 10 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) acrescida de 25 µL de H₂O₂ a 25%. A atividade foi determinada monitorando-se a degradação de H₂O₂ a 240 nm durante o período de 1 minuto em dosagem contínua em intervalos de 1 segundo, os resultados são expressos em µmol min⁻¹ mg proteína⁻¹.

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi determinada em espectrofotômetro no comprimento de 290nm, durante o período de 1 minuto de reação. O ensaio é realizado com 650 µL do tampão fosfato de potássio (80 mM, pH7,0), 100 µL de ascorbato (5 mM), 100 µL de EDTA (1mM), mantidos a 30°C, posteriormente adicionado 50µL do extrato e 100 µL de H₂O₂ (1mM). A atividade será calculada usando o coeficiente de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹. Uma unidade de atividade de APX é definida como a quantia de enzima que oxida 1 µmol de ascorbato por minuto a temperatura ambiente (MITTLER; ZILINSKAS, 1991).

A determinação da atividade da peroxidase (POX) é dada pela diluição (1:25) de 100 μL de extrato bruto e adicionados a 4,9 mL de solução tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8 contendo 20mM de pirogallol e 20 mM H_2O_2 . Após incubação por 1 minuto a reação foi paralisada com 0,5 mL de H_2SO_4 e a leitura da absorbância a 420nm no espectrofotômetro. A atividade específica ($\mu\text{Kat } \mu\text{g Prot}^{-1}$) da enzima é calculada usando-se um coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (PEIXOTO *et al.*, 1999).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As esferas de TiO_2/AC obtidas possuem 10% (m/m) de TiO_2 ou 6% (m/m) de Ti^{4+} , com diâmetro médio de 4 ± 1 mm e massa média de $0,030 \pm 0,005$ g. As técnicas de caracterização foram empregadas para se compreender a organização estrutural e morfológica do material.

5.1. CARACTERIZAÇÃO DO FOTOCATALISADOR

5.1.1. Análise termogravimétrica (TG-DTG/DTA)

A análise termogravimétrica permitiu avaliar a estabilidade térmica do fotocatalisador (TiO_2/AC) e o processo de perda de massa com o aumento da temperatura, conforme a Figura 11.

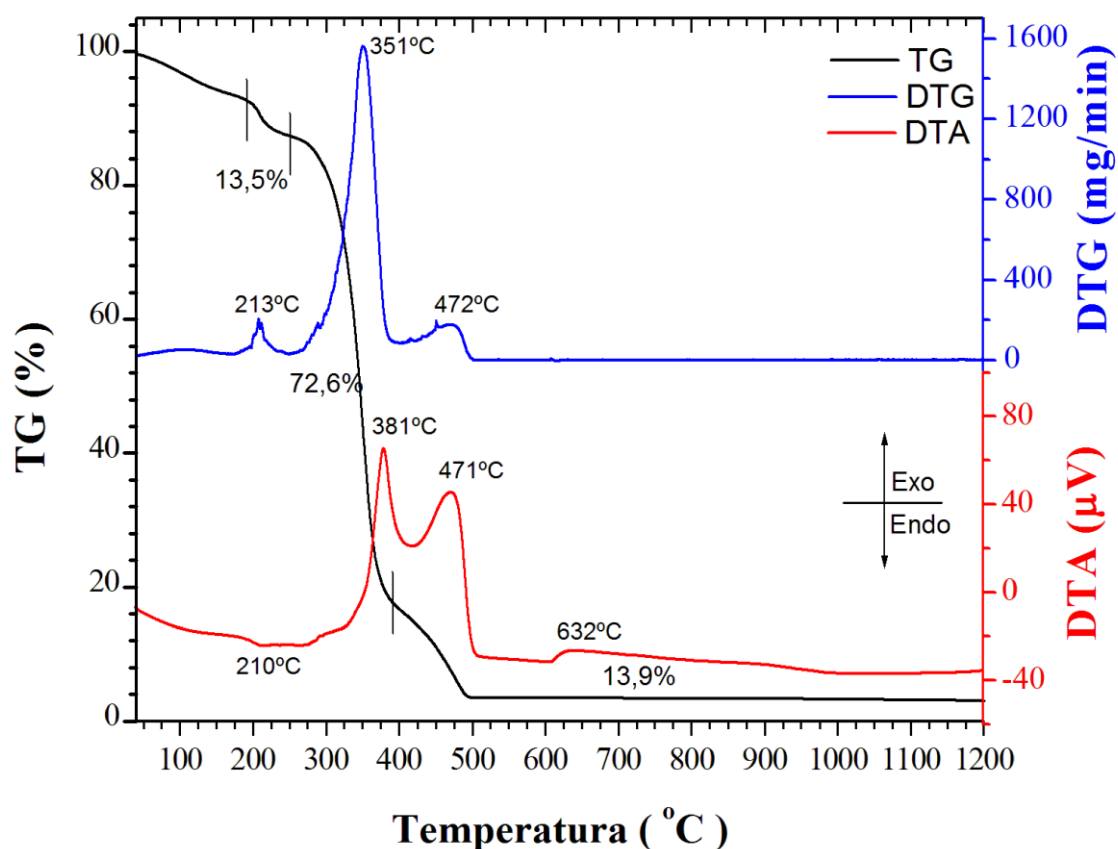


Figura 11. Análises TG/DTA para TiO_2/AC .

Na Figura 11 podem-se verificar quatro eventos de perda de massa. O primeiro é devido a água superficial liberada em até 180 °C, seguida da decomposição do resíduo orgânico, mostrado em DTG 213 °C, ambas correspondem a perda de 13,6% da massa inicial. Entre 251 e 392 °C observa-se a degradação da celulose, ocorre a despolimerização e decomposição pirolítica do AC seguida da formação de um resíduo carbonizado (BARUD *et al.*, 2008). O pico do DTG aparece em 351°C, o terceiro evento corresponde a perda de 72,6% de massa.

Entre 280 e 500 °C ocorre a formação do dióxido de carbono proveniente do TiO₂ mostrado na curva DTG em 472 °C, também devido a mudança da fase amorfa para a fase anatase (ROMAN e WINTER, 2004; BARUD *et al.*, 2007), esse quarto evento corresponde a perda de 13,9 % da massa.

O resultado mostra que a calcinação é suficiente para garantir que o material se encontre livre da matéria orgânica, indicando que é constituído basicamente pela fase anatase, em temperaturas próximas a 680 - 740 °C ocorre a transição para a fase rutila (XIE *et al.*, 2002). Mesmo com aquecimento até 1100°C não há mudanças significativas de massas, comprovando que a temperatura de 472 °C foi eficaz na eliminação de praticamente toda a matéria orgânica e também que o material é termicamente estável até a temperatura final da análise (1100 °C).

5.1.2. Microanálise Quantitativa com mapeamento químico por Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDS)

Empregando a técnica de espectroscopia de energia dispersiva de Raios X é possível investigar a pureza e homogeneidade dos materiais a técnica, também conhecida como microanálise de Raios X, a identificação baseia-se nos Raios X emitidos pela amostra e interação com o feixe eletrônico. Dessa forma, é possível determinar a composição de regiões com até 1 nm de diâmetro. A técnica é não destrutiva e permite determinar quantidades relativas de até 0,3% dos elementos presentes na amostra. No EDS os raios X são distribuídos no espectro por ordem de energia, sendo esta distribuição distinta e específica para cada elemento que compõe a amostra. A partir das informações contidas no espectro é possível obter informações qualitativas e quantitativas acerca da composição da amostra em

escala microscópica (FREITAS, 2008). Os resultados estão apresentados na Figura 12.

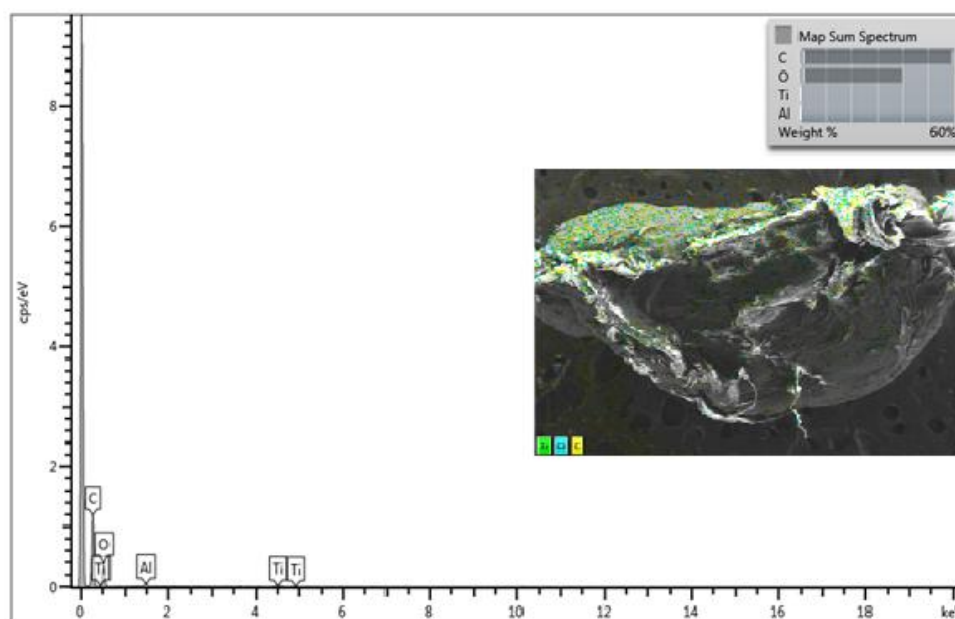


Figura 12. Microanálise Quantitativa do TiO_2/AC .

Com o mapeamento químico foi possível determinar as quantidades dos elementos presentes no material (Tabela 5).

Tabela 5. Composição porcentual do TiO_2/AC obtida via Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDS).

Elemento	C	O	Ti
%	$45,87 \pm 1,11$	$48,12 \pm 1,12$	$6,01 \pm 0,14$

5.1.3. Difratometria de Raios X

Para se identificar as fases do titânio presentes no material realizou-se a difratometria de Raios X para as esferas de TiO_2/AC , conforme mostrado na figura 13.

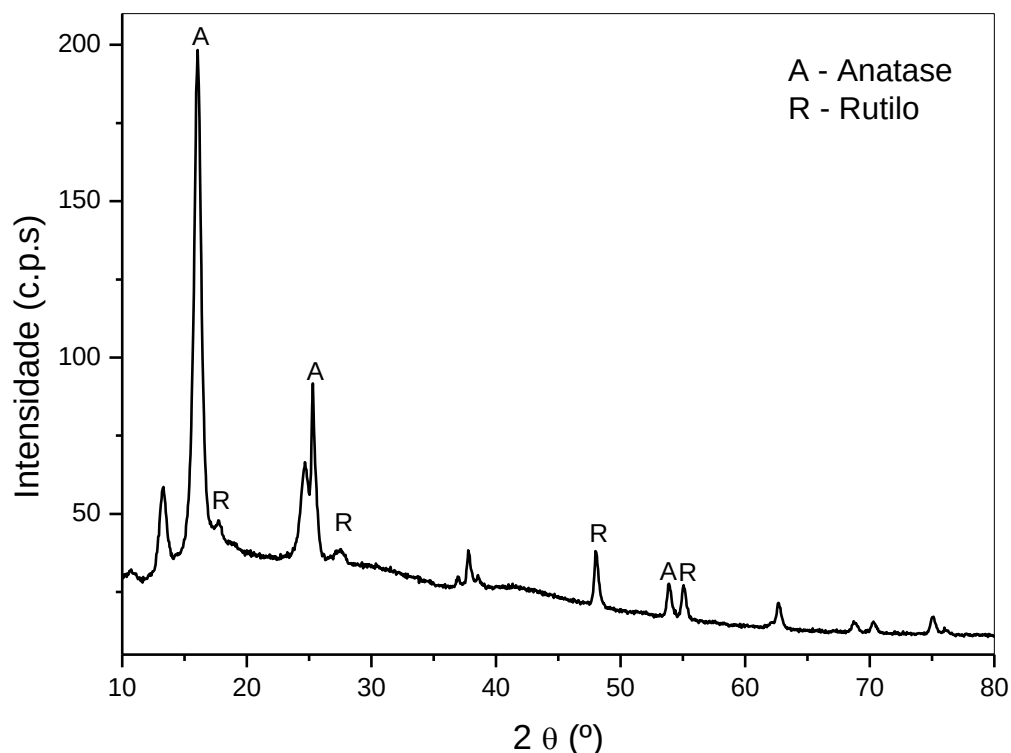


Figura 13. Difratoograma do TiO₂/AC.

Existem três tipos de estruturas no óxido de titânio natural: o tipo rutila, anatase e broquita. A Figura 13 apresenta o difratograma obtido para o material TiO₂/AC, que mostra a presença de duas fases a anatase e a rutila.

Quando o óxido de titânio é submetido à radiação absorve energia que dão origens ao band gap, e os saltos dos elétrons da banda de valência dão origens a vacâncias positivas na banda de valência. Para a forma rutila o valor de band gap é de 3,02 eV e para o tipo anatase o valor é de 3,23 eV (RAJESHWAR, 1995).

Ambas as formas absorvem somente raios ultravioleta, entretanto, a forma rutila pode absorver raios na região do visível próximo e o tipo rutila pode absorver em uma ampla faixa do espectro. Dessa forma, o tipo rutila é o mais adequado para o estudo de fotocatalise, no entanto a forma anatase é a que apresenta maior atividade catalítica (RAJESHWAR, 1995).

Uma das razões disto é a diferença de energia das duas estruturas. Em ambos os tipos, a posição da banda de valência é baixa e a vacância positiva apresenta suficiente poder oxidativo. Entretanto a banda de condução está

posicionada próximo do potencial de redução-oxidação do hidrogênio indicando que ambos os tipos são considerados relativamente fracos em termos de redução (Three Bond Technical News, 2004).

Sabe-se que a banda de condução na anatase é mais próxima do negativo do que o tipo rutila. Entretanto, o poder de redução da anatase é muito mais forte do que da rutila. Devido à diferença da posição na banda de condução a anatase apresenta alta atividade fotocatalítica comparada a rutila (Three Bond Technical News, 2004).

O band gap do óxido de titânio na forma anatase é de 3,2 eV o que corresponde ao comprimento de onda de 388nm. Uma baixa absorção de raios ultravioletas neste comprimento de onda já promove reações. Estes raios ultravioletas são ultravioletas próximos que estão contidos na luz do sol lançados na Terra e na luz de lâmpadas. A fotocatalise com óxido de titânio não requer a incidência de raios de tão alta energia (254nm) o que mostra uma grande vantagem da sua utilização, visto que raios neste comprimento de onda são extremamente perigosos para os seres vivos. Assim, as reações podem ser conduzidas com a incidência de raios na região do ultravioleta próximo que pode ser obtido tanto da luz do sol, quanto da luz de lâmpadas fluorescentes (Three Bond Technical News, 2004).

5.1.4. Espectroscopia no Infravermelho

A figura 14 mostra os espectros obtidos para o acetato de celulose, o dióxido de titânio e o material obtido a partir desses dois reagentes.

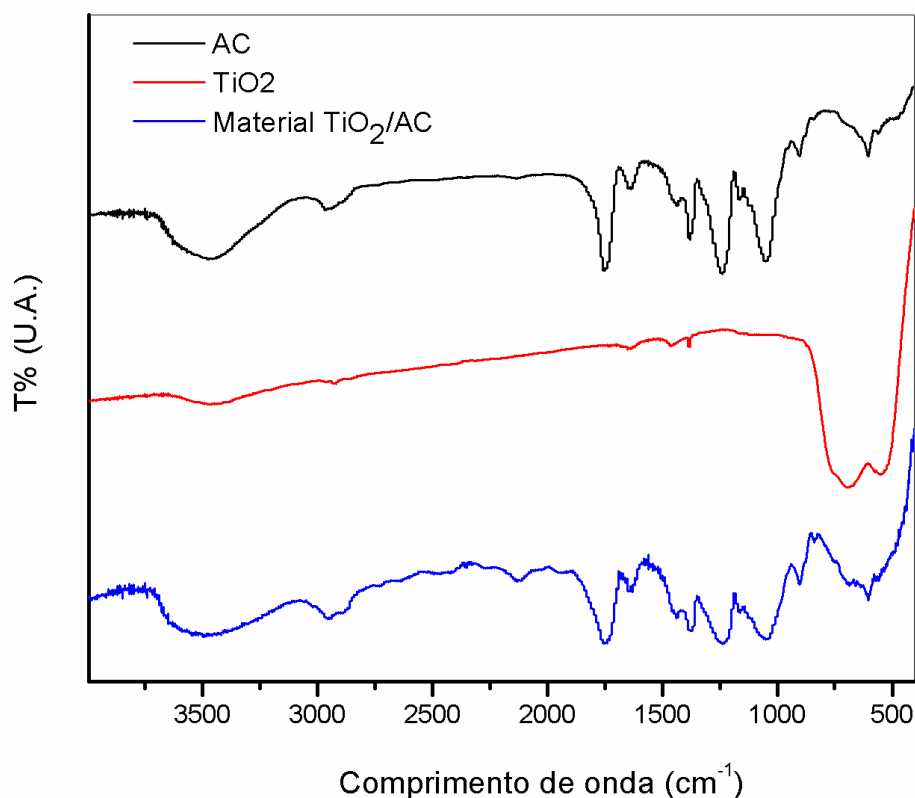


Figura 14. Espectro de Infravermelho obtido para o Acetato de celulose (AC), Dióxido de titânio (TiO_2) e o material TiO_2/AC .

No espectro obtido para o acetato de celulose é possível identificar a banda característica atribuída às vibrações de distensão das ligações OH, que aparecem, normalmente, entre 3600 e 3700 cm^{-1} (BECKER, 1997). No entanto, a banda identificada neste espectro se encontra por volta dos 3470 cm^{-1} , o que indica que estes grupos fazem parte de uma ligação de hidrogênio, encontrando-se desviada para comprimentos de onda menores.

A 2940 cm^{-1} , identificam-se as bandas características das vibrações de distensão das ligações CH alifáticas. O grupo carbonila surge a 1747 cm^{-1} , caracterizado pela banda referente às vibrações de distensão da ligação C=O. A 1370 cm^{-1} revela-se a banda relativa às deformações $-\text{CH}_3$, e a 1238 cm^{-1} a banda característica da distensão assimétrica da ligação C–O–C, típica dos ésteres. Em 1042 cm^{-1} é identificada a vibração de distensão da ligação C–OH, característica dos álcoois primários presentes na estrutura da celulose.

O espectro infravermelho do dióxido de titânio apresenta bandas fortes entre 543 e 689 cm^{-1} , referente ao estiramento das ligações Ti-O. A banda larga entre 3550–3300 cm^{-1} é atribuída aos estiramentos de grupos OH- de água (LI, et al.; 2016).

Observa-se no espectro material TiO_2/AC as bandas características do acetato de celulose e do TiO_2 , a principal diferença é um pequeno deslocamento na banda referente a carbonila para valores de maior frequência (1762 cm^{-1}) em relação ao espectro do AC e o alargamento da banda referente ao estiramento O-H em 3500 cm^{-1} .

Essas observações indicam a interação entre o acetato de celulose e o titânio, pois as interações entre o titânio e o acetato de celulose podem ser consideradas de natureza eletrostática, isto é, interações íon-dipolo. Assim, o oxigênio do grupo acetato rico em elétrons, pode interagir com os cátions eletropositivos do metal. Segundo os autores essa suposição foi evidenciada em estudos do acetato de celulose com os cátions metálicos Be(II) e Mg(II). Nestes casos bandas de adsorção do grupo hidroxila e da carbonila sofreram desvios, indicando o enfraquecimento dessas bandas devido à competição dos cátions metálicos para os elétrons dos quais as bandas são compostas (SHIM, 2001)

5.2. PLANEJAMENTO FATORIAL

A otimização dos parâmetros operacionais foi obtida através de planejamento fatorial, baseando-se em informações da literatura (OHKO *et al.*, 2002; MALYGINA *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2007) foram variados o pH da solução dos fármacos (pH = 4,0 e 8,0) e a quantidade de dióxido de titânio ($m = 0,21$ e $0,84\text{g}$) adicionada ao acetato de celulose, avaliados em dois níveis o que configura um planejamento 2^2 (Tabela 6) acrescido de um ponto central (pH= 6,0 e $m_{\text{TiO}_2} = 0,42$) realizado em triplicata para obtenção do desvio padrão dos ensaios.

Tabela 6. Matriz do planejamento fatorial 2^2 aplicado na degradação dos fármacos Fluoxetina, Amoxicilina e Sinvastatina (100 mg L^{-1}) a 25°C utilizando a fotocatalise heterogênea.

Variável	Nível (-)	Nível (0)	Nível (+)
Ph	4,0	6,0	8,0
Massa de TiO_2 (g)	0,21	0,42	0,84

Experimento	Variáveis		% Degradação		
	pH	Massa	Flu	Amx	Sin
1	4,0	0,21	75	80	56
2	8,0	0,21	41	40	77
3	4,0	0,84	67	72	60
4	8,0	0,84	64	66	80
Ponto Central	6,0	0,42	$66 \pm 2,3$	$69 \pm 2,5$	$65 \pm 3,2$

Segundo os resultados apresentados na Tabela 7, a eficiência do processo de degradação é significativamente influenciada pelo pH, respectivamente, para FLU e AMX (-18,5 e -22,0), o que implica em uma maior capacidade de degradação do processo fotocatalítico mediado por TiO_2 em valores de pH próximos ao menor nível estudado (4). Por outro lado, o efeito da massa de semicondutor é positivo (7,5 e 8,0), o que implica em pequenas melhoras na capacidade de degradação do sistema com o uso de menores massas de TiO_2 . Para SIN observou-se que o valor do pH também influenciou na eficiência do processo fotocatalítico, contrariamente aos outros fármacos estudados, para SIN a maior eficiência foi verificada em pH mais elevado (8,0) o aumento da massa de semicondutor foi positivo apresentando melhora na eficiência.

Tabela 7. Efeitos médios calculados e seus erros padrão para o planejamento fatorial 2^2 obtido na degradação dos fármacos Fluoxetina, Amoxicilina e Sinvastatina (100 mg L^{-1}) pelo processo fotocatalítico.

	FLU	AMX	SIN
Média Global	$62,6 \pm 2,3$	$65,4 \pm 2,5$	$67,6 \pm 3,2$
Efeitos principais			
Ph	$-18,5 \pm 3,0$	$-22,0 \pm 2,5$	$-20,5 \pm 3,1$
massa TiO_2	$7,5 \pm 3,0$	$8,0 \pm 2,5$	$3,5 \pm 3,1$
Efeito de interação			
pH x massa TiO_2	$15,5 \pm 3,0$	$18,0 \pm 2,5$	$-1,0 \pm 3,1$

Para FLU e AMX verificou-se a existência de um efeito de segunda ordem significativo (15,5 e 18,0) o que implica na necessidade de ambas variáveis serem analisadas em conjunto, para SIN não foi observado efeito de segunda ordem. As representações geométricas estão apresentadas na Figura 15.

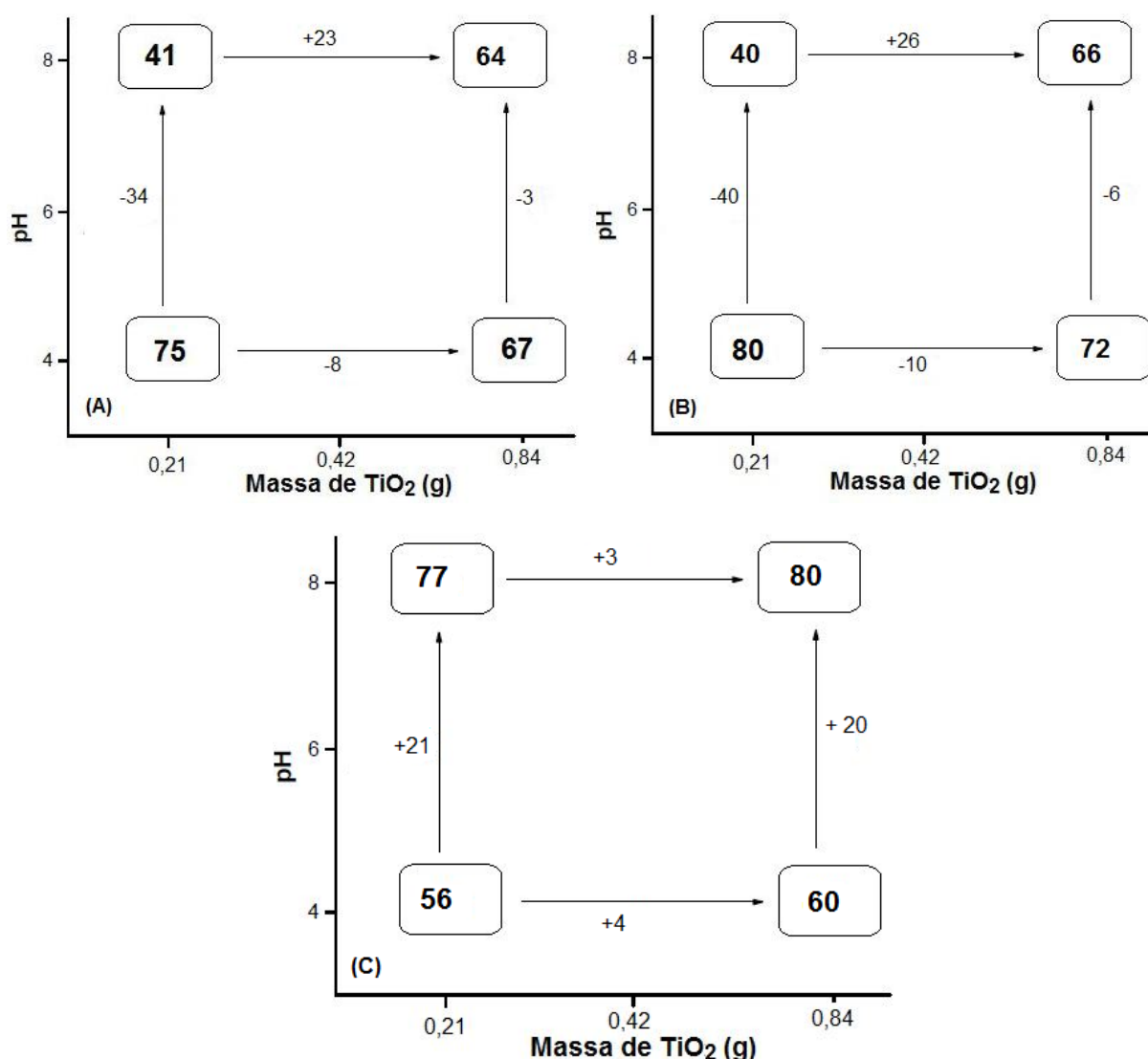


Figura 15. Representação geométrica do planejamento fatorial 2^2 utilizado para investigação do efeito das variáveis pH e massa de TiO_2 na degradação fotocatalítica para (A) Fluoxetina, (B) Amoxicilina e (C) Sinvastatina.

De acordo com esta representação, o efeito do pH não é exatamente o mesmo nos três níveis de massa de fotocatalisador estudados. Isto é, para a menor massa de TiO_2 a mudança de pH 4 para 8 provoca uma diminuição de 34 e 40 pontos percentuais na taxa de degradação, enquanto no maior nível de massa, esta modificação provoca perdas de somente 3 e 6 pontos percentuais para FLU e AMX,

respectivamente. Resultados similares podem ser observados em relação ao efeito da massa, o que inequivocamente confirma a existência de efeitos combinados de relevância, fazendo com que as melhores condições de degradação sejam observadas em valores de pH próximos de 4, independentemente da massa de fotocatalisador.

De acordo com Zhao e colaboradores (2004) a eficiência do processo fotocatalítico é fortemente influenciada pelo pH do meio, pois, além de influenciar no processo de adsorção, também acredita-se que a maior concentração de cargas positivas, verificada em pH ácido, favorece a migração dos elétrons foto-produzidos, reduzindo a recombinação do par elétron lacuna e promovendo a maior eficiência do processo fotoquímico.

Para SIN, Figura 15 (C), na menor massa do fotocatalisador a mudança de pH de 4,0 para 8,0 provoca um aumento de 21 pontos percentuais na taxa de degradação, enquanto que em maior nível de massa essa modificação apresenta aumento de 20 pontos percentuais. O aumento de massa pouco contribui com a eficiência do processo, as melhores condições são atribuídas ao pH 8,0.

A melhor eficiência do processo, em valores mais elevados de pH, também foi verificado por Piecha e colaboradores (2010) que afirmam que a degradação de Sin é mais eficiente em valores de pH maiores, pois a estrutura do fármaco está na forma aberta de hidroxí-ácido, enquanto em pH menores está na forma lactona (ambas as formas estão mostradas na Figura 7).

5.3. PROCESSO FOTOQUÍMICO

A reação de fotocatalise heterogênea foi realizada em reator fotoquímico de bancada, equipado com refrigeração com água (25°C) e agitação magnética. A radiação foi proporcionada por uma lâmpada a vapor de mercúrio de 125 W (sem o bulbo protetor), inserida na solução por meio de um bulbo de quartzo como mostrado na Figura 16.

Foi adicionado, separadamente, no reator fotoquímico 300 mL da solução de cada fármaco em estudo: AMX, FLU (pH 4,0) e SIN (pH 7,0) com concentração de 100 mg L⁻¹ e o material TiO₂/AC (descrito em 4.2). Coletou-se uma amostra antes da reação e outras amostras a cada 15 minutos de reação que foram analisadas por CLAE/DAD e CG/EM.

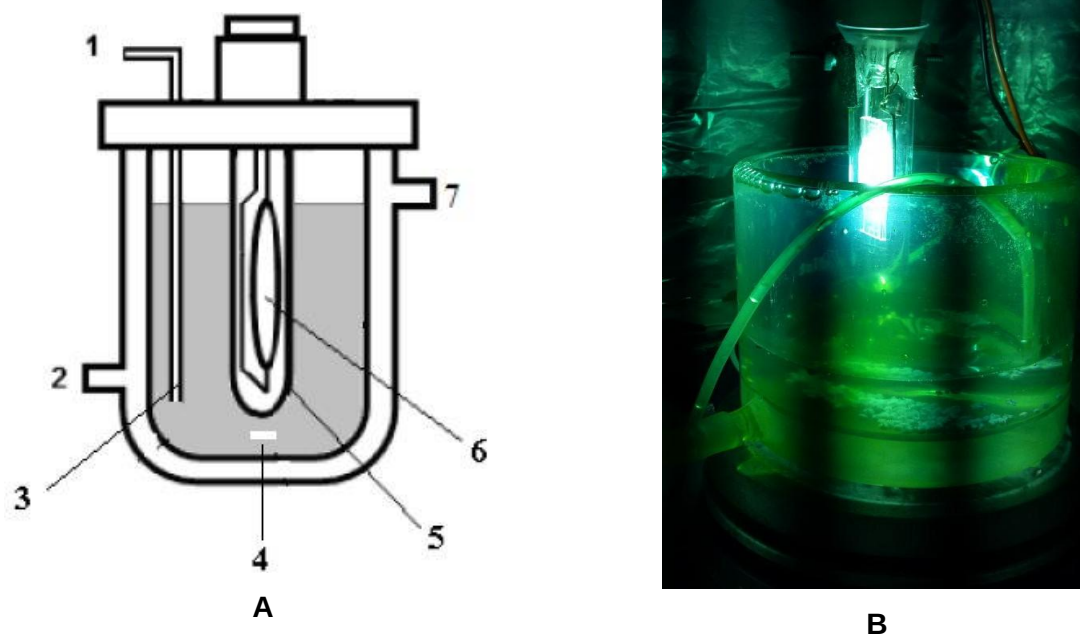


Figura 16. Representação esquemática do reator fotoquímico: 1. Retirada de amostra com seringa adaptada; 2. Saída de água; 3. Coletor de amostra; 4. Agitador magnético; 5. Bulbo de quartzo; 6. Lâmpada a vapor de mercúrio; 7. Entrada de água (A). Fotografia do reator fotoquímico (B).

5.4. ANÁLISE DA DEGRADAÇÃO FOTOCATALÍTICA HETEROGÊNEA POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE-DAD)

As frações provenientes da degradação dos fármacos foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência. Na Figura 17, são mostrados os cromatogramas e espectros UV extraídos para o pico mais intenso em cada cromatograma. As frações foram recolhidas detectadas no comprimento de onda de máxima absorção para cada fármaco, determinados em λ 231,1; 228,8 e 239,4; com tempos de retenção em 4,51; 3,30 e 7,54 minutos para amoxicilina, fluoxetina e sinvastatina, respectivamente.

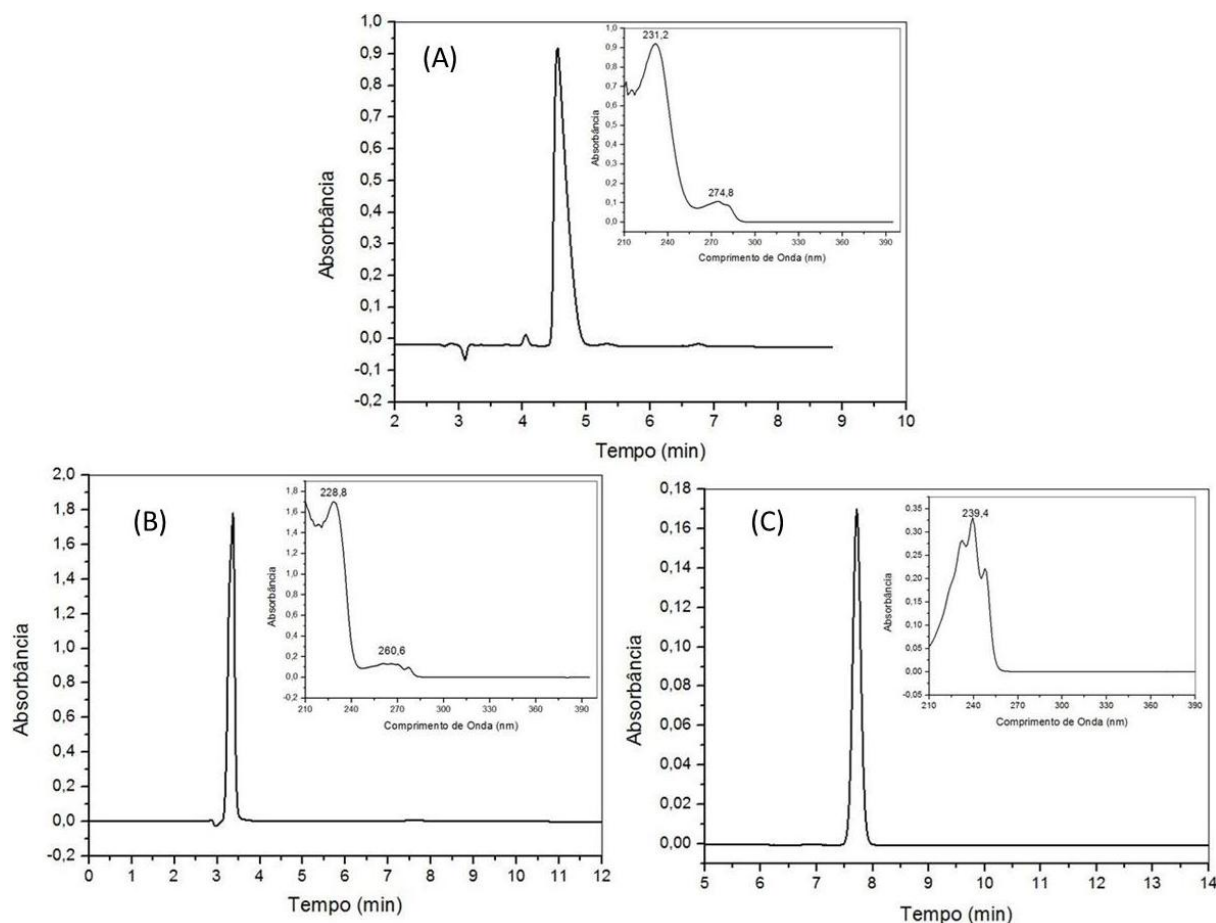
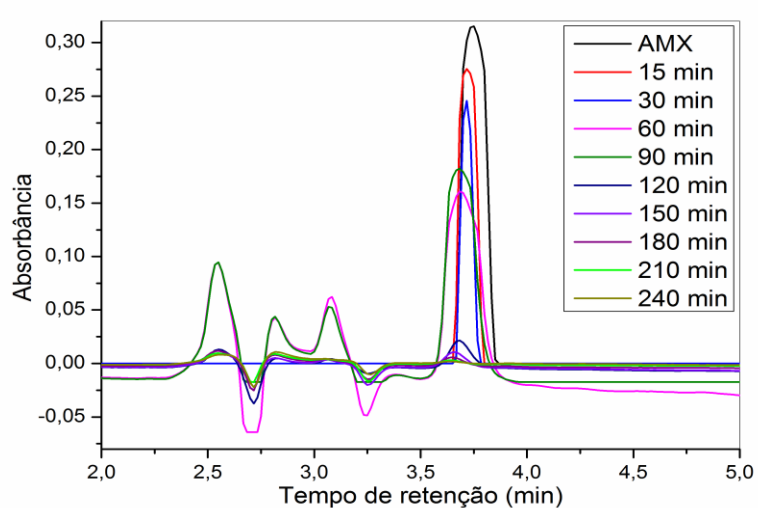


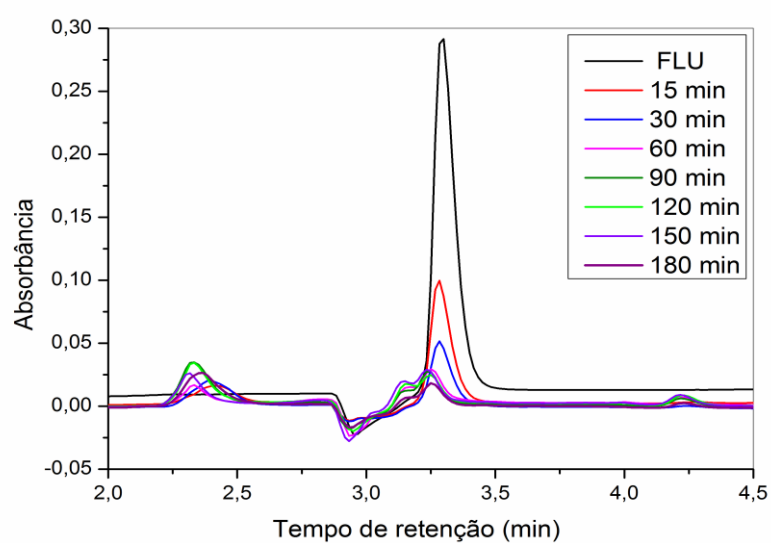
Figura 17. Cromatogramas e espectros UV obtidos para (A) AMX, (B) FLU e (C) SIN.

Nos ensaios de degradação foram preparadas soluções aquosas de AMX, FLU e SIN, adicionadas, separadamente, no reator fotoquímico na presença de dióxido de titânio imobilizado em acetato de celulose (TiO_2/AC) assistido sob radiação ultravioleta (UV).

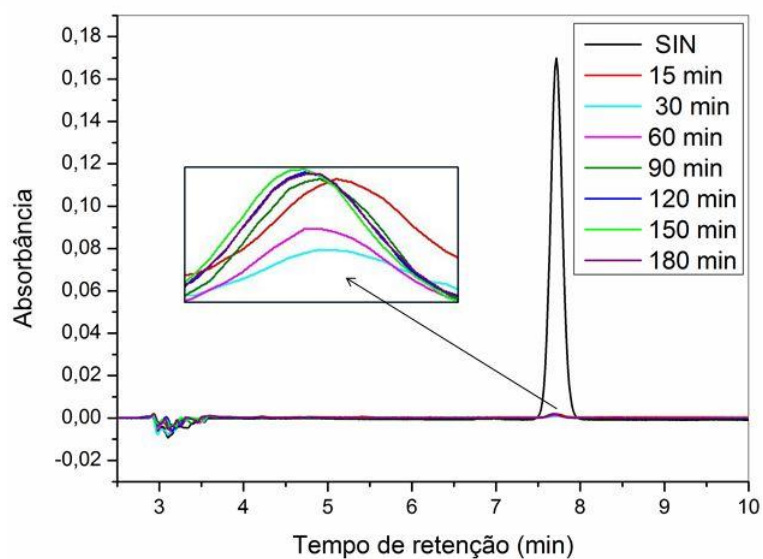
Foram coletadas alíquotas das soluções antes e a cada 15 minutos de reação, utilizando um sistema seringa-cateter acoplado ao reator fotoquímico, e em seguida foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) as quantidades de alíquotas e o tempo total de reação de cada fármaco estão descritos na Figura 18. A degradação de cada um dos fármacos foi calculada mediante a avaliação da área da curva, comparando a área obtida para a concentração inicial de 100 mg L^{-1} com as frações obtidas no decorrer do processo fotocatalítico, no comprimento de onda de máxima absorção para cada um dos fármacos estudados.



(A)



(B)



(C)

Figura 18. Modificação do perfil espectral de (A) AMX, (B) FLU e (C) SIN durante degradação fotocatalítica mediada por TiO_2/AC com radiação UV.

O monitoramento espectral da solução de AMX indica que o processo fotocatalítico assistido por radiação ultravioleta permitiu a sua remoção em 240 minutos de reação. A FLU apresentou maior diminuição da área do espectro em 180 minutos de reação, após esse período a área monitorada não sofreu nenhuma modificação, mantendo-se constante e, para SIN é possível observar significativas mudanças no perfil espectral somente nos primeiros 30 minutos de reação, a partir deste tempo, a reação estabiliza, e não se percebe grandes modificações em até 180 minutos de reação. Ao final do processo foram obtidas as taxas de degradação descritas na Tabela 8.

Tabela 8. Taxas de degradação obtidas para AMX, FLU e SIN determinadas por CLAE/DAD.

Fármaco	Tempo de degradação (min)	Degradação (%)
Amoxicilina	240	99,0
Fluoxetina	180	85,0
Sinvastatina	30	99,1

5.5. AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO POR FOTÓLISE

Os ensaios de fotólise foram conduzidos na presença de luz e ausência do fotocatalisador. As amostras dos fármacos de SIN, FLU e AMX foram coletadas, respectivamente, após 120, 180 e 240 minutos em presença de luz e analisadas no UV/Vis. Para se verificar se ocorreu variação da área, as amostras degradadas foram comparadas as soluções dos fármacos antes do processo. Observando os resultados de absorbância constatou-se que não ocorreram variações significativas apenas na presença de luz, logo os fármacos estudados não apresentam fotossensibilidade, assim pode-se constatar que as degradações verificadas anteriormente são provenientes exclusivamente da relação entre o fotocatalisador TiO_2/AC e a radiação ultravioleta.

Em seu trabalho Piecha e colaboradores (2010) também confirmam que a fotólise direta de estatinas não está envolvida na degradação da sinvastatina e que adsorção nos filmes de TiO_2 era desprezível. O espectro de absorção das estatinas

(compreendido de 200 a 260 nm) não apresenta qualquer sobreposição com a emissão solar ($\lambda > 300$ nm), levando à conclusão de que a via potencial para a remoção destas estatinas de soluções aquosas deve envolver um Processo de Oxidação Avançada.

5.6. ESTUDO DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO CG/EM PARA QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS

5.6.1. Seletividade

De acordo com a ANVISA (2003) para se identificar a substância em estudo é necessário demonstrar a capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas similares, isto deve ser confirmado pela obtenção de resultados positivos em amostras contendo o fármaco, comparativamente com resultados negativos obtidos com amostras que não contém o fármaco, mas compostos estruturalmente semelhantes. Para métodos cromatográficos, devem-se tomar cuidados necessários para garantir a pureza dos picos cromatográficos. Ao selecionar um pico (obtido, por exemplo, do detector de arranjo de fotodiodos ou espectrometria de massas) é interessante demonstrar que o pico cromatográfico corresponde ao componente de interesse.

A seletividade do método foi avaliada de duas formas: 1^a) observando os mesmos tempos de retenção das amostras; 2^a) pelo perfil similar dos cromatogramas CG/EM obtidos para a solução padrão e frações degradadas de SIN e FLU.

Para FLU os cromatogramas para o padrão e das amostras mostram tempos de retenção obtidos em 8,2 minutos (Figura 19) e, em 9,3 minutos para SIN (Figura 20). A comparação dos tempos de retenção dos padrões no cromatograma das amostras mostrou que estes apresentam tempos de retenção muito similares aos observados nos cromatogramas dos padrões.

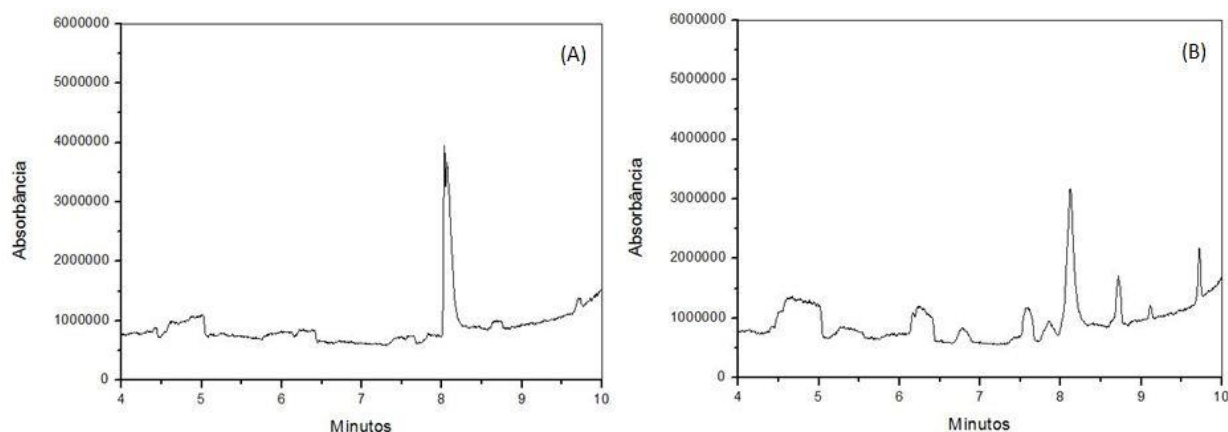


Figura 19. Cromatogramas obtidos para FLU (A) solução padrão 40 ppm (B) Solução degradada após 15 minutos de reação.

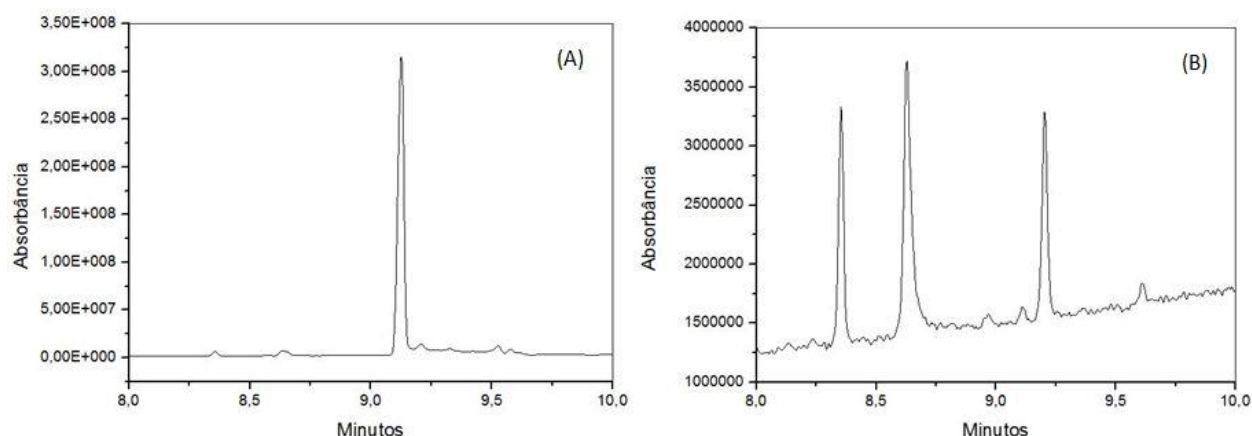


Figura 20. Cromatogramas obtidos para SIN (A) solução padrão 40 ppm (B) Solução degradada após 10 minutos de reação.

Também para verificar a seletividade foram analisados os perfis dos espectros CG/EM dos padrões na solução padrão e dos picos atribuídos aos mesmos na amostra de FLU (Figura 21) e SIN (Figura 22). Para identificar as amostras de SIN e FLU pelos seus íons principais foi selecionado no equipamento o modo SIM. Para o fármaco SIN os íons estão em 159 (m/z) e 198 (m/z) no tempo de retenção de 8,60 minutos, os íons marcadores para FLU estão presentes em 104 e 309 (m/z) no tempo de 9,30 minutos.

A similaridade dos perfis dos espectros dos padrões na solução padrão e na amostra indica que os picos cromatográficos apresentam resolução adequada.

Com a obtenção destes resultados foi considerado que o método cromatográfico proposto apresenta seletividade adequada para a análise das amostras degradadas dos fármacos.

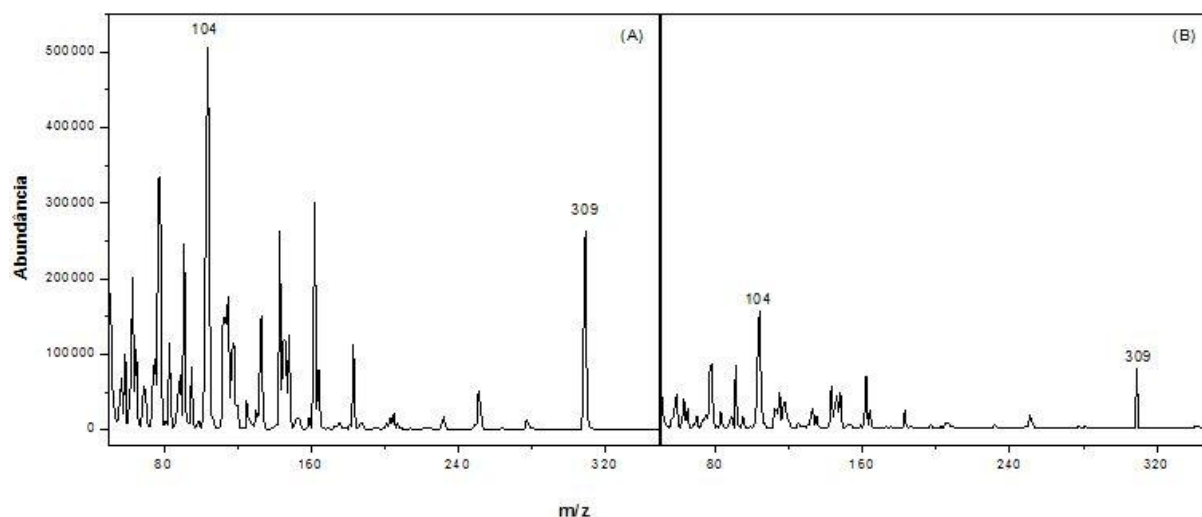


Figura 21. Espectros obtidos para FLU (A) solução padrão 40 ppm (B) Solução degradada após 15 minutos de reação.

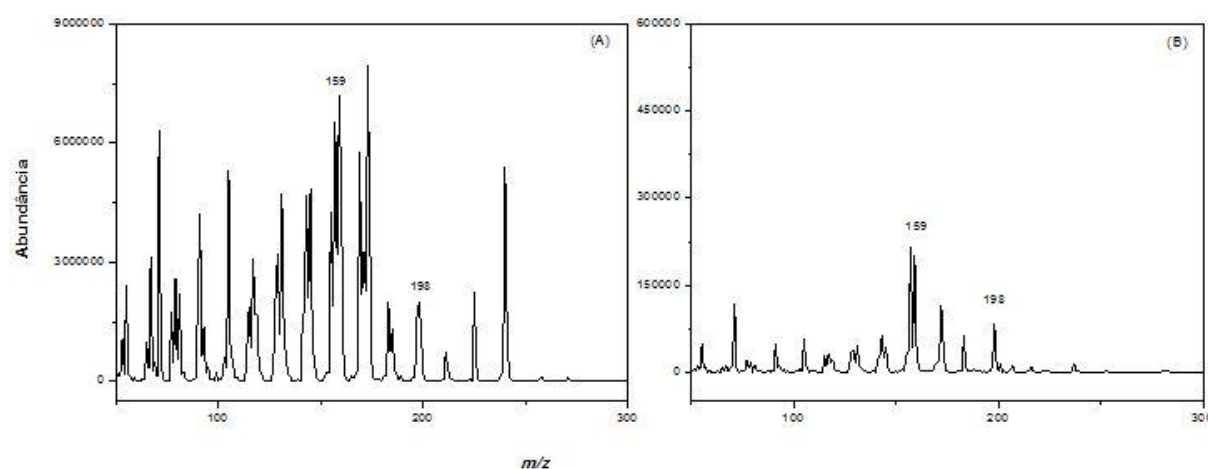


Figura 22. Espectros obtidos para SIN (A) solução padrão 40 ppm (B) Solução degradada após 10 minutos de reação.

5.6.2. Linearidade

A linearidade do método corresponde à habilidade do mesmo em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame dentro de uma determinada variação. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes (ANVISA, 2003; ICH, 1995).

Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y,

coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. Se não houver relação linear, realizar transformação matemática. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,99 (ANVISA, 2003).

O estudo de validação foi conduzido no modo SIM de operação do equipamento, dessa forma foi possível identificar os fármacos pelos seus íons principais. A linearidade tem a finalidade de avaliar a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância que se está trabalhando, dentro de uma determinada faixa de concentração (RIBANI *et al.*, 2004, ANVISA, 2003). A faixa de concentração utilizada para esse estudo foi de 10 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (FLU) e de 20 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (SIN). Por meio da curva analítica obtida a partir das soluções de padrões foi avaliada a linearidade do método de CG/EM.

Os dados do experimento de calibração de área dos picos cromatográficos e sua concentração foram ajustados por meio da aplicação da técnica de regressão linear no nível de 99% de confiança ($p < 0,01$). Foi realizado um teste de falta de ajuste (F_{faj}) para verificar se o modelo linear era apropriado (Tabela 9).

Tabela 9. Dados da análise de regressão linear no nível de 99% de confiança para o estudo de linearidade.

Linearidade FLU					
Regressão		Falta de Ajuste		R	R ²
F _{calculado}	Valor de p	F _{faj}	Valor de p		
14269,37	0,000	2,19	0,075	0,998	99,8%
F _{crítico} (0,01; 1, 27) 7,56		F _{crítico} (0,01; 9,18) 3,46			
Equação:		Área = - 2615161 + 892018 x Concentração			
Linearidade SIN					
Regressão		Falta de ajuste		R	R ²
F _{calculado}	Valor de p	F _{faj}	Valor de p		
2237,85	0,000	2,25	0,148	0,994	99,4%
F _{crítico} (0,01; 1, 13) 9,33		F _{crítico} (0,01; 5, 8) 6,63			
Equação:		Área: -1207169 + 60868 x Concentração			

A linearidade das curvas foi avaliada pela regressão linear apresentado na Tabela 9, indicando que o modelo linear se ajusta aos dados experimentais. Os resultados mostram que o método apresentou linearidade na faixa de trabalho, com valor de R^2 para FLU, SIN igual a 99,8% e 99,4% respectivamente, sugerindo uma relação linear entre os dados cromatográficos e a concentração do analito (ANVISA, 2003; INMETRO, 2011).

As significâncias das regressões foram consideradas satisfatórias, pois o $F_{\text{calculado}}$ é maior que o $F_{\text{crítico}}$, para FLU ($F_{\text{calculado}} = 14269,37 > F_{\text{crítico}} = 7,56$), e para SIN ($F_{\text{calculado}} = 2237,85 > F_{\text{crítico}} = 9,33$). Este fato também é ressaltado pelo valor do $F_{\text{observado}}$ altamente significativo ($p = 0,000$).

O teste não sugere falta de ajuste no nível de 99% de confiança ($p > 0,01$), pois o F_{faj} é menor que o $F_{\text{crítico}}$, para FLU ($F_{\text{faj}} = 2,19 < F_{\text{crítico}} = 3,46$), e para SIN ($F_{\text{faj}} = 2,25 < F_{\text{crítico}} = 6,63$). Os resíduos estão distribuídos de forma homogênea, logo não influenciaram a variação observada entre os resultados. Assim, pode-se concluir que as curvas de calibração por padrão externo para os analitos foram lineares na faixa de concentrações estudada, não houve evidência de falta de ajuste, logo os modelos de regressão linear foram adequados para a determinação de FLU e SIN.

5.6.3. Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

Os valores de LD e LQ foram calculados para avaliar se o método proposto permitiria a determinação de compostos em baixas concentrações. O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. O limite de quantificação (LQ) é a concentração mínima do analito que o equipamento pode quantificar com precisão e exatidão, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI *et al.*, 2004, ANVISA, 2003).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados pelas equações 13 e 14.

Os limites de detecção foram $2,81 \mu\text{g mL}^{-1}$ (FLU) e $3,15 \mu\text{g mL}^{-1}$ (SIN). Os limites de quantificação foram $9,38 \mu\text{g mL}^{-1}$ (FLU), $10,49 \mu\text{g mL}^{-1}$ (SIN) (Tabela 10).

Os valores indicam que o método CG/EM permite a detecção e quantificação de compostos presentes em baixas concentrações em amostras de fármacos.

Tabela 10. Limites de Detecção e Quantificação.

	Curva FLU	Curva SIN
LD	2,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$	3,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$
LQ	9,38 $\mu\text{g mL}^{-1}$	10,49 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Fregonezi-Nery e colaboradores (2008) empregaram dois métodos para a análise de FLU em cápsulas, para o UV-Vis o LD e LQ foram de 4,67 e 14,16 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, e para o CLAE o LD foi 3,29 e o LQ 9,96 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Como os valores obtidos são menores que os descritos pelos autores pode-se concluir que o LD e LQ são adequados para o método.

5.6.4. Precisão

A precisão do método foi avaliada nos níveis de repetitividade e de precisão intermediária (PI) (Tabela 11) durante um dia (manhã e tarde) para a repetitividade e três dias consecutivos para precisão intermediária. As estimativas de precisão foram obtidas pelos desvios padrões relativas (RSD% ou CV%) das áreas dos picos cromatográficos a partir de análises em triplicata das amostras após 15 minutos de degradação para FLU e 10 minutos para SIN, calculados pela equação 15.

Tabela 11. Parâmetros estatísticos de repetitividade e precisão intermediária obtidos para FLU e SIN.

	CV (%)	
Amostra	Repetitividade	PI
FLU	12,72	4,53
SIN	18,62	12,53

Segundo a Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas (GARP, 1999; THIER e ZEUMER, 1992), um limite aceitável para precisão da análise de micropoluentes é de 20%, portanto os três fármacos estudados apresentam precisão adequada.

5.6.5. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio da realização dos testes de recuperação por adição de padrão nas amostras degradadas de FLU em 180 minutos de reação e SIN em 30 minutos, obtendo as concentrações finais de 30, 40 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, calculado pela equação 16 (Tabela 12).

Tabela 12. Parâmetros estatísticos da exatidão.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Exatidão (%)	
	FLU	SIN
30	101,23 $\pm$ 11,09	98,0 $\pm$ 20,0
40	84,65 $\pm$ 13,95	110,51 $\pm$ 17,34
50	78,28 $\pm$ 5,25	109,28 $\pm$ 16,86

Para a determinação de micropoluentes GARP (1999), Thier e Zeumer (1992) consideram adequadas recuperações entre 70 e 120% e desvio padrão da ordem de 20%. A exatidão de FLU está dentro dos intervalos de 70 a 120%, no entanto SIN mostrou-se fora dos intervalos determinados nas concentrações analisadas.

As divergências dos resultados obtidos com os recomendados são atribuídas ao meio reacional único para cada reação, pois as amostras analisadas são provenientes de reações químicas e mesmo com o controle da temperatura, tempo de reação, massa do fotocatalisador e concentração da solução, podem ocorrer diferenças entre uma reação e outra ocasionando resultados diferentes entre as análises, ou seja, as reações apresentam maior grau de complexidade quando comparadas, por exemplo, a identificação de analito em amostras.

5.7. APLICAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO PARA QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os resultados para a quantificação dos fármacos em estudo estão descritos nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 13. Quantificação da FLU por CG/EM.

Tempo de reação (min)	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
0	$100 \pm 1,20$
15	$35,0 \pm 3,94$
30	$14,9 \pm 3,34$
45	< LQ
60	< LQ
75	< LQ

Tabela 14. Quantificação da SIN por CG/EM.

Tempo de reação (min)	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
0	$103 \pm 5,20$
10	$23,7 \pm 11,5$
20	< LQ
30	< LQ

Para a FLU a menor concentração obtida foi no tempo de 30 minutos com $14,9 \mu\text{g mL}^{-1} \pm 3,34$ e, para SIN a menor concentração foi detectada no tempo de 10 minutos com $23,7 \mu\text{g mL}^{-1} \pm 11,5$. Embora as reações fossem conduzidas em tempos maiores de reação não foi possível quantificar valores menores, pois estavam abaixo do limite de quantificação do equipamento.

5.8. POSSÍVEIS PRODUTOS GERADOS NA DEGRADAÇÃO DOS FÁRMACOS

Conforme já citado, existem na literatura diversos trabalhos sobre a degradação de fármacos envolvendo POAs empregando variados tipos de processos e materiais. No entanto são escassos os trabalhos em que são investigados os sub-produtos gerados nas reações e a avaliação de sua toxicidade

para o meio. Sabe-se que nem sempre os POAs conduzem a completa mineralização das amostras em CO₂ e H₂O, havendo a formação de espécies intermediárias na reação. Para verificar se o processo empregado promoveu a degradação dos contaminantes para uma forma não prejudicial ao meio é necessário avaliar a toxicidade dos intermediários formados, pois se o processo utilizado gerar produtos mais tóxicos que o produto inicial o tratamento empregado não é indicado (KIDAK e DOGAN, 2018).

Com o objetivo de verificar as espécies geradas na degradação e avaliar a eficiência do processo empregado, nessa etapa do trabalho foi feita a identificação dos produtos formados. Para isso foram analisadas as frações provenientes das reações de degradação dos fármacos FLU e SIN no CG/EM (modo scan) e comparadas com resultados obtidos na literatura. Devido a sua baixa volatilidade não foi possível a determinação dos produtos de degradação gerados para AMX, no entanto será apresentado uma revisão na literatura sobre os seus possíveis produtos de degradação .

5.8.1. Proposta de degradação para a Sinvastatina

Para a identificação dos produtos provenientes da degradação de SIN (Figura 23) foi necessário derivatizar as amostras, uma vez que estes fármacos são polares, caso não fosse feita a derivatização implicaria em uma pior resolução na análise por cromatografia a gás. Segundo Blau e Halket (1993) essa reação consiste na substituição de hidrogênios ativos na molécula por grupamentos apolares, com o objetivo de reduzir a polaridade e aumentar a volatilidade desses compostos, tornando viável o uso da CG/EM.

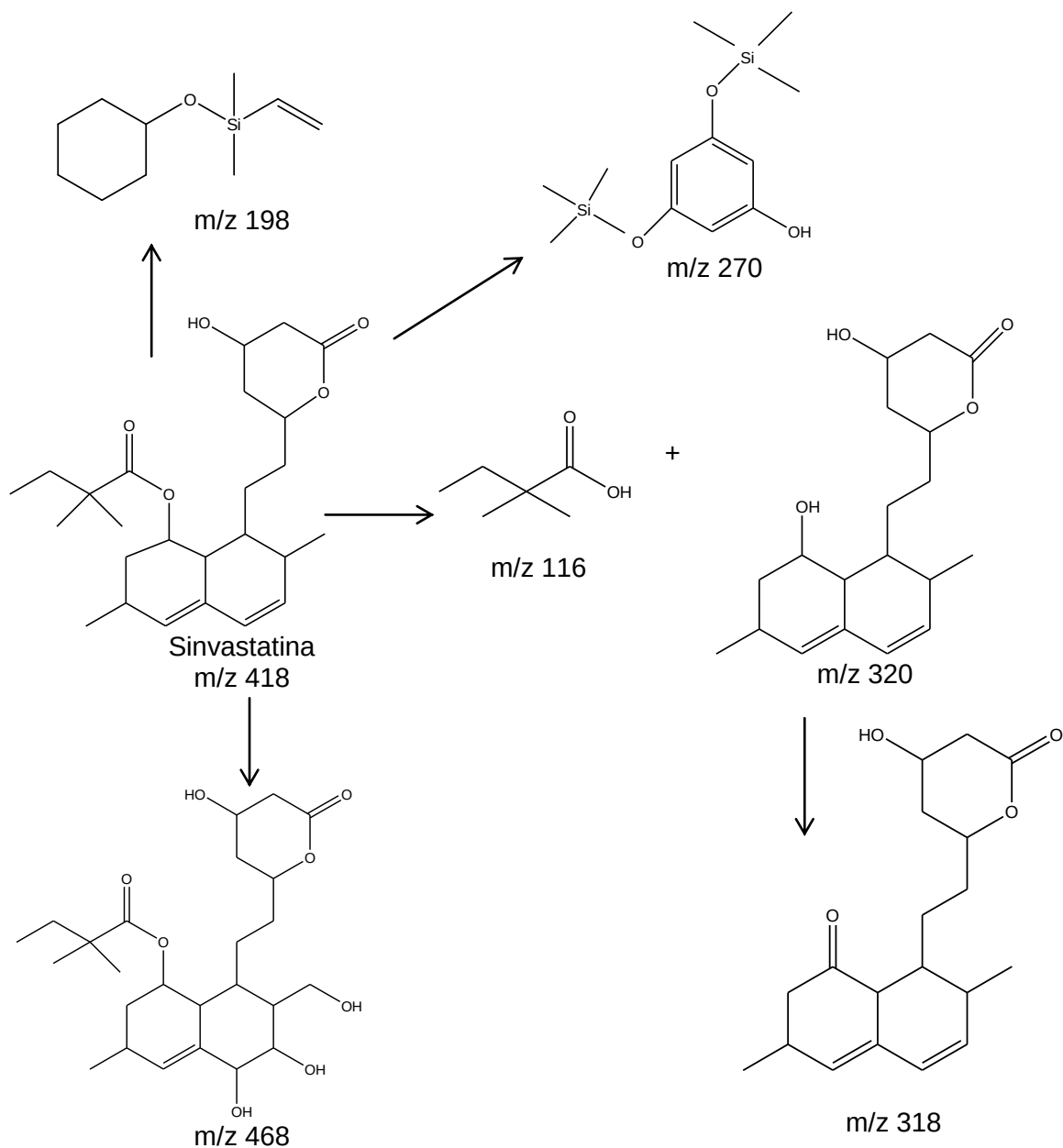


Figura 23. Proposta de formação de produtos resultantes da degradação da sinvastatina.

A estrutura correspondente a SIN foi detectada no tempo de retenção de 18,7 min sem derivatizar e 21,5 min para a forma derivatizada. O pH 7,0 da solução favorece a presença da sinvastatina na forma lactona identificada por m/z 418.

Após 15 minutos de reação foi obtido o m/z 198 no tempo de retenção de 18,6 min. Em 30 minutos de reação nos tempos de retenção de 6,78 e 6,80 minutos foram obtidos os produtos m/z 116 e 320, anteriormente verificado por Razavi e colaboradores (2011). Os produtos resultam do ataque do radical OH na ligação éster do composto original resultando em clivagem originando o ácido e álcool (116 e 320, respectivamente) e, na sequência, a oxidação do álcool a uma cetona

2005 e ZHAO *et al.*, 2017). A estrutura não pode ser proposta neste trabalho, pois não foi observada no espectro de massa.

Na amostra obtida após 75 minutos de reação foi observado um pico, em 9,3 minutos de retenção, correspondente ao íon molecular m/z 325 e íons fragmentados verificados em m/z 181, m/z 163 e m/z 149.

No tempo de retenção de 11,6 minutos verificou-se um produto de oxidação, cujo espectro de massa apresenta um pico base m/z 237, verificado também por Zhao e colaboradores (2017) que estudaram a ozonização do antidepressivo. Os autores atribuem o surgimento do produto m/z 237 a desalquilação e hidroxilação no grupo amina e clivagem do anel benzênico pelo mecanismo de Criegee (Oliveira e Wosch, 2012).

Para as amostras analisadas nos tempos de reação de 15 e 30 minutos observou-se pico intenso para a fluoxetina, em 75 minutos de reação a intensidade ficou menor e a partir de 90 minutos praticamente não se observa.

5.8.3 Proposta para a degradação da Amoxicilina

Devido a alta volatilidade do fármaco estudado não foi possível com o equipamento disponível verificar os produtos de degradação obtidos para a amoxicilina, observando o trabalho realizado por Kidak e Dogan (2017) pode-se compreender quais seriam os possíveis produtos obtidos.

Kidak e Dogan relatam que a reação de degradação de AMX foi realizada por meio de irradiação, ozonização (O_3) e a combinação das duas formas e que estudo identificou maiores taxas de degradação para as formas combinadas. As soluções tratadas de amoxicilina foram analisadas por GC-EM em diferentes intervalos de tempo. Os resultados revelaram que a formação de compostos intermediários ocorreu principalmente por hidroxilação, desmetilação, descarboxilação e abertura do anel β -lactâmico e tiazol da amoxicilina (Figura 25).

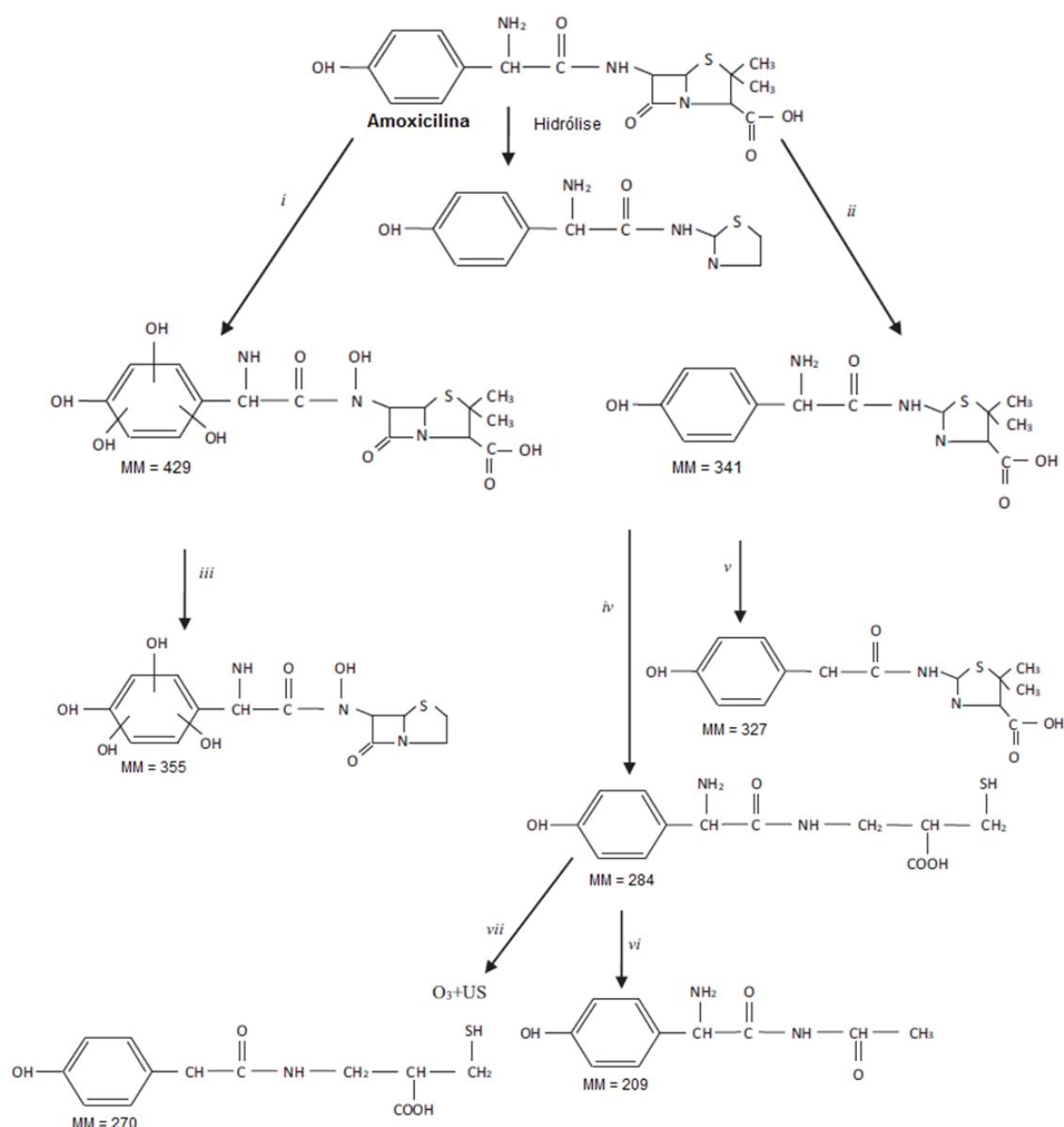


Figura 25. Proposta de via de formação de compostos intermediários após irradiação (US), ozonização e US/O₃ (pH 10, frequência US = 575 kHz, potência US = 75W, [O₃ (aq)] = 0,15 mg L⁻¹).

FONTE: KIDAK e DOGAN, 2018.

A hidroxilação (adição de grupo -OH no composto) ocorreu em (i), formando o m/z 429 e, simultaneamente, a abertura do anel de β-lactâmico em (ii) gerando m/z 341. Os compostos intermediários de m/z 429 e m/z 341 foram previamente identificados por outro estudo em que a amoxicilina foi submetida a foto-tratamento de Fenton (BENITEZ *et al.*, 2009). O produto de hidrólise formado após a abertura do anel β-lactâmico é considerado como uma parte instável da molécula (KLAUSON, *et al.*, 2010; DIONYSIOU *et al.*, 2012; TROVÓ *et al.*, 2011) originando a

desmetilação (perda do grupo $-\text{CH}_3$) e descarboxilação (perda de $-\text{COOH}$) verificado em (iii) pela formação do composto m/z 355.

A abertura do anel tiazol (iv) e a desaminação (perda do grupo $-\text{NH}_2$) (v) resultaram na formação das moléculas m/z 284 e m/z 327, respectivamente. Estes dois intermediários foram previamente monitorados por outro estudo que investigou o a degradação da amoxicilina utilizando o processo Fenton (LI *et al.*, 2016). Finalmente, a descarboxilação, a perda do átomo de S e o rearranjo da molécula resultaram na formação de m/z 209 (vi). Um composto intermediário adicional (m/z 270) (vii) foi subsequentemente formado após a desaminação da molécula (m/z 284).

5.9. DETERMINAÇÃO DAS TAXAS DE MINERALIZAÇÃO DAS AMOSTRAS POR COT

A cinética de degradação fotocatalítica dos fármacos foi verificada empregando a cinética de pseudo-primeira ordem representado pela Eq. (5). A constante de velocidade (k) foi determinada a partir das inclinações das retas representadas na Figura 26 e ambas possuem $R^2 > 0,97$ ($p < 0,05$).

Analisou-se o teor de COT para as soluções dos fármacos puros de AMX e FLU obtidas após 60, 120 e 180 minutos de reação. A constante de degradação fotocatalítica seguiu a constante de velocidade cinética de pseudo-primeira ordem para AMX e FLU com valores de k , respectivamente, iguais a 0,00556 e 0,00315 min^{-1} .

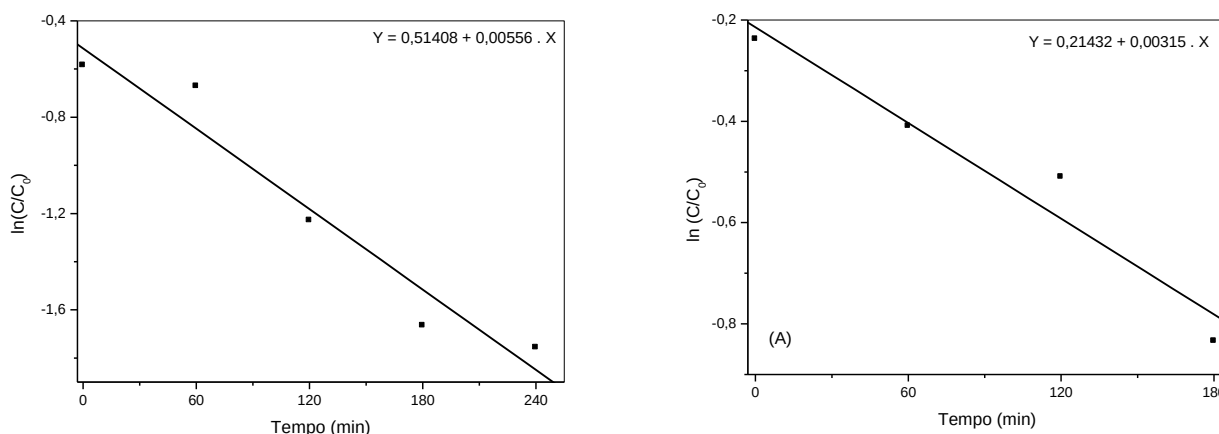


Figura 26. Determinação de COT para amostras degradadas de (A) Amoxicilina e (B) Fluoxetina, $C_0 = 100 \text{ mg L}^{-1}$.

Após 180 minutos de reação foram determinadas as taxas de mineralização para a AMX, FLU de 70, 43%. A determinação da mineralização para SIN foi realizada para as amostras coletadas nos tempos de reação de 0, 15, 30, 60 e 120 minutos. Verificou-se que houve aumento do teor de COT nos períodos de 15 a 60 minutos, seguida de redução do teor de COT em 120 minutos de reação, não sendo possível determinar a ordem de reação. A mineralização obtida foi de 15%, embora a degradação observada por CLAE foi de 99,1%.

Os resultados alcançados para AMX e FLU foram satisfatórios, pois as mineralizações são iguais ou superiores a outros trabalhos descritos na literatura. Para a fotodegradação de AMX Benacherine e colaboradores (2017) utilizaram Goethita ($\alpha\text{-FeOOH}$) sob radiação UV, a taxa de mineralização foi de 42% após 90 h de irradiação. Kidak e Dogan (2018) estudaram o tratamento da amoxicilina por irradiação ultrassônica de média e alta frequência e/ou ozonização, obtendo mineralização de 10%.

Galvis e colaboradores (2015) realizaram o tratamento da solução contendo FLU ($2,9\text{-}162,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) e após 360 min de irradiação ultra-sônica, obtiveram 15% de mineralização. Enquanto Zhao e colaboradores (2017) estudaram a ozonização da FLU e seu principal produto metabólito norfluoxetina (NFlu), consideraram a remoção de COT como limitada, pois após 60 minutos de reação houve aumento no valor atribuído a formação de ácidos carboxílicos e aldeídos.

Comparando os resultados obtidos para CLAE e COT percebe-se diferenças nas porcentagens apresentadas para degradação/mineralização, enquanto CLAE

mostra degradações de 85 a 99,1%, COT apresenta mineralizações de 15 a 70%. Esta diferença pode ser explicada pelo fato de CLAE (UV/Vis) determinar a degradação do fármaco a partir do monitoramento do comprimento de onda de máxima absorção específico para cada fármaco, assim, caso ocorra a formação de novos produtos estes não serão detectados pelo equipamento, pois podem possuir comprimentos de onda diferentes do selecionado. Contudo as análises de COT baseiam-se na determinação de teores de carbono presente nas amostras, assim reduções dos teores de COT indicam que houve a mineralização da amostra, convertendo-as em dióxido de carbono, água e sais inorgânicos (ANDREOZZI, *et al.*, 1999) e também a formação de subprodutos de reação.

Os resultados obtidos por COT corroboram com os encontrados por CG/EM. Análises de CG/EM confirmam que houve a formação de subprodutos originados a partir da degradação dos fármacos, mostrando assim, que as amostras não foram completamente mineralizadas.

5.10. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS FÁRMACOS E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

A crescente contaminação global da água com contaminantes farmacêuticos tem se revelado preocupação crescente na atualidade em função da considerável ecotoxicidade destes compostos e associados à saúde humana (XIONG *et al.*, 2018). Desta forma, tem se buscado alternativas de degradação adequada desses poluentes, assim como processos de biorremediação.

Os ensaios ecotoxicológicos realizados tiveram por objetivo avaliar se os produtos da degradação fotocatalítica dos medicamentos que fluoxetina, amoxicilina e sinvastatina não apresentam ecotoxicidade e avaliar a capacidade de bio-concentração dos fármacos ou de seus produtos de degradação. Estes estudos podem ainda, revelar a possibilidade de fitorremediação dos fármacos, ferramenta importante no processo de tratamento desses contaminantes (AMY-SAGERS *et al.*, 2017).

Os efeitos de toxicidade dos fármacos (AMX, FLU e SIN) em *L. aequinoctialis*, foram avaliados por meio da análise de crescimento (tempo de

duplicação), do teor de pigmentos (clorofila *a* e *b*) e da atividade das enzimas antioxidantes: catalase, peroxidase e ascorbato peroxidase.

Os ensaios ecotoxicológicos foram realizados utilizando o controle negativo: realizado somente na presença de água destilada (concentração igual a zero), o controle positivo: contendo a solução do fármaco antes de tratamento fotocatalítico (100 mg L^{-1}) e as frações provenientes da degradação da AMX, FLU e SIN com TiO_2/AC diluídas em cinco concentrações diferentes conforme mostrado nas Figuras 27 a 31.

5.10.1. Tempo de Duplicação de *L. aequinoctialis*

Os resultados da análise de crescimento realizada por meio do tempo de duplicação (TD) de *L. aequinoctialis*, submetidas aos produtos da degradação fotocatalítica da FLU, VEF, AMX, e SIN são apresentados na Figura 27.

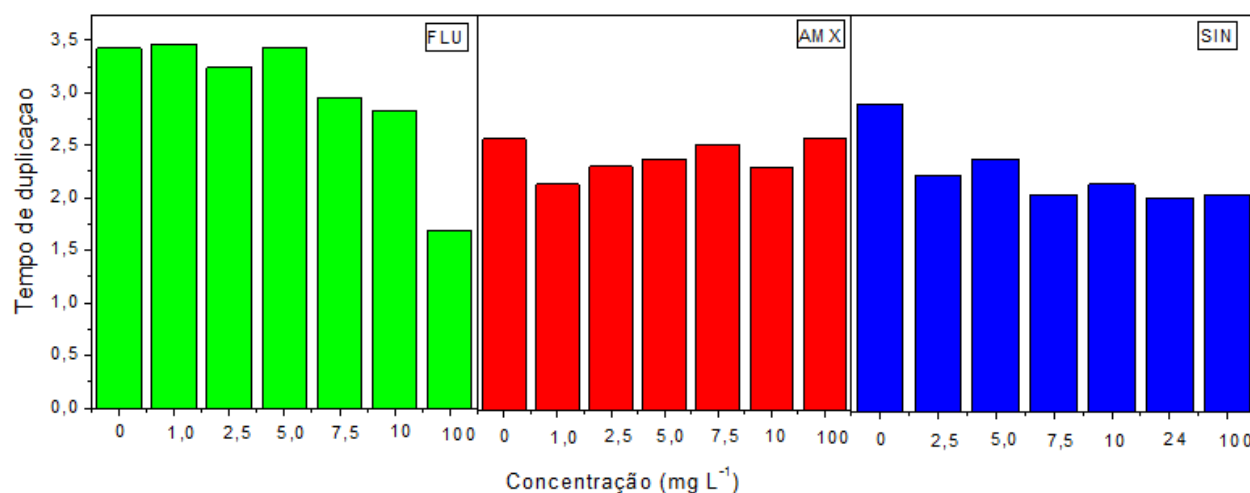


Figura 27. Tempo de duplicação (g dias^{-1}) de *Lemna aequinoctialis* submetidas à fluoxetina (FLU), amoxicilina (AMX) e sinvastatina (SIN) e seus produtos da degradação por fotocatalise.

Observou-se que as concentrações mais baixas da fluoxetina (FLU) degradada por fotocatalise (1,0; 2,5 e $5,0 \text{ mg L}^{-1}$) não afetaram o crescimento da planta. No entanto, houve redução do TD à medida que houve aumento da concentração dos produtos da degradação do fármaco. Reduções de cerca de 50% foram observadas no controle positivo contendo a FLU não tratada.

O TD dos ensaios realizados com *L. aequinoctialis* e amoxicilina (AMX) tratada por fotocatalise não sofreram alterações significativas em nenhuma das concentrações testadas e nem mesmo com a AMX não tratada (100 mg L^{-1}).

Não foram observadas alterações significativas no TD de *L. aequinoctialis* e sinvastatina (SIN) em nenhuma das concentrações dos produtos da degradação fotocatalítica deste fármaco, incluindo a própria SIN antes da degradação.

A fluoxetina é um fármaco geralmente prescrito como inibidor seletivo da serotonina e a taxa de metabolização é menor do que 10%, e no ambiente são detectadas concentrações da ordem de $9 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (HIEMKE; HÄRTTER, 2000). Amy-Sagers e colaboradores (2017) afirmam que a fluoxetina, a 323 nmol L^{-1} , diminuiu significativamente o crescimento da raiz, a taxa de crescimento e a reprodução *L. minor*. O tratamento mostrou redução de 50% na reprodução assexuada por brotação, e a taxa de crescimento também reduziu à metade quando comparado ao tratamento controle. Os autores afirmam que não conseguem explicar quanto aos mecanismos responsáveis, pois ainda não são conhecidos trabalhos sobre os impactos da fluoxetina em plantas.

Com relação à AMX, é importante ressaltar que o efeito de toxicidades dos antibióticos depende essencialmente da compreensão do seu modo de ação. Em estudo desenvolvido por Pomati e colaboradores (2004), avaliando os efeitos do antibiótico eritromicina em *L. aequinoctialis*, verificaram que a eritromicina (1 mg L^{-1}) afetou o crescimento da *L. aequinoctialis* causando 20% de inibição. No ensaio utilizando a amoxicilina observando a média para todas as concentrações verificou-se que houve inibição de 9,3% do crescimento da planta.

Ensaio ecotoxicológico realizado com *Pseudoikirchneriella subcaptata* e os antibióticos cefatoxamina e amoxicilina revelaram efeitos tóxicos relativamente baixos (Fu *et al.*, 2017). Estes resultados corroboram com os observados neste estudo, e provavelmente se deve ao fato de que estes antibióticos são inibidores da síntese da parede celular em bactérias, e estas apresentam composição química diferenciada em relação às células vegetais e desta forma, não exercem o mesmo efeito.

Por outro lado, estudos realizados com *L. minor* e tetraciclina revelaram fitotoxicidade, com inibição do crescimento e redução do teor de pigmentos clorofilianos (BACIAK *et al.*, 2016). Pomati e colaboradores (2004) já haviam relatado a redução do número de frondes de *L. minor* causadas por 1 mg L^{-1} de

tetraciclina e ressaltam inclusive, elevação na produção do fitormônio do estresse, o ácido abscísico.

Ressalta-se ainda que o TD por ser um *endpoint* morfológico pode não refletir o efeito da sinvastatina ou de seus produtos de degradação fotocatalítica. Brain e colaboradores (2006) relataram que as respostas morfológicas não foram efetivas na observação dos efeitos da lovastatina e atorvastatina em *L. gibba*.

A sinvastatina pertence ao grupo das estatinas e Brian *et al.*, (2006) relatam que estes fármacos são responsáveis pelo controle da hipercolesterolemia, e atuam como inibidores da enzima 3-hidroxi, 3-metilglutaril coenzima-A redutase (HMGR). Em plantas, estes compostos também inibem a HMGR, a qual regula a biossíntese de isoprenoides da via do ácido mevalônico (BRIAN *et al.*, 2006). Os isoprenoides em plantas desempenham inúmeras funções bioquímicas envolvendo a cadeia de transporte de elétrons, os fosfolípidos de membrana, síntese de pigmentos fotossintéticos, hormônios vegetais, síntese de compostos de defesa, dentre outros (RUPASINGH *et al.*, 2003).

As estatinas: lovastatina e atorvastatina foram fitotóxicas em *L. gibba*, e revelaram por meio dos *endpoints* bioquímicos utilizados que, a reação enzimática pela HMGR não é limitante, podendo estes organismos ser ou não susceptíveis às estatinas testadas (SEILER, 2002). Hemmerlin e colaboradores (2003) afirmam ainda que as concentrações de 50 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de estatinas parece não atuar de forma efetiva na atuação como herbicidas e nas concentrações ambientais destes fármacos parece não oferecer riscos à *L. gibba*.

5.10.2. Pigmentos fotossintéticos

Os pigmentos clorofilianos nas plantas desempenham função primordial na captação de energia luminosa para o processo fotossintético e desta forma, variações no seu conteúdo podem fornecer informações sobre o estado fisiológico das folhas. Sob condições de estresse, o teor de pigmentos clorofilianos tendem a declinar mais rapidamente do que os carotenoides, pois estes apresentam um papel secundário na absorção de energia luminosa (BACCIO *et al.*, 2017; SIMS; GAMON, 2002).

A Figura 28 apresenta o teor de pigmentos clorofilianos (Chl *a* e Chl *b*) observados em *L. aequinoctialis* submetidas FLU, AMX, e SIN e aos produtos de degradação dos referidos fármacos.

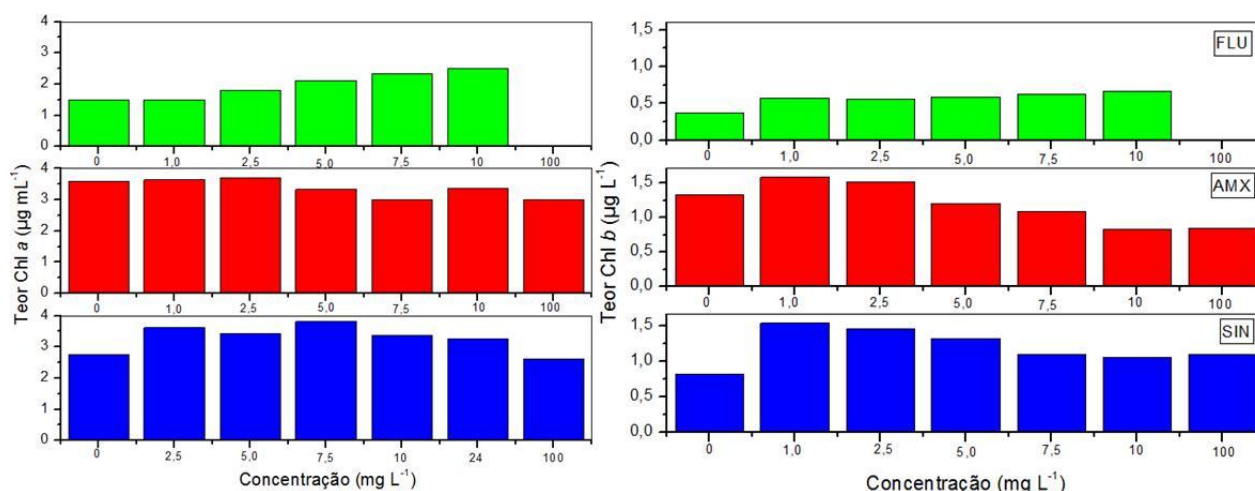


Figura 28. Teor de pigmentos clorofilianos em *Lemna aequinoctialis* submetidas à fluoxetina (FLU), amoxicilina (AMX) e sinvastatina (SIN) e seus produtos da degradação por fotocatalise.

O fármaco fluoxetina antes da degradação (100 mg L^{-1}) afetou drasticamente o teor dos pigmentos clorofilianos, corroborando com a redução observada no tempo de duplicação. Por outro lado, houve aumento no teor de Chl *a* e *b* com a elevação das diluições da fluoxetina degradada por fotocatalise.

O teor de Chl *a* praticamente não se alterou quando comparado ao controle nas concentrações mais baixas dos produtos de degradação da AMX ($1,0$ e $2,5 \text{ mg L}^{-1}$). Nas concentrações de $7,5$ sofreu leve redução, assim como na concentração de AMX antes da degradação fotocatalítica. A 5 e 10 mg L^{-1} os teores de pigmentos foram mais baixos quando comparados ao controle. Por outro lado, o teor de Chl *b* apresentou elevações nas concentrações de $1,0$ e $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ nos produtos degradados da AMX. Já nas concentrações de 5 a 10 mg L^{-1} da AMX tratada e a 100 mg L^{-1} do fármaco antes da degradação fotocatalítica as reduções foram dose-dependentes. Logo, o aumento da clorofila *b* pode ser atribuído ao mecanismo de resposta da planta quando em presença de condição de estresse.

O efeito da SIN no teor de Chl *a* apresentou elevações até a concentração de $7,5 \text{ mg L}^{-1}$ dos produtos de degradação do fármaco quando comparada ao controle e apresentou reduções nas concentrações mais elevadas (10 e 24 mg L^{-1} da SIN degradada) e a 100 mg L^{-1} do fármaco antes da degradação. O teor de Chl *b*

apresentou elevação quando comparado ao controle na concentração mais baixa dos produtos degradados da sinvastatina ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) e posteriormente reduziu de forma dose dependente até $7,5 \text{ mg L}^{-1}$. Nas concentrações de $7,5$ e 10 mg L^{-1} e 100 mg L^{-1} da SIN antes da degradação o teor de Chl *b* se manteve constante.

Os resultados dos ensaios ecotoxicológicos têm demonstrado que o teor de pigmentos clorofilianos, carotenoides e as razões entre estes pigmentos servem como marcadores de estresse causado por medicamentos (BAROLI; NIYOGI, 2000). Isto ocorre porque os pigmentos fazem parte da estrutura do aparato fotossintético e são imprescindíveis ao processo de fotossíntese em algas e plantas (LI *et al.*, 2009).

O fato de ter ocorrido elevação no teor de Chl *a* causados pela fluoxetina, amoxicilina e sinvastatina, se deve ao fenômeno denominado *hormesis*. Neste caso, determinados toxicantes podem promover um estímulo no crescimento ou na reprodução de determinados organismos para que os mesmos possam suportar as concentrações testadas, tanto doses altas como doses baixas (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

Estudos realizados por Baciak e colaboradores (2016) com *L. minor* e medicamentos revelaram distúrbios morfológicos e bioquímicos. Estes autores relataram ainda que a exposição aos antibióticos em geral, causaram redução no teor de pigmentos fotossintéticos e acúmulo de carboidratos osmoticamente ativos, principalmente antibióticos em *L. minor*.

5.10.3. Enzimas antioxidantes

Nas plantas, o oxigênio gerado na reação de fotossíntese causa danos nas células aeróbicas devido à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Como forma de defesa as células vegetais se utilizam dos sistemas antioxidantes para minimizar as ações nocivas sofridas, mantendo ROS em certos níveis de estado estacionário (BABIOR, 1991). Em algumas circunstâncias, quando o equilíbrio entre a geração e a eliminação de ROS é perturbado, elevando seu nível, é chamado de "estresse oxidativo" (KUMMEROVÁ *et al.*, 2016).

O estresse pode ser ocasionado por vários fatores ambientais e biológicos como seca, salinidade, frio, choque térmico, metais tóxicos, poluentes, radiação ultravioleta, estresse mecânico, privação de nutrientes, manipulações experimentais, ataque de patógenos e envelhecimento da planta (BARTOSZ, 1997).

A atividade específica da enzima ascorbato peroxidase (APX) em *L. aequinoctialis* submetidas aos fármacos fluoxetina, amoxicilina e sinvastatina são apresentados na figura 29.

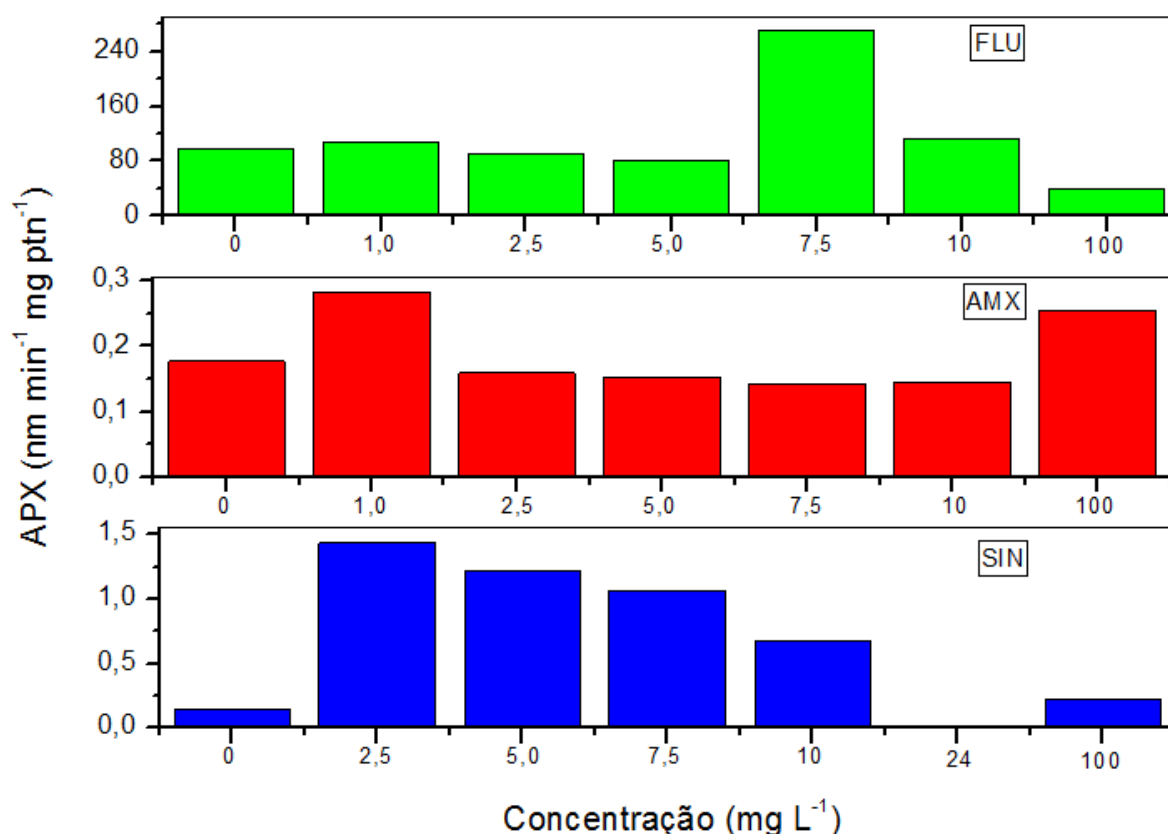


Figura 29. Variação na atividade da Ascorbato peroxidase em *Lemna aequinoctialis* submetidas à fluoxetina (FLU), amoxicilina (AMX) e sinvastatina (SIN) e seus produtos da degradação por fotocatalise.

Houve aumento da atividade de APX para FLU (figura 29) nas concentrações mais altas dos produtos de degradação (7,5 e 10 mg L⁻¹). No entanto em baixas concentrações os teores de APX (1,0; 2,5 e 5,0) mantiveram-se iguais ao do controle negativo.

Para a AMX percebeu-se que as plantas cultivadas na solução contendo os produtos de degradação nas concentrações entre 2,5 e 10 mg L⁻¹ os níveis de APX foram iguais ao obtidos pelas plantas do controle negativo. Concentrações mais elevadas foram observadas na concentração mais baixa e a 100 mg L⁻¹ do fármaco antes da degradação.

Os valores da atividade da APX foram inversamente proporcionais ao da concentração das soluções obtidas na degradação do fármaco. A atividade

enzimática reduziu de forma dose dependente com o aumento da concentração dos produtos da degradação fotocatalítica da SIN, e não apresentou atividade na concentração mais alta do fármaco degradado. O estresse causado pelos produtos da degradação da sinvastatina pode ter superado a capacidade desta enzima em proteger a célula do estresse oxidativo.

A APX é uma das principais enzimas antioxidantes envolvidas na regulação dos níveis de H_2O_2 durante o desenvolvimento da planta e sob condições de estresse adversas (PALMA *et al.*, 2006; LETERRIER *et al.*, 2007). Por exemplo, em sementes de ervilhas cultivadas na presença de NaCl (150 mM) mostraram que o estresse induzido pelo sal produz um aumento de 1,4 vezes na atividade APX (GÓMEZ *et al.*, 2004). Verificou-se também a dependência do APX com a concentração para a planta *Spirodela polyrhiza* na presença de ftalato de dietilo onde a atividade de APX foi menor na concentração mais baixa e depois aumentou conforme a concentração (CHENG; CHENG, 2012).

A atividade específica das peroxidases (POX) em plantas de *L. aequinoctialis* submetidas aos produtos da degradação fotocatalítica dos diversos fármacos testados é apresentada na Figura 30.

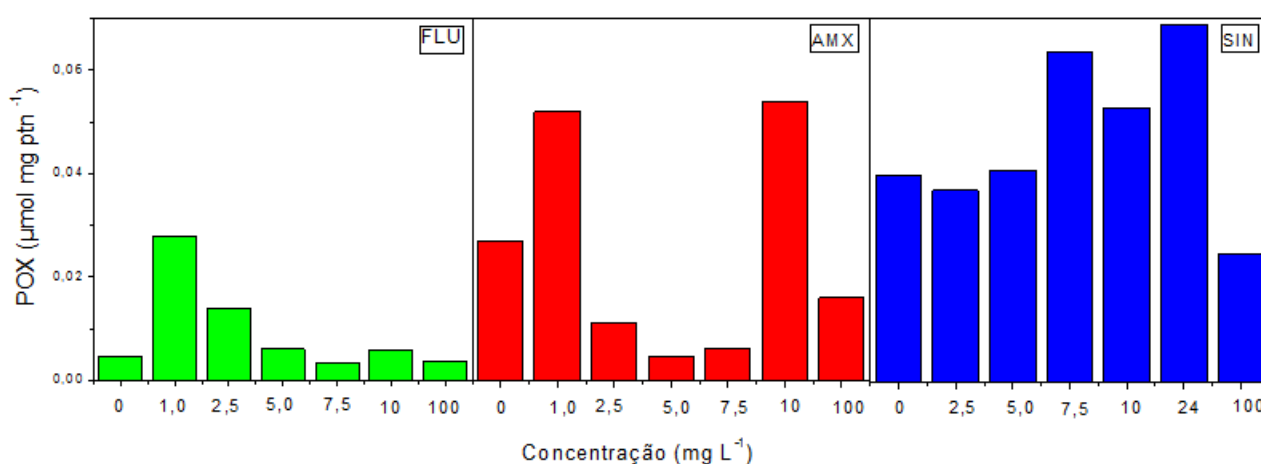


Figura 30. Variação na atividade da Peroxidase em *Lemna aequinoctialis* submetidas à fluoxetina (FLU), amoxicilina (AMX) e sinvastatina (SIN) e seus produtos da degradação por fotocatalise.

Conforme verificado na Figura 30, FLU mostrou altos valores de POX para as concentrações mais baixas (1,0 e 2,5 mg L⁻¹), nas outras concentrações analisadas e controle positivo e negativo praticamente não houve variação. Esse fato também foi verificado quando a planta *Lemna punctata* foi cultivada em

soluções contendo o herbicida 2,4,6-Triclorofenol, em concentrações mais baixas ocorreu maior atividade enzimática e, com a elevação da concentração houve diminuição da síntese de POX (Biswas *et al.*, 2010).

O fenômeno da *hormesis* foi observado na atividade da POX em *L. aequinoctialis* na concentração mais baixa e na mais elevada do antibiótico tratado por fotocatalise (Figura 30).

A atividade para SIN foi maior nas concentrações maiores (7,5; 10 e 24 mg L⁻¹) e diminuiu em concentrações menores. Estes resultados corroboram com aqueles verificados para *Lenma minor* e *Lemna gibba* na presença de 2,4,6-Triclorofenol (Biswas *et al.*, 2010).

A catalase é uma enzima importante no sistema de defesa antioxidante por promover a neutralização do peróxido de hidrogênio. Na figura 31 são apresentados os resultados obtidos para CAT. Para a FLU foram observadas atividades específicas mais elevadas para a CAT nas concentrações menores (1,0; 2,5 e 5,0 mg L⁻¹) enquanto em concentrações mais altas (7,5; 10 e 100 mg L⁻¹) a atividade sofreu redução. Ou seja, em menores concentrações a planta conseguiu superar o estresse causado pelos produtos originados na degradação dos fármacos.

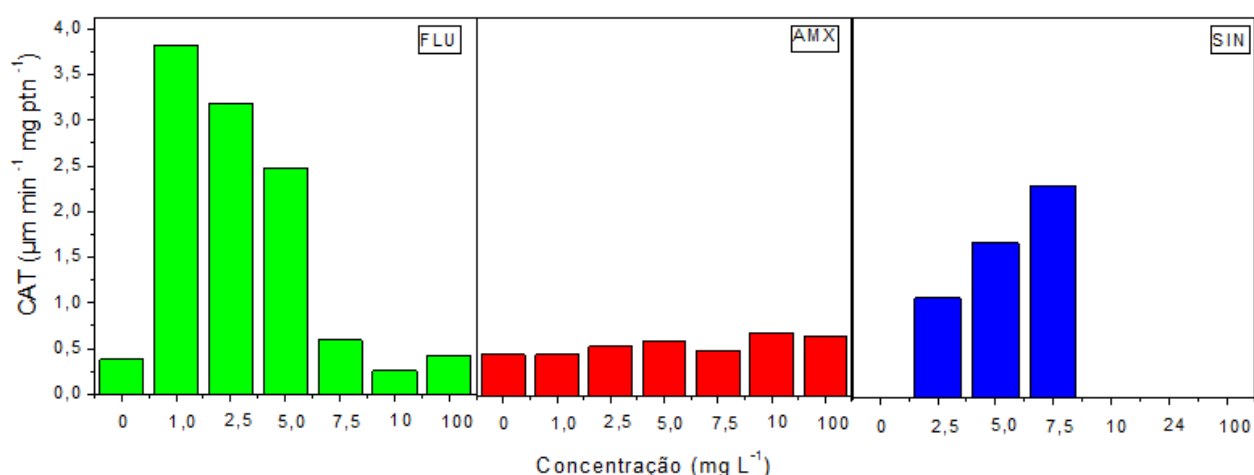


Figura 31. Variação na atividade da Catalase em *Lemna aequinoctialis* submetidas à fluoxetina (FLU), amoxicilina (AMX) e sinvastatina (SIN) e seus produtos da degradação por fotocatalise.

Na presença de AMX percebeu-se pequeno aumento da CAT para as maiores concentrações (10 e 100 mg L⁻¹) que reduziram em concentrações menores (7,5; 5,0; 2,5 e 0 mg L⁻¹). O aumento da catalase com a concentração também foi

verificado para a planta *Spirodela polyrhiza* na presença de ftalato de dietila, e a atividade da CAT foi menor na concentração mais baixa e depois aumentou conforme a concentração (CHENG; CHENG, 2012).

Em experimento empregando *L. gibba* em presença de Cd foi observado que maiores concentrações de Cd mostrou-se extremamente tóxica para a planta, reduzindo a atividade da CAT. Neste estudo houve declínio na atividade da catalase conforme se aumentava a concentração de Cd (URUC-PARLAK; YILMAZ, 2013). Comportamento semelhante foi observado para SIN, que em baixas concentrações apresentou atividade enzimática e em concentrações maiores (10, 24 e 100 mg L⁻¹) não foi observada atividade. Percebeu-se, no entanto, aumento da atividade conforme diminui a concentração em 2,5; 5,0 e 7,5 mg L⁻¹.

Até o momento não foi encontrado na literatura a utilização da planta *Lemna aequinoctialis* Welw para a avaliação dos fármacos (AMX, FLU e SIN) e produtos provenientes de suas degradações. Os fármacos e seus produtos mostraram comportamentos diferentes para os parâmetros analisados (TD, pigmentos, CAT, POX, APX), no entanto, quando comparados os resultados obtidos com os descritos na literatura para outras plantas do gênero *Lemna*, dessa forma pode-se afirmar que o tratamento fotocatalítico empregado foi eficiente para reduzir a toxicidade dos fármacos.

6. CONCLUSÃO

O processo de fotocatalise heterogênea, utilizando o semicondutor TiO_2 imobilizado em acetato de celulose, permitiu uma eficiente degradação dos fármacos em solução aquosa. Utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE - DAD) comparando-se os fármacos com os produtos da degradação obtidos após o tratamento fotocatalítico foram alcançadas degradações de 99,1% (sinvastatina em 30 minutos), 85% (fluoxetina em 180 minutos) e 99,0% (amoxicilina em 240 minutos). Os fármacos investigados não apresentaram fotossensibilidade, logo a degradação é atribuída somente a interação entre TiO_2/AC e radiação UV.

O método analítico foi validado por meio de parâmetros analíticos de validação utilizando CG/EM, dessa forma, foi possível quantificar os produtos gerados na degradação. Empregando também determinações de CG/EM foi possível propor estruturas originadas, durante o tratamento fotocatalítico, para os subprodutos gerados.

As determinações das taxas de mineralização das amostras foi realizada por meio da análise de Carbono Orgânico Total (COT) obtendo-se para AMX, FLU e SIN mineralizações de 70, 43 e 15%, respectivamente, determinou-se também que as reações seguem a cinética de degradação de pseudo-primeira ordem (para AMX e FLU).

Nos ensaios para avaliação da toxicidade dos fármacos e produtos de degradação foram empregadas plantas aquáticas pertencentes ao gênero *Lemna spp.* Os produtos da degradação fotocatalítica dos fármacos FLU, AMX e SIN apresentaram respostas diferenciadas em *Lemna aequinoctialis* quanto aos *endpoints* testados. Observou-se que FLU promoveu reduções no tempo de duplicação e na atividade das enzimas POX e CAT de forma dose-dependente e causou elevações no teor de pigmentos clorofilianos e na atividade na APX.

O antibiótico AMX apresentou respostas contrárias às observadas pela fluoxetina quanto ao tempo de duplicação e teor de pigmentos, redução na atividade da APX e oscilações nas atividades específicas da POX e CAT.

Já a SIN reduziu o crescimento, o teor de pigmentos e a atividade da enzima APX, porém elevou a atividade específica das enzimas POX e CAT em *L. aequinoctialis* submetidas aos produtos da degradação fotocatalítica deste fármaco.

Os *endpoints* utilizados na avaliação da resposta de *L. aequinoctialis* aos fármacos antes do processo de degradação também revelaram respostas diferenciadas. A fluoxetina afetou drasticamente o teor de pigmentos clorofilianos e o tempo de duplicação. Já a amoxicilina elevou a atividade da APX, por outro lado, inibiu a atividade da CAT ou pode-se dizer que a planta perdeu a capacidade de superar o estresse oxidativo causado por este fármaco.

REFERÊNCIAS

ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12648**: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade Crônica - Teste com algas (*Chlorophyceae*). Rio de Janeiro, 2005.

ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12648**: ecotoxicologia aquática – método de ensaio com algas (*Chlorophyceae*). Rio de Janeiro, 2011.

ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713**: água – ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro, 2009.

ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13373**: ecotoxicologia aquática – toxicidade crônica – método de ensaio com *Ceriodaphnia spp* (Crustácea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2010.

ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15088**: ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com peixes. Rio de Janeiro, 2011.

ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15308**: ecotoxicologia aquática – método de ensaio com misídeos (Crustácea). Rio de Janeiro, 2011.

ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15469**: ecotoxicologia aquática – preservação e preparo de amostras. Rio de Janeiro, 2007.

ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15470**: ecotoxicologia aquática – toxicidade em sedimento - método de ensaio com *Hyalella spp* (Amphipoda). Rio de Janeiro, 2007.

ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15499**: ecotoxicologia aquática – toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com peixes. Rio de Janeiro, 2007.

ABUSALLOUT, I.; HUA, G. Natural solar photolysis of total organic chlorine, bromine and iodine in water. **Water Research**. v 92, pp. 69 -77, 2016.

AFFAM, A. C.; CHAUDHURI, M. Degradation of pesticides chlorpyrifos, cypermethrin and chlorothalonil in aqueous solution by TiO₂ photocatalysis. **Journal of Environmental Management**, v. 130, pp. 160 -165, 2013.

AFZAL, A.; KANG, J.; CHOI, B. M.; LIM, H. J. Degradation and fate of N-nitrosamines in water by UV photolysis. **International Journal of Greenhouse Gas Control**. v. 52, pp. 44–51, 2016.

ALALM, M. G.; TAWFIK, A.; OOKAWARA, S. Enhancement of photocatalytic activity of TiO₂ by immobilization on activated carbon for degradation of pharmaceuticals. **Journal of Environmental Chemical Engineering**. pp. 1929–1937, 2016.

AL-EKABI, H. SERPONE, N. kinetic studies in heterogeneous photocatalysis. 1. Photocatalytic degradation of chlorinated phenol in aerated aqueous solutions over TiO_2 supported on a glass matrix. **J. Phys. Chem.**, v. 92, n. 20, pp-5726-5731, 1988.

AMERICAN HEART ASSOCIATION. Heart disease & stroke statistics. Disponível em: <<http://www.americanheart.org/downloadable/heart/123783441267009Heart%20and%20Stroke%20Update.pdf>> Acesso em: 15 fev. 2014.

AMY-SAGERS, C.; REINHARDT, K.; LARSON, D. M. Ecotoxicological assessments show sucralose and fluoxetine affect the aquatic plant, *Lemna minor*. **Aquatic Toxicology**, v. 185, pp. 76–85, 2017.

ANDREOZZI, R; CAPRIO, V; INSOLA, A; MAROTTA, R; Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery. **Catal. Today**. v.53, p.51, 1999.

ANSAI, S.; HOSOKAWA, H.; MAEGAWA, S.; KINOSHITA, M. Chronic fluoxetine treatment induces anxiolytic responses and altered social behaviors in medaka, *Oryzias latipes*. **Behavioural Brain Research**. v. 303 , pp. 126–136, 2016.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: <www.anvisa.gov.br> Acesso em: 20 mar. 2015.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC nº 27, de 17 de maio de 2012 <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0027_17_05_2012.pdf/c6e5deb56-200d-4482-8a19-99fa11c33fd3> Acesso em: 20 mai. 2016.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC Nº 44, de 26 de outubro de 2010. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0044_26_10_2010.html> Acesso em: 09 mar. 2017.

AOAC. **Official methods of analysis of AOAC international.** Appendix F - Guidelines for standard method performance requirements. Ed.19, 2012. p.16.

ARAUJO, P. Key aspects of analytical method validation and evaluation. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2224-2234, 2009.

AZIZ, T.; WATANABE, I. Influence of nutrients on the growth and mineral composition of *Azolla pinnata*. **Bangladesh Journal Botany**, v. 12, p. 166-170, 1983.

BABIOR, B.M. Oxidants from phagocytes: agentes of defense and destruction. **Blood**, v. 64, pp. 959-966, 1991.

BACCIO, D.D.; PIETRINI, F.; BERTOLOTTO, P.; PÉREZ, S.; BARCELÒ, D.; ZACCHINI, M.; DONATI, E. Response of *Lemna gibba* L. to high and environmentally relevant concentrations of ibuprofen: Removal, metabolism and morpho-physiological traits for biomonitoring of emerging contaminants. **Science of the Total Environment**, v.584-585, pp. 363-373, 2017.

BACIAK, M.; LUKASZ, S.; PIOTROWICZ-CIEŚLAK, A. I.; ADOMAS, B. Content of biogenic amines in *Lemna minor* (common duckweed) growing in medium contaminated with tetracycline. **Aquatic Toxicology**, v.180, pp.95-102, 2016.

BARBOSA, T. M.; LEVY, S.B. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. **Drug Resistance Updates**, 3, 303–311, 2000.

BAROLI, I.; NIYOGI, K. Molecular genetics of xanthophyll-depende photoprotection in green algae and plants. **Philos. Trans. R. Soc. Lond.**, v. 355, pp. 1385 – 1394, 2000.

BARTOSZ, G. Oxidative stress in plants. **Acta Physiologiae Plantarium**, v. 19, pp. 47 – 64, 1997.

BARUD, H. S.; DE ARAUJO, A. M.; SANTOS, D. B.; DE ASSUNCAO, R. M. N.; MEIRELES, C. S.; CERQUEIRA, D. A.; RODRIGUES, G.; RIBEIRO, C. A.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Thermal behavior of cellulose acetate produced from homogeneous acetylation of bacterial cellulose. **Thermochimica Acta**, v. 471, ed. 61, 2008.

BARUD, H.S. RIBEIRO, C.A. CRESPI, M.S. MARTINES, M.A DEXPERT-GHYS, J. MARQUES, R.F.C. MESSADDEQ, Y. RIBEIRO, S.J.L. Thermal characterization of bacterial cellulose–phosphate composite membranes. **J. Therm. Anal. Calorimetry**, v. 87, pp. 815–818, 2007.

BECKER, H. **Organikum – Química Orgânica Experimental**. Cap. 2, 2ª ed., Fundação Calouste Gulbenkian, 1997.

BENACHERINE, M. M. DEBBACHE, N.; GHOUL, I.; MAMERI, Y. Heterogeneous photoinduced degradation of amoxicillin by Goethite under artificial and natural irradiation. **J. Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. v. 335, pp. 70–77, 2017.

BENDZ, D.; PAXÉUS, N. A.; GINN, T. R.; LOGE, F. J. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden. **J. Hazard. Mater.** v.122, p.195, 2005.

BENITEZ, F.J.; ACERO, J.L., REAL, F.J.; ROLDAN, G. Ozonation of pharmaceutical compounds: rate constants and elimination in various water matrices, *Chemosphere* v. 77, pp. 53–59, 2009.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Quím. Nova**. v. 30, p.651, 2007.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Quím. Nova**, v. 26, n. 4, p. 523 - 530, 2003.

BISUTTI, I.; HILKE, I.; RAESSLER, M. Determination of total organic carbon – an overview of current methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n.10-11, pp. 716-726, 2004.

BISWAS, D. K.; SCANNELL, G.; AKHMETOV, N.; FITZPATRICK, D.; JANSEN, M, A.K. 2,4,6-Trichlorophenol mediated increases in extracellular peroxidase activity in three species of Lemnaceae. **Aquatic Toxicology**, v. 100, pp – 289 – 294, 2010.

BLAU, K.; HALKET, J. M. **Handbook of Derivatives for Chromatography**. 2 ed. Chichester: John Wiley & Sons, 1993.

BOTARO, V. R.; SANTOS, C. G.; OLIVEIRA, V. A. Hidrogéis superabsorventes a base de acetato de celulose modificado por dianidrido 3,3', 4,4' benzofenona tetracarboxílico (BTDA): síntese, caracterização e estudos físico-químicos de absorção. **Polímeros**, São Carlos, v.19, n.4, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAIN, R. A.; REITSMA, T. S.; LISSEMORE, L. I.; BESTARI, K.; SIBLEY, P. K.; SOLOMON, K. R. Herbicidal Effects of Statin Pharmaceuticals in *Lemna gibba*. **Environ. Sci. Technol.**, v. 40, pp. 5116 – 5123, 2006.

BRAZON, E. M.; PICCIRILLO, C.; MOREIRA, I. S., CASTRO, P.M.L. Photodegradation of pharmaceutical persistent pollutants using hydroxyapatite-based materials. **Journal of Environmental Management**, v. 182, pp. 486 – 495, 2016.

BRIENZA, M.; MAHDI AHMED, M. ; ESCANDE, A. ; PLANTARD, G. ; SCRANO, L.; CHIRON, S. ; BUFO, S.A. ; GOETZ, V. Use of solar advanced oxidation processes for wastewater treatment: Follow-up on degradation products, acute toxicity, genotoxicity and estrogenicity. **Chemosphere**, v. 148, pp.473-480, 2016.

BRITO, F.S.R. Abastecimento de águas: parte geral, tecnologia e estatística. v. 3. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1943.

BRUCE, G. M.; PLEUS, R. C.; SNYDER, S. A. Toxicological relevance of pharmaceuticals in drinking water. **Environ. Sci. Technol.** v. 44, pp. 5619– 626, 2010.

BUENO, M.J.M., GÓMEZ, M.J., HERRERA, S., HERNANDO, M.D., AGÜERA, A., FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Occurrence and persistence of organic emerging contaminants and priority pollutants in five sewage treatment plants of Spain: two years pilot survey monitoring. **Environ. Pollut.** v. 164, pp. 267–273, 2012.

BUGAMELLI, C. S. F.; VARANI, G.; MERCOLINI, L.; MUSENGA, A.; SARACINO, M. A.; FANALI, S.; RAGGI, M. A. A rapid HPLC-DAD method for the analysis of fluoxetine and norfluoxetine in plasma from overdose patients. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.36, n.2, pp. 351-356, 2004.

BULICH, A. A. A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic. **Process Biochemistry**. pp. 45-47, 1982.

CAMACHO-MUÑOZ, D., MARTÍN, J., SANTOS, J.L., ALONSO, E., APARICIO, I., DE LA TORRE, T., RODRÍGUEZ, C., MALFEITO, J.J. Effectiveness of three configurations of membrane bioreactors on the removal of priority and emergent organic compounds from wastewater: comparison with conventional wastewater treatments. **J. Environ. Monitor.** v.14, pp.1428–1436, 2012.

CAMACHO-MUÑOZ, D., MARTÍN, J., SANTOS, J.L., APARICIO, I., ALONSO, E. Effectiveness of conventional and low-cost wastewater treatments in the removal of

pharmaceutically active compounds. **Water Air Soil Pollut.** v. 223, pp. 2611–2621, 2014.

CANELA, M. C.; JARDIM, W. F.; SODRÉ, F. F.; GRASSI, M. T. **Cafeína em águas de abastecimento público no Brasil.** INCTTAA Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas. Cubo: 2014, 96p.

CARP, O.; C.L. HUISMAN, C. L.; RELLER, A. Photoinduced reactivity of titanium dioxide. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 32, pp. 33–177, 2004.

CARR, D. L.; MORSE, A. N.; ZAK, J.C.; ANDERSON, T. A. Biological Degradation of Common Pharmaceuticals and Personal Care Products in Soils with High Water Content. **Water, Air, & Soil Pollution**. v. 217, pp 127–134, 2011.

CETESB. COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Norma Técnica L5.228:** teste de toxicidade água utilizando *Spirillum volutans* - método de ensaio. São Paulo, 1988.

CETESB. COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Norma Técnica L5.227:** teste de toxicidade com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* – método de ensaio. São Paulo, 2001.

CHENG, L. J.; CHENG, T. S. Oxidative effects and metabolic changes following exposure of greater duckweed (*Spirodela polyrrhiza*) to diethyl phthalate. **Aquatic Toxicology**, v. 109, pp. 166 – 175, 2012.

CIOLA, R. **Fundamentos da catálise.** 1. Ed. Editora da Universidade de São Paulo, 1981, 377p.

COLEMAN, R. N.; QURESHI, A. A. Microtox® and *Spirillum volutans* tests for assessing toxicity of environmental samples. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 35, n. 1, p. 443-451, 1985.

COLLADO, N.; BUTTIGLIERI, G. FERRANDO-CLIMENT, L, RODRIGUEZ-MOZAZ, S, BARCELÓ, D.; COMAS J.; RODRIGUEZ-RODA, I. Removal of ibuprofen and its transformation products: Experimental and simulation studies. **Science of the Total Environment** .v, 433, pp. 296–301, 2012.

CONAMA. **Resolução CONAMA 357/2005, de 17 de Março de 2005.** Dispõem sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Brasília, Ministério do Meio ambiente, 2005.

CONAMA. **Resolução CONAMA 430/2011, de 13 de Maio de 2011.** Dispõem sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Brasília, Ministério do Meio Ambiente, 2011.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

COSTA, E. M. F.; SPRITZER, P. M.; HOHL, A.; BACHEGA, T. A. S. S. Efeitos dos desreguladores endócrinos no desenvolvimento do trato reprodutivo feminino. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.58, n.2, pp.153-161, 2014.

CRISTALE, J.; RAMOS, D.D.; DANTAS, R. F.; MACHULEK JUNIOR, A.; LACORTE, S.; SANS, C.; ESPLUGAS, S. Can activated sludge treatments and advanced oxidation processes remove organophosphorus flame retardants? **Environmental Research**. v. 144, pp. 11–18, 2016.

DA CRUZ, L. H.; HENNING, F. G.; DOS SANTOS, A. B.; PERALTA-ZAMORA, P. Degradação fotocatalítica de sulfametoxazol, trimetoprima e diclofenaco em solução aquosa. **Quím. Nova**. v. 33, n. 6, p. 1270-1274, 2010.

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

DAUGHTON, C.G. Y., TERNES T.A. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the environment: Agents of subtle change? **Environmental Health Perspectives**. v.107, pp. 907-938, 1999.

DE LA CRUZ, N.; GIMÉNEZ, J.; ESPLUGAS, S.; GRANDJEAN, D.; DE ALENCASTRO, L. F.; PULGARÍN, C. Degradation of 32 emergent contaminants by UV and neutral photo-fenton in domestic wastewater effluent previously treated by activated sludge. **Water Res**. v. 46, pp. 1947 - 1957, 2012.

DE PÁDUA, V. L. coord. **Programa de pesquisa em saneamento básico – PROSAB. Água – remoção de microrganismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento de água para consumo humano**. 1ed. Rio de Janeiro: ABES, 2009, 394p.

DIAZ, E.; CEBRIAN, M.; BAHAMONDE, A.; FARALDOS, M.; MOHEDANO, A. F.; JOSE A. CASAS, RODRIGUEZ, J. J. Degradation of organochlorinated pollutants in water by catalytic hydrodechlorination and photocatalysis. **Catalysis Today**, v. 266, pp. 168–174, 2016.

DIONYSIOU, D. D.; CRUZ, A. A.; STEFAN, M.I.; KALOUDIS, T.; TRIANTIS, T.; HISKIA, A.; O'SHEA, K.E.; WESTRICK, J.A.; PELAEZ, M.; HE, X. Efficient removal of microcystin-LR by UV-C/H₂O₂ in synthetic and natural water samples, **Water Res**. v. 46, pp.1501–1510, 2012.

DOUŠA, M.; HOSMANOVÁ, R. Rapid determination of amoxicillin in premixes by HPLC. **J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, n.2, pp. 373 – 377, 2005.

DRUGBANK DATABASE. Web page sem autor. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca>> Acesso 19 agosto 2017.

DRUGBANK DATABASE. Web page sem autor. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00472>> Acesso 10 junho 2017.

EAP, C. B. BAUMANN, P. Analytical methods for the quantitative determination of selective serotonin reuptake inhibitors for therapeutic drug monitoring purposes in patients. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.*, v. 686, pp. 51 – 63, 1996.

EATON, A.D.; CLESCERI, L.S.; RICE, E.W.; GRENNBERG, A.E. *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater*. 21. ed., Maryland: Port City Press, 2005.

ELLESAT, K. S.; TOLLEFSEN, K. E.; ÅSBERG, A.; THOMAS, K. V.; HYLLAND, K. Cytotoxicity of atorvastatin and simvastatin on primary rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. **Toxicology in Vitro**. v. 24, pp. 1610–1618, 2010.

Encyclopedia Britânica, Inc. 2012. Cellulose acetate. Disponível em <<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/101663/cellulose-acetate>> Acesso em 06 fev. 2015.

EPA. National Primary Drinking Water Standards. Disponível em: <<http://www.epa.gov/safewater/consumer/pdf/mcl.pdf>>. Acesso: 05 jan. 2012.

ERTÜRK, S.; ÖNAL, A.; ÇETIN, S. M. Analytical methods for the quantitative determination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in biological Samples. **J. Chromatography B**, v. 793, pp. 193–205, 2003.

ESTRADA-ARRIAGA, E. B.; CORTÉS-MUÑOZ, J.E.; GONZÁLEZ-HERRERA, A.; CALDERÓN-MÓLGORA, C.G.; RIVERA-HUERTA, M. L.; RAMÍREZ-CAMPEROS, E.; MONTELLANO-PALACIOS, L.; GELOVER-SANTIAGO, S. L.; PÉREZ-ASTREJÓN, S.; CARDOSO-VIGUEROS, L. MARTÍN-DOMÍNGUEZ, A.; GARCÍA-SÁNCHEZ, L. Assessment of full-scale biological nutrient removal systems upgraded with physico-chemical processes for the removal of emerging pollutants present in wastewaters from Mexico. **Sci.Total Environ.**, v.571, pp.1172-1182, 2016.

ETACHERI, V.; E.; DI VALENTIN, C. ; SCHNEIDER, J.; BAHNEMANN, D. ; PILLAI, S. C. Visible-light activation of TiO₂ photocatalysts: Advances in theory and experiments. **J. Photochemistry & Photobiology, C: Photochemistry Reviews**, v.25, pp.1-29, 2015.

FERRANDO-CLIMENT, L.; GONZALEZ-OLMOS, R.L ; ANFRUNS, A. ; AYMERICH, I. ; COROMINAS, L. ; BARCELÓ, D.; RODRIGUEZ-MOZAZ, S. Elimination study of the chemotherapy drug tamoxifen by different advanced oxidation processes: Transformation products and toxicity assessment. **Chemosphere**, v.168, pp.284-292, 2017.

FREGONEZI-NERY, MM ; BARACAT, MM ; CASAGRANDE, R ; MACHADO, HT ; MIGLIORANZA, B ; GIANOTTO, EAD ; DALMAS, JC. Validation of Methods for Determination of Fluoxetine Capsules. **Quím. Nova**, v.31, pp.1665-1669, 2008.

FREITAS, A. M.; SIRTORI, C.; PERALTA-ZAMORA, P. G. Avaliação do potencial de processos oxidativos avançados para remediação de águas contaminadas com Geosmina e 2MIB. **Quím. Nova**. v.31, n.1, p.75-78, 2008.

FU, L.; HUANG, T.; WANG, S.; WANG, X.; SU, L.; LI, C.; ZHAO, Y. Toxicity of 13 different antibiotics towards freshwater green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and their modes of action. **Chemosphere**, v. 168, pp. 217 – 222, 2017.

GANIYU, S. O.; VAN HULLEBUSCH, E. D.; CRETIN, M.; ESPOSITO, G.; OTURAN, M. A. Coupling of membrane filtration and advanced oxidation processes for removal of pharmaceutical residues: A critical review. **Separation and Purification Technology**. v. 156, pp. 891–914, 2015.

GARP, Associação grupo de analistas de resíduos de pesticidas. Manual de resíduos de pesticidas em alimentos, 1999.

GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A.; ARAÚJO, R. P. A.; RAMOS, M. L. L. C.; **Procedimentos para Utilização de Testes de Toxicidade no Controle de Efluentes Líquidos**, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB): São Paulo, 1990.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. Interferentes endócrinos no ambiente. **Quím. Nova**. v. 30, p. 695, 2007.

GIANNAKIS, S. ; VIVES, F. A. G ; GRANDJEAN, D. ; MAGNET, A. ; DE ALENCASTRO, L. F.E ; PULGARIN, C. Effect of advanced oxidation processes on the micropollutants and the effluent organic matter contained in municipal wastewater previously treated by three different secondary methods. **Water Research**, v.84, pp. 295-306, 2015.

GILART, N.; MARCÉ, R. M.; BORRULL, F.; FONTANALS, N. Determination of pharmaceuticals in wastewaters using solid-phase extraction-liquid chromatography tandem mass spectrometry. **J. Sep. Sci.** v. 35, p.875, 2012.

GIRI, A. S.; GOLDER, A. K. Fenton, Photo-Fenton, H₂O₂ Photolysis, and TiO₂ Photocatalysis for Dipyrone Oxidation: Drug Removal, Mineralization, Biodegradability, and Degradation Mechanism. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 53, pp. 1351 – 1358, 2014.

GÓMEZ, J. M.; JIMÉNEZ, A.; OLMOS, E.; SEVILLA, F. Location and effects of long-term NaCl stress on superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes of pea (*Pisum sativum* cv. Puget) chloroplasts. **J. Experimental Botany**, v. 55, pp. 119–130, 2004.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p. 739-744, 2003.

GRAESER, K. A.; STRACHAN, C. J; PATTERSON, J. E.; GORDON, K. C.; RADES, T. Physicochemical properties and stability of two differently prepared amorphous forms of simvastatin. **Crystal Growth & Design**, v. 8, n. 1, p. 128-135, 2008.

GRELA, M. A., LOEB, B., RESTREPO, G. M., LAGORIO M. G., SAN ROMÁN, E.; **Eliminación de Contaminantes por Fotocatálisis Heterogénea**, Capítulo 5: Los mecanismos de destrucción de contaminantes orgánicos, 2001.

GURR, C.J.; REINHARD, M. Harnessing natural attenuation of pharmaceuticals and hormones in rivers. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 9, pp. 2872 - 2876, 2006.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GOODMAN & GILMAN. As bases Farmacológicas da Terapêutica, 10a . ed., Editora McGraw-Hill: Rio de Janeiro, 2004.

HEBERER, T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. **Toxicology Letters**. v.131. p. 5–17, 2002.

HEMMERLIN, A., HOEFFER, J. F.; MEYER, O.; TRITSCH, D.; KAGAN, I. A.; GROSDEMANGE-BILLIARD, C; ROHMER, M.; BACH, T. J. Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methyl-erythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells. **J. Biol. Chem.**, v. 278, pp. 26666 – 26676, 2003.

HEMPEL, S. John Snow. **The Lancet**. v. 381, pp.1269-1270, 2013.

HERNANDO, M. D.; MEZCUA, M.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R.; BARCELÓ, D. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. **Talanta**. v. 69, pp. 334 - 342, 2006.

HIEMKE, C.; HARTTER, S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. **Pharmacol. Ther.**, v, 85, pp. 11 – 28, 2000.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística Pesquisa de informações básicas municipais. Perfil dos municípios brasileiros: meio ambiente - **2002**. Rio de Janeiro: IBGE, 2005. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/perfilmunic/meio_ambiente_2002/default.shtm> Acesso em: 22 ago. 2016.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (PNSB), 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pnsb/pnsb.pdf>>. Acesso em: jul. 2016.

ICH. International Conference on Harmonisation, 1996. Validation of analytical procedures: Methodology, Q2B.

IQBAL, M. S.; AKMAL, M. A. A simple method for simultaneous determination of some organic liquids in in-process materials and effluents produced in the manufacture of amoxicillin and ampicillin. **Environ. Monit. Assess**, v. 151, pp. 397–400, 2009.

JELIC, A., GROS, M., GINEBRED, A., CESPEDES-SÁNCHEZ, R., VENTURA, D., PETROVIC, M., BARCELÓ, D. Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. **Water Res.** v. 45, pp. 1165– 1176, 2011.

JONES, P.; KAFONEK, S.; LAURORA, I.; HUNNINGHAKE, D. Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the curves study). **American Journal of Cardiology**, v. 81, p. 582-587, 1998.

JOSS, A.; ZABCZYNSKI, S. GÖBEL, A.; HOFFMANN, B.; LÖFFLER, D.; MCARDELL, C. S.; TERNES, T. A. THOMSEN, A.; SIEGRIST, H. Biological

degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: Proposing a classification scheme. **Water Research**. v. 40, pp. 1686–1696, 2006.

KAPLAN, R.; ERJAVEC, B.; DRAZI, G.; GRDADOLNIK, C, J.; PINTAR, A. Simple synthesis of anatase/rutile/brookite TiO_2 nanocomposite with superior mineralization potential for photocatalytic degradation of water pollutants. *Appl. Catal. B: Environ.*, v. 18, pp. 465–474, 2016.

KHATAEE, A. R.; FATHINIA, M.; JOO, S. W. Simultaneous monitoring of photocatalysis of three pharmaceuticals by immobilized TiO_2 nanoparticles: Chemometric assessment, intermediates identification and ecotoxicological evaluation. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.112, pp. 33 – 45, 2013.

KHONGTHON, W.; JOVANOVIC, G.; YOKOCHI, A.; SANGVANICH, P.; PAVARAJARN, V. Degradation of diuron via an electrochemical advanced oxidation process in a microscale-based reactor. **Chemical Engineering Journal**. v. 292, pp. 298–307, 2016.

KIDAK, R.; DOGAN, S. Medium-high frequency ultrasound and ozone based advanced oxidation for amoxicillin removal in water. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 40, pp. 131-139, 2018.

KLAUSON, D.; BABKINA, J.; STEPANOVA, K.; KRICHEVSKAYA, M.; S. PREIS, S.. Aqueous photocatalytic oxidation of amoxicillin. **Catal. Today**. v. 151, pp. 39–45, 2010.

KOCE, J. D. Effects of exposure to nano and bulk sized TiO_2 and CuO in *Lemna minor*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 119, pp. 43-49, 2017.

KOCIJAN, A.; GRAHEK, R; BASTARDA, A.; KRALJ, L. Z. Fast analysis of pravastatin in production media. **Journal of Chromatography B**, v. 822, pp.311–315 2005.

KRAUS, T. E.; MCKERSIE, B. D.; FLETCHER, R. A. Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. **Journal Plant Physiology**, v. 145, pp. 570-576, 1995.

KUMAR, K.S.; HAN, T. Physiological response of *Lemna* species to herbicides and its probable use in toxicity testing. **Toxicol. Environ. Health Sci.**, v. 2, pp. 39-49, 2010.

KUMMEROVÁ, M.; ZEŽULKA, Š.; BABULA, P.; TŘÍSKA, J. Possible ecological risk of two pharmaceuticals diclofenac and paracetamol demonstrated on a model plant *Lemna minor*. **J. Hazardous Materials**, v. 302, pp.351-361, 2016.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G.; DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Quím. Nova**, v. 25, n. 1, p. 78 – 82, 2002.

KUO, C. S.; LIN, C. F.; HONG, P. K. A. Photocatalytic degradation of methamphetamine by UV/ TiO_2 e Kinetics, intermediates, and products. **Water Research**, v. 74, pp. 1 – 9, 2015.

LAM, M. W.; YOUNG, C. J.; MABURY, S. A. Aqueous Photochemical Reaction Kinetics and Transformations of Fluoxetine. **Environ. Sci. Technol.** v. 39, pp. 513-522, 2005.

LEGRINI, O. OLIVEROS, E.; BRAUN, A. M. Photochemical processes for water treatment. **Chem. Rev.**, v. 93, pp. 671-698, 1993.

LETERRIER, M.; DEL RÍO, L. A.; CORPAS, F. J. Cytosolic NADP isocitrate dehydrogenase of pea plants: genomic clone characterization and functional analysis under abiotic stress conditions. **Free Radical Research**, v. 41, pp. 191–199, 2007.

LEVISON, W.; JAWETZ, E. Microbiologia médica e imunologia. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. 415p.

LEWIS, N. S.; ROSENBLUTH, M. L. In: **Photocatalysis: Fundamentals and Applications**; SERPONE, N. E. PELIZZETTI, E., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 1989; p.45.

LI, B.; ZHANG, Y.; YANG, Y.; QIU, W.; WANG, X.; LIU, B.; WANG, Y.; SUN, G. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of chitosan/TiO₂ nanocomposite against *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. **Carbohydrate Polymers**, v. 152, pp. 825-831, 2016.

LI, X.; SHEN, T.; WANG, D.; YUE, X.; LIU, X.; YANG, Q.; CAO, J.; WU, ZHENG, W.; ZENG, G. Photodegradation of amoxicillin by catalyzed Fe³⁺/H₂O₂ process, **J. Environ. Sci.**, v. 24, pp. 269–275, 2012.

LIN, L.; WANG, H.; JIANG, W.; MKAOUAR, A.R.; XU, P. Comparison study on photocatalytic oxidation of pharmaceuticals by TiO₂-Fe and TiO₂-reduced graphene oxide nanocomposites immobilized on optical fibers. **Journal of Hazardous Materials**, v. 333, n. 5, pp. 162 – 168, 2017.

LIU, J.L.; WONG, M.H. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): a review on environmental contamination in China. **Environ. Int.**, v. 59, pp. 208–224, 2013.

LUTTRELL, T.; HALPEGAMAGE, S.; TAO, J. G.; KRAMER, A.; SUTTER, E.; BATZILL, M. Why is anatase a better photocatalyst than rutile? - Model studies on epitaxial TiO₂ films, **Scientific Reports**, v. 4, pp. 1 – 8, 2014.

MAGALHÃES, D.P.; FERRÃO FILHO, A.S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de sistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

MANSILLA, H. D.; YEBER, M. C.; FREER, J.; RODRÍGUEZ, J.; BAEZA, J. Homogeneous and heterogeneous advanced oxidation of a bleaching effluent from the pulp and paper industry. **Water Sci. Technol.** v.35, ed. 4, pp. 273 -278, 1997.

MASTEN, S. J.; DAVIES, S. H. The use of ozonation to degrade organic contaminants in wastewaters. **Environ. Sci. Technol.** v. 28, n. 4, pp. 180A–185A, 1994.

MATOZZO, V.; VALERIA BERTIN, V.; BATTISTARA, M.; GUIDOLIN, A.; MASIERO, L.; MARISA, I.; ORSETTI, A. Does the antibiotic amoxicillin affect

haemocyte parameters in nontarget aquatic invertebrates? The clam *Ruditapes philippinarum* and the mussel *Mytilus galloprovincialis* as model organisms. **Marine Environmental Research**. v. 119, pp. 51 - 58, 2016.

MATTHEWS, R. W. Hydroxylation reactions induced by near-ultraviolet photolysis of aqueous titanium dioxide suspensions. **J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1**, v. 80, p. 457-471, 1984.

MATTOS, V. L.; SHIRAISHI, K. A.; BRAZ, A. D.; FERNANDES, J. R. Peróxido de hidrogênio: importância e determinação. **Química Nova**, v.26, n.3, pp. 373-380, 2003.

Mechanism of photocatalyst. **Three Bond Technical News**. Nippon Jitsugyo Publishing Co Ltd, Documento técnico: TB6731, 2005.

MESSIHA, FS. Review: Fluoxetine adverse effects and drug-drug interactions. **Clin Toxicol.**, v. 31, pp. 603-630, 1993.

MIHAYLOV, B.V. HENDRIX, J. L., NELSON, J. H. Comparative catalytic activity of selected metal oxides and sulfides for the photo-oxidation of cyanide. **J. Photochem. Photobiol. A: Chem.**, v. 72, pp. 173 – 177, 1993.

MIKAMI, E., GOTO, T., OHNO, T., MATSUMOTO, H., NISHIDA, M. Simultaneous analysis of dehydroacetic acid, benzoic acid, sorbic acid and salicylic acid in cosmetic products by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. **J. Pharm. Biomed. Anal.** v. 28, pp. 261–267, 2002.

MIRANDA-GARCÍA, N; M. MALDONADO, I.; CORONADO, J. M.; B, MALATO, S. Degradation study of 15 emerging contaminants at low concentration by immobilized TiO₂ in a pilot plant. **Catal. Today**. v.151, n.1, pp. 107 - 113, 2010.

MITTLER, R.; ZILINSKAS, B. A. Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. **Plant Physiology** v. 97, n. 3, p. 962-968, 1991.

MME - Ministério de Minas e Energia – Secretaria de Geologia, Mineração e Transformação Mineral, Relatório Técnico – Perfil do Titânio, Consultor: Juarez Fontana dos Santos, 2010.

MOGHADASIAN, M. H. Minireview. Clinical pharmacology of 3-hidroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. **Life Sciences**, v. 65, n. 13, p. 1329-1337, 1999.

MULROY, A. Monitoring and Analysis of Water and Wastes, 2001 *apud* Nunes, B.; Verde, M. F.; Soares, A. M. V. M. Biochemical effects of the pharmaceutical drug paracetamol on *Anguilla anguilla*. **Environ. Science and Pollution Research**. v. 22, pp. 11574–11584, 2015.

MWH – MONTGOMERY WATSON HARZA. **Water treatment: principles and design**. 2. ed. Hoboken, NJ: Wiley, 2005.

NEUPARTH, T.; MARTINS, C.; DE LOS SANTOS, C. B., COSTA, M. H., MARTINS, I.; COSTA, P. M, SANTOS, M. M. Hypocholesterolaemic pharmaceutical simvastatin disrupts reproduction and population growth of the amphipod *Gammarus locusta* at the ng/L range. **Aquatic Toxicology**. v. 155, pp. 337–347, 2014.

NOGUEIRA, R. F. P.; JARDIM, W. F. A fotocatalise heterogênea e sua aplicação ambiental. **Quím. Nova.** v. 21, n.1, p. 69 - 72, 1998.

NOVÁKOVÁ, L.; SATÍNSKÝ, D.; SOLICH, P. HPLC methods for the determination of simvastatin and atorvastatin. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 4, pp. 352 – 367, 2008.

OKAMOTO, K.; YAMAMOTO, Y.; TANAKA, H.; TANAKA, M., ITAYA, A. Heterogeneous photocatalytic decomposition of phenol over TiO₂ powder. **Bull. Chem. Soc. Jpn**, v.58, pp. 2015-2022, 1985.

OLIVEIRA, A. F. F.; DE FIGUEIREDO, E.C.; DOS SANTOS-NETO, A. J. Analysis of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma by liquid-phase microextraction and injection port derivatization GC–MS. **J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, V. 73, PP. 53– 58, 2013.

OLIVEIRA, A. R. M.; WOSCH, C. L. Ozonólise: A Busca Por Um Mecanismo. **Quim. Nova**, v. 35, pp. 1482 - 1485, 2012.

OMS. **Organização Mundial de Saúde**. Segurança dos medicamentos: um guia para detectar e notificar reações adversas a medicamentos. Brasília: OPAS/OMS; 2004. 18 p.

O'SHEA, B. Antidepressants: user and attitudes among consultant psychiatrists. **J. Psychosocial Med.** v. 8, pp.167-70, 1991.

PALMA, J.M.; JIMÉNEZ, A.; SANDALIO, L. M.; CORPAS, F. J.; LUNDQVIST, M.; GÓMEZ, M.; SEVILLA, DEL RÍO, L. A. Antioxidative enzymes from chloroplasts, mitochondria, and peroxisomes during leaf senescence of nodulated pea plants. **J. Experimental Botany**, v. 57, pp. 1747–1758, 2006.

PAN, X.; DENG, C.; ZHANG, D.; WANG, J.; MU, G.; CHEN, Y. Toxic effects of amoxicillin on the photosystem II of *Synechocystis* sp. characterized by a variety of in vivo chlorophyll fluorescence tests. **Aquatic Toxicology**, v. 89, pp. 207–213, 2008.

PARK, J.-S.; BROWN, M.T.; HAN, T. Phenol toxicity to the aquatic macrophyte *Lemna Paucicostata*. **Aquat. Toxicol.** v. 106-107, pp. 182-188, 2012.

PARMON, V.; EMELINE, A. V.; SEPONE, N. Glossary of terms in photocatalysis and radiocatalysis. **Intern. J. Pjotoenergy**, v. 4, pp. 91 -131, 2002.

PATERAKIS, N. ; CHIU, T.Y. ; KOH, Y.K.K. ; LESTER, J.N. ; MCADAM, E.J.; SCRIMSHAW, M.D. ; SOARES, A. ; CARTMELL, E. The effectiveness of anaerobic digestion in removing estrogens and nonylphenol ethoxylates. **J. Hazard Mater.** v. 199–200, pp. 88–95, 2012.

PEDROUZO, M.; BORRULL, F.; POCURULL, E.; MARCÉ, R.M. Presence of pharmaceuticals and hormones in waters from sewage treatment plants. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 217, n. 1-4, p. 267-281, 2011.

PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANA, R.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, M. A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, n.3, p.137-143, 1999.

PENG, L.; CHEN, X.; XU, Y.; LIU, Y.; GAO, S. H.; NI, B. J. Biodegradation of pharmaceuticals in membrane aerated biofilm reactor for autotrophic nitrogen removal: A model-based evaluation. **Journal of Membrane Science**, v. 494, pp. 39 - 47, 2015.

PERA-TITUS, M.; GARCÍA-MOLINA, V.; BAÑOS, M. A.; GIMÉNEZ, J.; ESPLUGAS, S. Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation processes: a general review. **Applied Catalysis B: Environ.**, v.47, pp.219 - 256, 2004.

PETERS, J. R.; GRANEK, E. F. Long-term exposure to fluoxetine reduces growth and reproductive potential in the dominant rocky intertidal mussel, *Mytilus californianus*. **Science of the Total Environ.**, v. 545, n. 546, pp. 621–628, 2016.

PETROVIC, M. BARCELÓ, D. Liquid chromatography–mass spectrometry in the analysis of emerging environmental contaminants. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 385, pp. 422, 2006.

PIECHA, M.; SARAKHA, M.; TREBSE, P. Photocatalytic degradation of cholesterol-lowering statin drugs by TiO₂-based catalyst. Kinetics, analytical studies and toxicity evaluation. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 213, pp. 61–69, 2010.

POLO, A. M. S.; LÓPEZ-PEÑALVER, J. J.; SÁNCHEZ-POLO, M.; RIVERA-UTRILLA, J. VELO-GALA, I.; SALAZAR-RÁBAGO, J. J. Oxidation of diatrizoate in aqueous phase by advanced oxidation processes based on solar radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v.319–320, pp. 87–95, 2016.

POMATI, F.; NETTING, A. G.; CALAMARI, D.; NEILAN, B. A. Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis* sp. and *Lemna minor*. **Aquatic Toxicology**, v. 67 pp. 387–396, 2004.

PORRA, R.J.; THOMSON, W.A.; KRIEDEMANN, P.E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, pp. 384-394, 1989.

PRUDEN, A. Balancing Water Sustainability and Public Health Goals in the Face of Growing Concerns about Antibiotic Resistance. **Environ. Sci. Technol.**, v. 48, pp. 5–14, 2014.

RADIĆ, S, STIPANICEV, D, CVJETKO, P, MARIJANOVIC, R. M, SIRAC S, PEVALEK-KOZLINA, B, PAVLICA, M. Duckweed *Lemna minor* as a tool for testing toxicity and genotoxicity of surface waters. **Ecotox Environ Safe**, v. 74, pp. 182–187, 2011.

RAJESHWAR, K. Photoelectrochemistry and the environment. **J. Appl. Electrochem**, v.25, n.12, pp. 1067 - 1082, 1995.

RAZAVI, B.; SONG, W.; SANTOKE, H.; COOPER, W. J. Treatment of statin compounds by advanced oxidation processes: Kinetic considerations and destruction mechanisms. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 80, pp. 453–461, 2011.

RENAME. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais**. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. 9ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

RIBANI, M., COLLINS, C.H., BOTTOLI, C.B.G. Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. **Journal of Chromatography A**, v. 1156, p. 201-205, 2007.

RIBEIRO, K.; ANDRADE, T. M.; FUJIWARA, S.T. Preparation and application of cellulose acetate/Fe films in the degradation of Reactive Black 5 dye through photo-Fenton reaction. **Environmental Technology**, v. 37, pp. 1664 - 1675, 2016.

RIBEIRO, S.; TORRES, T.; MARTINS, R.; SANTOS, M. M. Toxicity screening of Diclofenac, Propranolol, Sertraline and Simvastatin using *Danio rerio* and *Paracentrotus lividus* embryo bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 114, pp. 67–74, 2015.

RIBO, J. M. Interlaboratory Comparison Studies of the Luminescent Bacteria Toxicity Bioassay. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, v. 12, pp. 283 - 294, 1997.

RIVAS, F. J.; BELTRÁN, F. J.; ENCINAS, A. Removal of emergent contaminants: Integration of ozone and photocatalysis. **J. Environmental Management**, v. 100, pp.10 -15, 2012.

RODIL, R., QUINTANA, J.B., CONCHA-GRAÑA, E., LÓPEZ-MAHÍA, P., MUNIATEGUI-LOORENZO, S., PRADA-RODRÍGUEZ, D. Emerging pollutants in sewage, surface and drinking water in Galicia (NW Spain). **Chemosphere**, v. 86, pp. 1040–1049, 2012.

ROMAN, M. WINTER, W.T. Effect of Sulfate Groups from Sulfuric Acid Hydrolysis on the Thermal Degradation Behavior of Bacterial Cellulose. **Biomacromolecules**, v. 5, pp. 1671–1677, 2004.

RONCO, A.; BÁEZ, M. C. D.; GRANADOS, Y.P. **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas – estandarización, intercalibración, resultados e aplicaciones**. 2004, 190p.

ROSI-MARSHALL, E. J.; ROYER, T. V. Pharmaceutical compounds and ecosystem function: an emerging research challenge for aquatic ecologists. **Ecosystems**, v. 15, pp. 867 – 880, 2012.

RxList – The Internet Drug Index. Top 200 Drugs, U.S. Only, 2007; WebMD; Disponível em <<http://www.rxlist.com/script/main/art.asp?articlekey=109757>> Acesso em: 24 ago 2016.

SAMPAIO, M. J.; SILVA, C.G.; SILVA, A. M.T.; VILAR, V. J. P.; BOAVENTURA, R.A.R.; FARIA, J. L. Photocatalytic activity of TiO₂-coated glass raschig rings on the degradation of phenolic derivatives under simulated solar light irradiation. **Chemical Engineering Journal**, v. 224, n. 15, pp. 32 – 38, 2013.

SCHRIKS, M.; HERINGA, M. B.; VAN DER KOOI, M. M. E.; VOOGT, P.; VAN WEZEL, A. P. Toxicological relevance of emerging contaminants for drinking water quality. **Water Res.**, 44, 461, 2010.

SCHUMACHER, B. A. **Methods for determination of Total Organic Carbon (TOC) in soils and sediments**. Las Vegas: US. Enviromental Protection Agency, 2002.

SEILER, J. P. Pharmacodynamic activity of drugs and ecotoxicology—can the two be connected? **Toxicology Letters**, v. 131, pp. 105 – 115, 2002.

SERNA-GALVIS, E. A.; SILVA-AGREDO, J.; GIRALDO-AGUIRRE, A. L.; TORRES-PALMA, R. A. Sonochemical degradation of the pharmaceutical fluoxetine: Effect of parameters, organic and inorganic additives and combination with a biological system. **Science of the Total Environment**, v. 524-525, pp.354-360, 2015.

SHEN, Y.S., KU, Y., LEE, K.C. The effect of light absorbance on the decomposition of chlorophenols by ultraviolet radiation and UV/H₂O₂ processes. **Water Res.** v.29, pp. 907 - 914, 1995.

SHIM, I. W.; CHOI, S.; NOH, W. T.; KWON, J.; CHO, J. Y.; CHAE, D. Y.; KIM, K. S. Preparation of Iron Nanoparticles in Cellulose Acetate Polymer and Their Reaction Chemistry in the Polymer. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 22, pp.772-774, 2001.

SILVA, L. J.G.; MARTINS, M. C.; PEREIRA, A. M. P.T.; MEISEL, L. M.; GONZALEZ-REY, M.; BEBIANNO, M. J.; LINO, C. M.; PENA, A. Uptake, accumulation and metabolization of the antidepressant fluoxetine by *Mytilus galloprovincialis*. **Environmental Pollution**, v. 213, pp. 432 – 437, 2016.

SIMS, D.A., GAMON, J.A. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. **Remote Sens. Environ.** v. 81, pp. 337–354, 2002.

SIMSEK, E. B. Solvothermal synthesized boron doped TiO₂ catalysts: Photocatalytic degradation of endocrine disrupting compounds and pharmaceuticals under visible light irradiation. **Applied Catalysis B: Environ.**, v. 200, pp. 309–322, 2017.

SIRTORI, C; LÓPEZ, A. M. A; RODRÍGUEZ, S.M. **Evaluación analítica de procesos de transformación biológica, fotoquímica y fotocatalítica de fármacos en agua**. Ciemat - Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, 2010.

SOARES, O.S.G.P.; ROCHA, R.P.; ALVES.; A.G. FIGUEIREDO, G J.L. J.J.M. ÓRFÃO, M.F.R. PEREIRA. Highly active N-doped carbon nanotubes prepared by an easy ball milling method for advanced oxidation processes. **Applied Catalysis B: Environmental**. v. 192, pp. 296–303, 2016.

SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Occurrence of Emerging Contaminants in Brazilian Drinking Waters: A Sewage-To-Tap Issue. **Water Air Soil Pollut.** v. 206, p.57, 2010.

TANAKA, K.; HISANAGA, T. Photodegradation of chlorofluorocarbon alternatives on metal oxide. **Sol. Energy**, v. 52, n. 5, pp. 447 – 450, 1994.

TEIXEIRA, C. P. A. B.; JARDIM, W. F. **Caderno temático – Processos Oxidativos Avançados, Conceitos Teóricos.** v. 3. 2004. Disponível em <<http://lqa.iqm.unicamp.br/cadernos/caderno3.pdf>> Acesso em 14 jul. 2014.

THIER, H.P., ZEUMER, H. Manual of Pesticide Residue Analysis, v. 2, Cleanup Method 6. Weinheim, VCH, Verlagsgesellschaft, 1992, p. 31 - 36.

Titanium-Oxide Photocatalyst. **Three Bond Technical News.** Nippon Jitsugyo Publishing Co Ltd, 62, January, 01, 2004.

TRAN, H. T. T.; KOSSLICK, H.; IBAD, M. F.; FISCHER, C.; BENTRUP, U.; VUONG, T. H.; NGUYEN, L. Q.; SCHULZ, A. Photocatalytic Performance of Highly Active Brookite in the Degradation of Hazardous Organic Compounds Compared to Anatase and Rutile. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 200, pp. 647–658, 2017.

TROVÓ, A.G.; NOGUERIA, R.F.; AGÜERA, A.; FERNANDEZ-ALBA, A.R.; MALATO, S. Degradation of the antibiotic amoxicillin by photo-fenton process-chemical and toxicological assessment. **Water Res.** v. 45, pp.1394–1402, 2011.

TRUHAUT, R. Can permissible levels of carcinogenic compounds in the environment be envisaged? **Critical remarks. Ecotoxicology and environmental safety**, pp.31 -37, 1977.

URUC- PARLAK, K.; YILMAZ, D. D. Ecophysiological tolerance of Lemna gibba L. exposed to cadmium. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 91, pp. 79 – 85, 2013.

US – Food and Drug Administration - FDA. Disponível em <<http://www.fda.gov/>> Acesso em: 24 ago 2016.

US EPA. Environmental Protection Agency. EPA 712- C-96-114.OPPTS 850.1010 **Aquatic invertebrate toxicity test, freshwater daphnids: ecological effects test guidelines.** Washington. USA, 1996.

US EPA. Environmental Protection Agency. EPA-821-R-02-1. **Methods for measuring the acute toxicity** of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 5 ed. Washington. USA, 2002.

US EPA. Environmental Protection Agency. **Technical overview of ecological risk assessment analysis phase: ecological effects characterization U. S. Environ. Prot. Agency.** Disponível: <<https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/technical-overview-ecological-risk-assessment-0>> Acesso em 07 dez 2017.

VALCÁRCEL, Y.; GONZÁLEZ ALONSO, S.; RODRÍGUEZ-GIL, J. L.; ROMO MAROTO, R. GIL, A.; CATALÁ, M. Analysis of the presence of cardiovascular and analgesic-antiinflammatory- antipyretic pharmaceuticals in river-and drinking-water of the Madrid Region in Spain. **Chemosphere**, 82, 1062, 2011.

VALENTIM, A. C. S.; DEZOTTI, M. Ensaios de Toxicidade. In: DEZOTTI, M. **Processos e Técnicas para o Controle Ambiental de Efluentes Líquidos**, Rio de Janeiro: E-Papers, p. 309-356, 2008.

WALLACE, B.; PURCELL, M.; FURLONG, J. Total organic carbon analysis as a precursor to disinfection by products in potable water: oxidation technique considerations. **J. Environ. Monit.**, v. 4, pp. 35-42, 2002.

WANG, W. Literature review on duckweed toxicity testing. **Environ. Res.** v.52 pp. 7-22, 1990.

WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophyll a and chlorophyll b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **J. Plant Physiology**, v. 144, pp. 307-313, 1994.

WENK, J.; Von GUNTEN, U.; CANONICA, S. Effect of Dissolved Organic Matter on the Transformation of Contaminants Induced by Excited Triplet States and the Hydroxyl Radical. **Environmental Science and Technology**, v. 45, pp. 1334-1340, 2011.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance global report on surveillance**, 2014. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1> Acesso em: 09 mar. 2017.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **European standards for drinking-water**. Geneva: WHO, 1970.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for drinking water quality. First Addendum, 3a ed., vol. 1, 2006, Geneva, Suíça. Disponível em <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/pdf> Accessed 12 out. 2015.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for drinking water quality**. Geneva: WHO, 2006.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for drinking-water quality**. 2 ed. Geneva: WHO, 2004.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for drinking-water quality**. Geneva: WHO, 1995.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Model List of Essential Medicines. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML_2015_FINAL_amended_NOV2015.pdf?ua=1> Acesso: 09 mar. 2017.

XIE, H.; ZHANG, Q.; XI, T.; WANG, J.; LIU, Y. Thermal analysis on nanosized TiO₂ prepared by hydrolysis. **Thermochimica Acta**. v. 381, pp. 45 – 48, 2002.

XIONG, J. Q.; KURADE, M. B.; JEON, B. H. Can Microalgae Remove Pharmaceutical Contaminants from Water? **Trends in Biotechnology**, 36, 1, pp. 30 - 44, 2018.

YANG, D. J.; HWANG, L. S. Study on the conversion of three natural statins from lactone forms to their corresponding hydroxy acid forms and their determination in Pu-Erh tea. **Journal of Chromatography A**, v.1119, n. 1 pp. 277–284, 2006.

YANG, L. YU, L. E.; RAY, M. B. Degradation of paracetamol in aqueous solutions by TiO₂ photocatalysis. **Water Research**, v. 42, pp. 3480 – 3488, 2008.

ZABAR, R.; SARAKHA, M.; LEBEDEV, A. T.; Olga V. POLYAKOVA, O. V.; TREBSE, P. Photochemical fate and photocatalysis of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol, degradation product of chlorpyrifos. **Chemosphere**, v. 144, pp. 615–620, 2016.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática – Princípios e Aplicações**. Editora Rima, São Carlos, 2006.

ZHANG, D.; GERSBERG, R. M.; NG, J. W.; TAN, S.K. Removal of pharmaceuticals and personal care products in aquatic plant-based systems: A review. **Environ. Pollut.** v. 184, pp. 620-639, 2014a.

ZHANG, J.; ZHOU, P.; LIU, J.; YU, J. New understanding of the difference of photocatalytic activity among anatase, rutile and brookite TiO₂. **Phys. Chem. Chem. Phys.** v.16, pp. 20382–20386, 2014b.

ZHANG, S.; PANG, P. F.; WANG, C.; HAN, N.; LIU, B.; HAN, B.; LI, Y.; ANIM-LARBI, K. Antibiotic concentration and antibiotic-resistant bacteria in two shallow urban lakes after stormwater event. **Environ. Sci. Pollut. Res.** v. 23, pp. 9984 – 9992, 2016b.

ZHANG, T.; PAN, G.; ZHOU, Q. Temperature effect on photolysis decomposing of perfluorooctanoic acid. **J. Environ. Sciences**. v. 42, pp. 126 – 133, 2016a

ZHANG, Y. NOSAKA, Y. Mechanism of the OH Radical Generation in Photocatalysis with TiO₂ of Different Crystalline Types. **J. Phys. Chem. C**, v.118, pp. 10824–10832, 2014.

ZHANG, Y.; ZHUANG, Y.; GENG, J.; REN, H.; XU, K.; DING, L. Reduction of antibiotic resistance genes in municipal wastewater effluent by advanced oxidation processes. **Science of the Total Environment**, v. 550, pp.184-191, 2016.

ZHANG, Z.; FENG, Y.; GAO, P.; WANG, C.; REN, N. Occurrence and removal efficiencies of eight EDCs and estrogenicity in a STP. **J. Environ. Monitoring**, v. 13, n. 5, pp. 1366-1373, 2011.

ZHAO, S.; XU, J.; ZHONG, X. B. Kinetic study on the photo-catalytic degradation of pyridine in TiO₂ suspension systems. **Catal. Today**. v. 93, pp. 857 – 861, 2004.

ZHAO, Y.; YU, G.; CHEN, S.; ZHANG, S.; WANG, B.; HUANG, J.; DENG, S.; WANG, Y. Ozonation of antidepressant fluoxetine and its metabolite product norfluoxetine: Kinetics, intermediates and toxicity. **Chemical Engineering Journal**, v. 316, pp. 951– 963, 2017.