UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANTIANDROGÊNIOS EM EFLUENTE HOSPITALAR: EXTRAÇÃO COM BARRAS POLIMÉRICAS, QUANTIFICAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS E SUBPRODUTOS, PROPOSIÇÃO DE ROTAS DE DEGRADAÇÃO POR PROCESSOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO

TESE DE DOUTORADO

Carla Geane Brandenburg Brenner

Santa Maria, RS, Brasil

2013

ANTIANDROGÊNIOS EM EFLUENTE HOSPITALAR: EXTRAÇÃO COM BARRAS POLIMÉRICAS, QUANTIFICAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS E SUBPRODUTOS, PROPOSIÇÃO DE ROTAS DE DEGRADAÇÃO POR PROCESSOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO

Carla Geane Brandenburg Brenner

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutora em Química.

Orientador: Prof. Emérito Tit. Dr. Ayrton Figueiredo Martins

Santa Maria, RS, Brasil

2013

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química

Comissão Examinadora, abaixo assinada aprova a Tese de Doutorado

ANTIANDROGÊNIOS EM EFLUENTE HOSPITALAR: EXTRAÇÃO COM BARRAS POLIMÉRICAS, QUANTIFICAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS E SUBPRODUTOS, PROPOSIÇÃO DE ROTAS DE DEGRADAÇÃO POR PROCESSOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO

elaborada por
Carla Geane Brandenburg Brenner

como requisito parcial da obtenção do grau de
Doutora em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

_____

Ayrton Figueiredo Martins, Prof. Emérito Dr.
(Orientador/Presidente)

_____

Osmar Damian Prestes, Prof. Dr. (UFSM)

_____

Marcio Antonio Mazutti, Prof. Dr. (UFSM)

_____

Daniel Ricardo Arsand, Prof. Dr. (IFFSul)

_____

Sandro Rogério Giacomelli (URI)

Santa Maria, 12 de abril de 2013.

Dedicatória

Dedico esta tese de doutorado à minha amada filha Dariéle que é meu anjo, minha luz e aos meus pais Adenir e Nilze Brenner.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Emérito Ayrton Figueiredo Martins pela oportunidade, conselhos e orientação ao longo deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES financiadora desta dissertação.

Aos Professores Martha Bohrer Adaime, Osmar Damian Prestes, Ednei Gilberto Primel e Djalma da Silveira pela participação e sugestões no exame de qualificação.

Aos Professores Osmar Damian Prestes, Marcio Antonio Mazutti, Daniel Ricardo Arsand pela participação e sugestões na banca de defesa.

Ao Prof. José Neri Paniz pela ajuda com as lâmpadas-UV.

Ao Prof. Aleir De Paris pela cessão do Microscópio Eletrônico de Varredura.

Ao funcionário eletrotécnico Paulino pelas colaborações.

Ao Ademir e a Valéria funcionários da coordenação do PPGQ.

Aos colegas e amigos do LATER.

Em especial as amigas Francieli Martins Mayer e Daiane Skupin, pela ajuda, pelos conselhos, pelas noites trabalhando juntas e, por nossa grande amizade que vai além do coleguismo.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

Aos meus pais, e, a minha filha pelo incentivo, amor, carinho e compreensão.

Aos demais familiares que sempre me incentivaram.

E a Deus por me dar coragem, força e perseverança para superar momentos difíceis.

Qualquer que seja o grau de nosso desenvolvimento, quaisquer que sejam as alturas onde possamos chegar, há sempre cimos mais elevados que havemos de atingir mais tarde. Trabalhemos, pois, sempre pelo nosso desenvolvimento."

(Henri Durville)

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

ANTIANDROGÊNIOS EM EFLUENTE HOSPITALAR: EXTRAÇÃO COM BARRAS POLIMÉRICAS, QUANTIFICAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS E SUBPRODUTOS, PROPOSIÇÃO DE ROTAS DE DEGRADAÇÃO POR PROCESSOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO

AUTORA: Carla Geane Brandenburg Brenner
ORIENTADOR: Ayrton Figueiredo Martins
Santa Maria, 12 de abril de 2013.

Neste trabalho foram desenvolvidos métodos para a determinação de antiandrogênios em efluente hospitalar utilizando-se a técnica analítica de HPLC-DAD. Técnicas de microextração de Espironolactona, Flutamida, Ciproterona e Tamoxifeno foram investigadas: líquido-líquido (LLME) e extração sortiva (SBSE). Para a quantificação dos analitos em efluente hospitalar foi usada extração em fase sólida (SPE) com recuperações de 75,0-109,0±1,0-13,0%, em solução aquosa, e de 72,0-106,0±2,0-13,0%, em efluente hospitalar. As concentrações médias dos analitos no efluente do pronto atendimento (PA) e geral-HUSM variaram de 0,00-11,70 μg L^{-1} (RSD 0,00-11,5%) e 0,00-11,30 μg L^{-1} (RSD 0,00-6,78%), respectivamente. A técnica de LC-ESI-MS/MS foi utilizada na fragmentação dos íons precursores, na identificação dos íons-produto e perda de massa neutra. LC-ESI-QqLIT-MS/MS foi usada na identificação de metabólitos e no estudo dos subprodutos. Fotorreator STR de 800 mL foi usado para fotólise simples e fotocatálise heterogênea e, para ozonização, reator tipo coluna de 800 mL. Planejamento fatorial fracionado foi aplicado nos experimentos de extração, bem como, de PAOs. Radiação UV foi gerada com lâmpada de vapor de mercúrio de 125 W e 401 W m^{-2}. Barras poliméricas de polidimetilsiloxano e poliuretano com TiO_2 suportado foram desenvolvidas para a fotocatálise. Estudos cinéticos das reações de degradação foram feitos, subprodutos foram identificados e rotas de fragmentação propostas. Metabólitos foram identificados no efluente hospitalar. Análise preliminar de risco revelou que a espironolactona apresenta menor risco ambiental e que todos os analitos, exceto tamoxifeno, apresentam valor de PEC > 0,01 μg L^{-1}.

Palavras-chave: Efluente hospitalar, Antiandrogênios; Microextração; Cromatografia Líquida; Metabólitos; PAOs; Subprodutos; Avaliação de risco.

ABSTRACT

PhD Thesis
Chemistry Pos-Graduation Program
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

ANTIANDROGENS IN HOSPITAL EFFLUENT: EXTRACTION WITH POLYMER BARS, QUANTIFICATION, IDENTIFICATION OF METABOLITES AND SUBPRODUCTS AND PROPOSITION OF DEGRADATION ROUTES BY ADVANCED OXIDATION PROCESSES

AUTHOR: CARLA Carla Geane Brandenburg Brenner
ADVISER: Ayrton Figueiredo Martins
Santa Maria, April 12, 2013.

In this work, methods were developed for the determination of antiandrogens in hospital effluent using the analytical technique HPLC-DAD. Microextraction techniques of Spironolactone, Flutamide, Cyproterone and Tamoxifen were investigated: liquid-liquid (LLME) and sorptive extraction (SBSE). For quantification of the analytes in hospital effluent was used solid phase extraction (SPE) with recoveries of 75.0 to 109.0±1.0 to 13.0% in aqueous solution and from 72.0 to 106.0±2.0 to 13.0% in hospital effluent. The average concentrations of analytes in the effluent of emergency (PA) ranged from 0.00 to 11.70 μg L^{-1} (RSD 0.00 to 11.5%) and of general-HUSM 0.00 to 11.30 μg L^{-1} (0.00 to 6.78% RSD), respectively. LC-ESI-MS/MS technique was used for fragmentation of the precursor ions, to identify product ions, and for neutral mass loss. LC-ESI-QqLIT-MS/MS was used to identify metabolites and subproducts. STR photoreactor of 800 mL was used for simple photolysis and heterogeneous photocatalysis, and for ozonation, column reactor of 800 mL. Fractional factorial design was applied to the extraction experiments, as well as, to AOPs. UV-radiation was generated by mercury vapor lamp of 125 W and 401 W m^{-2}. Polymer bars of polydimethylsiloxane and polyurethane with TiO_2 supported were developed for photocatalysis. Kinetic studies of the degradation reactions were made, subproducts were identified and fragmentation routes proposed. Metabolites were identified in hospital effluent. Preliminary risk analysis revealed that spironolactone has lower environmental risk, and that all analytes except tamoxifen, show PEC value > 0.01 μg L^{-1}.

Keywords: Hospital effluent; Antiandrogens; Microextraction; Liquid Chromatography; Metabolites; AOPs; Subproducts; Risk Assessment.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1- Caminho dos contraceptivos orais no meio ambiente. Adaptado de: BESSE e GARRIC, 2009 e LIU et al., 2011. 9
Figura 2– Hospital Universitário de Santa Maria – HUSM. 18
Figura 3 – Representação esquemática do sistema de tratamento de efluentes adotado pelo HUSM: (a) fossa séptica conjugada a (b) filtro anaeróbio. Fonte: DA SILVA, 2012; WILDE, 2012. 18
Figura 4 – Fluxograma experimental. 23
Figura 5 – Organograma do sistema de esgotos, sistema de tratamento de efluentes do HUSM e pontos de amostragem. 25
Figura 6 - Sistema de esgoto UFSM-HUSM, pontos de amostragem. (A) Ponto de amostragem PA-HUSM. (B) Ponto de amostragem efluente geral. 26

CAPÍTULO 2 - Desenvolvimento do Método HPLC-DAD e Técnicas de Extração

Figura 1 – Estrutura molecular do PU (a) e PDMS (b) 37
Figura 2 - Fluxograma do procedimento SPE/*clean up* aplicado nas determinações EFCT com HPLC-DAD..... 43
Figura 3 - Processo de microextração líquido-líquido: solução aquosa/efluente e solventes submetidos à agitação (1); solução aquosa/efluente é removida (2 e 3) e o solvente contendo os analitos (4) é evaporado em fluxo de nitrogênio (5); os analitos são reconstituídos em metanol (6) 44
Figura 4 - Materiais utilizados no preparo das barras extratoras de PDMS e PU..... 45
Figura 5 – (a) Esquema das barras PDMS e PU para otimização da SBSE de EFCT em solução aquosa e em efluente hospitalar; (b) foto das barras de PDMS e (c) PU..... 46
Figura 6 – Representação esquemática da otimização da SBSE de EFCT em solução aquosa e em efluente hospitalar utilizando barras de PU (7 mm, ϕ 3,5 mm). (a) processo de adsorção dos analitos na fase extratora e (b) processo de dessorção em solvente..... 47
Figura 7 – Cromatogramas HPLC-DAD dos analitos EFCT. (A) EFCT/254 nm. (B) FCT/280 nm..... 49
Figura 8 - Diagramas de Pareto para LLME de EFC em solução aquosa 56
Figura 9 – Diagramas de Pareto para LLME de EFC em efluente hospitalar 58
Figura 10 – Diagramas de Pareto para SBSE de EFCT em solução aquosa 61
Figura 11 – Diagramas de Pareto para SBSE de EFCT em efluente hospitalar..... 62

CAPÍTULO 3 - Determinação de EFCT em Efluente Hospitalar e Avaliação Preliminar de Riscos

Figura 1 – Concentrações de EFCT determinadas no efluente PA-HUSM 76
Figura 2 – Concentrações de EFCT determinadas no efluente geral HUSM. 77

CAPÍTULO 4 - Aplicação de Processos Avançados de Oxidação e Estudo Cinético

Figura 1 – Mecanismo simplificado para a fotoativação do catalisador TiO_2 (e^-: elétron fotogerado na banda de condução; h^+: lacuna gerada na banda de valência; RX_{ads}: substrato; $RX^{\bullet+}_{ads}$: substrato oxidado). Fonte: HERRMANN, 2010; b-DA SILVA, 2012. 58
Figura 2 – Mecanismo de ozonização reação direta e indireta. R: produto de reação; M: micropoluente; S: Sequestrante de radicais. Adaptado de: GOTTSCHALK et al., 2000..... 91
Figura 3 – Materiais utilizados no preparo das barras de TiO_2 imobilizado em polímeros. Modificado de: (DA SILVA, 2012)..... 95
Figura 4– (a) Esquema da barra de TiO_2 imobilizado em polímeros produzida em laboratório para a aplicação de PAOs; (b) foto das barras de PDMS/TiO_2. Fonte: (DA SILVA, 2012)... 96
Figura 5 – (1) Reator tanque agitado artesanal utilizado na aplicação de PAOs. (2) Barras poliméricas, com TiO_2 suportado, em volta do tubo de quartzo. (3) Esquema representativo do sistema fotocatalítico: (a) reator; (b) barras poliméricas com TiO_2 suportado; (c) lâmpada UV com tubo protetor de quartzo; (d) termômetro digital; (e) bomba dosadora; (f) reservatório com água gelada; (g) entrada e (h) saída de água; (i) agitador magnético; (j) amostragem; (k) rolha de silicone. Fonte: (DA SILVA, 2012). 98
Figura 6 - Sistema de ozonização. (1) compressor de ar; (2) tubo secante (GAC + $CaCl_2$ + sílica gel); (3) gerador de ozônio; (4) Reator tipo coluna (h = 81 cm, ∅i = 4 cm), (5) destruição do ozônio excedente (solução KI 10g L^{-1}) e (6) GAC. No detalhe: (7) entrada e saída de água de resfriamento, (8) Termômetro, (9) Difusor de ozônio e (10) amostragem. Fonte: (WILDE, 2011). 100
Figura 7 – Micrografia eletrônica de varredura de TiO_2 suportado em (a) PDMS e (b) PU. Vista interna (corte vertical) das barras poliméricas com TiO_2. Fonte: (DA SILVA, 2012)..... 104
Figura 8 – Desempenho da fotólise na degradação de EFCT em solução aquosa. Condições: pH 5, 30 °C. (a) Somente fotólise; (b) Fotocatálise TiO_2 em suspensão; (c) fotocatálise PDMS/TiO_2 e (d) fotocatálise PU/TiO_2. 105
Figura 9 – Desempenho da fotólise na degradação de EFCT em efluente hospitalar. Condições: pH 5, 30 °C.(a) Somente fotólise; (b) Fotocatálise TiO_2 em suspensão; (c) fotocatálise PDMS/TiO_2 e (d) fotocatálise PU/TiO_2. 106
Figura 10 – Espectro de emissão da lâmpada de vapor de mercúrio usada na aplicação de POAs: (a) sem bulbo de proteção e (b) com o bulbo de proteção. Fonte: WILDE, 2006 apud SILVA, 2012. 110

Figura 11– Diagramas de Pareto para a degradação de EFCT em solução aquosa pela aplicação de fotólise e fotocatálise com TiO_2 suportado em barras PU/PDMS. (a) Espironolactona; (b) Flutamida; (c) Ciproterona e (d) Tamoxifeno. 111
Figura 12–Perfis para os valores preditos e a desejabilidade para os compostos EFCT em solução aquosa pela aplicação de fotólise e fotocatálise com TiO_2 suportado em barras PU/PDMS. (a) Espironolactona; (b) Flutamida; (c) Ciproterona e (d) Tamoxifeno. 112
Figura 13– Diagramas de Pareto para a degradação de EFCT em efluente hospitalar por meio de fotólise e fotocatálise com TiO_2 suportado em barras PU/PDMS. (a) Espironolactona; (b) Flutamida; (c) Tamoxifeno e (d)Ciproterona. 115
Figura 14–Perfis para os valores preditos e a desejabilidade para EFCT em efluente hospitalar pela aplicação de fotólise e fotocatálise com TiO_2 suportado em barras PU/PDMS. (a) Espironolactona; (b) Flutamida; (c) Ciproterona e (d) Tamoxifeno. 116
Figura 15– Gráfico da degradação dos compostos EFCT. (a) solução aquosa. Condições: 30 °C, pH9 e ausência de TiO_2 (Fotólise simples); (b) efluente hospitalar. Condições: 30 °C, pH 5 e barras de PU/TiO_2 + UV. 119
Figura 16– Cromatogramas da degradação de EFCT. (a) solução aquosa; (b) efluente hospitalar. 119
Figura 17– Gráficos do estudo cinético da degradação fotolítica de (a) espironolactona (b) flutamida (c) ciproterona e (d) tamoxifeno em solução aquosa por fotólise. 121
Figura 18 – Gráficos do estudo cinético da degradação de (a) Espironolactona (b) Flutamida (c) Ciproterona e (d) Tamoxifeno em efluente hospitalar. 123
Figura 19 - Gráfico da degradação dos compostos EFCT, em solução aquosa, pelo processo de ozonização. Condições: (a) pH 5; (b) pH 7 e (c) pH 9. 125
Figura 20 - Gráficos da degradação dos compostos EFCT em efluente hospitalar por processo de ozonização. Condições: (a) pH 5; (b) pH 7 e (c) pH 9. 126
Figura 21 - Gráficos da degradação dos compostos EFCT pelo processo de ozonização na condição otimizada (pH 5). (a) solução aquosa. (b) efluente hospitalar. 128
Figura 22 - Cromatogramas da degradação de EFCT pelo processo de ozonização na condição otimizada (pH 5). (a) solução aquosa; (b) efluente hospitalar. 129
Figura 23– Gráficos do estudo cinético da degradação de (a) espironolactona (b) flutamida (c) ciproterona e (d) tamoxifeno, em solução aquosa, por ozonização. 131
Figura 24– Gráficos do estudo cinético da degradação de (a) espironolactona (b) flutamida (c) ciproterona e (d) tamoxifeno em efluente hospitalar por ozonização. 132
Figura 25– Gráfico de barras comparativo das eficiências dos PAOs na degradação de EFCT nas matrizes solução aquosa e efluente hospitalar. [1]Solução aquosa; [2]Efluente hospitalar. ..134

CAPÍTULO 5 - Espectrometria de Massas: Metabólitos e Subprodutos

Figura 1 – Esquema da Espectrometria de massas de um sistema triplo quadrupolo. Adaptado de: (SKOOG et al., 2002). 140

Figura 2 – Diagrama dos tipos de espectrômetros de massas mais utilizados, com modos de introdução da amostra, fontes de íons, filtros de massas, detectores e processadores de dados 141
Figura 3 – Técnicas de introdução da amostra em fase líquida. 142
Figura 4 - Experimento de MS2 SCAN com injeção direta de padrões. (A) Espectro de massas de Espironolactona. (B) Espectro de massas da Ciproterona. (C) Espectro de massas de Tamoxifeno. (D) Espectro de massas de Flutamida. 152
Figura 5 - Experimento de MS2 SIM com injeção direta de padrões. (A) Espectro de massas do Tamoxifeno; (B) Espectro de massas de Flutamida. (C) Espectro de massas de Ciproterona. (E) Espectro de massas de Espironolactona. 153
Figura 6 - Experimento de ion produto pela injeção direta de padrões. (A) Espectro de massas da Espironolactona. (B)Espectro de massas da Flutamida. (C) Espectro de massas da Ciproterona. (D) Espectro de massas do Tamoxifeno 154
Figura 7 - Experimento de ion precursor pela injeção direta de padrões. (A) Espectro de massas da Espironolactona. (B) Espectro de massas da Ciproterona. (C) Espectro de massas da Flutamida. (E) Espectro de massas do Tamoxifeno. 155
Figura 8 - Experimento de Neutral Loss pela injeção direta de padrões. (A) Espectro de massas de Tamoxifeno; (B) Espectro de massas de Flutamida; (C) Espectro de massas de Ciproterona e (E) Espectro de massas de Espironolactona. 156
Figura 9 - Espectro de massas do experimento Q1 MS Scan. (a) Espironolactona; (b) Flutamida; (c) Ciproterona e (d) Tamoxifeno..... 158
Figura 10 - Espectro de massas do experimento EPI para espironolactona (solução padrão), com CE 33 V. 159
Figura 11 - (A) Estrutura resultante da espironolactona perdendo seu grupamento metil sulfóxido (B, C, D, E e F); estruturas propostas para seus íons produtos. 160
Figura 12 - Espectro de massas do experimento EPI para flutamida. 161
Figura 13 -(A) Estrutura da flutamida (B, C, D, E e F): estruturas propostas para seus íons produtos. 162
Figura 14 - Espectro de massas do experimento EPI para ciproterona. 163
Figura 15 - (A) Estrutura da ciproterona (B, C, D e E): estruturas propostas para seus íons produtos..... 163
Figura 16 - Espectro de massas do experimento EPI para tamoxifeno. 164
Figura 17 - (A) Estrutura do tamoxifeno (B, C, D e E): estruturas propostas para seus íons produtos. 165
Figura 18 - Espectros de massas PI referente ao produto de fragmentação do composto espironolactona *m/z* 107,0. (a) Espironolactona; (b) Flutamida; (c) Ciproterona e (d) Tamoxifeno. 166
Figura 19 - Espectro de massas NL. (a) espironolactona *m/z* 76.0 (341.0 – 265.0 = 76.0); (b) flutamida *m/z* 73.1 (275.0 – 201.9 = 73.1); (c) ciproterona *m/z* 60.0 (417.0 – 357.0 = 60.0); (d) tamoxifeno *m/z* 45.0 (372.2 – 327.2 = 45.0). 167
Figura 20 - Espectros de massas da espironolactona *m/z* 341.0. Experimento EMS + EPI. (a) PA-HUSM; (b) geral-HUSM. 169
Figura 21 - Estudo de fragmentação da espironolactona baseado nos espectros de massas EPI das amostras de efluente hospitalar. 170

Figura 22 - Espectro de massas da flutamida *m/z* 275.0. Experimento -EMS + (-EPI). (a) PA-HUSM; (b) geral-HUSM. 171
Figura 23 - Estudo da fragmentação da flutamida baseado nos espectros de massas das amostras de efluente hospitalar. 172
Figura 24 - Espectros de massas da ciproterona *m/z* 417.0. Experimento EMS + EPI, amostra efluente geral-HUSM. 173
Figura 25 - Estudo da fragmentação da ciproterona baseado nos espectros de massas da amostra de efluente hospitalar geral-HUSM. 174
Figura 26 - Espectros de massas do tamoxifeno *m/z* 372.0. Experimento EMS + EPI, amostra efluente PA-HUSM..... 175
Figura 27 - Estudo da fragmentação do tamoxifeno baseado nos espectros de massas da amostra de efluente hospitalar PA-HUSM..... 175
Figura 28 - Espectro de massas do metabólito 7-α-tiometil-Espironolactona *m/z* 389.0. Experimento EMS + EPI. (a) Amostra efluente PA-HUSM. (b) Amostra efluente geral-HUSM. 177
Figura 29 - Caminho de fragmentação para o metabólito 7-α-tiometil-Espironolactona. 178
Figura 30 - Espectro de massas do metabólito canrenoato de potássio *m/z* 397.0. Experimento PI (107.0). Amostra efluente PA-HUSM. 179
Figura 31 - Espectro de massas do metabólito canrenoato de potássio *m/z* 397.0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V. (a) Amostra efluente PA-HUSM. 180
Figura 32 - Caminho de fragmentação para o metabólito canrenoato de potássio. 181
Figura 33 - Espectro de massas do metabólito 6-β-hidroxi-7-α-tiometil-Espironolactona *m/z* 405.0, amostra efluente geral-HUSM. Experimento EMS + EPI. 182
Figura 34 - Caminho de fragmentação para o metabólito 6-β-hidroxi-7-α-tiometil-Espironolactona. 183
Figura 35 - Espectro de massas do metabólito 2-hidroxiflutamida *m/z* 291,2, amostra efluente PA-HUSM. Experimento EMS + (-EPI). 184
Figura 36 - Caminho de fragmentação para o metabólito 2-hidroxiflutamida. 185
Figura 37 - Espectro de massas do metabólito 4-nitro-3-(trifluorometil)fenilamina *m/z* 205,0, amostra efluente PA-HUSM. Experimento -EMS + (-EPI). 186
Figura 38 - Espectro de massas do metabólito Flu-3 *m/z* 221,0. Experimento - EMS + (-EPI). (a) PA-HUSM; (b) geral-HUSM. 187
Figura 39 - Espectro de massas do metabólito Flu-6 *m/z* 245.0. Experimento -PI (202.0). Amostra PA-HUSM. 187
Figura 40 - Espectro de massas do metabólito Flu-6 *m/z* 245.0. Experimento -PI (202,0) + (-EPI). (a) PA-HUSM; (b) geral-HUSM. 188
Figura 41 - Espectro de massas do metabólito Flu-6 *m/z* 245.0. Experimento - EMS + (-EPI). (a) PA-HUSM; (b) geral-HUSM. 189
Figura 42 - Caminho de fragmentação para o metabólito Flu-6. 190
Figura 43 - Espectro de massas do metabólito 15-hidroxi-Ciproterona *m/z* 419,97. Experimento EMS + EPI. 191
Figura 44 – Caminho de fragmentação para o metabólito 15-hidroxi-Ciproterona. 192
Figura 45 - Espectro de massas do metabólito 15-beta-hidroxi Ciproterona *m/z* 434.0. Experimento EMS + EPI. Amostra efluente PA-HUSM. 193

Figura 46 – Caminho de fragmentação para o metabólito 15-beta-hidroxi Ciproterona. 194
Figura 47 - Espectro de massas do metabólito NDTAM *m/z* 358.0. Experimento EMS + EPI. (a) PA-HUSM; (b) geral-HUSM. 196
Figura 48 – Caminho de fragmentação para o metabólito (NDTAM) 197
Figura 49 - Espectro de massas do metabólito N-desmetil-Tamoxifeno-d5 *m/z* 363.0, amostra efluente PA-HUSM. Experimento EMS + EPI com CE 10 V. 198
Figura 50 – Caminho de fragmentação para o metabólito N-desmetil-Tamoxifeno-d5. 199
Figura 51 - Espectro de massas do metabólito 4-OH-Tamoxifeno *m/z* 388.0. Experimento EMS + EPI. Amostra efluente PA-HUSM. 200
Figura 52 - Caminho de fragmentação para o metabólito 4-OH-Tamoxifeno. 200
Figura 53 - Espectro de massas do metabólito 4-OH-Tamoxifeno-d5 *m/z* 393.0. Experimento EMS + EPI. (a) PA-HUSM; (b) geral-HUSM. 201
Figura 54 - Caminho de fragmentação para o metabólito 4-OH-Tamoxifeno-d5. 202
Figura 55 - Espectro de massas do metabólito endoxifeno-d5 *m/z* 379.0. Experimento EMS + EPI. (a) PA-HUSM; (b) geral-HUSM. 204
Figura 56 - Caminho de fragmentação para o metabólito endoxifeno-d5. 205
Figura 57 - Espectro de massas do experimento PREC (107) com EC de 30 V. Subprodutos da Espironolactona em solução aquosa submetida à fotólise. 207
Figura 58 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Espironolactona *m/z* 343,0. Experimento PREC (107) + EPI com EC 30 V. Solução aquosa submetida à fotólise. 207
Figura 59- Estrutura molecular do subproduto da Espironolactona *m/z* 343,0..... 208
Figura 60 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Espironolactona *m/z* 105,0. Experimento PREC (107) + EPI com EC 10 V. Solução aquosa submetida à fotólise. 208
Figura 61 - Estrutura molecular do subproduto da Espironolactona *m/z* 205,0. 209
Figura 62 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Espironolactona *m/z* 135,0. Experimento PREC (107) + EPI com EC 10 V. Solução aquosa submetida à fotólise. 209
Figura 63 - Estrutura molecular dos fragmentos e do subproduto da Espironolactona *m/z* 135,0. 210
Figura 64 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Espironolactona *m/z* 107,0. Experimento PREC (107) + EPI com EC 10 V. Solução aquosa submetida à fotólise. 210
Figura 65 - Estrutura molecular dos fragmentos e do subproduto da Espironolactona *m/z* 107,0. 211
Figura 66 - Espironolactona e subprodutos de degradação identificados após a aplicação do processo de fotólise à solução aquosa do composto. 212
Figura 67 - Espectro de massas do experimento PREC (107) com EC de 30 V. Subprodutos da Espironolactona em efluente hospitalar submetido à fotocatálise heterogênea. 213
Figura 68 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Espironolactona *m/z* 357,0. Experimento PREC (107) + EPI com EC 30 V. Efluente hospitalar submetido à fotocatálise heterogênea. 213
Figura 69- Estrutura molecular do subproduto da Espironolactona *m/z* 357,0. 214
Figura 70 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Espironolactona *m/z* 343,0. Experimento PREC (107) + EPI com EC 30 V. Efluente hospitalar submetido à fotocatálise heterogênea. 214

Figura 71 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Espironolactona *m/z* 135,0. Experimento PREC (107) + EPI com EC 30 V. Efluente hospitalar submetido à fotocatálise heterogênea. 215
Figura 72 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Espironolactona *m/z* 107,0. Experimento PREC (107) + EPI com EC 30 V. Efluente hospitalar submetido à fotocatálise heterogênea. 215
Figura 73 - Espironolactona e subprodutos de degradação identificados após a aplicação do processo de fotocatálise heterogênea ao efluente hospitalar enriquecido do composto. 216
Figura 74 - Espectro de massas do experimento (PREC 107) com EC de 30 V. Subprodutos da Espironolactona em solução aquosa submetida à ozonização. 217
Figura 75 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Espironolactona *m/z* 357,0. Experimento PREC (107) + EPI com EC 10 V. Solução aquosa submetida à ozonização. ..217
Figura 76 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Espironolactona *m/z* 343,0. Experimento PREC (107) + EPI com EC 30 V. Solução aquosa submetida à ozonização. . 218
Figura 77 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Espironolactona *m/z* 135,0. Experimento PREC (107) + EPI com EC 10 V. Solução aquosa submetida à ozonização. . 219
Figura 78 - Espironolactona e subprodutos de degradação identificados após a aplicação do processo de ozonização à solução aquosa do composto. 220
Figura 79- Espectro de massas do experimento (PREC 107) com CE de 30 V. Subprodutos da Espironolactona em efluente hospitalar submetido à ozonização. 221
Figura 80 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Espironolactona *m/z* 375,0. Experimento PREC (107) + EPI com CE 10 V. Efluente hospitalar submetido à ozonização. 221
Figura 81 - Estrutura molecular do subproduto da Espironolactona *m/z* 375,0. 222
Figura 82 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Espironolactona *m/z* 343,0. Experimento PREC (107) + EPI com EC 10 V.Efluente hospitalar submetido à ozonização. 222
Figura 83 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Espironolactona *m/z* 135,0. Experimento PREC (107) + EPI com EC 10 V. Efluente hospitalar submetido à ozonização 223
Figura 84 - Espironolactona e subprodutos de degradação identificados após a aplicação do processo de ozonização ao efluente hospitalar enriquecido do composto. 223
Figura 85 - Espectro de massas do experimento -PREC (202) com EC -24 V. Subprodutos da Flutamida em solução aquosa submetida à fotólise. 224
Figura 86 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Flutamida *m/z* 284,0. Experimento -PREC (202) + EPI com EC -30 V. Solução aquosa submetida à fotólise. 224
Figura 87 - Estrutura molecular do subproduto da Flutamida *m/z* 284,0. 225
Figura 88 - Estrutura molecular do subproduto da Flutamida *m/z* 245,0. 225
Figura 89- Espectro de massas EPI do produto de degradação da Flutamida *m/z* 217,0. Experimento -PREC (202) + EPI com EC -24 V. Solução aquosa submetida à fotólise. ... 226
Figura 90 - Estrutura molecular do subproduto da Flutamida *m/z* 217,0. 226
Figura 91 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Flutamida *m/z* 202,0. Experimento -PREC (202) + EPI com EC -24 V. Solução aquosa submetida à fotólise. 227
Figura 92 - Estrutura molecular do subproduto da Flutamida *m/z* 202,0. 227

Figura 93 - Flutamida e subprodutos de degradação identificados após a aplicação do processo de fotólise aplicado à solução aquosa do composto. 228
Figura 94 - Espectro de massas do experimento -PREC (202) com CE de -24 V. Subprodutos da Flutamida em efluente hospitalar submetido à fotocatálise heterogênea. 229
Figura 95 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Flutamida *m/z* 230,0. Experimento -PREC (202) + EPI com CE -30 V. Efluente hospitalar submetido à fotocatálise heterogênea. 229
Figura 96 - Estrutura molecular do subproduto da Flutamida *m/z* 230,0. 230
Figura 97 - Flutamida e subprodutos de degradação identificados após a aplicação do processo de fotocatálise heterogênea aplicado ao efluente hospitalar enriquecido do composto. 230
Figura 98 - Espectro de massas do experimento -PREC (202) com EC -24 V. subprodutos da Flutamida em solução aquosa submetida à ozonização. 231
Figura 99- Espectro de massas EPI do produto de degradação da Flutamida *m/z* 232,0. Experimento -PREC (202) + EPI com EC -24 V. Solução aquosa submetida à ozonização. 231
Figura 100 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Flutamida *m/z* 202,0. Experimento -PREC (202) + EPI com CE -24 V. Solução aquosa submetida à ozonização. 232
Figura 101 - Flutamida e subprodutos de degradação identificados após a aplicação do processo de ozonização aplicado à solução aquosa do composto. 232
Figura 102 - Espectro de massas do experimento -PREC (202) com CE -24 V. Subprodutos da Flutamida em efluente hospitalar submetido à ozonização. 233
Figura 103 – Espectro de massas do experimento PREC (357) com CE de 30 V. Subprodutos da Ciproterona em solução aquosa submetida à fotólise. 234
Figura 104 – Espectro de massas EPI do produto de degradação da Ciproterona *m/z* 439,0. Experimento PREC (357) + EPI com CE 30 V. Solução aquosa submetida à fotólise. 234
Figura 105 - Estrutura molecular do subproduto da Ciproterona *m/z* 439,0. 235
Figura 106 – Espectro de massas EPI do produto de degradação da Ciproterona *m/z* 425,0. Experimento PREC (357) + EPI com CE 30 V. Solução aquosa submetida à fotólise. 235
Figura 107 - Estrutura molecular do subproduto da Ciproterona *m/z* 425,0. 236
Figura 108 – Espectro de massas EPI do produto de degradação da Ciproterona *m/z* 357,0. Experimento PREC (357) + EPI com EC 20 V. Solução aquosa submetida à fotólise. 236
Figura 109 – Estrutura molecular do subproduto da Ciproterona *m/z* 357,0. 237
Figura 110- Ciproterona e subprodutos de degradação identificados após a aplicação do processo de fotólise aplicado à solução aquosa do composto. 237
Figura 111 – Espectro de massas do experimento PREC (357) com CE de 30 V. Subprodutos da Ciproterona em efluente hospitalar submetido à fotocatálise heterogênea. 238
Figura 112 – Espectro de massas EPI do produto de degradação da Ciproterona *m/z* 439,0. Experimento PREC(357) + EPI com CE 20 V. Efluente hospitalar submetido à fotocatálise heterogênea. 238
Figura 113 – Espectro de massas EPI do produto de degradação da Ciproterona *m/z* 425,0. Experimento PREC (357) + EPI com CE 20 V. Efluente hospitalar submetido à fotocatálise heterogênea. 239

Figura 114 – Espectro de massas EPI do produto de degradação da Ciproterona *m/z* 357,0. Experimento PREC (357) + EPI com CE 30 V. Efluente hospitalar submetido à fotocatálise heterogênea. 239
Figura 115 – Espectro de massas do experimento PREC (357) com CE de 30 V. Subprodutos da Ciproterona em solução aquosa submetida à ozonização. 240
Figura 116 – Espectro de massas EPI do produto de degradação da Ciproterona *m/z* 413,0. Experimento PREC (357) + EPI com CE 30 V. solução aquosa submetida à ozonização. .. 241
Figura 117- Estrutura molecular do subproduto da Ciproterona *m/z* 413,0. 241
Figura 118 – Espectro de massas EPI do produto de degradação da Ciproterona *m/z* 375,0. Experimento PREC (357) + EPI com CE 30 V. solução aquosa submetida à ozonização. .. 242
Figura 119 - Estrutura molecular do subproduto da Ciproterona *m/z* 375,0. 242
Figura 120 – Espectro de massas EPI do produto de degradação da Ciproterona *m/z* 357,0. Experimento PREC (357) + EPI com CE 30 V. solução aquosa submetida à ozonização. .. 243
Figura 121 - Acetato de Ciproterona e subprodutos de degradação identificados após a aplicação do processo de ozonização à solução aquosa do composto. 243
Figura 122 – Espectro de massas do experimento PREC (357) com CE de 30 V. Subprodutos da Ciproterona em efluente hospitalar submetido à ozonização. 244
Figura 123 – Espectro de massas EPI do produto de degradação da Ciproterona *m/z* 415,0. Experimento PREC (357) + EPI com CE 30 V. Efluente hospitalar submetido à ozonização. 244
Figura 124 - Estrutura molecular do subproduto da Ciproterona *m/z* 415,0. 245
Figura 125 – Espectro de massas EPI do produto de degradação da Ciproterona *m/z* 375,0. Experimento PREC (357) + EPI com CE 20 V. Efluente hospitalar submetido à ozonização 245
Figura 126 – Espectro de massas EPI do produto de degradação da Ciproterona *m/z* 357,0. Experimento PREC (357) + EPI com EC 20 V. Efluente hospitalar submetido à ozonização. 246
Figura 127- Acetato de Ciproterona e subprodutos de degradação identificados após a aplicação do processo de ozonização ao efluente hospitalar enriquecido do composto. 247
Figura 128 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 371,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V. 247
Figura 129 - Estrutura molecular dos fragmentos originários do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 371,0. 248
Figura 130 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 354,0. Experimento EMS + EPI com EC 10 V. 248
Figura 131 - Estrutura molecular dos fragmentos originários do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 354. 249
Figura 132 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 362,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V. 249
Figura 133 - Estrutura molecular dos fragmentos originários do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 362. 250
Figura 134 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 385,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V. 250

Figura 135 - Estrutura molecular dos fragmentos originários do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 385,0. 251
Figura 136 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 369,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V. 251
Figura 137 - Estrutura molecular dos fragmentos originários do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 369,0 252
Figura 138 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 417,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V. 252
Figura 139 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 417,0. 253
Figura 140 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 408,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V. 253
Figura 141 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z*408,0. 254
Figura 142 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 356,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V. 254
Figura 143 - Estrutura molecular dos fragmentos originários do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 356,0. 255
Figura 144 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 389,0. Experimento EMS + EPI com EC 25 V. 255
Figura 145 - Estrutura molecular dos fragmentos originários do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 389. 256
Figura 146 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 229,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V. 256
Figura 147 - Estrutura molecular dos fragmentos originários do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 229,0. 257
Figura 148 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 393,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V. 257
Figura 149 - Estrutura molecular do fragmento e do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 393,0. 258
Figura 150 - Tamoxifeno e subprodutos de degradação identificados após a aplicação do processo de fotólise em solução aquosa. 258
Figura 151 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 389,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V. 259
Figura 152 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 354,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V. 260
Figura 153 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 369,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V 260
Figura 154 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 379,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V. 261
Figura 155 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z*407,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V. 261
Figura 156 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 412,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V. 262
Figura 157 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 412,0. 262

Figura 158 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 409,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V. 263
Figura 159 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 409,0. 263
Figura 160 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 434,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V. 264
Figura 161 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 434,0. 264
Figura 162 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 427,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V. 265
Figura 163 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 427,0. 265
Figura 164 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 425,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V. 265
Figura 165 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 425,0. 266
Figura 166 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 370,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V. 266
Figura 167 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 370,0. 267
Figura 168- Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 212,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V. 267
Figura 169 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 212,0. 267
Figura 170 - Tamoxifeno e subprodutos de degradação identificados após a aplicação do processo de fotocatálise heterogênea ao efluente hospitalar fortificado. 268
Figura 171 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 371,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V. 269
Figura 172 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 371,0. 269
Figura 173 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 354,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V. 270
Figura 174 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 363,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V. 270
Figura 175 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 363,0. 271
Figura 176 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 430,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V. 271
Figura 177 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 421,0. Experimento EMS + EPI com EC 25 V. 272
Figura 178 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 421,0. 272
Figura 179 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 420,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V. 273
Figura 180 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 420,0. 273
Figura 181 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 386,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V. 274
Figura 182 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 386,0. 274
Figura 183 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 350,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V. 275
Figura 184 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 350,0. 275
Figura 185 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 291,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V. 276

Figura 186 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 291,0. 276
Figura 187 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 210,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V. 277
Figura 188 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 210,0. 277
Figura 189 - Tamoxifeno e subprodutos de degradação identificados após a aplicação do processo de ozonização à solução aquosa. 278
Figura 190 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 354,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V. 279
Figura 191 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 369,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V. 280
Figura 192 - Estrutura molecular do fragmento e do subproduto do Tamoxifeno *m/z*369,0. 280
Figura 193 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 427,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V. 281
Figura 194 - Estrutura molecular do fragmento e do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 427,0. 281
Figura 195 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 430,0. Experimento EMS + EPI com EC 10 V. 282
Figura 196 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 383,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V. 282
Figura 197 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 383,0. 283
Figura 198 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 375,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V. 283
Figura 199- Estrutura molecular do fragmento e do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 375,0. 284
Figura 200- Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 353,0. Experimento EMS + EPI com EC 10 V. 284
Figura 201 - Estrutura molecular dos fragmentos e do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 353,0. 285
Figura 202 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 270,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V. 285
Figura 203 - Estrutura molecular do fragmento e do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 270,0. 286
Figura 204 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 204,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V. 286
Figura 205 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 204,0. 287
Figura 206 - Tamoxifeno e subprodutos de degradação identificados após a aplicação do processo de ozonização ao efluente hospitalar. 287

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL

Tabela 1– Estrutura molecular e propriedades da espironolactona e seus principais metabólitos. 11
Tabela 2 – Estrutura molecular e propriedades da flutamida e seus principais metabólitos. ... 12
Tabela 3 – Estrutura molecular e propriedades do acetato de ciproterona e seu principal metabólito. 14
Tabela 4 – Estrutura molecular e propriedades do tamoxifeno e seus principais metabólitos. 15
Tabela 5 – Parâmetros físico-químicos médios do efluente tratado do HUSM. 19
Tabela 6 – Testes de controle de qualidade e EP/USP (matéria prima EFCT). 24

CAPÍTULO 2 - Desenvolvimento do Método HPLC-DAD e Técnicas de Extração

Tabela 1 – Condições cromatográficas utilizadas para os compostos de EFCT. 41
Tabela 2 – Figuras-de-mérito do método HPLC-DAD para EFCT..... 50
Tabela 3 - Recuperações de EFCT nos cartuchos SPE Strata X em solução aquosa e em efluente hospitalar, em diferentes concentrações (n = 3). 51
Tabela 4 – Figuras-de-mérito do método de determinação de EFCT por SPE seguida de HPLC-DAD. 52
Tabela 5 - Desvio padrão relativo (RSD%) em diferentes dias de análise (n=6). 54
Tabela 6 – Coeficientes de determinação do modelo para a degradação de EFC em solução aquosa e em efluente hospitalar. 55
Tabela 7 - Validação nas condições otimizadas para os compostos EFC utilizando LLME. .. 59
Tabela 8 – Coeficientes de determinação do modelo para a SBSE de EFCT em solução aquosa e em efluente hospitalar. 60
Tabela 9 – Validação da SBSE para os compostos EFCT nas condições otimizadas. 63

CAPÍTULO 3 - Determinação de EFCT em Efluente Hospitalar e Avaliação Preliminar de Riscos

Tabela 1 – Métodos analíticos utilizados na determinação dos fármacos EFCT em diferentes matrizes. 69
Tabela 2 - Resultados da determinação de EFCT no efluente do PA-HUSM (n=2). 75
Tabela 3 - Resultados da determinação de EFCT no efluente geral do HUSM (n=2). 76
Tabela 4 – Valores de Kow e log Kow para EFCT. 78

Tabela 5 - Concentração ambiental predita (PEC) e o quociente de risco (QR) dos analitos estudados usados no HUSM. 79

CAPÍTULO 4 - Aplicação de Processos Avançados de Oxidação e Estudo Cinético

Tabela 1– Potencial de oxidação (segundo a IUPAC) de alguns oxidantes em meio aquoso. 85
Tabela 2 – Características do reator tanque agitado e condições utilizadas na investigação de degradação de EFCT. 97
Tabela 3 – Coeficientes de determinação do modelo para a degradação de EFCT em solução aquosa e em efluente hospitalar. 107
Tabela 4– Matriz experimental do planejamento fatorial fracionado (3^{3-1}) para a otimização da degradação de EFCT por meio de fotólise e fotocatálise com TiO_2 suportado em barras PU/PDMS, com variáveis investigadas e taxas de degradação em solução aquosa. 109
Tabela 5–Matriz experimental do planejamento fatorial fracionado (3^{3-1}) para a otimização da degradação de EFCT em efluente hospitalar por meio de fotólise e fotocatálise com TiO_2 suportado em barras PU/PDMS. 114
Tabela 6– Condições ótimas para a degradação de EFCT em solução aquosa e em efluente hospitalar por meio de fotólise e fotocatálise. 117
Tabela 7 – Coeficientes de regressão para a degradação de EFCT em solução aquosa e em efluente hospitalar. 121
Tabela 8 – Constantes cinéticas do estudo de degradação de EFCT em solução aquosa. 122
Tabela 9 – Constantes cinéticas aparentes da degradação fotocatalítica de EFCT em efluente hospitalar. 124
Tabela 10 – Coeficientes de regressão para a degradação de EFCT em solução aquosa e em efluente hospitalar. 130
Tabela 11 - Constantes cinéticas da degradação de EFCT pelo processo de ozonização em solução aquosa. 131
Tabela 12 – Constantes cinéticas aparentes da degradação de EFCT em efluente hospitalar pelo processo de ozonização. 133

CAPÍTULO 5 - Espectrometria de Massas: Metabólitos e Subprodutos

Tabela 1 – Parâmetros experimentais otimizados nos experimentos IDA. 149
Tabela 2 - Condições operacionais do espectrômetro de massas para os EFCTs. 157

LISTA DE EQUAÇÕES

CAPÍTULO 2 - Desenvolvimento do Método HPLC-DAD e Técnicas de Extração

Equação 1 33

Equação 2 34

Equação 3 34

Equação 4 38

Equação 5 39

Equação 6 53

CAPÍTULO 3 - Determinação de EFCT em Efluente Hospitalar e Avaliação Preliminar de Riscos

Equação 1 71

Equação 2 73

CAPÍTULO 4 - Aplicação de Processos Avançados de Oxidação e Estudo Cinético

Equação 1 86

Equação 2 86

Equação 3 86

Equação 4 86

Equação 5 86

Equação 6 86

Equação 7 87

Equação 8 88

Equação 9 88

Equação 10 91
Equação 11 91
Equação 12 92
Equação 13 92
Equação14 92
Equação 15 92
Equação 16 92
Equação 17 93
Equação 18 93
Equação 19 93
Equação 20 93
Equação 21 110
Equação 22 110

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ϕ: diâmetro.
ANOVA: análise de variância.
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
AR: receptor andrógeno.
BC: banda de condução.
BTEX: Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno
BV: banda de valência.
CE: energia de colisão (do inglês *Collision Energy*).
CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente
COS: contraceptivos orais sintéticos.
COT: carbono orgânico total
DECs: desreguladores endócrinos químicos (do inglês *Endocrine Disrupting Chemicals*).
E°: potencial de redução.
EC: energia de colisão.
EFCT: Espironolactona, Flutamida, Ciproterona e Tamoxifeno.
EMEA: agência Européia de Medicamentos (do inglês *European Medicines Agency*).
EMS: aumento da *m/z* (do inglês *Enhanced MS*).
EPI: aumento do íon produto (do inglês *Enhanced ProductIon*).
EPIs: equipamentos de proteção individual.
ER: receptor estrógeno.
ETE:estações de tratamento de efluentes
GC-MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
GR: receptor de glicocorticoides.
$HO^{\bullet}$: radical hidroxil.
HPLC-DAD: cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (do inglês *high performance liquid chromatography with diode-array detection*).
HUSM: Hospital Universitário de Santa Maria.
hv: quantum de radiação eletromagnética.
IDA: Informação dependente da aquisição (do inglês – *information dependent acquisition*).
INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada (*do inglês International Union of Pure and Applied Chemistry*).
k: número de fatores.
K_{ow}: coeficiente de partição octanol/água.
$K_{PDMS/w}$: coeficiente de partição do analito entre as fases PDMS e aquosa.
LATER: Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Efluentes e Resíduos.
LC-ESI-(QqLIT)MS/MS: cromatografia líquida/Quadrupolo linear-trapeamento iônico acoplada à espectrometria de massas tandem com ionização electrospray (do inglês *Liquid Chromatography electrospray ionisation/Quadrupole-Linear Ion Trap Tandem Mass Spectrometry*).
LC-ESI-MS/MS: cromatografia liquida acoplada a espectrometria de massas tandem com ionização electrospray (do inglês *Liquid chromatography electrospray ionisation mass spectrometry*).
LD: limite de detecção.
LLE: extração em líquido-líquido (do inglês *liquid-liquid extraction*).

LPME: microextração em fase líquida (do inglês *liquid phase microextraction*).
LQ: limite de quantificação.
m/z: é a massa molecular do composto mais um elétron (íon molecular)
MELL: microextração Líquido Líquido.
MEV: microscopia eletrônica de varredura.
m_{PDMS}: massa do soluto na fase PDMS.
MR: receptor de mineralocorticoides.
MRM: monitoramento múltiplo de reações (do inglês *Multiple Reaction Monitoring*).
MS2 SCAN: varredura da razão *m/z* no espectrômetro de massas utilizando MS em tandem.
MS2 SIM: varredura da razão *m/z* no espectrômetro de massas pelo monitoramento de íon selecionado.
m_w: massa do soluto na fase aquosa.
NL: perda neutra (do inglês *Neutral Loss*).
OECD: organização para cooperação econômica e desenvolvimento, (do inglês *Organisation for Economic Co-operation and Development*).
PA: Pronto Atendimento do Hospital Universitário
PAOs: processos avançados de oxidação.
PC: ponto central.
PDMS: polidimetilsiloxano.
PEC: concentração predita no ambiente, (do inglês *Predicted Environmental Concentration*).
PhACs:compostos farmacologicamente ativos (do inglês *Pharmaceutically active compounds*).
PI: ions produto (do inglês *Product Ion*).
PNEC: concentração previsivelmente sem efeitos (do inglês *Predicted Environmental No Effect Concentration*).
POP: poluentes orgânicos persistentes.
PPCPs: fármacos e produtos de cuidado pessoal, (do inglês *Pharmaceuticals and Personal Care Products as Pollutants*).
PR: receptor da progesterona.
PREC: ion precursor (do inglês *Precursor íon*).
PU: poliuretano.
Q1 MS SCAN: monitoramento de massas feito apenas no quadrupolo 1.
QR: quociente de risco.
r^2: coeficiente de correlação.
RSD: desvio padrão relativo.
SBSE: extração sortiva em barra de agitação (do inglês *stir bar sorptive extraction*).
LLME: extração líquido-líquido (do inglês *liquid–liquid microextraction*).
SDME: microextração em gota suspensa (do inglês *single drop microextraction*).
SPE: extração em fase sólida (do inglês *solid phase extraction*).
SPME: microextração em fase sólida (do inglês *solid phase microextraction*).
TIC: cromatograma de íons totais (do inglês *total íon chromatogram*).
UFSM: Universidade Federal de Santa Maria.
UV: radiação eletromagnética ultravioleta.
XIC: cromatograma de íons extraídos (do inglês *extracted íon chromatogram*).
β: razão entre o volume da amostra e volume da fase extratora.
λ: comprimento de onda

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL

1.1 INTRODUÇÃO 3
1.1.1 Objetivos 4
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 7
1.2.1 Fármacos no meio ambiente 7
1.2.2 Desreguladores Endócrinos Químicos (EDCs) 8
1.2.3 Contraceptivos Orais Sintéticos (COS) 9
1.2.4 Antiandrogênios 10
1.2.4.1 Espironolactona 10
1.2.4.2 Flutamida 11
1.2.4.3 Acetato de Ciproterona 13
1.2.4.4 Citrato de Tamoxifeno 14
1.2.5 Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) no contexto de efluentes hospitalares 17
1.2.6 Planejamento de experimentos 19
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS 23
1.3.1 Fluxograma experimental 23
1.3.2 Reagentes e soluções 24
1.3.3 Coleta e preparo das amostras 25

CAPÍTULO 2 - Desenvolvimento do Método HPLC-DAD e Técnicas de Extração

2.1 INTRODUÇÃO 29
2.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 31
2.2.1 Técnicas de extração 31
2.2.2 Extração em fase sólida (SPE) 32
2.2.3 Microextração líquido-líquido 33
2.2.4 Extração sortiva em barra de agitação (SBSE) 36
2.2.4.1 Princípios da SBSE. 38
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS 41
2.3.1 Técnica de HPLC-DAD 41
2.3.2 Técnica de SPE HPLC-DAD 41
2.3.3 Microextração Líquido-Líquido 43
2.3.4 Barras de extração sortiva 44
2.3.4.1 Otimização do processo SBSE de EFCT. 46
2.3.4.2 Validação do processo de SBSE para EFCT. 47
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES 49
2.4.1 Para a aplicação da técnica de HPLC-DAD 49
2.4.2 Aplicação da extração em fase sólida – SPE 50
2.4.3 Figuras-de-mérito da metodologia SPE HPLC-DAD 52
2.4.4 Microextração Líquido-Líquido -LLME 54
2.4.4.1 Solução aquosa. 55

2.4.4.2 Efluente hospitalar. 57
2.4.4.3 Validação da LLME em solução aquosa e efluente hospitalar. 58
2.4.5 Otimização do processo SBSE. 59
2.4.5.1 Solução aquosa. 60
2.4.5.2 Efluente hospitalar. 62
2.4.5.3 Validação da SBSE em solução aquosa e efluente hospitalar. 63

CAPÍTULO 3 - Determinação de EFCT em Efluente Hospitalar e Avaliação Preliminar de Riscos

3.1 INTRODUÇÃO..... 67
3.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 69
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS..... 73
3.3.1 Determinação de EFCT no efluente do HUSM..... 73
3.3.2 Avaliação do risco ambiental dos EFCT 73
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES..... 75
3.4.1 Concentrações de EFCT determinadas nas amostras de efluente hospitalar..... 75
3.4.2 Avaliação preliminar do risco potencial para EFCT em efluente hospitalar..... 77

CAPÍTULO 4 - Aplicação de Processos Avançados de Oxidação e Estudo Cinético

4.1 INTRODUÇÃO..... 83
4.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 85
4.2.1 Processos Avançados de Oxidação..... 85
4.2.2 Fotólise 86
4.2.3 Fotocatálise heterogênea..... 87
4.2.4 Ozonização 90
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS..... 95
4.3.1 Preparo das barras com TiO_2 imobilizado em polímeros.....95
4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 96
4.3.3 Reator fotocatalítico 97
4.3.4 Otimização da fotólise e da fotocatálise heterogênea..... 98
4.3.5 Otimização da geração de ozônio..... 99
4.3.5.1 Reator e gerador de ozônio.....100
4.3.5.2 Ajuste do processo de ozonização.....101
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES..... 103
4.4.1 Fotólise e fotocatálise heterogênea..... 103
4.4.1.1. Barras de TiO_2 imobilizada em polímeros.....103

4.4.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura.....103
4.4.1.3 Desempenho do catalisador TiO_2.....104
4.4.2 Otimização do processo de fotólise/fotocatálise.....107
4.4.2.1 Solução aquosa.....108
4.4.2.2 Efluente hospitalar.....113
4.4.3 Condições otimizadas para fotocatálise heterogênea.....117
4.4.4 Degradação dos EFCTs por meio de fotólise/fotocatálise.....118
4.4.5 Estudo cinético de degradação de EFCT por fotólise/fotocatálise.....120
4.4.6 Estudo de degradação de EFCT por ozonização.....124
4.4.6.1 Ozonização de EFCT em pH 5. 127
4.4.7 Estudo cinético de degradação de EFCT por ozonização.....130
4.4.8 Comparação das eficiências da Fotólise, Fotocatálise e Ozonização 133

CAPÍTULO 5 - Espectrometria de Massas: Metabólitos e Subprodutos

5.1 INTRODUÇÃO 137
5.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 139
5.2.1 Conceitos Básicos de Espectrometria de Massas. 139
5.3 MATERIAIS E MÉTODOS 147
5.3.1 LC-ESI-MS/MS 147
5.3.2 LC-ESI-(QqLIT)MS 147
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES 151
5.4.1 Estudos de fragmentação estrutural de EFCT no sistema LC-ESI-MS/MS 151
5.4.2 Estudos de fragmentação estrutural de EFCT no sistema LC-ESI(QqLIT)MS.....157
5.4.3 Identificação de EFCT em amostras de efluente hospitalar e estudos de fragmentação estrutural. 168
5.4.4 Identificação dos metabólitos dos compostos EFCT em efluente hospitalar.....176
5.4.5 Identificação e estudo dos subprodutos dos compostos EFCT pela aplicação de PAOs. 206
5.4.5.1 Fotólise aplicada à solução aquosa de espironolactona.....207
5.4.5.2 Fotocatálise heterogênea aplicada ao efluente hospitalar fortificado de espironolactona.....212
5.4.5.3 Ozonização aplicada à solução aquosa de espironolactona.....217
5.4.5.4 Ozonização aplicado ao efluente hospitalar fortificado de espironolactona 220
5.4.5.5 Fotólise aplicada à solução aquosa de flutamida.....224
5.4.5.6 Fotocatálise heterogênea aplicada ao efluente hospitalar fortificado de flutamida..228
5.4.5.7 Ozonização aplicado à solução aquosa de flutamida 231
5.4.5.8 Ozonização aplicado ao efluente hospitalar fortificado com flutamida 233
5.4.5.9 Fotólise aplicada à solução aquosa de ciproterona.....233
5.4.5.10 Fotocatálise heterogênea aplicada ao efluente hospitalar enriquecido de ciproterona.... 238
5.4.5.11 Ozonização aplicado à solução aquosa de ciproterona 240

5.4.5.12 Ozonização aplicado ao efluente hospitalar fortificado de ciproterona..... 244
5.4.5.13 Fotólise aplicada à solução aquosa de tamoxifeno 247
5.4.5.14 Fotocatálise heterogênea aplicada ao efluente hospitalar fortificado de tamoxifeno..... 259
5.4.5.15 Ozonização aplicado à solução aquosa de tamoxifeno..... 268
5.4.5.16 Ozonização aplicado ao efluente hospitalar fortificado de tamoxifeno..... 278

CONCLUSÕES GERAIS

6 CONCLUSÕES 291

TRABALHOS FUTUROS

7 Sugestões para trabalhos futuros..... 297

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 301

ANEXOS

9.1 ANEXO A – Capítulo 4..... 322
9.2 ANEXO B – Capítulo 4..... 324
9.3 ANEXO C – Capítulo 4..... 325

APÊNDICES

10.1 APÊNDICE A – Teste de controle de qualidade da matéria prima dos padrões de EFCT. 328
10.2 APÊNDICE B – Antiandrogênios e seus metabólitos em águas: determinação e identificação através de LC-ESI- MS/MS. 331

ESTRUTURAÇÃO DA TESE

Esta tese está estruturada da seguinte forma:

- ✓ Introdução geral, com uma breve colocação sobre a problemática relacionada aos fármacos no meio ambiente; objetivo principal e objetivos específicos;
- ✓ Revisão bibliográfica geral;
- ✓ Breve explanação sobre o efluente do HUSM;
- ✓ Planejamento experimental;
- ✓ Fluxograma experimental – demonstrando a seqüência experimental aplicada à tese;
- ✓ Reagentes e soluções utilizados;
- ✓ Coleta e preparo das amostras de efluente hospitalar;
- ✓ Capítulos temáticos com diferentes seções, onde cada seção terá uma breve introdução e, revisão bibliográfica específica para cada assunto estudado, seguida da descrição de materiais e metodologia analítica utilizada; posteriormente serão apresentados e discutidos os resultados;
- ✓ Conclusões gerais;
- ✓ Sugestões para trabalhos futuros;
- ✓ Referências bibliográficas

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 INTRODUÇÃO

Desde a primeira detecção em ambiente aquático, em 1970 (HIGNITE & AZNAROFF, 1977), crescente atenção tem sido dada aos produtos farmacêuticos. Medidos no ambiente em quantidades não negligenciáveis os fármacos e assemelhados, por exercerem efeitos biológicos e/ou adversos nos organismos em geral, podem ser considerados como 'contaminantes emergentes'. Desta forma, há uma necessidade de avaliação dos riscos ecotoxicológicos destes produtos farmacêuticos (LEUNG et al, 2012; FENT et al, 2006). Entre os fármacos de maior relevância ambiental, os medicamentos utilizados no tratamento de câncer (antineoplásicos), em particular, são suspeitos de apresentar riscos específicos para organismos aquáticos não-alvos (KÜMMERER, 2001; BESSE et al., 2012).

O câncer é uma das doenças que mais causam temor, constituindo um estigma de mortalidade e dor; os principais tratamentos desta enfermidade envolvem cirurgia, quimioterapia e/ou radioterapia (DA SILVA et al., 2012-c; NUSSBAUMER et al., 2011). A palavra câncer é sinônima do termo neoplasia, especificamente, tumores malignos, caracterizados pelo desenvolvimento descontrolado de células transformadas; entretanto, o termo câncer refere-se, genericamente, ao conjunto de mais de 100 doenças (DA SILVA et al., 2012-c).

Espironolactona, Flutamida, Ciproterona e Tamoxifeno (EFCT) são compostos antiandrogênios, antagonistas de receptores hormonais e representam um grupo de grande interesse ambiental. Entretanto, praticamente não há estudos da ocorrência e dos efeitos destes compostos no meio ambiente e, consequentemente, dos riscos, toxicidade, persistência e/ou recalcitrância.

Nos últimos anos, a contínua descarga de produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais (PPCPs) para o ambiente aquático se tornou uma grande preocupação para a comunidade científica. Tais substâncias entram no ambiente aquático por meio de efluentes urbanos, hospitalares, serviços médicos e unidades industriais. A maioria deles não é completamente eliminada em estação de tratamento de efluentes (ETEs) em consequência de sua polaridade e alta estabilidade química. Estes compostos podem ser detectados no ambiente aquático em concentrações que variam de ng L^{-1} a µg L^{-1}. A exposição contínua a PPCPs pode levar a efeitos adversos aos seres vivos, incluindo desregulação do sistema endócrino, inibição da produtividade primária e resistência a antibióticos (SHAABAN & GÓRECKI, 2013).

Assim sendo, processos que minimizem o efeito de contaminação ambiental e o potencial da ação poluente de efluentes urbanos, hospitalares e de serviços médicos, em geral, despertam grande interesse junto aos setores público, governamental e industrial. Tecnologias como fotólise, fotocatálise e ozonização, entre outros Processos Avançados de Oxidação (PAOs), vão ao encontro deste interesse, constituindo nicho de inovação (ALTMANN et al., 2012).

Novos procedimentos tecnológicos e novos equipamentos no campo de análise e monitoramento ambiental têm tornado possível a identificação de contaminantes "emergentes", a medida das concentrações-traço em diferentes compartimentos e a avaliação dos riscos ambientais. As novas técnicas analíticas apresentam melhor reprodutibilidade e repetibilidade, e baixos limites de detecção (CASTILHO et al., 2012; MARTENDAL & CARASEK, 2011). A cromatografia líquida hifenizada à espectrometria de massas, em tandem, é uma poderosa técnica de detecção e quantificação que alcança limites de ng L^{-1} a µg L^{-1} (traços e subtraços). Assim, é possível hoje quantificar-se inúmeros constituintes de medicamentos (ingredientes ativos e excipientes), PCPs, metabólitos, bem como, subprodutos de degradação (VULLIET et al., 2011; FERNÁNDEZ et al., 2010; LACEY et al, 2008; RADJENOVIĆ et al., 2009; KOZLOWSKA-TYLINGO et al., 2010; STRECK, 2009; WANG et al., 2012).

1.1.1 Objetivos

O objetivo principal do presente trabalho de doutorado foi o desenvolvimento de metodologia analítica inovadora para a identificação de EFCT e seus metabólitos em matriz de grande complexidade (efluente hospitalar), bem como, aplicar processos avançados de oxidação (fotólise, fotocatálise heterogênea e ozonização) na geração de possíveis subprodutos de degradação de antiandrogênios; proposição de rotas de degradação via PAOs e avaliação preliminar de riscos ambientais.

E como objetivos específicos:

- Desenvolvimento de novas variantes de extração/preparação de amostras, enfatizando a miniaturização;
- Desenvolvimento de variante de extração em fase sólida, única, para a determinação dos antiandrogênios EFCT conjuntamente;
- Determinação de EFCT em efluente hospitalar por meio de SPE, seguida de HPLC-DAD;
- Avaliação preliminar do potencial de risco ambiental relativo ao descarte de EFCT em efluente hospitalar do HUSM;
- Estudo da fragmentação estrutural de EFCT por meio de LC-ESI-MS/MS e LC-ESI-(QqLIT)MS/MS;
- Identificação e estudos de fragmentação dos metabólitos de EFCT em amostras de efluente hospitalar;
- Avaliação dos processos de fotólise direta e de fotocatálise heterogênea (TiO_2 suportado), e de ozonização, na degradação de EFCT em solução aquosa e em efluente hospitalar;
- Estudo da cinética de degradação de EFCT por meio de três processos avançados de oxidação;
- Identificação dos produtos de degradação de EFCT gerados por PAOs utilizando-se LC-ESI-(QqLIT)MS/MS e proposição de rotas de degradação estrutural.

1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1 Fármacos no meio ambiente

Fármacos foram inicialmente identificados em meados da década de 1970, associados a ETEs nos EUA (HIGNITE E AZARNOFF, 1977), quando começou a despertar a preocupação social com o potencial risco destes compostos aos ecossistemas. Todavia, nas últimas décadas, tem ocorrido um aumento constante na sensibilização da população com relação às questões de proteção ambiental. O impacto negativo sobre o ambiente natural resultante das emissões de substâncias poluentes prejudiciais à saúde tem sido constatado. É reconhecido que a poluição influencia os organismos vivos, incluindo os seres humanos, de forma direta (afetando a saúde) e, indiretamente pela (contaminação de alimentos e compartimentos abióticos), (KOT-WASIK et al., 2007).

Fármacos são primeiramente prescritos como moléculas bioativas no tratamento de doenças em concentrações terapêuticas, no entanto, estes compostos podem afetar organismos não alvos com efeitos nocivos ambientalmente em um longo tempo de exposição, mesmo a concentrações muito baixas (SANTOS et al., 2010; VALCÁRCEL et al., 2011).

Atualmente, o assunto mais relevante em química ambiental é a qualidade da água. A presença de poluentes e micropoluentes no meio ambiente em concentrações na ordem de ng L^{-1} e µg L^{-1} têm aumentado expressivamente. Pesquisas estão sendo feitas continuamente para estimar o potencial risco ambiental destes compostos, destacando-se os compostos farmacologicamente ativos, (PhACs), poluentes orgânicos persistentes, (POPs), fármacos e produtos de cuidado pessoal, (PPCPs) e os desreguladores endócrinos químicos, (EDCs) (FERNÁNDEZ et al., 2010; SANTOS et al., 2010; CHRISTENSEN et al., 2009; CHRISTEN et al., 2010; GROS et al., 2010; WANG et al., 2012; BILA et al., 2007).

PhACs, POPs e EDCs e seus metabólitos são encontrados especialmente em sistemas aquáticos que são os receptores finais destes compostos, como também, de outras substâncias antropogênicas, sendo encontrados em ETEs e efluentes em geral (STRECK 2009; GIBS et al., 2007; LEUNG et al., 2011; BEHERA et al., 2011; GRACIA-LOR et al., 2012; MIÈGE et al., 2009; JELIC et al., 2011; EINSIEDL et al., 2010; LACEY et al., 2008; LIN et al., 2009; SIM et al., 2011; BOLEDA et al., 2011; CHRISTENSEN et al., 2009), efluentes hospitalares (BRENNER et al., 2010; MARTINS et al., 2009; MARTINS et al., 2011; MARTINS et al.,

2008; VASCONCELOS et al., 2009-a; HENRIQUES et al., 2012), águas superficiais (STRECK 2009; WANG et al., 2012; VALCÁRCEL et al., 2011; KUMAR et al., 2010; WANG et al., 2011-b; VULLIET et al., 2011; FERNÁNDEZ et al., 2010), águas subterrâneas (FRAM et al., 2011; VULLIET et al., 2011; GOTTSCHAL et al., 2012) e, até mesmo em águas de abastecimento (WANG et al., 2012; MOMPELAT et al., 2009; HUERTA-FONTELA et al., 2011; FRAM et al., 2011; BOLEDA et al., 2011; KUMAR et al., 2010; WANG et al., 2011-b).

1.2.2 Desreguladores Endócrinos Químicos (EDCs)

EDCs são agentes exógenos que interferem com a produção, liberação, transporte, metabolismo, ligação, ação e eliminação de hormônios naturais no corpo responsáveis pela manutenção da homeostase e pela regulação dos processos de desenvolvimento (KOZLOWSKA et al., 2010). São um extenso grupo de compostos naturais e antropogênicos que podem atuar como substâncias hormonais que influenciam a regulação do desenvolvimento e crescimento de animais e humanos. Além disso, EDCs têm sido associados ao câncer de próstata, desordens do trato reprodutivo, baixa contagem de espermatozóides e câncer de mama (WANG et al., 2012) e, em organismos aquáticos, são responsáveis por feminilização, infertilidade e hermafroditismo (KOZLOWSKA et al., 2010**)**.

A questão do risco potencial de desregulação endócrina para os seres humanos e para animais no meio ambiente devido aos hormônios utilizados em anticoncepcionais e na terapia de reposição hormonal precisa ser abordada. Alguns estudos foram realizados sobre o risco relacionado com antiandrogênios (JOLLY et al., 2009; SEBIRE et al., 2008) e, praticamente, não há estudos sobre a ocorrência de gestagênios (também chamados de progestágenos, ou progesterona) em águas residuais e superficiais e seus efeitos sobre os organismos não-alvos, como já relatavam BESSE & GARRIC, em 2009. Esta asserção continua válida.

1.2.3 Contraceptivos Orais Sintéticos (COS)

Liu et al. (2011) falam sobre a ocorrência, caminho, remoção ambiental e toxicidade de contraceptivos orais sintéticos (COS), para humanos e organismos aquáticos, sendo que, a natureza androgênica/progestagênica destes compostos sugere que eles também podem apresentar riscos para vida aquática e para os microorganismos (HERNÁNDEZ et al., 2009). Caminho e distribuição dos COS está descrito na figura 1.

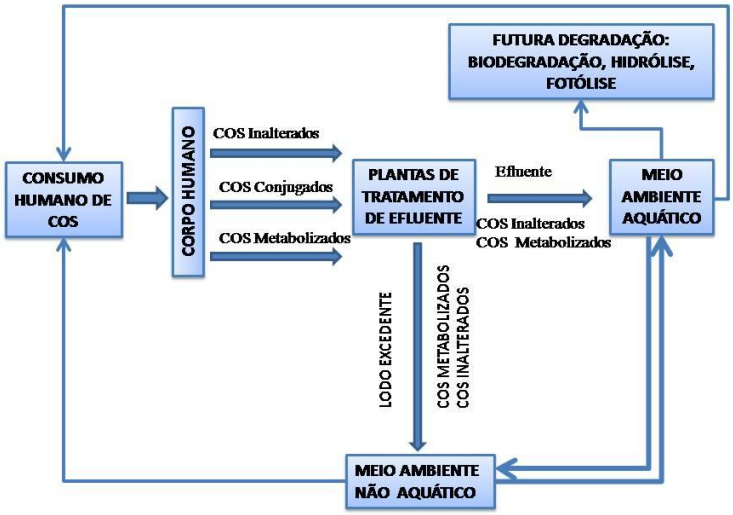


Figura 1- Caminho dos contraceptivos orais no meio ambiente. Adaptado de: BESSE e GARRIC, 2009 e LIU et al., 2011.

Durante a última década, um aumento da incidência de desordens reprodutivas tem sido relatada em vários animais e, também, em seres humanos. Um número crescente de estudos laboratoriais e de campo têm investigado as supostas ligações entre estas desordens e a presença de produtos químicos antropogênicos no meio ambiente, que são capazes de interferir com as funções endócrinas em ambos seres humanos e vida selvagem. De particular preocupação são os antiandrogênios que são capazes de mimetizar ou bloquear as respostas tipicamente induzidas por hormonios sexuais masculinos, os androgênios (JOLLY et al., 2009).

Entre os EDCs, estrógenos naturais e sintéticos têm sido reconhecidos como tendo o maior potencial de desregulação endócrina. As emissões de estrógenos para o meio ambiente

originam-se principalmente de indústrias farmacêutica e veterinária (fabricação de preparações hormonais, incluindo COS), esgotos (excreção de drogas e seus metabólitos por seres humanos e animais), eliminação de medicamentos com prazo de validade expirado (pequena escala) e hospitais (escala muito maior), bem como, plantas de tratamento de águas residuais (métodos de purificação ineficientes) (KOZLOWSKA et al., 2010).

Metabólitos de COS que entram nas águas superficiais com o esgoto são a principal fonte de estrógenos no ambiente. Embora as concentrações de etinilestradiol (E2), progesterona nos COS hoje são muito pequenas, gerações mais antigas destas drogas continham quantidades significativamente maiores de hormônios. Resíduos desses medicamentos ainda estão presentes no meio ambiente e exercem efeitos de desregulação endócrina (KOZLOWSKA et al., 2010).

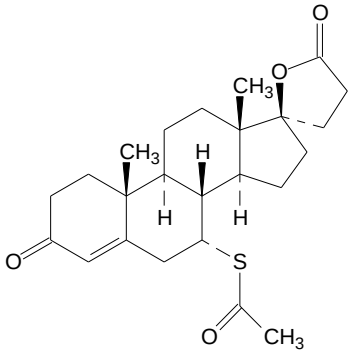
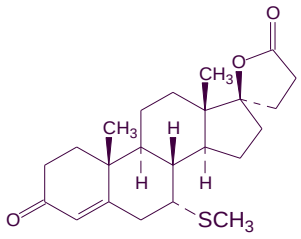
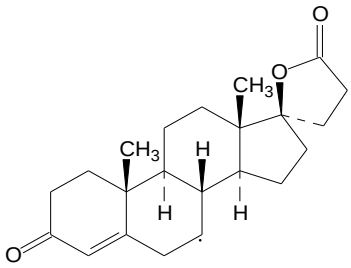
Informações sobre os níveis de EDCs (estrógenos em uma grande fração de amostras 50-95%) em esgotos municipais, águas residuais de fazendas de animais e, até, água de abastecimento público e seus efeitos na biocenose e organismos aquáticos são encontrados na literatura (WU et al., 2010; TOURAUD et al., 2011).

1.2.4 Antiandrogênios

1.2.4.1 Espironolactona

Espironolactona (Tabela 1) é um esteroide sintético, atua como diurético poupador de potássio e, é comercializada como um antagonista renal competitivo da aldosterona e é indicada para o tratamento de edemas e ascite na cirrose do fígado, ascite maligna, síndrome nefrótica, falha cardíaca congestiva e hiperaldosteronismo primário. Espironolactona é rapidamente e extensivamente metabolizada em um grande número de metabólitos. A principal via metabólica da espironolactona resulta na formação dos metabólitos 7-α-tiometil-espironolactona e canrenona (Tabela 1) (SANDALL et al., 2006; SORA et al., 2010).

Tabela 1– Estrutura molecular e propriedades da Espironolactona e seus principais metabólitos.

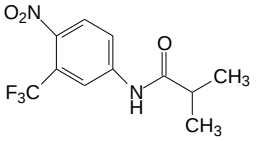
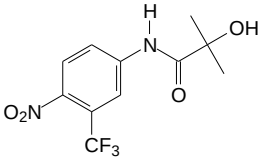
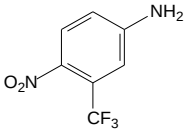
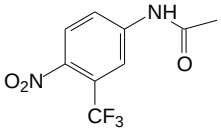
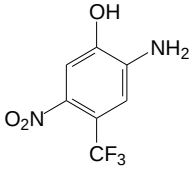
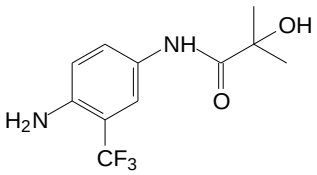
Composto	**Estrutura química**	**PM* (g mol^{-1})**	**Fórmula molecular**	**Nº CAS**
Espironolactona		416,58	$C_{24}H_{32}O_4S$	52-01-7
7-α-tiometilespironolactona		388,0	$C_{23}H_{32}O_3S$	38753-77-4
Canrenona		340,0	$C_{22}H_{28}O_3$	976-71-6

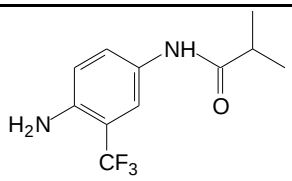
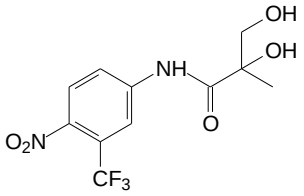
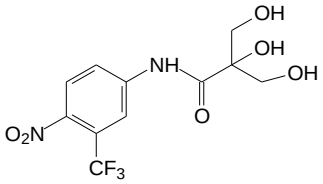
1.2.4.2 Flutamida

A flutamida, 2-metil-N-[4-nitro-3-(trifluorometil)fenil]propanamida, α,α,α-trifluoro-2-metil-4'-nitro-m-propionotoluidida ou 4'-nitro-3'-trifluorometilisobutiranilida (Tabela 2), é um fármaco antiandrogênio não esteroide, destituído de atividade hormonal, utilizado no tratamento do câncer avançado de próstata. Este composto foi o primeiro composto puro não esteróide descoberto e tem sido amplamente usado no tratamento do câncer de próstata desde 1970 (TEVELL et al., 2006; WEN et al., 2008). Atua inibindo a ligação da testosterona ou da diidrotestosterona aos receptores nucleares e citoplasmáticos nas células-alvo. A flutamida é

completamente absorvida pelo trato gastrintestinal, e rapidamente convertida em vários metabólitos (Tabela 2) sendo que o principal metabólito formado é o 2-hidroxi-flutamida e a ligação deste metabólito ao receptor androgênico parece ser 20 vezes mais forte que a da flutamida 2-amino-5-nitro-4-(trifluormetil)-fenol (Flu-3) é o metabólito encontrado em maior concentração na urina e o 4-nitro-3-(trifluorometil)fenilamina (FLU-1) é o mais encontrado em amostras de plasma (KANG et al., 2007; TEVELL et al., 2006; KANG et al., 2008; MARONA et al., 2004). A ligação às proteínas plasmáticas é de 94% a 96%. O fármaco e seus metabólitos são excretados principalmente na urina (MARONA et al., 2004).

Tabela 2 – Estrutura molecular e propriedades da flutamida e seus principais metabólitos.

Composto	**Estrutura química**	**PM* (g mol^{-1})**	**Fórmula molecular**	**Nº CAS**
Flutamida		276,22	$C_{11}H_{11}F_3N_2O_3$	13311-84-7
2-hidroxi-flutamida		292,21	$C_{11}H_{11}F_3N_2O_4$	52806-53-8
4-nitro-3(trifluorometil)fenilamina (Flu-1)		206,12	$C_7H_5F_3N_2O_2$	393-11-3
N-[2-nitro-3(trifluorometil)fenil]acetamida (Flu-2)		248,16	$C_9H_7F_3N_2O_3$	387-19-9
2-Amino-5-nitro-4-(trifluorometil)fenol(Flu-3)		222,12	$C_7H_5F_3N_2O_3$	56987-02-1
Metil 2-[3-(trifluorometil)-4,5,6,7-tetrahidroindazol-1-il-acetato(Flu-5)		262,23	$C_{11}H_{13}F_3N_2O_2$	-

N-[4-Amino-3 (trifluorometil)fenil]-2-metilpropanamida (Flu-6)		246,23	$C_{11}H_{13}F_3N_2O$	39235-51-3
2-(4-metoxi-2-nitrofenoxi)-N-(2,2,2-trifluoroetil)acetamida M1 Dihidroxiflutamida		308,21	$C_{11}H_{11}F3N_2O_5$	-
[5-(2-metoxietoxi)-2-nitro-4-(trifluorometil)fenil]carbâmico acido M3 Trihidroxiflutamida		324,21	$C_{11}H_{11}F_3N_2O_6$	-

*Peso molecular.

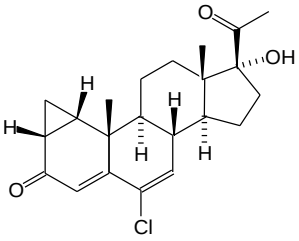
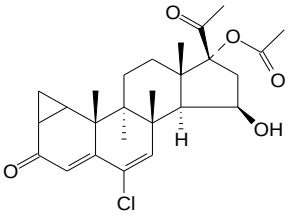
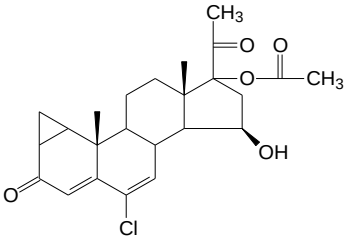
1.2.4.3 Acetato de Ciproterona

O acetato de ciproterona, quimicamente denominado pela IUPAC de 6-cloro-1β, 2β-dihidro-17-hidroxi-3'H-ciclopropa[1,2]pregna-4,6-dieno-3,20-diona (Tabela 3), é um esteróide sexual sintético derivado da hidroxiprogesterona. Atua bloqueando a ação do androgênio como um inibidor competitivo dos receptores de androgênio e também exerce um efeito progestacional e antigonadotrófico. Suas principais indicações são no tratamento do câncer de próstata, na hiperplasia benigna da próstata, priapismo, hipersexualidade e outras condições em que a ação do andrógeno mantém o processo da doença. Devido ao seu efeito antiandrogênico, ele também pode ser usado para tratar o hirsutismo, e é um componente comum na terapia hormonal para o homem e para humanos transexuais do sexo feminino. Além disso, o acetato de ciproterona é usado combinado com estrogênios em alguns contraceptivos orais **(**Dianette no Reino Unido e Diane-35 em outros países) (KASPER et al., 2001).

O acetato de ciproterona é lentamente absorvido pelo trato gastrointestinal com pico de concentração plasmática alcançada em três a quatro horas, cuja taxa de ligação às proteínas plasmáticas é de 96% e meia-vida de aproximadamente 38 horas. O acetato de ciproterona é metabolizado pelo fígado. A excreção se faz pela urina, cerca de 35%. Aproximadamente

90% de uma dose oral foram detectados nas fezes em oito dias. Resíduos de metabólitos sofrem excreção biliar, cujo principal metabólito é 15 beta-hidroxi-ciproterona acetato (Tabela 3) que possui atividade antiandrogênica (FRITH, 1985; MAZUQUELI, 2008).

Tabela 3 – Estrutura molecular e propriedades do acetato de ciproterona e seu principal metabólito.

Composto	**Estrutura química**	**PM* (g mol^{-1})**	**Fórmula molecular**	**Nº CAS**
Acetato de ciproterona		416,9	$C_{22}H_{27}ClO_3$	427-51-0
15 hidroxi-ciproterona acetato		461,0	$C_{26}H_{33}ClO_5$	-
15-beta-hidroxi-ciproterona		432,94	$C_{24}H_{29}ClO_5$	65423-26-9

*Peso molecular.

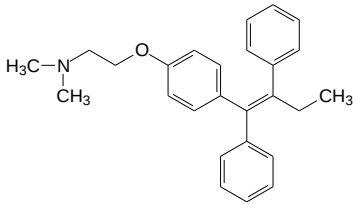
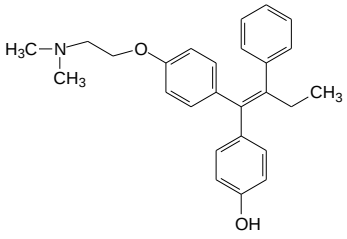
1.2.4.4 Citrato de Tamoxifeno

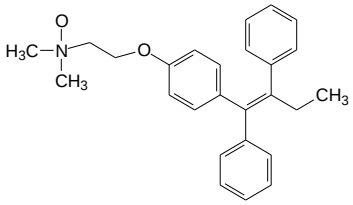
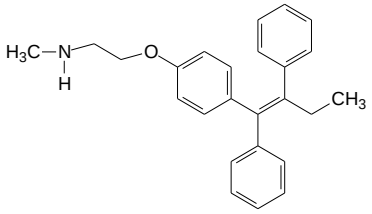
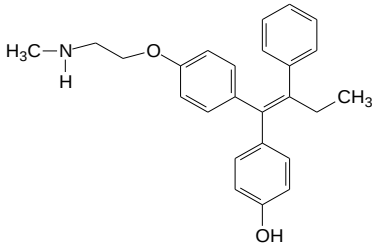
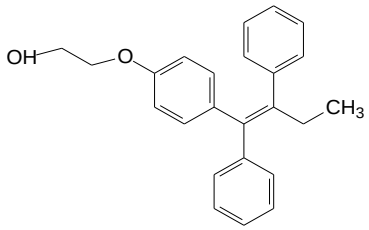
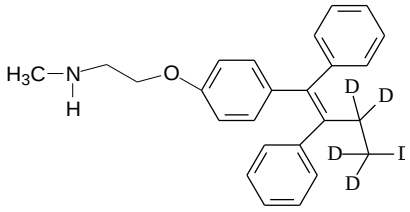
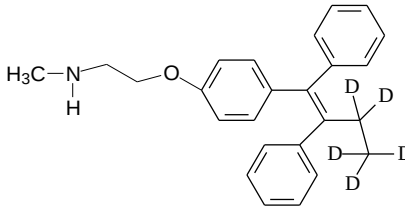
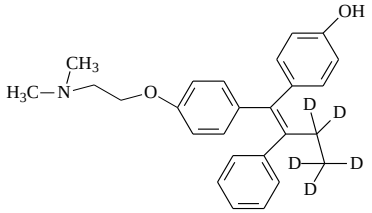
Tamoxifeno, trans-1-(4-β-dimetilaminoetilfenil)-1,2-difenil but-1-eno) (Tabela 4), é um trifeniletileno não esteroidal modulador seletivo do receptor de estrogênio, atualmente é amplamente usado como um agente terapêutico endócrino em todos os estágios de câncer de mama e, em menor extensão para a prevenção do câncer de mama em mulheres com alto risco de desenvolvimento da doença. Atua através da completa inibição da ligação de estradiol com

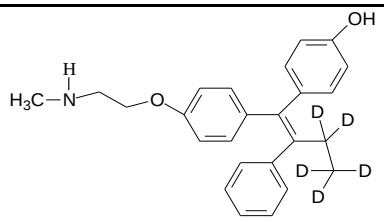
o receptor estrogênio de alta afinidade inibindo o crescimento de estrogênio-dependente e a proliferação de células epiteliais mamárias malignas (ARANDA et al., 2011, TEUNISSEN et al., 2010, DAHMANE et al., 2010, TEUNISSEN et al., 2009).

O metabolismo do tamoxifeno desempenha um papel significante na atividade da droga. A atividade e o sitio de efeitos causados pela ingestão da droga são não somente devido ao tamoxifeno, mas também seus metabólitos biologicamente ativos. Tamoxifeno é extensivamente metabolizado pelas enzimas do citocromo P450 e flavinaoxigenase *in vivo* em vários metabólitos de fase I que variam em toxicidade e potências no sentido estrogênio receptor (ER) alfa e ER beta. No metabolismo de fase I a bioativação ou inativação dão lugar à oxidação catalisada enzimaticamente, redução e hidrólise (TEUNISSENet al., 2010). Os principais metabólitos do tamoxifeno de fase I (isto é, presente em concentrações relativamente altas de estado estacionário no soro e/ou com forte afinidade pelos receptores alfa e beta) são: N-desmetiltamoxifeno (metabólito que se forma em maior quantidade e atinge concentrações séricas 2 vezes maiores do que o tamoxifeno), N,N-didesmetiltamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno, tamoxifeno-N-oxido, e 4-hidroxi-N-desmetiltamoxifeno (endoxifeno), N-desmetil-tamoxifeno-d5, tamoxifeno-d5, 4-OH-tamoxifeno-d5 e endoxifeno-d5 (Tabela 4), (ARANDA et al., 2011, TEUNISSEN et al., 2010, TEUNISSEN et al., 2009, DAHMANE et al., 2010, BINKHORST et al., 2011).

Tabela 4 – Estrutura molecular e propriedades do tamoxifeno e seus principais metabólitos.

Composto	**Estrutura química**	**PM* (g mol^{-1})**	**Fórmula molecular**	**Nº CAS**
Tamoxifeno (TAM)		371,5	$C_{26}H_{29}NO$	10540-29-1
4-hidroxi-tamoxifeno (4-OH-TAM)		387,5	$C_{26}H_{29}NO_2$	68392-35-8

Tamoxifeno-N-oxido		387,5	$C_{26}H_{29}NO_2$	75504-34-6
N-desmetiltamoxifeno (NDTAM)		357,5	$C_{25}H_{27}NO$	10540-29-1
4-hidroxi-N-desmetiltamoxifeno (endoxifeno) (4-OH-NDTAM)		373,5	$C_{25}H_{27}NO_2$	114828-90-9
N,N-didesmetiltamoxifeno		343,5	$C_{24}H_{25}NO$	80234-20-4
N-desmetil-tamoxifeno-d5		362,53	$C_{25}H_{22}D_5NO$	-
N-desmetil-tamoxifeno-d5		362,53	$C_{25}H_{22}D_5NO$	-
4-OH-tamoxifeno-d5		392,53	$C_{26}H_{24}D_5NO_2$	58047-06-3(non-d)

Endoxifeno-d5		378,53	$C_{25}H_{22}D_5NO_2$	-

*Peso molecular.

Os metabólitos do tamoxifeno N-desmetil-tamoxifeno-d5, tamoxifeno-d5, 4-OH-tamoxifeno-d5 e endoxifeno-d5, tem essa denominação (D5) devido ao receptor de dopamina D5, que é também conhecido como D5R, é uma proteína que, em seres humanos é codificada pelo gene DRD5 que funciona como um receptor acoplado à proteína G (DAVID et al., 1991). Esses receptores são uma grande família protéica de receptores transmembranares que captam sinais extracelulares e ativam vias de transdução de sinal no interior da célula. Este tipo de receptores são encontrados apenas em eucariotas, como é o caso das leveduras, plantas, coanoflagelados e animais. Os ligantes que se ligam e ativam estes receptores incluem compostos sensíveis à luz, odores, feromônios, hormônios e neurotransmissores, variam de tamanho, desde pequenas moléculas, até peptídeos, podendo ser grandes proteínas. Estes receptores estão envolvidos numa variedade de doenças, mas também, são alvo de cerca de metade das drogas medicinais humanas (KING et al., 2003).

1.2.5 Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) no contexto de efluentes hospitalares

O Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) (Figura 2) é a instituição de saúde mais importante da região central do Estado do Rio Grande do Sul. Oferece cobertura para toda a região centro-oeste do estado (população de 1,6 milhões de habitantes). (http://www.husm.ufsm.br).

Figura 2– Hospital Universitário de Santa Maria – HUSM.

No HUSM, o tratamento das águas servidas geradas é feito através de sistema de fossas sépticas conjugada a filtros anaeróbios (Figura 3), sendo o efluente tratado descartado em um córrego que corta o campus da Universidade (VASCONCELOS et al., 2009-a; DA SILVA, 2012-a; WILDE, 2012).

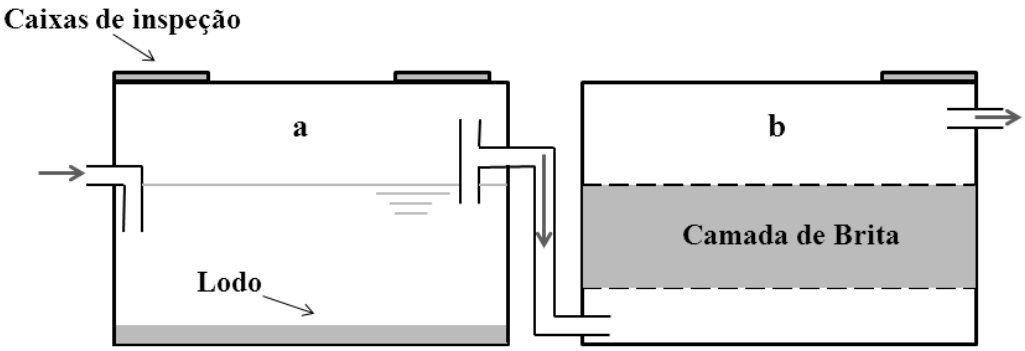


Figura 3 – Representação esquemática do sistema de tratamento de efluentes adotado pelo HUSM: (a) fossa séptica conjugada a (b) filtro anaeróbio. Fonte: DA SILVA, 2012; WILDE, 2012.

As características físico-químicas do efluente do HUSM, após o tratamento, bem como os limites permitidos para estes parâmetros de acordo com o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Parâmetros físico-químicos médios do efluente tratado do HUSM.

Parâmetro	Valor	Limites (CONAMA)
DBO_5(mg L^{-1})	303,7	≤ 120
DQO (mg L^{-1})	200-612	≤ 200
$A_{UV\ 254}$	1,254	-
Nitrogênio amoniacal (mg L^{-1})	52,0	20
Nitrogênio total (mg L^{-1})	59,1	10
Alcalinidade (mg L^{-1})	200	-
NO_3^- (µg L^{-1})	680	<10
Cl^- (mg L^{-1})	132	-
PO_4^{3-}total (mg L^{-1})	7,5	1
SO_4^{2-}	4,0	-
K^+ (mg L^{-1})	21,9	-
Na^+(mg L^{-1})	150,5	-
Sólidos suspensos (mg L^{-1})	57,0	≤ 150
Sólidos totais a 105 °C (mg L^{-1})	484,0	-
pH	7-8	5-9
Temperatura média (°C)	23	< 40

Fonte: MARTINS et al.,2009; MINETTO, 2009; CONAMA, 2011; WILDE, 2012; DA SILVA, 2012.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 5, o efluente do HUSM, mesmo após tratamento, apresenta alta carga orgânica variável e alguns parâmetros acima dos limites estabelecidos pelo CONAMA.

Neste contexto, o LATER vem realizando estudos enfocando o lançamento de efluentes e abordando potenciais soluções para a problemática em questão (MARTINS et al., 2008, 2009, 2011; VASCONCELOS et al., 2009-a, VASCONCELOS et al., 2009-b; BRENNER et al., 2011; HENRIQUES et al., 2012; DA SILVA et al., 2013).

1.2.6 Planejamento de experimentos

Tradicionalmente, a otimização de experimentos e processos é realizada de forma univariada, ou seja, apenas uma variável tem sua condição alterada e, as respostas, são, então, medidas em relação a estas variações. As maiores desvantagens deste procedimento são: não avaliar os efeitos de interação que ocorrem entre as variáveis estudadas, bem como, envolver um número maior de experimentos (ARSAND, 2010; WILDE, 2012).

Nos últimos anos, a quimiometria tem surgido nesta interface como uma ferramenta para auxiliar à otimização de métodos analíticos, considerando-se suas vantagens como a redução do número de experimentos resultando em um menor consumo de reagentes, menor tempo de análise, aumentando consideravelmente a qualidade da informação. Além disso, os métodos multivariados de calibração/otimização permitem o desenvolvimento de modelos matemáticos que avaliem a importância e significância estatística dos efeitos dos fatores em estudo, bem como, a interação dos mesmos, para os quais, os níveis de todas as variáveis são alteradas simultaneamente (FERREIRA et al., 2007).

O planejamento experimental, baseado nos fundamentos estatísticos, é sem dúvida alguma, uma ferramenta poderosa para se chegar às condições otimizadas de um processo, desenvolvimento da formulação de produtos dentro das especificações desejadas ou simplesmente para avaliar os efeitos ou impactos que os fatores têm nas respostas desejadas. Para atingir estes objetivos várias estratégias podem ser utilizadas. Os delineamentos fatoriais fracionados são construídos selecionando-se um subconjunto de tamanho 2^{k-p} de todos os pontos possíveis de um planejamento 2^k e executando a simulação somente para os pontos escolhidos. As simulações são excelentes para uma avaliação prévia das variáveis e seleção daquelas que devam ser consideradas (RODRIGUES & LEMMA, 2009).

A análise de variância (ANOVA) é o método mais confiável para avaliar a qualidade do modelo ajustado. Por meio desta, pode-se avaliar a significância da regressão usada para prever as respostas. A maior parte das variações observadas deve ser descrita pela equação de regressão (RODRIGUES & LEMMA, 2009).

Na otimização do processo, uma etapa importante em que cabe ao pesquisador investir algum tempo no planejamento do processo e no estudo das variáveis envolvidas, coletando informações na literatura, para que a definição da estratégia de realização dos ensaios possa agregar melhor qualidade aos resultados obtidos (RODRIGUES e IEMMA, 2009).

O planejamento fatorial completo de dois níveis ou fatorial 2^k é o tipo de planejamento no qual se define para cada fator dois níveis de valores, nível alto e nível baixo, e testa-se cada combinação de fatores. Um aspecto a ser considerado neste tipo de planejamento é que, como há somente dois níveis de cada fator, tem-se que supor que a resposta é aproximadamente linear na faixa dos níveis dos fatores escolhidos (BEZERRA et al., 2008).

Outro aspecto importante é que, para experimentos com um grande número de fatores sendo considerado, o fatorial completo resulta em um número extremamente grande de combinações para serem testadas. O número de ensaios necessários para se fazer um planejamento 2^k completo aumenta rapidamente com k, número de fatores investigados.

Quanto maior *k*, maior será o número de experimentos envolvidos no processo (DA SILVA, 2012).

Neste trabalho, planejamento de experimentos fracional fatorial e Box-Behnken design foram utilizados na otimização dos experimentos de metodologias de extração MELL e SBSE, bem como, na otimização das melhores condições de aplicação de fotólise e fotocatálise heterogênea na degradação dos fármacos EFCT.

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1 Fluxograma experimental

A Figura 4 apresenta um fluxograma com a parte experimental realizada neste trabalho, enfatizando a coleta das amostras no efluente do HUSM, bem como, as metodologias de extração estudadas, o desenvolvimento dos métodos analíticos para a determinação e estudo de EFCT, seus metabólitos e subprodutos pela aplicação de PAOs.

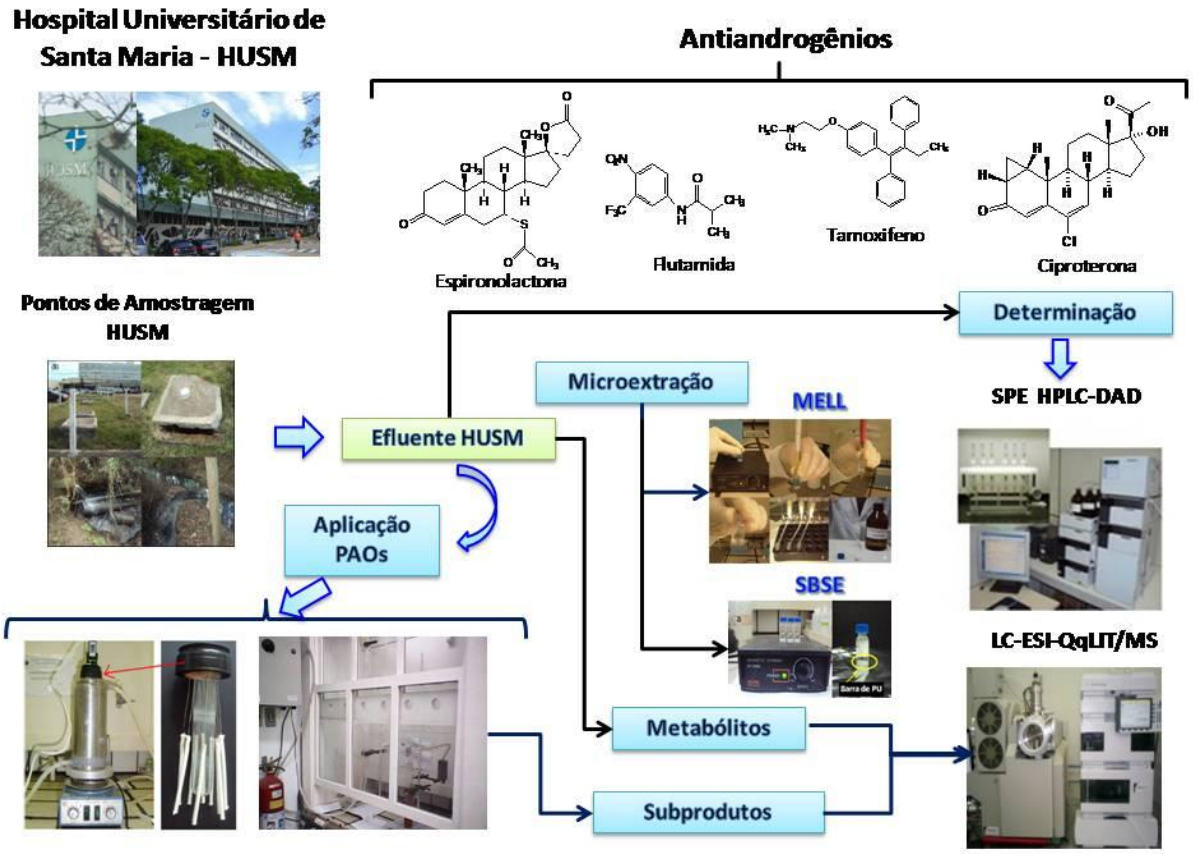


Figura 4 – Fluxograma experimental.

1.3.2 Reagentes e soluções

Utilizaram-se reagentes de grau analítico e as soluções injetadas no cromatógrafo a líquido foram preparadas com água de alta pureza, 18 MΩ cm, de um aparelho Direct-Q 3 Ultrapure Water Systems da Millipore (http://www.millipore.com). Os reagentes utilizados foram: metanol grau HPLC, acetato de amônio P.A.; ácido fórmico P.A. e ácido acético glacial P.A. (J.T.Baker, Xalostoc, México).

Os padrões analíticos dos fármacos EFCT foram matéria prima certificada de acordo com *European Pharmacopoeia/United States Pharmacopoeia* (EP/USP), os resultados dos testes realizados estão na Tabela 6. Os padrões de trabalho foram preparados pela diluição dos compostos em metanol em concentração de 1000 µg mL^{-1}.

Tabela 6 – Testes de Controle de Qualidade EP/USP (matéria prima EFCT).

Composto	Testes	Especificação	Resultado
Espironolactona	Descrição	Pó branco amarelado ou branco (EP)	De acordo
	Doseamento	Por UV-Visível 97,0 a 102,0% em substância seca (EP)	101,07%
Flutamida	Descrição	Pó cristalino amarelo pálido (USP)	De acordo
	Teor (sob base anidra)	98,0 – 101,0% (USP)	99,36%
Ciproterona acetato	Descrição	Pó cristalino branco ou quase branco (EP)	De acordo
	Teor (base anidra)	97,0 – 103,0% (EP)	100,33%
Tamoxifeno citrato	Descrição	Pó fino cristalino branco (USP)	De acordo
	Doseamento	Por potenciometria: 99,0 – 101,0% (substância seca) (USP)	99,16%

*Laudos completos, no Apêndice A.

1.3.3 Coleta e preparo das amostras

Esta pesquisa foi desenvolvida utilizando-se como amostra efluente hospitalar do Hospital Universitário de Santa Maria – HUSM/UFSM.

Antecedendo o período de coletas de amostra de efluente hospitalar, os alunos do LATER passaram por um processo de imunização contra tétano, hepatite A e B. Durante as coletas utilizaram-se permanentemente Equipamentos de Proteção Individual (EPIs), como aventais, luvas, máscaras, óculos de proteção e calçados fechados.

As amostras de efluente foram coletadas da canalização do efluente geral do HUSM (Figura 5) após o sistema de tratamento (fossa séptica e filtro anaeróbio), no efluente que sai diretamente do pronto atendimento do hospital (PA-HUSM), também após o sistema de tratamento. Estas amostras foram filtradas em filtro qualitativo (celulose, ø 26 µm) para aplicação de PAOs e estudo de novas técnicas de extração; e, em filtro quantitativo (filtro de nitrato de celulose, ø 0,45 µm) para a determinação das concentrações dos fármacos e identificação dos metabólitos.

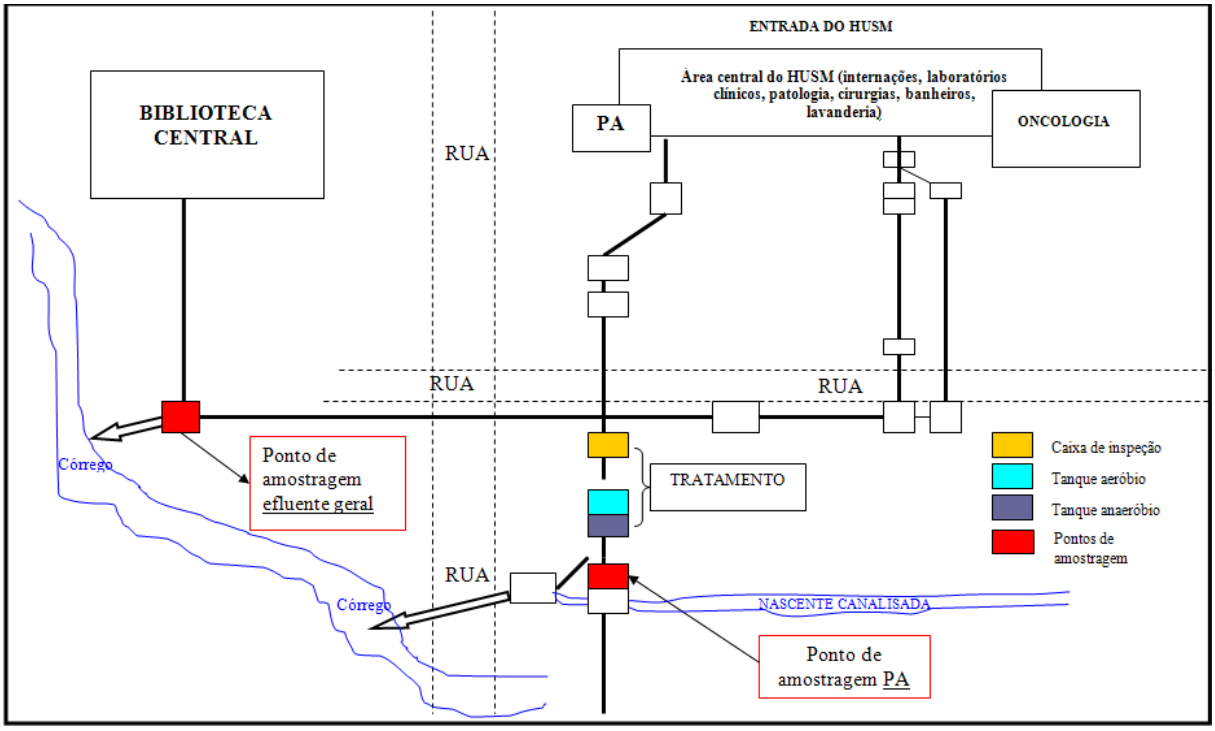


Figura 5 – Organograma do sistema de esgotos, sistema de tratamento de efluentes do HUSM e pontos de amostragem.

O procedimento de coleta adotado foi o de amostragem composta, para a determinação de EFCT por SPE, aplicação de técnicas de microextração e estudo de degradação por meio de PAOs. As coletas foram feitas de hora em hora, das 08:00 até as 20:00 h. Para a determinação de EFCT, realizaram-se as coletas durante 8 dias seguidos. Após as 20:00 h, devido ao difícil acesso ao ponto de amostragem, não foram feitas coletas de efluente hospitalar. As amostras coletadas foram acondicionadas em frascos de polietileno e mantidas sob refrigeração (4–8 °C). Na figura 6 pode-se observar os pontos de amostragem no sistema de esgotos do HUSM-UFSM.

Figura 6 - Sistema de esgoto UFSM-HUSM, pontos de amostragem. (A) Ponto de amostragem PA-HUSM. (B) Ponto de amostragem efluente geral.

CAPÍTULO 2

Desenvolvimento do Método HPLC-DAD e Técnicas de Extração

2.1 INTRODUÇÃO

A técnica de HPLC continua sendo a mais amplamente utilizada mundialmente para a separação de misturas de compostos, particularmente, em química analítica orgânica e bioquímica, com o propósito de identificar, quantificar ou purificar os componentes individuais de uma mistura. Distingue-se da cromatografia líquida convencional (de baixa pressão) pelas altas pressões operacionais (HPLC=50-350 bar) (COLLINS et al., 2006).

Um instrumento de HPLC inclui, normalmente, auto amostrador, bombas e detector, como também um microprocessador e software de controle para aquisição dos dados. Vários detectores, que podem ser usados em comum, estão disponíveis comercialmente: UV-visível, fluorescência, arranjo de diodos, espectrômetro de massas, índice de refração, dentre outros (CIOLA, 2000).

Inicialmente, neste trabalho, para estudo das técnicas de extração das drogas anticâncer EFCT, o método HPLC-DAD foi ajustado em seus parâmetros operacionais.

O uso de fases sólidas na extração de analitos orgânicos e bioquímicos de matrizes biológicas e ambientais, complexas, remonta os anos 50 do século passado. Baseia-se no emprego de fases sólidas, como por exemplo, diversos adsorventes comerciais disponíveis em cartuchos na forma de seringa ou cilindros. Os materiais de recheio dos cartuchos sofrem grande evolução, como por exemplo, os derivados de sílica – etila, octadecila e dodecila, aminopropila, nitrila, alumina neutra e os derivados de resina de poliestireno-divinilbenzeno (COLLINS et al. 2006).

Neste trabalho, além da extração em fase sólida simples (SPE), foram estudadas, também, a microextração líquido-líquido (LLME) e a microextração em barras de agitação (SBSE). A LLME e a SBSE são variantes evolutivas das técnicas de extração que encontram grande aplicação e interesse em diversas áreas da ciência (YIANTZI et al. 2010; HUANG et al., 2011; DA SILVA et al. 2013).

2.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.2.1 Técnicas de extração

Para analisar fármacos em amostras ambientais com matrizes complexas, a preparação da amostra é a etapa fundamental. Vários objetivos nesta etapa precisam ser cumpridos antes da análise experimental. Os compostos orgânicos-alvo da análise precisam ser separados da matriz aquosa, muitas vezes complexa, como é o caso de efluentes em geral, esgoto urbano, amostras de água marinha, águas superficiais e outras, para remoção dos interferentes. Etapas de extração e concentração são aplicadas para melhorar a sensibilidade na determinação do analito, bem como, para adequar a matriz do analito à analise instrumental que será usada (WU et al., 2010).

As técnicas convencionais mais utilizadas para a extração de fármacos em amostras complexas são a extração líquido-líquido (LLE, do inglês *liquid-liquid extraction*) e extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) (OLIVEIRAet al., 2008).

Atualmente, tornaram-se indispensáveis técnicas de microextração, livres de solventes, ou que fazem uso de menores quantidades de solventes, sendo amplamente empregadas, e representando tendência irreversível em termos de metodologia analítica, particularmente, na área ambiental (KRÜGER et al., 2011).

A literatura relata trabalhos que desenvolvem novas técnicas de microextração destinadas aos mais diversos analitos e matrizes. Entre as mais utilizadas para a extração de contaminantes emergentes destacam-se a microextração em fase sólida (SPME), a microextração em gota simples (SDME), a microextração em fase líquida (LPME) e a extração sortiva em barra de agitação (SBSE), microextração em fase líquida por fibra oca (HF-LPME), polímeros de impressão molecular (MIP), entre outras (RICHARDSON, S.D. & TERNES A.T., 2011; DA SILVA et al., 2013).

2.2.2 Extração em fase sólida (SPE)

As concentrações em efluentes e mananciais de substâncias ativas oriundas de fármacos PPCPs, PhACs, POPs e EDCs, entre outros, geralmente encontram-se em níveis muito baixos (μg L^{-1}, ng L^{-1} e pg L^{-1}), ou seja, indetectáveis à maioria dos detectores convencionais. Desta forma, procedimentos de pré-concentração e *clean-up* para separar a matriz do analito são necessários. Para tanto, a SPE vem obtendo ainda grande emprego e novas fases sólidas vêm sendo testadas e seu desempenho avaliado frente a diferentes grupos de substâncias. A pré-concentração com SPE Oasis HLB tem se mostrado mais eficiente: em combinação com polímeros lipo/hidrossolúveis conseguem reter diferentes substâncias em diferentes pHs, entretanto, os extratores com C18 apresentam bons resultados para um número significativo de fármacos (ARSAND, 2010, WILDE, 2012).

TEUNISSEN et al. (2010) fizeram revisão sobre métodos bioanalíticos para a determinação de Tamoxifeno e seus metabólitos, em que encontram como mais referenciados: SPE oasis HLB na determinação de Tamoxifeno em soro sanguíneo; SPE com superfície ciano semipermeável para determinação de Tamoxifeno em fígado humano e, para determinação em plasma sanguíneo, SPE de ciano nitrila.

AL-ODAINI et al. (2010) desenvolveram metodologia analítica para a determinação simultânea de 23 fármacos de diferentes classes terapêuticas (antidiabéticos, anti-hipertensivos, agentes hipolipidêmicos, receptor agonista β2-adrenergico, anti-histamínicos, analgésicos e hormônios sexuais – dentre eles o acetato de Ciproterona) em amostras de água de rio e efluentes de ETE. Para a etapa de *clean-up* e pré-concentração utilizou-se SPE, com cartuchos Oasis MCX (3 cm^3, 60 mg), eluídos após com 4 diferentes reagentes para máxima recuperação de todos os 23 analitos (>70%).

Para o controle de "*doping*", as análises das amostras são feitas em duas etapas: uma triagem rápida e, no caso de resultado positivo, uma análise confirmatória. Para examinar e confirmar 103 agentes de doping, de várias classes (β-bloqueadores, estimulantes, diuréticos - dentre eles a Espironolactona e narcóticos), em urina, utilizou-se extração em fase sólida (SPE) específica (Oasis MCX cartuchos de 30 mg com tamanho de partícula de 30 μm, em uma placa de 96 poços), para o método de confirmação dos compostos básicos, neutros e ácidos e, detectados por MS em tandem, de modo a obter os íons precursores e produtos característicos (BADOUD et al., 2010).

Cartuchos de extração em fase sólida (SPE) C18 contendo octadecilcilano foram utilizados para *clean-up* e extração de flutamida em amostras de água das soluções estoque e de cada tanque onde peixes machos do tipo espinhela (esgana-gata) foram expostos para estudo da supressão e expressão do comportamento reprodutivo desta espécie frente a este antiandrógeno. As determinações foram feitas por meio de LC-MS (SEBIRE et al., 2008).

A aplicabilidade de um procedimento envolvendo SPE em membrana microporosa de polipropileno foi avaliada por BEDENDO & CARASEK (2010) para extração de vários pesticidas organoclorados em água de rio, tomates e amostras de morango.

2.2.3 Microextração líquido-líquido

Uma tendência recente de busca por novas técnicas de preparação de amostras é de miniaturização do método tradicional de LLE com o objetivo de reduzir a razão volumétrica entre a fase aquosa, chamada de doadora, e a fase orgânica, denominada de aceptora, e favorecer a transferência dos analitos da fase aquosa para a fase orgânica (elevado fator de enriquecimento). Isto pode ser obtido usando-se tanto fases líquidas imiscíveis (microextração em gota suspensa) quanto com membranas separando as fases aceptora e doadora (extração em membrana) (DE OLIVEIRA et al., 2008; YIANTZI et al., 2010).

Para correlacionar a técnica de extração (LLME), desenvolvida neste trabalho, convém rever conceitos de outras técnicas já estabelecidas. O conceito de microextração em gota suspensa (SDME) foi introduzido em 1996 por Jeannot e Cantwell. Com o desenvolvimento, esta técnica passou a ser feita com microsseringa, onde a fase orgânica era suspensa na ponta da agulha. Tal sistema emprega microlitros de fase aquosa contidos no interior da seringa (anterior à gota de solvente orgânico) (DE OLIVEIRA et al., 2008).

Em sistemas de duas fases, a transferência dos analitos da fase aquosa para a fase orgânica pode ser assim descrita na equação 1:

A (fase doadora) $\rightleftharpoons$ B (fase aceptora) (Equação 1)

onde A representa o analito de interesse. Nesse caso, o coeficiente de partição do analito entre a fase orgânica e doadora $K_{org/d}$ é dado pela expressão:

$$K_{org/d} = C_{eq,org}/C_{eq,d} \quad \text{(Equação 2)}$$

onde $C_{eq,org}$ é a concentração de A na fase aceptora no equilíbrio e $C_{eq,d}$ é a concentração de A na fase doadora no equilíbrio.A recuperação (R) pode ser definida como a quantidade total de analito, em porcentagem, que é transferida para a fase aceptora ao final da extração; além do coeficiente de partição, a razão entre o volume da fase doadora (V_d) e a fase aceptora (V_{org}) também governa a recuperação do analito, de acordo com:

$$R = K_{org/d}\, V_{org} / K_{org/d}\, V_{org} \times 100 \quad \text{(Equação 3)}$$

Sendo assim, conclui-se que a extração em duas fases é favorecida para analitos hidrofóbicos, ou seja, com elevados coeficientes de partição (BJERGAARD & RASMUSSEN, 2008).

Alguns dos parâmetros que afetam a LPME também estão relacionados com a eficiência da extração LLME sendo estes: características dos analitos (coeficientes de ionização e partição), tipo de solvente orgânico, tempo e temperatura de extração, agitação do sistema, ajuste do pH da amostra e força iônica.

- Solvente orgânico - Uma etapa fundamental na otimização de métodos na LLME é a seleção do solvente orgânico. Algumas propriedades são necessárias para um solvente orgânico ser empregado em LLME, dentre elas: baixa solubilidade em água, prevenindo a dissolução da fase orgânica na aquosa (doadora); baixa volatilidade, evitando a perda de fase orgânica durante a extração; solubilidade adequada para o analito de interesse.Vários solventes orgânicos têm sido utilizados, como éter diexílico, n-octanol, acetato de hexila, acetato de butila, acetato de dodecila, éter dibutílico e isooctanol, clorofórmio, éter dietílico, tolueno ou misturas desses solventes (RASMUSSEN & BJERGAARD, 2004; PSILLAKIS & KALOGERAKIS 2003).
- Tempo de extração - A eficiência da extração na LLME depende da transferência de massa do analito da fase aquosa para a orgânica. É um processo de equilíbrio e, portanto, a recuperação do analito aumenta com o tempo de extração até atingir uma

situação de platô. Neste ponto, o equilíbrio é atingido e a distribuição do analito entre as fases permanece constante (RASMUSSEN & BJERGAARD, 2004).

- Temperatura - Com o aumento da temperatura, os coeficientes de difusão aumentam em resposta à diminuição da viscosidade. Logo, o tempo requerido para alcançar o equilíbrio é diminuído. Por outro lado, os coeficientes de partição para a fase aceptora diminuem, reduzindo a quantidade de fármaco extraído no estado de equilíbrio. Portanto, a velocidade das extrações pode ser melhorada a custa da perda da detectabilidade do método. Contudo, a LLME normalmente é executada à temperatura ambiente, evitando-se possíveis problemas de formação de bolhas e evaporação do solvente durante a extração, já que a quantidade de solvente utilizada é bastante pequena (BASHEER et al., 2002).
- Agitação - Normalmente, a agitação da amostra é aplicada para acelerar a cinética de extração, facilitando a difusão dos analitos através da interface fase doadora – solvente orgânico. Logo, diminui-se o tempo necessário para o sistema atingir o equilíbrio (LAMBROPOULOU & ALBANIS, 2007).
- pH da fase doadora - O pH da amostra é crucial para a eficiente extração de compostos ácidos e básicos. O ajuste do pH resulta em uma maior razão de distribuição e garante elevados fatores de enriquecimentos e valores de recuperação do analito de interesse. Ajustes no pH podem aumentar a eficiência da extração, uma vez que tanto o equilíbrio de dissociação quanto a solubilidade de ácidos e bases são diretamente afetados pelo pH da amostra (BJERGAARD & RASMUSSEN, 2008).
- Força iônica – (Sais). O efeito da adição de sais à matriz é complexo. Pode aumentar a eficiência da extração, particularmente para analitos mais polares, devido ao efeito denominado “salting-out”. Neste processo, as moléculas de água da fase doadora passam a hidratar também os íons adicionados ocorrendo, então, a redução de moléculas do analito dissolvidos na solução aquosa por mecanismos de competição. Por outro lado, a interação das moléculas do analito com os íons adicionados, pode reduzir a difusão do analito para a fase extratora; além disso, o aumento da viscosidade da matriz pode reduzir a mobilidade dos analitos e prejudicar também a extração. Entre os sais empregados como aditivos na fase doadora, o cloreto de sódio é o mais comum (DE OLIVEIRA et al., 2008).

Grande quantidade de medicamentos é lançada no meio ambiente através de efluentes hospitalares (BRENNER et al., 2011; MARTINS et al., 2011; MARTINS et al., 2009; VASCONCELOS et al., 2009; HENRIQUES et al., 2012), caracterizados por apresentarem uma matriz complexa, carregada de micro-organismos, metais pesados, substâncias químicas

tóxicas e elementos radioativos. A descarga direta destes efluentes, em sistemas de esgoto urbano e cursos de água, sem tratamento preliminar constituem potencial risco para os ecossistemas (SUAREZ et al., 2009). Neste contexto YIANTZI et al. (2010) desenvolveram uma nova e rápida técnica de microextração baseada no equilíbrio do solvente, denominada microextração líquido-líquido e agitação vórtex (VALLME - do inglês - *vortex-assisted liquid-liquid microextraction*), para a análise de traços de octilfenol, nonilfenol e bisfenol-A em amostras de água e de águas residuais.

2.2.4 Extração sortiva em barra de agitação (SBSE)

A técnica de preparo de amostras SBSE objetiva a extração de compostos orgânicos e apresenta fundamentos similares da SPME. Foi desenvolvida no ano de 1999 por Baltussen e colaboradores (DAVID e SANDRA, 2007; UNCETA et al., 2010). Baseia-se no equilíbrio de partição dos analitos entre a fase extratora e a amostra, assim como na LLE. Porém, a SBSE necessita de pequenos volumes de solventes orgânicos e não gera grandes quantidades de resíduos como a LLE (KRÜGER et al., 2011).

A primeira etapa, de adsorção, consiste na interação dos analitos com os sítios ativos presentes na fase extratora até atingir o equilíbrio de partição. O processo de adsorção dos analitos na fase extratora está diretamente ligado a características químicas como coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}) e polaridade, a qual deve ser semelhante a da fase extratora a fim de que se obtenham taxas de recuperação satisfatórias. Condições como temperatura e concentração de cloreto de sódio adicionada à amostra podem influenciar no processo de adsorção dos analitos na fase extratora. Como consequência, o volume e a área superficial da fase extratora irão influenciar nas taxas de recuperação da técnica SBSE (KAWAGUCHI, 2006-b; CHAVES & QUEIROZ, 2008).

A etapa seguinte consiste na dessorção dos analitos (termicamente ou em solvente). São comercializados dispositivos automatizados que podem ser acoplados a cromatógrafos a gás para a dessorção térmica dos analitos da fase extratora. A dessorção em solvente consiste na solubilização direta dos analitos adsorvidos na fase extratora para posterior análise cromatográfica (CHAVES & QUEIROZ, 2008).

Materiais poliméricos, homogêneos, não porosos, são as fases sortivas empregadas em SBSE. Poliuretano (PU) e polidimetilsiloxano (PDMS) são exemplos das fases extratoras mais utilizadas na aplicação da técnica de SBSE (DAVID e SANDRA, 2007). A figura 1 apresenta a estrutura do PU e do PDMS.

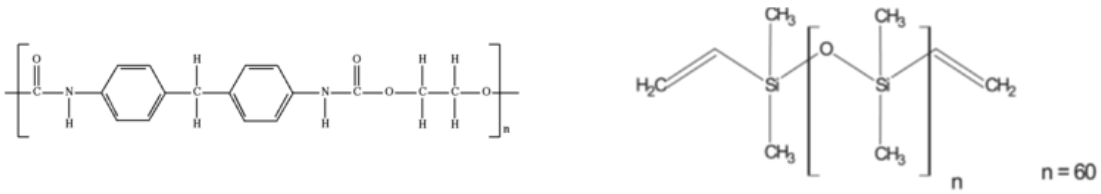


Figura 1– Estrutura molecular do PU (a) e PDMS (b).

A SBSE apresenta alta sensibilidade e diversidade de aplicações, geralmente, com o uso de barras de extração comerciais e fases extratoras modificadas. Dentre as aplicações da técnica estão à determinação de fármacos (MELO et al., 2009; UNCETA et al., 2010), pesticidas (PÉREZ-CARRERA et al., 2007; OCHIAI et al., 2008), bifenilas policloradas (PÉREZ-CARRERA et al., 2007), compostos halogenados (KAWAGUCHI, et al., 2005), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (ROY et al., 2005; PÉREZ-CARRERA et al., 2007, KRÜGER et al., 2011), fenóis (LIU et al., 2004), entre outros compostos de interesse ambiental.

Diversos exemplos da aplicação de SBSE na determinação de fármacos são relatados na literatura envolvendo a avaliação de amostras alimentíceas, de origem ambiental e biológica. Huang e colaboradores realizaram a determinação simultanea de metronidazol, ronidazol, dimitronidazol e tinidazol em amostras de mel obtendo-se taxas de recuperação na faixa de 71,1-114% (HUANG et al., 2011).

Em 2012, Carpinteiro e colaboradores realizaram a determinação de benzotriazol em matrizes de águas residuais utilizando SBSE/GC-MS verificando-se recuperações entre 47,9 a 103,1% nas diferentes condições avaliadas para a extração sortiva (CARPINTEIRO et al., 2012).

Antidepressivos, dentre eles, sertralina, fluoxetina, citalopram, paroxetina, nortriptilina, imipramina, desipramina, amitriptilina, foram determinados em amostras de

plasma humano por meio de SBSE/HPLC-UV (CHAVES & QUEIROZ, 2008). Clorpromazina e trifluoperazina foram determinadas por Bazhdanzadeh e colaboradores em amostras de soro humano, utilizando SBSE/HPLC-UV, obtendo-se taxas de recuperação entre 103 e 105% (BAZHDANZADEH et al., 2011). A determinação de diclofenaco em amostras de urina utilizando SBSE/HPLC-UV foi realizada por Kole e colaboradores evidenciando-se neste estudo taxas de recuperação superiores a 70% (KOLE et al., 2011).

2.2.4.1 Princípios da SBSE

Para amostras aquosas, a extração do soluto, baseia-se no coeficiente de partição dos solutos entre a fase extratora e a fase aquosa (b-KAWAGUCHI et al., 2006). Alguns autores correlacionam o coeficiente de partição da técnica SBSE com o coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}). Para um analito específico, o coeficiente de distribuição octanol/água indica a eficiência da extração sortiva, quando utilizada a fase extratora PDMS.

O equilíbrio de sorção é dependente da razão entre as fases, sendo diretamente dependente da quantidade de PDMS contida na fase extratora, como pode ser observado abaixo (CHAVES & QUEIROZ, 2008).

$$K_{ow} \approx K_{PDMSW} = \frac{C_{PDMS}}{C_w} = \frac{m_{PDMS}}{m_w} . \frac{V_w}{V_{PDMS}} = \frac{m_{PDMS}}{m_w} . \beta \qquad \text{(Equação 4)}$$

O coeficiente de partição do analito entre as fases PDMS e aquosa ($K_{PDMS/w}$) é definido como a razão entre a concentração do analito na fase de PDMS (C_{PDMS}) e a concentração do analito em água (C_w), no equilíbrio. Esta razão, por sua vez, é igual ao produto entre razão das massas do soluto na fase PDMS (m_{PDMS}) e na fase aquosa (m_w) e β, onde β é igual a razão entre o volume da amostra e volume da fase extratora ($\beta = V_w / V_{PDMS}$).

O fator de recuperação é dado através da razão entre a quantidade de analito extraído (m_{PDMS}) e a quantidade inicial de analito em água ($m_o = m_{PDMS} + m_w$), que corresponde às correlações entre $K_{PDMS/w}$ e β:

$$\frac{m_{PDMS}}{m_o} = \frac{\frac{K_{PDMS}}{W}/\beta}{1+(\frac{K_{PDMS)}}{W}/\beta} \qquad \text{(Equação 5)}$$

De acordo com a equação 5, quanto maior a quantidade de PDMS e menor o β, maior será a eficiência de extração. Uma vez que o valor de K_{PDMS} é correlacionado ao valor de K_{ow}, a eficiência da extração em PDMS em geral diminui com o aumento da polaridade do analito (DAVID & SANDRA, 2007; CHAVES & QUEIROZ, 2008; PRIETO et al., 2010).

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Técnica de HPLC-DAD

Para a determinação de EFCT em efluente hospitalar, bem como, para estudo de novas técnicas de extração destes analitos, foi utilizado o sistema de cromatografia a líquido Shimadzu Modelo Prominence, constituído por bomba quaternária (LC-20AT), desgaseificador (DGU-20A_5), amostrador automático (SIL-20A), detector de arranjo de diodos (SPD-M20A), modulo comunicador (CBM-20A) e Software LC Solution (http://www.shimadzu.com). Na tabela 1, são apresentadas as condições cromatográficas para a determinação de EFCT.

Tabela 1– Condições cromatográficas utilizadas para os compostos de EFCT.

Condições cromatográficas	
Coluna	Shim-pack CLC-ODS(M) (250 x 4,6 mm, 4 μm)
Pré-coluna	Shimadzu G-ODS (4 mm)
Fase móvel	Fase orgânica: MeOH, contendo acetato de amônio (0,1 mol L^{-1}) e ácido acético (1%, m/v). Fase aquosa: tampão acetato de amônio (0,1 mol L^{-1}), contendo 1% de ácido acético. 77:23 (v/v)
Vazão da fase móvel	0,6 mL min^{-1}
Eluição	Modo isocrático
Comprimento de onda	254 nm (E); 280 nm (FCT)
Volume de injeção	20 μL
Tempo de retenção (min)	8,69 (E); 9,82 (F); 13,79 (C); 22,76 (T)
Corrida cromatográfica	27 min

* E=Espironolactona; F=Flutamida; C=Ciproterona; T=Tamoxifeno.

2.3.2 Técnica de SPE HPLC-DAD

Devido ao fato das concentrações dos compostos EFCT serem muito baixas no efluente hospitalar e a metodologia analítica (HPLC-DAD) utilizada para determinação dos mesmos nesta matriz não prover limites de quantificação (LQ) e detecção (LD)

suficientemente baixos, etapas de pré-concentração e *clean up* da amostra fizeram-se necessárias.

Para tanto, diferentes cartuchos (Chromabond RP-18ec, Strata C18, Strata E, Strata X) e diferentes solventes (MeOH, ACN) foram testados nas etapas de ativação, lavagem e eluição, bem como diferentes volumes, proporções e tampões (Tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7, água milli Q, ácido acético 0,1% v/v) sempre levando em consideração as propriedades físico químicas dos compostos EFCT e dados descritos na literatura (FLORES, et al., 2005; SEBIRE, et al., 2008; SANDALL, et al., 2006; CHRISTIAENS, et al., 2004). Após os testes os cartuchos da marca Phenomenex (Strata X 33 u Polymeric Reversed Phase 200 mg/3 mL) forneceram os melhores resultados na recuperação dos quatro compostos. Um estudo preliminar em solução foi realizado para testar a pré-concentração de EFCT nas concentrações de 1,05 µg L^{-1} Espironolactona; 0,85 µg L^{-1} Flutamida; 0,7 µg L^{-1} Ciproterona e 1,4 µg L^{-1} Tamoxifeno. Uma pré-concentração de 200 vezes foi testada com estas concentrações para que se pudesse aproximar-se ao LQ do método cromatográfico e chegar-se a quantificação destes compostos no efluente hospitalar. Posteriormente a matriz (efluente hospitalar isento dos compostos em estudo) foi enriquecida com os compostos nas mesmas concentrações testadas em solução para testar o efeito da matriz na pré-concentração e etapa de *clean up*. No organograma a seguir pode-se observar a metodologia de pré-concentração e *clean up* utilizada nas determinações EFCT, o fluxo de eluição utilizado não ultrapassou 2 mL min^{-1} durante toda a etapa de extração (Figura 2).

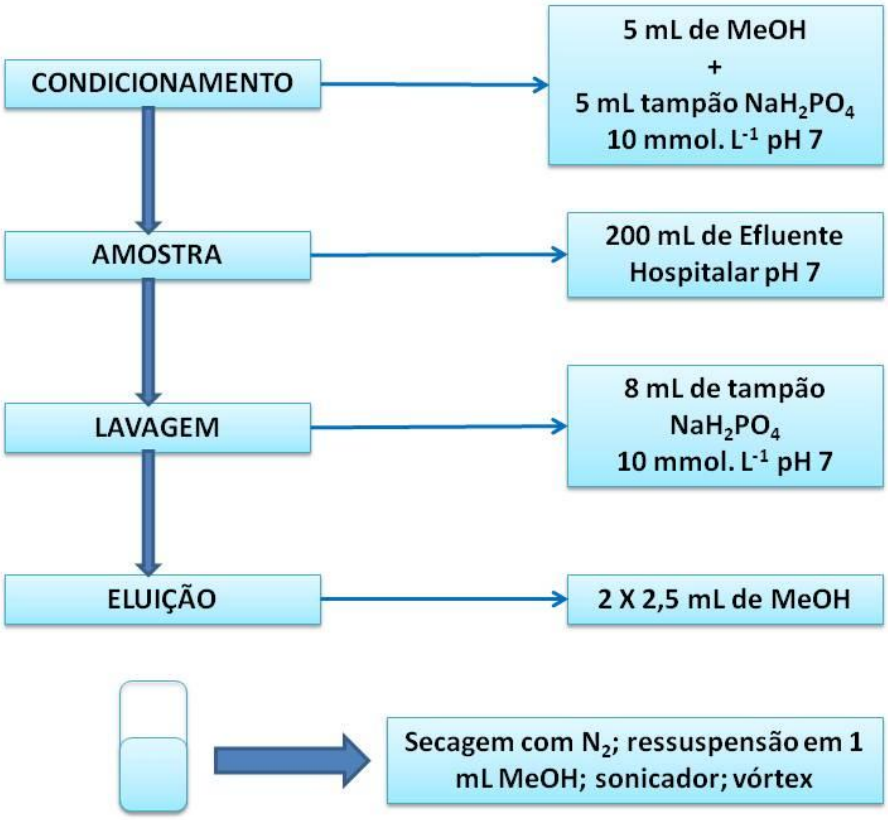


Figura 2- Fluxograma do procedimento SPE/*clean up* aplicado nas determinações EFCT com HPLC-DAD.

2.3.3 Microextração Líquido-Líquido

A otimização das variáveis para o processo de LLME dos analitos em solução aquosa e, em efluente hospitalar foram feitas com planejamento fatorial fracionário Box-Behnken Designs (3^{4-1}), resultando em uma matriz com 27 experimentos, em duplicata. As variáveis investigadas foram: volume de solvente (25, 50 e 100 µL); tempo de agitação (15, 30 e 60 segundos); quantidade de NaCl adicionada à amostra (0,1; 0,5 e 1 Mol. L^{-1}) e pH (5, 7 e 9). Testes prévios foram feitos para avaliar a eficiência de alguns solventes orgânicos (tolueno, diclorometano, hexano e clorofórmio) na extração dos analitos e a utilização de um corante (verde de bromocresol 1% - pH 5,9 regulado com tetraborato de sódio 0,1 Mol. L^{-1}) para facilitar a visualização da separação das fases no processo de microextração. Na figura 3, encontram-se detalhadas as etapas da LLME.

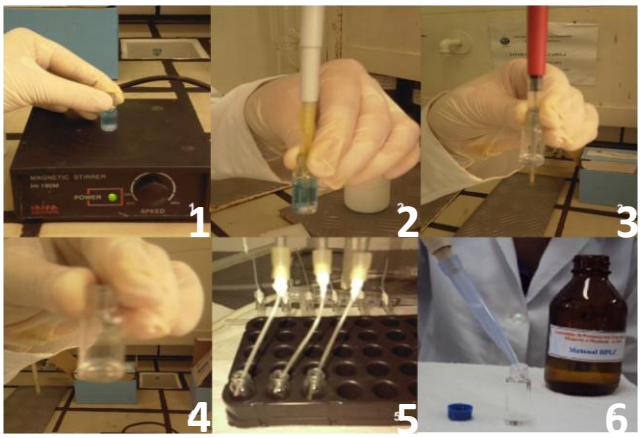


Figura 3 - Processo de microextração líquido-líquido: solução aquosa/efluente e solventes submetidos à agitação (1); solução aquosa/efluente é removida (2 e 3) e o solvente contendo os analitos (4) é evaporado em fluxo de nitrogênio (5); os analitos são reconstituídos em metanol (6).

A determinação dos analitos foi feita por cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos nos comprimentos de onda selecionados 254 nm e 280 nm como descrito previamente. As concentrações padrões utilizadas no estudo para cada um dos analitos foram as seguintes (Espironolactona - 210 µg L^{-1}, Flutamida - 680 µg L^{-1} e Ciproterona - 140 µg L^{-1}).

2.3.4 Barras de extração sortiva

Para o preparo das barras de extração sortiva de utilizou-se adesivo comercial à base de PDMS (Henkel Ltda., Itapevi, SP, Brasil), produto este à base de borracha de silicone (polidimetilsiloxano), fungicida e ácido acético. Também utilizou-se adesivo comercial à base de poliuretano (PU) (Brascola, Joenvile, SC, Brasil) constituído de adesivo selante monocomponente à base de polióis. Estes dois polímeros foram investigados no preparo das barras de extração a fim de avaliar o melhor componente para SBSE de EFCT.

Utilizou-se, ainda, para o preparo das barras de extração sortiva, canudos de polipropileno (Regina Ind. Com. SA, Presidente Prudente, SP, Brasil) como molde e haste de aço galvanizado revestido com pintura epóxi (clipes metálicos) (Bacchi Ind. Com. Ltda., Embu, SP, Brasil). Todos os materiais foram adquiridos no comércio local (Figura 4).

Figura 4 - Materiais utilizados no preparo das barras extratoras de PDMS e PU.

Prepararam-se barras de extração de PDMS e PU com as seguintes dimensões: 7 mm de comprimento e 3,5 mm de diâmetro (ϕ), que foi preparada acondicionado, em canudos de polipropileno, 80 mg de adesivo PDMS ou 225 mg de PU (quantidades necessárias pra preencher a área do canudo – 7 mm, ϕ 3,5 mm). No interior do adesivo de PDMS ou de PU se inseriu haste de aço galvanizado (7 mm), revestido com pintura epóxi, para prevenir a ocorrência de reações catalíticas resultantes do contato direto da haste com os polímeros. Na figura 5, é representada a barra de PDMS utilizada para a otimização da extração sortiva de EFCT em solução aquosa e em efluente hospitalar.

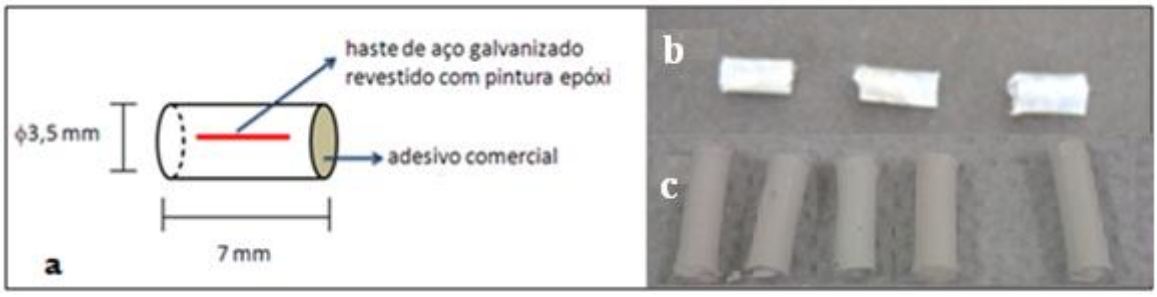


Figura 5– (a) Esquema das barras PDMS e PU para otimização da SBSE de EFCT em solução aquosa e em efluente hospitalar; (b) foto das barras de PDMS e (c) PU.

Antes de serem utilizadas nos experimentos SBSE de EFCT, ambos os tipos de barras extratoras foram submetidas a um tratamento final por 24 horas em metanol, sob agitação, a 50 °C. Este tratamento teve por finalidade à remoção de resíduos e possíveis interferentes presentes na composição dos adesivos comerciais. Para o reuso das barras entre extrações sucessivas, estas foram lavadas em metanol, nas mesmas condições do tratamento final, porém, por apenas 30 minutos.

2.3.4.1 Otimização do processo SBSE de EFCT

As condições para a SBSE de EFCT em solução e em efluente hospitalar foram otimizadas através de planejamento fatorial fracionado (2^{6-2}) standard designs (Box, Hunter, & Hunter) com seis fatores (variáveis independentes) e dois níveis. A matriz experimental resultante é composta de 16 ensaios com três replicatas do ponto central (PC). Para assegurar a confiabilidade dos resultados os experimentos foram feitos em duplicata.

Os parâmetros de SBSE otimizados foram: quantidade de cloreto de sódio (NaCl) adicionada a amostra; pH; temperatura e tempo de adsorção; temperatura e tempo de dessorção. Para solução aquosa (pH inicial 7) e efluente hospitalar (pH inicial 7-9), ajustou-se o pH com o uso de NaOH 0,1 mol L^{-1} ou HCl 0,1 mol L^{-1}.

Após testes prévios realizados com ambos os polímeros, conclui-se que os analitos não foram adsorvidos em PDMS, apenas em PU, polímero este utilizados nas barras para a otimização.

No processo de otimização da SBSE para a extração de EFCT em solução aquosa e em efluente hospitalar (Figura 6), a barra de PU (7 mm, ϕ 3,5 mm) foi inserida diretamente em um vial contendo 1 mL da amostra, previamente filtrada (filtro qualitativo –celulose, 26 µm) e submetida a agitação magnética com controle de temperatura. A barra de PU com os analitos adsorvidos foi transferida para um novo vial contendo 1 mL de solvente de dessorção (MeOH) e submetida novamente a agitação com controle de temperatura. Após, a barra de PU foi removida do vial e a amostra pode ser analisada diretamente por HPLC-DAD utilizando a metodologia de determinação de EFCT desenvolvida e validada previamente. As concentrações utilizadas no estudo de SBSE para cada um dos analitos foram as seguintes (Espironolactona – 210 µg L^{-1}, Flutamida – 680 µg L^{-1} e Ciproterona – 140 µg L^{-1}).

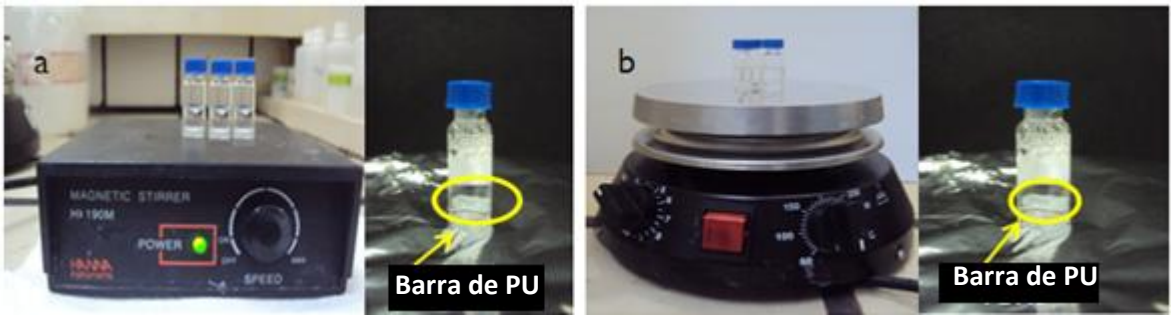


Figura 6 – Representação esquemática da otimização da SBSE de EFCT em solução aquosa e em efluente hospitalar utilizando barras de PU (7 mm, ϕ 3,5 mm). (a) processo de adsorção dos analitos na fase extratora e (b) processo de dessorção em solvente.

2.3.4.2 Validação do processo de SBSE para EFCT

A validação do processo de SBSE de EFCT nas condições otimizadas a partir do planejamento fatorial foi feita em um nível concentração compreendido na faixa quantificável com segurança pelo HPLC-DAD, com 6 replicatas (n = 6).

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.4.1 Para a aplicação da técnica de HPLC-DAD

A cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos foi adequada para a determinação dos compostos EFCT, de polaridades e propriedades físico químicas e moleculares distintas, segundo recomendações da literatura (KASHTIARAY, et al., 2011; HASSONVILLE, et al., 2004; KANG, et al., 2008; MENEZES & STORTI, 2005) sobre fases móveis e colunas; posteriormente, fez-se o ajuste das condições cromatográficas para a determinação conjunta dos quatro compostos, concomitantemente, chegando-se às condições previamente descritas (Tabela 1). Avaliaram-se, também, os melhores comprimentos de onda, que proporcionaram cromatogramas, o mais livre possível de interferentes, partindo-se do pressuposto que a amostra a ser trabalhada apresenta grande complexidade (efluente hospitalar). Na figura 7, podem ser observados os cromatogramas HPLC-DAD obtidos para EFCT.

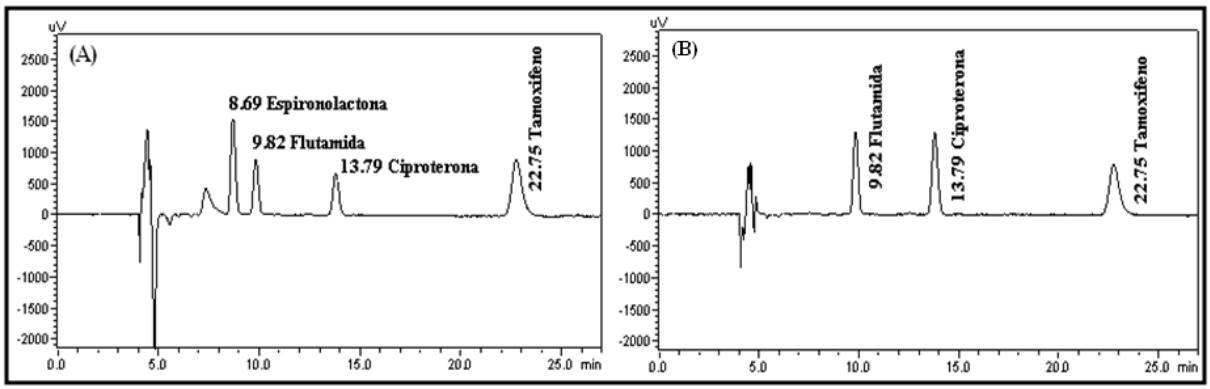


Figura 7 - Cromatogramas HPLC-DAD dos analitos EFCT. (A) EFCT/254 nm. (B) FCT/ 280 nm.

A validação do método instrumental, ou seja, a resposta do equipamento às condições cromatográficas aplicadas foi feita pela injeção de soluções-padrão dos compostos EFCT para a obtenção do limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ), bem como, a construção da

curva de calibração para aquisição dos dados necessários às principais Figuras-de-mérito (Tabela 2).

Tabela 2– Figuras-de-mérito do instrumento HPLC-DAD para EFCT.

Figuras-de-mérito	**Espironolactona**	**Flutamida**	**Ciproterona**	**Tamoxifeno**
Faixa linear[a] (µg L^{-1})	210 – 840	680 – 2720	140 – 2240	280 – 1120
Coeficiente de correlação (R^2)	0,999	0,995	0,994	0,996
Equação da reta	y = 48,05x - 519,2	y = 41,77x + 613,82	y = 70,538x – 596,6	y = 31,814x + 844
Limite de detecção – LD[b] (µg L^{-1})	60,0	200	42,0	84,0
Limite de quantificação – LQ[c] (µg L^{-1})	210	680	140	280
Tempo de retenção (min)	8,69	9,82	13,79	22,75
Comprimento de onda λ (nm)	254	280	280	280

[a]para 7 níveis de concentração.
[b]Limite de detecção para S/N = 3 (*n*=6).
[c] Limite de quantificação para S/N =10 (*n*=6).

2.4.2 Aplicação da extração em fase sólida – SPE

A metodologia SPE foi validada, primeiramente, em solução aquosa em 3 níveis de concentração (dentro da faixa linear do método) e, posteriormente, em efluente hospitalar (livre de EFCT, matriz isenta), fortificado com concentrações conhecidas dos EFCTs para testes de recuperação. Na tabela 3, podem ser observados os resultados dos testes de recuperação para EFCT em diferentes concentrações por SPE.

Tabela 3- Recuperações de EFCT nos cartuchos SPE Strata X em solução aquosa e em efluente hospitalar, em diferentes concentrações (n = 3).

Analitos	**Concentração µg L^{-1}**	**Recuperação solução (%)**	**RSD (%)**	**Recuperação efluente (%)**	**RSD (%)**
Espironolactona	1,00	101,4	8,0	80,0	10,0
	2,10	105,0	9,2	83,0	9,5
	3,20	90,0	7,5	85,0	9,0
	8,40	95,0	5,0	90,0	8,3
Flutamida	3,40	90,0	8,0	99,0	10,5
	5,10	107,0	6,2	102,0	8,4
	6,80	109,0	3,5	105,40	5,0
	13,5	102,0	2,0	106,0	7,0
Ciproterona	0,70	92,0	12,0	75,0	4,5
	5,60	93,0	9,4	79,0	2,0
	8,00	95,0	1,5	86,0	8,3
	11,2	97,0	1,0	88,0	7,9
Tamoxifeno	1,40	75,0	13,0	72,0	13,0
	2,80	86,0	11,5	76,0	9,3
	4,20	88,0	9,7	73,0	8,7
	5,60	90,0	9,5	77,0	8,9

Segundo STÖCKL et al. (2009), um mínimo de 3 concentrações é necessário para assegurar a confiabilidade analítica da metodologia aplicada. RIBANI et al. (2004), afirmam que os intervalos aceitáveis de recuperação para a análise de resíduos, geralmente, estão entre 70 e 120%, com precisão de até ± 20%. Porém, dependendo da complexidade analítica, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até ± 15%. Segundo estes autores, os dados de recuperação deste trabalho, que ficaram entre 75,0 – 109,0%, com RSD 1,0 – 13,0%, em solução aquosa dos EFCTs, e 72,0 – 106,0% com RSD 2,0 – 10,5%, em efluente fortificado, são adequados para a metodologia analítica proposta para determinação de EFCT em efluente hospitalar.

2.4.3 Figuras-de-mérito da metodologia SPE HPLC-DAD

A validação da metodologia foi feita considerando a pré-concentração necessária nas determinações dos compostos nas amostras de efluente hospitalar. Na validação do método SPE seguida de HPLC-DAD foram obtidas as seguintes figuras-de-mérito (Tabela 4).

Tabela 4 – Figuras-de-mérito do método de determinação de EFCT por SPE seguida de HPLC-DAD.

Figuras-de-mérito	**Espironolactona**	**Flutamida**	**Ciproterona**	**Tamoxifeno**
Faixa linear (μg L^{-1})	1,05 – 8,4	3,4 – 13,6	0,7 – 11,2	1,4 – 5,6
Coeficiente de correlação (R^2)	0,995	0,955	0,994	0,997
Equação da reta	y = 48,56x - 837,3	y= 41,90x +2215,6	y = 70,562 – 802,15	y = 32,533x – 334,92
Seletividade	1,05	0,3	0,04	2,26
Limite de detecção – LD[a](μg L^{-1})	0,30	1,00	0,21	0,42
Limite de quantificação – LQ[b] (μg L^{-1})	1,05	3,40	0,70	1,40
Tempo de retenção (min)	8,69	9,82	13,79	22,75
Comprimento de onda λ (nm)	254	280	280	280

[a] Limite de detecção para S/N = 3 (*n*=6).
[b] Limite de quantificação para S/N =10 (*n*=6).

Para a determinação de EFCT em amostras de efluente hospitalar por SPE seguida de HPLC-DAD, os coeficientes de correlação (R^2) das curvas analíticas ficaram todos, satisfatoriamente, acima de 0,99, com exceção da Flutamida (0,955), pois, conforme VALDERRAMA et al., 2009, a ANVISA recomenda R^2=0,99 e o INMETRO R^2>0,90. As curvas analíticas foram construídas com 7 níveis de concentração e injeções em triplicata, com desvio de 0,5 a 5,0 % entre as injeções, o que, segundo PASCHOAL & RATH, 2008, a *European Commission* (EC) recomenda no mínimo cinco níveis de concentração na construção da curva analítica, com RSD que não deve exceder 15%, exceto para o LOQ, para o qual se admite desvios menores ou iguais a 20%. Considerando-se pré-concentração de 200

vezes feita em SPE, os LDs baseados na relação sinal-ruído (S/N:3) variaram de 0,21 a 1,00 µg L^{-1} e, os LQs, baseados na relação sinal-ruído (S/N:10), variaram de 0,70 a 3,40 µg L^{-1}.

A seletividade foi testada com curva na matriz isenta de analitos; as concentrações adicionadas foram as mesmas da curva analítica, com padrão diluído no solvente, considerando-se o fator de pré-concentração de 200 vezes no cartucho SPE. Sendo assim, os cálculos do teste de seletividade foram feitos comparando-se os valores dos coeficientes angulares das duas curvas analíticas: a primeira, obtida com as soluções diluídas em metanol, e a segunda, com a matriz enriquecida dos fármacos, ambas na faixa linear do método, conforme a Equação 6:

$$\frac{(ra)\ da\ matriz - (ra)\ da\ solução}{(ra) da\ solução} X\ 100 \qquad \text{(Equação 6)}$$

onde, r_a é o coeficiente angular da reta.

Neste caso, quando as inclinações das duas curvas são iguais ou muito próximas, e a razão entre os dois coeficientes angulares se aproxima de 1, significa que o único efeito de matriz presente é a interferência natural causada pelo nível básico do analito, ou seja, não há efeito de matriz (ARAGÃO et al., 2009). A partir dos valores obtidos de r_a, nenhum efeito de matriz foi observado para Flutamida e Ciproterona na matriz, apenas uma pequena variação foi observada para Espironolactona e Tamoxifeno, sendo que, este último apresentou efeito mais considerável.

A precisão intermediária foi avaliada a partir da análise de soluções-padrão dos compostos EFCT em 3 níveis de concentração, em 3 diferentes dias (n=6). A tabela 5 demonstra os resultados obtidos para precisão intermediária do método.

Tabela 5 - Desvio padrão relativo (RSD%) em diferentes dias de análise (n=6).

Compostos	**Concentrações em µg L^{-1} e (RSD %)**		
Espironolactona	1,05 (8,2)	2,1 (8,5)	3,15 (7,2)
Flutamida	0,85 (14,0)	1,7 (13,2)	2,55 (4,2)
Ciproterona	0,7 (14,3)	1,4 (11,0)	2,1 (3,0)
Tamoxifeno	1,4 (15,0)	2,8 (8,1)	4,2 (7,9)

As determinações revelam que o método fornece resultados com precisão aceitável, em diferentes dias de análise (de acordo com ARAGÃO et al., 2009).

2.4.4 Microextração Líquido-Líquido - LLME

Os parâmetros otimizados para a LLME, descritos anteriormente, para solução aquosa e efluente hospitalar, envolveram o uso de tolueno como solvente ideal para a extração da Flutamida, e de clorofórmio, para Espironolactona e Ciproterona. Fizeram-se testes prévios para definir o intervalo de tempo de transferência do analito, sem perdas ou evaporação perceptível do solvente extrator. Desta forma, definiu-se o intervalo de 15 a 60 s para investigação e aplicação de planejamento fatorial fracionado. O Tamoxifeno não foi recuperado com nenhum dos solventes previamente testados.

Os parâmetros da ANOVA do software *Portable Statistica 8* para o modelo foram utilizados na análise estatística. Para a LLME de Ciproterona, em solução aquosa, o modelo que melhor se ajusta aos resultados foi verificado pelo R^2 (coeficiente de determinação do modelo), calculado em 0,79, podendo-se dizer que 79% da variação total em torno da média é explicada pela regressão. Enquanto que no efluente hospitalar, o R^2 calculado foi de 0,77, para Flutamida, podendo-se dizer que 77% da variação total em torno da média é explicado pela regressão (Tabela 6).

Tabela 6 – Coeficientes de determinação do modelo para a extração de EFC em solução aquosa e em efluente hospitalar.

Analito	**Coeficiente de determinação do modelo (R^2)**	
	Solução aquosa	Efluente hospitalar
Espironolactona	0,74	0,74
Flutamida	0,73	0,77
Ciproterona	0,79	0,75

Com estes resultados foram gerados diagramas de Pareto com auxílio do software *Portable Statistica 8* (StatSoft Inc.,USA). A variável dependente considerada foi o percentual de recuperação da LLME dos analitos em solução aquosa e em efluente hospitalar. O intervalo de confiança de 95% foi utilizado.

2.4.4.1 Solução aquosa

Uma matriz experimental foi obtida pela aplicação do planejamento fatorial fracionado (3^{4-1}) onde, as variáveis independentes investigadas foram: volume do solvente (µL); tempo (s); NaCl (Mol. L^{-1}) e pH (5, 7 e 9). A matriz experimental do planejamento fatorial e as taxas de recuperação (%) de EFC em solução aquosa encontram-se na tabela 1 – (Anexo A).

Através da avaliação dos resultados obtidos pela matriz experimental, diagramas de Pareto foram gerados para análise das variáveis significativas dos compostos EFC em solução aquosa (Figura 8).

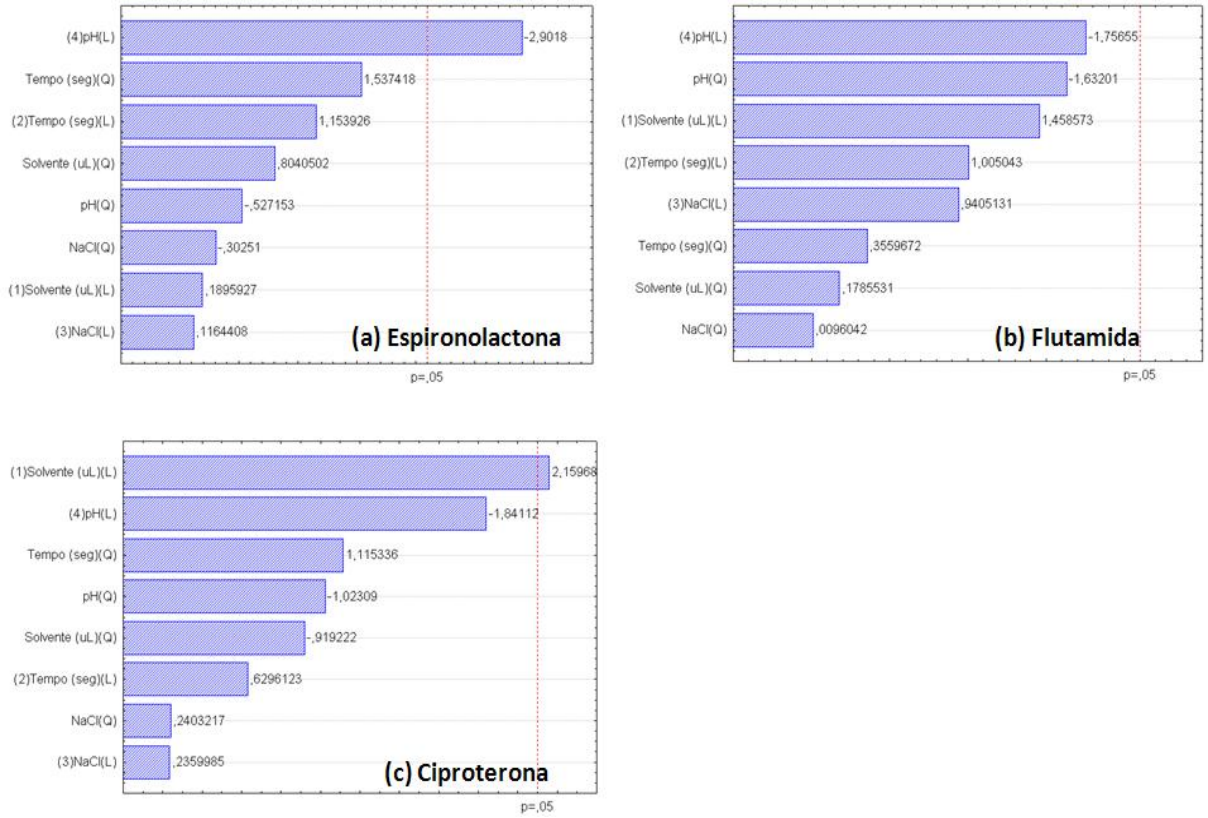


Figura 8 – Diagramas de Pareto para LLME de EFC em solução aquosa.

Analisando-se os diagramas, dentre as variáveis independentes estudadas para a LLME, em solução aquosa, o pH foi a variável significativa para a extração de Espironolactona (Figura 8-a), apresentando efeito negativo, ou seja, o aumento do pH 5 para 9 reduz as taxas de recuperação deste analito. Para a Flutamida (Figura 8-b), nenhuma das variáveis investigadas apresentou efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Para a LLME de Ciproterona (Figura 8-c), a variável significativa foi o volume de solvente, apresentando efeito estatisticamente positivo, ou seja, o aumento do volume de solvente (clorofórmio) de 25 µL para 100 µL faz com que se obtenham as melhores taxas de recuperação deste analito em solução aquosa.

As melhores condições obtidas para as recuperações de EFC em solução aquosa através da aplicação deste planejamento fatorial foram: 100 µL de solvente, 30 segundos de extração, 0,1 mol. L^{-1} de NaCl e pH 5.

2.4.4.2 Efluente hospitalar

A matriz experimental obtida pela aplicação do planejamento fatorial fracionado (3^{4-1}) em efluente hospitalar fortificado, em que as variáveis independentes investigadas foram: volume do solvente (µL); tempo (s); NaCl (Mol. L^{-1}) e pH (5, 7 e 9). A matriz experimental do planejamento fatorial e as taxas de recuperação (%) de EFC em efluente hospitalar encontram-se na tabela 2 – (Anexo A).

Para análise das variáveis significativas para EFC em efluente hospitalar enriquecido dos compostos, gráficos de Pareto foram gerados utilizando-se o software *Portable Statistica 8* (Figura 9).

Analisando-se os diagramas, dentre as variáveis independentes estudadas para a LLME em efluente hospitalar, o volume de solvente foi a variável significativa para a extração de Espironolactona (Figura 9-a) e Flutamida (Figura 9-b), apresentando efeito positivo, ou seja, a variação do volume de solvente de 25 para 100 µL proporciona o aumento das taxas de recuperação destes analitos. Para a LLME de Ciproterona (Figura 9-c), nenhuma das variáveis investigadas apresentou efeitos estaticamente significativos.

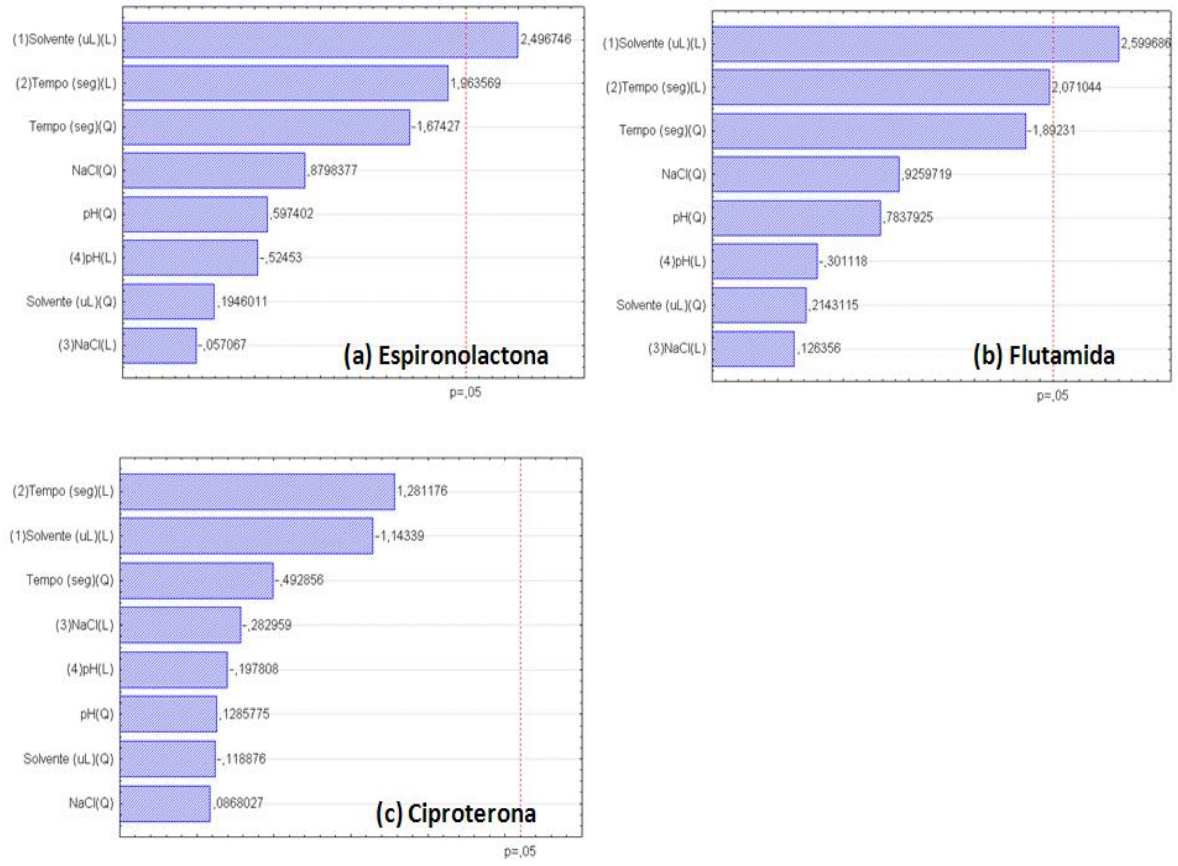


Figura 9 – Diagramas de Pareto para LLME de EFC em efluente hospitalar.

As melhores condições obtidas para as recuperações de EFC, em efluente hospitalar fortificado, através da aplicação deste planejamento fatorial foram: 100 µL de solvente, 15 s de extração, 0,1 mol. L^{-1} de NaCl e pH 7 (pH normalmente medido para o efluente do HUSM).

2.4.4.3 Validação da LLME em solução aquosa e efluente hospitalar

A validação da recuperação do método de extração (Tabela 7), em condições otimizadas, foi feita em um nível de concentração, sendo este o mais baixo, quantificável por HPLC-DAD (Espironolactona 210 µg L^{-1}, Flutamida 680 µg L^{-1} e Ciproterona 140 µg L^{-1}), com 6 replicatas.

Tabela 7 - Validação nas condições otimizadas para os compostos EFC utilizando LLME.

	Solução Aquosa		**Efluente Hospitalar**	
Analito	Média (%) *n*=6	RSD (%) *n*=6	Média (%) *n*=6	RSD (%) *n*=6
Espironolactona	89,0	1,55	71,0	10,0
Flutamida	85,9	1,60	99,6	6,80
Ciproterona	89,8	0,50	70,0	10,5

Embora no estudo de recuperação dos compostos (Tabela 7), por LLME, nas concentrações citadas para cada um dos analitos estudados, os resultados tenham sido satisfatórios, a determinação de EFC no efluente hospitalar não foi possível por LLME com determinação por HPLC-DAD. Para utilizar esta técnica de detecção, uma etapa de pré-concentração dos analitos se faz necessária devido ao fato destes se encontrarem, no efluente hospitalar, em concentrações abaixo das quantificáveis (abaixo do LQ instrumental). Sugere-se esta metodologia, LLME, como alternativa para uma etapa preliminar de preparo de amostras/*clean up* fazendo-se uso da técnica de LC-MS/MS, por exemplo.

2.4.5 Otimização do processo SBSE

Na SBSE, os parâmetros otimizados tanto em solução aquosa, quanto em efluente hospitalar, utilizando-se barras de PU, foram descritos anteriormente.

Os parâmetros da ANOVA para o modelo foram utilizados na análise estatística. Para a extração de Espironolactona, em solução aquosa, a verificação do modelo que melhor se ajusta aos resultados foi feita pela determinação do R^2, calculado em 0,85, podendo-se dizer que 85% da variação total em torno da média é explicada pela regressão. Já em efluente hospitalar, para Ciproterona, o R^2 calculado foi de 0,79, podendo-se dizer que 79% da variação total em torno da média é explicada pela regressão (Tabela 8).

Tabela 8 – Coeficientes de determinação do modelo para a SBSE de EFCT em solução aquosa e em efluente hospitalar.

Analito	**Coeficiente de determinação do modelo (R^2)**	
	Solução aquosa	Efluente hospitalar
Espironolactona	0,85	0,73
Flutamida	0,74	0,71
Ciproterona	0,72	0,79
Tamoxifeno	0,71	0,65

Com os resultados obtidos pela aplicação do planejamento fatorial fracionado na extração sortiva, foram gerados os diagramas de Pareto. A variável dependente considerada foi o percentual de recuperação dos analitos em solução aquosa e em efluente hospitalar. O intervalo de confiança de 95% não permitiu avaliar as variáveis significantes para a extração sortiva de EFCT.

2.4.5.1 Solução aquosa

Na matriz experimental do planejamento fatorial fracionado (2^{6-2}), em solução aquosa, as variáveis independentes investigadas foram: NaCl (Mol. L^{-1}); pH (5, 7 e 9); temperatura de adsorção (°C); tempo de adsorção (min); temperatura dessorção (°C) e tempo de dessorção (min). A matriz experimental do planejamento fatorial e as taxas de recuperação (%) de EFCT em solução aquosa encontram-se na tabela 3 (Anexo B).

Pelo exame da matriz experimental foram gerados diagramas de Pareto para a análise das variáveis significativas para a extração dos EFCT por SBSE em solução aquosa (Figura 10).

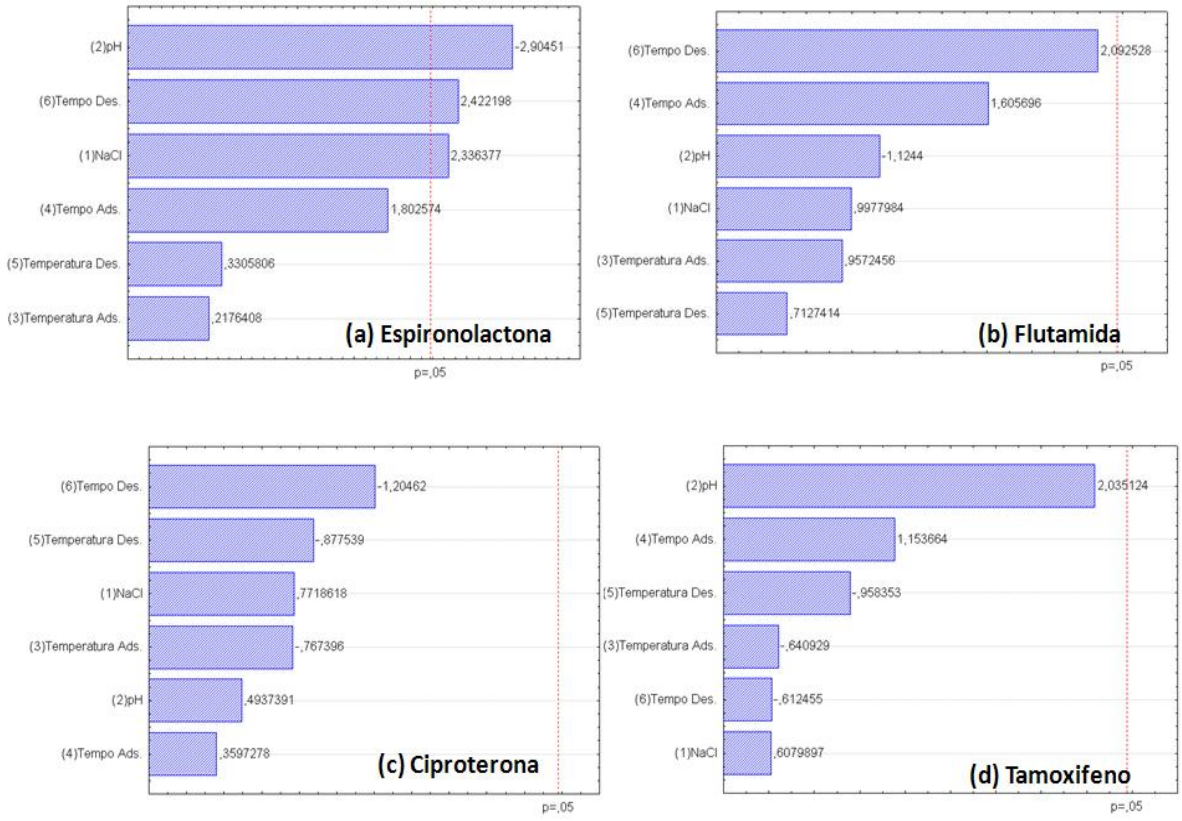


Figura 10 – Diagramas de Pareto para SBSE de EFCT em solução aquosa.

Dentre as variáveis independentes, para Espironolactona (Figura 10-a), o pH teve efeito negativo estatisticamente significativo ($p < 0,05$), ou seja, o aumento do pH diminui as taxas de recuperação deste analito em solução aquosa. O tempo de dessorção apresentou efeito positivo e o aumento de 15 min para 60 min proporciona melhor recuperação. Ainda para a Espironolactona, a quantidade de NaCl apresenta-se como variável significativa com efeitos positivos, ou seja, maiores quantidade de NaCl adicionada a amostra resultam em maiores recuperações. Como se pode observar nos diagramas de Pareto (Figura 10), para os demais analitos, nenhuma das variáveis investigadas na SBSE foram significativas.

As melhores condições para extração de EFCT por SBSE em solução aquosa foram: 1 mol. L^{-1} de NaCl; pH 5; temperatura de adsorção, 25 °C; tempo de adsorção, 60 min; temperatura de dessorção, 50 °C e tempo de dessorção, 60 min.

2.4.5.2 Efluente hospitalar

A aplicação do planejamento fatorial fracionado (2^{6-2}) para efluente hospitalar fortificado resultou em matriz experimental em que as variáveis independentes foram: NaCl (Mol. L^{-1}); pH (5, 7 e 9); temperatura de adsorção (°C); tempo de adsorção (min); temperatura dessorção (°C) e tempo de dessorção (min). A matriz experimental do planejamento fatorial e as taxas de recuperação (%) de EFCT em efluente hospitalar encontram-se na tabela 4 (Anexo B).

Utilizando-se o software *Portable Statistica 8*, foram gerados diagramas de Pareto da extração de EFCT em efluente hospitalar por SBSE (Figura 11).

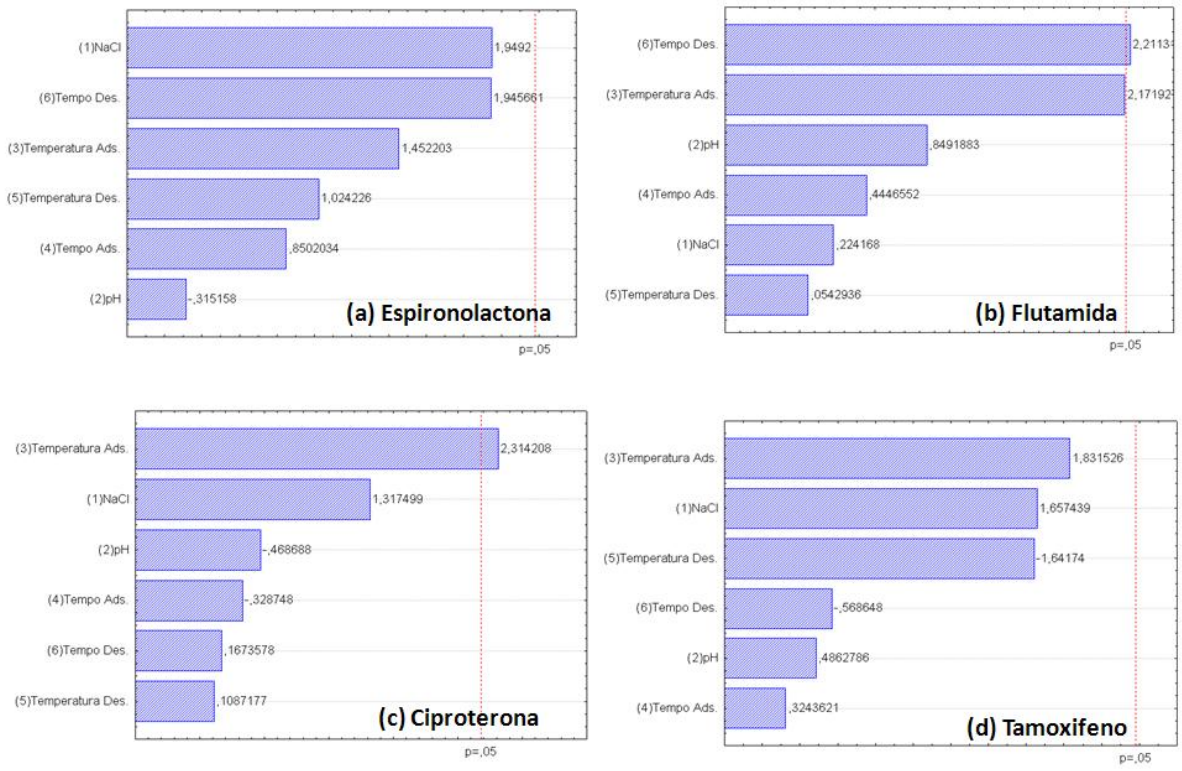


Figura 11 – Diagramas de Pareto para SBSE de EFCT em efluente hospitalar.

Dentre as variáveis investigadas, para Flutamida (Figura 11-b), o tempo de dessorção apresentou-se como estatisticamente significativa, com efeito positivo, ou seja, o aumento do tempo de dessorção proporciona maior recuperação deste analito. Para Ciproterona (Figura

11-c), a temperatura de adsorção foi a variável significativa, com efeito positivo. Para os demais analitos, nenhuma das variáveis investigadas neste estudo mostraram-se significativas (Figura 10). As melhores condições foram: sem adição de NaCl; pH 9; temperatura de adsorção, 50 °C; tempo de adsorção, 60 min; temperatura de dessorção, 25 °C e tempo de dessorção, 60 min.

2.4.5.3 Validação da SBSE em solução aquosa e efluente hospitalar

A validação do método de SBSE, em condições otimizadas, foi feita no nível de concentração de EFCT quantificável mais baixo, isto é, no LQ instrumental (n=6).

Tabela 9 – Validação da SBSE para os compostos EFCT nas condições otimizadas.

	Solução Aquosa		**Efluente Hospitalar**	
Analito	Média (%) *n*=6	RSD (%) *n*=6	Média (%) *n*=6	RSD (%) *n*=6
Espironolactona	85,0	3,20	80,5	11,6
Flutamida	100,2	6,55	90,3	14,2
Ciproterona	105,9	8,19	95,0	7,9
Tamoxifeno	80,7	11,14	77,8	14,3

Como antes, os resultados da SBSE foram satisfatórios nos níveis de concentração de EFCTs utilizados nos testes de recuperação, porém, a determinação dos compostos EFCT no efluente hospitalar não foi possível por HPLC-DAD. Assim, uma etapa de pré-concentração se faz necessária. Sugere-se a, SBSE, como alternativa para uma etapa preliminar de preparo de amostras/*clean up* fazendo-se uso da técnica de LC-MS/MS, por exemplo.

CAPÍTULO 3

Determinação de EFCT em Efluente Hospitalar e Avaliação Preliminar de Riscos

3.1 INTRODUÇÃO

Efluente hospitalar pode ser considerado uma das principais fontes de contaminação ambiental causada por uma gama de xenobióticos de sua constituição, tais como fármacos, ingredientes ativos, surfactantes, desinfetantes, hidrocarbonetos aromáticos, entre outros (HENRIQUES et al., 2012). Estes efluentes caracterizam-se também pela poluição microbiológica que causam ao meio ambiente aquático (DA SILVA et al., 2012). No Brasil, estudos sobre fármacos em efluentes hospitalares são raros, em especial, que abordem a inadequação dos sistemas de tratamentos destes efluentes (WILDE et al., 2012).

Pouca informação existe sobre a ocorrência, concentração, efeitos ecotoxicológicos e risco potencial da exposição aos fármacos e demais xenobióticos, dos efluentes hospitalares, muitos deles, desreguladores endócrinos; no entanto, análises de risco tornam-se cada vez mais importantes (BESSE et al., 2012).

Neste contexto, o risco de danos por desregulação endócrina para organismos aquáticos e, ao final da teia alimentar, ao ser humano, em consequência da ocorrência em efluente hospitalar de uma gama de hormônios usados em contracepção e na terapia de reposição hormonal, é um fato conhecido. Sabe-se que a maioria destas substâncias acaba sendo descartada para o ambiente aquático, mas a contribuição dos medicamentos de uso humano para esta contaminação ambiental ainda não foi bem definida (BESSE & GARRIC, 2009).

Drogas anticâncer, antiandrogênios, são usadas na terapia endócrina devido as suas propriedades hormonais ou anti-hormonais específicas, podendo assim ser consideradas desreguladores endócrinos, exigindo grande cuidado no seu gerenciamento. Considerando-se o distinto mecanismo de ação das drogas anticâncer no organismo humano, o risco potencial que representam precisa ser avaliado (BESSE et al., 2012). Assim, as concentrações dos antiandrogênios Espironolactona, Flutamida, Ciproterona e Tamoxifeno foram quantificadas no efluente hospitalar do HUSM e feita uma avaliação de risco preliminar.

3.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Foi feita uma revisão da literatura no sentido de verificar as informações disponíveis quanto às concentrações de EFCT em diferentes matrizes, em especial, em amostras ambientais. Na tabela 1, encontram-se os principais métodos analíticos utilizados na determinação dos fármacos EFCT, bem como, as concentrações em diferentes matrizes.

Tabela 1 – Métodos analíticos utilizados na determinação dos fármacos EFCT em diferentes matrizes.

Composto	Matriz	Preparoda amostra	Método analítico	Concentração ($\mu g\ L^{-1}$)	Referências
Espironolactona	Plasma humano	-	LC-ESI-MS/MS	27,76	(SORA et al., 2010)
Flutamida	-	-	-	-	-
	Efluente (processo de aeração de lodo ativado)	-	LC-MS/MS	< 0,02	(AL-ODAINI et al., 2010)
Ciproterona	Água de abastecimento publico	(SPDE)[a]	UPLC-ESI-MS/MS	nd	(SUN et al., 2009)
	Agua de rio			nd	
	Água de lago			nd	
	Efluente			nd	
	Água de rio	SPE	LC-ESI-MS/MS	nd	(LÓPEZ-SERNA et al., 2010)
	Água potável			nd	
	ETE terciário			nd	
	Afluente ETE	SPE	HPLC-MS/MS	0,143 – 0,215	(ROBERTS & TOMAS, 2006)
	ETE			0,146 – 0,369	
	Água de rio			0,027 – 0,212	
Tamoxifeno	ETE	SPE	HPLC-MS/MS	< 0,01	(HILTON & THOMAS, 2003)
	Água superfície	SPE	LC-MS/MS	< 0,01	(ZHOU et al., 2009)
	Afluente ETE			0,0002-0,015	
	ETE			0,0002-0,0007	

nd – não detectado.
[a]Extração em disco de fase sólida - do inglês, *solid-phase disk extraction* (SPDE).

Como se pôde observar na tabela 1, pouca informação está disponível na literatura sobre a ocorrência destas drogas anticâncer no meio ambiente; em especial, nenhuma informação foi encontrada na literatura consultada referente à concentração destes analitos em efluente hospitalar.

Um número considerável de estudos investiga a ocorrência ambiental eefeitos de esteróides naturais e sintéticos de estrogênio (etinilestradiol, estradiol, estrona e estriol) e o risco potencial da exposição a eles. Porém, pouco tem sido investigado sobre o risco da exposição aos antiandrogênios (SUMPTER, 2005). Surpreendentemente, não há estudos sobre a ocorrência de gestagênios em águas residuais e águas de superfície, assim como sobre os seus efeitos em organismos não alvos (BESSE & GARRIC, 2009).

A progesterona natural é inativada muito rapidamente no organismo; assim, diversas progestinas sintéticas têm sido desenvolvidas. Progesterona e progestinas sintéticas atuam através de receptores nucleares, principalmente o receptor da progesterona, mas também, através de outros receptores, tais como, o receptor andrógeno, receptor estrógeno, receptor de glicocorticoides e, por último, receptor de mineralocorticoides. As progestinas sintéticas têm várias atividades hormonais: estrogênicas, antiestrogênicas e androgênicas e, são usadas principalmente em associação com um estrogênio na contracepção oral. Alguns podem exibir atividades estrogênicas, enquanto outros são mais fortes antiandrogênicos como é o caso do acetato de Ciproterona. E, dependendo de sua estrutura química as progestinas apresentam vários outros efeitos metabólicos (SITRUK-WARE, 2006).

Segundo a Agência Européia de Avaliação de Medicamentos (EMEA) podem ser empregadas ferramentas para avaliação do risco ambiental, com base em dados de consumo, características físico-químicas, etc.

Três fases para a avaliação de risco são propostas pelo EMEA. (I) Predição da concentração ambiental (PEC), ou seja, uma forma de avaliar teoricamente a quantidade de fármaco lançada no meio ambiente de acordo com seu uso e exposição. Este PEC pode ser estimado de uma forma ampla, como para cidades, estados, países e até mesmo, para fontes locais, como hospitais e clínicas médicas. Pode, ainda, ser estimado para águas superficiais, sedimentos e águas subterrâneas. O limite de ação desta fase é a concentração de 0,01 $\mu g\ L^{-1}$; abaixo deste limite assume-se que o composto não apresenta risco ambiental. Para desreguladores endócrinos, este limite não se aplica. (II) PEC $\leq$ 0,01 $\mu g\ L^{-1}$, envolve estudos de toxicidade, destino e efeitos no meio ambiente, consistindo em cálculos mais realísticos de dosagem diária do fármaco, taxas de excreção humana e taxas de remoção em sistemas de

tratamento. (III) Esta fase consiste em maior refinamento, avaliando comportamento específico e risco (EMEA, 2006).

O PEC pode, então, ser calculado segundo a expressão:

$$PEC_{conv}(gL^{-1}) = \frac{A - (1 - \frac{R}{100})}{365\ XPXVXD} \qquad \text{(Equação 1)}$$

onde *A* é quantidade predita usada por ano em uma área geográfica (kg), *R* é taxa de remoção (biodegradação, adsorção, hidrólise, etc.), *P* é o número de habitantes da área considerada, *V* é o volume de efluente per capita diário (m^3 cap^{-1}) e *D* é o fator de diluição do efluente pela água superficial (em geral 10) (WILDE, 2011).

Outro índice que ainda pode ser aceito para a avaliação de risco de uma substância é o Quociente de Risco (QR). Para o cálculo deste quociente é considerado a Concentração Predita que Não Causa Efeito (PNEC) no meio ambiente (WILDE, 2011).

FICK et al. (2010) calcularam a concentração ambiental crítica prevista (PEC) para 500 produtos farmacêuticos dentre eles, Espironolactona (2996 ng L^{-1}), Flutamida (8313 ng L^{-1}), e Ciproterona (1786 ng L^{-1}), concentrações estas, em água de superfície que podem causar efeito farmacológico em peixes, assumindo a atividade farmacológica equivalente. Os PECs são baseados em dados da literatura sobre consumo humano, juntamente com um fator de bioconcentração pré-predito em peixes, para cada uma das drogas, baseando-se na lipofilicidade. Para Tamoxifeno, um PEC de 22 ng L^{-1} em efluente de ETE foi calculado por COETSIER et al. (2009).

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Determinação de EFCT no efluente do HUSM

As amostras foram coletadas sequencialmente em um período de 8 dias, fazendo-se composição diária das amostras (pontos de amostragem citados na Introdução Geral). Estas amostras compostas foram submetidas à extração e *clean up* por SPE, posteriormente, submetidas à determinação por HPLC-DAD nas condições previamente descritas (capítulo 2 – pg 41).

3.3.2 Avaliação do risco ambiental dos EFCT

As concentrações de EFCT no efluente do HUSM foram preditas com base na oferta de 300 leitos e a bioacumulação de EFCT no ambiente foi estimada por meio de seus respectivos “Kow” e “log Kow”.

Para o cálculo dos valores PEC, as seguintes situações foram admitidas: (1) todo o fármaco receitado foi usado para o tratamento no hospital; (2) a fração de fármacos excretada foi lançada no sistema de esgotos; (3) sem transformações dos fármacos após a excreção no sistema de esgotos e (4) o padrão de uso foi distribuído uniformemente temporal e espacialmente.

Segundo ESCHER et al. (2010) para o estudo de caso específico, como de um hospital, a expressão abaixo pode ser utilizada:

$$PEC_{Efl.} = \frac{AXE}{V_{Efl.}X\ 365} \qquad \text{(Equação 2)}$$

O quociente de risco é a maneira de expressar o risco ecológico de um produto químico ou fármaco no ambiente, sendo calculado pelo quociente PEC/PNEC.

$PEC_{Efl.}$ é a concentração predita no efluente (g L^{-1}), *A* é a quantidade do fármaco consumido no hospital (g), *E* é a fração excretada na urina e nas fezes e $V_{Efl.}$ é a quantidade de efluente lançado por dia (L dia^{-1}).

Foi assumida excreção de 10% para a Espironolactona, com respeito à absorção e excreção sem transformação na urina, enquanto que, para Flutamida e Ciproterona, 4%, respectivamente. E para o Tamoxifeno, 30% de sua concentração é excretada na forma inalterada, lentamente, pelas fezes (KISANGA et al., 2005).

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.4.1 Concentrações de EFCT determinadas nas amostras de efluente hospitalar

Nas tabelas 2 e 3, podem-se observar as concentrações dos compostos EFCT medidas nas amostras do efluente hospitalar coletadas nos dois pontos de amostragem, PA-HUSM e efluente geral. As extrações SPE foram feitas em duplicata, bem como as injeções no equipamento analítico HPLC-DAD, sendo que os valores das concentrações e dos RSD (%), podem ser vistos na tabela 2, para cada um dos compostos determinados.

Tabela 2 - Resultados da determinação de EFCT no efluente do PA-HUSM (n=2).

	Efluente PA-HUSM							
Amostragens	**(E)** $\mu g\ L^{-1}$	**RSD %**	**(F)** $\mu g\ L^{-1}$	**RSD %**	**(C)** $\mu g\ L^{-1}$	**RSD %**	**(T)** $\mu g\ L^{-1}$	**RSD %**
1	1,52	9,50	5,37	4,50	2,38	8,50	nd	nd
2	1,87	8,20	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3	2,51	7,30	8,44	4,00	3,20	8,70	1,09	10,4
4	3,73	5,00	7,91	5,30	3,26	9,00	1,18	11,0
5	1,91	9,20	9,31	3,20	nd	nd	0,75	11,5
6	2,85	7,55	11,70	3,60	nd	nd	5,30	9,60
7	3,33	6,70	6,79	5,70	3,61	7,85	nd	nd
8	3,78	6,50	9,89	3,00	8,50	5,75	nd	nd

nd – não detectado.

A figura 1 apresenta as concentrações de EFCT determinadas no efluente hospitalar PA-HUSM.

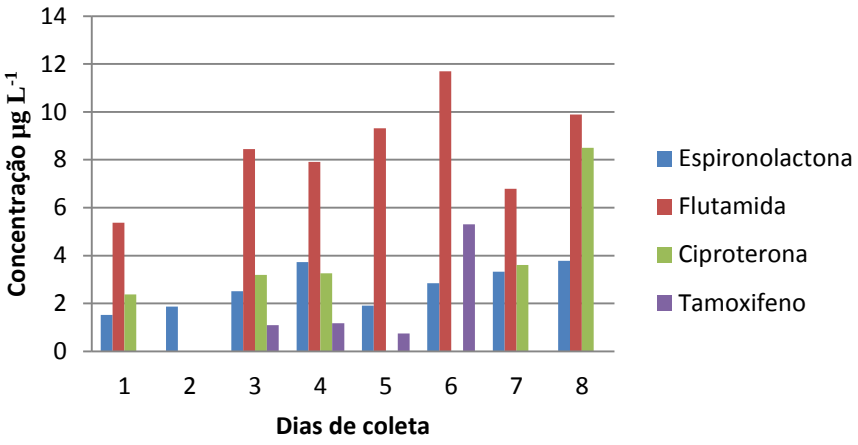


Figura 1 – Concentrações de EFCT determinadas no efluente PA-HUSM.

Na tabela 3 podem ser observadas as concentrações de EFCT determinadas no efluente geral do HUSM.

Tabela 3 - Resultados da determinação de EFCT no efluente geral do HUSM (n=2).

	Efluente geral-HUSM							
Amostragens	**(E) µg L^{-1}**	**RSD %**	**(F) µg L^{-1}**	**RSD %**	**(C) µg L^{-1}**	**RSD %**	**(T) µg L^{-1}**	**RSD %**
1	3,38	5,75	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2	2,94	7,85	11,3	2,56	3,00	4,90	nd	nd
3	1,52	9,82	nd	nd	1,98	5,87	nd	nd
4	6,77	4,34	9,92	4,45	nd	nd	nd	nd
5	5,88	4,30	nd	nd	0,92	8,00	nd	nd
6	3,65	5,93	7,54	3,54	nd	nd	nd	nd
7	2,73	4,97	nd	nd	1,58	6,78	nd	nd
8	nd	nd	11,1	2,65	nd	nd	nd	nd

nd – não detectado.

Na figura 2 podem ser observadas as concentrações de EFCT determinadas no efluente geral do HUSM.

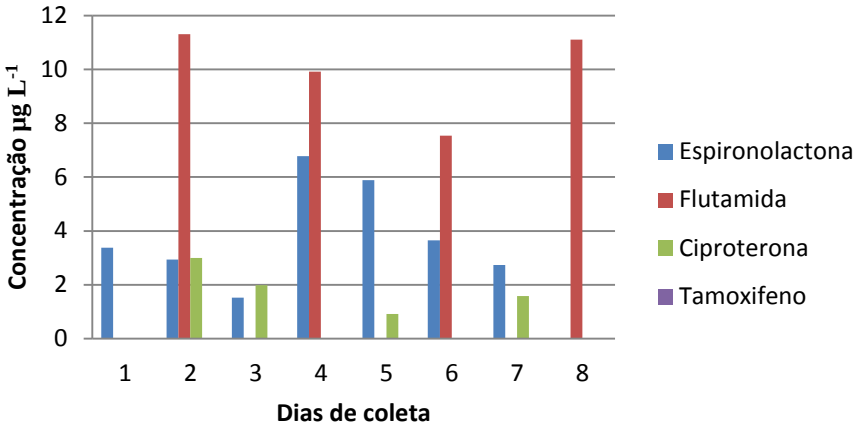


Figura 2 – Concentrações de EFCT determinadas no efluente geral HUSM.

Como se pôde observar nas tabelas 2 e 3, as concentrações de Espironolactona no efluente PA-HUSM ficaram na faixa de 1,52 - 3,78 µg L^{-1} e, no efluente geral do HUSM, 0,00 – 6,77 µg L^{-1}; para Flutamida, as concentrações variaram de 0,00 - 11,70 µg L^{-1} no efluente PA-HUSM, e de 0,00 - 11,3 µg L^{-1} no efluente geral; para Ciproterona, as concentrações ficaram na faixa de 0,00 - 8,50 µg L^{-1} no efluente PA-HUSM e, de 0,00 - 3,0 µg L^{-1}, no efluente geral; Tamoxifeno foi encontrado no efluente PA-HUSM nas concentrações de 0,00 - 5,30 µg L^{-1} e, no efluente geral do HUSM, não foi detectado.

3.4.2 Avaliação preliminar do risco potencial para EFCT em efluente hospitalar

Uma atenção maior foi dada à estimativa das quantidades de antiandrogênios EFCT lançados pelo HUSM para o sistema de esgotos e, ao final, para águas de superfície (curso d'água receptor). A corrente efluente do HUSM tem um fluxo médio de aproximadamente 190 m^3 dia^{-1} (WILDE et al., 2012).

Um parâmetro físico-químico fundamental para o estudo do risco ecológico é o Kow, que expressa a polaridade da substância em estudo e, consequentemente, seu potencial bioacumulação no ambiente (ARSAND, 2010).

Assim, primeiramente, avaliou-se a capacidade de bioacumulação no ambiente dos EFCT, através dos seus valores de "Kow" e "log Kow" (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores de Kow e log Kow para EFCT.

Analito	**Kow**	**logKow**
Espironolactona	602,55	2,78
Flutamida	2.238,72	3,35
Ciproterona	1.258,92	3,10
Tamoxifeno	1.995.262,31	6,30

Substâncias com log Kow 4,5 ou superior são classificadas como substâncias de risco, devido à fácil bioacumulação, sem exigências de estudos complementares. Dentro deste contexto, observando-se a tabela 4, a substância que apresenta manifesto risco ecológico é o Tamoxifeno, e a substância com menor risco, é a Espironolactona (mais alta hidrossolubilidade). Os passos seguintes propostos pela EMEA (2006) para a avaliação de risco destas substâncias no ambiente devem ser aceitos.

Neste contexto, foram estudadas as concentrações preditas no ambiente aquático PEC (efluente hospitalar-HUSM).

O quociente de risco de cada fármaco foi calculado dividindo-se os valores PEC pelos valores PNEC. Os valores PEC foram estimados segundo a equação 2. A tabela 5 apresenta os dados da avaliação de risco dos EFCT usados no HUSM.

Tabela 5 - Concentração ambiental predita (PEC) e o quociente de risco (QR) dos analitos estudados usados no HUSM.

Analito	**Excreção como composto ativo (%)**	**Consumo Anual (g ano^{-1})[a]**	**PEC$_{Efl.}$ (µg L^{-1})***	**PNEC (µg L^{-1})**	**QR (PEC/PNEC)[b] ***
Espironolactona	10	510	0,73	-	-
Flutamida	4	500	0,28	-	-
Ciproterona	4	300	0,17	-	-
Tamoxifeno	30	4080	0,001	0,49	3,59

[a] Dados do HUSM (2012); [b] Quociente de risco teórico; *Presente estudo.

Como pode ser observado na tabela 5, todos os analitos estudados, exceto Tamoxifeno, apresentaram valor de PEC$_{Efl.}$ maior do que 0,01 µg L^{-1}. Isso demonstra a relevância do estudo de tais compostos em efluente hospitalar e de serviços médicos.

Segundo BESSE et al. (2012), em amostras de águas superficiais, o PEC encontrado para Flutamida foi >10 ng L^{-1} e, para Tamoxifeno > 1 ng L^{-1}.

Não se encontrou na literatura consultada valores de PNEC para EFC, apenas para Tamoxifeno, o que permitiu calcular-se apenas o quociente de risco deste último: QR = 3,59 alto risco, pois a relação PEC/PNEC > 1.

Segundo dados do *Environmenttally Classified Pharmaceuticals* (2012), o risco para Tamoxifeno é considerado insignificante, como confirmado neste estudo. Para EFC, o risco não pode ser excluído.

CAPÍTULO 4

Aplicação de Processos Avançados de Oxidação e Estudo Cinético

4.1 INTRODUÇÃO

A poluição ambiental pode ser apontada como um dos grandes problemas dos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Resulta de uma série de fatores contribuintes, como mau uso de recursos naturais, ineficiência da legislação, falta de consciência ambiental e ignorância de atitudes e procedimentos corretos, os quais, em certas situações, causam o agravamento de problemas (JARDIM & TEIXEIRA, 2004).

O tratamento de efluentes é feito de forma integrada em países desenvolvidos. Os efluentes gerados em diferentes fontes (hospitais, clinicas médicas, indústrias e demais origens) são direcionados para a central de tratamento de efluentes. O mesmo não ocorre em países em desenvolvimento, como o Brasil, onde apenas uma pequena parte dos esgotos gerados é coletado e tratado. Desta forma, muitas pesquisas têm se concentrado em processos de tratamento direcionados à especificidade de cada efluente gerado, sugerindo-se tratamento *on site*, com processos diferenciados para diferentes situações (ARSAND, 2010).

A preocupação com a contaminação e, consequentemente, com a qualidade da água no país ainda está focada no tratamento de esgotos domésticos que, como relatado anteriormente, ainda é deficitário. No entanto, a contaminação aquática por substâncias de uso contínuo, como PPCPs, merece atenção especial, uma vez que os reais riscos à saúde humana e ao ambiente aquático ainda não são totalmente conhecidos (MELO et al., 2009).

A ocorrência de microcontaminantes no meio ambiente aquático, especialmente, desreguladores endócrinos, é uma questão de grande preocupação para a proteção da vida aquática, bem como, no processo de reutilização da água para consumo humano. Desreguladores endócrinos têm o potencial de afetar seriamente a viabilidade da fauna aquática através da interferência no regulamento das funções hormonais como o desenvolvimento, reprodução e crescimento ou imunocompetência em organismos. Nestas considerações, um foco especial tem sido dado à questão da remoção destes microcontaminantes durante o tratamento de águas residuais. No entanto, tecnologias de tratamento convencionais não são capazes de remover completamente tais substâncias e, mesmo efluentes terciários, tratados, são considerados umas das principais fontes de emissão de micropoluentes em águas superficiais (ZHANG, et al., 2012 e ALTMANN, et al., 2012).

Os Processos Avançados de Oxidação (PAOs) têm sido referidos como os métodos mais eficazes para a degradação de resíduos perigosos, refratários e poluentes orgânicos não biodegradáveis, em vários tipos de águas e efluentes, uma vez que os radicais hidroxil gerados

são altamente reativos e pouco seletivos, podendo atuar na oxidação química de uma vasta gama de substâncias (SU et al., 2012).

A degradação dos antiandrogênios EFCT neste trabalho foi avaliada pela aplicação dos seguintes PAOs: fotólise simples, fotocatálise heterogênea com TiO_2 imobilizado em polímeros e ozonização).

4.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.2.1 Processos Avançados de Oxidação

Fármacos, dentre eles a classe dos DECs, são considerados espécies recalcitrantes a tratamentos convencionais de remediação de sítios contaminados (KLAVARIOTI et al., 2009; YANG et al., 2010). Neste caso, os PAOs constituem uma alternativa para o tratamento de matrizes complexas, como efluentes hospitalares e de serviços médicos, constituídos por uma gama de substâncias tóxicas e recalcitrantes.

Os PAOs fundamentam-se na capacidade de conversão da grande maioria dos compostos orgânicos em CO_2, H_2O e ânions inorgânicos (mineralização) por meio de reações em que intervêm espécies radicalares em solução (WOLS & HOFMAN-CARIS, 2012). O radical hidroxil ($HO^{\bullet}$) apresenta alto poder de oxidação (2,8 V), sendo o mais potente oxidante em solução aquosa (Tabela 1).

Tabela 1– Potencial de oxidação (segundo a IUPAC) de alguns oxidantes em meio aquoso.

Oxidante	**E° (V, 25 °C)**
$HO^{\bullet}$	2,80
O_3	2,07
H_2O_2	1,77
$HO_2^{\bullet}$	1,70
MnO_4^-	1,67
HClO	1,48
ClO_2	1,50
Cl_2	1,36
O_2	1,23

Fonte: adaptado de MALATO et al., 2009.

O radical $HO^{\bullet}$ é altamente reativo. Sua geração se dá em reações envolvendo oxidantes fortes (O_3, H_2O_2, semicondutores) combinados com radiação ultravioleta (UV) e/ou, apenas

por radiação UV (LAMSAL et al., 2011; OHTANI, 2011; RAZAVI et al., 2011; WANG& CHEN, 2011).

Dentre os PAOs investigados na degradação de fármacos citam-se a fotocatálise heterogênea, a fotólise e a ozonização (GULTEKIN & INCE, 2007; KLAVARIOTI et al., 2009; YANG et al., 2010, POCOSTALES et al., 2011; ZHANG et al., 2012).

4.2.2 Fotólise

No processo de fotólise direta, moléculas orgânicas podem absorver fótons de radiação UV gerando espécies eletronicamente excitadas, que podem transferir elétrons para aceptores presentes no meio, formando radicais livres:

$$H_2O + h\nu \rightarrow H\bullet + HO\bullet \qquad \text{(Equação 1)}$$

$$H_2O + h\nu \rightarrow H^+ + e^- + HO\bullet \qquad \text{(Equação 2)}$$

Estas espécies radicalares podem reagir com oxigênio molecular, gerando radicais peróxi (R-O-O-R'), que tendem a se decompor naturalmente, formando intermediários parcialmente oxidados, como o ânion radical superóxido ($O_2\bullet^-$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (HO•) (GONZALEZ et al., 2004).

$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -} \qquad \text{(Equação 3)}$$

$$O_2^{\bullet -} + e^- + 2\,H^+ \rightarrow H_2O_2 \qquad \text{(Equação 4)}$$

$$H_2O_2 + e^- + H^+ \rightarrow HO^\bullet + H_2O \qquad \text{(Equação 5)}$$

$$HO^\bullet + e^- + H^+ \rightarrow H_2O \qquad \text{(Equação 6)}$$

UDAGAWA et al. (2011) estudaram a degradação de Flutamida por fotólise, mas constata-se uma grande carência de dados na literatura. Fica evidente a necessidade de investigação da aplicação de PAOs na degradação de DECs (como EFCT) e no estudo de subprodutos formados.

4.2.3 Fotocatálise heterogênea

A fotocatálise heterogênea tem como base a oxidação química de contaminantes mediada por meio de um semicondutor inorgânico ativado por radiação UV – como ZnO, CdS e TiO_2. Este último é o semicondutor mais utilizado devido às características de alta fotoatividade, estabilidade e baixo custo (HASHIMOTO et al., 2005; MALATO et al., 2009; WANG et al., 2009).

Anatase, rutilo e brookita são as três formas alotrópicas do TiO_2. Anatase e brookita podem ser transformadas irreversivelmente em rutilo, quando submetidas a temperaturas acima de 700 °C. A forma anatase e rutila são ativas em reações fotocatalíticas, mas, mesmo apresentando energias de "*band gap*" similares, a forma anatase apresenta uma maior atividade fotocatalítica, sendo o componente principal do TiO_2 P-25 da Degussa – constituído basicamente de 75% anatase e 25% rutilo – com partículas muito pequenas, de 21 nm, e área superficial elevada, de cerca de 50 $m^2\ g^{-1}$ (HASHIMOTO et al., 2005).

Através da irradiação do semicondutor, este é promovido a um estado eletronicamente excitado (na superfície), no qual um elétron da banda de valência (BV) passa para a banda de condução (BC) gerando um par elétron-lacuna ($e^- + h^+$), como pode ser observado na expressão abaixo (MELO et al., 2009-a; KHAN et al., 2010; HERRMANN, 2010).

$$TiO_2 + hv \rightarrow (e^- + h^+) \qquad \text{(Equação 7)}$$

A radiação incidente deve ter fótons com energia suficiente para atingir a energia mínima necessária para a promoção de elétrons da BV para a BC. O "*band-gap*" do TiO_2 é de 3,2 eV (λ= 387,5 nm).

O caráter oxidante da lacuna da BV gera radicais hidroxil pela oxidação de moléculas de H_2O adsorvidas na superfície do semicondutor (mecanismo indireto) (Equação 8) e, também, é capaz de oxidar diretamente moléculas orgânicas via lacuna foto gerada (Equação

9). O mecanismo de oxidação indireta dos contaminantes predomina sobre o direto devido à alta concentração de moléculas de água adsorvidas na superfície do semicondutor (YANG et al., 2008; MELO et al., 2009-a).

$$TiO_2\ (h^+) + H_2O_{ads} \rightarrow TiO_2 + HO^{\cdot}_{ads} + H^+ \qquad \text{(Equação 8)}$$

$$TiO_2\ (h^+) + RX_{ads} \rightarrow TiO_2 + RX^{\cdot+}_{ads} \qquad \text{(Equação 9)}$$

Na figura 1 é representado o mecanismo para a fotoativação do catalisador TiO_2.

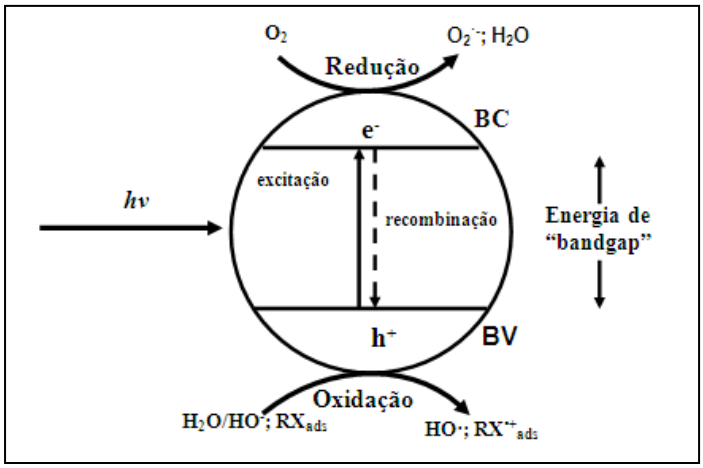


Figura 1 – Mecanismo simplificado para a fotoativação do catalisador TiO_2 (e^-: elétron fotogerado na banda de condução; h^+: lacuna gerada na banda de valência; RX_{ads}: substrato; $RX^{\bullet+}_{ads}$: substrato oxidado). Fonte: HERRMANN, 2010; DA SILVA, 2012-b.

A eficiência dos processos de oxirredução está ligada ao processo de recombinação do par elétron/lacuna, sendo que, quanto menor a recombinação, maior a eficiência do semicondutor. Este processo pode ser favorecido pela presença de doadores ou receptores de elétrons pré-adsorvidos ao catalisador. As lacunas (h^+) formadas na superfície das partículas do semicondutor possuem alto poder oxidante devido a potenciais positivos (+2.0 a +3.5 V), reagindo com a água ou com grupos OH^- pré-adsorvidos na superfície do catalisador. Enquanto os elétrons presentes na BC são responsáveis pela distribuição das cargas negativas e podem migrar para a superfície da partícula, são bons redutores, com potenciais entre 0 e –1,0 V (HERRMANN, 2010).

Métodos que utilizam TiO_2 em suspensão, orientados para a remediação de efluentes, ou, pelo menos, para substratos de interesse ambiental, são abundantes. Mas, a aplicação destes procedimentos é bastante discutida, principalmente em função das desvantagens que derivam do seu caráter heterogêneo (DA SILVA, 2012-b).

Neste sentido, a dificuldade de penetração da radiação em um meio que contém fina suspensão de partículas opacas, a dificuldade na remoção dos fotocatalisadores, uma vez terminado o processo, e a rápida recombinação do par elétron-lacuna (10^{-12} s), constituem as principais desvantagens destes métodos. Com o intuito de contornar estes problemas, muitos trabalhos têm investigado a imobilização de semicondutores em suportes como zeólitas (HISANAGA & TANAKA, 2002), vidros (BOUZAZA & LAPLANCHE, 2002; TSOUKLERIS et al., 2007), nanotubos de carbono (SILVA & FARIA, 2010), polímeros (DA SILVA, 2012-b), entre outros materiais.

A fotocatálise heterogênea com uso de TiO_2 tem sido aplicada na degradação de fármacos em solução aquosa. YURDAKAL e colaboradores (2007) avaliaram a degradação de Tamoxifeno utilizando TiO_2 em suspensão. A degradação de fármacos sulfurados também foi avaliada em estudo de YANG et al. (2010), demonstrando que os analitos foram completamente mineralizada em CO_2, H_2O e íons inorgânicos em 240 min de reação.

Outros fármacos foram estudados na degradação por fotocatálise heterogênea, em solução aquosa: paracetamol (YANG et al., 2008); furosemida, ranitidina, ofloxacine, fenazona, naproxeno, carbamazepina e ácido clofíbrico (MOLINARI et al., 2006).

Em amostras de efluente, RIZZO e colaboradores (2009) avaliaram a degradação de amoxicilina, carbamazepina e diclofenaco aplicando fotocatálise herterogênea com 0,8 g de TiO_2 L^{-1} em suspensão e 120 min de irradiação.

Estudos de degradação de EFCT são pouco relatados na literatura, especialmente, sobre subprodutos da degradação por PAOs (UDAGAWA et al., 2011; MOLINARI et al., 2008; DELLAGRECA et al., 2007).

Buscou-se, também, neste trabalho, avaliar aspectos cinéticos da degradação de EFCT pelos PAOs fotólise, fotocatálise e ozonização, bem como, determinar as rotas de degradação que levam à formação dos subprodutos dos analitos.

Na aplicação do processo de fotocatálise em solução aquosa, bem como, em efluente fortificado com EFCT, procurou-se uma alternativa para o problema da necessidade de remoção do catalisador em suspensão da solução degradada, final. A proposta foi a confecção de barras poliméricas com TiO_2 imobilizado, p. ex., em PDMS e PU. Para comparar a

eficiência do catalisador em suspensão e imobilizado, em ambos os polímeros, foram feitos testes prévios.

4.2.4 Ozonização

Dentre os PAOs, a ozonização se tornou uma importante técnica para a oxidação e degradação de uma grande variedade de poluentes orgânicos em efluentes. Dentre esses, destaca-se o uso eficiente da ozonização para a degradação de PPCPs (CHEN et al., 2012).

O ozônio é um oxidante forte (E° = 2,07 eV) que se decompõe em água para formar radical $HO^{\bullet}$, agente oxidante muito forte (E° = 2,80 eV). Os radicais $HO^{\bullet}$ podem induzir a oxidação dos analitos (modo indireto) ou, devido a sua natureza dipolar, atuar como eletrófilo, agente nucleofílico ou em reações de adição dipolar (modo direto), atacando seletivamente certos grupos funcionais de moléculas orgânicas através de um mecanismo eletrofílico (KLAVARIOTI et al., 2009).

Estes diferentes caminhos reacionais na ozonização conduzem a diferentes produtos de oxidação, controlados por diferentes cinéticas. A figura 2 mostra uma visão geral dos caminhos diretos e indiretos, e suas interações.

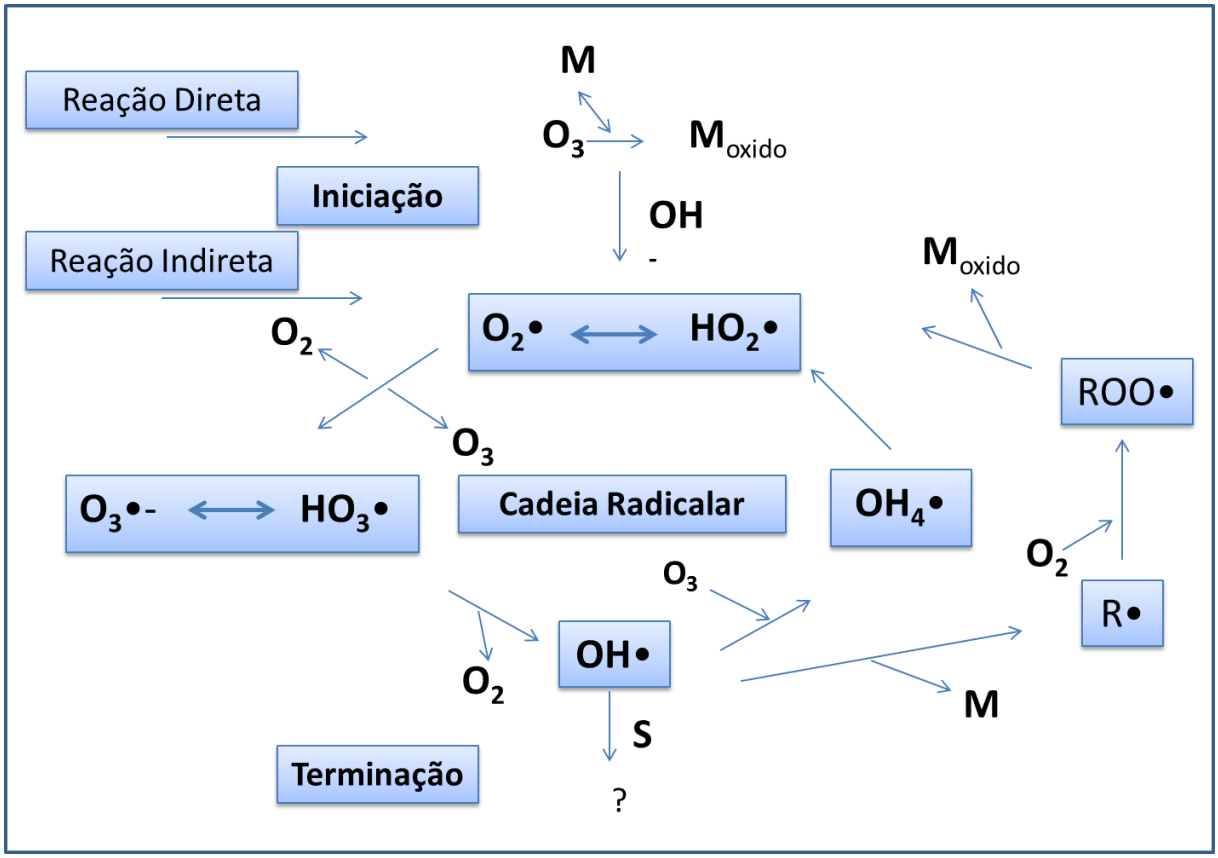


Figura 2– Mecanismo de ozonização reação direta e indireta. R: produto de reação; M: micropoluente; S: Sequestrante de radicais. Adaptado de: GOTTSCHALK et al., 2000.

Seguindo o mecanismo de reação direta e indireta (Figura 2), a geração de radicais pode ser dividida em três etapas principais, conforme descrito abaixo.

1ª Etapa: **Iniciação**

A reação entre íons hidroxila e ozônio promove a formação do ânion radicalar superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e radicais hidroperoxila ($HO_2^{\cdot}$), este último em equilíbrio ácido-base, reações 10 e 11.

$$O_3 + OH^- \rightarrow O_2^{\cdot -} + HO_2^{\cdot} \qquad k_{17} = 70\ M^{-1}\ s^{-1} \qquad \text{(Equação 10)}$$

$$HO_2^{\cdot} \leftrightarrows O_2^{\cdot -} + H^+ \qquad pKa = 4,8 \qquad \text{(Equação 11)}$$

2ª Etapa: **Cadeia Radicalar**

O ânion radicalar ozonídeo ($O_3 \cdot^-$), formado pela reação entre ozônio e o ânion radicalar superóxido (Equação 12), se decompõe imediatamente em radical hidroxila, que poder reagir com compostos orgânicos, microcontaminantes ou mesmo com radical hidroxila, além de poder reagir com o próprio ozônio gerando $HO_4 \cdot$, que se decompõe gerando oxigênio e radical hidroperoxila (Equações 12-16) e, deste modo, a cadeia radicalar pode começar novamente (Equações 10 e 11).

$O_3 + O_2 \cdot^- \rightarrow O_3 \cdot^- + O_2$	$k_{19} = 1{,}6 \times 10^9\ M^{-1}s^{-1}$	(Equação 12)
$HO_3 \cdot \leftrightarrows O_3 \cdot^- + H^+$	p*K*a = 6,2	(Equação 13)
$HO_3 \cdot \rightarrow HO \cdot + O_2$	$k_{21} = 1{,}1 \times 10^8\ M^{-1}\ s^{-1}$	(Equação 14)
$HO \cdot + O_3 \rightarrow HO_4 \cdot$	$k_{22} = 2{,}0 \times 10^9\ M^{-1}\ s^{-1}$	(Equação 15)
$HO_4 \cdot \rightarrow O_2 + HO_2 \cdot$	$k_{23} = 2{,}8 \times 10^4\ M^{-1}\ s^{-1}$	(Equação 16)

Qualquer substância que reage com radicais hidroxil gerando $O_2 \cdot^-$ e $HO_2 \cdot$ promove a cadeia radicalar.

3ª Etapa: **Terminação**

Alguns compostos orgânicos (microcontaminantes) e inorgânicos podem reagir com radicais hidroxil formando radicais secundários, produtos degradados, interrompendo a geração de radicais $O_2 \cdot^-$e $HO_2 \cdot$. Da mesma forma, a reação entre radicais pode promover o fim da cadeia radicalar de reações, como pode ser visto nas reações 17-20 (GOTTSCHALK et al., 2000; WILDE, 2011).

$HO\cdot + CO_3^{2-} \rightarrow OH^- + CO_3\cdot^-$ $k_6 = 4{,}2 \times 10^8\ M^{-1}\ s^{-1}$ (Equação 17)

$HO\cdot + HCO_3^{2-} \rightarrow OH^- + HCO_3\cdot^-$ $k_7 = 1{,}5 \times 10^7\ M^{-1}\ s^{-1}$ (Equação 2)

$HO\cdot + HO_2\cdot \rightarrow O_2 + H_2O$ $k_8 = 3{,}7 \times 10^{10}\ M^{-1}\ s^{-1}$ (Equação 3)

$HO\cdot + M \rightarrow CO_2 + H_2O$ (Equação 40)

A ozonização tem sido tradicionalmente utilizada no tratamento de água potável, no controle de odor, sabor e desinfecção, bem como, para a o tratamento de águas residuais (KLAVARIOTI et al., 2009; REUNGOAT, et al., 2012; SILVA,. et al., 2012).

São reportados na literatura estudos utilizando ozonização ou ozonização fotocatalítica na degradação de fármacos em amostras de águas: Sulfamethoxipiridazina (CHUANG, et al., 2011); Tetracilina (WANG et al., 2011); Ciprofloxacina (SUI et al., 2012); Sulfametoxazol (BELTRÁN et al., 2009; POCOSTALES et al., 2011); Diclofenaco (AGUINACO et al, 2012); Estrogênios e Progestinas (ROKHINA et al., 2012).

ROSAL et al. (2010) avaliaram a ocorrência de um grupo de contaminantes emergentes em efluente e a remoção por meio de ozonização. Entre os compostos estudados estão beta-bloqueadores (Atenolol, Metoprolol e Propranolol), reguladores lipídicos (Ácido Bezafibrato e Fenofíbrico), antibióticos (Eritromicina, Sulfametoxazol e Trimetoprima), anti-inflamatórios (Diclofenaco, Indometacina, Cetoprofeno e Ácido Mefenâmico), Carbamazepina e Omeprazol.

ZHANG et al. (2012) estudaram a degradação do DEC 17α-etinilestradiol em efluentes utilizando ozonização e planejamento de experimentos a fim de verificar as melhores condições para a degradação completa do analito em questão. Outros estudos envolvendo ozonização aplicada a amostras de efluentes são reportados na literatura. Dentre os fármacos avaliados estão o anti-viral Aciclovir (MASCOLO et al, 2010); Bisfenol-A, 17α-etinilestradiol e os antibióticos Eritromicina e Roxitromicina (SCHAAR et al., 2010); Ciprofloxacina (VASCONCELOS et al., 2009-b), entre outros.

Em 2012, ALTMANN et al. (2012), estudaram o impacto da ozonização para a ecotoxicidade e atividade endócrina de DECs em efluente de ETE.

Apesar da ozonização de poluentes orgânicos em águas residuais ter sido muito investigada, dados sobre remoção de fármacos, em especial EFCT, e eventual formação de subprodutos, são escassos, tanto para estudos em solução aquosa como em matrizes

complexas, como o efluente hospitalar, tornando este estudo de suma importância no que tange à área ambiental.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 Preparo das barras com TiO_2 imobilizado em polímeros

As barras de TiO_2 imobilizado em polímeros foram preparadas com adesivo comercial à base de PDMS (Henkel Ltda., Itapevi, SP, Brasil), cuja composição é borracha de silicone (polidimetilsiloxano), fungicida e ácido acético. O adesivo comercial à base de poliuretano (PU) (Brascola, Joenvile, SC, Brasil) é constituído de adesivo selante monocomponente à base de polióis e coadjuvantes.

Foram utilizados, ainda, canudos de polipropileno (Regina Ind. Com. SA, Presidente Prudente, SP, Brasil)e haste de aço galvanizado (clipes de papel) revestido com pintura epóxi (Bacchi Ind. Com. Ltda., Embu, SP, Brasil). Todos os materiais foram adquiridos no comércio local. Na figura 3, é apresentado um esquema dos materiais utilizados no preparo das barras de TiO_2 imobilizado em polímeros, produzidas em laboratório (DA SILVA, 2012).

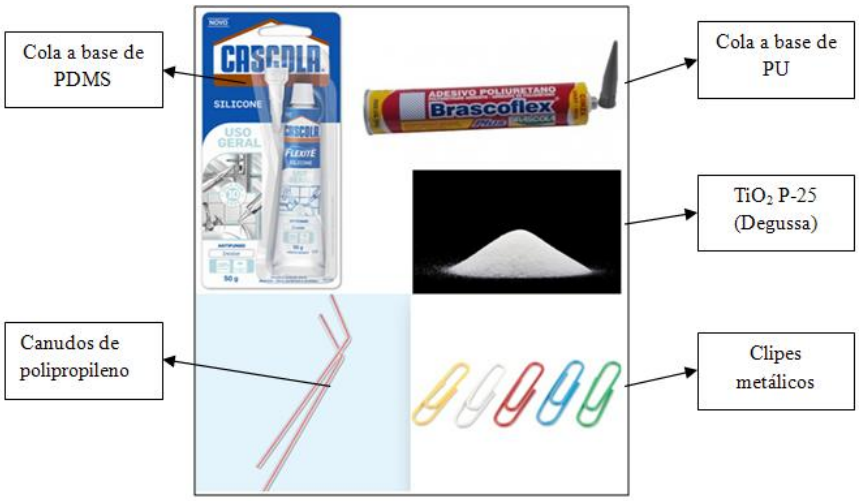


Figura 3 – Materiais utilizados no preparo das barras de TiO_2 imobilizado em polímeros. Modificado de: (DA SILVA, 2012).

Barras cilíndricas (90 mm x ϕ 5 mm) foram preparadas utilizando 0,750 g de TiO_2 P-25 da Degussa. O catalisador foi misturado com 1,6 g de polidimetilsiloxano (PDMS) ou 4,5 g de poliuretano (PU), adesivos comerciais. As misturas foram acondicionadas no interior de canudos de polipropileno (90 mm; ϕ 5 mm), que serviu de molde. No interior do canudo contendo a mistura TiO_2 + polímero inseriu-se axialmente a haste de aço (200 mm), e o conjunto foi submetido a processo de cura (5 a 7 dias, temperatura ambiente) e, após isto, a película do canudo foi removida. Um esquema da barra de TiO_2 imobilizado em polímeros é ilustrado na figura 4.

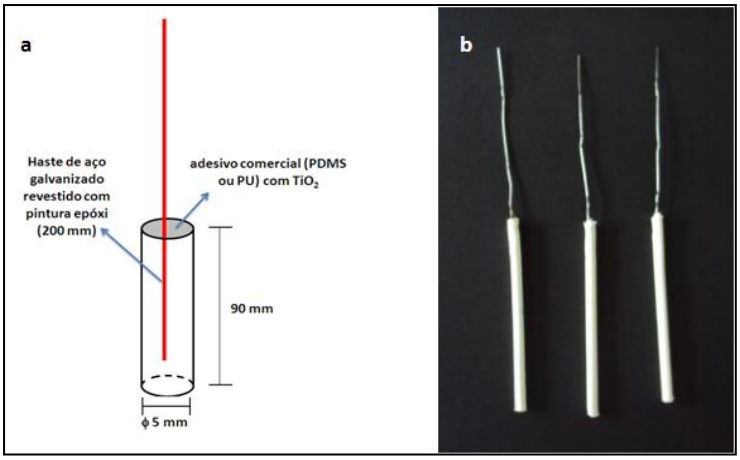


Figura 4– (a) Esquema da barra de TiO_2 imobilizado em polímeros produzida em laboratório para a aplicação de PAOs; (b) foto das barras de PDMS/TiO_2. Fonte: (DA SILVA, 2012).

4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A MEV foi utilizada para examinar a homogeneidade de distribuição do TiO_2 suportado nos polímeros. A amostra de polímero com TiO_2 imobilizado foi preparada através de metalização com ouro, usando aparelho Desk II modelo Denton Vacuum (http://www.dentonvacuum.com) e as imagens foram geradas em um microscópio eletrônico de varredura JEOL modelo JSM-6360 (Denton Vacuum, Moorestown, USA).

4.3.3 Reator fotocatalítico

Um reator tipo tanque agitado, artesanal, provido de jaqueta termostática, foi empregado na aplicação dos PAOs fotocatálise heterogênea e fotólise. Para geração de radiação ultravioleta foi utilizada lâmpada de vapor de mercúrio de pressão média (Philips do Brasil, Barueri, SP, Brasil). O bulbo de proteção original da lâmpada foi substituído por um tubo de quartzo imerso nas amostras.

Como fonte para a lâmpada de vapor de mercúrio uma fonte Intral (Intral Reatores e Luminárias, Porto Alegre, RS, Brasil) foi usada. A temperatura foi controlada por meio de resfriamento com circulação de água gelada, usando-se bomba dosadora pulsante Pro Minent (Pro Minent Dosiertechnik GmbH, Heidelberg, Germany). A agitação da solução foi feita com o auxílio de um agitador magnético IKA C-MAG HS 7 (IKA do Brasil, Campinas, SP, Brasil) com barra de agitação, inserida no fundo do reator. As condições empregadas na degradação de EFCT em solução aquosa e em efluente hospitalar são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2 – Características do reator tanque agitado e condições utilizadas na investigação de degradação de EFCT.

Características	**Especificação**	
Tipo de reator	tanque agitado jaqueta termostática	
Dimensão	25 x 9 cm	
Capacidade	800 mL	
Material	Aço inox	
Área total irradiada	0,0349 m^2	
Resfriamento	Água gelada	
Radiação UV	Lâmpada de vapor de mercúrio	
	Pressão	Média
Lâmpada	Potência	125 W
	Intensidade	401 W m^{-2}
Fonte para lâmpada	220 V e 60 Hz	
Bulbo de quartzo	ϕ_e = 24 mm; ϕ_i = 22 mm; h = 200 mm	
Agitador magnético	3 x 0,5 cm	
Velocidade de agitação	750 rpm	
Fluxo de fótons q (mol s^{-1})	1,06 x 10^{-4} ± 1,45 x 10^{-5}	
Eficiência fotônica ζ (%)	16,07 ± 0,55	

Durante os experimentos de fotocatálise heterogênea, as barras de TiO_2 imobilizado nos polímeros foram fixadas em volta do tubo de quartzo com lâmpada UV, implantadas em rolha de borracha de silicone inserida em rosqueável, com isolamento especial de alta resistência ao calor, que fecha o reator fotocatalítico. O monitoramento da temperatura da solução no interior do reator foi feito com auxílio de termômetro digital, também fixado na rolha de silicone, através de orifício usado também para a coleta das amostras. O reator fotocatalítico e o sistema completo utilizado na fotodegradação podem ser observados no esquema da figura 5. As amostras foto oxidadas foram analisadas por HPLC-DAD para determinação do avanço da degradação e a cinética; usou-se LC-ESI(QqLIT)MS para a identificação dos subprodutos formados pela aplicação processo.

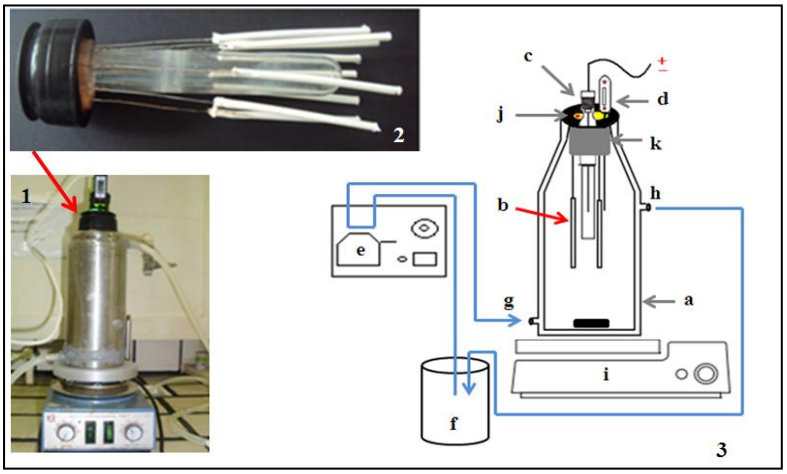


Figura 5 – (1) Reator tanque agitado artesanal utilizado na aplicação de PAOs. (2) Barras poliméricas, com TiO_2 suportado, em volta do tubo de quartzo. (3) Esquema representativo do sistema fotocatalítico: (a) reator; (b) barras poliméricas com TiO_2 suportado; (c) lâmpada UV com tubo protetor de quartzo; (d) termômetro digital; (e) bomba dosadora; (f) reservatório com água gelada; (g) entrada e (h) saída de água; (i) agitador magnético; (j) amostragem; (k) rolha de silicone. Fonte: (DA SILVA, 2012).

4.3.4 Otimização da fotólise e da fotocatálise heterogênea

A otimização das variáveis do processo de degradação de EFCT, em solução aquosa e em amostras de efluente hospitalar fortificados, foi feita com planejamento fatorial fracionado

(3^{3-1}), com três variáveis independentes e três níveis. A matriz experimental resultante é composta de 11 ensaios, dentre eles, três replicatas do ponto central (PC).

As variáveis independentes investigadas no planejamento fatorial foram: temperatura, pH (ajustado com solução de NaOH 0,1 mol L^{-1} ou ácido fórmico 1 mol L^{-1}) e catalisador (presença ou ausência de TiO_2 suportado em PDMS ou PU). O tempo de irradiação utilizado na degradação de EFCT foi de 60 min.

Para comparar o desempenho do sistema com catalisador TiO_2 em suspensão (0,750 g, mesma quantidade utilizada no preparo das barras de TiO_2 suportado) e imobilizado nos polímeros, utilizando o mesmo sistema fotocatalítico e as já condições apresentadas anteriormente, foram feitos testes prévios, em solução aquosa e em efluente hospitalar fortificado.

A fim de investigar a ocorrência de possível adsorção dos analitos nas barras poliméricas (ao invés de fotodegradação), as barras de PDMS e PU com TiO_2 suportado foram usadas na ausência de radiação UV, por 60 min, retirando-se alíquotas de 5 em 5 min, para a determinação da concentração de EFCT. Posteriormente, submeteu-se as barras a um processo de dessorção em MeOH (30 min, 35 °C) para garantir que os analitos não ficassem adsorvidos nos polímeros. Estas barras de TiO_2 submetidas à dessorção em MeOH foram descartadas, depois, uma vez que este solvente é um dos principais sequestrantes do radical hidroxil, além de contribuir como carga orgânica.

4.3.5 Otimização da geração de ozônio

Na primeira fase do estudo faz-se necessária a otimização das condições de trabalho do ozonizador, uma vez que o ozônio deve ser gerado *in situ*. A otimização da geração de ozônio foi feita em testes prévios (WILDE, 2011) e confirmada neste trabalho.

4.3.5.1 Reator e gerador de ozônio

Os experimentos foram feitos empregando-se sistema de ozonização com reator tipo coluna de semi-batelada de 800 mL de capacidade, de vidro borosilicatado (Figura 6). O gerador de ozônio utilizado foi o modelo experimental MV01 (Qualidor Saneamento Inc – Instituto Tecnológico da Aeronáutica), com geração de ozônio pelo método corona (Glaze, 1987). Como fonte de oxigênio foi usado ar seco, previamente, pela passagem em tubo secante contendo carvão ativado granulado, cloreto de cálcio ($CaCl_2$) e sílica gel. A mistura ar - ozônio foi purgado e disperso na forma de bolhas no fundo do reator-coluna através de frita de vidro sinterizado. O fluxo de ar foi de 2 L min^{-1}. Na figura 6, pose-se ver a foto e o esquema do sistema de ozonização.

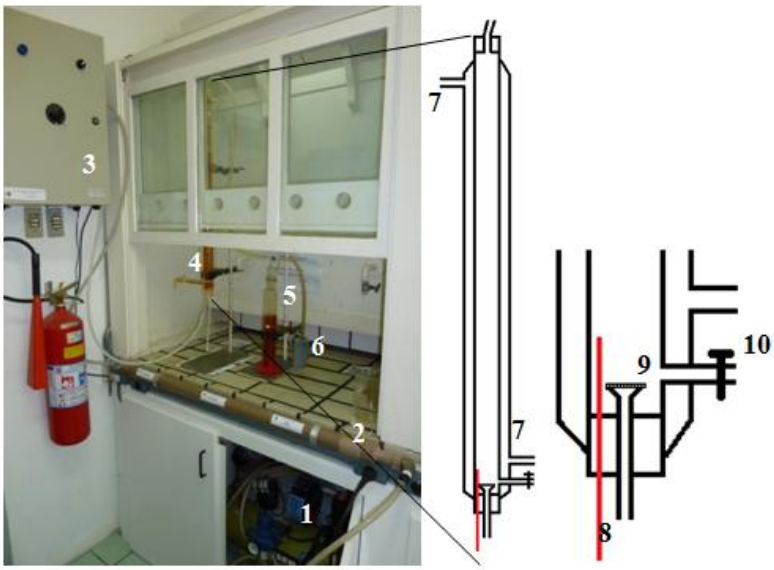


Figura 6 - Sistema de ozonização. (1) compressor de ar; (2) tubo secante (GAC + $CaCl_2$ + sílica gel); (3) gerador de ozônio; (4) Reator tipo coluna (h = 81 cm, ∅i = 4 cm), (5) destruição do ozônio excedente (solução KI 10g L^{-1}) e (6) GAC. No detalhe: (7) entrada e saída de água de resfriamento, (8) Termômetro, (9) Difusor de ozônio e (10) amostragem. Fonte: (WILDE, 2011).

4.3.5.2 Ajuste do processo de ozonização

Para o ajuste do processo, ou seja, das melhores condições para a degradação dos fármacos EFCT, variou-se apenas o pH. Os primeiros testes foram feitos em solução aquosa de EFCT em concentração de 100 mg L^{-1}, e, posteriormente, em efluente hospitalar fortificado na mesma concentração. Foram avaliados os pH 5, 7 e 9 (ajustados com NaOH 0,1 mol L^{-1} ou ácido fórmico 1 mol L^{-1}) tanto em solução aquosa quanto nas amostras de efluente hospitalar. Alíquotas foram coletadas de 5 em 5 min. As amostras de efluente hospitalar foram filtradas em filtro qualitativo (26 µm) antes da ozonização e, posteriormente, em filtro seringa de membrana de 0,45 µm, PTFE Chromafil® (Macherey-NagelGmbH&Co. KG, Düren, Germany) e, então, diluídas em MeOH diretamente no vial. Amostras dos testes em solução apenas passaram pelo processo de diluição em MeOH no vial. Posteriormente, as amostras foram levadas à determinação de EFCT por HPLC-DAD, nos estudos de degradação e cinética, e por LC-ESI(QqLIT)MS, na identificação dos subprodutos formados na ozonização.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.4.1 Fotólise e fotocatálise heterogênea

4.4.1.1 Barras de TiO_2 imobilizada em polímeros

O descarte e remoção do catalisador em suspensão da solução aquosa ou do efluente da fotocatálise heterogênea implica em uma etapa de microfiltração para viabilizar posterior determinação cromatográfica dos produtos da degradação de EFCT, como também, para a identificação dos subprodutos gerados. Isto constitui um problema operacional. Ademais, durante o tratamento fotooxidativo, o catalisador em suspensão dificulta a penetração da radiação devido a turbidez do meio, formada pela fina suspensão de partículas (TIBURTIUS et al., 2004), e, no caso da matriz efluente hospitalar, somam-se os efeitos (DA SILVA, 2012). MOLINARI et al. (2008), investigaram duas configurações de fotorreatores catalíticos de membranas, pressurizado e não-pressurizado, em batelada e em fluxo contínuo, para a degradação dos dois fármacos (Gemfibrozil e Tamoxifeno), utilizando como catalisador TiO_2 policristalino suspenso, concluindo que o benefício comum de ambos os sistemas estudados foi a retenção do catalisador (em suspensão) no ambiente de reação e a possibilidade de operação contínua. Levando em conta estas considerações, fica muito clara a importância do estudo de processos fotooxidativos com catalisador TiO_2 suportado em materiais poliméricos.

4.4.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

A MEV foi utilizada, particularmente, para melhor percepção da homogeneidade da distribuição das partículas de TiO_2 na superfície e a textura do filme de TiO_2 suportado nos polímeros PDMS e PU (Figura 7).

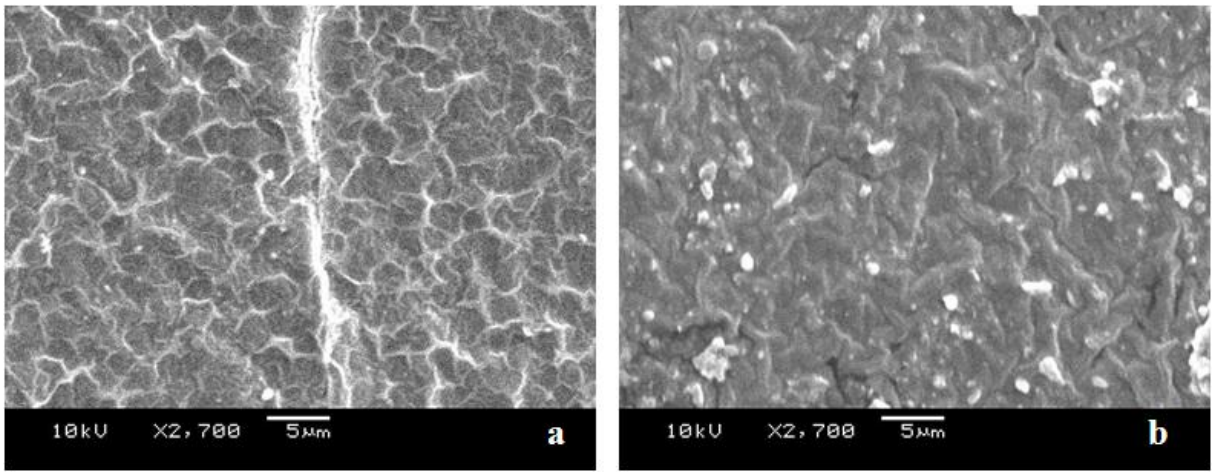


Figura 7 – Micrografia eletrônica de varredura de TiO_2 suportado em (a) PDMS e (b) PU. Vista interna (corte vertical) das barras poliméricas com TiO_2. Fonte: (DA SILVA, 2012).

Na micrografia eletrônica de varredura da figura 7-a, observa-se maior formação de 'ranhuras' para PDMS/TiO_2, que caracterizam o catalisador aderido ao polímero, comparado com PU/TiO_2 em que as partículas de TiO_2 formaram espécie de aglomerado (Figura 7-b). Contrariando o que foi observado por DA SILVA (2012), na determinação de EFCT, em que a melhor eficiência foi das barras de PDMS/TiO_2 tinham melhor desempenho, neste trabalho as barras poliméricas PU/TiO_2 tiveram maior eficiência na remoção dos EFCT do efluente hospitalar. Isto se deve ao fato dos analitos EFCT terem maior afinidade adsortiva por PU que pelo PDMS.

4.4.1.3 Desempenho do catalisador TiO_2

Testes prévios avaliaram o desempenho do sistema com catalisador TiO_2 (0,750 g) em suspensão e imobilizado nas barras poliméricas. Contrariando as expectativas, constatou-se que a eficiência global do sistema com catalisador TiO_2 imobilizado, para amostras de efluente, é maior que em suspensão (e maior ainda, que na fotólise). Já, para a solução aquosa dos analitos, transparente, a fotólise demonstra ser mais eficiente. No sentido, ainda, de investigar a ocorrência de possível adsorção dos analitos nas barras poliméricas (ao invés de fotodegradação), as barras com TiO_2 suportado foram ensaiadas na ausência de radiação UV.

Os resultados mostraram, também, que os analitos durante este ensaio não se adsorvem em ambos os tipos de barras poliméricas com TiO_2 suportado.

Na Figura 8 a-d, pode-se observar a eficiência dos PAOs no tratamento de EFCT em solução aquosa, avaliando-se fotólise, fotocatálise com PDMS/TiO_2, fotocatálise com PU/TiO_2, fotocatálise com TiO_2 em suspensão. O tempo total de reação foi 60 min.

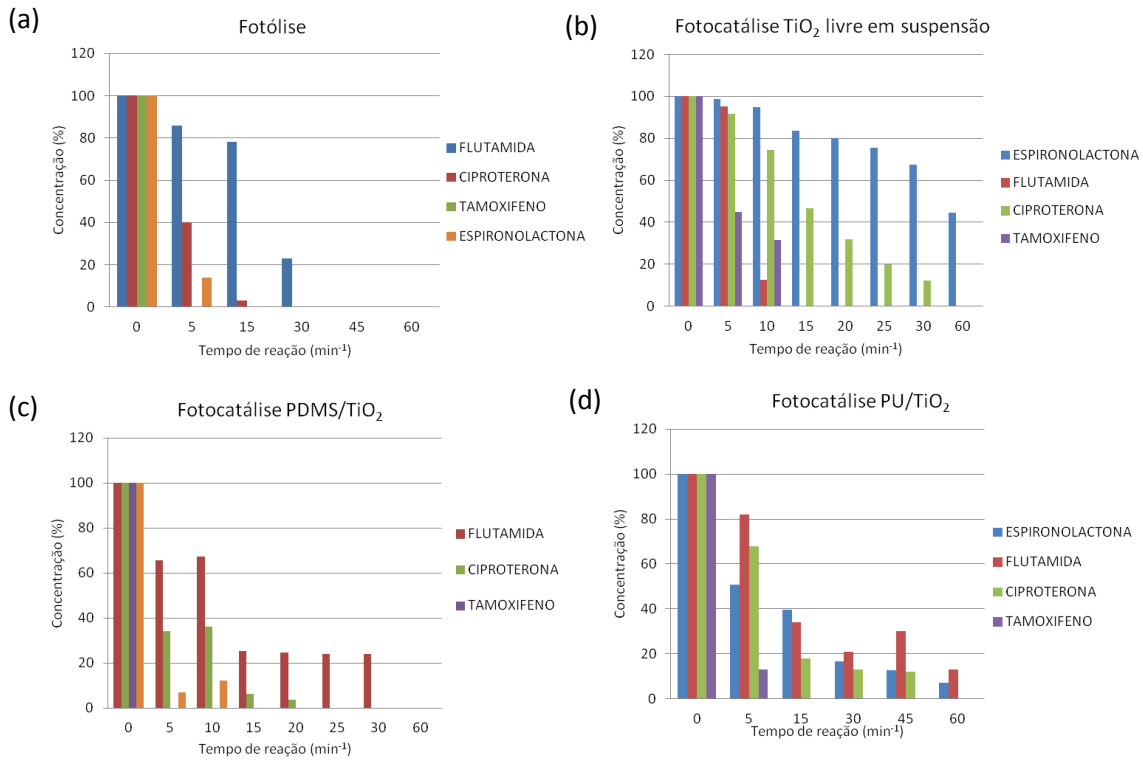


Figura 8 – Desempenho da fotólise na degradação de EFCT em solução aquosa. Condições: pH 5, 30 °C. (a) Somente fotólise; (b) Fotocatálise TiO_2 em suspensão; (c) fotocatálise PDMS/TiO_2 e (d) fotocatálise PU/TiO_2.

Como se pode observar na fotólise de EFCT em solução aquosa, em menos de 30 min de reação todos os compostos haviam sido removidos. Tamoxifeno é removido em menos de 5 min de fotólise (Figura 8-a). No caso da fotocatálise com TiO_2 em suspensão, após 60 min de reação 44,0% da concentração de Espironolactona ainda remanescia (Figura 8-b). Quando aplicou-se fotocatálise com PDMS/TiO_2 restou apenas um certo teor de Flutamida, após 30 min de reação (Figura 8-c). Na fotocatálise com PU/TiO_2, 7 e 13% de Espironolactona e de Flutamida, respectivamente, remanesceram após 60 min de reação (Figura 8-d).

O efluente hospitalar apresenta características como complexidade, turbidez e presença de outros compostos recalcitrantes, resultando em uma matriz de extrema complexidade físico-química. O processo de fotocatálise heterogênea com as barras de PU/TiO_2 apresentaram maior eficiência no processo de remoção dos EFCTs do efluente hospitalar, devido à maior afinidade de adsorção dos analitos pela PU, o que assegurou a degradação dos EFCTs neste meio complexo em 60 min de reação.

Na figura 9, pode-se observar a eficiência da degradação de EFCT em efluente hospitalar por meio de fotólise, fotocatálise com PDMS/TiO_2, fotocatálise com PU/TiO_2, fotocatálise com TiO_2 em suspensão.

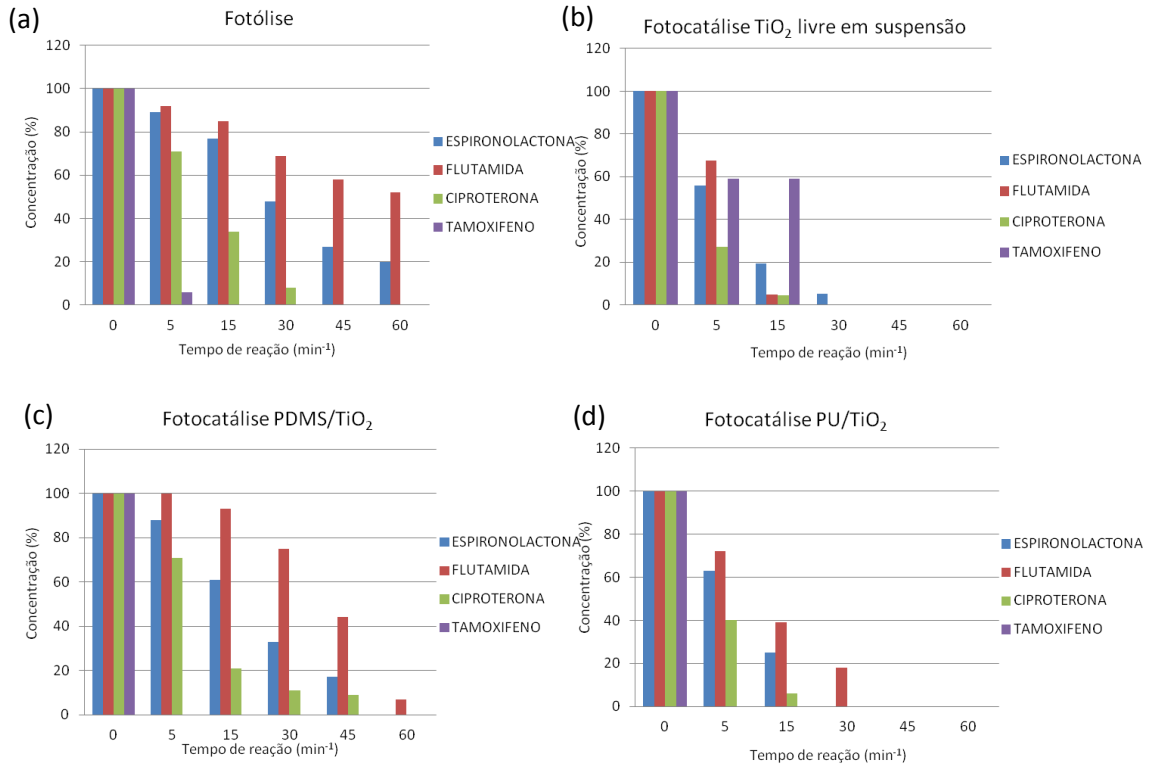


Figura 9 – Desempenho da fotólise na degradação de EFCT em efluente hospitalar. Condições: pH 5, 30 °C. (a) Somente fotólise; (b) Fotocatálise TiO_2 em suspensão; (c) fotocatálise PDMS/TiO_2 e (d) fotocatálise PU/TiO_2.

A fotólise, quando aplicada ao efluente hospitalar, mostrou-se pouco eficiente no caso da Espironolactona e da Flutamida, que continuaram presentes depois de 60 min de reação, respectivamente, em 20 e 52 % da concentração inicial (Figura 9-a). No caso da fotocatálise com TiO_2 em suspensão, com apenas 30 min de reação restava uma pequena concentração de

Espironolactona no efluente tratado (Figura 9-b). Na fotocatálise com barras poliméricas de PDMS/TiO_2, a degradação da Flutamida, em especial, mostrou-se menos eficiente (Figura 9-c). E, por último, na avaliação das barras poliméricas com PU/TiO_2 uma maior eficiência foi observada na degradação dos 4 compostos, particularmente, para Flutamida (Figura 9-d).

Para verificar a ocorrência de adsorção dos analitos nas barras poliméricas (que poderia mascarar a fotodegradação), as barras com TiO_2 suportado foram testadas na ausência de radiação UV. Os resultados demonstraram que os analitos não se adsorvem de maneira irreversível, em ambos os tipos de barras poliméricas (DA SILVA, 2012).

4.4.2 Otimização do processo de fotólise/fotocatálise

Um planejamento fatorial fracionado (3^{3-1}) foi aplicado na otimização das variáveis no processo de degradação de EFCT, em solução aquosa, bem como, no efluente hospitalar, totalizando 11 experimentos, em duplicata, com tempo de irradiação de 60 min. As variáveis investigadas foram: temperatura, pH e irradiação com e sem TiO_2 suportado nos polímeros PDMS e PU. As amostras foram coletadas nos tempos de 0, 5, 15, 30, 45 e 60 min de reação.

Os parâmetros da ANOVA para o modelo foram utilizados na análise estatística. Para a degradação de Flutamida, em solução aquosa, o modelo que melhor se ajusta aos resultados foi verificado pela determinação do R^2, calculado em 0,99, podendo-se dizer que 99% da variação total em torno da média é explicada pela regressão. Em efluente hospitalar, Ciproterona e Espironolactona tiveram o R^2 calculado em 0,92, podendo-se, então, dizer que 92% da variação total em torno da média é explicada pela regressão (Tabela 3).

Tabela 3 – Coeficientes de determinação do modelo para a degradação de EFCT em solução aquosa e em efluente hospitalar.

Analito	**Coeficiente de determinação do modelo (R^2)**	
	Solução aquosa	Efluente hospitalar
Espironolactona	0,97	0,92
Flutamida	0,99	0,80
Ciproterona	0,92	0,92
Tamoxifeno	0,60	0,85

Utilizou-se o software *Portable Statistica 8.0,* para avaliar os resultados obtidos experimentalmente pelo planejamento fatorial aplicado aos compostos EFCT em solução aquosa e em efluente hospitalar. Diagramas de Pareto foram gerados nos tempos de irradiação onde as maiores taxas de degradação foram observadas para os fármacos. O intervalo de confiança de 95% foi utilizado para avaliação dos resultados.

A variável dependente considerada foi o percentual de degradação dos analitos, uma vez que a redução da DQO não foi superior a 15%, em efluente hospitalar, nas condições ótimas do planejamento fatorial. Os autores RIZZO et al. (2009) também observaram uma baixa mineralização dos fármacos Amoxicilina, Carbamazepina e Diclofenaco nas melhores condições otimizadas de fotocatálise com TiO_2, tanto em água destilada quanto em efluente fortificado. A incompleta mineralização dos fármacos é consequência da formação de intermediários recalcitrantes, que podem ser mais impactantes que o fármaco original (MELO et al., 2009). Por isso, a grande importância do estudo de subprodutos de degradação dos fármacos por meio de PAOs neste trabalho.

4.4.2.1 Solução aquosa

A matriz experimental do planejamento fatorial fracionado (3^{3-1}), com as variáveis e as taxas de degradação de EFCT em solução aquosa está apresentada na tabela 4.

Tabela 4– Matriz experimental do planejamento fatorial fracionado (3^{3-1}) para a otimização da degradação de EFCT por meio de fotólise e fotocatálise com TiO_2 suportado em barras PU/PDMS, com variáveis investigadas e taxas de degradação em solução aquosa.

Variáveis / **Níveis**	**X_1** Temperatura (°C)	**X_2** pH	**X_3** Catalisador				
(-1)	20	5	Ausência de TiO_2 (Fotólise simples)				
(0)	30	7	TiO_2 imobilizado em PDMS				
(1)	40	9	TiO_2 imobilizado em PU				
Exp.	**X_1**	**X_2**	**X_3**	**E**[(a)]	**F**[(b)]	**C**[(c)]	**T**[(d)]
1	20(-1)	5 (-1)	Fotólise (-1)	100	88	98	100
2	40 (1)	7 (0)	Fotólise (-1)	100	100	100	100
3	30 (0)	9 (1)	Fotólise (-1)	100	100	100	100
4	40 (1)	5 (-1)	TiO_2/PDMS (0)	55	59	89	75
5 (PC)	30 (0)	7 (0)	TiO_2/PDMS (0)	63	83	63	100
6	20 (-1)	9 (1)	TiO_2/PDMS (0)	77	84	84	100
7	30 (0)	5 (-1)	TiO_2/PU (1)	61	70	87	85
8	20 (-1)	7 (0)	TiO_2/PU (1)	100	100	100	80
9	40 (1)	9 (1)	TiO_2/PU (1)	72	91	97	100
10 (PC)	30 (0)	7 (0)	TiO_2/ PDMS (0)	62	80	59	97
11 (PC)	30 (0)	7 (0)	TiO_2/ PDMS (0)	60	82	64	95

Tempos de degradação. [(a)]Espironolactona 15 min; [(b)]Flutamida 45 min; [(c)]Ciproterona 30 min; [(d)]Tamoxifeno 5 mim.

Observando-se a matriz experimental do planejamento fatorial com os resultados obtidos para a degradação dos compostos EFCT, observa-se que, os experimentos 2 e 3 apresentaram uma maior eficiência global na redução destes compostos. Sendo assim, verificaram-se as estimativas estatísticas para cada um dos compostos em ambos os experimentos e fez-se uma média dos melhores resultados obtidos ($p < 0,05$), em que o experimento 3, utilizando somente fotólise, pH 9 e temperatura intermediária de 30 °C, foi usado nos estudos cinéticos e dos subprodutos gerados na degradação.

MELO et al. (2009) falam sobre o efeito do pH utilizando-se fotólise com H_2O_2 na degradação de fármacos residuais. Os autores colocam que o processo é dependente do pH, uma vez que em meio alcalino a dissociação do H_2O_2 é favorecida, formando o íon HO_2^-, que apresenta maior absortividade molar. No entanto, a elevação excessiva do pH prejudica o processo devido ao sequestro de radicais hidroxil por íons carbonato e bicarbonato (Equações 21 e 22). A ação competitiva desses íons constitui a principal interferência nos processos oxidativos baseados na produção de radicais HO•.

$HO\bullet + HCO_3^- \longrightarrow H_2O + CO_3\bullet^-$ (Equação 21)

$HO\bullet + CO_3^{2-} \longrightarrow HO^- + CO3\bullet^-$ (Equação 5)

MALATO et al. (2009) comentam em seu trabalho sobre descontaminação e desinfecção de água por fotocatálise solar, que temperaturas elevadas podem causar a volatilização dos analitos e/ou da amostra, desfavorecendo a adsorção dos contaminantes.

Para os experimentos de fotólise/fotocatálise, geralmente, são utilizadas lâmpadas de vapor de mercúrio de média ou baixa pressão, que emitem em comprimento de onda de 254 nm (MELO et al., 2009).

Na figura 10 é apresentado o espectro de emissão da lâmpada UV 125 W e se pode observar a emissão em 254 nm. Para este procedimento, utilizou-se um aparelho espectrômetro de absorção atômica e colocou-se a lâmpada de vapor de mercúrio no local destinado às lâmpadas (WILDE, 2006 *apud* SILVA, 2012).

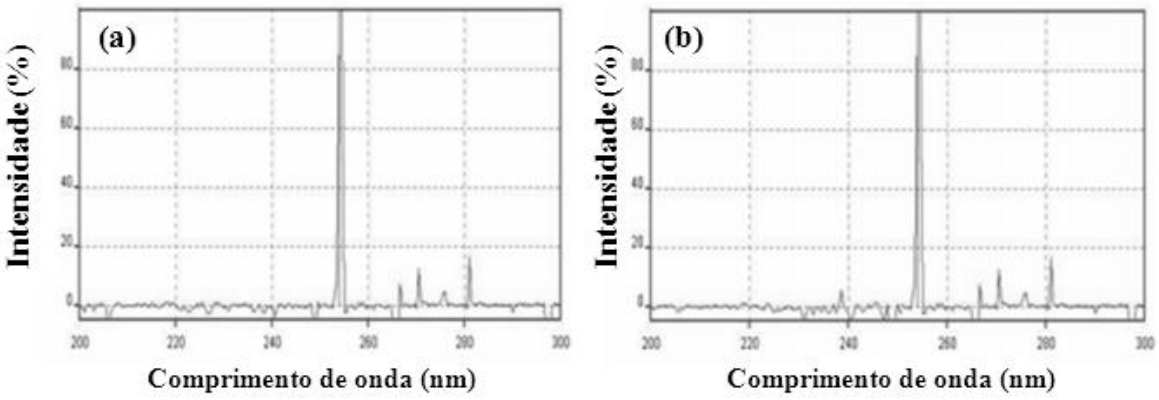


Figura 10 – Espectro de emissão da lâmpada de vapor de mercúrio usada na aplicação de PAOs: (a) sem bulbo de proteção e (b) com o bulbo de proteção. Fonte: WILDE, 2006 *apud* SILVA, 2012.

Os diagramas de Pareto para cada composto podem ser observados na figura 11, apresentando as variáveis significativas.

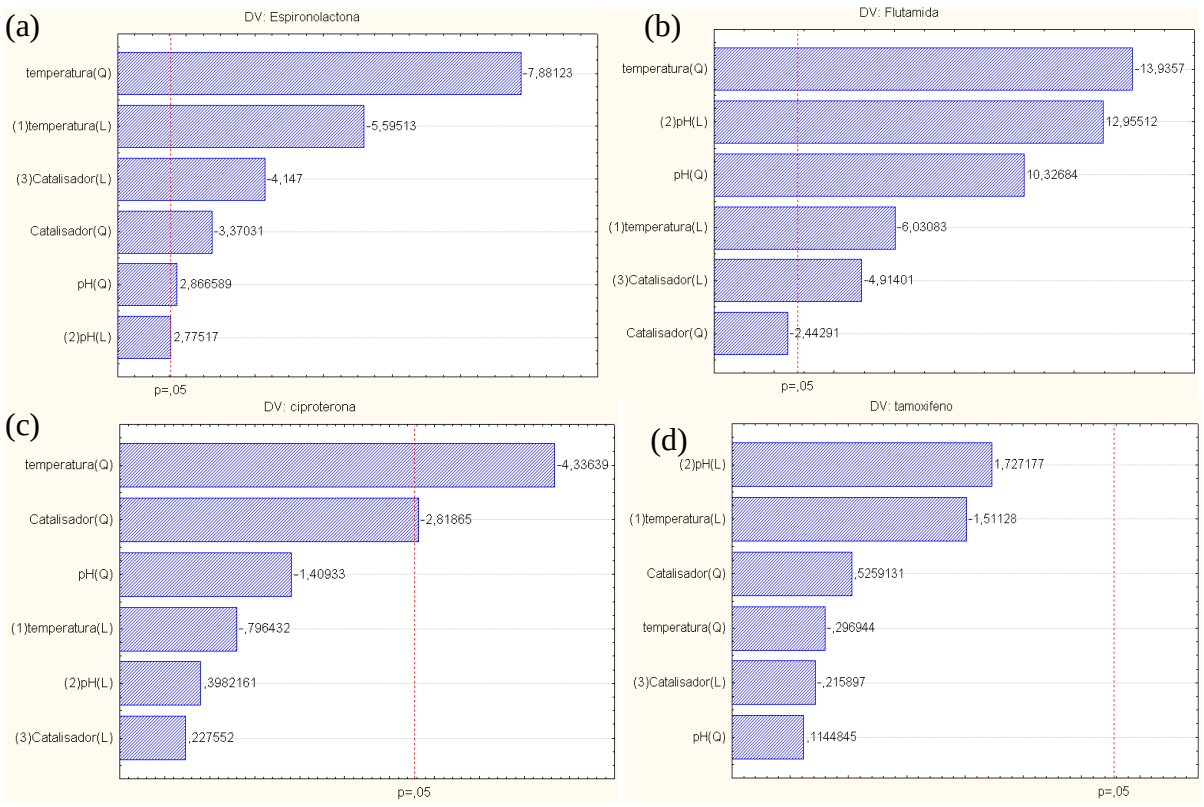


Figura 11– Diagramas de Pareto para a degradação de EFCT em solução aquosa pela aplicação de fotólise e fotocatálise com TiO_2 suportado em barras PU/PDMS. (a) Espironolactona; (b) Flutamida; (c) Ciproterona e (d) Tamoxifeno.

Como se pode observar nos gráficos de Pareto para a Espironolactona (Figura 11-a), a temperatura, como também, a influência do catalisador, tanto no modelo linear quanto no quadrático, foram significativas, bem como, o pH quadrático mostrou uma pequena significância dentro do intervalo de confiança de 95%. Para a Flutamida (Figura 11-b) as variáveis que apresentaram maior significância foram temperatura quadrática, pH linear, pH quadrático, temperatura linear e catalisador linear, nesta mesma ordem.

YANG et al. (2010) estudando os efeitos da quantidade de catalisador, valores de pH inicial e concentração inicial dos fármacos Sulfacloropiridazina, Sulfapiridina e Sulfisoxazol,

também encontraram o pH 9 como sendo o valor de pH ideal na remoção do composto Sulfisoxazol em solução aquosa do fármaco.

Ciproterona (Figura 11-c) tem como variáveis significativas apenas a temperatura quadrática e o catalisador quadrático. Tamoxifeno (Figura 11-d) não tem variáveis significativas no gráfico de Pareto com um intervalo de confiança de 95%. Como se pode observar, a temperatura quadrática mostrou-se mais significativa para Espironolactona, Flutamida e Ciproterona (Figura 11- a-c) e, nos 3 casos, com resultados negativos, o que permite concluir que temperaturas mais baixas devem levar a uma melhor degradação, mas uma temperatura média de 30 °C, juntamente com as outras variáveis, mostrou uma melhor eficiência na degradação global de todos os compostos.

Para melhor explicar os resultados obtidos pelo planejamento fatorial têm-se também os gráficos dos perfis para os valores preditos e a desejabilidade (Figura 12).

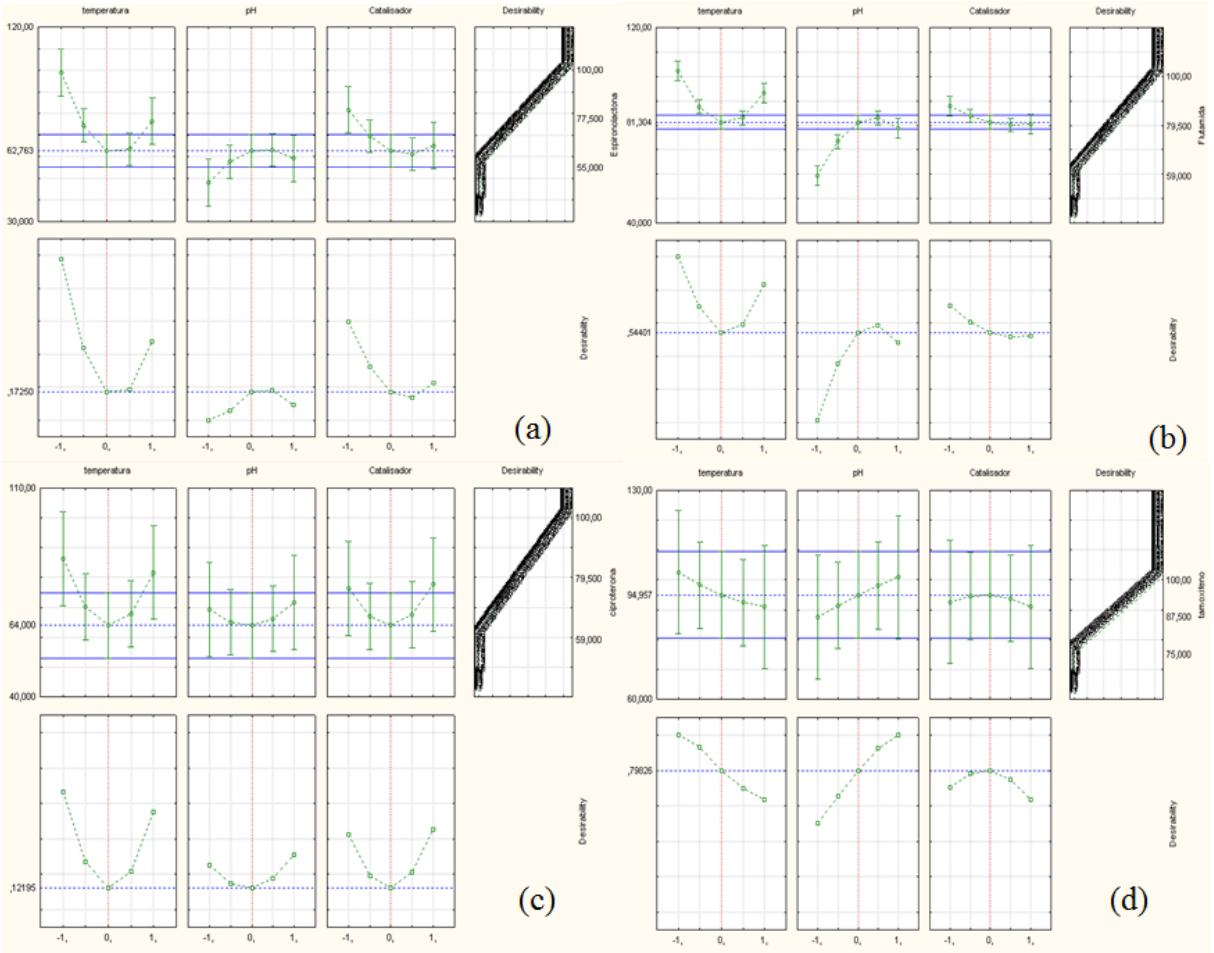


Figura 12–Perfis para os valores preditos e a desejabilidade para os compostos EFCT em solução aquosa pela aplicação de fotólise e fotocatálise com TiO_2 suportado em barras PU/PDMS. (a) Espironolactona; (b) Flutamida; (c) Ciproterona e (d) Tamoxifeno.

Observando-se os gráficos de desejabilidade das variáveis independentes para a Espironolactona, observa-se que temperaturas menores proporcionam maiores taxas de degradação; o pH não apresenta grande influência e, no caso de uso ou não de catalisador, a fotólise é visivelmente mais indicada (Figura 12-a). Para Flutamida, o perfil da temperatura é praticamente o mesmo da Espironolactona; no caso do pH observa-se que diminuindo-se este, diminui-se também as taxas de degradação da Flutamida e, em se tratando de uso de catalisador, a fotólise demonstra ser a mais indicada para degradação da Flutamida em solução (Figura 12-b). A Ciproterona apresentou perfis de temperatura onde os extremos de temperatura apresentaram melhores resultados na degradação; o pH não apresentou grandes variações nas taxas de desejabilidade e o catalisador também não apresentou grande influência na degradação da Ciproterona,segundo o gráfico de desejabilidade (Figura 12-c). Para o Tamoxifeno, nenhuma das variáveis apresentou grande influência na degradação deste composto (Figura 12-d).

4.4.2.2 Efluente hospitalar

Na tabela 5, é apresentada a matriz experimental do planejamento fatorial fracionado (3^{3-1}), com as variáveis e as taxas de degradação de EFCT em efluente hospitalar (60 min de irradiação).

Tabela 5 – Matriz experimental do planejamento fatorial fracionado (3^{3-1}) para a otimização da degradação de EFCT em efluente hospitalar por meio de fotólise e fotocatálise com TiO_2 suportado em barras PU/PDMS.

Variáveis / **Níveis**	**X_1**	**X_2**	**X_3**				
	Temperatura (°C)	pH	Catalisador				
	20	5	Ausência de TiO_2 (Fotólise simples)				
	30	7	TiO_2 imobilizado em PDMS				
	40	9	TiO_2 imobilizado em PU				
Exp.	**X_1**	**X_2**	**X_3**	**E**[(a)]	**F**[(b)]	**C**[(c)]	**T**[(d)]
1	20 (-1)	5 (-1)	Fotólise (-1)	95	100	100	85
2	20 (-1)	7 (0)	Fotólise (-1)	52	42	66	94
3	20 (-1)	9 (1)	Fotólise (-1)	100	92	85	45
4	30 (0)	5 (-1)	TiO_2/PDMS (0)	67	56	79	100
5 (PC)	30 (0)	7 (0)	TiO_2/PDMS (0)	54	74	72	100
6	30 (0)	9 (1)	TiO_2/PDMS (0)	63	36	75	100
7	40 (1)	5 (-1)	TiO_2/PU (1)	100	100	100	100
8	40 (1)	7 (0)	TiO_2/PU (1)	91	75	85	100
9	40 (1)	9 (1)	TiO_2/PU (1)	85	84	83	76
10 (PC)	30 (0)	7 (0)	TiO_2/ PDMS (0)	53	73	70	100
11 (PC)	30 (0)	7 (0)	TiO_2/ PDMS (0)	50	71	73	100

Tempos de degradação. [(a)]Espironolactona 45 min; [(b)]Flutamida 60 min; [(c)]Ciproterona 30 min; [(d)]Tamoxifeno 10 mim.

O planejamento fatorial com os dados experimentais da degradação de EFCT, obtidos para efluente hospitalar fortificado, apresentou como melhor experimento para a degradação global destes compostos o experimento 7: fotocatálise com barras de PU/TiO_2, pH 5 e temperatura 30 °C. Este experimento foi utilizado para os estudos cinéticos e de formação de subprodutos da degradação de EFCT em efluente hospitalar fortificado, fazendo uso de estimativas estatísticas para EFCT ($p < 0,05$). Fica evidente a influência negativa da matriz complexa do efluente hospitalar no fenômeno de fotólise simples. Na fotocatálise heterogênea, a ação das barras poliméricas com PU/TiO_2 suportado promove maior formação de radicais (hidroxil) que asseguram completa fotodegradação dos fármacos (em 60 min).

A interpretação do efeito do pH na eficiência do processo UV + PU/TiO_2 do efluente hospitalar não é tarefa fácil (SILVA, 2012). Primeiramente, por se tratar de um efluente de matriz bastante complexa, mas também devido à possibilidade de três mecanismos de reação de degradação da matéria orgânica: (1) ataque do radical $HO^{\bullet}$ gerado na fotocatálise, (2) oxidação direta pela lacuna positiva fotogerada na superfície do TiO_2 e (3) redução direta por elétrons fotogerados na banda de condução (MOLINARI et al., 2006).

O efeito do pH nos tratamentos de fotocatálise heterogênea está intimamente relacionado com o fenômeno de adsorção às partículas do catalisador. A capacidade de

adsorção do analito ao catalisador (TiO_2) pode ser relacionado à solubilidade. Como tendência geral, a uma solubilidade elevada em água corresponde uma adsorção mais baixa às partículas de TiO_2 (MOLINARI et al., 2006). Contudo, o pH do meio tem influência na capacidade de adsorção dos compostos do efluente às partículas de TiO_2 e, quanto maior a adsorção, mais rápidas são as reações de oxirredução (HAQUE e MUNEER, 2007).

Na figura 13 se encontram os diagramas de Pareto com as variáveis significativas na degradação de EFCT por fotólise e fotocatálise heterogênea com TiO_2 imobilizado em barras poliméricas.

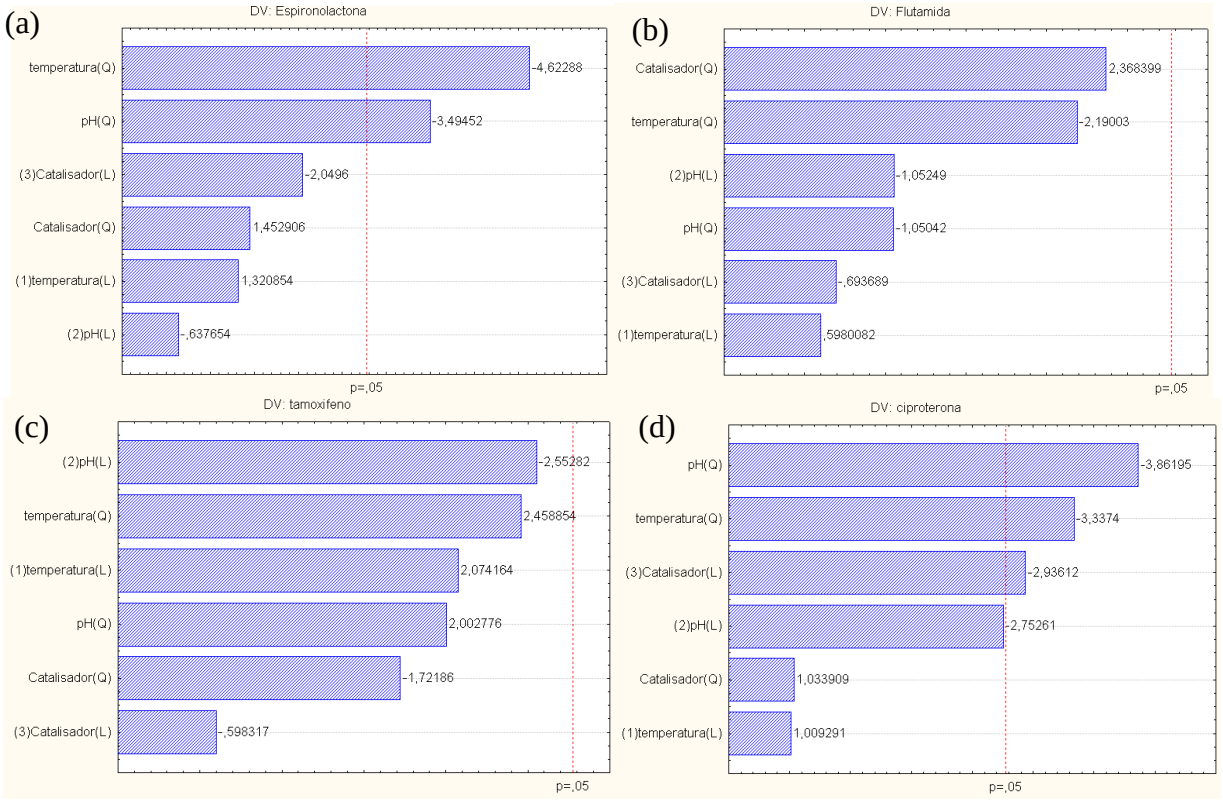


Figura 13 – Diagramas de Pareto para a degradação de EFCT em efluente hospitalar por meio defotólise e fotocatálise com TiO_2 suportado em barras PU/PDMS. (a) Espironolactona; (b) Flutamida; (c) Tamoxifeno e (d) Ciproterona.

Nos gráficos de Pareto obtidos para fotólise e fotocatálise no efluente hospitalar, a Espironolactona (Figura 13-a) apresentou como variáveis significativas a temperatura quadrática e o pH quadrático. Já, para a Flutamida e para o Tamoxifeno, nenhuma das

variáveis mostrou-se significativa (Figura 13-b e 13-c). Ciproterona (Figura 13-d) tem como variáveis significativas o pH quadrático, a temperatura quadrática e o catalisador linear.

Foram feitos gráficos dos perfis para os valores preditos e a desejabilidade para melhor explicar os resultados obtidos pelo planejamento fatorial da fotólise e fotocatálise de EFCT em efluente hospitalar (Figura 14).

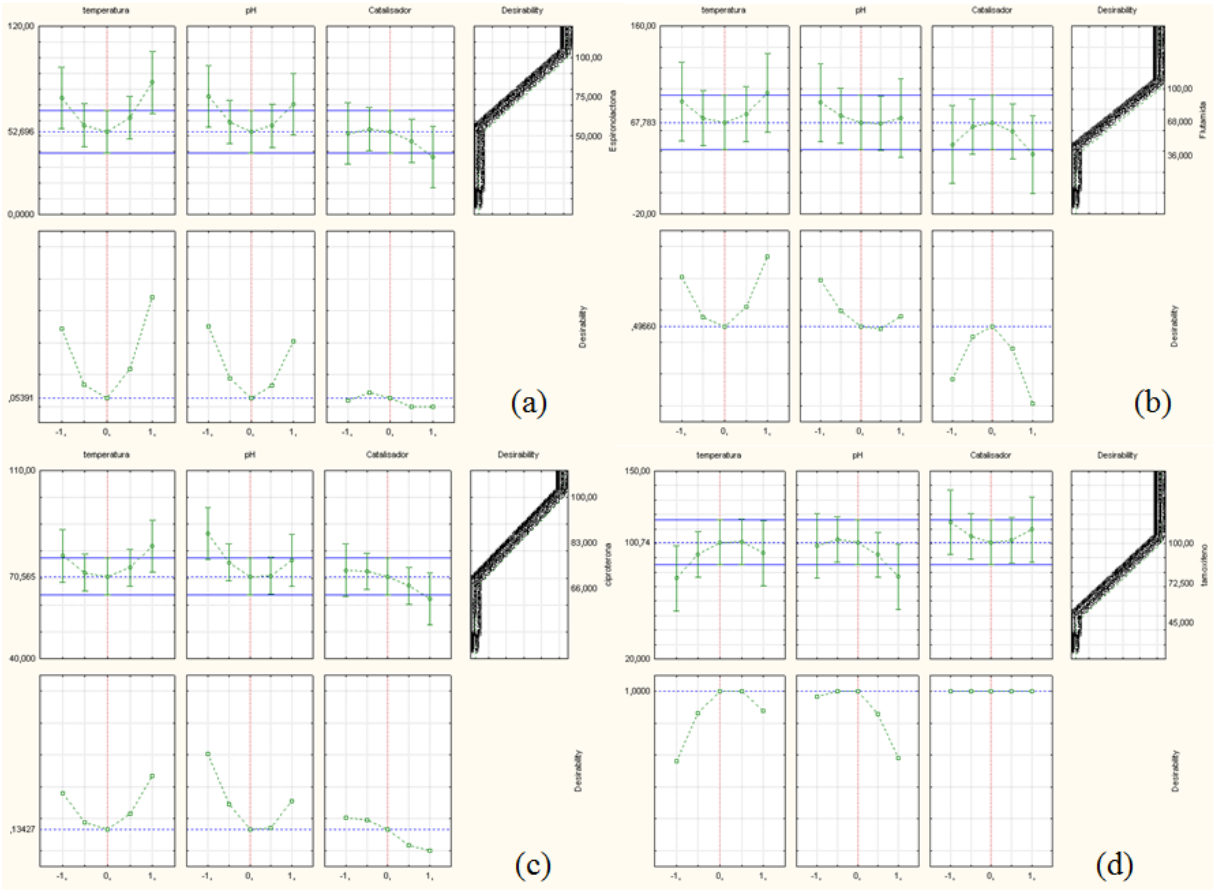


Figura 14–Perfis para os valores preditos e a desejabilidade para EFCT em efluente hospitalar pela aplicação de fotólise e fotocatálise com TiO_2 suportado em barras PU/PDMS. (a) Espironolactona; (b) Flutamida; (c) Ciproterona e (d) Tamoxifeno.

Examinando-se os gráficos de desejabilidade para a Espironolactona (Figura 14-a) observa-se que, com a maior temperatura, obtêm-se as maiores taxas de degradação; quanto ao pH, o menor pH é desejável. Quanto à variável que diz respeito a fotólise, PDMS/TiO_2 e PU/TiO_2 o sistema não apresenta variação para Espironolactona, em efluente hospitalar. Para Flutamida (Figura 14-b), a variável temperatura não apresenta grandes variações, embora

tenha uma tendência de elevação da degradação em temperaturas mais altas; o pH não apresenta valores significativos dedesejabilidade, como também o catalisador não apresenta tendência. Para Ciproterona (Figura 14-c), temperaturas mais altas demonstram ter uma maior desejabilidade, bem como, o menor pH demonstra ser mais favorável para a degradação da Ciproterona e, com relação ao catalisador, não se observa tendências na desejabilidade. Com relação ao Tamoxifeno (Figura 14-d), observa-se que temperaturas mais baixas diminuem a capacidade de degradação deste composto, nesta matriz, como também, o pH mais elevado dificulta a degradação e, no caso do catalisador, as variáveis utilizada não demonstram tendências de desejabilidade, neste meio.

4.4.3 Condições otimizadas para fotocatálise heterogênea

As melhores condições do planejamento fatorial para a degradação completa de EFCT em solução aquosa e em efluente hospitalar aplicando-se fotólise e fotocatálise heterogênea são apresentadas na tabela 6.

Tabela 6– Condições ótimas para a degradação de EFCT em solução aquosa e em efluente hospitalar por meio de fotólise e fotocatálise.

Variáveis independentes	**Solução aquosa**	**Efluente hospitalar**
Temperatura	30 °C	30 °C
pH	9	5
Catalisador	Ausência de TiO_2 (Fotólise simples)	PU/TiO_2+UV

Para a solução aquosa, transparente, contendo os analitos, a fotólise apresentou maior eficiência. Evidenciou-se, portanto, a influência negativa da matriz complexa do efluente hospitalar no fenômeno de fotólise simples; o mesmo fenômeno foi observado por SILVA (2012). Já, na fotocatálise heterogênea, a ação das barras poliméricas de PU/TiO_2 induzem maior formação de radicais (hidroxil) na superfície do catalisador proporcionando completa degradação de EFCT, em efluente hospitalar, em 60 min de reação.

RIZZO et al. (2009), aplicando fotodegradação (com TiO_2) dos fármacos Amoxicilina, Carbamazepina e Diclofenaco, em efluente e água destilada fortalecida,encontraram como condições ótimas: máxima quantidade de catalisador e tempo de irradiação (0,8 g TiO_2 e 120 min).

YANG et al. (2008) estudaram as condições operacionais ótimas para fotólise/fotocatálise de Paracetamol em água; avaliaram a radiação UVA (365 nm) e a UVC (254 nm), a concentração inicial de Paracetamol, a concentração de TiO_2, bem como, o pH da solução. A degradação de Paracetamol e a remoção de carbono orgânico total (COT) foram monitoradas. Os autores concluíram que a radiação UVA sozinha degrada uma quantidade insignificante de Paracetamol, enquanto que, a concentração de Paracetamol diminuiu substancialmente sob radiação UVC, mas com alterações marginais do COT; na presença de TiO_2, a fotodegradação do Paracetamol foi mais rápida, com efetiva mineralização; o aumento da concentração do fármaco diminui a taxa de degradação; a degradação aumenta com a intensidade da luz e da concentração de oxigênio; a velocidade de degradação aumenta com a quantidade de TiO_2 até uma concentração de 0,8 g L^{-1}. Com relação ao pH, a taxa de degradação aumenta lentamente entre pH 3,5 e 9,5 e, diminui significativamente com o aumento do pH entre 9,5 e 11,0.

4.4.4 Degradação dos EFCTs por meio de fotólise/fotocatálise

Para os compostos em solução aquosa, a Espironolactona foi degradada totalmente em 15 min; a Flutamida, em 45 min; a Ciproterona, em 30 min; e o Tamoxifeno, em 5 min de reação. Em efluente hospitalar, a Espironolactona foi totalmente degradada em 45 min; Flutamida em 60 min; Ciproterona em 30 min e Tamoxifeno em 10 min de reação, nas condições ótimas definidas pelo planejamento fatorial fracionado.

Na figura 15, pode-se observar o gráfico do percentual de degradação de EFCT em função do tempo de reação, em solução aquosa e em efluente hospitalar fortificado, nas condições otimizadas para o sistema.

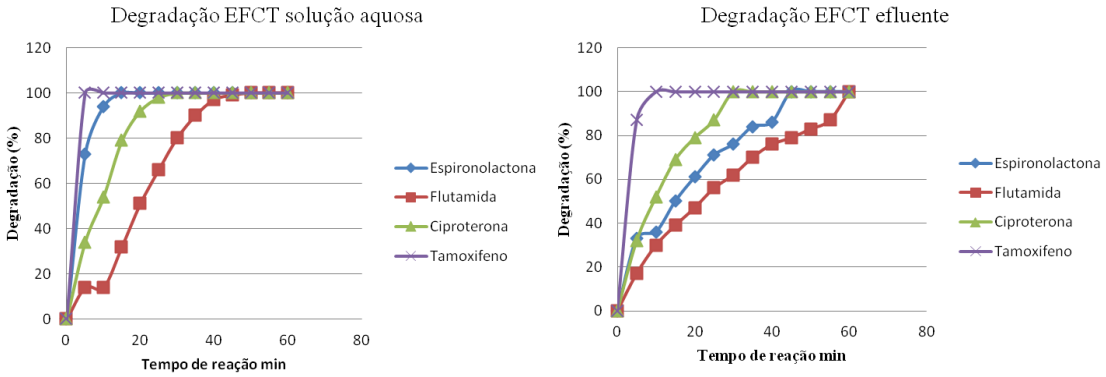


Figura 15 – Gráfico da degradação dos compostos EFCT. (a) solução aquosa. Condições: 30 °C, pH 9 e ausência de TiO_2 (Fotólise simples); (b) efluente hospitalar.Condições: 30 °C, pH 5 e barras de PU/TiO_2 + UV.

Nas mesmas condições otimizadas para a solução aquosa e efluente hospitalar fortificado, nas quais os gráficos acima foram obtidos, os cromatogramas da degradação dos fármacos EFCT foram adquiridos e representados na figura 16.

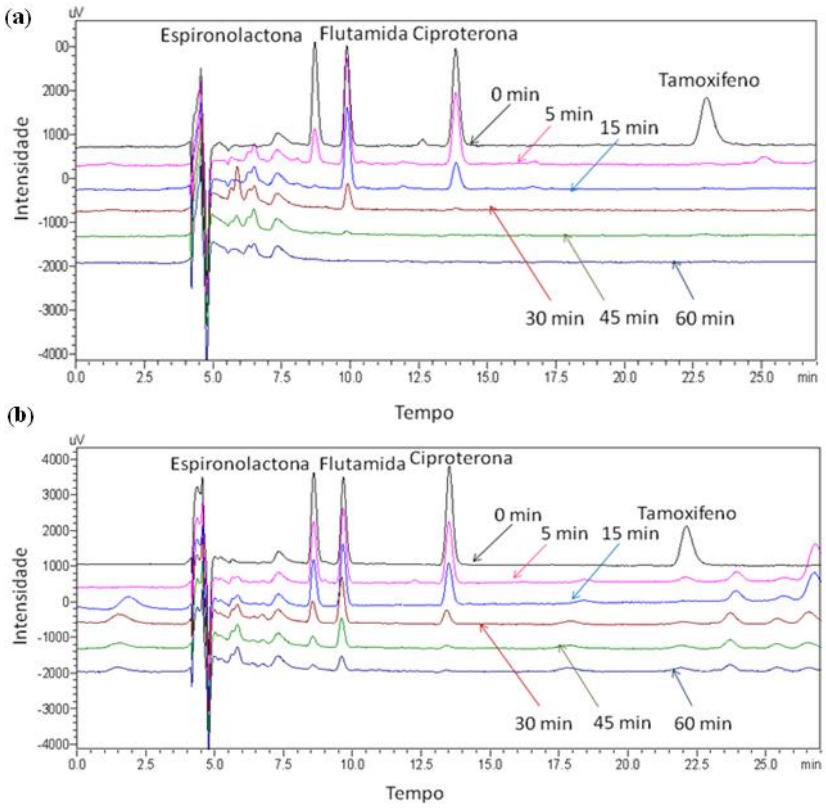


Figura 16 – Cromatogramas da degradação de EFCT. (a) solução aquosa; (b) efluente hospitalar.

MOZIA & MORAWSKI (2012) estudaram sistema híbrido de fotocatálise direta em contato com permeação em membrana para remoção de Ibuprofeno (IBU) de água da torneira. Compararam a eficácia da fotodegradação nos modos batelada e fluxo contínuo, em experimentos de 5 h de duração.

RIZZO et al. (2009) estudaram a mineralização dos fármacos Amoxicilina, Carbamazepina e Diclofenaco por fotocatálise com TiO_2 em água destilada e em efluente fortificado, observando que a remoção da fração aromática orgânica (UV 280 nm) correlacionada aos fármacos em solução aquosa fortalecida aumentou drasticamente após 30 min de tratamento fotocatalítico comparado ao efluente fortificado com os compostos em estudo.

YANG et al. (2010) estudando a cinética de degradação de três compostos Sulfa (Sulfacloropiridazina, Sulfapiridina e Sulfisoxazol) concluíram que podem ser eficientemente degradados por fotocatálise com eficiência de remoção de 85,2%; 92,5% e 85,0%, após 60 min de reação, respectivamente, e que todas as três sulfas podem ser completamente mineralizadas a CO_2, H_2O e íons inorgânicos, em 240 min.

YANG et al. (2008) estudaram a degradação de Paracetamol (2,0 mM) por TiO_2- fotocatálise, em solução aquosa e em condições otimizadas, alcançando eficiência de degradação de 95%, em 80 min.

4.4.5 Estudo cinético de degradação de EFCT por fotólise/fotocatálise

O estudo cinético da fotodegradação de EFCT foi feito nas condições otimizadas pelo planejamento fatorial descrito anteriormente. Os experimentos em solução aquosa e em efluente hospitalar, ambos fortificados, para determinar-se a cinética de degradação, foram feitos em triplicata e, as amostragens, de 5 em 5 min. Na tabela 7, são apresentados os coeficientes de regressão para solução aquosa e efluente hospitalar, também, para cada um dos EFCTs avaliados.

Tabela 7 – Coeficientes de regressão para a degradação de EFCT em solução aquosa e em efluente hospitalar.

Analito	R^2 (Solução aquosa)		R^2 (Efluente hospitalar)	
	Ordem zero	Pseudo-primeira ordem	Ordem zero	Pseudo-primeira ordem
Espironolactona	0,9048	0,9992	0,8927	0,9996
Flutamida	0,9611	0,9294	0,9170	0,9861
Ciproterona	0,9382	0,9553	0,9041	0,9922
Tamoxifeno	1	-	1	1

Comparando-se os coeficientes de regressão, melhores valores são obtidos aplicando-se (C/C_0) *versus* o tempo de irradiação, ou seja, cinética de reação de ordem zero, para o Tamoxifeno, que, por sua vez, é degradado completamente nos primeiros 5 min de reação. A cinética de reação de pseudo-primeira ordem - $\ln(C/C_0)$ *versus* o tempo de irradiação, foi utilizada para os demais analitos, Espironolactona, Flutamida e Ciproterona, em solução aquosa. Os gráficos, com as respectivas constantes cinéticas para cada composto, podem ser vistos abaixo. Na figura 17, encontram-se os gráficos com as constantes cinéticas de primeira ordem (para Espironolactona, Flutamida, Ciproterona) e de ordem zero (para Tamoxifeno).

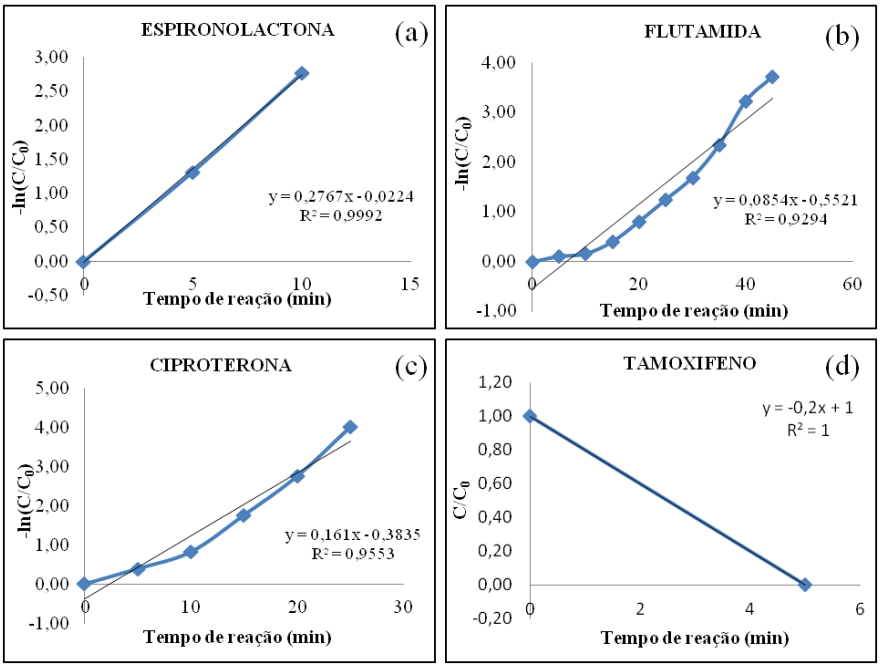


Figura 17– Gráficos do estudo cinético da degradação fotolítica de (a) Espironolactona (b) Flutamida (c) Ciproterona e (d) Tamoxifeno em solução aquosa por fotólise.

Como se pode observar na figura 17-a, a cinética de reação que descreve o perfil da degradação da Espironolactona em solução aquosa é de pseudo-primeira ordem.

ARSAND (2010), estudando a rota de remoção de Dexametasona em solução aquosa pela aplicação de fotocatálise com TiO_2 em suspensão encontrou coeficiente de regressão 0,9506, aplicando o modelo de pseudo-primeira ordem.

Para Flutamida, uma pequena diferença foi observada nos coeficientes de regressão adquiridos para ordem zero e pseudo-primeira ordem (0,9611 e 0,9294), respectivamente. Isto sugere que a reação pode ser melhor explicada pelos 2 modelos cinéticos, porém, quando o cálculo para o tempo de meia-vida foi aplicado, utilizando-se as constantes cinéticas (k), obtidas para ordem zero e pseudo-primeira ordem, respectivamente (-0,0244 e 0,0854), chegou-se à conclusão que a degradação de Flutamida é melhor explicada utilizando-se a constante cinética de pseudo-primeira ordem, como exposto na figura 17-b.

No caso da Ciproterona não foi observada variação apreciável nos coeficientes de regressão dos modelos cinéticos de ordem zero e de primeira ordem (Figura 17-c), porém, uma melhor modelagem é observada aplicando-se cinética de pseudo-primeira ordem, especialmente, ao analisar-se as constantes cinéticas de degradação (k) dos dois modelos: 4,0 x 10^{-2}, ordem zero e 1,6 x 10^{-1}, pseudo-primeira ordem. Maior velocidade de degradação para a cinética de pseudo-primeira ordem.

No estudo cinético da degradação do Tamoxifeno (Figura 17-d) em solução aquosa, apenas a cinética de ordem zero pode ser aplicada, uma vez que este fármaco é degradado já nos primeiros 5 min de reação. YURDAKAL et al. (2007), estudando a TiO_2-fotodegradação em suspensão de Tamoxifeno e Gemfibrozil, em solução aquosa, encontraram cinética de primeira ordem para ambos os compostos investigados.

Na tabela 8, estão demonstradas as cinéticas de degradação de cada um de EFCT, em solução aquosa.

Tabela 8 – Constantes cinéticas do estudo de degradação de EFCT em solução aquosa.

Analito	**Constante cinética (k)[a;b]**	**Tempo de meia vida $^1/_2$ (min^{-1})**	**Degradação completa (min)**
Espironolactona[b]	2,76 x 10^{-1}	1,978	15
Flutamida[b]	8,54 x 10^{-2}	3,154	45
Ciproterona[b]	1,61 x 10^{-1}	2,519	30
Tamoxifeno[a]	2,0 x 10^{-1}	1,00	5

[a] Constante cinética de ordem zero ($mg\ L^{-1}\ min^{-1}$); [b]Cinética de reação de primeira ordem (min^{-1})

Como se pode observar na tabela 8, as constantes cinéticas obedecem à ordem decrescente de degradação Tamoxifeno – Espironolactona – Ciproterona e Flutamida e, da mesma forma, os tempos de meia vida.

Em efluente hospitalar, todos os coeficientes de regressão assumem melhores valores aplicando-se $-\ln(C/C_0)$ *versus* o tempo de irradiação, ou seja, cinética de reação de primeira ordem, ou seja, pseudo primeira ordem, porque outras reações podem ocorrer concomitantemente, já que a matriz efluente hospitalar é de grande complexidade. Para o Tamoxifeno, completamente removido aos 10 min de reação, no efluente, a regressão linear, R^2= 1; porém, comparando-se os valores da constante cinética para ordem zero e primeira ordem, observa-se um melhor valor para a taxa de degradação quando se utiliza o modelo cinético de ordem zero.

Na figura 18, encontram-se os gráficos do estudo cinético de EFCT em efluente hospitalar e suas respectivas constantes cinéticas aparentes.

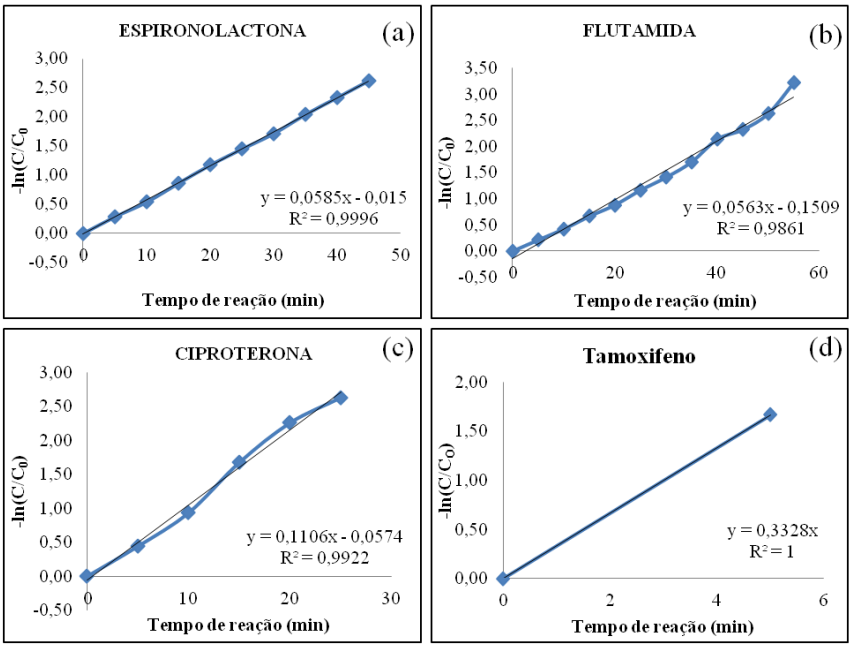


Figura 18 – Gráficos do estudo cinético da degradação de (a) Espironolactona (b) Flutamida (c) Ciproterona e (d) Tamoxifeno em efluente hospitalar.

Na tabela 9, são apresentadas as constantes cinéticas aparentes da degradação fotocatalítica de EFCT em efluente hospitalar, obtidas a partir do coeficiente angular.

Tabela 9 – Constantes cinéticas aparentes da degradação fotocatalítica de EFCT em efluente hospitalar.

Analito	**Constante cinética aparente (k_{ap}) (min^{-1})**	**Tempo de meia vida $^1/_2$(min^{-1})**	**Degradação completa (min)**
Espironolactona	$5{,}85 \times 10^{-2}$	3,532	45
Flutamida	$5{,}63 \times 10^{-2}$	3,570	60
Ciproterona	$1{,}10 \times 10^{-1}$	2,895	30
Tamoxifeno	$3{,}3 \times 10^{-1}$	0,211	10

Todos os analitos do efluente hospitalar foram degradados completamente em 60 min de reação. Devido à complexidade da matriz efluente hospitalar, pode-se apenas determinar uma constante cinética aparente (k_{ap}). Contudo, pode-se ainda verificar que o k_{ap} determina a velocidade de degradação, bem como, o tempo de meia-vida dos compostos, na ordem decrescente: Tamoxifeno – Ciproterona – Espironolactona e Flutamida. ZHANG et al. (2012) estudaram a cinética de degradação de desreguladores endócrinos em solução aquosa, concluindo que os cinco desreguladores endócrinos estudados exibiram reação cinética de pseudo-primeira ordem: estrona 1 (0,0272 min^{-1}, R_2= 0,969); estrona 2 (0,0269 min^{-1}, R_2= 0,962); estrona 3 (0,0242 min^{-1}, R_2= 0,956); nonilfenol (0,0356 min^{-1}, R_2= 0,953), e bisfenol A (0,026 min^{-1}, R_2= 0,983). O fato da fotodegradação de todos os desreguladores endócrinos seguir cinética de reação de pseudo-primeira ordem sugere que os compostos sofrem, praticamente, o mesmo mecanismo de fotodegradação, e que nenhuma reação de polimerização ocorre durante a fotocatálise com TiO_2.

4.4.6 Estudo de degradação de EFCT por ozonização

Os parâmetros avaliados para a maior eficiência da degradação dos fármacos EFCT por ozonização foram pH (5, 7 e 9), em solução aquosa e em efluente hospitalar, ambos fortificados. Nos gráficos abaixo podem ser vistos os testes feitos para avaliação da eficiência da degradação de EFCT nos três pH citados. As amostras foram coletadas nos tempos 0, 5, 15, 30, 45 e 60 min. Na figura 19, pode-se observar a eficiência da degradação dos compostos EFCT em solução aquosa, nos pH 5, 7 e 9.

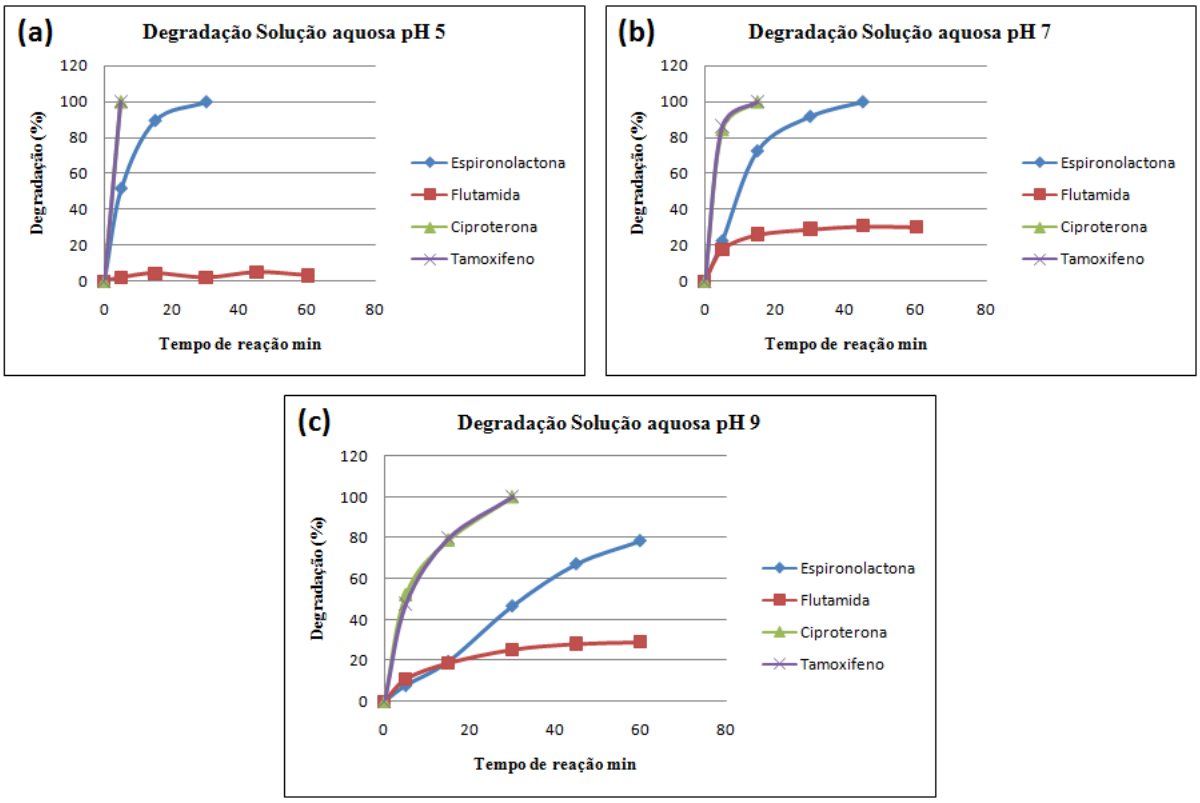


Figura 19- Gráfico da degradação dos compostos EFCT, em solução aquosa, pelo processo de ozonização. Condições: (a) pH 5; (b) pH 7 e (c) pH 9.

Como se pode observar no gráfico acima (Figura 19-a), nas condições estudadas em solução aquosa, Tamoxifeno e Ciproterona sofreram completa eliminação nos 5 min iniciais de ozonização; já a Espironolactona degradou completamente em 30 min e, a Flutamida, ao longo de 60 min de reação, em pH 5, praticamente, não sofreu redução de sua concentração inicial.

No estudo da degradação de EFCT, em solução aquosa, em pH 7, observa-se que Tamoxifeno e Ciproterona são completamente eliminados em 15 min; a Espironolactona é degradada em 45 min e a Flutamida tem redução de 30,0% de sua concentração inicial em 60 min de ozonização. AGUINACO et al. (2012) avaliando o processo de ozonização catalítica, com catalisador TiO_2, para obter as melhores condições de degradação, obtiveram completa eliminação de Diclofenaco em água ultrapura, em pH 7, com 6 min de tratamento.

Em solução aquosa e em pH 9, Tamoxifeno e Ciproterona são completamente degradados em 30 min. A Espironolactona sofre 70,0% de redução da concentração inicial e, Flutamida, apenas 29,0% de redução, ambas em 60 min de ozonização.

Na figura 20, pode-se observar a eficiência da degradação dos compostos EFCT em efluente hospitalar, pH 5, 7 e 9.

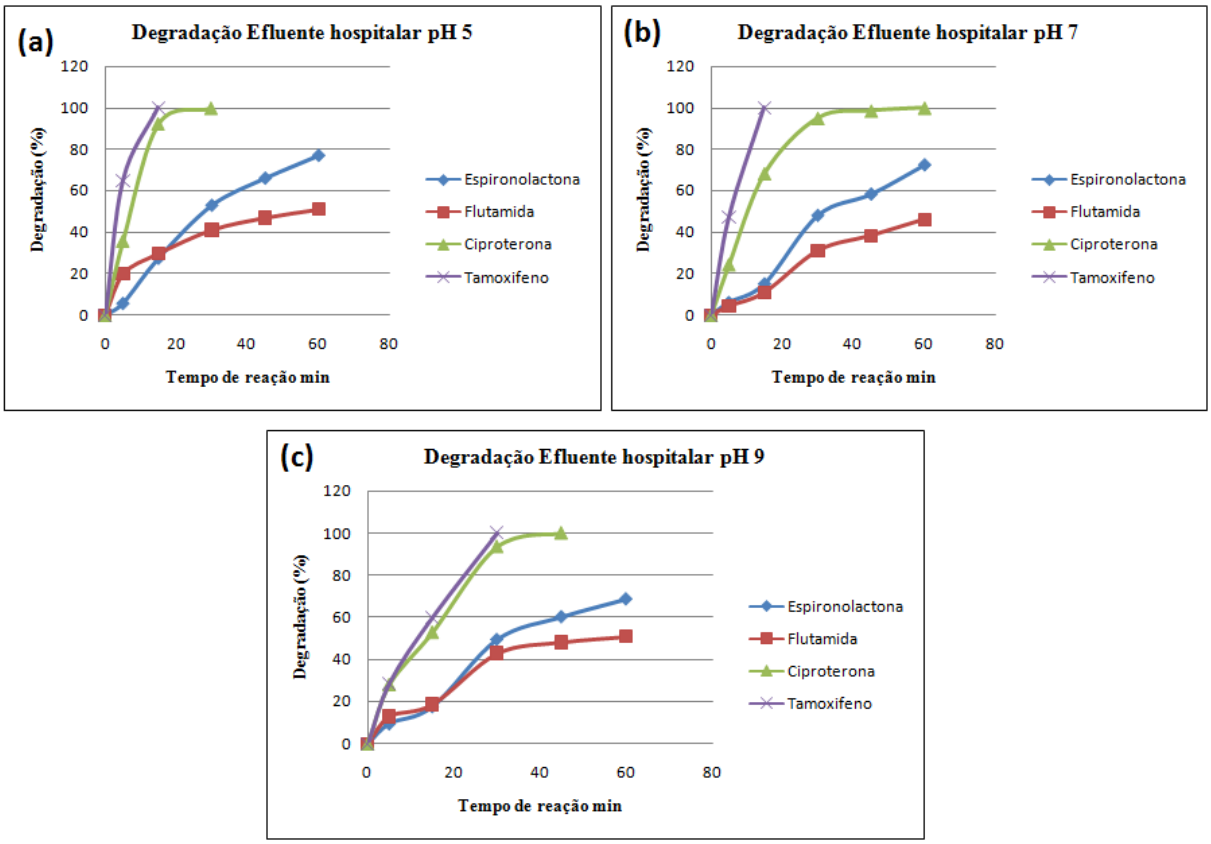


Figura 20 - Gráficos da degradação dos compostos EFCT em efluente hospitalar por processo de ozonização. Condições: (a) pH 5; (b) pH 7 e (c) pH 9.

Segundo os gráficos de degradação de EFCT em efluente hospitalar por meio de ozonização em pH 5, o Tamoxifeno é completamente eliminado em 15 min; a Ciproterona, em 30 min; a Espironolactona tem 77,0% da concentração inicial eliminada em 60 min; e, a Flutamida é degradada em 51,0% da sua concentração inicial, também, em 60 min de ozonização.

Em efluente hospitalar, no pH 7, a degradação do Tamoxifeno é a mesma que em solução aquosa: completa degradação em 15 min de ozonização. Já, para a Ciproterona, nesta matriz, são necessários 60 min de reação para a eliminação completa. A Espironolactona e a

Flutamida têm 73,0% e 46,0% de abatimento de concentração em 60 min de reação, respectivamente.

AGUINACO et al. (2012), estudando a ozonização fotocatalítica para a remoção do Diclofenaco em diferentes matrizes (água ultra-pura e efluentes residuais urbanos), obtiveram completa eliminação deste fármaco em 6 min e, 75% de remoção do COT, em 60 min de reação, em pH 7, independente da matriz.

POCOSTALES et al. (2011) estudaram a ozonização catalítica promovida por catalisadores à base de alumina para a remoção dos fármacos Diclofenaco, Sulfametoxazol e 17α-etinilestradiol. Os experimentos foram feitos com fortificação das amostras, de água ultra pura e de efluente secundário de ETE municipal. Em pH 7,5, independentemente da matriz, na presença ou ausência de catalisador, a remoção dos três fármacos foi alcançada por meio de reações rápidas, diretas, com o ozônio (isto é, os compostos foram totalmente removidos do meio em menos de 10 min).

Em efluente hospitalar, em pH 9, o Tamoxifeno foi completamente degradado em 30 min, a Ciproterona em 45 min de reação. A Espironolactona sofreu redução de concentração de 68,0% e, Flutamida, de 51,0% de sua concentração inicial, ambos em 60 min de ozonização.

VASCONCELOS et al. (2009) estudando a degradação da Ciprofloxacina em efluente hospitalar por diferentes PAOs, encontrou o pH 9 como o melhor pH para a eliminação deste fármaco em amostras de efluente hospitalar através de ozonização.

Comparando-se os testes em pH 5 nas duas matrizes estudadas (Figuras 19-a e 20-a), observa-se que a Flutamida apresenta maior taxa de degradação em efluente hospitalar do que em solução aquosa. Isto pode ocorrer devido ao fato de concomitantes favorecerem maior formação de radicais hidroxil, que atacam a estrutura molecular da Flutamida, ajudando na sua degradação.

4.4.6.1 Ozonização de EFCT em pH 5

O pH foi ajustado para pH 5 a fim de melhorar a degradação de EFCT de acordo com o estudo prévio. Neste pH ótimo, EFCT tem 100% de eliminação nos primeiros 30 min de reação e, em efluente hospitalar, a melhor taxa de degradação. O tempo de reação foi de 60

min de ozonização. Na figura 21 se encontram os gráficos da degradação em solução e efluente hospitalar.

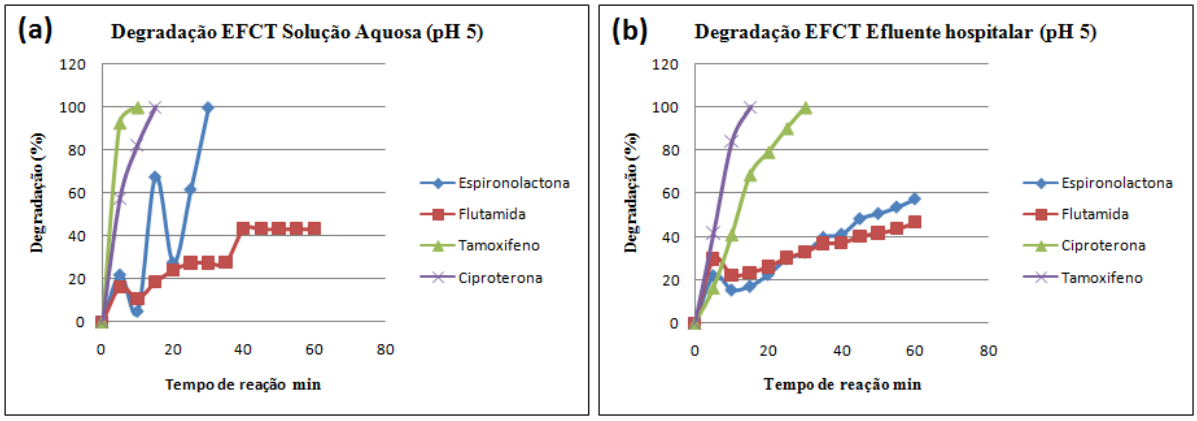


Figura 21 - Gráficos da degradação dos compostos EFCT pelo processo de ozonização na condição otimizada (pH 5). (a) solução aquosa. (b) efluente hospitalar.

Observando-se o gráfico de degradação dos EFCT em solução aquosa (Figura 21-a), pode-se notar que o Tamoxifeno é completamente degradado nos primeiros 5 min; Ciproterona, em 10 min e, Espironolactona, em 30 min ozonização. A Flutamida tem apenas 43% de sua concentração inicial degradada em 60 min de ozonização. Como se pode observar na figura 21-b, a completa degradação, ou seja, 100 % de eliminação por ozonização, em efluente hospitalar, no pH 5, só foi alcançada para o Tamoxifeno e a Ciproterona, em 15 e 30 min, respectivamente. Para a Espironolactona, obteve-se 58% e Flutamida 47% de eliminação, nos 60 min de ozonização.

Na figura 22, encontram-se os cromatogramas que demonstram a degradação dos EFCT em diferentes tempos reacionais, em ambas as matrizes.

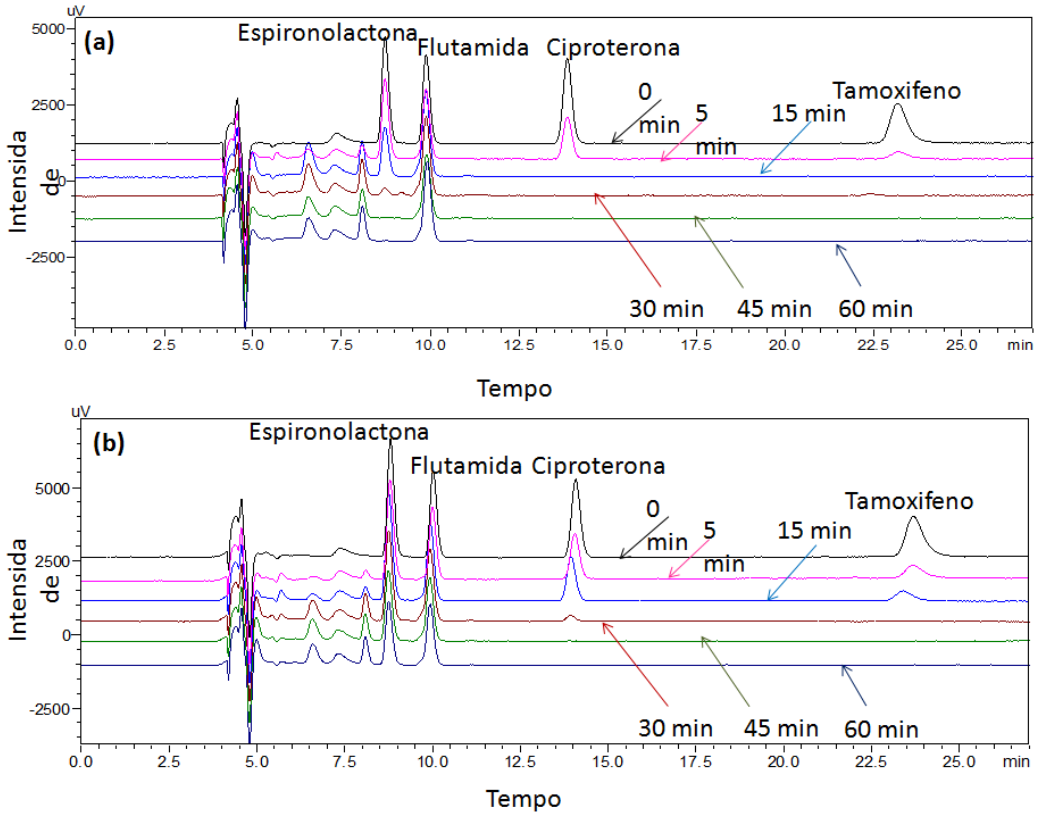


Figura 22 - Cromatogramas da degradação de EFCT pelo processo de ozonização na condição otimizada (pH 5). (a) solução aquosa; (b) efluente hospitalar.

Como pode ser observado nos cromatogramas da figura 22, os tempos de amostragem de 0, 5, 15, 30, 45 e 60 min foram utilizados, na degradação de EFCT nas condições otimizadas em ambas as matrizes.

Como anteriormente mencionado, o pH 5 foi escolhido pelo fato de obter-se a completa degradação da maioria dos compostos, em solução aquosa, no menor tempo de reação, com exceção da Flutamida. Em efluente hospitalar, este foi o melhor pH para estudo e obtenção das constantes cinéticas de degradação, embora para a Espironolactona e Flutamida não ter sido possível alcançar-se completa eliminação. Para o estudo dos subprodutos da degradação por ozonização, a degradação global obtida é suficiente.

4.4.7 Estudo cinético de degradação de EFCT por ozonização

O estudo cinético da degradação de EFCT pelo processo ozonização foi feito no pH ajustado, ou seja, que resultasse na melhor degradação dos compostos, tanto em solução aquosa como em efluente hospitalar. Os experimentos para cinética de degradação foram feitos em triplicata e as amostragens foram feitas de 5 em 5 min, tanto para solução aquosa como para efluente hospitalar, ambos fortificados e com pH regulado a pH 5. Na tabela 10, são apresentados os coeficientes de regressão para solução aquosa e efluente hospitalar, para cada um dos EFCT.

Tabela 10 – Coeficientes de regressão para a degradação de EFCT em solução aquosa e em efluente hospitalar.

Analito	**R^2 (Solução aquosa)**		**R^2 (Efluente hospitalar)**	
	Ordem zero	Pseudo-primeira ordem	Ordem zero	Pseudo-primeira ordem
Espironolactona	0,9249	0,9501	0,947	0,962
Flutamida	0,8933	0,6139	0,9236	0,9328
Ciproterona	0,9058	0,9061	0,9652	0,9653
Tamoxifeno	0,8036	1	0,8915	0,9999

Comparando-se os coeficientes de regressão, Espironolactona apresentou melhores valores de R^2 aplicando-se cinética de pseudo-primeira ordem, tanto em solução aquosa como em efluente hospitalar. Pequena diferença nos coeficientes de regressão foi observada aplicando-se ordem zero e pseudo-primeira ordem para a Ciproterona, em solução aquosa e em efluente hospitalar. Para a Flutamida, melhores valores de coeficiente de regressão são obtidos aplicando-se C/C_0 *versus* o tempo de reação, ou seja, cinética de reação de ordem zero, em solução aquosa; em efluente hospitalar, pequena diferença nos coeficientes foi observada na aplicação das duas cinéticas de reação. Para o Tamoxifeno, que degrada completamente já nos primeiros 5 min de reação, contudo, a cinética de reação de pseudo-primeira ordem, $-\ln(C/C_0)$ *versus* o tempo de reação, fornece o melhor coeficiente de regressão, em ambas as matrizes.

Os gráficos com as respectivas constantes cinéticas para cada fármaco, em solução aquosa, podem ser observados na figura 23.

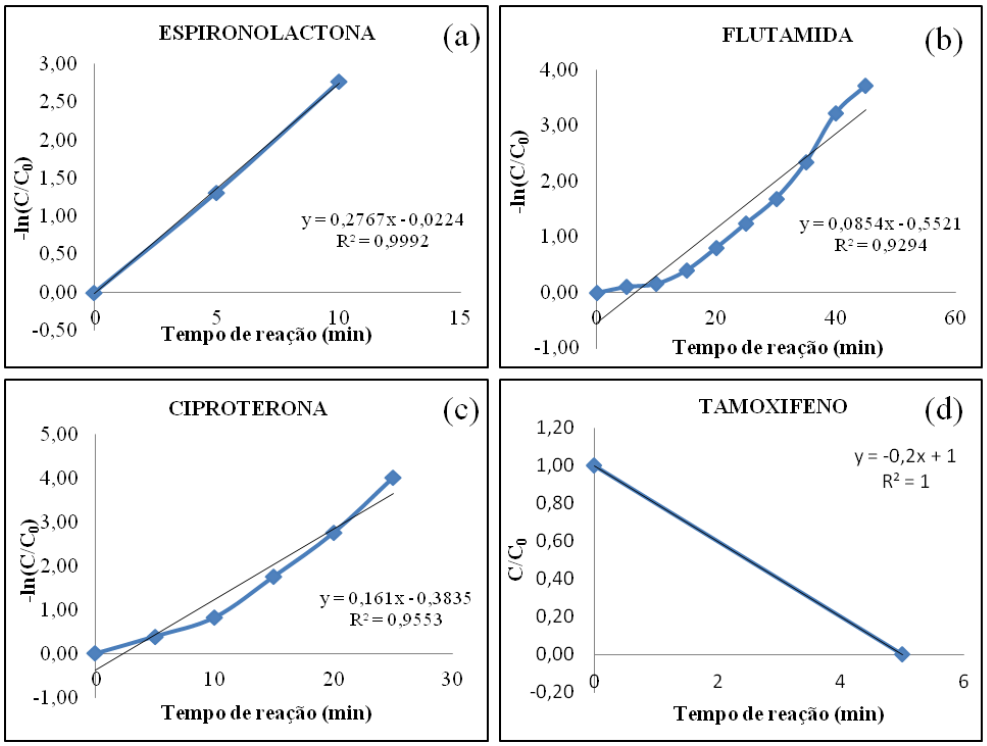


Figura 23– Gráficos do estudo cinético da degradação de (a) Espironolactona (b) Flutamida (c) Ciproterona e (d) Tamoxifeno, em solução aquosa, por ozonização.

Na tabela 11, são mostradas as cinéticas de degradação de cada um dos compostos em solução aquosa.

Tabela 11 - Constantes cinéticas da degradação de EFCT pelo processo de ozonização em solução aquosa.

Analito	Constante cinética (k)[a;b]	Tempo de meia vida $^{1}/_{2}$(min^{-1})	Degradação completa (min)
Espironolactona[b]	1,0 x 10^{-1}	6,93	30
Flutamida[a]	6,0 x 10^{-3}	833,33	< 60
Ciproterona[b]	3,2 x 10^{-1}	2,16	10
Tamoxifeno[b]	5,2 x 10^{-1}	1,33	5

[a] Cinética de ordem zero (mg L $^{-1}$ min^{-1}); [b] Cinética de pseudo-primeira ordem (min^{-1}).

Como se pode observar na tabela 11, as constantes cinéticas para a maioria dos fármacos estudados, em solução aquosa, obedecem pseudo-primeira ordem e seguem a sequência decrescente de degradação Tamoxifeno > Ciproterona > Espironolactona. A

Espironolactona mostrou cinética de degradação com ozônio de ordem zero. O tempo de meia-vida da Flutamida não pode ser obtido devido ao fato deste analito degradar apenas 43%, em 60 min de ozonização.

BENITEZ et al. (2009) avaliaram a eficiência do processo de ozonização na degradação de 4 fármacos (Metoprolol, Naproxeno, Amoxicilina e Fenacetina) em água ultra pura, variando-se o pH de 2,5 a 9,0 para a determinação das constantes cinéticas aparentes entre o ozônio e os compostos selecionados. A sequência de reatividade dos diferentes fármacos em relação ao ozônio é: Amoxicilina > Naproxeno > Fenacetina > Metoprolol, a mesma sequência obtida nos experimentos em pH 7, com cada fármaco, individualmente ozonizados em água ultrapura para obtenção das constantes cinéticas aparentes.

Na figura 24 se encontram os gráficos do estudo cinético da degradação de EFCT em efluente hospitalar e as respectivas constantes cinéticas aparentes. Estas constantes cinéticas, bem como, os tempos de meia-vida calculados para cada composto em efluente hospitalar encontram-se na tabela 12.

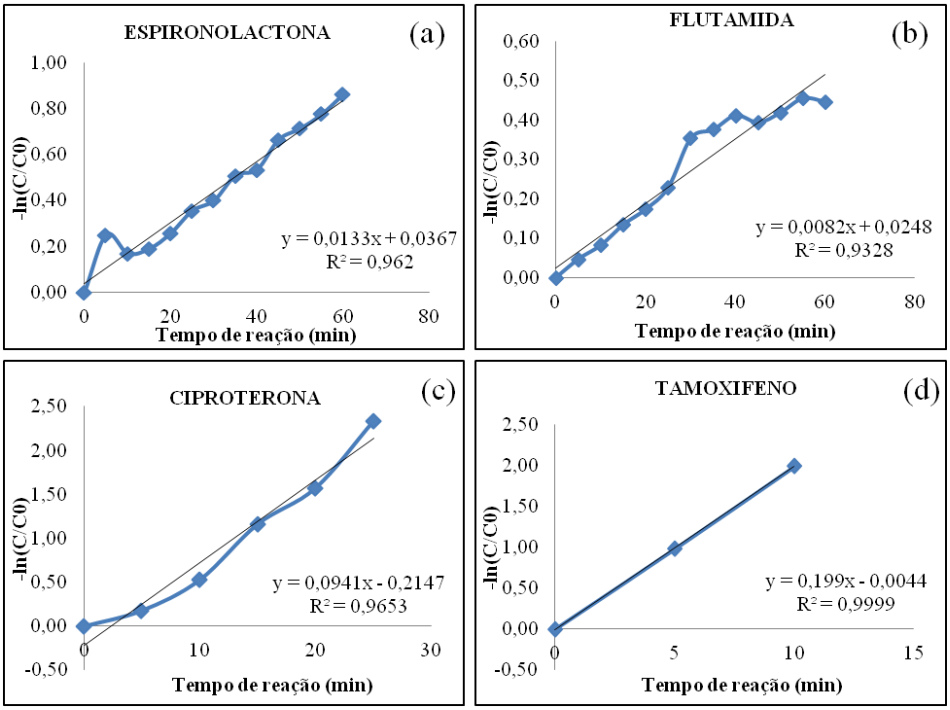


Figura 24– Gráficos do estudo cinético da degradação de (a) Espironolactona (b) Flutamida (c) Ciproterona e (d) Tamoxifeno em efluente hospitalar por ozonização.

Tabela 12 – Constantes cinéticas aparentes da degradação de EFCT em efluente hospitalar pelo processo de ozonização.

Analito	**Constante cinética aparente (k_{ap}) (min^{-1})**	**Tempo de meia vida $^1/_2$ (min^{-1})**	**Degradação completa (min)**
Espironolactona	$13,3 \times 10^{-3}$	52,11	< 60
Flutamida	$8,2 \times 10^{-3}$	84,53	< 60
Ciproterona	$94,1 \times 10^{-3}$	7,36	30
Tamoxifeno	$199,0 \times 10^{-3}$	3,48	10

Como se pode observar na tabela 12, as constantes cinéticas aparentes de primeira ordem, obtidas dos valores de coeficientes de regressão dos gráficos de cinética de ordem zero e primeira ordem para os compostos EFCT na matriz efluente hospitalar, seguem a ordem decrescente de degradação Tamoxifeno – Ciproterona – Espironolactona e Flutamida. Os tempos de meia-vida para a Espironolactona e a Flutamida não puderam ser calculados pelo fato destes compostos sofrerem redução de cerca de 50% da concentração em 60 min de reação.

ROSAL et al. (2010) estudaram a ocorrência de poluentes emergentes em efluente urbano e sua remoção através de tratamento biológico seguido de ozonização. Um modelo cinético permitiu a determinação das constantes cinéticas de segunda ordem para a ozonização de Benzafibrato, Cotinina, Diuron e Metronidazole. Os resultados mostraram que a reação com o radical hidroxil foi a principal via da conversão oxidativa destes compostos.

4.4.8 Comparação das eficiências da Fotólise, Fotocatálise e Ozonização

Após o estudo de degradação com PAOs (fotólise, fotocatálise e ozonização) de EFCT em solução aquosa e em efluente hospitalar fortificado, fez-se necessária a comparação das eficiências destas técnicas. Na figura 25, pode-se observar a eficiência dos PAOs na remoção de EFCT.

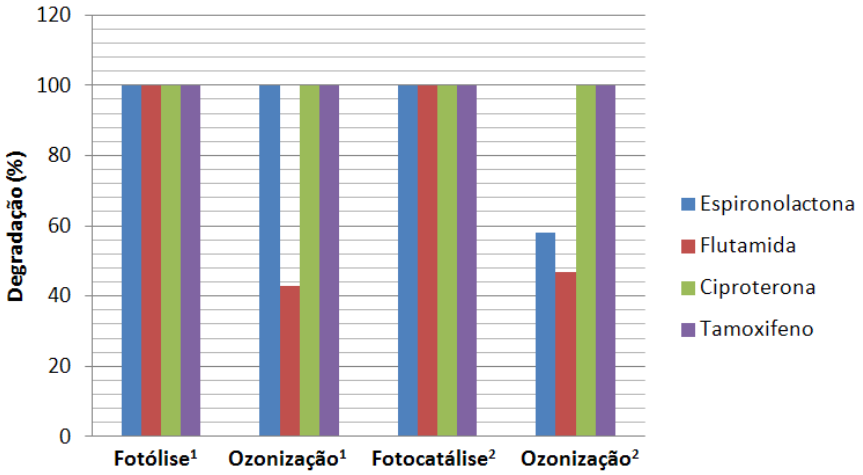


Figura 25 – Gráfico de barras comparativo das eficiências dos PAOs na degradação de EFCT nas matrizes solução aquosa e efluente hospitalar. [1]Solução aquosa; [2]Efluente hospitalar.

Observando-se o gráfico (Figura 24) se pode concluir que os foto processos (fotólise/fotocatálise) forneceram os melhores resultados de degradação/remoção de EFCT, tanto em solução aquosa quanto em efluente hospitalar. Em solução aquosa submetida à ozonização, a Flutamida teve eliminada apenas 43% de sua concentração inicial, em 60 min de tratamento em condições otimizadas. Na matriz efluente hospitalar fortificada e ozonizada por 60 min, a concentração de Espironolactona foi reduzida em 58% e, a Flutamida, em 47%. Pode-se afirmar que a estrutura química da Espironolactona, bem como, da Flutamida, é mais suscetível à radiação UV, ou seja, ao ataque dos radicais hidroxil formados do que ao ataque de ozônio molecular e suas espécies radicalares derivadas, já que, em pH 5, utilizado na ozonização, ambos os mecanismos estão presentes, ozonização direta e oxidação radicalar (WILDE, 2011).

BELTRÁN et al. (2008), compararam diferentes processos de oxidação (radiação UVA, ozonização, ozonização catalítica, foto-ozonização, fotocatálise e ozonização fotocatalítica), na degradação do fármaco Sulfametoxazol em água, sob diferentes condições experimentais. De acordo com estes autores, o emprego de ozonização fotocatalítica é recomendado se o objetivo for um alto grau de mineralização.

CAPÍTULO 5

Espectrometria de Massas: Metabólitos e Subprodutos

5.1 INTRODUÇÃO

A espectrometria de massas (EM) constitui uma importante ferramenta de análise, em que o propósito central é converter uma substância em subprodutos, ou seja, fragmentos moleculares mensuráveis que irão revelar a estrutura da molécula original. É uma técnica largamente utilizada na análise de massas moleculares diversas. Devido à alta sensibilidade (pg-µg) é utilizada na análise de substâncias em baixas concentrações (controle de *doping*, contaminação ambiental e de produtos, etc.) em diferentes matrizes (ambientais, biológicas, alimentos, etc.) (HOVE et al., 2010).

Para a identificação de compostos desconhecidos, elucidação estrutural, determinação de propriedades moleculares e, sobretudo, quantificação de substâncias em traços e ultra traços, a EM em tandem (MS/MS) é amplamente utilizada. É uma das técnicas mais difundidas na elucidação estrutural de metabólitos, sendo geralmente utilizada em associação com uma técnica de separação. A MS/MS pode fornecer informações através da fragmentação controlada de moléculas (variando-se a energia de colisão), particularmente, para a identificação de analitos, elucidação estrutural - neste estudo, metabólitos dos antiandrogênios EFCT - e, identificação de novos compostos, como é o caso do estudo dos subprodutos de EFCT pela aplicação de processos PAOs. Fornece, ademais, informações relativas a grupos funcionais (TEUNISSEN et al., 2010; DAHMANE et al., 2010; DELLAGRECA et al., 2007; MATEJÍCEK & KUBAN, 2007; SORA et al., 2010; WEN et al., 2008).

5.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

5.2.1 Conceitos Básicos de Espectrometria de Massas

O descobrimento da EM pode ser atribuído a dois pesquisadores, J.J. Thomson e F.W. Aston, no final do século 19, nos laboratórios de Cavendish, na Universidade de Cambridge, onde conduziram suas pesquisas. Os trabalhos feitos por J.J. Thomson renderam ao grupo sete prêmios Nobéis, sendo um ganho por seu filho, que continuou suas pesquisas (CHHABIL, 2007).

Aston (1877-1945) foi convidado por J.J. Thomson para trabalhar em seu laboratório em 1909, onde continuou as pesquisas com as parábolas da razão carga-massa do elétron (*e/m*). Utilizando aparelho de EM, observou que o átomo de neônio ao ser analisado apresentava duas parábolas correspondentes às unidades de massa 20 e 22: - o primeiro espectro de massas. Em 1919, Aston batizou seu instrumento espectrômetro de massa. Este instrumento atingiu uma precisão de 1/10.000 e conseguiu medir a massa exata de 212 isótopos estáveis; o que permitiu a ele introduzir os conceitos de defeito de massa e de energia de ligação nuclear, utilizados por Einstein na teoria da relatividade. Aston recebeu o Prêmio Nobel de 1922.

Na década de 40 surgiu o primeiro EM utilizado para análise de compostos orgânicos de baixa massa molecular (MM), na indústria petrolífera. Nesta década, também, foi descoberta a eletroionização (EI) e o analisador de massas por tempo de vôo (*time-of-flight*) (DE HOFFMANN & STROOBANT, 2007).

O espectrômetro de massas permite determinar a MM de compostos eletricamente carregados, ou íons, que são selecionados de acordo com a razão massa-carga (*m/z*). A unidade resultante da razão *m/z* de um íon segue a seguinte convenção: massa (*m*) em Daltons (Da), definida como 1.0 Da igual a 1/12 da massa de um átomo do isótopo de carbono 12 (^{12}C) sobre o número *z*, que é carga fundamental unitária do íon. Na maioria dos casos, os íons determinados por EM possuem somente uma carga ($z = 1$), sendo assim, o valor de *m/z* é numericamente igual à MM (iônica) em Da (SCOTT & VAN, 1998; CHHABIL, 2007; DE HOFFMANN & STROOBANT, 2007).

Na figura 1 vê-se um esquema das principais partes de um espectrômetro de massas.

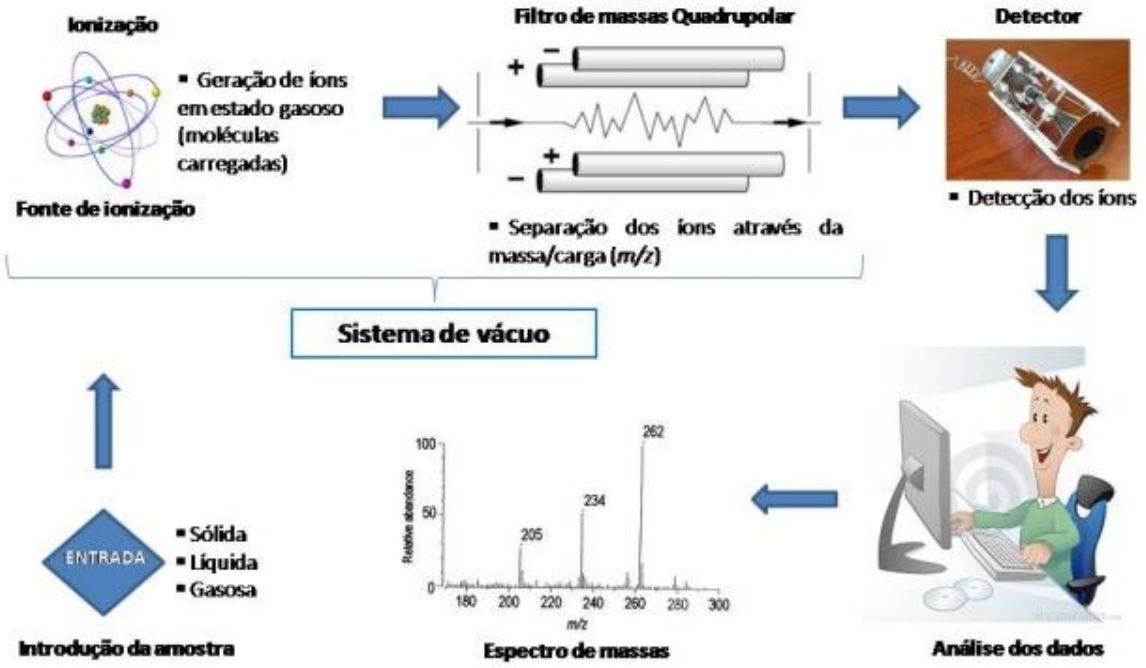


Figura 1 – Esquema da Espectrometria de massas de um sistema triplo quadrupolo. Adaptado de: (SKOOG et al., 2002).

Na entrada da amostra ocorre a transferência para a região de vácuo do espectrômetro; a seguir, na região da fonte de ionização, moléculas neutras são ionizadas e, então, aceleradas para o espectrômetro. O analisador de massa é o coração do espectrômetro. Esta seção separa íons, no espaço ou no tempo, de acordo com a razão *m/z*. Os íons são separados, detectados e o sinal é transferido para um sistema de aquisição de dados. Todos os espectrômetros de massa têm, também, um sistema de vácuo para manter a baixa pressão, ou alto vácuo, necessário para a operação. O alto vácuo minimiza reações íon molecular, de espalhamento e neutralização dos íons. Em alguns experimentos a pressão em uma das partes do espectrômetro pode ser intencionalmente aumentada para estudarem-se reações íon-molécula. Em funcionamento normal, no entanto, quaisquer colisões irão interferir na análise (SCOTT & VAN, 1998; DE HOFFMANN & STROOBANT, 2007).

A formação dos íons na fase gasosa é a primeira etapa fundamental para posterior separação e detecção no espectrômetro (nos primeiros aparelhos, as amostras tinham,

necessariamente, que estar no estado gasoso). A amostra, em estado sólido, líquido ou gasoso, entra na câmara de vácuo através de dispositivo de introdução. Dependendo do tipo de introdução da amostra, pode-se ter a técnica de ionização dos íons em solução ou podem ser ionizados simultaneamente à volatilização, ou por outros métodos proporcionados pela fonte de íons.

Os diversos espectrômetros de massas são conhecidos: (*i*) através da técnica de introdução da amostra (ex. Cromatografia líquida – LC e Cromatografia Gasosa – GC); (*ii*) através da técnica de ionização (ex. ionização à pressão atmosférica (API) ou ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI)); (*iii*) através do tipo de analisador de massas (ex. quadrupolo, tempo de vôo (TOF) ou trapeamento de íons (IT), ou a combinação destes em um único sistema (ex. triploquadrupolos, TOF/TOF ou híbridos) (CHHABIL, 2007; SCOTT &VAN, 1998; DE HOFFMANN & STROOBANT, 2007).

A figura 2 mostra diagrama dos diferentes tipos de espectrometria de massas, em conjunto com as técnicas de introdução de amostras caracterizando os sistemas existentes.

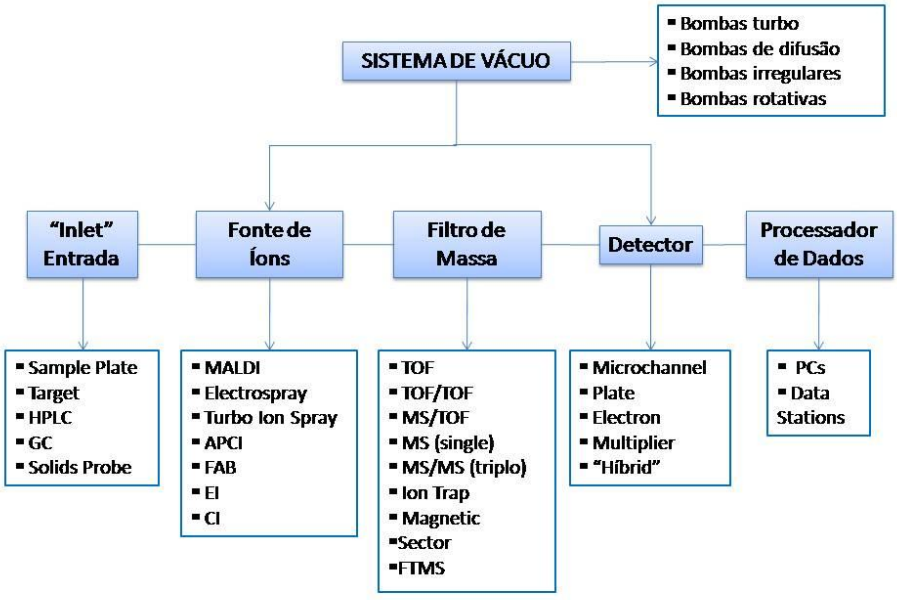


Figura 2 – Diagrama dos tipos de espectrômetros de massas mais utilizados, com modos de introdução da amostra, fontes de íons, filtros de massas, detectores e processadores de dados.

Seguindo o diagrama da figura 2 podem-se caracterizar alguns dos principais sistemas de EM hifenados e, em tandem, como, por exemplo, (*I*) GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada a um detector de EM, conhecido como *single quadrupole* (Q1). Esta técnica, em geral, utiliza a fonte de ionização por impacto de elétrons (EI) ou ionização química (CI), sob condições de vácuo; (*II*) GC-MS/MS – Cromatografia Gasosa acoplada a um detector de EM, conhecido como triploquadrupolo ou tandem MS/MS. O sistema possui dois filtros de massas (Q1 e Q3) e uma célula de colisão (Q2) para fragmentação da molécula em um único sistema. Esta técnica, em geral, utiliza a fonte de ionização EI ou CI, sob condições de vácuo (DE HOFFMANN & STROOBANT, 2007). (III) LC/MS – Cromatografia Líquida acoplada a um detector de EM, que possui um único analisador/filtro de massas do tipo quadrupolo (*single quadrupole* – Q1) ou analisador/filtro de massas do tipo *Ion Trap*; (IV) LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada a um detector de EM, que possui dois analisadores filtros de massas (Q1 e Q3) do tipo triploquadrupolo e uma célula de colisão (Q2) para fragmentação da molécula (ARDREY, 2003). Atualmente, a técnica de LC-MS/MS também pode ser classificada como híbrida, através do advento de um analisador/filtro de massas (Q3) que também possui a função de *trap*. Estes sistemas são conhecidos como *traps* lineares (MARCH & TODD, 2005; CHHABIL, 2007).

Nos sistemas de LC-MS ou LC-MS/MS existem algumas variações para introdução das amostras na fase líquida. A figura 3 mostra algumas das técnicas aplicadas em tal procedimento (SCOTT &VAN, 1998).

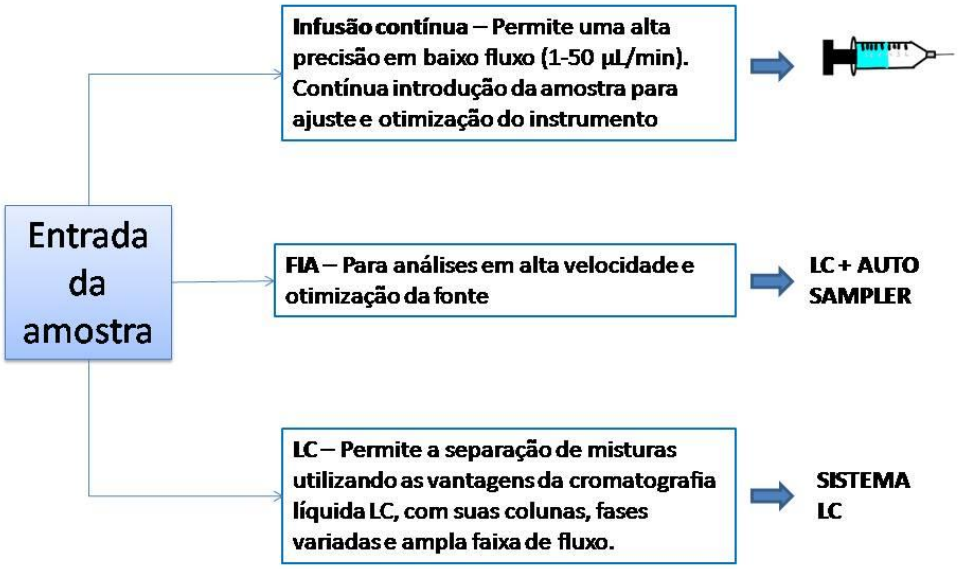


Figura 3 – Técnicas de introdução da amostra em fase líquida.

Técnicas de ionização com características singulares são utilizadas (DE HOFFMANN & STROOBANT, 2007; DE HOFFMANN & STROOBANT, 2003; SCOTT &VAN, 1998; CHHABIL, 2007):

- EI (*Electron ionization*) - (anteriormente conhecida como impacto de elétrons) é técnica de ionização com elétrons energéticos que interagem com átomos ou moléculas em fase gasosa para a produção de íons. É amplamente utilizada em espectrometria de massas, em particular, para gases e moléculas orgânicas voláteis.
- CI (*Chemical ionization*) – a ionização química é um processo de mais baixa energia comparando-se com a ionização de elétrons. Obtém-se uma menor fragmentação com campos de energia mais baixos. Um típico espectro de massas CI tem íons moleculares facilmente identificáveis.
- API (*Atmospheric Pressure Ionization)* – ionização à pressão atmosférica. Técnica utilizada nos instrumentos LC-MS e LC-MS/MS.
- FAB (*Fast Atom Bombardment*) – foi a fonte de ionização precursora e é a menos utilizada, atualmente.
- ESI (*Eletrospray Ionization*) – desenvolvida por John Fenn e colaboradores em 1984, revolucionou a técnica LC-MS, permitindo a ionização de

biomoléculas. Atualmente, a técnica é conhecida como TurboIonSpray e pode atingir um fluxo de até 2,0 mL/min;

- APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) – proposta por Horning e colaboradores em 1975, foi acoplada ao LC-MS em 1990, por Henion e colaboradores. Esta técnica tem alta eficiência para compostos de baixa polaridade analisados em fluxos acima de 1,0 mL/min.
- APPI (*Atmospheric Pressure Photoionization*) – desenvolvida por Bruins e colaboradores em 2000, permitiu a ionização de compostos apolares para determinaçãopor LC-MS ou LC-MS/MS.
- MALDI (*Matrix – Assisted Laser Dessorption/ionization*) – técnica de ionização sob vácuo, introduzida por Hillenkamp e colaboradores em 1985.

A separação por análise de massas em múltiplos estágios pode ser feita por elementos individuais do espectrômetro de massas separados no espaço ou usando-se um simples espectrômetro de massas com as etapas MS separadas no tempo. Há um grande número de experimentos em Tandem MS e todos tem suas próprias aplicações e oferecem diferentes informações. Tandem MS pode ser feito no tempo ou espaço. Tandem MS em espaço envolve a separação física dos componentes do instrumento (ex. espectrômetro de massas triplo quadrupolo (QqQ) ou com tempo de vôo (QTOF), ou tandem MS em tempo, que envolve o uso de trapeamento de íons.

Existem quatro tipos principais de experimentos scan usando-se o MS/MS:

- Íon Precursor.

O íon produto é selecionado no segundo analisador de massas e as massas precursoras são selecionadas no primeiro analisador de massas. Uma varredura de íon precursor não pode ser feita com instrumentos baseados em tempo de MS. Observe-se que o íon precursor é sinônimo de íon pai e íon produto de íons filhos (NIC et al., 2006-a).

- Íon Produto.

Um íon precursor é selecionado na primeira etapa, seguindo-se fragmentação e, em seguida, as massas resultantes são selecionadas no segundo analisador de massas, sendo detectadas pelo detector. Esta experiência é feita para identificar transições utilizadas para quantificação por MS em tandem (NIC et al., 2006-b).

- Perda Neutra.

O primeiro analisador faz uma varredura de todas as massas. O segundo analisador de massas também, mas, na sequência de deslocamento a partir do primeiro analisador de

massas. Este deslocamento corresponde a uma perda neutra de massa, que é normalmente observada para a uma dada classe de compostos. Varreduras de perdas neutras não podem ser feitas com instrumentos baseados em tempo de MS. Em uma verificação constante de perda neutra, todos os precursores que sofrem a perda de uma massa neutra comum especificada são monitorados. Para obter esta informação, os dois analisadores de massa são verificados em ação simultânea, mas com uma massa de deslocamento correlacionada com a massa neutra especificada. Semelhante ao precursor *ion scan*, esta técnica é útil para a identificação seletiva de uma classe de compostos intimamente relacionados em uma mistura (DE HOFFMANN & STROOBANT, 2003).

- Monitoramento de Reação Selecionada (SRM).

Ambos os analisadores de massa são programados para uma massa selecionada. Este modo é análogo ao monitoramento de íons selecionados para experimentos MS. É um modo de análise muito seletivo, o que pode aumentar a sensibilidade (DE HOFFMANN & STROOBANT, 2003).

A EM é uma técnica muito utilizada para a identificação de compostos desconhecidos, elucidação estrutural, propriedades químicas da molécula e quantificação de compostos conhecidos. Desta forma, a técnica de EM, em geral, acoplada às técnicas de cromatografia, tem aplicação em diversas áreas.

- Alimentos: determinação de resíduos de pesticidas em matrizes de alimentos utilizando a metodologia QuEChERS (WILKOWSKA & BIZIUK, 2011).
- Biologia Molecular: HENGEL & GOODLETT (2012) fizeram uma revisão de EM em tandem na caracterização de peptídeos adenosina trifosfato ribosilato.
- Farmacêutica: NUSSBAUMER et al. (2011) fizeram uma revisão da análise de drogas anticâncer.
- Forense: (BROECKER et al. (2012) fizeram triagem geral em cabelo por Cromatografia Líquida híbrida quadrupolo e tempo de vôo (LC–QTOF-MS).
- Medicina Clínica: Reprodutibilidade da EM baseada no perfil de proteínas para o diagnóstico de câncer de ovários em estudos clínicos: uma revisão sistemática (CALLESEN et al., 2012).
- Meio Ambiente: Destino, ocorrência e remoção de contraceptivos orais sintéticos (SOCs) no meio ambiente: uma revisão de LIU et al. (2011).
- Petróleo: Métodos de preparação de amostra para subsequente determinação de metais e não metais em óleo cru: uma revisão de LLMEO et al. (2012).

- Polímeros: Síntese e caracterização de polímeros molecularmente impressos para a extração seletiva de cocaína e seu metabólito benzoilecgonina de extrato de cabelo e análise por LC-MS (THIBERT et al., 2012).
- Produtos Naturais: LC-MS, análise de antioxidante, anti-câncer e das atividades anti-malária de extratos de Cynodon dactylon (L.) (KHLIFI et al., 2013).

5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

5.3.1 LC-ESI-MS/MS

O sistema de cromatografia líquida Agilent Series 1100 (Agilent Technologies, Cidade do México, México) é equipado com bomba binária, desgaseificador, forno para coluna e auto sampler. As condições operacionais usadas neste trabalho foram: Coluna Inertsil 5 µm, ODS2, 040 X 150 mm^2 (Metachem Technologies Inc); fase móvel acetonitrila e água milli-Q, ambas com 0,1% de ácido fórmico v/v, operando em modo isocrático 90:10 v/v com uma vazão de 0,8 mL min^{-1}. O volume de injeção utilizado foi 20 µL e o forno da coluna foi mantido em 40 ºC.

Os compostos foram identificados por meio de equipamento Agilent Technologies modelo G6410B Triplo Quadrupolo LC/MS (Agilent Technologies), como fonte de ionização Turbo Ion Spray (electrospray). As condições operacionais da fonte de ionização foram as seguintes: pressão do gás nebulizador 25 psi, temperatura do gás de nebulização 350 °C, voltagem do capilar 4000 V e fluxo do gás de 10 L min^{-1}. A optimização do espectrômetro de massas foi feita pela injeção de 20 µL de uma solução de trabalho contendo os compostos EFCT em uma concentração de 1000 µg L^{-1}, com uma vazão da fase móvel de 0,3 mL min^{-1}. O MS foi operado em modo MRM com uma resolução (UNIT) fixada nos quadrupolos 1 e 3. A confirmação de cada composto foi realizada por 2 transições MRM.

Foram feitos experimentos de MS2 SCAN, MS2 SIM, produto íon, íon precursor e perda neutra. O software Mass Hunter Agilent Technologies foi usado para aquisição dos dados.

5.3.2 LC-ESI-(QqLIT)MS

Para a identificação e estudo dos metabólitos e subprodutos gerados pelos processos de degradação aplicados aos fármacos em amostras de efluente hospitalar utilizou-se cromatógrafo líquido Agilent Series 1100. Para a separação cromatográfica dos compostos, uma coluna cromatográfica Zorbax SB C_{18} de 5 µm, 150 x 4,6 mm. A fase móvel orgânica foi

metanol e a fase móvel aquosa água ultrapura, ambas com 0,05% de ácido acético, operando em modo isocrático na proporção 50:50 v/v. A vazão da fase móvel foi 0,7 mL min^{-1} e, o volume de injeção, 20 µL. O forno da coluna foi mantido em 40 °C e tempo de corrida de 15 min utilizado.

Os compostos foram identificados por meio de um equipamento Applied Biosystems/MDS Sciex API 4000 Qtrap triplo quadrupolo com fonte de ionização eletrospray (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil).

A otimização do espectrômetro de massas foi conduzida por infusão direta de 10 mL min^{-1} de uma solução de trabalho de 100 µg L^{-1} de cada um dos EFCTs, onde experimentos de Q1 MS (Scan – varredura do espectro de massas de íons precursores) foram feitos para identificar a massa de cada composto e, sobretudo, foram feitos experimentos com modo de ionização positivo ou negativo, e de Product Ion scan MS2, com diferentes energias de colisão, para obter-se os íons produto de cada composto fragmentado. Posteriormente, para a identificação dos metabólitos e subprodutos gerados pela aplicação dos PAOs, experimentos de IDA (informação dependente da aquisição) Enhanced MS (EMS) com Enhanced Product Ion (EPI) com 3 energias de colisão (CE) 10, 25 e 50 V, e também, experimentos de Íon Precursor (PREC ION) com as massas/cargas (*m/z*) do íon produto de maior intensidade de cada composto, seguidos de EPI com 3 energias de colisão previamente selecionadas, para identificação e estudo das fragmentações dos subprodutos e metabólitos. Os parâmetros experimentais otimizados para os experimentos de IDA estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros experimentais otimizados nos experimentos IDA.

	Espironolactona, Ciproteronae Tamoxifeno	Flutamida	Espironolactona	Tamoxifeno	Flutamida	Ciproterona
TIPO SCAN	EMS + EPI	EMS + EPI	PREC ION 107 m/z + EPI	PREC ION 129 m/z + EPI	PREC ION 202 m/z + EPI	PREC ION 357 m/z + EPI
POLARIDADE	POSITIVA	NEGATIVA	POSITIVA	POSITIVA	NEGATIVA	POSITIVA
CUR	20	20	20	20	20	20
CAD (mínimo, médio e alto)	MEDIO	MEDIO	MEDIO	MEDIO	MEDIO	MEDIO
IS	4000	-3500	4000	4000	-3500	4000
TEMP	750 °C	750 °C	750 °C	750 °C	750 °C	750 °C
GS1	50	50	50	50	50	50
GS2	50	50	50	50	50	50
Ihe	ON	ON	ON	ON	ON	ON
DP	60	-130	100	100	-125	100
EP	-	-	10	10	-10	10
CE (V)	30 (EMS)	-30	30 (PREC ION)	10 (PREC ION)	-24	30
	10, 25 e 50 (EPI)	-20, -40 e -60	10, 30 e 50 (EPI)	10, 30 e 50 (EPI)	-20, -30 e -50 (EPI)	20, 30 e 50 (EPI)
CXP	-	-	10	10	-5	10

O software Analyst 1.4.2 da Applied Biosystems foi utilizado para controle do equipamento, para aquisição e estudo dos dados.

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.4.1 Estudos de fragmentação estrutural de EFCT no sistema LC-ESI-MS/MS

Para a otimização do espectrômetro de massas, experimentos com infusão direta dos padrões via HPLC, sem coluna cromatográfica, foram feitos para definir polaridade de ionização (positiva ou negativa), íon precursor, íon produto, voltagem do fragmentador e CE ideal para cada um dos compostos. Para tal, iniciou-se com experimento de MS2 Scan para identificação do íon precursor do analito, seguindo-se experimento MS2 SIM (Monitoramento de Íon Selecionado) para encontrar a melhor voltagem do fragmentador; um experimento de íon produto em que o íon precursor é fixado para definir a melhor CE, que resulta na maior intensidade do íon produto; um experimento de íon precursor em que o íon produto é fixado para confirmar o íon precursor e, por fim, um experimento de perda neutra para confirmar o íon precursor da perda de massa neutra entre precursor e produto. A figura 4 mostra os espectros de massas de cada um dos experimentos para cada um dos analitos EFCT, com as estruturas químicas propostas.

Na figura 4 encontram-se os cromatogramas de massas do experimento MS2 SCAN dos padrões de EFCT. Este experimento foi feito para identificar a *m/z* de cada um dos compostos dos EFCTs. A *m/z* 372,0 de Tamoxifeno foi identificada em modo positivo de ionização e pode ser observada no espectro de massas (A); a *m/z* 275,1 foi identificada para Flutamida em modo negativo de ionização e encontra-se no espectro de massas (B); para a Ciproterona, a *m/z* 417 foi identificada em modo positivo de ionização e encontra-se no espectro de massas (C); e para Espironolactona, a *m/z* 341 foi identificada em modo positivo de ionização e encontra-se no espectro de massas (D).

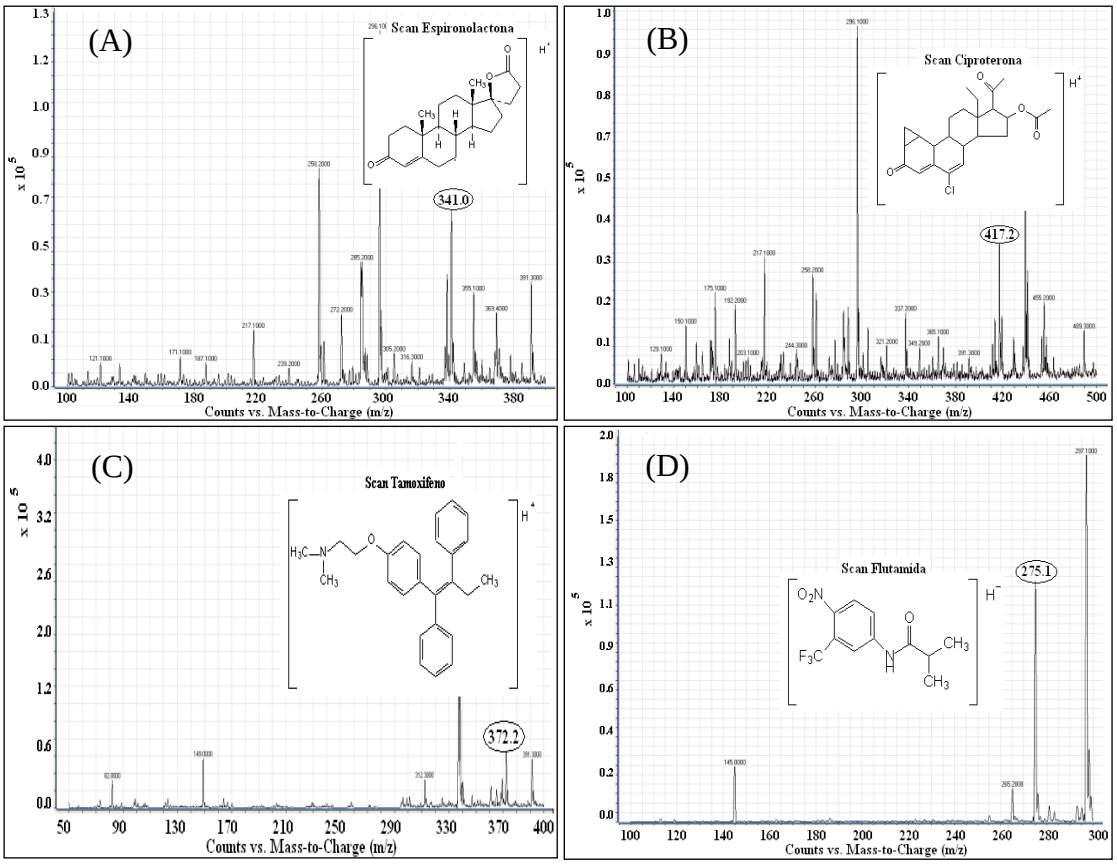


Figura 4 - Experimento de MS2 SCAN com injeção direta de padrões. (A) Espectro de massas de Espironolactona. (B) Espectro de massas da Ciproterona. (C) Espectro de massas de Tamoxifeno. (D) Espectro de massas de Flutamida.

Como se pode observar no espectro de massas na figura 4 (D) da Espironolactona, ao entrar na fonte de ionização a molécula perde o grupamento tioacetato C_2H_3SO e entra nos quadrupolos com uma estrutura ionizada, com *m/z* 341 DA.

O experimento de MS2 SIM foi feito para definir a melhor energia de fragmentação para os compostos EFCT observando a voltagem que proporcionou maior intensidade de massas para cada um dos analitos (Figura 5).

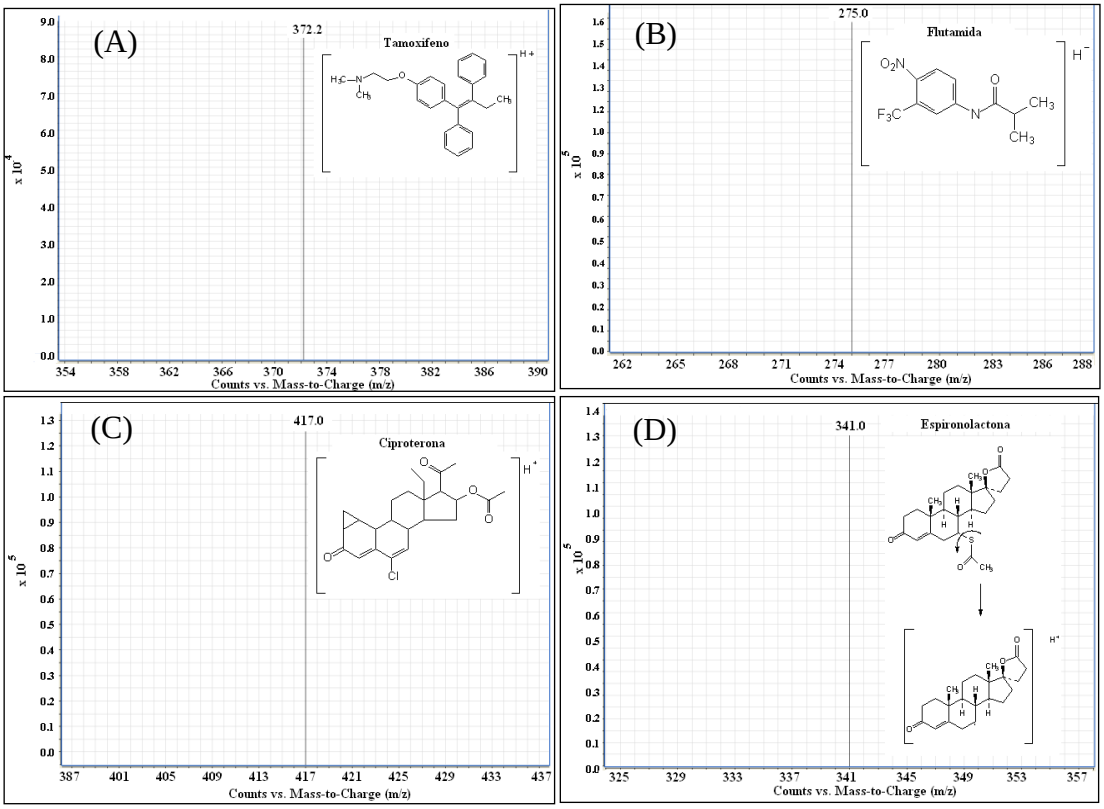


Figura 5 - Experimento de MS2 SIM com injeção direta de padrões. (A) Espectro de massas do Tamoxifeno; (B) Espectro de massas de Flutamida. (C) Espectro de massas de Ciproterona. (E) Espectro de massas de Espironolactona.

Como pode ser observado nos espectros, a melhor energia de fragmentação foi definida pela abundância relativa para cada um dos compostos, e esta ficou entre 10^4 e 10^5, o que demonstrou uma fragmentação adequada dos quatro compostos estudados.

Experimentos de íon produto foram feitos para cada um dos compostos EFCT para estudo da melhor CE para o fragmento de quantificação. A energia de colisão que resultou em maior abundância de sinal para o íon produto de cada composto foi escolhida. A figura 6 mostra os espectros de massa dos experimentos de íon produto para EFCT.

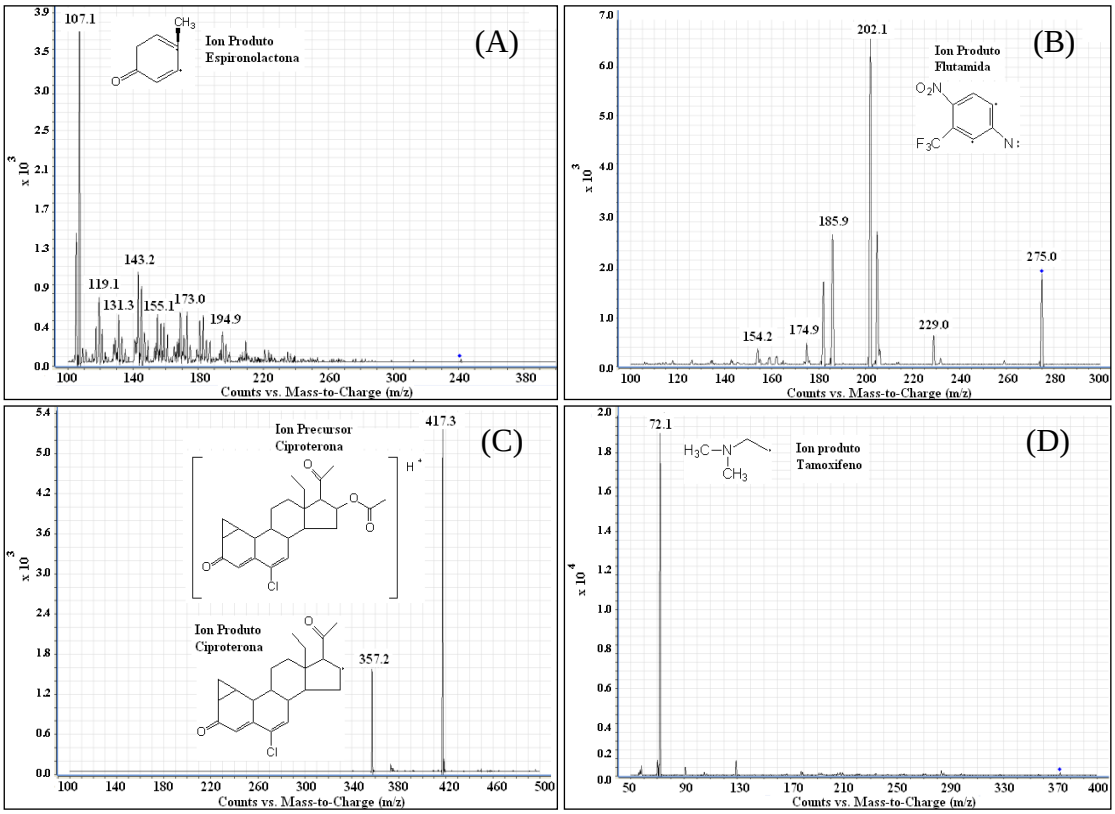


Figura 6 - Experimento de ion produto pela injeção direta de padrões. (A) Espectro de massas da Espironolactona. (B) Espectro de massas da Flutamida. (C) Espectro de massas da Ciproterona. (D) Espectro de massas do Tamoxifeno.

Observando-se a figura 6 constata-se que a Espironolactona apresentou como fragmento de maior intensidade *m/z* 107.1 com CE de 10 V. Para Flutamida, uma CE de 30 V foi a melhor para o íon produto de *m/z* 202,1. Ciproterona apresentou o fragmento de maior intensidade como sendo *m/z* 357.1 com CE 40 V. E, por último, para o Tamoxifeno, o íon produto que mostrou maior intensidade de sinal com a CE 25 V foi o fragmento de *m/z* 72,0.

Foi feito um experimento de íon precursor para confirmação, fixando-se a massa do íon produto de cada um dos analitos com as CE definidas. A figura 7 mostra os espectros de massa de íon precursor de EFCT.

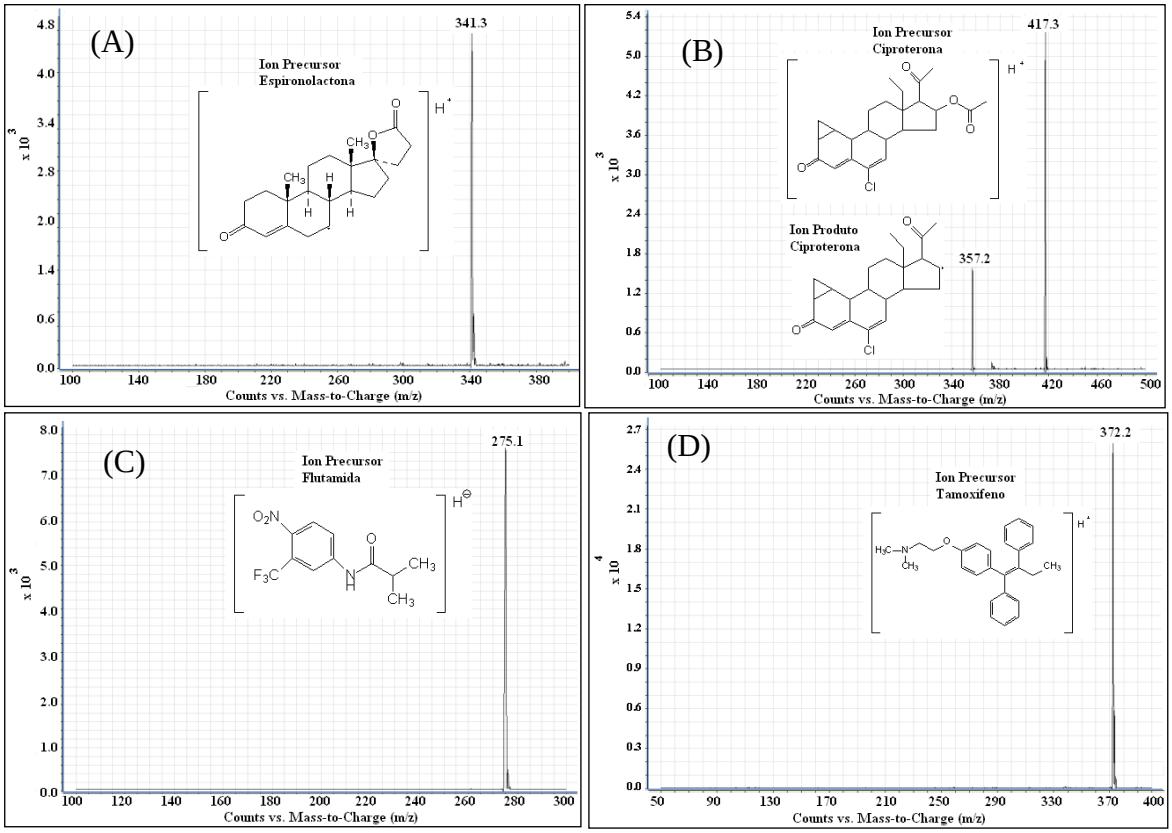


Figura 7 - Experimento de íon precursor pela injeção direta de padrões. (A) Espectro de massas da Espironolactona. (B) Espectro de massas da Ciproterona. (C) Espectro de massas da Flutamida. (E) Espectro de massas do Tamoxifeno.

Para finalizar, o experimento de perda neutra foi feito para confirmar o íon precursor com perda neutra de massa considerando-se o íon produto de cada analitos. A perda de massa neutra sugerida para Tamoxifeno foi de 72,2; para Flutamida, 73,0; para Ciproterona, 60,0 e, para Espironolactona, 234,0 (Figura 8).

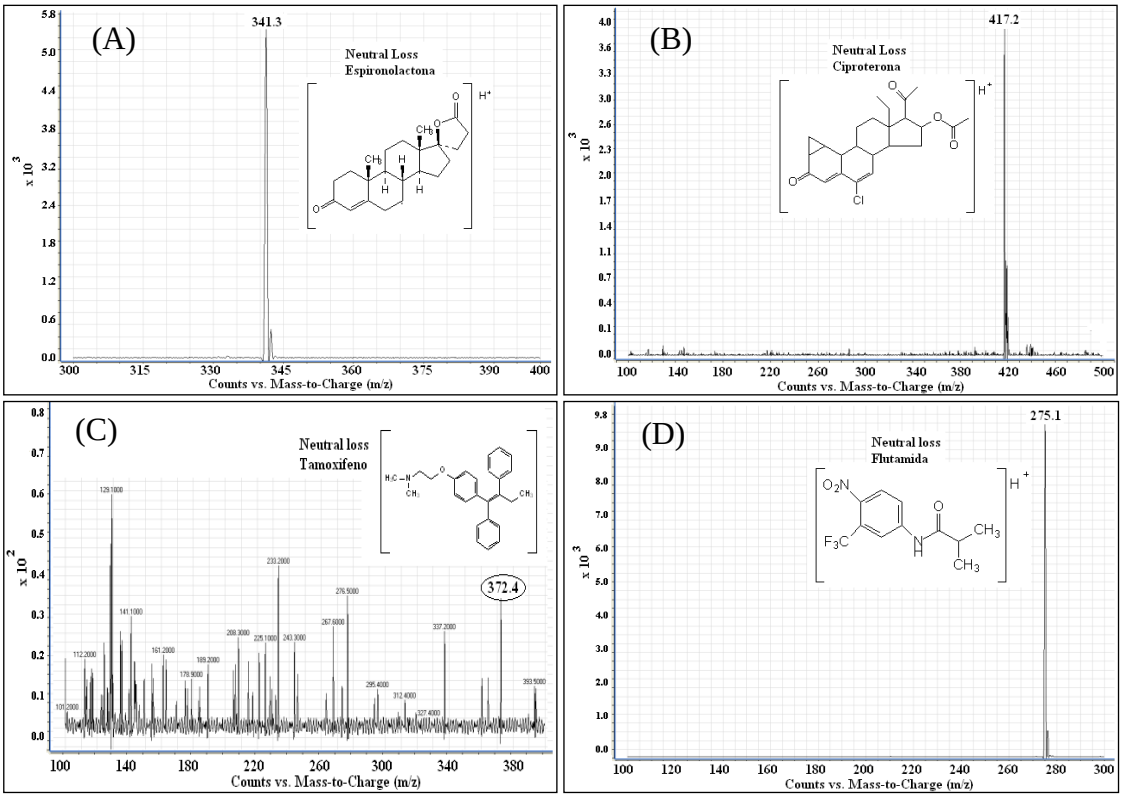


Figura 8 - Experimento de Neutral Loss pela injeção direta de padrões. (A) Espectro de massas de Espironolactona; (B) Espectro de massas de Ciproterona; (C) Espectro de massas de Tamoxifeno e (E) Espectro de massas de Flutamida.

Como podem ser observado nos espectros dos experimentos de Neutral Loss, todos os íons precursores foram identificados.

Após os experimentos descritos (Figuras 4, 5, 6, 7 e 8), as condições operacionais do espectrômetro de massas (íon precursor, íons de quantificação e qualificação, voltagem do fragmentador energia de colisão e *dwell time*) foram, então, otimizadas para cada analito separadamente, chegando-se às condições ideais descritas na tabela 2. Os analitos Espironolactona, Ciproterona, Tamoxifeno e seus metabolitos foram operados em modo positivo e, a Flutamida e seus metabólitos, em modo negativo de ionização na fonte electrospray. A otimização do espectrômetro de massas foi conduzida por injeção de solução-padrão nas concentrações descritas no item 4.3.1, em que as condições otimizadas para os segmentos de Scan no modo MRM (monitoramento múltiplo de reações) estão descritas na tabela 2.

Tabela 2 - Condições operacionais do espectrômetro de massas para os EFCTs.

Composto	Íon Precursor	Íon Produto	Dwell time	Fragmentador (V)	Energia de Colisão (V)	Polaridade
Espironolactona	341,0	107,0	200	90	10	Positiva
Flutamida	275,0	201,9	200	120	30	Negativa
Ciproterona	417,0	357,2	200	40	40	Positiva
Tamoxifeno	372,0	72,2	200	110	25	Positiva

Os autores BINKHORST et al. (2011) utilizaram, também, o fragmento *m/z* 72 como fragmento de maior intensidade na quantificação do Tamoxifeno em amostras de plasma humano. CHRISTIAENS et al. (2004) quantificaram acetato de Ciproterona em amostras de plasma humano e utilizaram como íon precursor *m/z* 417,4, encontrando como íon produto de maior intensidade para quantificação, *m/z* 357,4. BOGUSZ et al. (2006) determinaram Espironolactona em medicamentos fitoterápicos e fizeram a quantificação utilizando como íon precursor *m/z* 341,0, porém, como íon produto o fragmento de *m/z* 141,91 mostrou-se mais intenso. Flutamida foi detectado por GODA et al. (2006) em microssomos de fígado e urina humanos, utilizando o modo de monitoramento de íon selecionado, sendo que o íon *m/z* 275,0 foi selecionado em modo negativo de ionização $[M-H]^-$ e COLTON et al. (2011) determinaram Flutamida em urina de eqüinos utilizando como íon precursor *m/z* 275,0 e íon produto *m/z* 201,9, condição foi utilizada neste trabalho.

5.4.2 Estudos de fragmentação estrutural de EFCT no sistema LC-ESI(QqLIT)MS

Experimentos de IDA foram realizados para a identificação e estudo dos metabólitos e subprodutos dos PAOs aplicados à solução aquosa e ao efluente hospitalar. Para tal, a otimização do espectrômetro de massas foi feita com solução-padrão de cada um dos compostos EFCT, descritos no item 5.3.1, pag. 145. Iniciou-se a otimização com um experimento de Q1 MS Scan em que na varredura o sistema de triplo quadrupolo opera como um *single*, selecionando os íons em uma determinada faixa de *m/z*. Este experimento tem a função de identificar íons precursores e obter o melhor sinal, modificando os parâmetros

necessários (ARDREY, 2003). Na figura 9 se encontram os espectros do experimento Q1 MS Scan para os analitos EFCT.

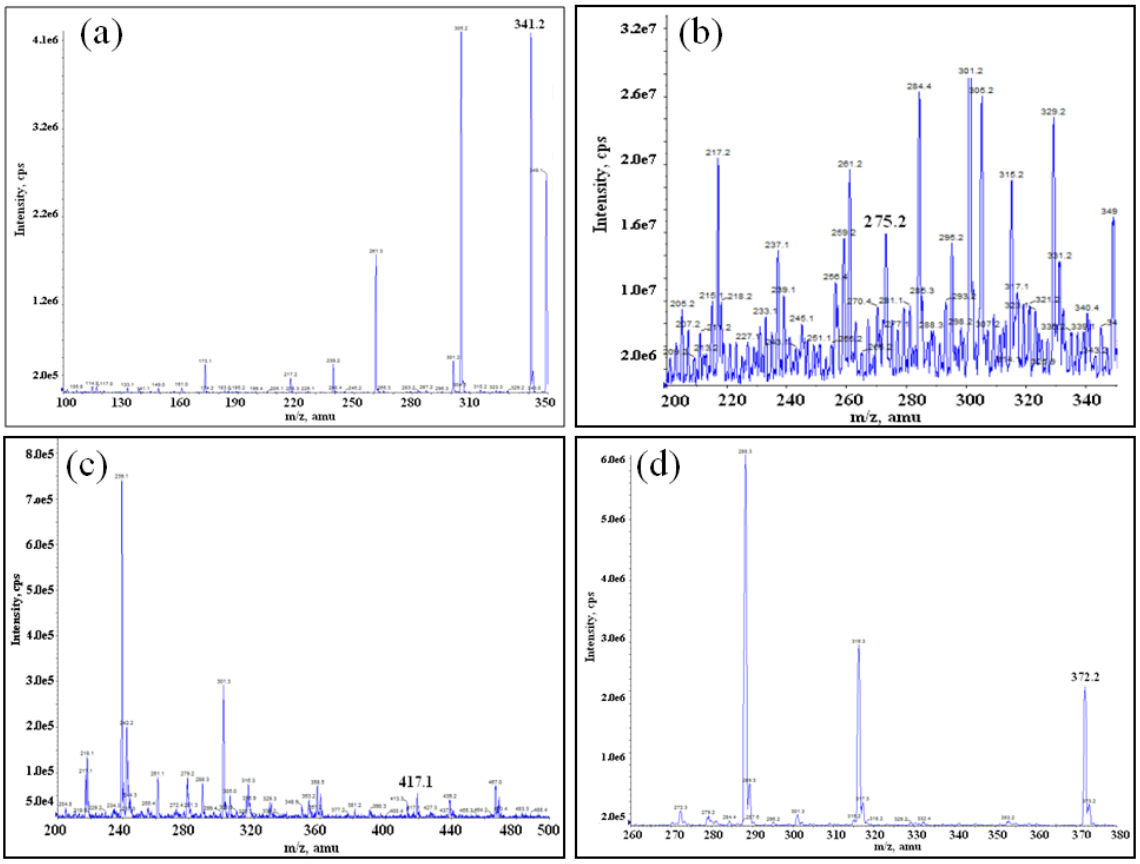


Figura 9 - Espectro de massas do experimento Q1 MS Scan. (a) Espironolactona; (b) Flutamida; (c) Ciproterona e (d) Tamoxifeno.

A faixa de massas de Scan fixada para Espironolactona foi de 100-350, isto é devido ao fato da Espironolactona sair da fonte de ionização sem o grupamento metil sulfóxido tendo sua *m/z* reduzida a 341.0 uma, operando em modo positivo de ionização $[M+H]^+$ (Figura 9 – a). Para a Flutamida, o experimento Q1MS Scan mostrou melhor intensidade de sinal no modo negativo de ionização de acordo com dados da literatura consultada (COLTON et al.., 2011; GODA et al., 2006) apresentando *m/z* 275.2 $[M-H]^-$. A faixa de massas fixada para varredura foi de 200-350 uma como pode ser observado na (Figura 9 – b). Como pose-se observar no espectro de massas Q1 MS (Figura 9 – c), a *m/z* 417.1 foi observada para Ciproterona em modo positivo de ionização $[M+H]^+$ como previamente descrito na literatura (LI, et al., 2009). O Tamoxifeno foi ionizado em modo positivo na fonte de ionização $[M+H]^+$

e a *m/z* 372.2 uma foi definida como sendo o íon precursor do Tamoxifeno (Figura 9 – d), como previamente relatado pelos autores (BINKHORST et al., 2011) onde os mesmos quantificaram Tamoxifeno e três de seus principais metabólitos em plasma humano.

Experimentos de IDA (Product Ion scan - EPI), íons produto foram feitos para estudo e perfil das fragmentações dos compostos EFCT. Neste modo os íons precursores são selecionados em Q1, fragmentados em Q2 e os produtos de fragmentação analisados em Q3, a fim de se obter informações estruturais da molécula.

Na figura 10, pode-se observar o espectro de íons produto da Espironolactona onde as estruturas foram propostas para os principais fragmentos formados.

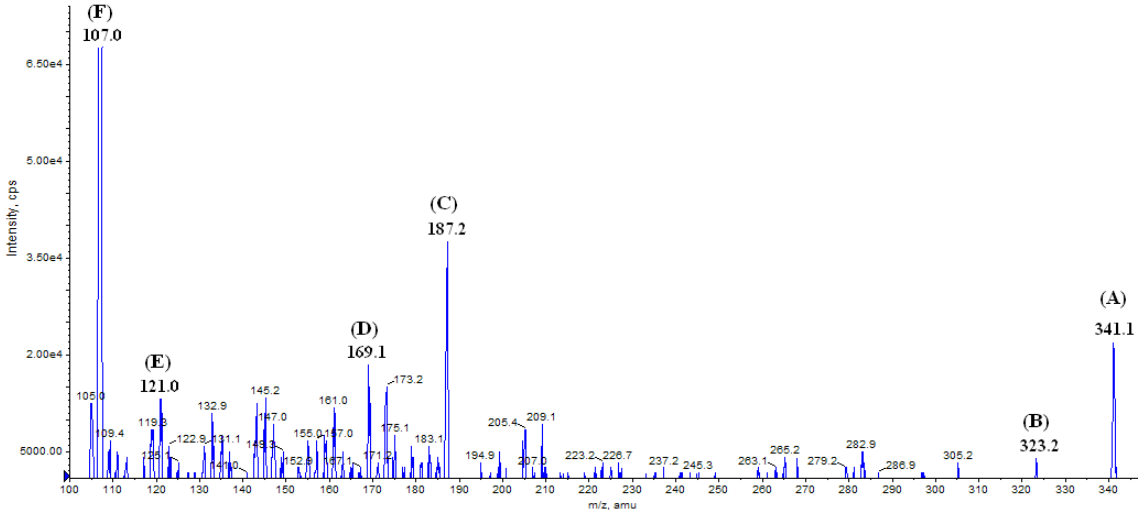


Figura 10 - Espectro de massas do experimento EPI para Espironolactona (solução padrão), com CE 33 V.

As estruturas moleculares propostas (Figura 11) para os fragmentos mais significativos estão expostas no espectro do experimento EPI para Espironolactona.

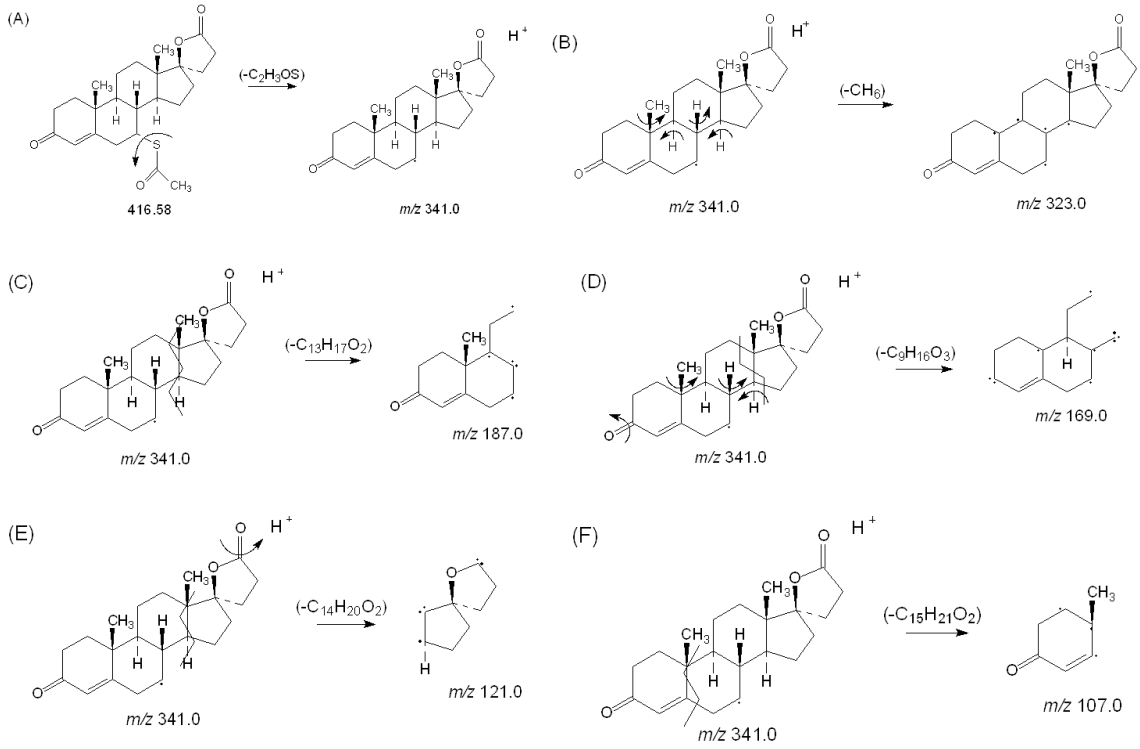


Figura 11 - (A) Estrutura resultante da Espironolactona perdendo seu grupamento metil sulfóxido (B, C, D, E e F); estruturas propostas para seus íons produtos.

Três energias de colisão foram testadas para este experimento, sendo que, a energia de colisão que proporcionou uma melhor fragmentação, bem como, uma maior intensidade dos fragmentos foi a CE 33 V. Como se pode observar na figura 11, o fragmento de maior intensidade foi *m/z* 107,0; a mesma transição MRM usada por SORA et al. (2010) para propósitos de quantificação de Espironolactona em amostras de plasma humano.

Flutamida também teve sua fragmentação estudada pelo experimento Scan de íon produto e o espectro de massas obtido pode ser observado na figura 12.

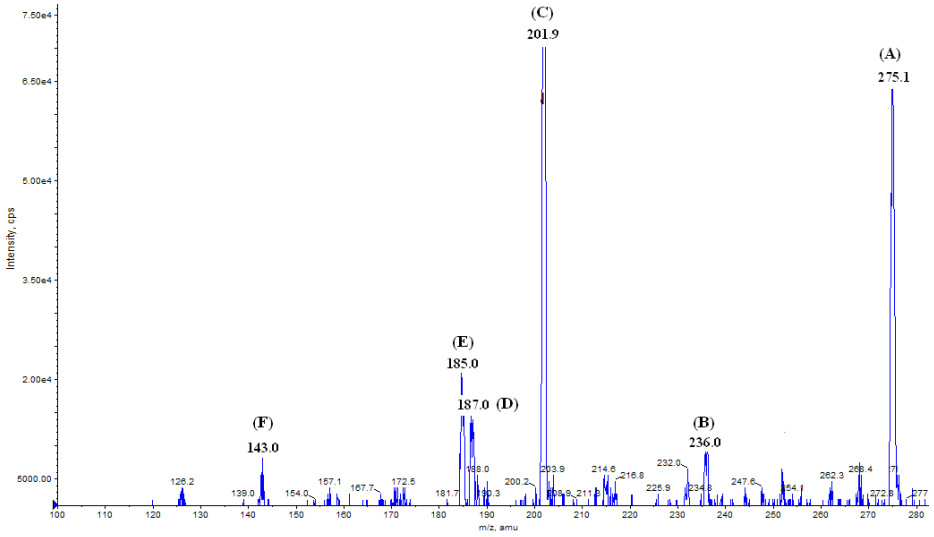


Figura 12 - Espectro de massas do experimento EPI para Flutamida.

A partir da estrutura da Flutamida, foram propostas as estruturas moleculares de seus íons produtos gerados pelo experimento EPI (Figura 13), considerando-se os fragmentos mais significativos expostos no espectro acima; para moléculas de Flutamida ionizadas em modo negativo.

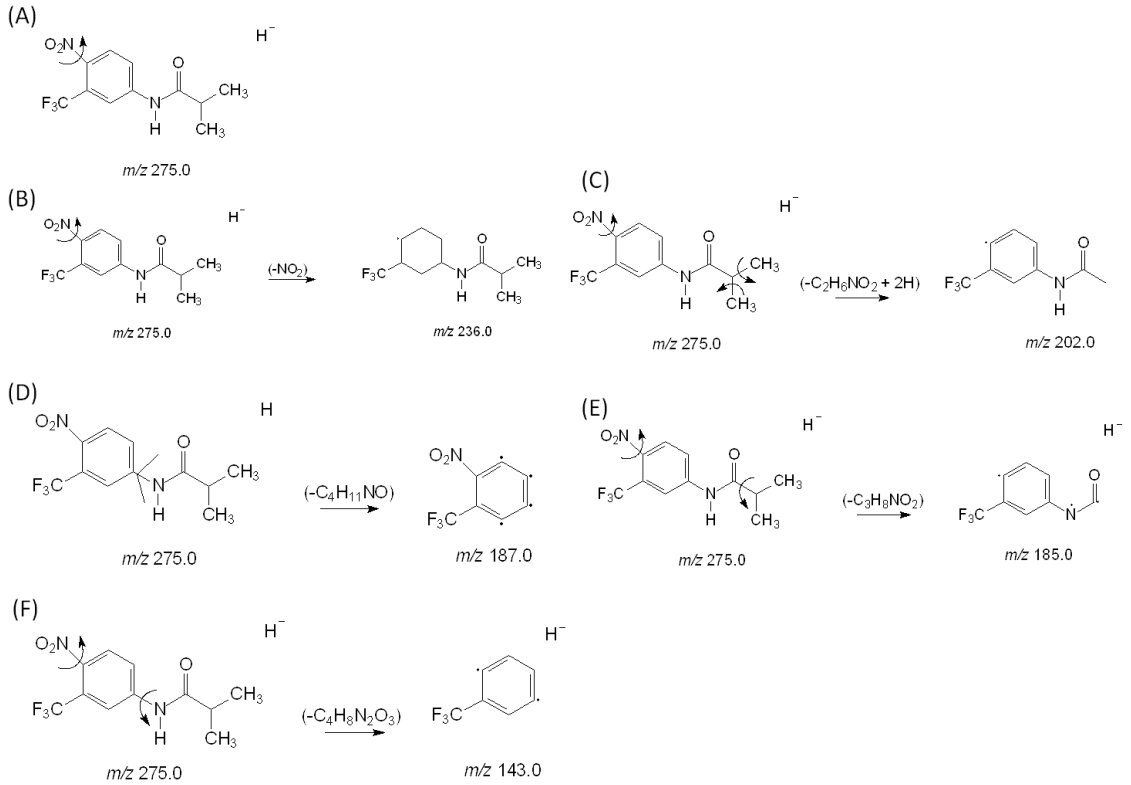


Figura 13 - (A) Estrutura da Flutamida (B, C, D, E e F): estruturas propostas para seus íons produtos.

Energias de colisão (-24, -34 e -54 V) foram testadas para Flutamida, sendo que a melhor fragmentação foi obtida com a CE de -34 V. O fragmento *m/z* 201.9 foi o fragmento de maior intensidade de sinal.

O experimento EPI feito para estudo da fragmentação da Ciproterona (em solução padrão) pode ser observado na figura 14.

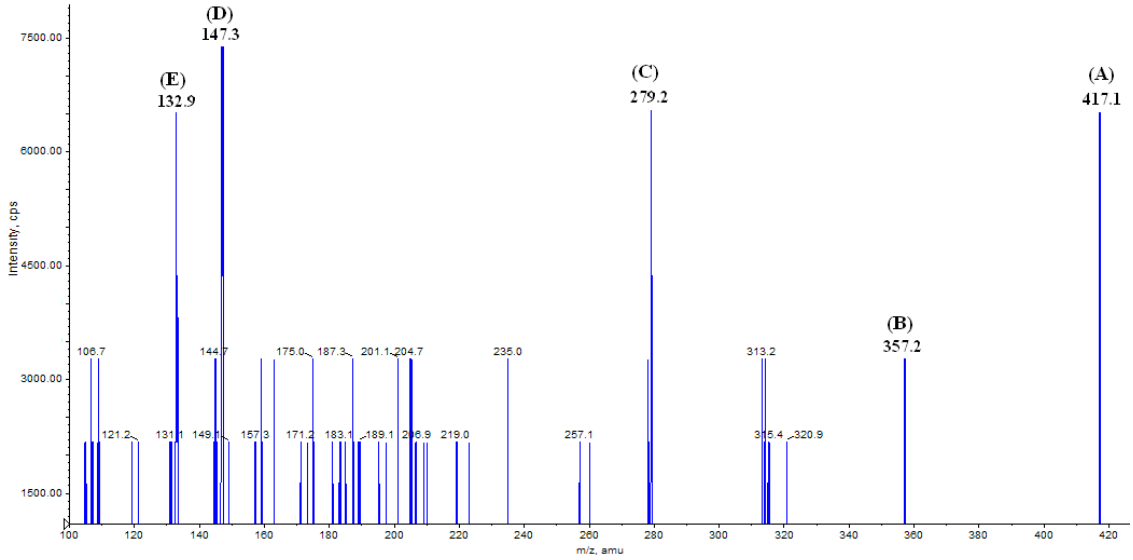


Figura 14 - Espectro de massas do experimento EPI para Ciproterona.

Partindo-se da estrutura da Ciproterona, estruturas moleculares para os íons produtos mais significativos, em termos de intensidade, gerados no espectro Scan de íon produto foram propostas (Figura 15).

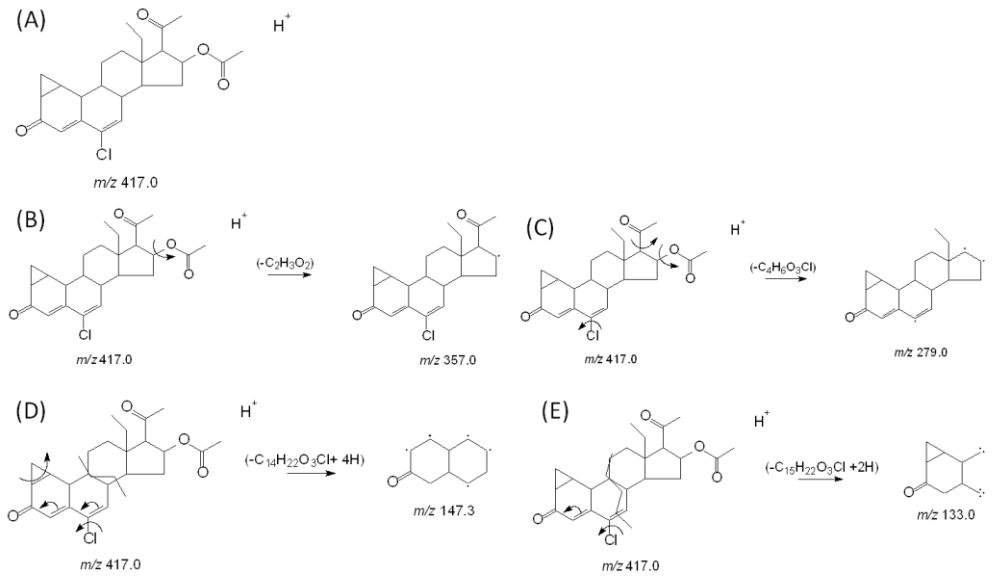


Figura 15 - (A) Estrutura da Ciproterona (B, C, D e E): estruturas propostas para seus íons produtos.

A melhor fragmentação para Ciproterona foi obtida com uma CE de 30 V; contudo, foram testadas CE de 20 e 50 V. O fragmento de maior intensidade obtido com a melhor CE foi 147,3; porém, o íon produto característico para Ciproterona é *m/z* 357.2 (SUN et al., 2009).

O espectro de massas (Figura 16) mostra o experimento EPI para solução padrão de Tamoxifeno.

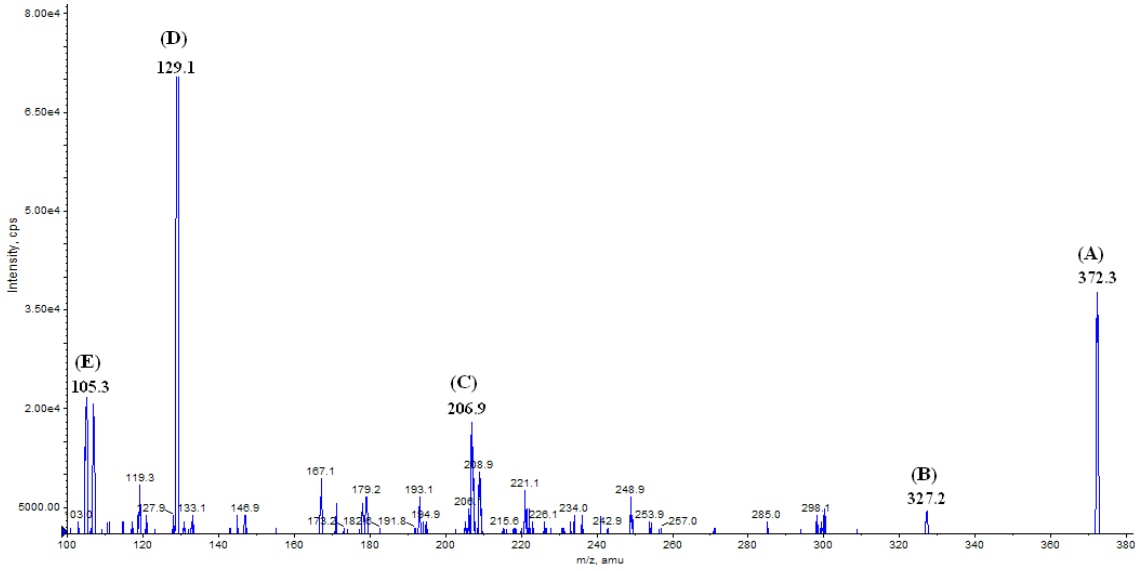


Figura 16 - Espectro de massas do experimento EPI para Tamoxifeno.

Considerando o espectro gerado no EPI para solução padrão de Tamoxifeno, estruturas moleculares foram propostas para os íons-produto partindo da estrutura do íon precursor (Figura 17).

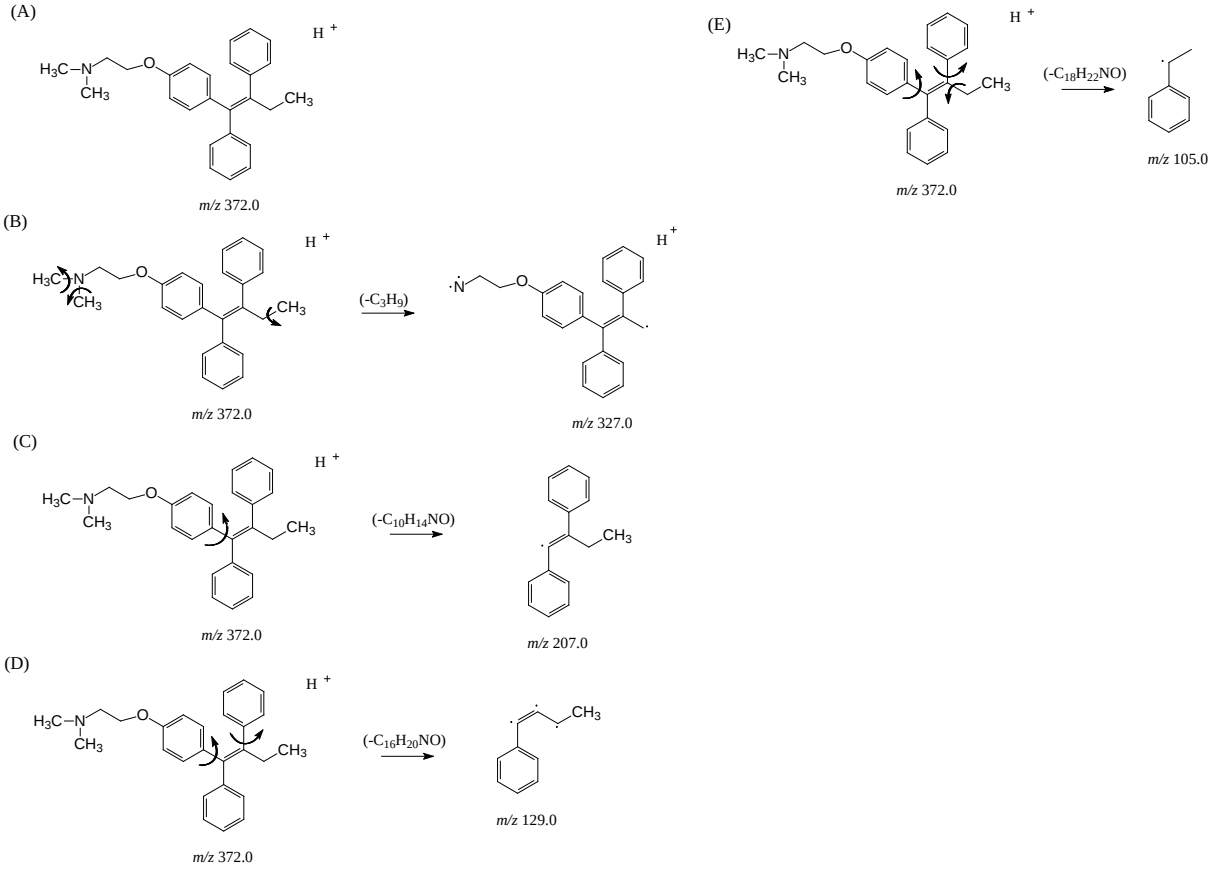


Figura 17 - (A) Estrutura do Tamoxifeno (B, C, D e E): estruturas propostas para seus íons produtos.

Para o Tamoxifeno, a CE que resultou em melhores fragmentos foi CE 35 V. O fragmento de maior intensidade observado foi *m/z* 129,1; a literatura (BINKHORST et al., 2011) relata como íon produto selecionado para quantificação o fragmento de *m/z* 72,0, porém, como a faixa de massas de varredura selecionada foi de 100 a 380 uma, o fragmento *m/z* 72,0 não pode ser observado neste espectro.

Experimentos IDA (Precursor Ion Scan - PI) foram feitos para identificar se o produto de fragmentação encontrado provém de um único ou mais precursores, confirmando a estrutura da molécula analisada.

Neste experimento, o espectro de *m/z* obtido fornece informações estruturais complementares para um determinado "íon filho". Neste modo, Q1 funciona em modo Scan para determinada faixa do íon precursor, fragmentando em Q2 (CE e gás de fragmentação CAD) e Q3 em modo MI (monitoramento de íon múltiplo), selecionando somente o íon produto de interesse.

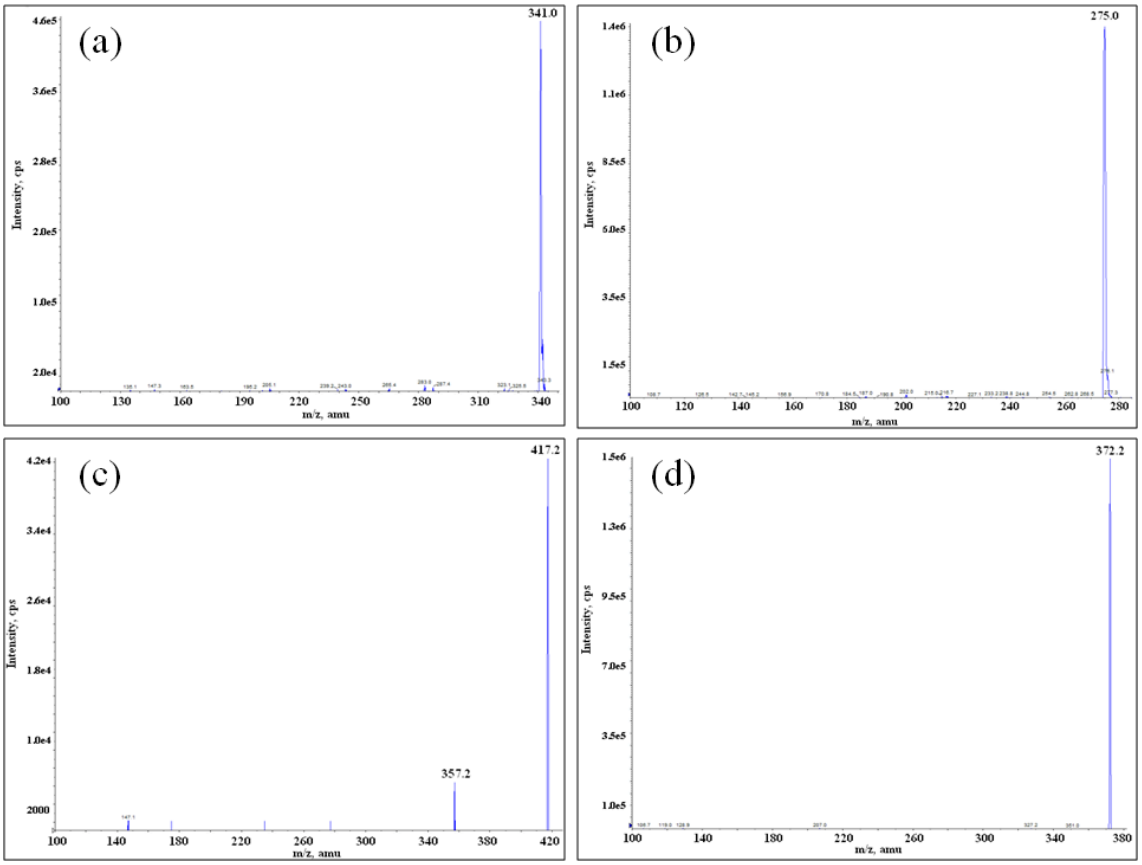


Figura 18 - Espectros de massas PI referente ao produto de fragmentação do composto Espironolactona *m/z* 107,0. (a) Espironolactona; (b) Flutamida; (c) Ciproterona e (d) Tamoxifeno.

Como se pode observar nos espectros do experimento íon precursor obteve-se a confirmação de que o íon m/z 341.0 é mesmo o precursor do íon produto m/z 107.0 no estudo da Espironolactona (Figura 18 – a). O íon produto fixado para Flutamida neste experimento foi o de maior intensidade obtido pelo experimento de EPI *m/z* 201,9, e obteve-se o íon precursor *m/z* 275,0, proveniente da molécula da Flutamida CE de -24, -34 e -54 V foram testadas, mas, uma energia de colisão mais alta gerou um íon precursor de maior intensidade (Figura 18 – b). Para Ciproterona o íon produto fixado para este experimento foi *m/z* 357,2 resultando no íon precursor *m/z* 417,0. O experimento foi feito testando 3 CE onde, a CE de 20 V proporcionou a maior intensidade de sinal para o íon precursor *m/z* 417,2 (Figura 18 – c). O íon produto fixado para o Tamoxifeno foi *m/z* 129,1 e o íon precursor *m/z* 372.2 foi obtido como sendo da molécula de Tamoxifeno. As CE foram testadas (20, 35 e 53 V) e a CE de 20 V proporcionou a maior intensidade de sinal para o íon precursor (Figura 18 – d).

Na seqüência dos experimentos de IDA no (QqLIT)MS foram realizados experimentos de Neutral Loss (NL). Este experimento consiste na seleção de um fragmento neutro ou perda neutra e detecção de todos os fragmentos, que estão relacionados com seus respectivos precursores, proporcionando a perda neutra específica. Q1 e Q3 funcionam em modo Scan, onde a diferença de varredura de faixa de massa entre Q1 e Q3 é igual à perda neutra.

Na figura 19, encontram-se o espectro de massas do experimento NL para EFCT.

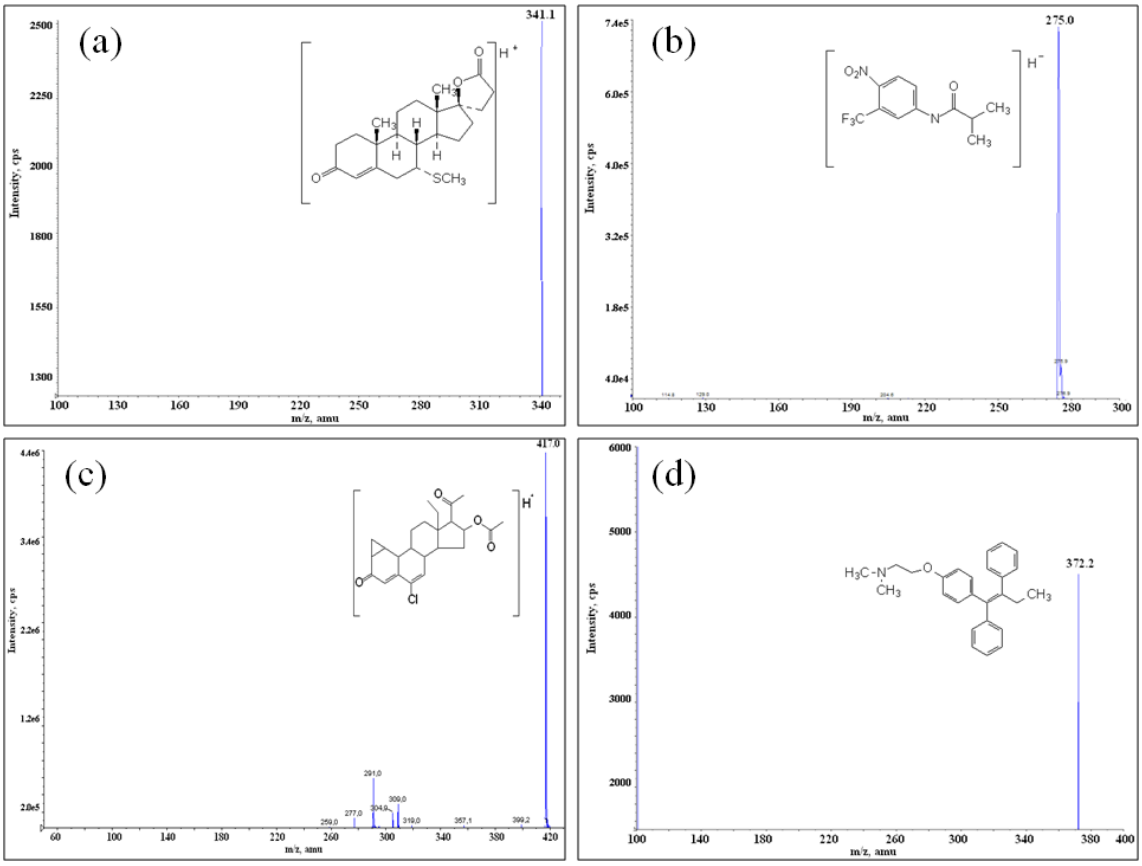


Figura 19 - Espectro de massas NL. (a) Espironolactona *m/z* 76.0 (341.0 – 265.0 = 76.0); (b) Flutamida *m/z* 73.1 (275.0 – 201.9 = 73.1); (c) Ciproterona *m/z* 60.0 (417.0 – 357.0 = 60.0); (d) Tamoxifeno *m/z* 45.0 (372.2 – 327.2 = 45.0).

Como pode-se observar no espectro de massas do modo NL para Espironolactona, fixando uma perda neutra de *m/z* 76,0, resultado da subtração do íon precursor *m/z* 341,0 com o íon produto *m/z* 265,0, o íon precursor *m/z* 341,0 proveniente da molécula de Espironolactona foi obtido. Uma CE de 33 V foi aplicada e resultou na maior intensidade de sinal do íon precursor (Figura 19 - a). No espectro acima (Figura 19 - b) encontra-se o íon

precursor da Flutamida *m/z* 275,0 uma, obtido através do experimento de NL pela perda neutra de *m/z* 73,0 obtida subtraindo o íon precursor *m/z* 275,0 do íon produto *m/z* 201,9 fragmento este de maior intensidade obtido nos experimentos de IDA. A CE que resultou em uma maior intensidade de sinal neste experimento foi 34 V. Para Ciproterona uma CE de 30 V foi utilizada para o experimento de NL onde, o precursor íon *m/z* 417,0 foi obtido fixando uma perda de massa neutra de *m/z* 60 referente à subtração do íon precursor *m/z* 417,0 do íon produto *m/z* 357,0 (Figura 19 - c). No experimento NL feito para o Tamoxifeno uma CE de 30 V foi utilizada e a perda neutra aplicada foi de *m/z* 45,0 onde o precursor íon *m/z* 372.2 foi obtido devido a subtração do precursor *m/z* 372,2 do íon produto *m/z* 327,2 (Figura 19 - d).

5.4.3 Identificação de EFCT em amostras de efluente hospitalar e estudos de fragmentação estrutural.

Nos espectros de massas do experimento IDA EMS + EPI com 3 energias de fragmentação 10, 25 e 50 V, pode-se observar o comportamento da fragmentação da Espironolactona em amostra de efluente PA-HUSM (Figura 20 - a), sendo que, nesta amostra o composto foi encontrado em 8,8 min e, em efluente geral-HUSM (Figura 20 - b), no tempo de 7,9 min de corrida cromatográfica TIC.

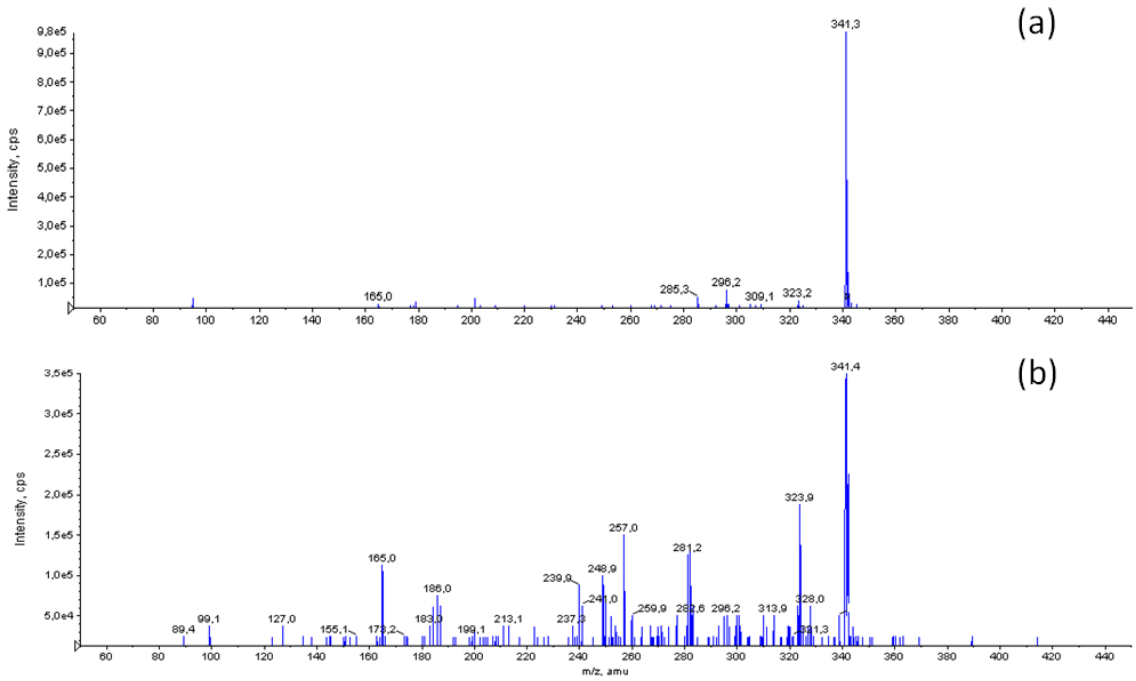


Figura 20 - Espectros de massas da Espironolactona *m/z* 341.0. Experimento EMS + EPI. (a) PA-HUSM; (b) geral-HUSM.

Observando os espectros de massas do experimento EMS + EPI das duas amostras, pode-se ver que a fragmentação do íon precursor foi diferente, sendo que o único fragmento que foi identificado nas duas amostras foi *m/z* 165,0. Da mesma forma, no experimento precursor íon Scan em solução padrão a fragmentação ocorreu de forma diferente correlacionando os experimentos EMS + EPI das amostras, exceto, no caso do fragmento *m/z* 323,0 que apresentou-se tanto no experimento de PI quanto nos experimentos EPI para amostra de efluente PA-HUSM.

A partir dos espectros de massas do experimento EMS + EPI das amostras de efluente hospitalar, levando em consideração os fragmentos mais intensos obtidos, uma rota de fragmentação para a Espironolactona foi proposta (Figura 21).

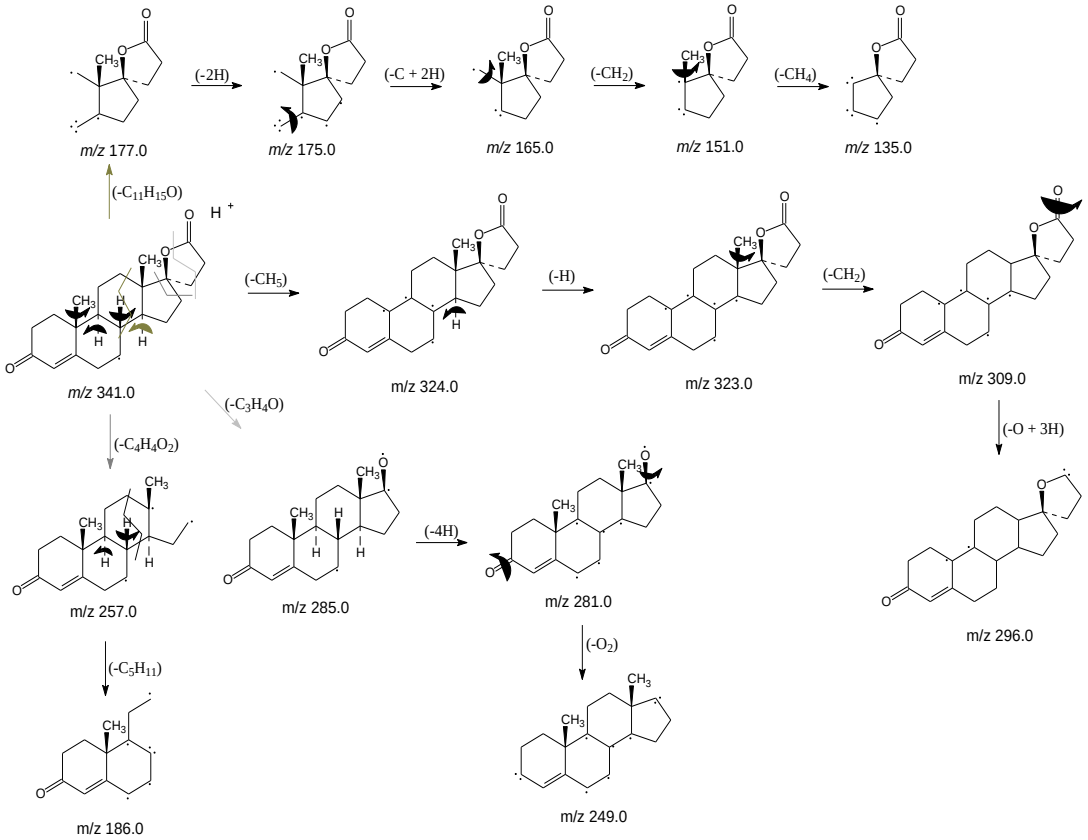


Figura 21 - Estudo de fragmentação da Espironolactona baseado nos espectros de massas EPI das amostras de efluente hospitalar.

O Caminho de fragmentação da Espironolactona baseado nos íons dos espectros das amostras de efluente hospitalar inicia-se pela fragmentação do íon pai *m/z* 341,0, este íon precursor libera uma metila e mais 3 hidrogênios de sua molécula formando o íon produto *m/z* 324,0 que, libera um hidrogênio e forma o fragmento *m/z* 323,0, este, por sua vez, com a saída de um CH_2 de sua estrutura molecular forma o íon produto *m/z* 309,0 que, da mesma forma, liberando um oxigênio que encontrava-se duplamente ligado a furanona forma o fragmento *m/z* 296,0. Também partindo do íon precursor tem-se o íon produto *m/z* 285,0 pela abertura da furanona e saída de C_3H_4O da estrutura molecular do íon precursor. A partir deste fragmento formado *m/z* 285,0 tem-se a formação do fragmento *m/z* 281,0 pela perda de 4 hidrogênios da molécula, este fragmento, perde seus dois oxigênios e formam o íon produto *m/z* 249,0. O íon produto *m/z* 257,0 forma-se pela perda da furanona do íon precursor e, então, pela ruptura do anel e saída de C_5H_{11} tem-se o íon produto *m/z* 186,0. Os fragmentos de menores massas também são formados a partir do íon precursor iniciando com o fragmento *m/z* 177,0 formado

pelo rompimento do anel e saída de $C_{11}H_{15}O$, este libera 2 hidrogênios e forma o fragmento *m/z* 175,0 que perde um carbono e forma o fragmento *m/z* 165,0 este, libera um CH_2 e forma o fragmento *m/z* 151,0 que pela saída da metila e de mais um hidrogênio da estrutura forma o último fragmento *m/z* 135,0.

Para estudo do comportamento estrutural da Flutamida em amostras de efluente hospitalar, experimentos de IDA -EMS + (-EPI) com 3 energias de colisão diferentes -24, -34 e -54 V foram realizados. Em amostra de efluente PA-HUSM a Flutamida foi identificada em 3,35 min e em amostra de efluente geral-HUSM em 3,50 min de corrida cromatográfica TIC. Os espectros adquiridos podem ser observados na figura 22.

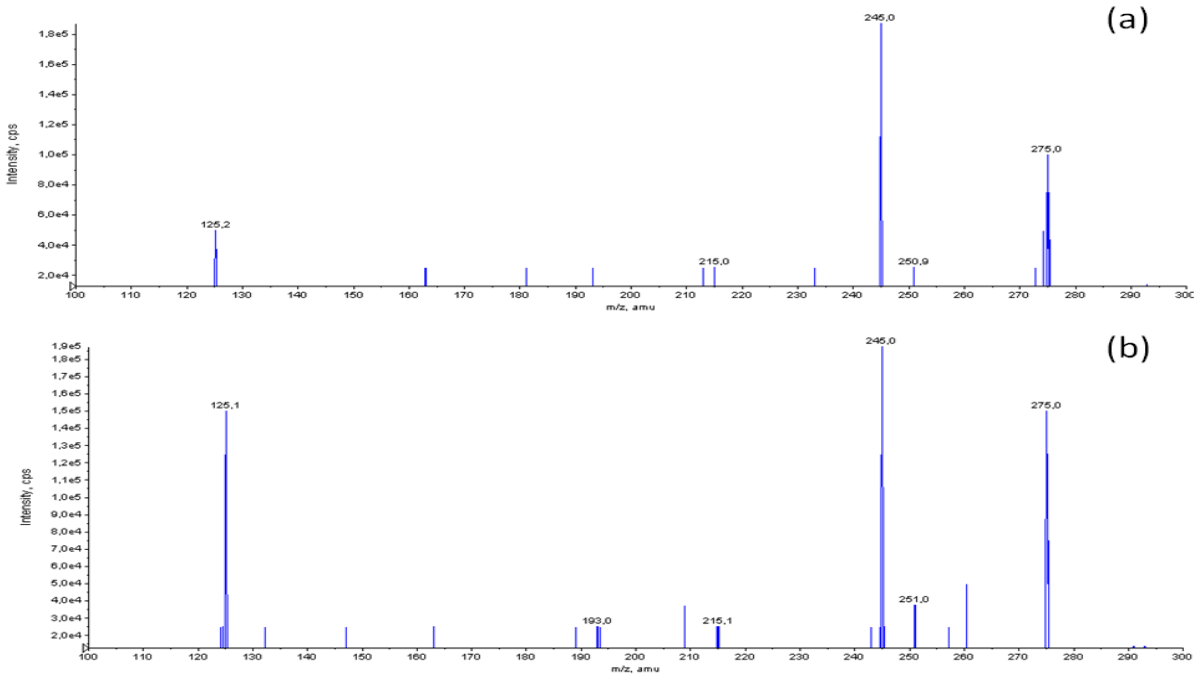


Figura 22 - Espectro de massas da Flutamida *m/z* 275.0. Experimento -EMS + (-EPI). (a) PA-HUSM; (b) geral-HUSM.

Praticamente a mesma fragmentação, ou seja, os mesmos íons produtos foram observados para as duas amostras (PA-HUSM e geral-HUSM), com CE -24 V, exceto o íon produto *m/z* 193,0 foi observado apenas na amostra de efluente geral-HUSM. Utilizando CE de -34 V no experimento-EPI uma menor fragmentação foi observada, porém, os únicos fragmentos que diferenciaram dos outros espectros foram *m/z* 209,0 e 183,0. Comparando os espectros dos experimentos EPI (solução padrão de Flutamida) e os experimentos -EMS + (-

EPI), nenhuma semelhança na fragmentação estrutural foi observada, isto deve-se, talvez, pela diferença entre os experimentos e também, as condições do analito em meio a complexidade da matriz. A partir dos fragmentos adquiridos e dispostos nos espectros de efluente PA-HUSM (Figura A) e geral-HUSM (Figura B), um Caminho de fragmentação foi proposto para Flutamida (Figura 23).

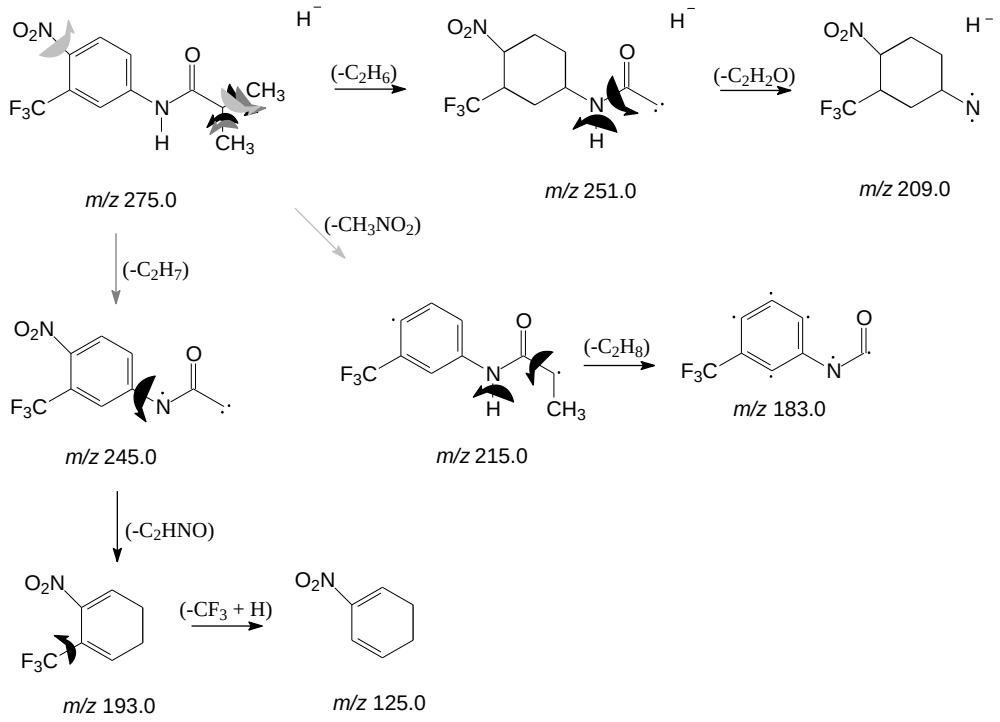


Figura 23 - Estudo da fragmentação da Flutamida baseado nos espectros de massas das amostras de efluente hospitalar.

O Caminho de fragmentação da Flutamida em amostras de efluente hospitalar tem início com a saída dos dois grupamentos metila e abertura das duplas ligações do anel benzênico proveniente do íon precursor *m/z* 275,0 dando origem ao íon produto *m/z* 251,0, que, por sua vez, perde a carbonila e mais dois hidrogênios de sua molécula e forma o fragmento *m/z* 209. Partindo do íon precursor tem-se a formação do fragmento *m/z* 245,0 pela saída dos dois grupamentos metila e mais um hidrogênio e, a partir deste fragmento tem-se a formação do fragmento *m/z* 193,0, com a saída da carboxila, do nitrogênio e abertura de uma das duplas ligações do anel benzênico. Partindo do fragmento *m/z* 193,0 tem-se a formação do fragmento de menor massa observado nos espectros sendo este *m/z* 125,0 formado pela saída do grupamento trifluorometil. O íon produto *m/z* 215,0 forma-se a partir da saída de um

grupamento metila e do dióxido de nitrogênio do íon precursor, este, dá origem ao fragmento de *m/z* 183,0 pela perda de 2 carbonos e 8 hidrogênios da molécula.

O comportamento da fragmentação da Ciproterona foi estudado em amostras de efluente por meio de experimentos IDA EMS + EPI com 3 energias de fragmentação 10, 25 e 50 V. Ciproterona foi encontrada apenas em efluente geral-HUSM em 11,36 mim de corrida cromatográfica TIC. O espectro de massas da Ciproterona encontra-se na (Figura 24).

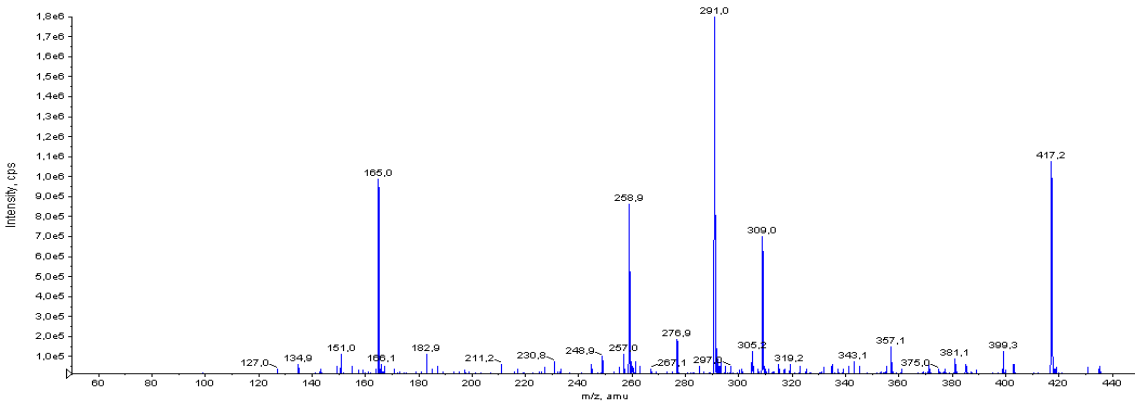


Figura 24 - Espectros de massas da Ciproterona *m/z* 417,0. Experimento EMS + EPI, amostra efluente geral-HUSM.

Fragmentos com maiores intensidades de sinal foram obtidos no experimento EPI com CE de 25 V. Comparando o espectro de massas obtido pelo experimento EPI com uma CE de 30 V e os experimentos EPI com CE 10, 25 e 50 V, observou-se que o íon produto mais significativo para Ciproterona *m/z* 357,0 foi encontrado em ambos os experimentos, o que, nos deixa seguro quanto a real procedência do composto em amostra de efluente hospitalar geral-HUSM. Um Caminho de fragmentação foi proposto para Ciproterona considerando os fragmentos mais intensos e mais significativos para este composto (Figura 25).

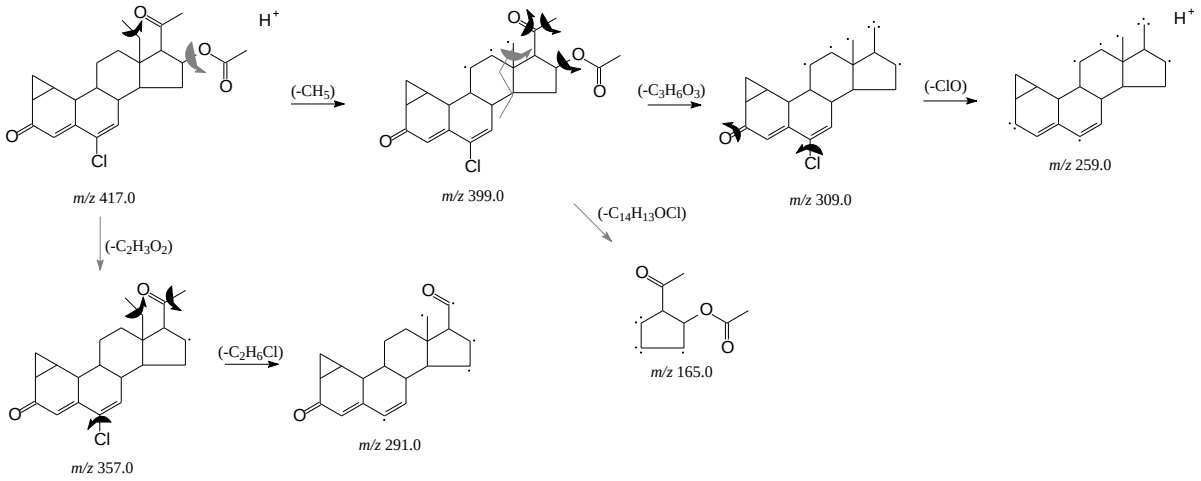


Figura 25 - Estudo da fragmentação da Ciproterona baseado nos espectros de massas da amostra de efluente hospitalar geral-HUSM.

A rota de fragmentação proposta para Ciproterona em amostra de efluente geral-HUSM tem início com a saída de uma metila e mais dois hidrogênios da molécula do íon precursor *m/z* 417,0 e formação do íon produto *m/z* 399,0 este, por sua vez, perde o grupamento acetato, uma metila e um oxigênio e forma o fragmento *m/z* 309,0 que, perde o cloro e o oxigênio da molécula formando o fragmento *m/z* 259,0. Também a partir do íon precursor tem-se a formação do íon produto de maior significância estrutural para Ciproterona *m/z* 357,0 pela perda do grupamento acetato. Pela saída do cloro e de duas metilas deste íon produto forma-se o fragmento *m/z* 291,0. O último fragmento com intensidade significativa observada nas 3 energias de colisão *m/z* 165,0 forma-se a partir do íon precursor pela ruptura da molécula.

Por meio de experimentos IDA EMS + EPI com 3 energias de fragmentação 10, 25 e 50 V, o comportamento da fragmentação do Tamoxifeno foi estudado em amostras de efluente. Tamoxifeno foi encontrado apenas em amostra de efluente PA-HUSM em 5,2 mim de corrida cromatográfica TIC. O espectro de massas adquirido encontra-se na Figura 26.

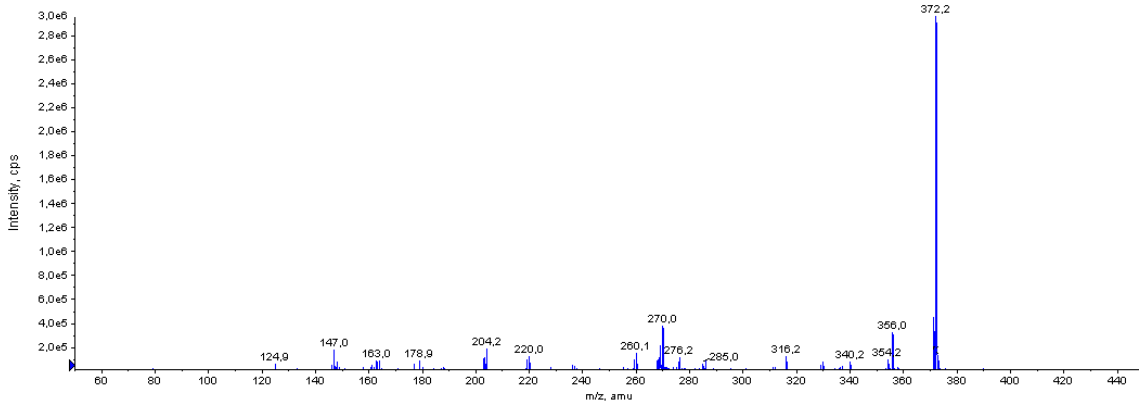


Figura 26 - Espectros de massas do Tamoxifeno *m/z* 372.0. Experimento EMS + EPI, amostra efluente PA-HUSM.

O espectro de massas do Tamoxifeno acima descrito foi obtido com uma CE de 25 V onde, uma fragmentação mais significativa foi observada. Partindo dos espectros de massas das 3 energias de fragmentação estudadas para Tamoxifeno na amostra de efluente PA-HUSM um Caminho de fragmentação estrutural foi proposto (Figura 27) considerando os fragmentos que apresentaram maior intensidade e representatividade nos espectros.

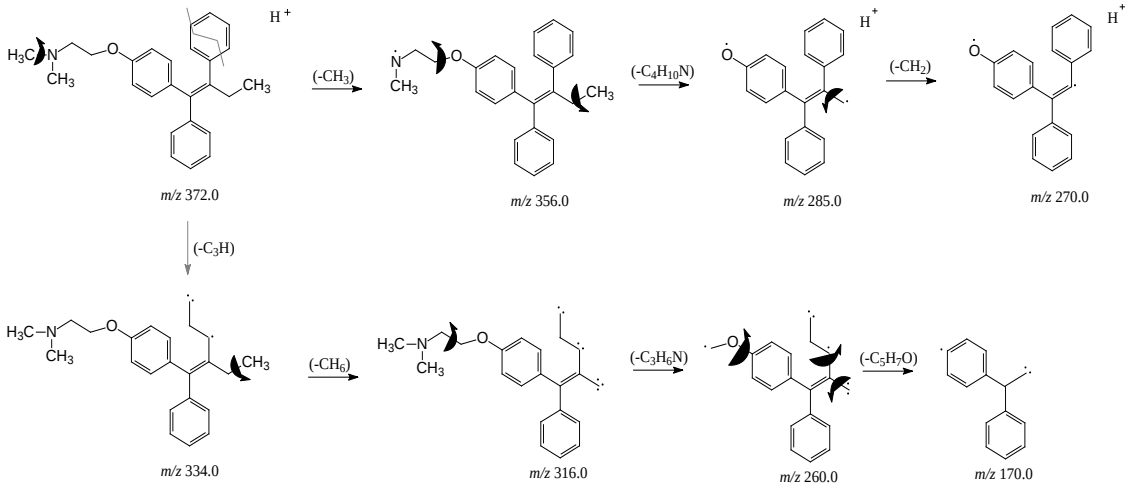


Figura 27 - Estudo da fragmentação do Tamoxifeno baseado nos espectros de massas da amostra de efluente hospitalar PA-HUSM.

O Caminho de fragmentação para o Tamoxifeno inicia-se com a saída de uma metila do íon precursor *m/z* 372,0 e posterior formação do íon produto *m/z* 356,0, este, por sua vez, perde o grupamento C_3H_7N e mais uma metila formando o fragmento *m/z* 285,0, que, libera um CH_2 e forma o fragmento *m/z* 270,0. Também Partindo do íon precursor, tem-se o íon produto *m/z* 334,0 formado pela ruptura do anel benzênico da estrutura do Tamoxifeno, este fragmento libera uma metila e perde mais 3 hidrogênios formando o fragmento *m/z* 316,0, que, perde o grupamento propilamina e forma o fragmento *m/z* 260,0, este, seguindo a fragmentação do anel e liberando o CH_2O que encontrava-se ligado a um dos anéis benzênicos forma o fragmento *m/z* 170,0, os fragmentos *m/z* 147,0, 119,0 e 105,0, estes, de menores massas observados nos espectros são formados pela seqüência de rupturas dos anéis benzênicos remanescentes da estrutura do íon precursor.

5.4.4 Identificação dos metabólitos dos compostos EFCT em efluente hospitalar

Os metabólitos EFCT foram identificados nas amostras de efluente hospitalar do PA-HUSM bem como, do efluente geral-HUSM, e foram estudadas por meio de experimentos IDA como previamente descrito.

Os metabólitos da Espironolactona identificados e estudados nas amostras de efluente PA-HUSM e geral-HUSM foram 7-α-tiometil-Espironolactona, canrenoato de potássio e 6-β-hidroxi-7-α-tiometil-Espironolactona, seus espectros de massas foram estudados em modo EPI com 3 diferentes energias de colisão 10, 25 e 50 V e, posteriormente, uma rota de fragmentação foi proposta para este metabólito.

O metabólito da Espironolactona 7-α-tiometil-Espironolactona *m/z* 389,0 foi encontrado na amostra do efluente PA-HUSM e também do efluente geral-HUSM por meio do experimento IDA EMS com EPI em 3 diferentes energias de colisão CE 10, 25 e 50 V. Os espectros de massas abaixo (Figura 28) são do experimento EMS com EPI utilizando energia de colisão de 25 V na qual, melhor fragmentação do íon precursor foi observada.

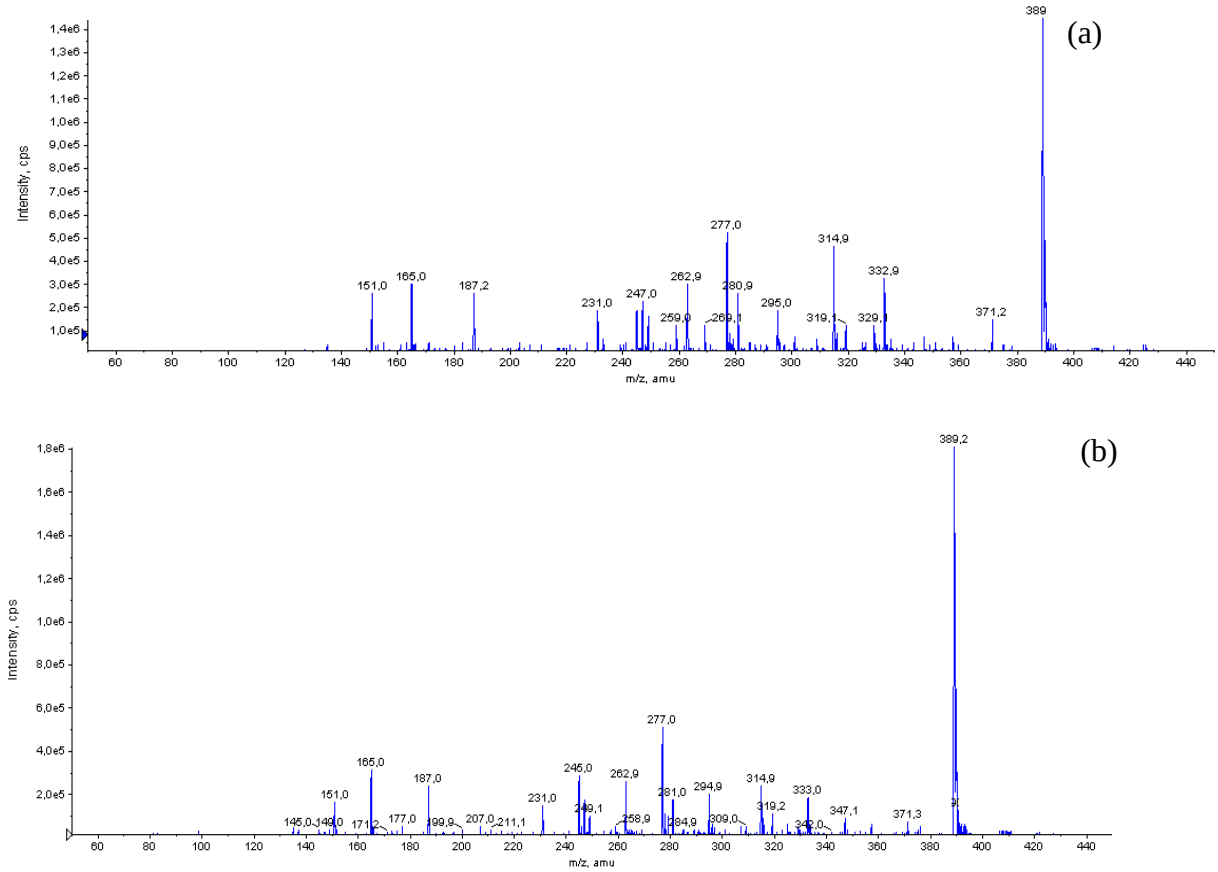


Figura 28 - Espectro de massas do metabólito 7-α-tiometil-Espironolactona *m/z* 389.0. Experimento EMS + EPI. (a) Amostra efluente PA-HUSM. (b) Amostra efluente geral-HUSM.

Como pode-se observar nos espectros (Figuras 28-a e 28-b) os fragmentos obtidos com esta energia de colisão de 25 V para as duas amostras foram os mesmos, o que nos comprova ser o mesmo composto proposto como sendo o metabólito 7-α-tiometil-Espironolactona. Com esta energia de colisão os fragmentos que apresentaram maior intensidade nas duas amostras investigadas foram íon precursor *m/z* 389,0 e íons produto *m/z* 371,3; 333,0; 324,9; 295,0; 277,0; 263,0; 231,0; 187,0; 165,0; 151,0.

A partir dos espectros adquiridos para as duas amostras de efluente PA-HUSM e geral-HUSM uma rota de fragmentação foi proposta para este metabólito 7-α-tiometil-Espironolactona e pode ser observada na figura 29.

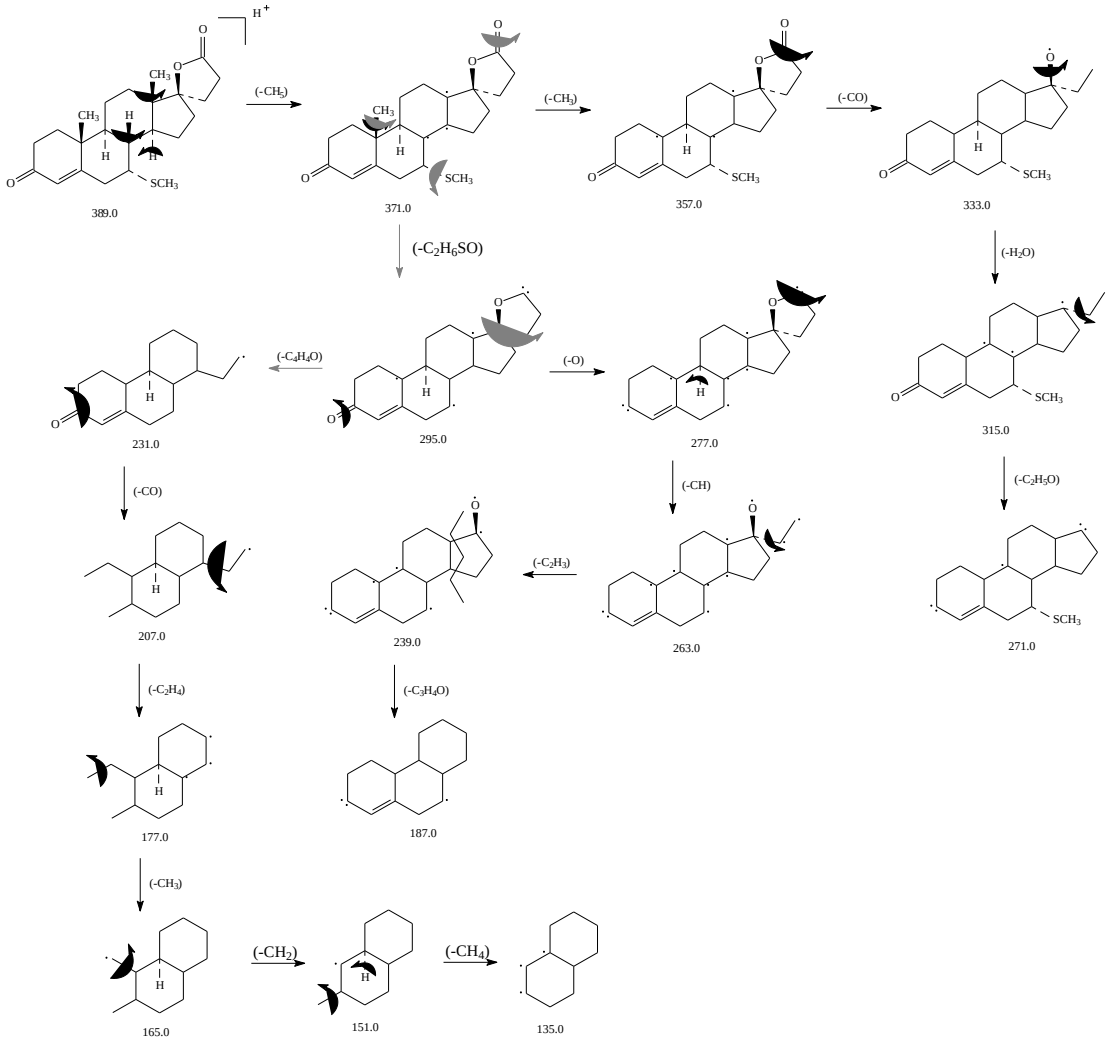


Figura 29 - Caminho de fragmentação para o metabólito 7-α-tiometil-Espironolactona.

A rota de fragmentação do metabólito 7-α-tiometil-Espironolactona inicia-se pela fragmentação do íon precursor *m/z* 389,0 através da saída de uma metila e dois hidrogênios da estrutura molecular formando o íon produto *m/z* 371,0 seguindo-se da perda do grupamento sulfeto de metila, uma metila e um oxigênio da estrutura deste tem-se o fragmento *m/z* 357,0. Com a ruptura do anel furano e saída do oxido de carbono deste fragmento forma-se o íon produto *m/z* 333,0 este, por sua vez, libera uma molécula de água e forma o fragmento *m/z* 315,0. Partindo da saída do sulfeto de metila, de um grupamento metila e de um oxigênio da molécula do fragmento de *m/z* 371,0 tem-se o íon produto de *m/z* 295,0 que com a perda do oxigênio de sua estrutura forma o fragmento *m/z* 277,0 este perde um carbono com a abertura do furano e um hidrogênio é retirado da molécula formando o íon produto *m/z* 263,0 que perde C_2H_3 do anel que sofreu rompimento e a partir daí forma o fragmento *m/z* 239,0. O íon

produto *m/z* 231 é formado pela saída do anel furano da estrutura do fragmento *m/z* 295,0 e então, o oxido de carbono é retirado da estrutura do anel aromático e tem-se o fragmento *m/z* 207,0. O fragmento seguinte seguindo a ordem de unidade de massa atômica é o fragmento *m/z* 187,0 que constitui de três anéis aromáticos remanescentes da estrutura do íon produto *m/z* 239,0. O fragmento *m/z* 177,0 forma-se a partir da saída de C_2H_4 do íon produto *m/z* 207,0 e, então, com a saída de uma metila tem-se o fragmento *m/z* 165,0 e, posteriormente, com a saída de CH_2 forma-se o fragmento *m/z* 151,0 e o último fragmento observado é *m/z* 135,0 formado por dois anéis aromáticos remanescentes.

O metabólito canrenoato de potássio foi obtido com o experimento IDA PI, sendo o íon produto fixado *m/z* 107,0 para identificar o íon precursor *m/z* 397.0. Na figura 30 encontra-se o espectro de massas do experimento Precursor Íon (107,0). Canrenoato de potássio foi identificado em 7,6 min de corrida cromatográfica TIC em amostra de efluente geral-HUSM.

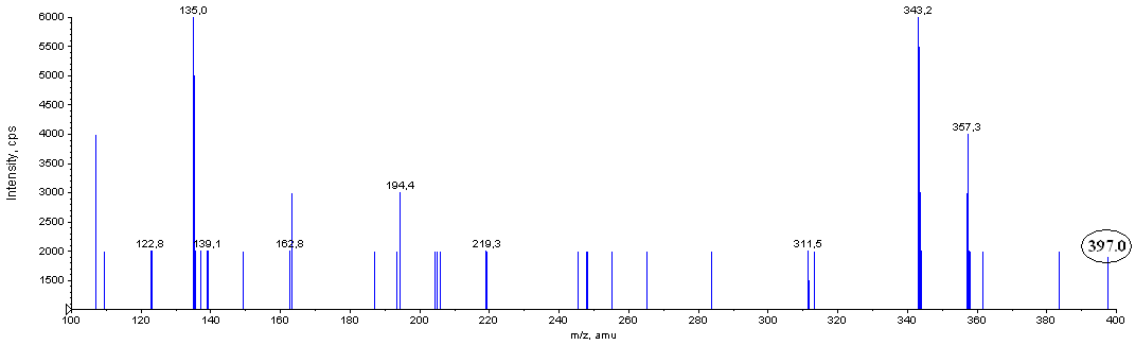


Figura 30 - Espectro de massas do metabólito canrenoato de potássio *m/z* 397.0. Experimento PI (107.0). Amostra efluente PA-HUSM.

Este experimento onde o íon produto de maior intensidade obtido nos experimentos de otimização para Espironolactona neste caso o fragmento *m/z* 107,0 foi fixado e, como pode-se observar no espectro PI (107,0) na figura 30, o íon precursor *m/z* 397,0 foi identificado na amostra PA-HUSM.

O metabólito da Espironolactona, canrenoato de potássio *m/z* 397,0, também foi identificado pelo experimento IDA EMS com EPI em 3 diferentes energias de colisão CE 10, 25 e 50 V e foi encontrado no efluente PA-HUSM em 9,8 min por cromatograma TIC. O espectro de massas (Figura 31) foi adquirido pelo experimento EMS com EPI utilizando energia de colisão de 25 V na qual, melhor fragmentação do íon precursor foi observada.

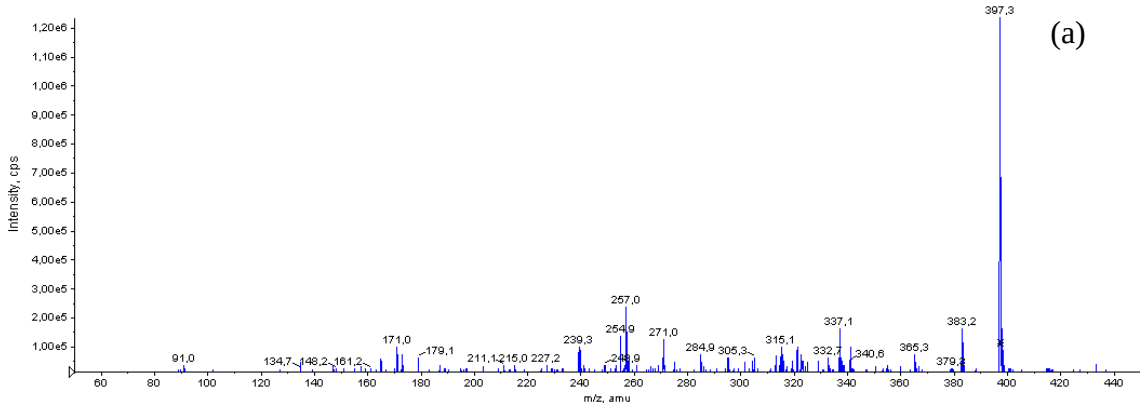


Figura 31 - Espectro de massas do metabólito canrenoato de potássio *m/z* 397.0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V. (a) Amostra efluente PA-HUSM.

No experimento EPI os íons produtos com maior intensidade obtidos foram *m/z* 383,0; 379,0; 365,0; 355,0; 337,0; 315,0; 295,0; 284,9; 271,0; 257,0; 254,9; 239,0; 171,0 e 165,0.

A partir dos fragmentos mais intensos dos espectros de massas obtidos pelo experimento PI (107.0) e EMS uma rota de fragmentação estrutural foi proposta para este metabólito canrenoato de potássio *m/z* 397,0 e pode ser observado na figura 32.

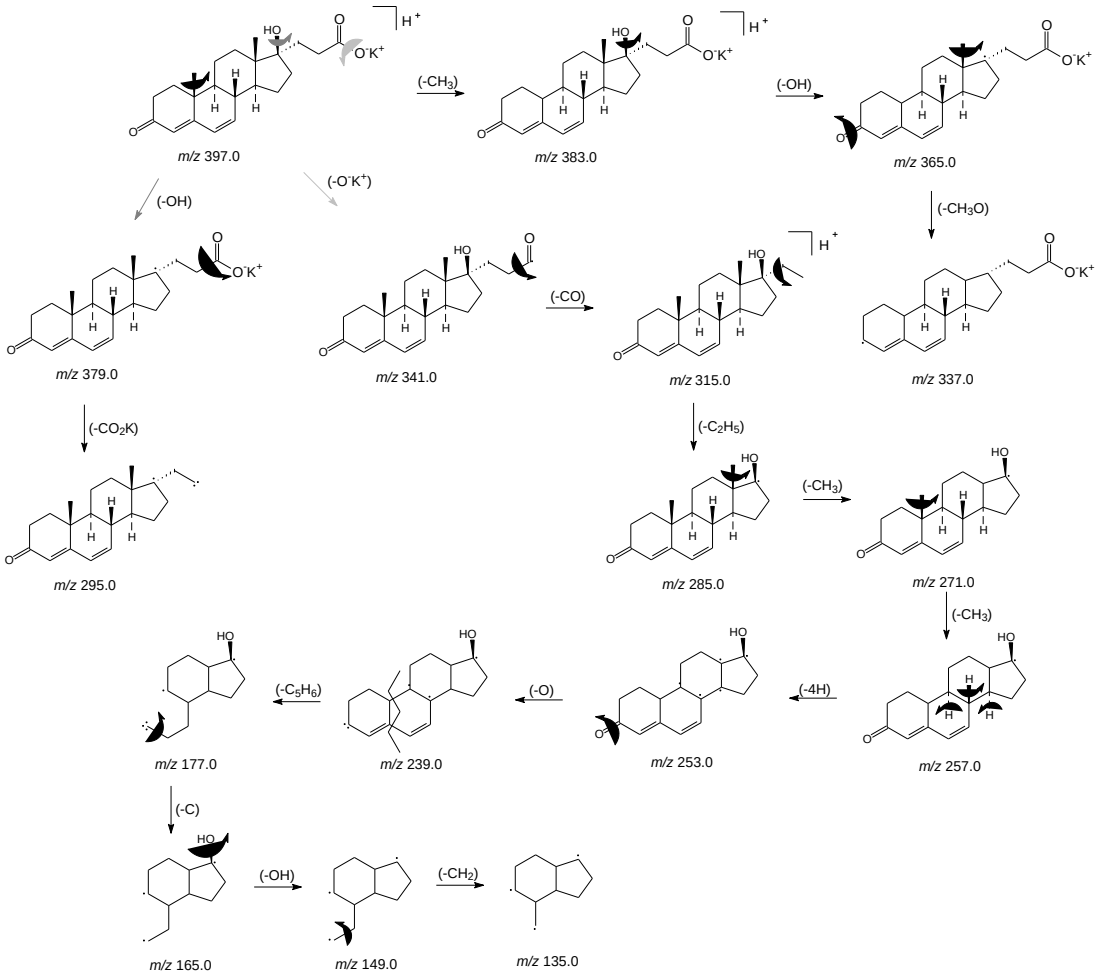


Figura 32 - Caminho de fragmentação para o metabólito canrenoato de potássio.

A rota ou Caminho de fragmentação do canrenoato de potássio *m/z* 397,0 inicia com a formação do íon produto *m/z* 383,0 com a saída de um grupamento metila do íon pai, posteriormente, o íon produto *m/z* 379,0 forma-se pela saída da hidroxila também proveniente da estrutura molecular do íon pai, logo, o fragmento *m/z* 379,0 perde CO_2K formando o fragmento *m/z* 295,0. O fragmento *m/z* 383,0 libera sua hidroxila e forma o íon produto *m/z* 365,0, este, por sua vez, libera uma metila e um oxigênio de sua estrutura molecular e forma o fragmento *m/z* 337,0. O íon produto *m/z* 341,0 também forma-se a partir do íon pai *m/z* 397,0 pela saída do O^-K^+ e, então, perde um óxido de carbono e forma o íon produto *m/z* 315,0, este, perde um grupamento etila e forma o íon produto *m/z* 285,0, este, perdendo um grupamento metila forma o íon produto *m/z* 271,0, que, perde outro grupamento metila e forma o íon produto *m/z* 257,0 este pela perda de 4 hidrogênios forma o fragmento *m/z* 253,0, que, por sua vez, perde o oxigênio e forma o fragmento *m/z* 239,0, este, perde um anel aromático (C_5H_6)

formando o íon produto *m/z* 177,0, que, ainda, perde um carbono e forma o fragmento *m/z* 165,0, este, contudo, libera a hidroxila e forma o fragmento *m/z* 149,0, que, liberando um CH_2 forma o último fragmento *m/z* 135,0 com estrutura e intensidade significativa observado.

O último metabólito da Espironolactona 6-β-hidroxi-7-α-tiometil-Espironolactona *m/z* 405.0, foi identificado pelo experimento EMS + EPI com 3 energias de colisão CE 10, 25 e 50 V, para estudo da fragmentação do íon precursor. Este metabólito foi encontrado apenas em amostra de efluente geral-HUSM em 10,15 min de corrida cromatográfica TIC. O espectro pelo experimento EPI CE 25 V obtido pode ser observados na figura 33.

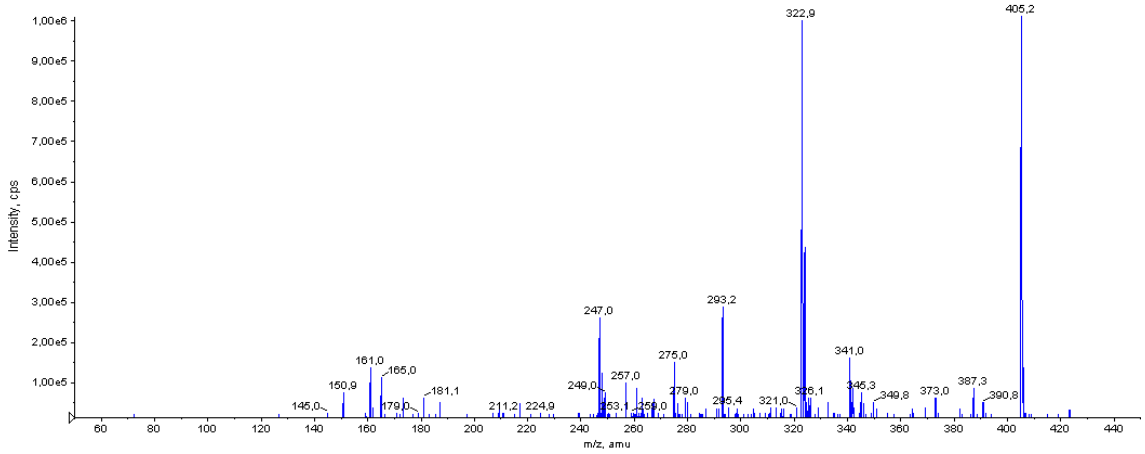


Figura 33 - Espectro de massas do metabólito 6-β-hidroxi-7-α-tiometil-Espironolactona *m/z* 405.0, amostra efluente geral-HUSM. Experimento EMS + EPI.

A partir dos íons produto de maior intensidade considerando os espectros com as 3 energias de colisão um Caminho de fragmentação para este composto foi proposto (Figura 34).

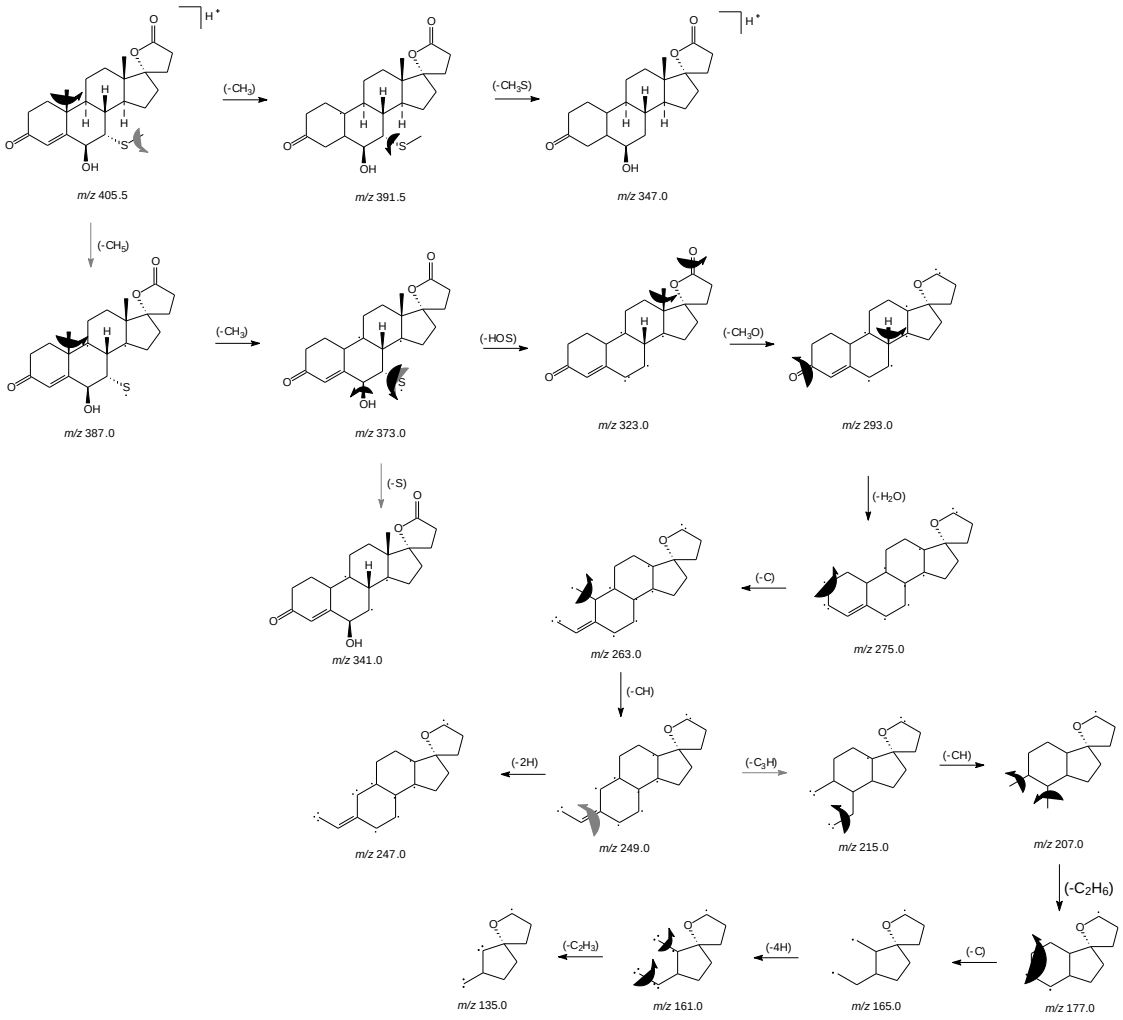


Figura 34 - Caminho de fragmentação para o metabólito 6-β-hidroxi-7-α-tiometil-Espironolactona.

O Caminho de fragmentação do metabólito 6-β-hidroxi-7-α-tiometil-Espironolactona inicia-se com a saída de uma metila da estrutura do íon pai formando o íon produto *m/z* 391,0, este, libera o grupamento metanotiolato formando o íon produto *m/z* 347,0. A partir da saída de uma metila e dois hidrogênios da molécula do íon pai *m/z* 405,0 tem-se o fragmento *m/z* 387.0 que libera um grupamento metila formando o fragmento *m/z* 373,0, este, perde o enxofre e forma o íon produto *m/z* 341,0. A partir da saída da hidroxila e do enxofre do íon produto *m/z* 373,0 forma-se o fragmento *m/z* 323,0 e, este, perde a metila remanescente na molécula e um oxigênio formando o íon produto *m/z* 293,0 que perde 2 hidrogênios e um oxigênio formando o fragmento *m/z* 275,0 este tem um anel aromático rompido perdendo um carbono e formando o íon produto *m/z* 263,0 que libera um CH deste anel rompido formando o fragmento *m/z* 249,0 este fragmento perde 2 hidrogênios e forma o fragmento *m/z* 247,0.

Partindo do íon produto *m/z* 249.0 tem-se o fragmento *m/z* 215,0 pela saída de 3 carbonos e um hidrogênio rompendo outro anel aromático e a partir daí formando os outros fragmentos de menor massa observado nos espectros *m/z* 207,0, 177,0, 165,0, 161,0 e 135,0.

O fragmento de *m/z* 341,0 característico da Espironolactona e também do metabólito canrenona foi detectado nos espectros de massas dos 3 metabólitos da Espironolactona estudados 7-α-tiometil-Espironolactona, canrenoato de potássio e 6-β-hidroxi-7-α-tiometil-Espironolactona.

Os fragmentos *m/z* 315,0 e 295,0 foram observados nos espectros de massas dos metabólitos 7-α-tiometil-Espironolactona e canrenoato de potássio. O íon produto *m/z* 271.0 foi detectado nos espectros de massas dos 3 metabólitos nas amostras de efluente. O fragmento *m/z* 263.0 foi detectado nos espectros dos metabólitos 7-α-tiometil-Espironolactona e 6-β-hidroxi-7-α-tiometil-Espironolactona. Os fragmentos *m/z* 177,0, 165,0 e 135,0 foram encontrados nos espectros de massas dos 3 metabólitos nas amostras de efluente hospitalar.

Os metabólitos da Flutamida foram identificados por experimentos IDA em modo negativo de ionização. Foram identificados nas amostras de efluente PA-HUSM e geral-HUSM, seus espectros de massas foram estudados em modo EPI com 3 diferentes CE -20, -40 e -60 V e, posteriormente, uma rota de fragmentação foi proposta para cada metabólito identificado.

O metabólito 2-hidroxiflutamida foi encontrado em amostra de efluente PA-HUSM por meio do experimento -EMS + (-EPI com 3 diferentes CE) em 0,1 min de corrida cromatográfica TIC. O espectro de massas de maior intensidade de fragmentos CE 10 V encontra-se na figura 35.

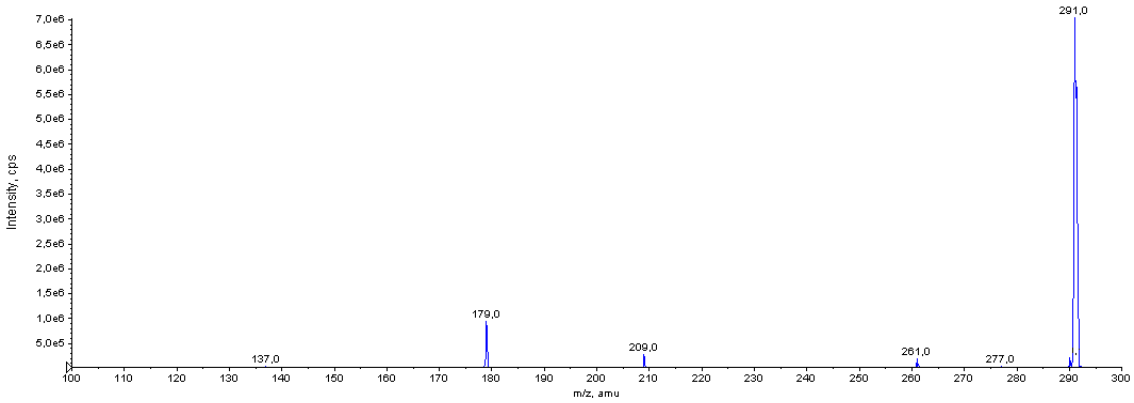


Figura 35 - Espectro de massas do metabólito 2-hidroxiflutamida *m/z* 291,2, amostra efluente PA-HUSM. Experimento EMS + (-EPI).

A partir dos espectros de massas obtidos na amostra de efluente PA-HUSM uma rota de fragmentação para o metabólito 2-hidroxiFlutamida foi proposta (Figura 36).

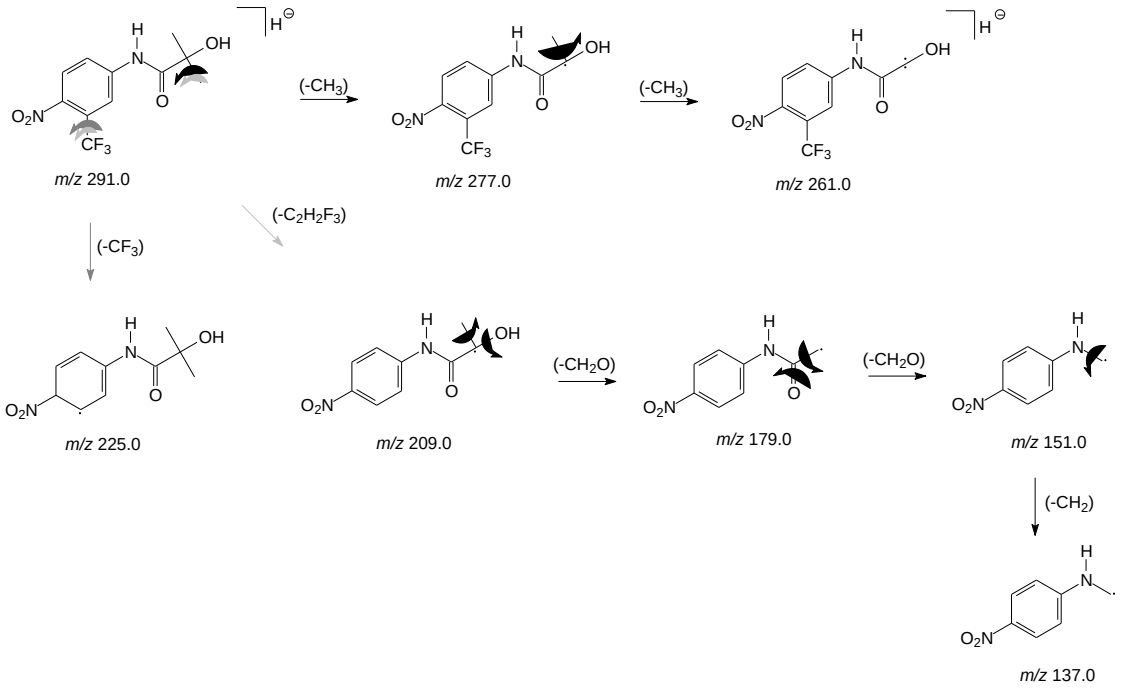


Figura 36 - Caminho de fragmentação para o metabólito 2-hidroxiflutamida.

A rota de fragmentação para o metabólito 2-hidroxiflutamina íon precursor *m/z* 291,0 inicia-se pela formação do íon produto *m/z* 277,0 pela saída de uma metila da molécula do íon precursor, este fragmento perde, por sua vez, outra metila de sua molécula formando o íon produto *m/z* 261,0. O íon produto *m/z* 225,0 forma-se a partir do íon precursor pela saída do trifluorometil. Também partindo do íon precursor tem-se a formação do íon produto *m/z* 209,0 pela saída do grupamento trifluorometil e também de uma metila da estrutura molecular. A partir deste fragmento *m/z* 209,0 tem-se a formação do fragmento *m/z* 179,0, pela saída da hidroxila e do grupamento metila da molécula, este fragmento formado, libera o oxigênio e um CH_2 e forma o fragmento *m/z* 151,0 que perde um CH_2 e forma o último fragmento observado nos espectros *m/z* 137,0.

O metabólito 4-nitro-3-(trifluorometil)fenilamina também conhecida como Flu-1 *m/z* 205,0 foi encontrado em amostra de efluente PA-HUSM (Figura 37) em 9,29 min de corrida

cromatográfica TIC. O espectro de massas gerado pelo experimento – EMS + (-EPI) pode ser observado na figura 37.

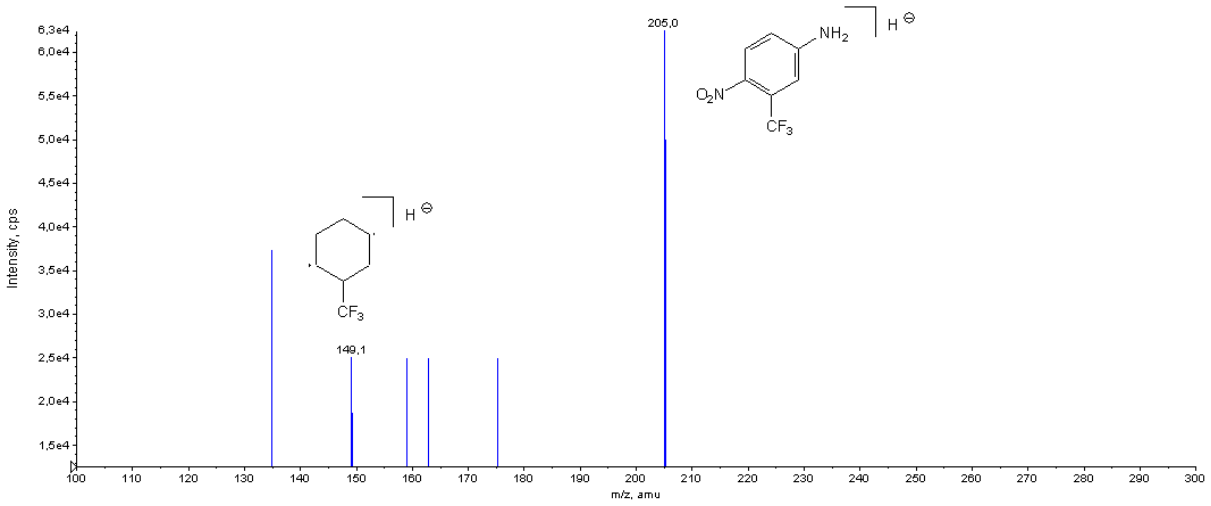


Figura 37 - Espectro de massas do metabólito 4-nitro-3-(trifluorometil)fenilamina *m/z* 205,0, amostra efluente PA-HUSM. Experimento -EMS + (-EPI).

Para amostra de efluente PA-HUSM apenas o íon produto *m/z* 149,0 foi observado com CE – 20 V, este, formado pela saída do grupamento amina e do dióxido de nitrogênio que encontravam-se ligados no anel, bem como, da abertura das duplas ligações do anel aromático. Em outras energias de colisão não obteve-se fragmentação do íon pai para esta amostra.

O metabólito Flu-3 *m/z* 221,0 foi encontrado na amostra PA-HUSM em 3,90 min de corrida cromatográfica TIC e em amostra de efluente geral-HUSM em 3,86 min. Os espectros de massas obtidos pelo experimento - EMS + (-EPI) podem ser observados na figura 38.

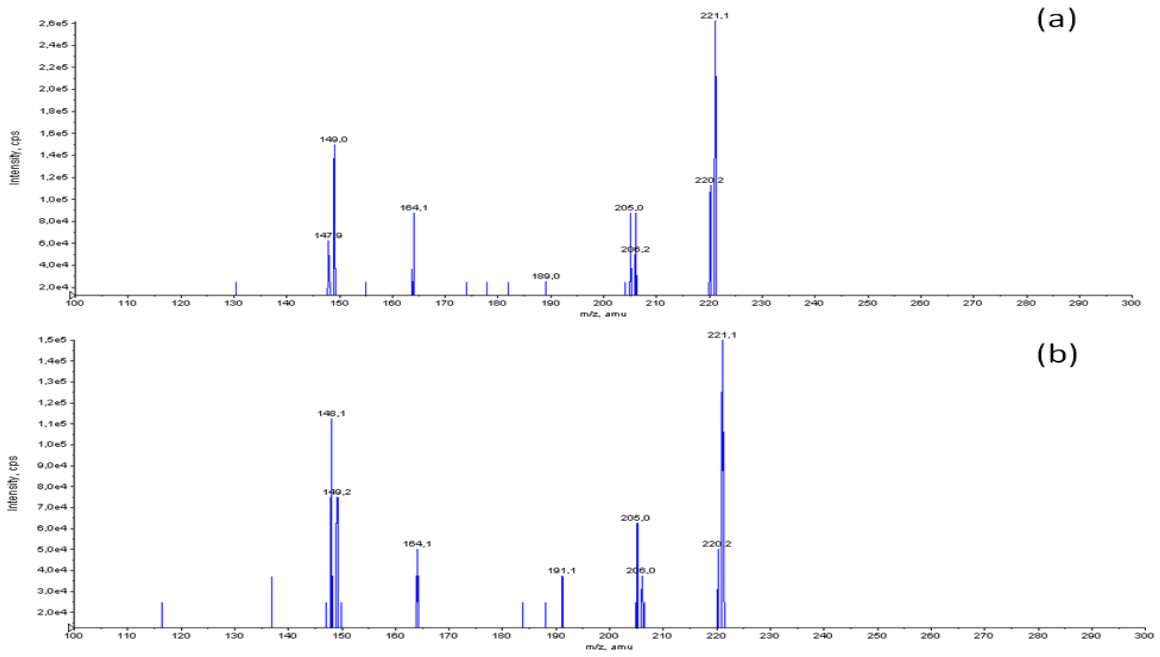


Figura 38 - Espectro de massas do metabólito Flu-3 *m/z* 221,0. Experimento - EMS + (-EPI). (a) PA-HUSM; (b) geral-HUSM.

Os mesmos fragmentos foram observados para este metabólito nas duas amostras estudadas, a partir dos espectros acima descritos uma rota de fragmentação foi proposta (Figura 39).

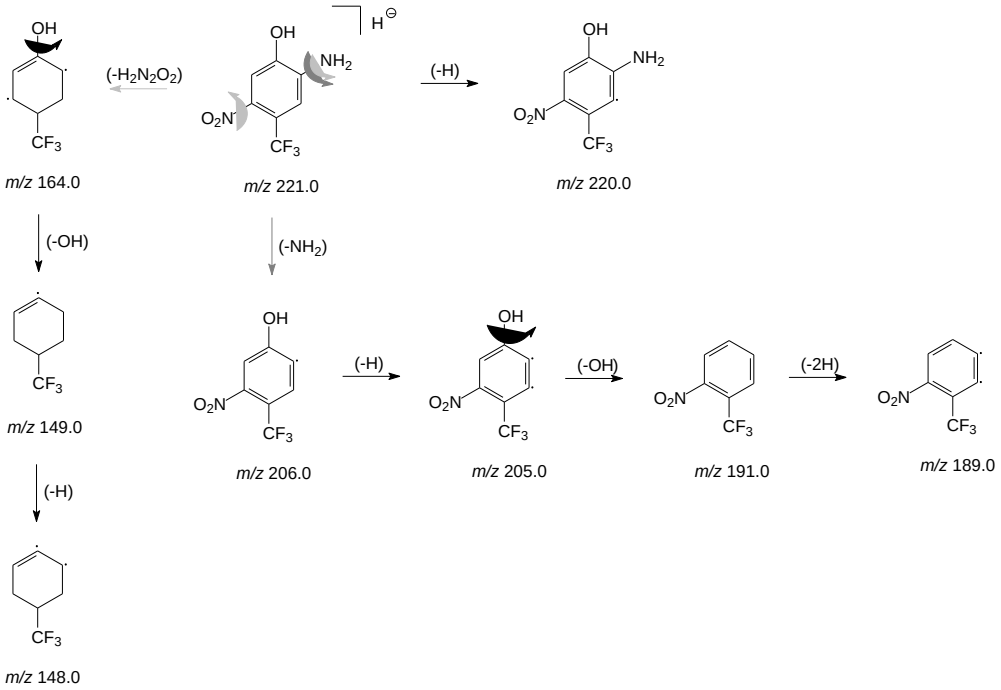


Figura 39 - Caminho de fragmentação para o metabólito Flu-3.

O Caminho de fragmentação do metabólito Flu-3 *m/z* 221,0 começa pela formação do íon produto *m/z* 220,0 pela saída de um hidrogênio da molécula do íon precursor. Pela saída do grupamento amina do íon precursor tem-se o fragmento *m/z* 206,0 este, perde um hidrogênio e forma o fragmento *m/z* 205,0 que perde a hidroxila formando o fragmento *m/z* 191,0 que, libera por sua vez, dois hidrogênios da molécula e forma o fragmento *m/z* 189,0. Também a partir do íon precursor tem-se o íon produto *m/z* 164,0 formado pela saída do grupamento amina e do dióxido de nitrogênio da molécula, este fragmento libera sua hidroxila e forma o fragmento *m/z* 149.0 que perde um hidrogênio de sua molécula formando o último fragmento observado nos espectros de massas para o metabólito Flu-3 *m/z* 148,0.

O metabólito Flu-6 foi identificado pelo experimento -PI (202,0), massa característica do íon produto de maior intensidade na fragmentação da Flutamida. O metabólito foi identificado em 2,59 min de corrida cromatográfica TIC em amostra de efluente PA-HUSM. O espectro de massas do experimento -PI (202.0) onde a *m/z* 245,0 do metabólito Flu-6 foi identificada pode ser visto na figura 40.

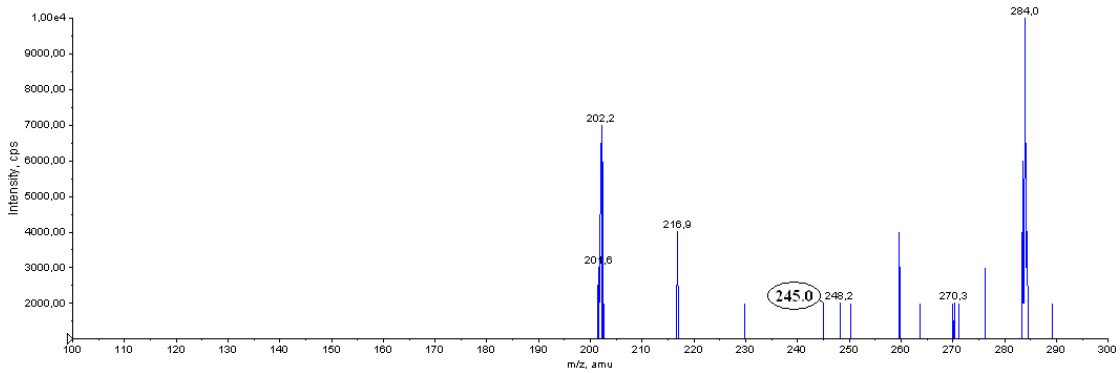


Figura 39 - Espectro de massas do metabólito Flu-6 *m/z* 245.0. Experimento -PI (202.0). Amostra PA-HUSM.

Na figura 41 encontram-se os espectros de massas adquiridos em amostra de efluente PA-HUSM e geral-HUSM.

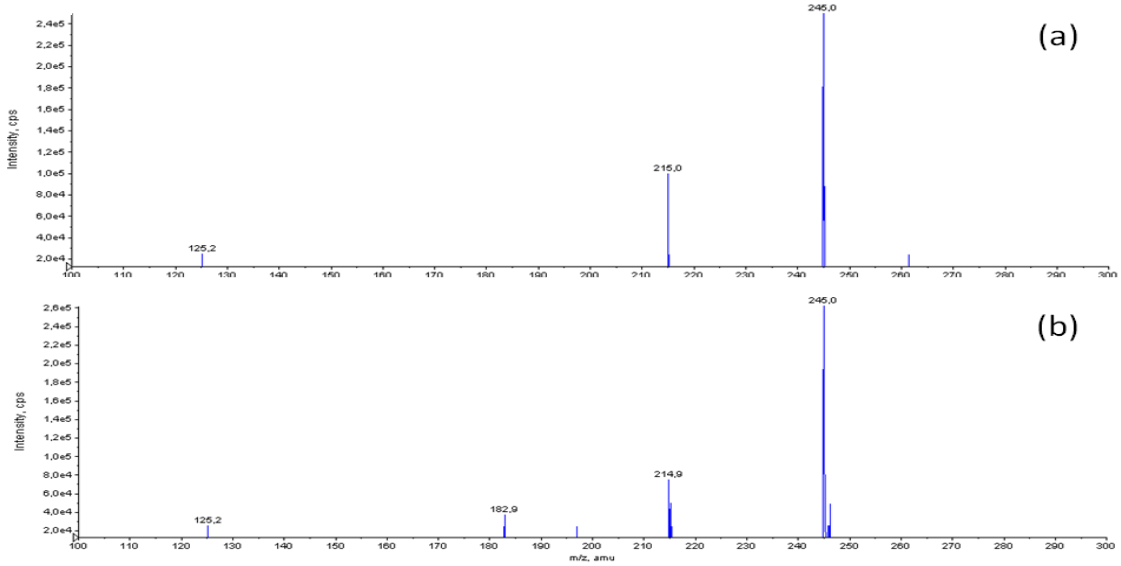


Figura 40 - Espectro de massas do metabólito Flu-6 *m/z* 245.0. Experimento -PI (202,0) + (-EPI). (a) PA-HUSM; (b) geral-HUSM.

Por meio do experimento -EMS + (-EPI com 3 CE) este metabólito também foi identificado em ambas as amostras. Para o efluente PA-HUSM o metabólito Flu-6 foi encontrado em 3,73 min de corrida cromatográfica TIC e para o efluente geral-HUSM em 3,76 min de corrida TIC. Os espectros de massas adquiridos para este experimento em ambas as amostras podem ser observados na figura 41.

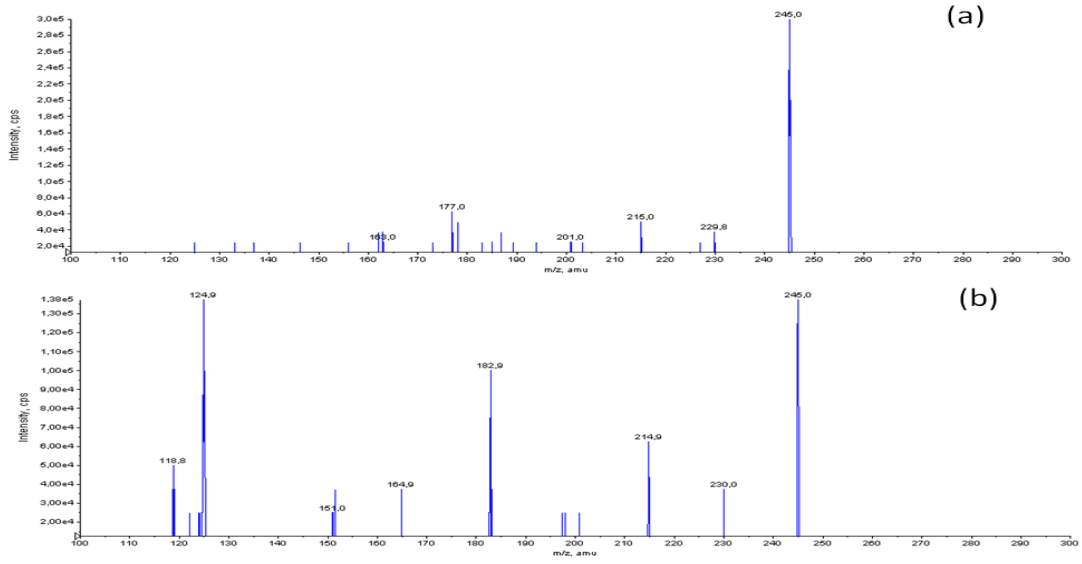


Figura 41 - Espectro de massas do metabólito Flu-6 *m/z* 245.0. Experimento - EMS + (-EPI). (a) PA-HUSM; (b) geral-HUSM.

A partir dos espectros de massas adquiridos para os dois experimentos Experimento - Precursor Ion (202.0) +(-EPI) e Experimento - EMS + (-EPI) uma rota de fragmentação foi proposta para o metabólito Flu-6 *m/z* 245,0, e pode ser observada na figura 42.

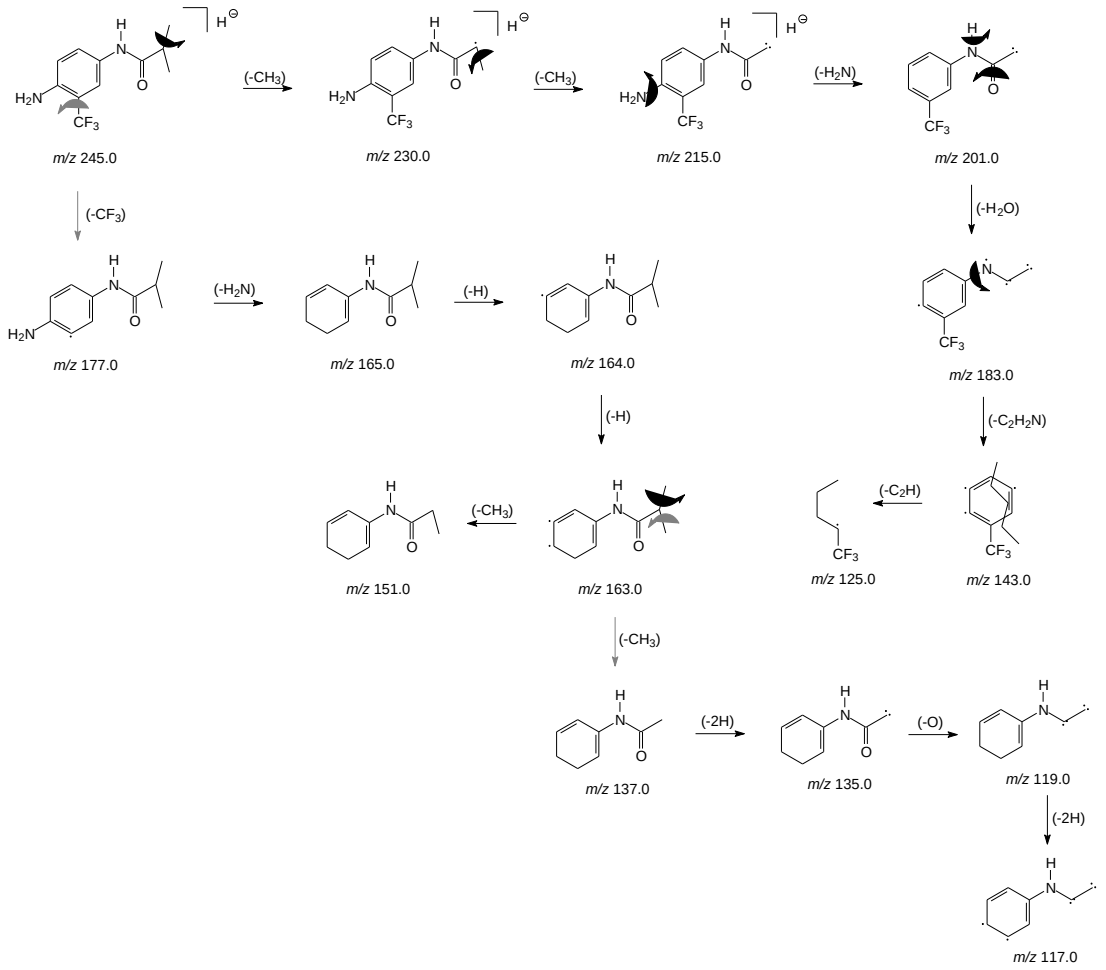


Figura 42 - Caminho de fragmentação para o metabólito Flu-6.

Como pode ser observado o Caminho de fragmentação acima inicia-se pela saída de uma metila do íon precursor formando o fragmento *m/z* 230,0, este, perde a outra metila formando dessa maneira o fragmento *m/z* 215,0, que perde o grupamento amina e forma o íon produto *m/z* 201,0, este fragmento libera uma molécula de água e forma o íon produto *m/z* 183,0. Também partindo do íon pai tem-se o fragmento *m/z* 177,0 pela saída do grupamento trifluorometil da molécula do íon precursor, este fragmento perde o grupamento amina e

forma o fragmento *m/z* 165,0 que na perda de um hidrogênio de sua molécula forma o fragmento *m/z* 164,0 e este, também perdendo um hidrogênio forma o fragmento *m/z* 163,0, que, libera um grupamento metila e forma o fragmento *m/z* 151,0. Também partindo do fragmento *m/z* 163,0 tem-se a formação do fragmento *m/z* 137,0 pela perda da outra metila, e, pela saída de dois hidrogênios deste fragmento tem-se o íon produto *m/z* 135,0, que perde o oxigênio e forma o fragmento *m/z* 119,0 este, por sua vez, libera 2 hidrogênios e forma o último fragmento observado nos espectros de massas adquiridos para o metabólito Flu-6 sendo este *m/z* 117,0.

Nas amostras de efluente hospitalar o fragmento de massas *m/z* 164,0 foi identificado na fragmentação do metabólito Flu-6 e Flu-3. O íon produto *m/z* 151,0 foi encontrado nos espectros de massas dos metabólitos Flu-6 e 2-hidroxiflutamida. Os fragmento *m/z* 149,0 e 148,0 foi identificado nos espectros de massas para os metabólitos Flu-6 e 4-nitro-3-(trifluorometil)fenilamina (Flu-1). Os fragmentos de *m/z* 137,0 foram identificados nos espectros de massas para os metabólitos Flu-6 e 2-hidroxiFlutamida.

Os metabólitos da Ciproterona identificados em amostra de efluente foram 15-hidroxi Ciproterona *m/z* 119,9 em 12,56 min de corrida cromatográfica TIC e 15-beta-hidroxi Ciproterona *m/z* 432.9 em 12,46 min de corrida cromatográfica TIC ambos em amostra de efluente PA-HUSM. O experimento IDA que proporcionou a identificação e estudos de fragmentação desses metabólitos foi EMS com EPI em 3 CE (10, 25 e 50 V) em modo positivo de ionização. Os espectros de massas obtidos para os metabólitos estudados podem ser vistos nas figuras abaixo.

O espectro de massas para o metabólito 15-hidroxi-Ciproterona *m/z* 419,97 em amostra PA-HUSM encontra-se na figura 43.

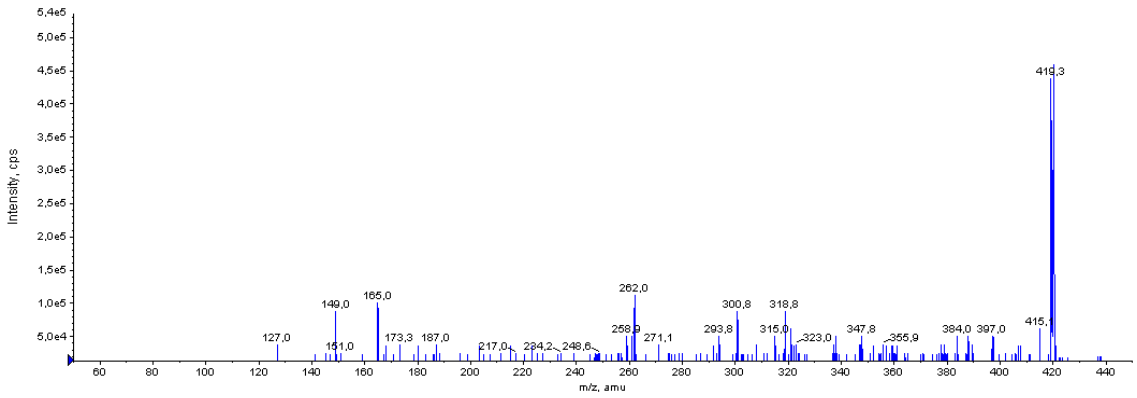


Figura 43 - Espectro de massas do metabólito 15-hidroxi-Ciproterona *m/z* 419,97. Experimento EMS + EPI.

A partir dos espectros de massas adquiridos para o metabólito da Ciproterona 15-hidroxi-Ciproterona em amostra de efluente PA-HUSM, uma rota de fragmentação foi proposta levando em consideração os íons produtos mais intensos adquiridos em cada energia de colisão estudada (Figura 44).

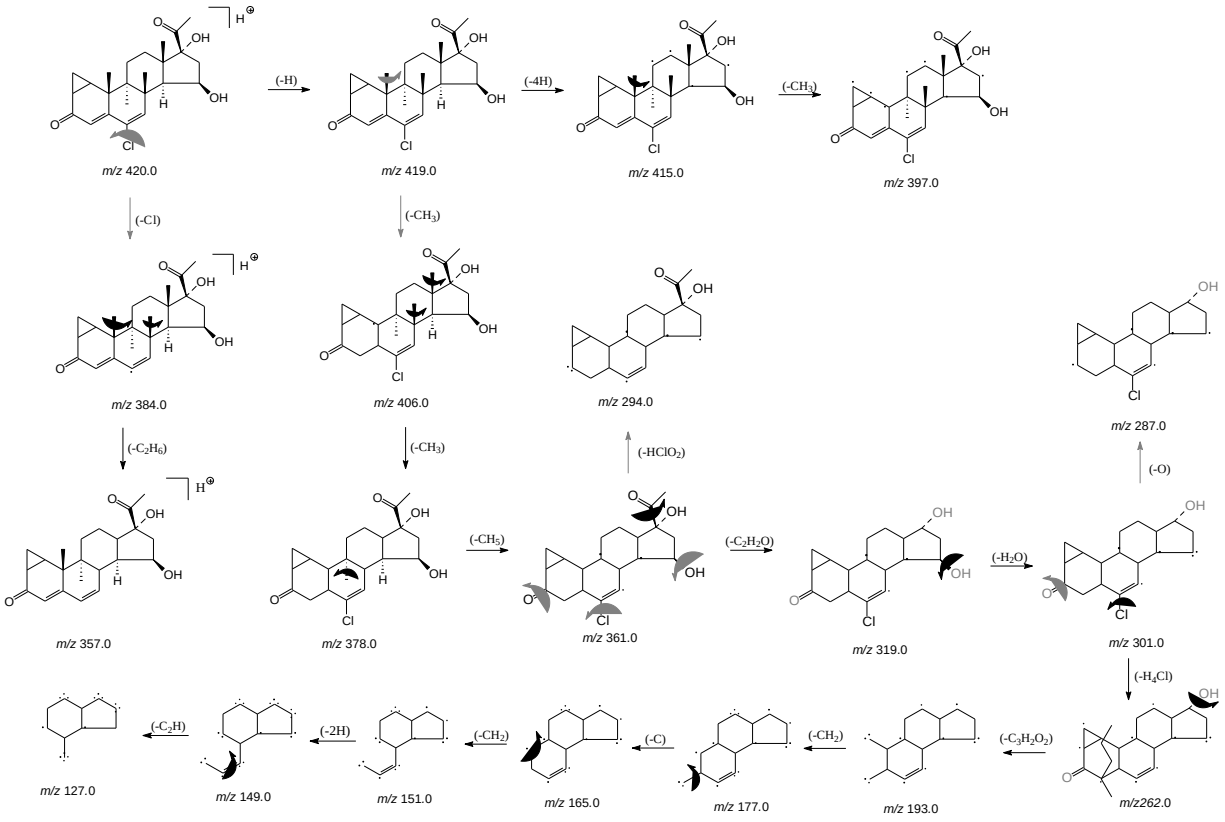


Figura 44 – Caminho de fragmentação para o metabólito 15-hidroxi-Ciproterona.

O Caminho de fragmentação do metabólito 15-hidroxi-Ciproterona *m/z* 419,97 tem início com a saída de um hidrogênio do íon pai formando o primeiro íon produto *m/z* 419,0, observado no espectro de massas com CE 25 V. A partir deste, tem-se a perda de 4 hidrogênios e a formação do fragmento *m/z* 415,0 que, perde uma metila e forma o fragmento *m/z* 397,0. A partir do íon produto *m/z* 419,0 também, forma-se o fragmento *m/z* 406,0 pela perda de uma metila, este fragmento por sua vez, perde duas metilas e forma o fragmento *m/z* 378,0 que perde outra metila e mais dois hidrogênios formando o fragmento *m/z* 361,0, que,

libera o cloro, o oxigênio que encontrava-se duplamente ligado ao anel e uma hidroxila formando o fragmento *m/z* 294,0. Pela saída do grupamento acetila do fragmento *m/z* 361,0 forma-se o fragmento *m/z* 319,0, este, perde uma molécula de água e forma o fragmento *m/z* 301,0, que, libera o oxigênio que encontrava-se duplamente ligado ao anel e forma o fragmento *m/z* 287,0. Também a partir do íon produto *m/z* 301,0 pela saída do cloro e mais quatro hidrogênios tem-se o fragmento *m/z* 262,0, este fragmento libera a hidroxila que ainda encontrava-se ligada ao furano como também tem-se a ruptura do anel aromático onde o oxigênio encontrava-se duplamente ligado e tendo-se a formação do fragmento *m/z* 193,0 e, a partir daí os fragmentos de menores massas *m/z* 177,0, 165,0, 151,0, 149,0, e 127,0 são observados pelas rupturas dos anéis remanescentes na molécula. Também a partir do íon precursor tem-se o íon produto *m/z* 384,0 pela saída do cloro que encontrava-se ligado ao anel, este fragmento, por sua vez, libera duas metilas e forma o fragmento *m/z* 357,0 íon produto característico da fragmentação da Ciproterona.

O metabólito 15-beta-hidroxi Ciproterona *m/z* 434,0 foi encontrado em amostra PA-HUSM em 14,16 min de corrida cromatográfica TIC. O espectro de massas obtido na CE de 25 V pode ser observado na figura 45.

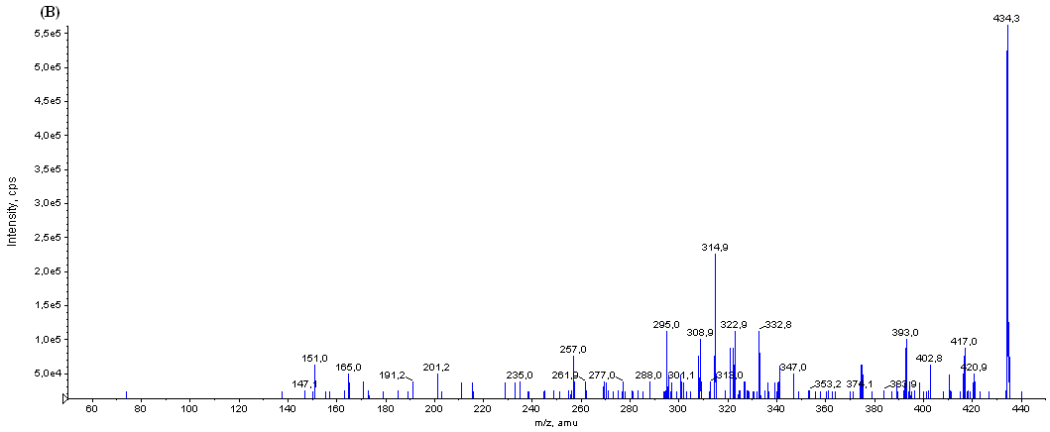


Figura 45 - Espectro de massas do metabólito 15-beta-hidroxi Ciproterona *m/z* 434.0. Experimento EMS + EPI. Amostra efluente PA-HUSM.

A partir dos fragmentos mais intensos adquiridos nos espectros de massas do experimento EMS + EPI com CE 10, 25 e 50 V, em amostra de efluente PA-HUSM, uma rota

de fragmentação foi proposta para o metabólito 15-beta-hidroxi Ciproterona *m/z* 434,0 (Figura 46).

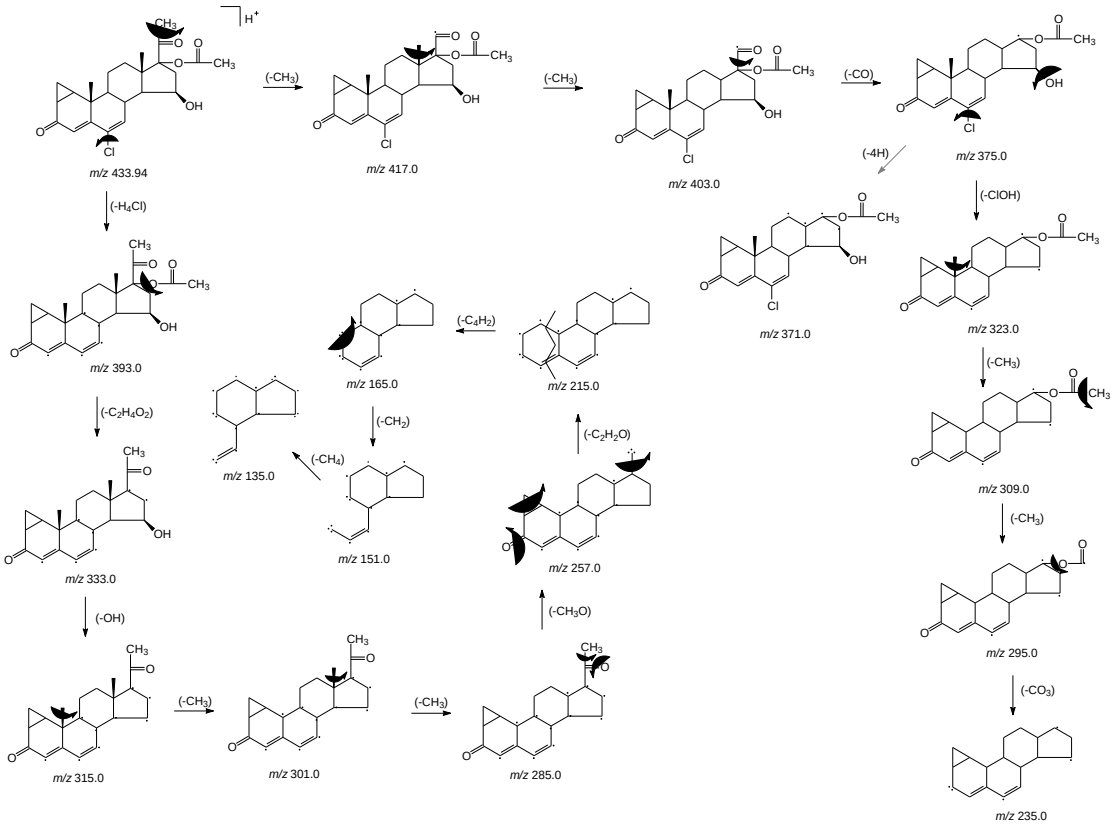


Figura 46 – Caminho de fragmentação para o metabólito 15-beta-hidroxi Ciproterona.

O Caminho de fragmentação proposto para o metabólito 15-beta-hidroxi Ciproterona *m/z* 434,0, tem início com a saída de um grupamento metila da estrutura molecular do íon precursor e formação do íon produto *m/z* 417,0 este, por sua vez, libera outra metila e forma o fragmento de *m/z* 403,0 que perde um óxido de carbono e forma o íon produto *m/z* 375,0 estes perdem 4 hidrogênios de sua molécula e forma o fragmento *m/z* 371,0, bem como, liberando o cloro e a hidroxila de sua molécula forma também o fragmento *m/z* 323,0, que, libera uma metila formando o íon produto *m/z* 309,0 este fragmento libera o último grupamento metila da molécula formando o fragmento *m/z* 295,0 que, perdendo a carbonila e o hidrogênio de sua estrutura forma desta maneira o íon produto *m/z* 235,0. Partindo também do íon precursor *m/z* 434,0 tem-se a formação do íon produto *m/z* 393,0 pela saída do cloro e mais 4 hidrogênios da

molécula. Este íon produto formado libera o grupamento acetato e mais um hidrogênio de sua molécula e forma o fragmento *m/z* 333,0 este, libera a hidroxila e forma o fragmento *m/z* 315,0, o mesmo perde um grupamento metila e forma o fragmento *m/z* 301,0 que libera outra metila da estrutura formando o fragmento *m/z* 285,0 este, libera a metila remanescente na sua estrutura molecular e também um oxigênio e forma o fragmento *m/z* 257,0, a partir deste fragmento tem-se a abertura do ciclopropano, a saída do oxigênio que encontrava-se duplamente ligado ao anel aromático e a saída de um carbono que ainda encontrava-se ligado ao ciclopentano, formando assim, o íon produto *m/z* 215,0, subseqüentemente, pela ruptura dos anéis aromáticos da estrutura molecular formam-se então os fragmentos de menores massas observados nos espectros acima descritos *m/z* 165,0, 151,0 e 135,0 para o metabólito 15-beta-hidroxi Ciproterona.

No estudo dos espectros de massas dos dois metabólitos da Ciproterona identificados pelo experimento IDA, em amostra de efluente PA-HUSM, observou-se que os fragmentos *m/z* 301,0, 165,0 e 151,0 foram encontrados nos espectros de fragmentação de ambos os metabólitos, da mesma forma, os fragmentos *m/z* 177,0, 193,0 e 287,0 também foram observados nos espectros dos dois metabólitos, porém, devido a menor intensidade de sinal comparado aos outros fragmentos obtidos nos espectros de massas do metabólito 15-beta-hidroxi Ciproterona *m/z* 434,0, estes, não foram incluídos no Caminho de fragmentação proposto para este composto.

Os metabólitos do Tamoxifeno identificados em amostras de efluente hospitalar por experimentos IDA foram N-desmetil Tamoxifeno *m/z* 358,0, N-desmetil Tamoxifeno-d5 *m/z* 363,0, 4-OH-Tamoxifeno *m/z* 388.0, 4-OH-Tamoxifeno-d5 *m/z* 393,0 e endoxifeno-d5 *m/z* 379,0. Foram obtidos espectros de massas utilizando o experimento EMS + EPI nas 3 CE 10, 25 e 50 V, para obtenção de melhores informações relacionadas a fragmentação dos compostos.

O metabólito N-desmetil-Tamoxifeno *m/z* 358,0 foi encontrado em amostra de efluente PA-HUSM e, em amostra de efluente geral-HUSM em 11,45 min de corrida cromatográfica TIC. Seus espectros de massas EMS + EPI com CE 10 V e 25 V energia de colisão onde a melhor fragmentação foi obtida podem ser observados na figura 47.

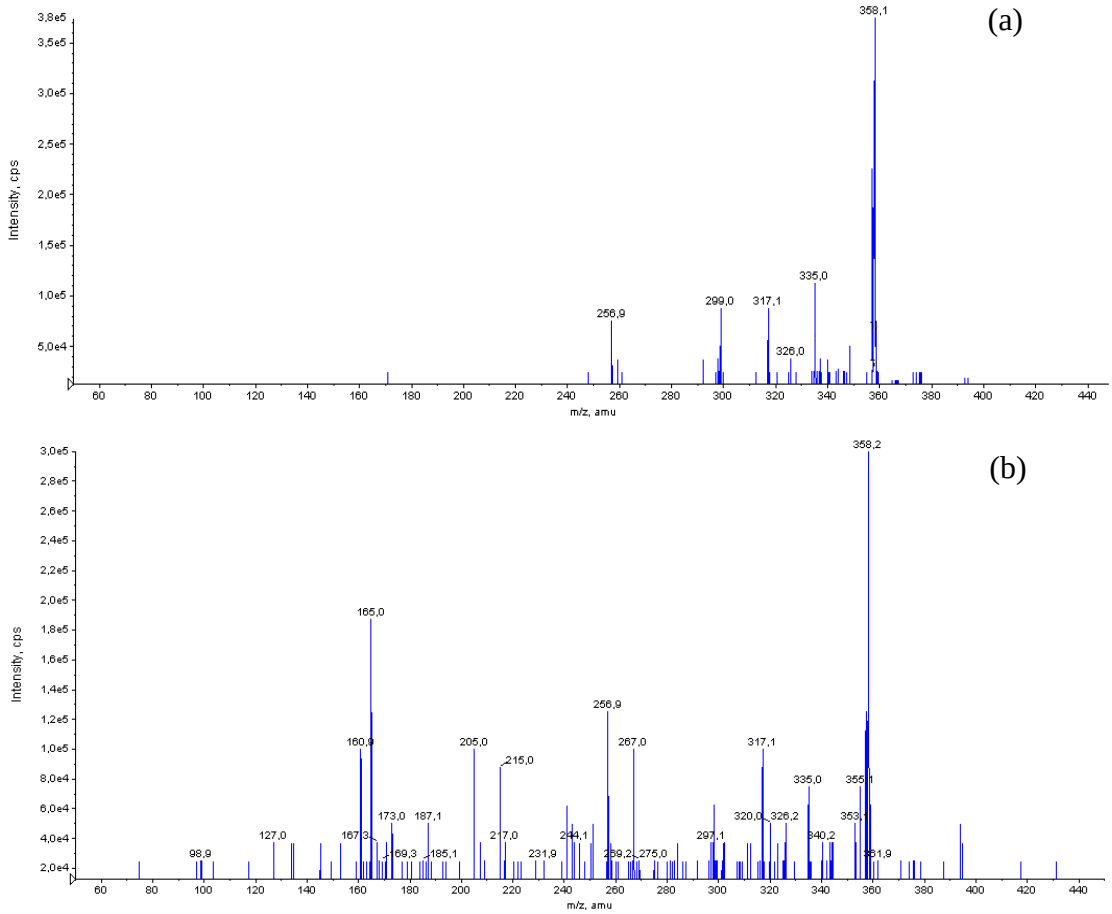


Figura 47 - Espectro de massas do metabólito NDTAM *m/z* 358.0. Experimento EMS + EPI. (a) PA-HUSM; (b) geral-HUSM.

Observando os espectros de massas do experimento EPI com CE 10 V e 25 V das duas amostras sendo estas, efluente PA e geral-HUSM, observa-se que os mesmos fragmentos de massas foram observados para as duas amostras o que nos leva a uma maior segurança quanto ao fato de ser o metabólito NDTAM em ambas as amostras.

A partir dos espectros de massas acima descritos para as duas amostras de efluente hospitalar onde o metabólito NDTAM *m/z* 358,0 foi identificado, uma rota de fragmentação foi proposta (Figura 48) baseada nos fragmentos de maior intensidade de massas observados nos espectros.

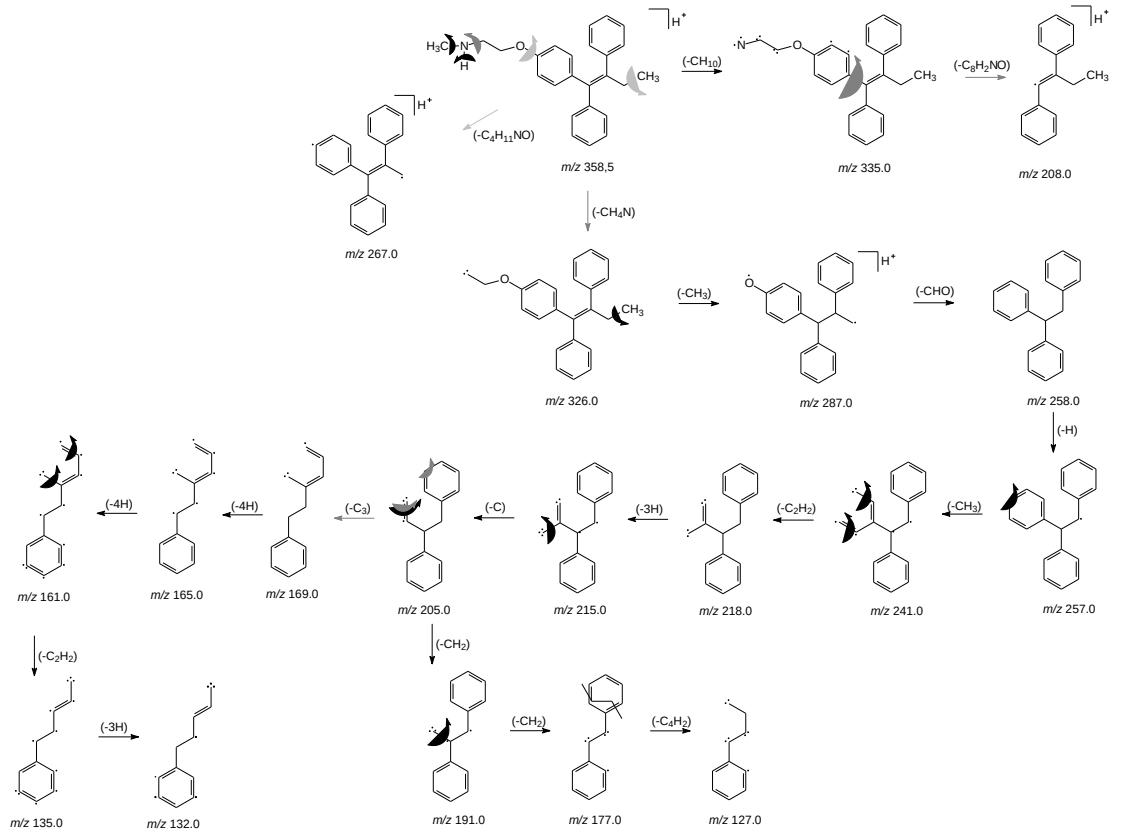


Figura 48 – Caminho de fragmentação para o metabólito (NDTAM).

A rota ou Caminho de fragmentação inicia-se com a formação do fragmento *m/z* 335,0 pela saída de um grupamento metila e mais 7 hidrogênios da molécula do íon precursor. O fragmento de *m/z* 335,0 libera um anel benzênico com sua ramificação estrutural remanescente, formando dessa forma, o íon produto *m/z* 208,0. Também, a partir do íon precursor tem-se a formação do íon produto *m/z* 326 pela saída da metilamina e mais 1 hidrogênio da estrutura molecular. Partindo deste fragmento forma-se o fragmento de *m/z* 287,0 pela saída do grupamento metila e, então, pela saída do oxigênio e também do CH da estrutura molecular tem-se o fragmento *m/z* 258,0, este, perde um hidrogênio e forma o fragmento *m/z* 257,0, a partir de então, tem-se a ruptura dos anéis benzênicos e formação dos fragmentos de menores massas *m/z* 241,0; 218,0; 215,0; 205,0; 191,0; 177,0; 169,0; 165,0; 161,0; 135,0; 132,0; 127,0, observados nos espectros de massas dos experimentos EMS + EPI acima descritos para ambas as amostras. O íon produto *m/z* 267,0 originou-se da saída do grupamento oxipropilamina do íon precursor.

Outro metabólito do Tamoxifeno identificado em amostra de efluente PA-HUSM foi o N-desmetil-Tamoxifeno-d5 *m/z* 363,0 encontrado em 12,36 min de corrida cromatográfica TIC. O espectro de massas do experimento EMS + EPI com energia de colisão de 10 V pode ser observado na figura 49.

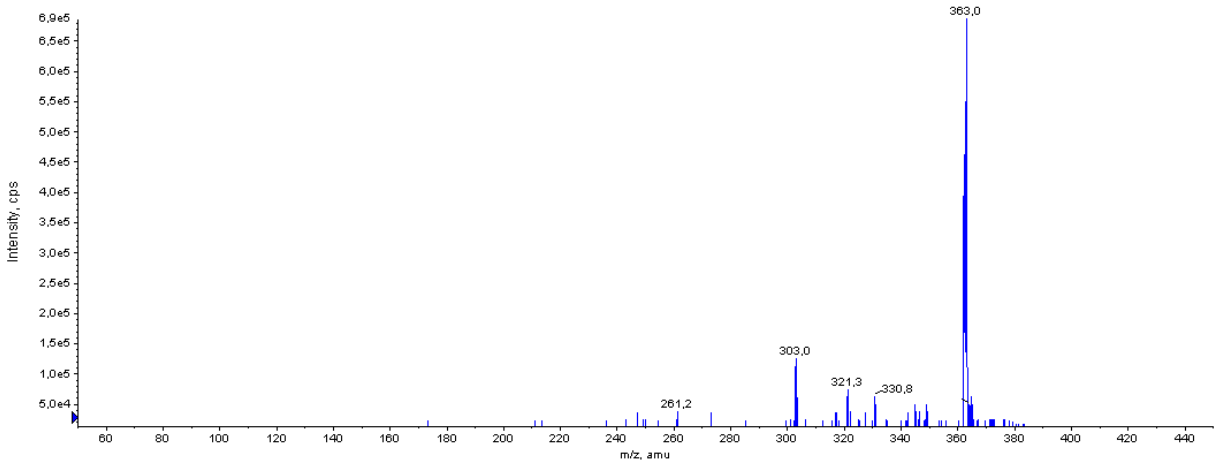


Figura 49 - Espectro de massas do metabólito N-desmetil-Tamoxifeno-d5 *m/z* 363.0, amostra efluente PA-HUSM. Experimento EMS + EPI com CE 10 V.

Outras energias de colisão testadas neste experimento não proporcionaram a fragmentação do íon precursor do metabólito N-desmetil-Tamoxifeno-d5, portanto, a rota de fragmentação foi proposta (Figura 50) considerando apenas os fragmentos obtidos neste espectro de massas com CE de 10 V, o que, como é sabido, energias de colisão menores proporcionam fragmentos de maiores massas.

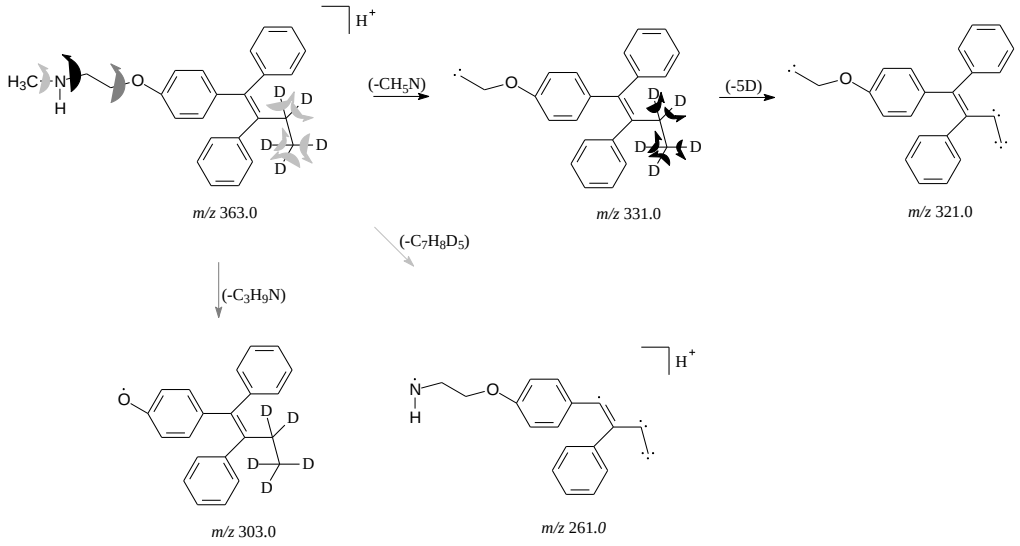


Figura 50 - Caminho de fragmentação para o metabólito N-desmetil-Tamoxifeno-d5.

O Caminho de fragmentação para o N-desmetil-Tamoxifeno-d5 baseado no espectro de massas adquirido pelo experimento EMS + EPI com CE 10 V tem início com a formação do íon produto *m/z* 331,0 pela saída da metilamina e mais um hidrogênio da molécula do íon precursor, sendo este, *m/z* 363,0. Posteriormente, a partir do fragmento *m/z* 331,0 tem-se a perda dos 5 receptores de dopamina e saída de mais um hidrogênio para a formação do íon produto de *m/z* 321,0. Partindo do íon precursor, tem-se também, a formação do íon produto *m/z* 303,0 pela saída do grupamento isopropilamina e mais um hidrogênio da molécula. E, ainda, o íon produto *m/z* 261,0 forma-se a partir do íon precursor pela perda de um anel benzênico, saída do grupamento metila e também a pela perda dos 5 receptores de dopamina.

O seguinte metabólito identificado foi encontrado em amostra de efluente PA-HUSM, 4-OH-Tamoxifeno este, foi encontrado em 9,95 min de corrida cromatográfica TIC. O estudo da fragmentação do íon precursor foi feito através do experimento EMS + EPI nas 3 energias de colisão 10, 25 e 50 V. O espectro de massas com CE de 25 V para este composto pode ser observado na figura 51.

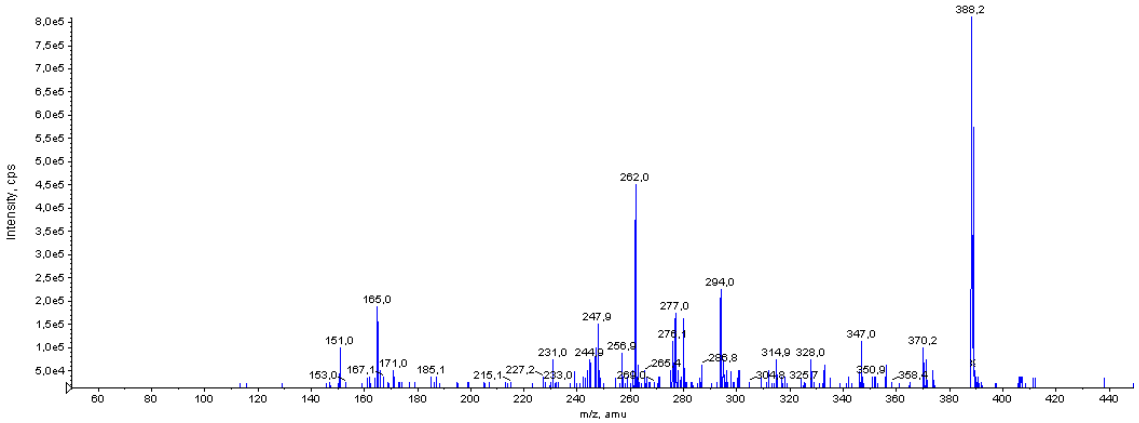


Figura 51 - Espectro de massas do metabólito 4-OH-Tamoxifeno *m/z* 388.0. Experimento EMS + EPI. Amostra efluente PA-HUSM.

Partindo dos espectros de massas adquiridos acima para estudo da fragmentação do metabólito 4-OH-Tamoxifeno *m/z* 388,0, uma rota de fragmentação foi proposta (Figura 52) para este metabólito levando em consideração as massas dos fragmentos mais intensos observados em cada um dos espectros com as diferentes energias de colisão.

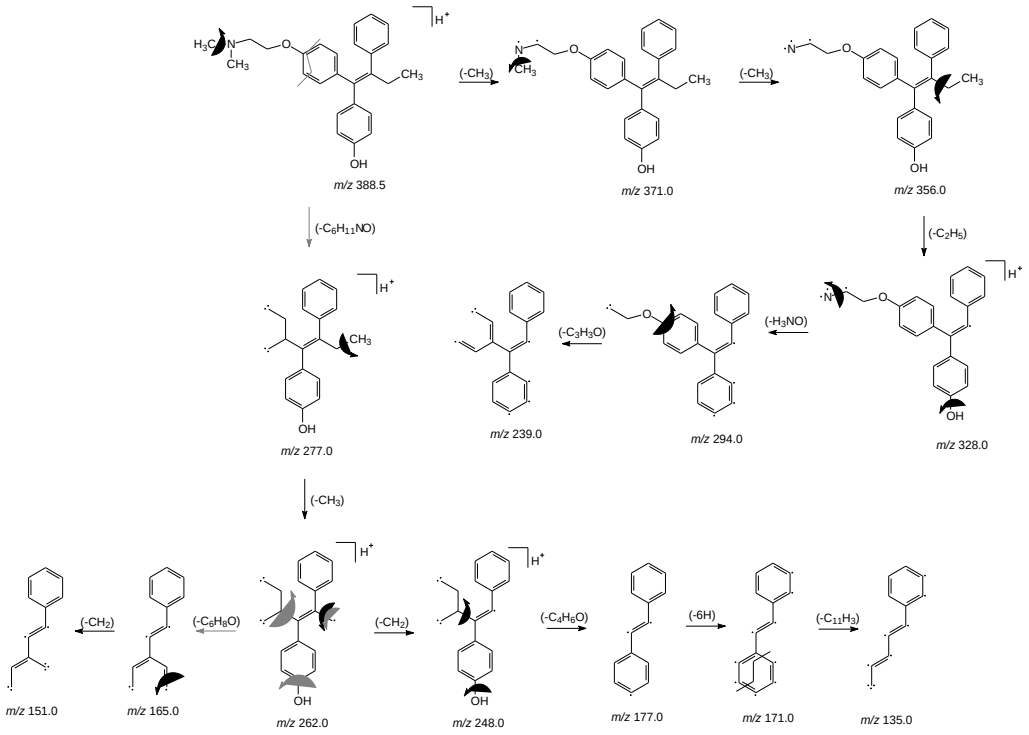


Figura 52 - Caminho de fragmentação para o metabólito 4-OH-Tamoxifeno.

O Caminho de fragmentação do metabólito 4-OH-Tamoxifeno *m/z* 388,0 tem inicio com a formação do íon produto *m/z* 371,0 pela saída de uma metila da molécula do íon precursor, este fragmento da origem, pela saída de outra metila de sua estrutura molecular ao fragmento de *m/z* 356,0, que, libera um grupamento etila formando assim, o fragmento de *m/z* 328,0 este, por sua vez, perde a hidroxila, o nitrogênio e mais 3 hidrogênios da molécula formando o fragmento *m/z* 294,0, este fragmento forma o íon produto *m/z* 239,0 pela saída do radical C_3H_3O e pela abertura do anel benzênico e subsequente saída de um carbono deste anel. Também partindo do íon precursor tem-se a formação do fragmento *m/z* 277,0 pela saída da oxipropilamina e abertura do anel benzênico e saída de mais dois carbonos e dois hidrogênios deste anel. Pela saída do grupamento metila do íon produto *m/z* 277,0 tem-se a formação do fragmento *m/z* 262,0, que libera um CH_2 e forma o fragmento *m/z* 248,0 este, no entanto, libera a hidroxila, bem como, 4 carbonos e 5 hidrogênios do anel benzênico que havia sido rompido formando o fragmento *m/z* 177,0, a partir de então, pela abertura dos anéis benzênicos remanescentes tem-se a formação dos fragmentos de menores massas *m/z* 171,0; 165,0; 151,0 e 135,0 observados nos espectros acima dispostos.

Outro metabólito do Tamoxifeno 4-OH-Tamoxifeno-d5 *m/z* 393,0 foi identificado em amostra de efluente PA-HUSM em 8,9 min de corrida cromatográfica TIC, bem como, em amostra de efluente geral-HUSM em 9,0 min de corrida cromatográfica TIC. Os espectros adquiridos pelos experimentos IDA EMS + EPI em ambas as amostras podem ser observados na figura 53.

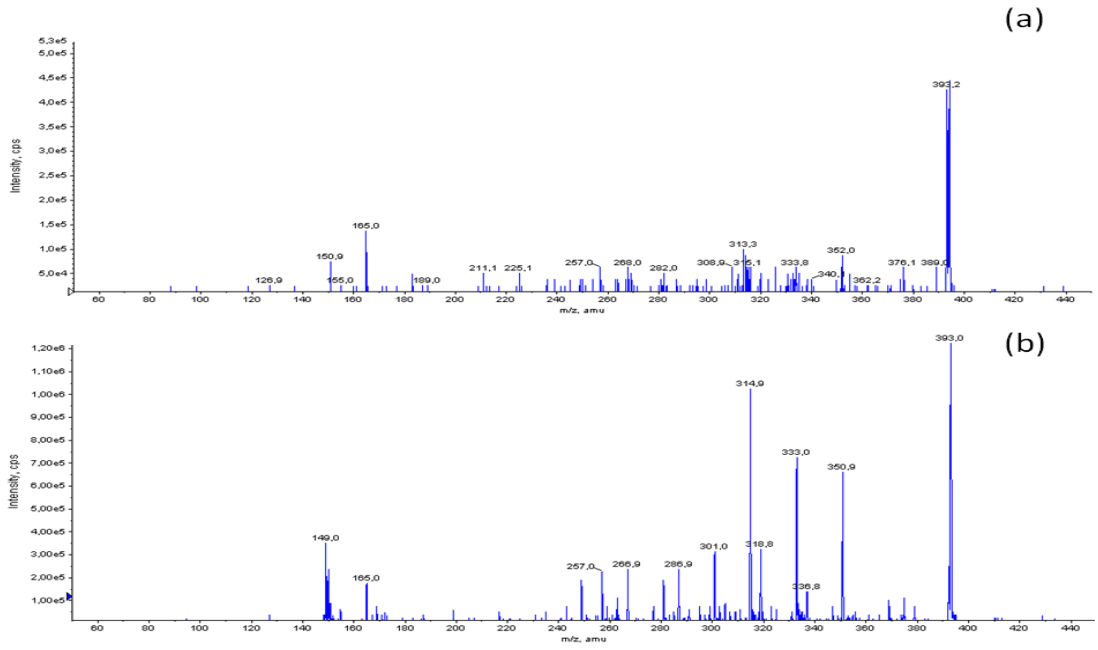


Figura 53 - Espectro de massas do metabólito 4-OH-Tamoxifeno-d5 *m/z* 393.0. Experimento EMS + EPI. (a) PA-HUSM; (b) geral-HUSM.

Os fragmentos *m/z* 207,0; 193,0; 177,0; 165,0 e 135,0 foram os mesmos encontrados nas duas amostras nas energias de colisão 25 e 50 V.

A partir dos íons produto mais intensos gerados nos espectros EPI com as diferentes energias de colisão utilizadas uma rota de fragmentação foi proposta para o metabólito 4-OH-Tamoxifeno-d5 (Figura 54).

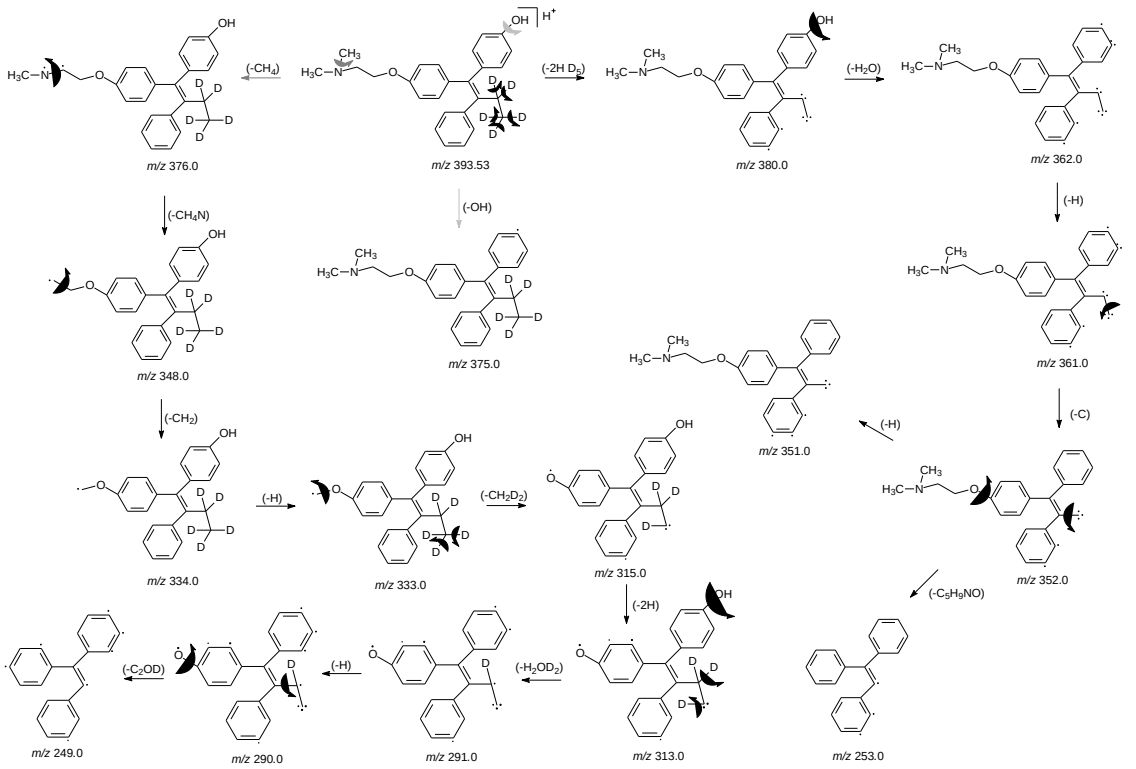


Figura 54 - Caminho de fragmentação para o metabólito 4-OH-Tamoxifeno-d5.

A rota de fragmentação do metabólito 4-OH-Tamoxifeno-d5 foi proposta de acordo com as massas mais intensas dos espectros acima descritos, iniciando-se com a saída dos 5 receptores de dopamina e 2 hidrogênios da estrutura molecular do íon precursor formando o íon produto *m/z* 380,0, a partir deste fragmento tem-se a saída da hidroxila e mais um hidrogênio da molécula formando o fragmento *m/z* 362,0, este, por sua vez, libera um hidrogênio de sua molécula e da origem ao fragmento *m/z* 361,0, que, com a saída de um carbono forma o fragmento *m/z* 352,0, liberando um hidrogênio de sua molécula e formando o fragmento *m/z* 351,0. Pela saída do grupamento oxipropilamina e mais um carbono e um

hidrogênio que encontravam-se ligados ao anel benzênico do fragmento *m/z* 352,0 tem-se a formação do fragmento *m/z* 253,0. Também partindo-se do íon precursor tem-se o íon produto *m/z* 376,0, pela saída de uma metila mais um hidrogênio da molécula do íon pai, a partir deste fragmento formado, tem-se, o fragmento *m/z* 348,0 pela saída da metilamina da estrutura molecular, este fragmento, forma o fragmento *m/z* 334,0 pela saída de um CH_2 de sua molécula que, perde um hidrogênio e forma o fragmento *m/z* 333,0 este, libera outro CH_2 e dois receptores de dopamina formando o fragmento *m/z* 315,0 que, libera dois hidrogênios de sua molécula e forma o fragmento *m/z* 313,0 este fragmento libera a hidroxila e dois receptores de dopamina formando o fragmento *m/z* 291,0, que liberando um hidrogênio de sua molécula forma o fragmento *m/z* 290,0, este, libera o oxigênio que encontrava-se ligado ao anel benzênico e também dois carbonos e o último receptor de dopamina e forma o fragmento *m/z* 249,0. O terceiro fragmento mais intenso identificado foi *m/z* 375.0, este forma-se pela saída da hidroxila do íon precursor. Os fragmentos de menores massas e mais intensos observados nos espectros acima descritos *m/z* 241,0; 225,0; 207,0; 193,0; 177,0; 165,0; 151,0; 149,0 e 135,0 formam-se a partir da ruptura dos anéis benzênicos remanescentes na estrutura molecular do metabólito 4-OH-Tamoxifeno-d5.

O metabólito do Tamoxifeno endoxifeno-d5 foi também identificado nas amostras de efluente hospitalar. Em amostra de efluente PA-HUSM este metabólito foi encontrado em 12,26 min e em amostra de efluente geral-HUSM em 12,50 min de corrida cromatográfica TIC. Em ambas amostras a identificação e estudo de fragmentação do metabólito foi feita através do experimento IDA EMS + EPI nas 3 CE previamente fixadas 10, 25 e 50 V. Os espectros de massas adquiridos podem ser observados na figura 55.

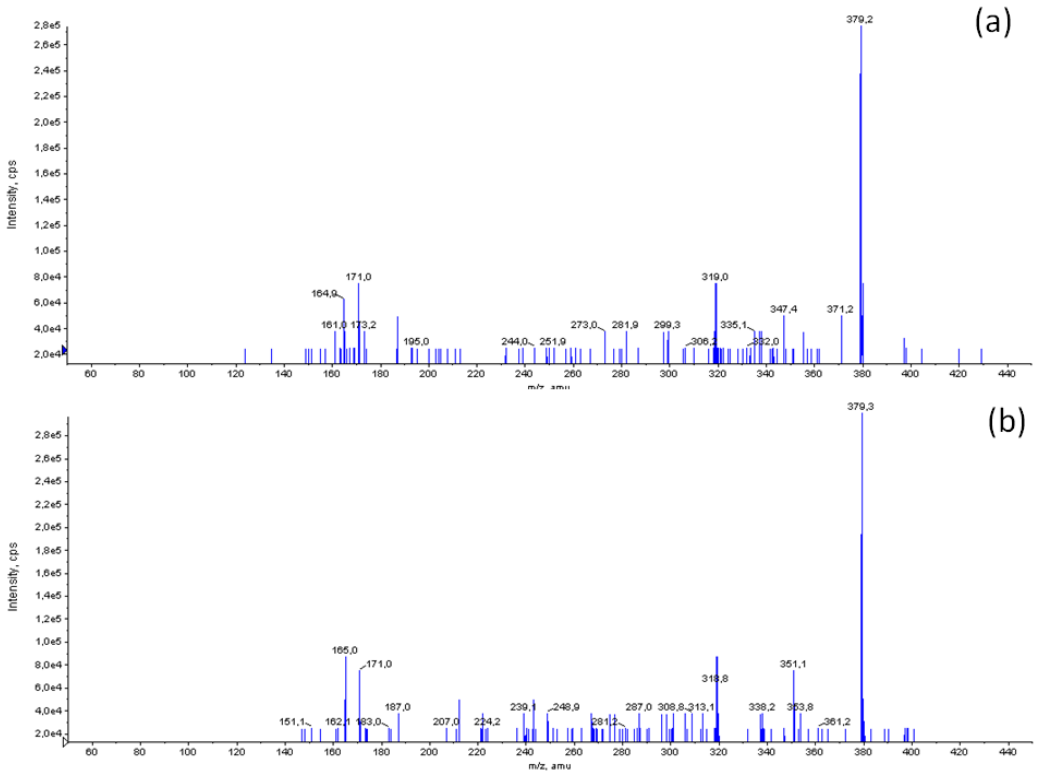


Figura 55 - Espectro de massas do metabólito endoxifeno-d5 *m/z* 379.0. Experimento EMS + EPI. (a) PA-HUSM; (b) geral-HUSM.

Fazendo uma análise da fragmentação do íon precursor nos espectros de massas EPI com diferentes energias de colisão pôde-se observar que, o íon produto *m/z* 371,0, está presente no espectro de massas com CE 25 V para PA-HUSM e 10 V na amostra de efluente geral-HUSM. O fragmento de *m/z* 319.0 foi encontrado nos espectros de massas de efluente PA-HUSM em CE 10, 25 e 50 V e geral-HUSM em CE 10 e 25 V. O fragmento *m/z* 273,0 foi identificado no espectro de massas da amostra PA-HUSM com CE 25 V e geral-HUSM 50 V. O fragmento *m/z* 249,0 foi encontrado em CE 50 V em amostra PA-HUSM e CE 25 e 50 V em amostra geral-HUSM. O fragmento *m/z* 239,0 está presente em CE 10 V amostra PA-HUSM e 10 e 25 V amostra geral-HUSM. O fragmento de *m/z* 171,0 foi encontrado na amostra PA-HUSM com CE 25 V e geral-HUSM com CE 25 e 50 V. O fragmento *m/z* 165,0 foi identificado em 25 e 50 V de CE, bem como, o fragmento *m/z* 135,0 foi identificado com CE 50 V nos espectros de massas de ambas as amostras.

Os fragmentos mais intensos gerados para as duas amostras foram utilizados para propor uma rota de fragmentação para o metabólito endoxifeno-d5 partindo dos espectros de

massas do experimento EPI com CE 10, 25 e 50 V. Este Caminho de fragmentação pode ser observado na figura 56.

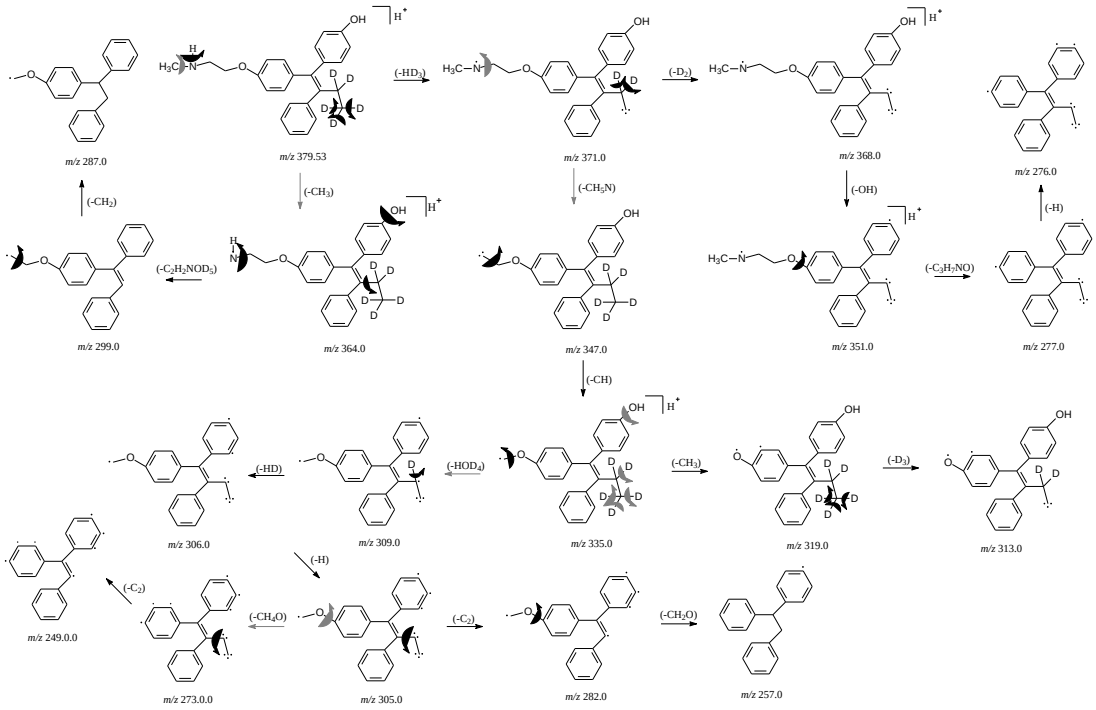


Figura 56 - Caminho de fragmentação para o metabólito endoxifeno-d5.

O Caminho de fragmentação proposto para o metabólito endoxifeno-d5 inicia com o íon produto *m/z* 371,0 formado pela saída de um hidrogênio e 3 receptores de dopamina da estrutura molecular do íon precursor *m/z* 379,0. Pela saída dos 2 receptores de dopamina remanescentes na molécula do fragmento *m/z* 371,0 tem-se o íon produto *m/z* 368,0, este, por sua vez, libera a hidroxila e forma o íon produto *m/z* 351,0, que liberando o grupamento oxietilmetilamina formou o íon produto *m/z* 277,0 este, libera um hidrogênio e forma o fragmento *m/z* 276,0. Também pela saída do grupamento metilamina e mais dois hidrogênios da molécula do íon precursor tem-se o íon produto *m/z* 347,0 este, entretanto, libera um carbono e um hidrogênio e forma o fragmento de *m/z* 335,0 que libera uma metila formando o fragmento *m/z* 319,0 que perde 3 receptores de dopamina e forma o fragmento de *m/z* 313,0. Partindo também do íon produto *m/z* 335,0 tem-se o fragmento *m/z* 309,0 pela saída da hidroxila, bem como, de 4 receptores de dopamina e, com a saída de um hidrogênio e do último receptor de dopamina deste, forma-se o fragmento *m/z* 306,0 que com a perda de um

hidrogênio forma o fragmento *m/z* 305,0 este, por sua vez, libera 2 carbonos e forma o fragmento *m/z* 282,0 que libera o oxigênio e o CH_2 que encontrava-se ligados ao anel benzênico formando o fragmento *m/z* 257,0. De mesma forma pela saída do oxigênio e do CH_2 que encontravam-se ligados ao anel benzênico da estrutura molecular do fragmento *m/z* 305,0, tem-se a formação do fragmento *m/z* 273,0 este, libera 2 carbonos da molécula e forma o fragmento de *m/z* 249.0 restando apenas os anéis benzênicos, sendo assim, a formação dos fragmentos de menores massas *m/z* 239,0, 193,0, 187,0, 179,0, 171,0, 165,0, 151,0 e 135,0 observados nos espectros acima dispostos são formados pela abertura dos anéis benzênicos.

Analisando as rotas de fragmentação propostas para os metabólitos do Tamoxifeno identificados nas amostras de efluente hospitalar pode-se observar que os íons produto de *m/z* 335,0, 299,0, 287,0 e 257,0 foram observados nos espectros de massas do metabólito N-desmetil-Tamoxifeno como também do metabólito endoxifeno-d5. O íon produto *m/z* 371,0, foi identificado como primeiro íon produto formado para os metabólitos 4-OH-Tamoxifeno e endoxifeno-d5, bem como, os íons produto *m/z* 277,0, 239,0 e 171,0 também foram identificados nos espectros de massas destes metabólitos. Os íons produto *m/z* 351,0, 249,0, 313,0 e 193,0 foram encontrados nos espectros de massas dos metabólitos 4-OH-Tamoxifeno-d5 e endoxifeno-d5. O íon produto *m/z* 241,0 foi identificado nos espectros de massas dos metabólitos N-Desmetil-Tamoxifeno e 4-OH-Tamoxifeno-d5. O íon produto *m/z* 177,0 esteve presente nos espectros de massas dos metabólitos N-desmetil-Tamoxifeno, 4-OH-Tamoxifeno, 4-OH-Tamoxifeno-d5 e endoxifeno-d5. Os íons produto *m/z* 165,0 e 135,0 aparecem nos espectros de massas dos metabólitos N-desmetil-Tamoxifeno, 4-OH-Tamoxifeno, 4-OH-Tamoxifeno-d5 e endoxifeno-d5. O íon produto *m/z* 151 foi identificado nos espectros de massas dos metabólitos 4-OH-Tamoxifeno, 4-OH-Tamoxifeno-d5 e endoxifeno-d5.

5.4.5 Identificação e estudo dos subprodutos dos compostos EFCT pela aplicação de PAOs

Os experimentos PAOs onde, as amostras para obtenção e estudo dos subprodutos foram obtidas estão descritos no (Capítulo 1, item 1.3.3, pag. 25). Os experimentos IDA para obtenção dos subprodutos dos compostos EFCT estão descritos anteriormente.

5.4.5.1 Fotólise aplicada à solução aquosa de Espironolactona

Para estudo dos subprodutos da Espironolactona pela aplicação de fotólise em solução aquosa do composto após os 60 min reacionais fez-se um experimento de PREC (107) - íon precursor *m/z* 107,0 fragmento produto característico da Espironolactona. E obteve-se o seguinte espectro (Figura 57).

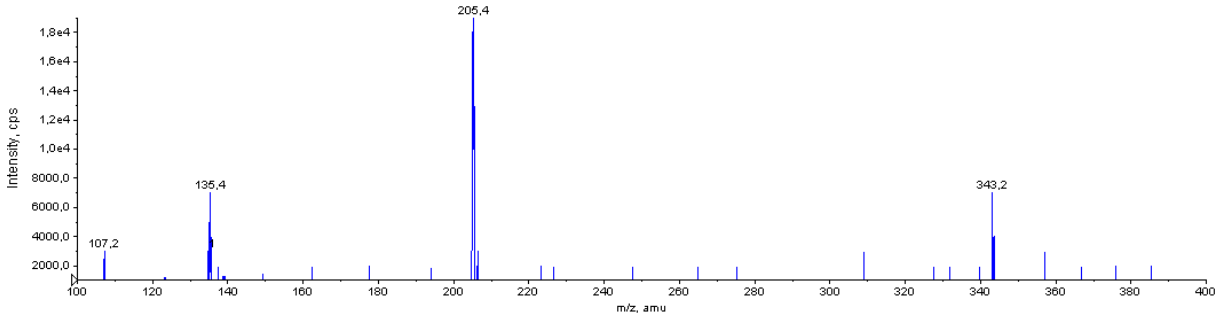


Figura 57 - Espectro de massas do experimento PREC (107) com EC de 30 V. Subprodutos da Espironolactona em solução aquosa submetida à fotólise.

Como pode ser observado no espectro PREC (107) 4 subprodutos foram identificados para Espironolactona *m/z* 343,0; 205,0; 135,0 e 107. O espectro EPI (Figura 58) mostra o íon precursor como sendo o subproduto da Espironolactona *m/z* 343,0 e seus íons produtos gerados pela fragmentação com uma CE de 30 V.

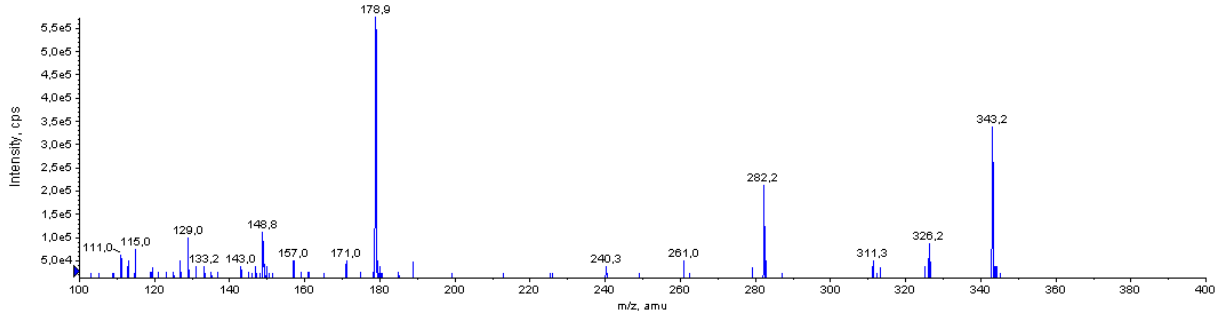
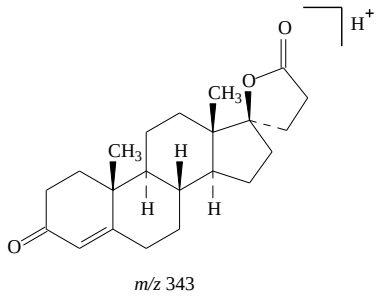


Figura 58 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Espironolactona *m/z* 343,0. Experimento PREC (107) + EPI com EC 30 V. Solução aquosa submetida à fotólise.

Como previamente descrito, a Espironolactona é fragmentada na fonte de ionização, ou seja, perde o grupamento etilsulfóxido e entra no espectrômetro de massas com uma razão *m/z* de 341,0. Partindo desta *m/z* se propõe a entrada de 2 hidrogênios à estrutura molecular do subproduto identificado pelo experimento de PREC (107) e fragmentado em EPI com EC 30 V. A estrutura molecular do subproduto *m/z* 343,0 esta proposta na figura 59.



m/z 343

Figura 59- Estrutura molecular do subproduto da Espironolactona *m/z* 343,0.

Outro subproduto identificado pelo espectro PREC (107) foi *m/z* 205,0 e sua fragmentação foi feita pelo experimento de EPI utilizando uma CE de 10 V (Figura 60).

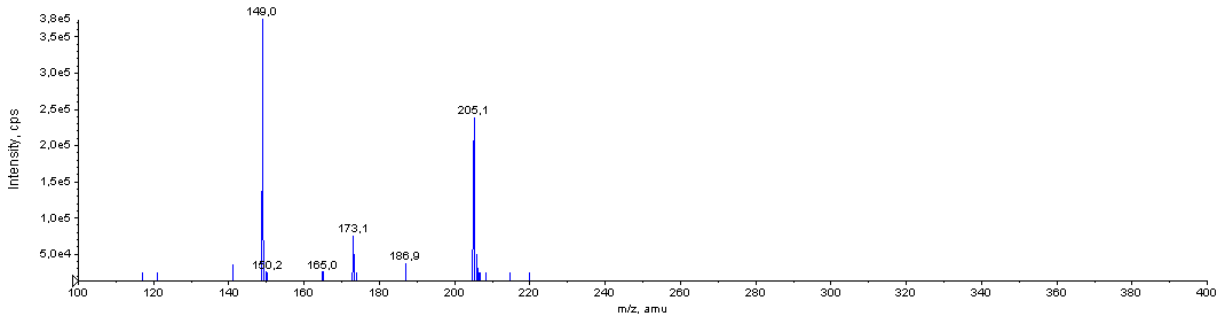
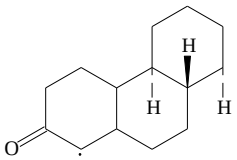


Figura 60- Espectro de massas EPI do produto de degradação da Espironolactona *m/z* 205,0. Experimento PREC (107) + EPI com EC 10 V. Solução aquosa submetida à fotólise.

O subproduto da Espironolactona *m/z* 205,0 parte da estrutura molecular *m/z* 341,0 perdendo o grupamento butironolactona, bem como, o ciclopentano que encontrava-se ligado

a ela e, também saída das duas metilas e abertura da dupla ligação remanescente no anel. A estrutura molecular proposta para o fragmento encontra-se na figura 61.



m/z 205

Figura 61 - Estrutura molecular do subproduto da Espironolactona *m/z* 205,0.

O espectro de massas EPI com o subproduto da Espironolactona *m/z* 135,0 e seu fragmento resultante encontram-se na figura 62.

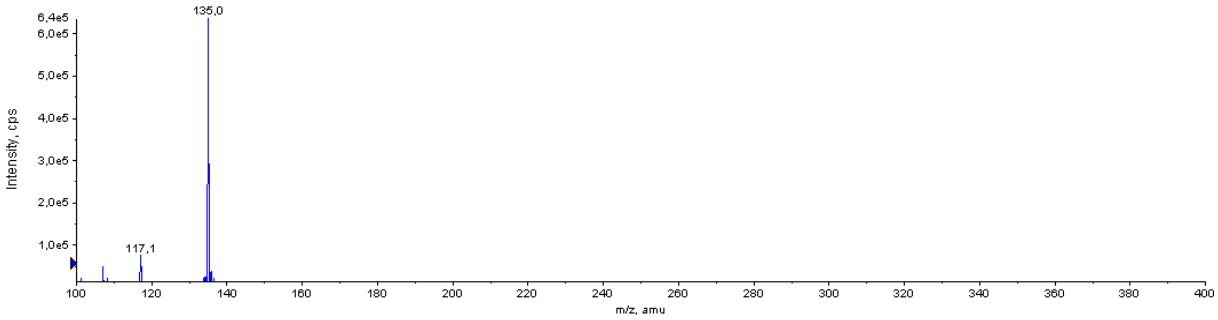
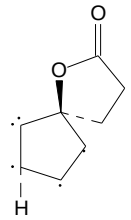


Figura 62 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Espironolactona *m/z* 135,0. Experimento PREC (107) + EPI com EC 10 V. Solução aquosa submetida à fotólise.

O subproduto *m/z* 135,0 provém da ruptura da estrutura molecular da Espironolactona, desta maneira, permanece a butironolactona ligada ao ciclopentano. A estrutura molecular proposta para este subproduto encontra-se na figura 63.



m/z 135

Figura 63 - Estrutura molecular do subproduto da Espironolactona *m/z* 135,0.

O último subproduto identificado para a Espironolactona *m/z* 107,0 pode ser identificado na figura 64, espectro de massas EPI.

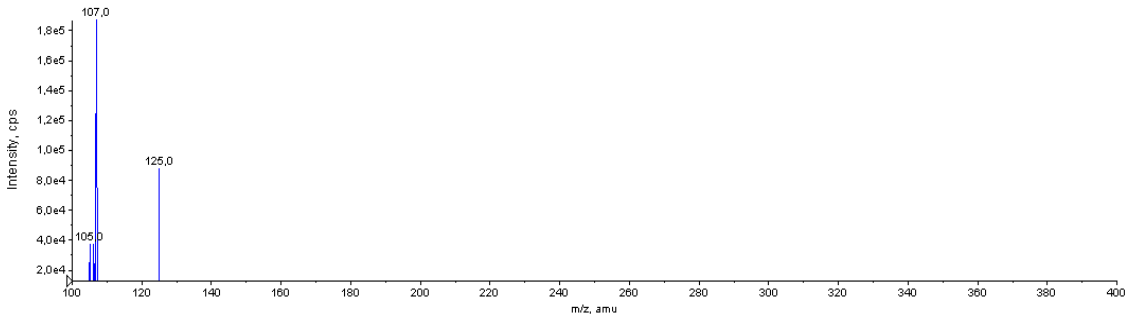


Figura 64 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Espironolactona *m/z* 107,0. Experimento PREC (107) + EPI com EC 10 V. Solução aquosa submetida à fotólise.

Estruturalmente o espectro de massas foi definido na figura 65. Onde propõe-se que o fragmento *m/z* 125,0 é devido a ruptura da dupla ligação e saída do oxigênio da butironolactona esta, por sua vez, perde um carbono e 6 hidrogênios da molécula formando o subproduto *m/z* 107,0 este, fragmenta-se perdendo dois hidrogênios formando o fragmento *m/z* 105,0.

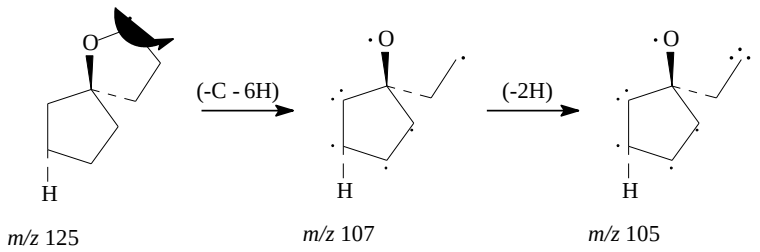


Figura 65 - Estrutura molecular dos fragmentos e do subproduto da Espironolactona *m/z* 107,0.

De acordo com as *m/z* encontradas nos experimentos de MS-IDA-PREC(107) seguido de EPI com a EC aplicada para cada subproduto objetivando a obtenção da melhor fragmentação estrutural, na figura 66, encontram-se a estrutura molecular da Espironolactona seguida das estruturas propostas para seus subprodutos formados pelo processo de fotólise em solução aquosa do composto.

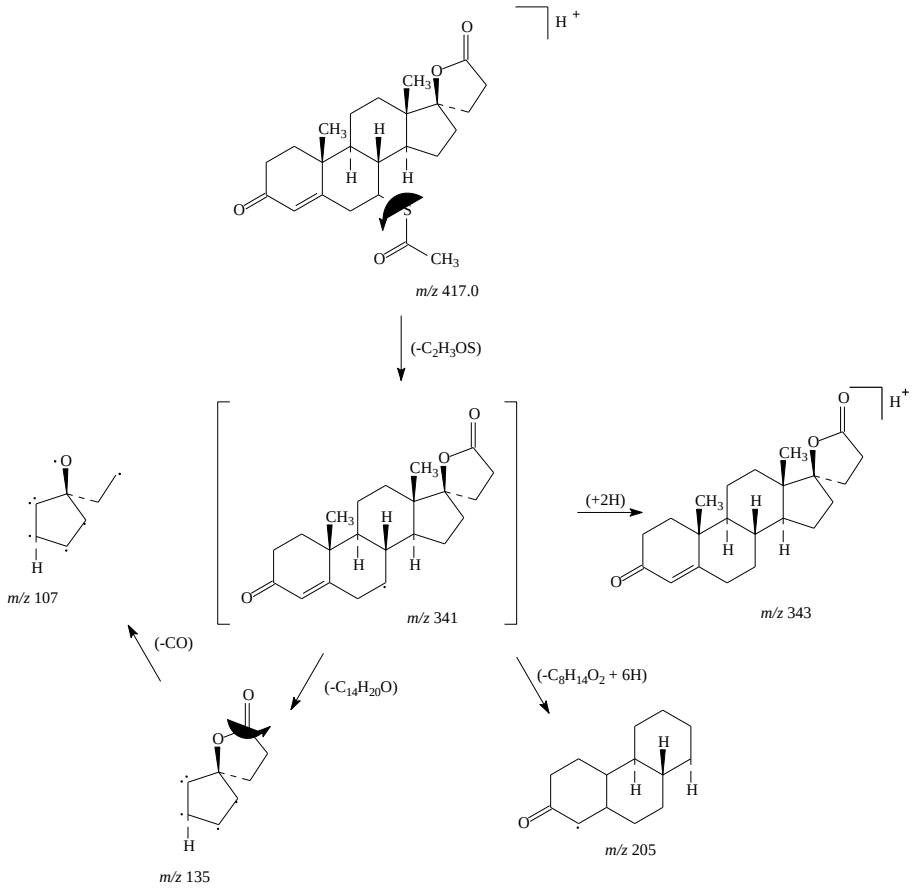


Figura 66 - Espironolactona e subprodutos de degradação identificados após a aplicação do processo de fotólise à solução aquosa do composto.

5.4.5.2 Fotocatálise heterogênea aplicada ao efluente hospitalar fortificado de Espironolactona

Para estudo dos subprodutos da Espironolactona pela aplicação de fotocatálise heterogênea em efluente hospitalar do composto após os 60 min reacionais fez-se um experimento de íon precursor *m/z* 107,0 com EC 30 V, este fragmento produto é característico da fragmentação estrutural da Espironolactona. E obteve-se o seguinte espectro como mostra a figura 67.

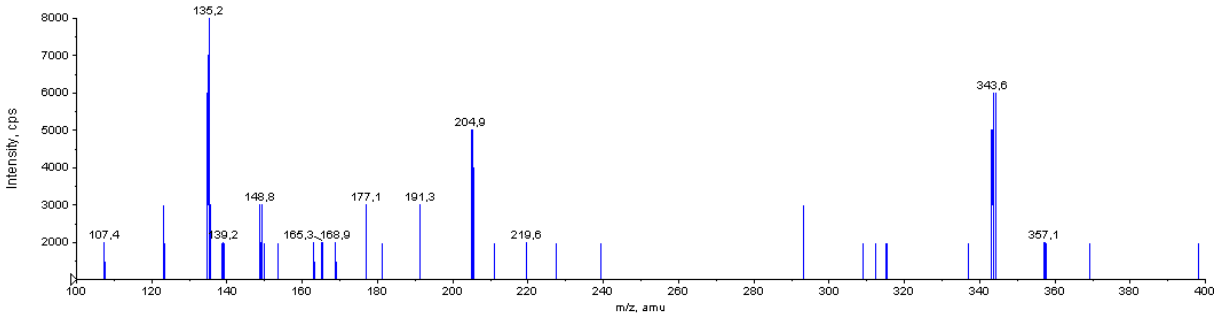


Figura 67 - Espectro de massas do experimento PREC (107) com EC de 30 V. Subprodutos da Espironolactona em efluente hospitalar submetido à fotocatálise heterogênea.

Como pode-se observar os íons precursores da *m/z* 107,0 mais intensos foram praticamente os mesmos que na fotólise em solução aquosa do composto com exceção do subproduto *m/z* 357,0 que encontra-se no espectro da figura 68.

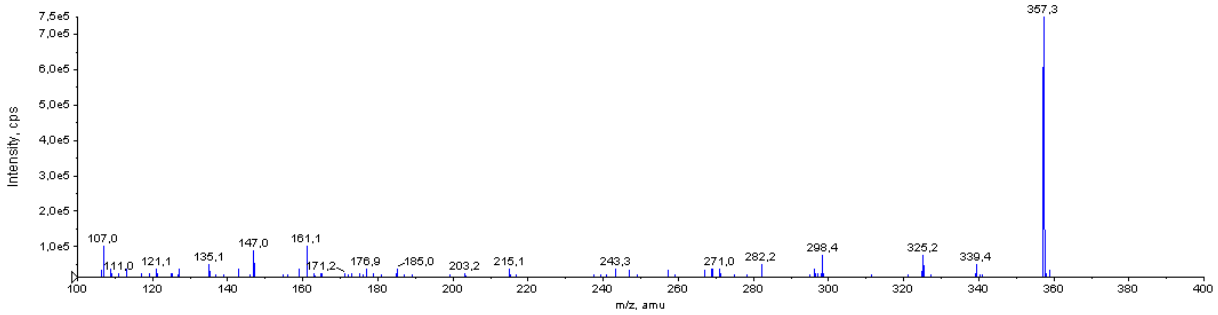


Figura 68 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Espironolactona *m/z* 357,0. Experimento PREC (107) + EPI com EC 30 V. Efluente hospitalar submetido à fotocatálise heterogênea.

Propõe-se para este subproduto *m/z* 357,0 a entrada de uma HO• à estrutura molecular da Espironolactona. A estrutura molecular proposta para este subproduto *m/z* 357,0 encontra-se na figura 69.

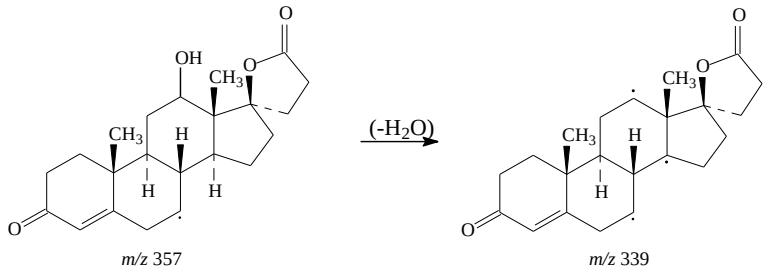


Figura 69- Estrutura molecular do subproduto da Espironolactona *m/z* 357,0.

O primeiro fragmento observado no espectro de massas EPI para o subproduto *m/z* 357,0 é o íon produto *m/z* 339,0, para este, propõe-se a saída de uma molécula de água do íon precursor.

O espectro de massas EPI do subproduto da Espironolactona encontrado em amostra de efluente hospitalar submetido ao processo de fotocatálise *m/z* 343,0, encontra-se na figura 70.

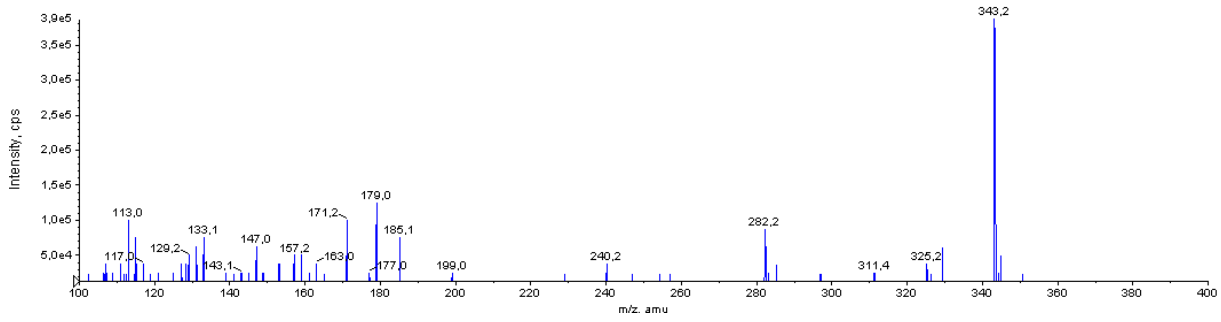


Figura 70 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Espironolactona *m/z* 343,0. Experimento PREC (107) + EPI com EC 30 V. Efluente hospitalar submetido à fotocatálise heterogênea.

Comparando este espectro do subproduto *m/z* 343,0 em amostra de efluente hospitalar e o espectro de massas EPI da Espironolactona em solução aquosa (Figura 58, pag. 207) onde o mesmo subproduto foi encontrado, observa-se o mesmo comportamento na fragmentação estrutural do íon precursor gerando os íons produto *m/z* 311,0; 282,0; 240,0 e 179,0. A estrutura molecular proposta para o subproduto *m/z* 343,0, pode ser observada na (Figura 59, pag. 208).

O espectro EPI para o subproduto de *m/z* 135,0 também encontrado em solução aquosa submetida à fotólise (Figura 62, pag. 209) e, pode ser observado na figura 71.

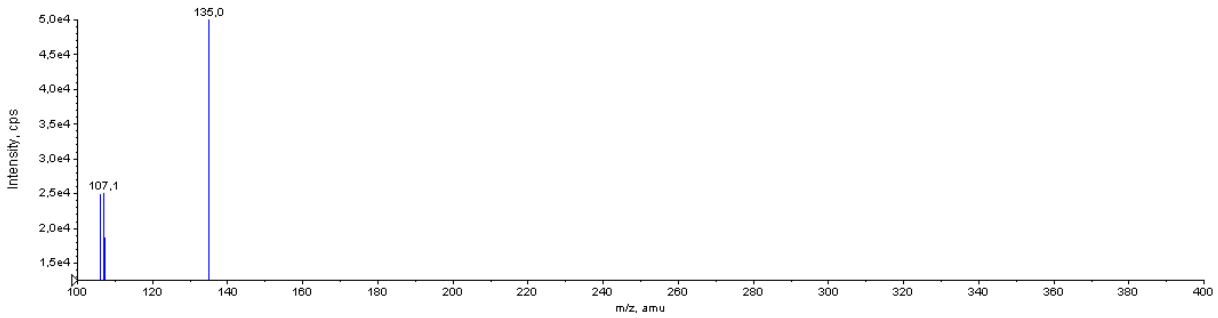


Figura 71 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Espironolactona *m/z* 135,0. Experimento PREC (107) + EPI com EC 30 V. Efluente hospitalar submetido à fotocatálise heterogênea.

Como pode-se observar no espectro acima, o perfil espectral foi exatamente o mesmo do espectro adquirido em solução aquosa. A estrutura molecular para este composto já foi previamente proposta na (Figura 63, pag. 210).

O espectro de massas EPI para o subproduto de menor massa identificado para Espironolactona encontra-se na figura 72.

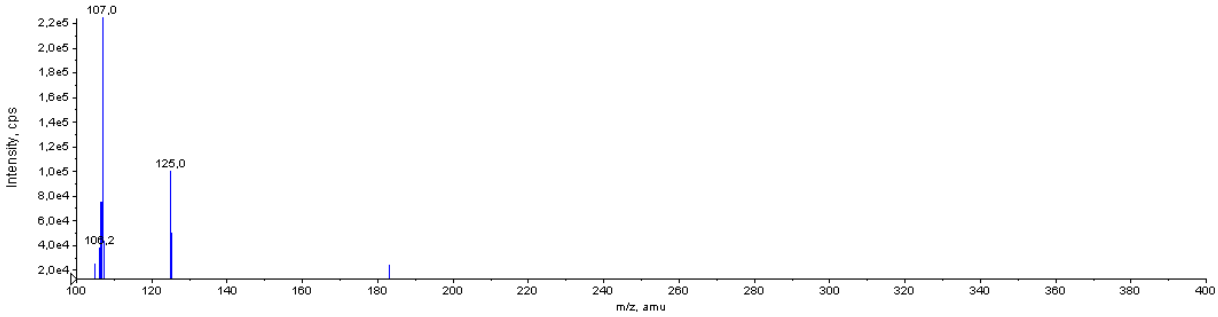


Figura 72 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Espironolactona *m/z* 107,0. Experimento PREC (107) + EPI com EC 30 V. Efluente hospitalar submetido à fotocatálise heterogênea.

Assim como no espectro de massas do subproduto anterior este, também, se iguala completamente ao espectro adquirido para este subproduto *m/z* 107,0 tanto em solução aquosa, quanto em efluente hospitalar. As estruturas moleculares propostas para este subproduto e seu fragmento estão previamente descritas na figura 65, pag. 211.

Seguindo as *m/z* encontradas nos experimentos de MS-IDA-PREC(107) de EPI com a EC aplicada para cada subproduto objetivando a obtenção da melhor fragmentação estrutural, na figura 73 encontram-se a estrutura molecular da Espironolactona decrescida do grupamento etil sulfóxido, seguida das estruturas propostas para seus subprodutos formados pelo processo de fotocatálise heterogênea aplicada ao efluente hospitalar enriquecido do composto.

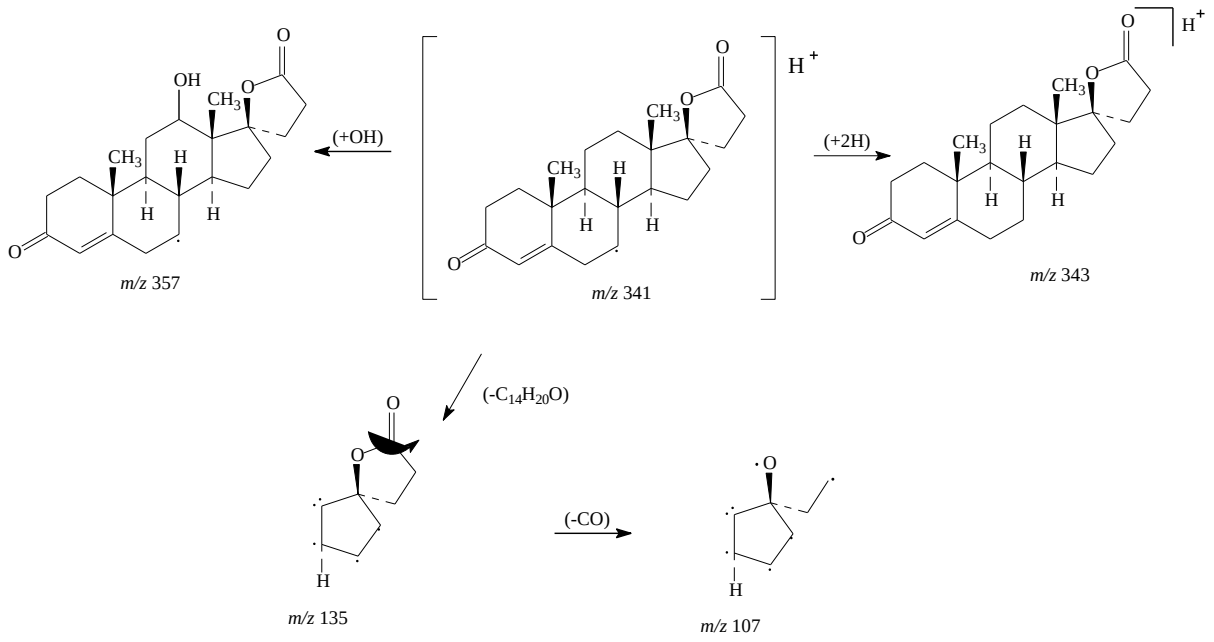


Figura 73 - Espironolactona e subprodutos de degradação identificados após a aplicação do processo de fotocatálise heterogênea ao efluente hospitalar enriquecido do composto.

5.4.5.3 Ozonização aplicada à solução aquosa de Espironolactona

O mesmo experimento de PREC (107) foi feito para estudo dos subprodutos da Espironolactona pela aplicação de ozonização em solução aquosa do composto após os 60 min reacionais. O seguinte espectro foi obtido figura 74.

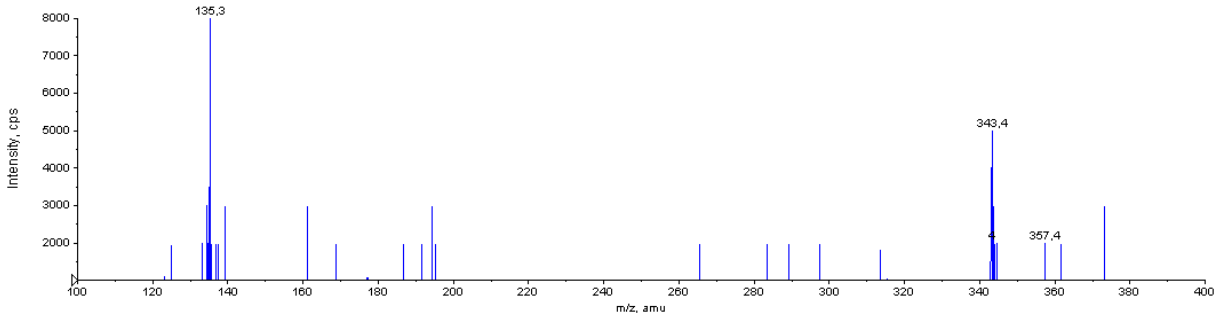


Figura 74 - Espectro de massas do experimento (PREC 107) com EC de 30 V. Subprodutos da Espironolactona em solução aquosa submetida à ozonização.

Observando o espectro de massas PREC (107), percebe-se que os principais subprodutos identificados pela aplicação do processo de ozonização à solução aquosa do composto são praticamente os mesmos que os encontrados pela aplicação do processo fotólise e fotocatálise heterogênea à solução aquosa e ao efluente hospitalar, respectivamente. O espectro de massas EPI para o subproduto *m/z* 357,9 encontra-se na figura 75.

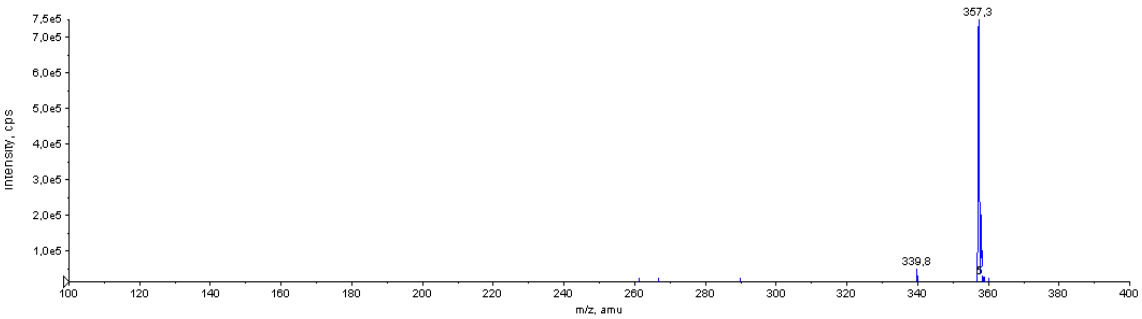


Figura 75 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Espironolactona *m/z* 357,0. Experimento PREC (107) + EPI com EC 10 V. Solução aquosa submetida à ozonização.

Em amostra de efluente hospitalar submetida ao processo de fotocatálise heterogênea este subproduto *m/z* 357,0 apresentou uma maior quantidade de fragmentos no espectro de massas EPI utilizando uma EC de 30 V. Neste espectro de massas EPI com EC 10 V (melhor energia de colisão para este subproduto nesta amostra), apenas um fragmento de massas foi identificado *m/z* 339,0, porém, este fragmento também esta presente no espectro EPI obtido por fotocatálise (Figura 68, pag. 213). A estrutura molecular proposta para este subproduto encontra-se na (Figura 69, pag. 214).

O subproduto *m/z* 343,0 identificado por fotólise e fotocatálise heterogênea, também foi identificado em solução aquosa do composto Espironolactona submetida ao processo de ozonização. O espectro EPI obtido encontra-se na figura 76.

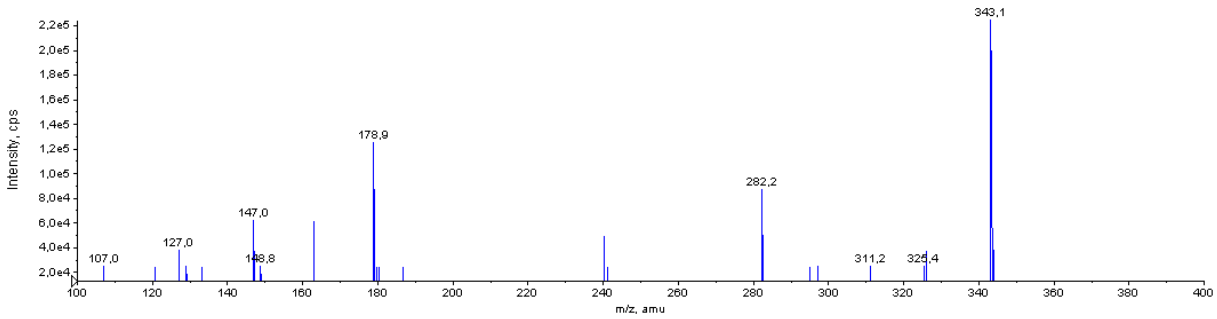


Figura 76 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Espironolactona *m/z* 343,0. Experimento PREC (107) + EPI com EC 30 V. Solução aquosa submetida à ozonização.

Neste espectro, os íons produtos *m/z* 311,0; 282,0 e 179,0 também foram identificados no espectro de massas EPI em solução aquosa do composto onde fotólise foi aplicada (Figura 58). E os fragmentos *m/z* 325,0; 311,0; 282,0; 179,0 e 147,0 são os mesmos que foram identificados no espectro EPI do efluente hospitalar exposto ao processo de fotocatálise heterogênea (Figura 71). O fragmento *m/z* 107,0 aparece no espectro dando uma maior ênfase ao experimento PREC, sendo este, a busca dos precursores desta *m/z* fazendo um aumento das massas (EPI) com diferentes energias de colisão, sendo que nos dois casos fotocatálise e ozonização o EPI com EC de 30 V apresentou uma melhor fragmentação do composto. A estrutura molecular para este subproduto *m/z* 343,0 previamente proposta pode ser visualizada na figura 60.

O espectro de massas EPI do subproduto da Espironolactona *m/z* 135,0 pode ser observado na figura 77.

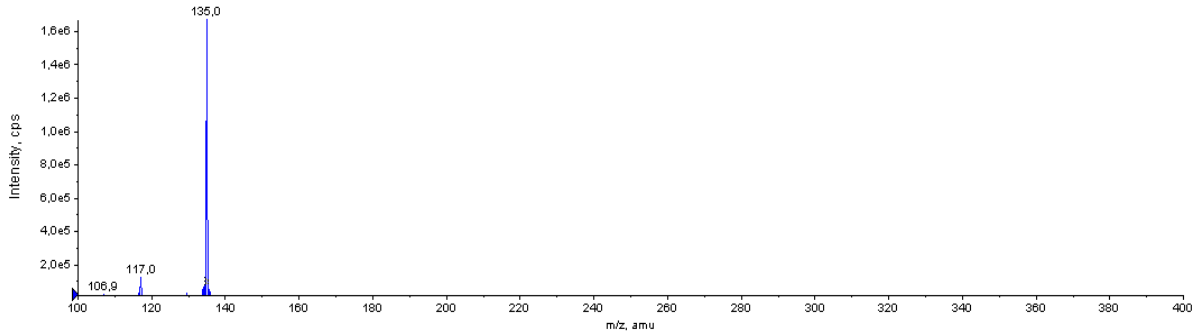


Figura 77 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Espironolactona *m/z* 135,0. Experimento PREC (107) + EPI com EC 10 V. Solução aquosa submetida à ozonização.

Observando o espectro EPI acima identifica-se os mesmos fragmentos de massas encontrados nos espectros EPI anteriores para este subproduto pela aplicação dos outros processos oxidativos fotólise e fotocatálise heterogênea (Figuras 62, pag. 209 e 71, pag. 215, respectivamente), com exceção do fragmento *m/z* 117,0 identificado apenas neste espectro. A estrutura molecular para este subproduto já foi proposta na (Figura 63, pag. 212).

De acordo com as *m/z* encontradas nos experimentos de MS-IDA-PREC(107) seguido de EPI com a EC aplicada para cada subproduto objetivando a obtenção da melhor fragmentação estrutural, encontram-se na figura 78 a estrutura molecular da Espironolactona decrescida do grupamento etil sulfóxido, seguida das estruturas propostas para seus subprodutos formados pela aplicação do processo de ozonização à solução aquosa do composto.

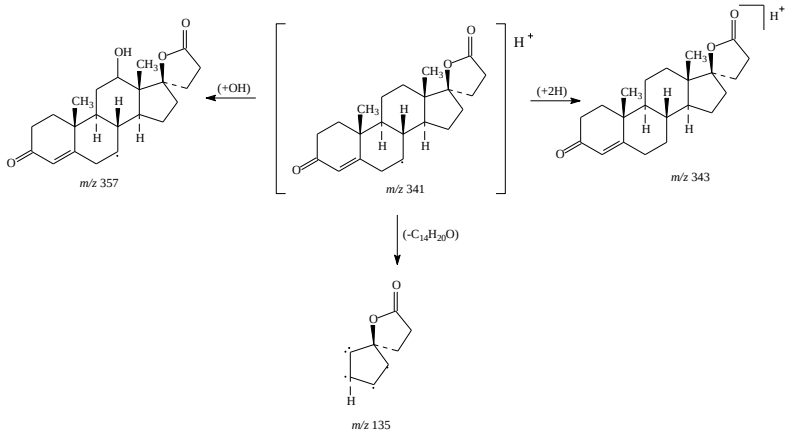


Figura 78 - Espironolactona e subprodutos de degradação identificados após a aplicação do processo de ozonização à solução aquosa do composto.

O que sugere-se para o subproduto da Espironolactona *m/z* 357,0 (subproduto de maior massa identificado) é a entrada de uma hidroxila à estrutura molecular da Espironolactona. Para o subproduto de segunda maior *m/z* 343,0 propõe-se a entrada de 2 hidrogênios a estrutura da Espironolactona. E, para o último subproduto identificado em solução aquosa do composto *m/z* 135,0 observa-se a ruptura da estrutura molecular da Espironolactona restando a butironolactona ligada ao anel ciclopentano destituído de 4 hidrogênios.

5.4.5.4 Ozonização aplicado ao efluente hospitalar fortificado de Espironolactona

Os subprodutos da Espironolactona em efluente hospitalar enriquecido e submetido ao processo de ozonização também foram estudados utilizando tempo de reação de 60 min. Com o experimento de PREC (107) utilizando CE de 30 V foi possível obter os espectros de massas dos íons precursores gerando, desta maneira, espectros de massas EPI para estudo e confirmação dos fragmentos gerados para cada subproduto. Sendo que, os principais subprodutos identificados foram *m/z* 375,0; 343,0 e 135,0 (Figura 79).

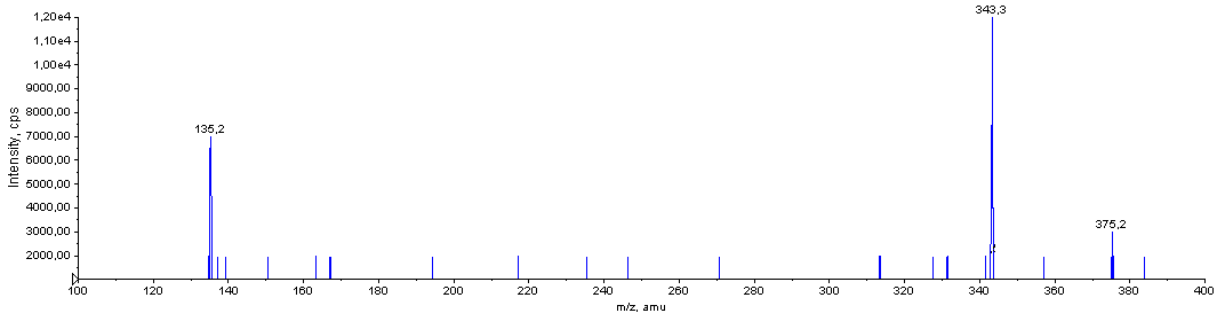


Figura 79- Espectro de massas do experimento (PREC 107) com CE de 30 V. Subprodutos da Espironolactona em efluente hospitalar submetido à ozonização.

Como pode ser observado no espectro de PREC (107) acima descrito, os subprodutos identificados são praticamente os mesmos que foram previamente encontrados para este composto submetido à fotólise e ozonização em solução aquosa e, em efluente hospitalar onde o processo de fotocatálise heterogênea foi aplicado como também, no presente caso, ozonização. No espectro de massas EPI (Figura 80) encontra-se o único subproduto que não havia sido previamente identificado *m/z* 375,0.

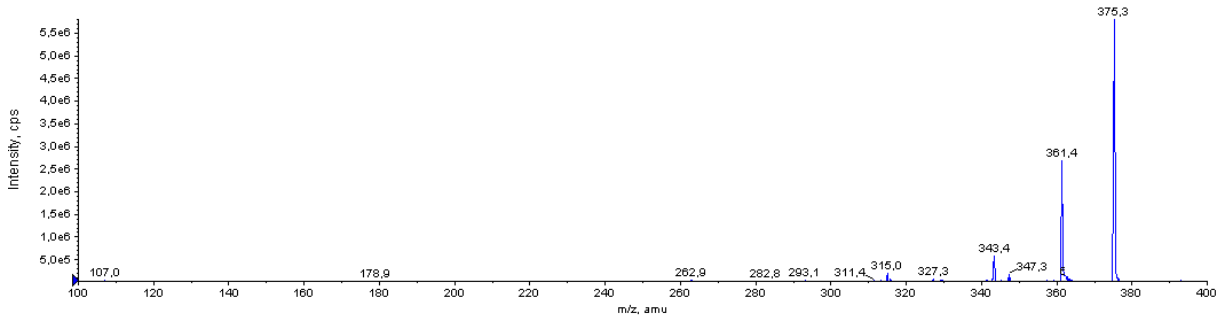
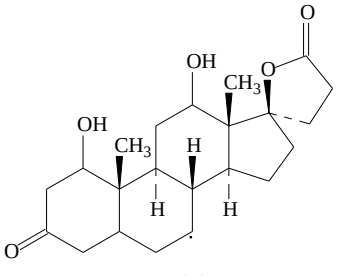


Figura 80 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Espironolactona *m/z* 375,0. Experimento PREC (107) + EPI com CE 10 V. Efluente hospitalar submetido à ozonização.

No espectro de massas EPI para o subproduto da Espironolactona *m/z* 375,0 observa-se que os principais fragmentos encontrados nos espectros dos outros subprodutos, bem como, pela aplicação de outros processos oxidativos também aparecem no espectro deste subproduto como *m/z* 311,0; 282,0 e o íon produto característico da fragmentação da Espironolactona *m/z* 107,0. A estrutura molecular para este subproduto foi proposta (Figura 81).



m/z 375

Figura 81 - Estrutura molecular do subproduto da Espironolactona *m/z* 375,0.

Propõe-se para este subproduto *m/z* 375,0 a entrada de 2 hidroxilas à estrutura molecular da Espironolactona *m/z* 341,0, como também, a abertura da dupla ligação do ciclohexano para entrada de dois hidrogênios a molécula.

Na figura 82, o espectro de massas EPI com EC de 10 V onde o subproduto *m/z* 343,0 foi identificado em amostra de efluente hospitalar do composto exposto ao processo de ozonização.

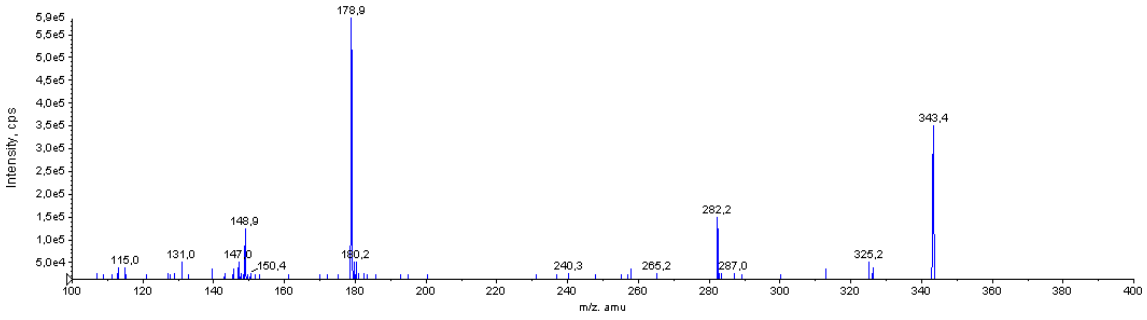


Figura 82 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Espironolactona *m/z* 343,0. Experimento PREC (107) + EPI com EC 10 V.Efluente hospitalar submetido à ozonização.

O espectro de fragmentação do subproduto *m/z* 343,0 caracteriza-se pela presença dos íons produto *m/z* 325,0; 282,0; 179,0 e 147,0. E, a estrutura molecular foi proposta para este subproduto (Figura 59, pag. 208).

Espectro de massas EPI para o subproduto da Espironolactona *m/z* 135,0 identificado em amostra de efluente hospitalar submetida ao processo de ozonização (Figura 83).

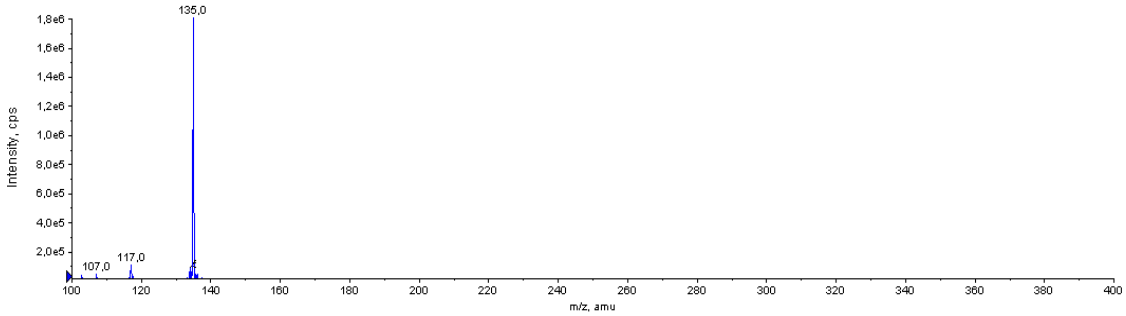


Figura 83 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Espironolactona *m/z* 135,0. Experimento PREC (107) + EPI com EC 10 V. Efluente hospitalar submetido à ozonização.

O espectro de massas EPI do subproduto *m/z* 135,0 obtido neste experimento é o mesmo adquirido para este composto em solução aquosa submetida à ozonização.

Este subproduto da Espironolactona *m/z* 343,0, bem como, o subproduto *m/z* 135,0 foram encontrados em todas as amostras e, em todos os processos avançados de oxidação aplicados a elas.

Com relação as *m/z* encontradas nos experimentos de MS-IDA-PREC(107) seguido de EPI com a EC aplicada para cada subproduto objetivando a obtenção da melhor fragmentação estrutural, na figura 84, encontram-se a estrutura molecular da Espironolactona decrescida do grupamento etil sulfóxido, seguida das estruturas propostas para seus subprodutos formados pelo processo de ozonização aplicado ao efluente hospitalar enriquecido do composto.

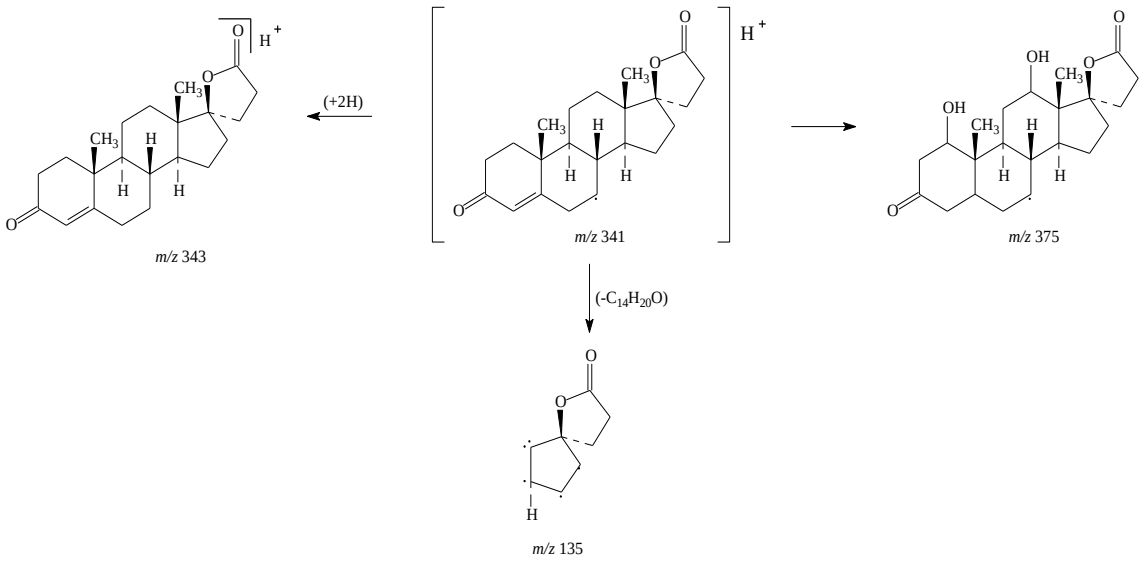


Figura 84 - Espironolactona e subprodutos de degradação identificados após a aplicação do processo de ozonização ao efluente hospitalar enriquecido do composto.

5.4.5.5 Fotólise aplicada à solução aquosa de Flutamida

Um experimento IDA PREC (202) com uma CE de -24 V (Figura 85) foi utilizado para identificação e estudo dos subprodutos da Flutamida em solução aquosa submetida à reação de fotólise por 60 min.

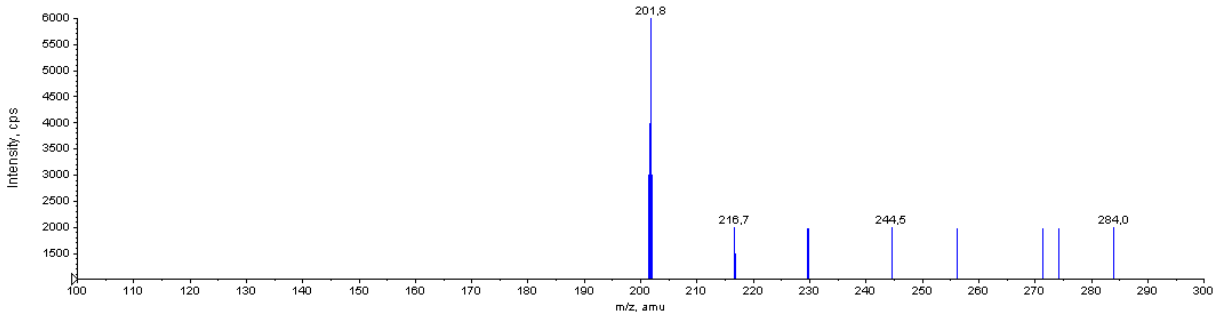


Figura 85 - Espectro de massas do experimento -PREC (202) com EC -24 V. Subprodutos da Flutamida em solução aquosa submetida à fotólise.

A escolha do íon precursor *m/z* 202,0 para este experimento foi pelo fato de este íon ser o mais intenso quando o composto Flutamida foi exposto à fragmentação estrutural. O espectro de massas EPI (Figura 86) mostra o subproduto da Flutamida *m/z* 284,0 como íon precursor e seus íons produtos, ou seja, os fragmentos gerados com uma EC de -30 V.

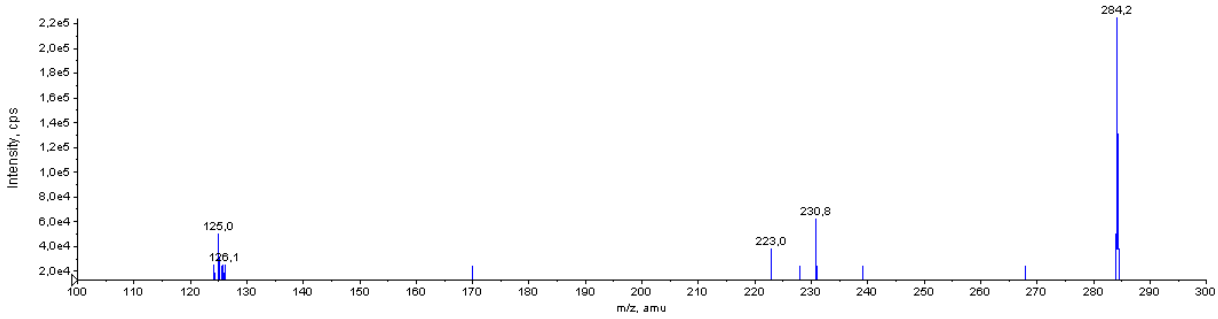
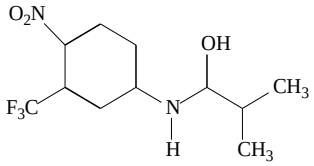


Figura 86 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Flutamida *m/z* 284,0. Experimento -PREC (202) + EPI com EC -30 V. Solução aquosa submetida à fotólise.

Propõe-se para a estrutura molecular deste subproduto *m/z* 284,0 (Figura 87) a saída de todas as duplas ligações da molécula de Flutamida para entrada de 9 hidrogênios dando origem ao subproduto formado.

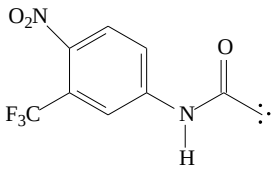


m/z 284

Figura 87 - Estrutura molecular do subproduto da Flutamida *m/z* 284,0.

O subproduto *m/z* 245,0 não alcançou o limite mínimo de intensidade (cps), para que seu íon precursor pudesse ser fragmentado em íons produtos no experimento de EPI.

Propõe-se estruturalmente para este composto a saída de dois grupamentos metila e mais um hidrogênio da estrutura molecular da Flutamida (Figura 88).



m/z 245

Figura 88 - Estrutura molecular do subproduto da Flutamida *m/z* 245,0.

Espectro de massas EPI do subproduto de degradação *m/z* 217,0 proveniente da reação fotocatalítica em solução aquosa de Flutamida (Figura 89).

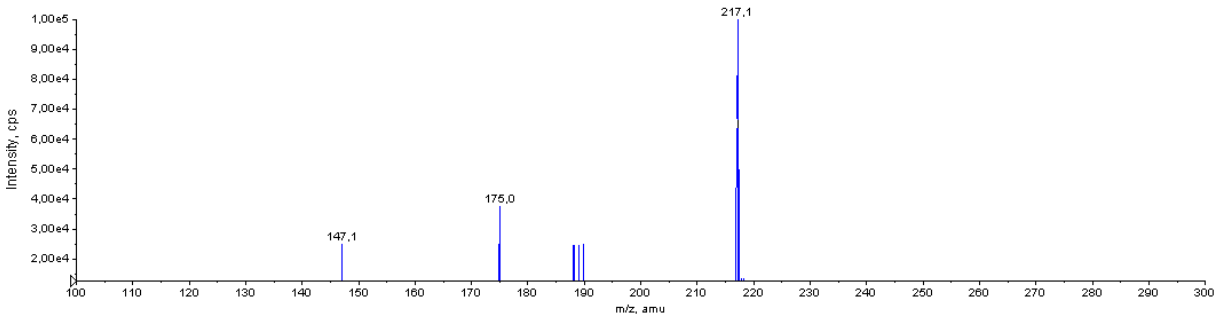
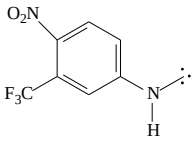


Figura 89- Espectro de massas EPI do produto de degradação da Flutamida *m/z* 217,0. Experimento -PREC (202) + EPI com EC -24 V. Solução aquosa submetida à fotólise.

Como formação estrutural para este subproduto *m/z* 217,0 partindo da estrutura molecular da Flutamida *m/z* 275,0 indica-se a saída do grupamento propila e, também, a saída do oxigênio da molécula (Figura 90).



m/z 217

Figura 90 - Estrutura molecular do subproduto da Flutamida *m/z* 217,0.

Espectro de massas EPI do último subproduto identificado para a Flutamida *m/z* 202,0 em solução aquosa submetida à fotólise (Figura 91).

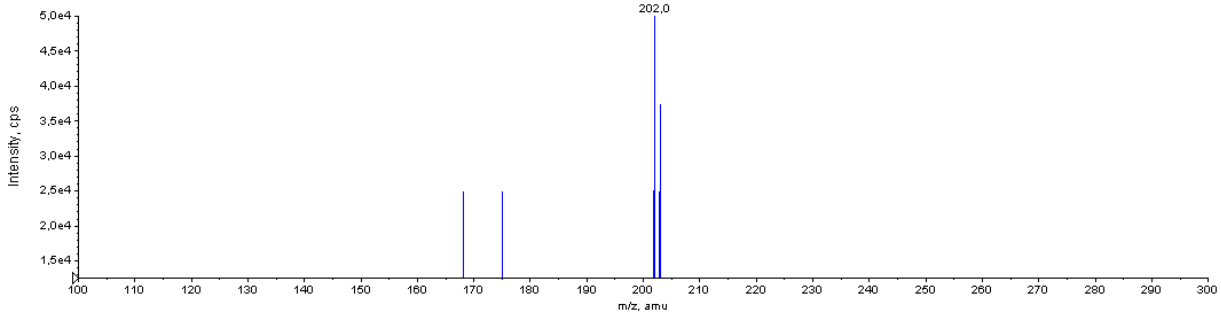
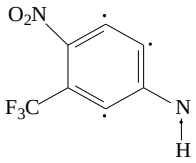


Figura 91 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Flutamida *m/z* 202,0. Experimento -PREC (202) + EPI com EC -24 V. Solução aquosa submetida à fotólise.

Como pode-se observar no espectro acima, praticamente não se obteve fragmentos do íon precursor, devido a baixa intensidade do mesmo. A estrutura molecular proposta para este subproduto deve-se a quebra da estrutura molecular da Flutamida com a saída do isobutiraldeido e mais 3 hidrogênios formando a estrutura do subproduto *m/z* 202,0 (Figura 92).



m/z 202

Figura 92 - Estrutura molecular do subproduto da Flutamida *m/z* 202,0.

De acordo com as *m/z* encontradas nos experimentos de MS-IDA/-PREC(202) seguido de EPI com a EC aplicada para cada subproduto objetivando a obtenção da melhor fragmentação estrutural pode-se observar a estrutura molecular da Flutamida, seguida das estruturas propostas e previamente comentadas, para cada um de seus subprodutos formados pelo processo de fotólise aplicada à solução aquosa do composto (Figura 93).

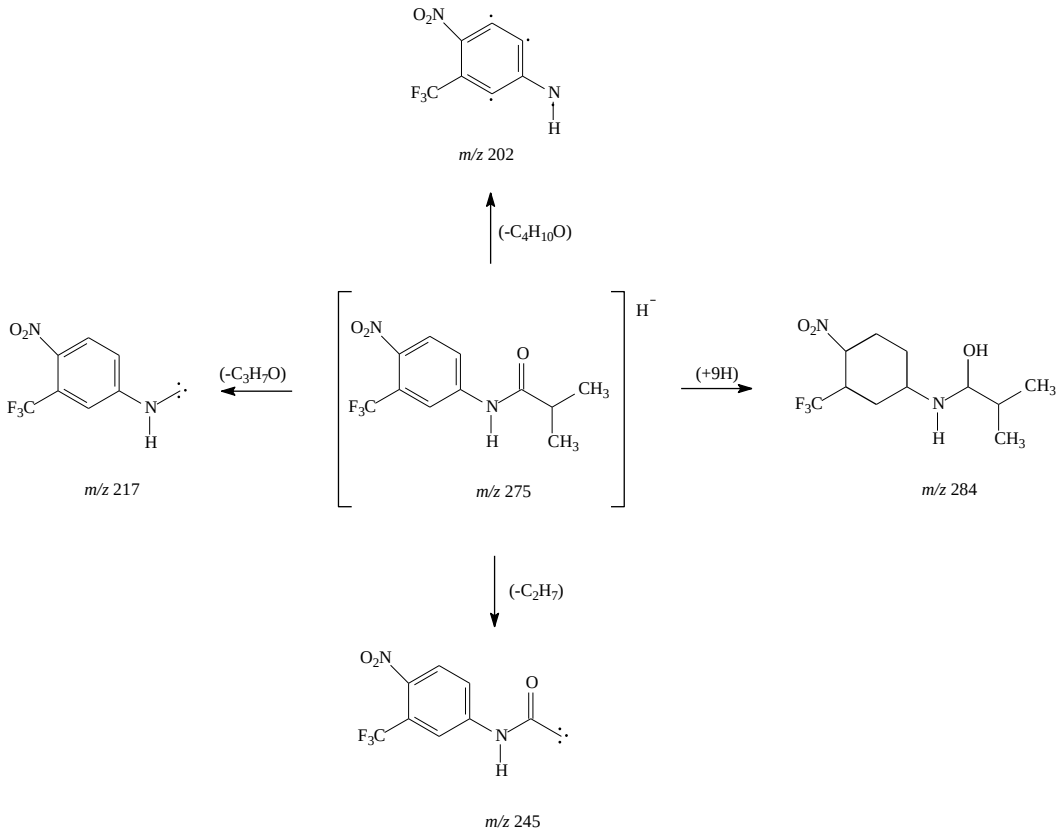


Figura 93 - Flutamida e subprodutos de degradação identificados após a aplicação do processo de fotólise aplicado à solução aquosa do composto.

5.4.5.6 Fotocatálise heterogênea aplicada ao efluente hospitalar fortificado de Flutamida

Em efluente hospitalar fortificado do composto Flutamida submetido à 60 min de fotocatálise heterogênea o experimento IDA -PREC (202) com uma EC de -24 V (Figura 94) foi utilizado para identificação e estudo dos subprodutos.

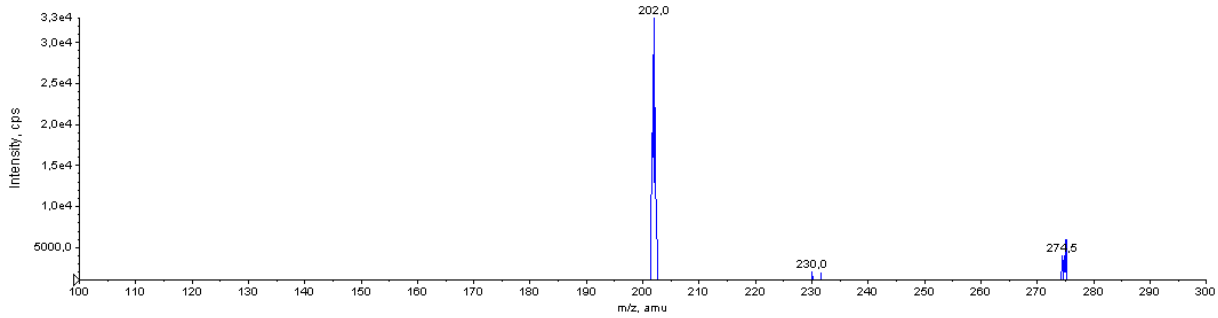


Figura 94 - Espectro de massas do experimento -PREC (202) com CE de -24 V. Subprodutos da Flutamida em efluente hospitalar submetido à fotocatálise heterogênea.

Diferentes subprodutos foram identificados para este composto correlacionando fotólise aplicada à solução e fotocatálise em efluente hospitalar. Observa-se ainda, a *m/z* 275,0 correspondente à estrutura molecular da Flutamida e, como subprodutos *m/z* 230,0 e 202,0 foram identificados e espectros de massas EPI foram obtidos para estudo de fragmentação estrutural de cada um deles. Na figura 95, encontra-se o espectro de massas EPI para o subproduto *m/z* 230,0.

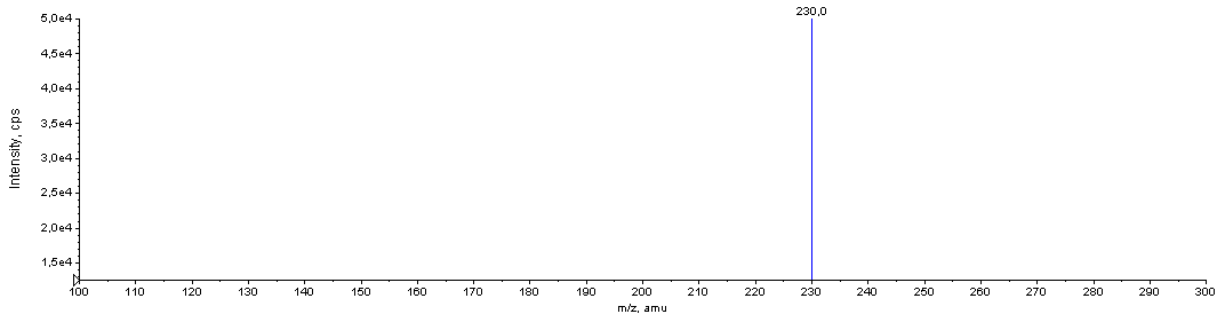
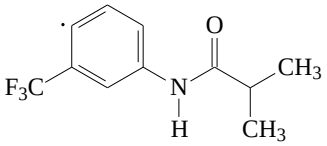


Figura 95 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Flutamida *m/z* 230,0. Experimento -PREC (202) + EPI com CE -30 V. Efluente hospitalar submetido à fotocatálise heterogênea.

Partindo da estrutura molecular da Flutamida, sugere-se para este subproduto encontrado em amostra de efluente hospitalar submetida à 60 min de fotocatálise heterogênea a saída do dióxido de nitrogênio e formação da estrutura molecular do subproduto *m/z* 230,0 (Figura 96).

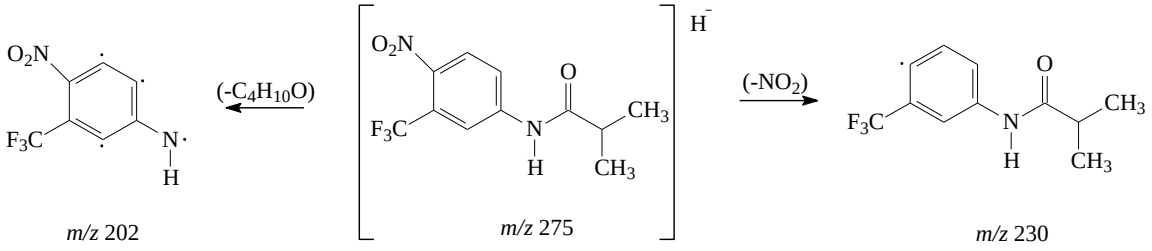


m/z 230

Figura 96 - Estrutura molecular do subproduto da Flutamida *m/z* 230,0.

Assim como outros subprodutos da Flutamida em solução aquosa, o subproduto *m/z* 202,0 encontrado em amostra de efluente hospitalar não alcançou o limite de intensidade (cps), para o experimento de EPI. A estrutura molecular para este subproduto foi proposta na (Figura 92, pag. 227).

De acordo com as *m/z* encontradas nos experimentos de MS-IDA/-PREC(202) seguido de EPI com a CE aplicada para cada subproduto objetivando a obtenção da melhor fragmentação estrutural, observa-se a estrutura molecular da Flutamida, seguida das estruturas propostas e previamente comentadas, para cada um de seus subprodutos formados pelo processo de fotocatálise heterogênea aplicado ao efluente hospitalar enriquecido do composto (Figura 97).



m/z 202 *m/z* 275 *m/z* 230

Figura 97 - Flutamida e subprodutos de degradação identificados após a aplicação do processo de fotocatálise heterogênea aplicado ao efluente hospitalar enriquecido do composto.

5.4.5.7 Ozonização aplicado à solução aquosa de Flutamida

O experimento IDA -PREC (202) com uma EC de -24 V (Figura 98) foi utilizado para identificação e estudo dos subprodutos da Flutamida em solução aquosa submetida à reação de ozonização por 60 min.

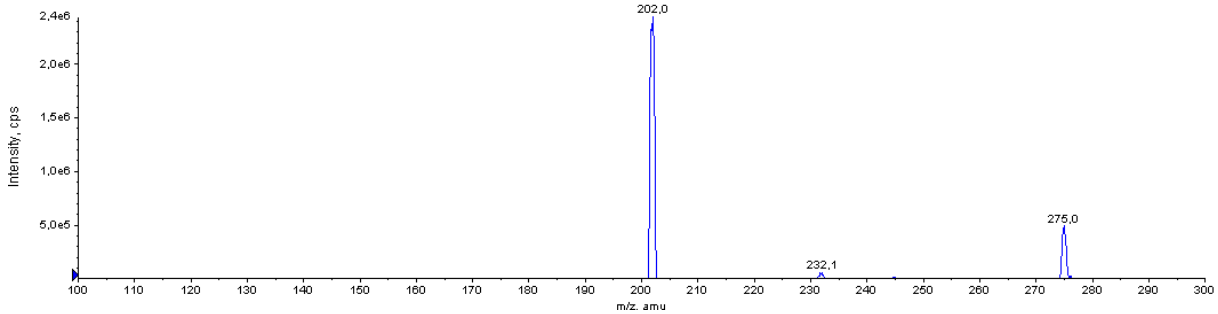


Figura 98 - Espectro de massas do experimento -PREC (202) com EC -24 V. subprodutos da Flutamida em solução aquosa submetida à ozonização.

Neste experimento, observa-se também, a *m/z* 275,0 correspondente à estrutura molecular da Flutamida e, como subprodutos *m/z* 232,0 e 202,0.

O experimento de -PREC (202) gerou o espectro de massas EPI com EC -10 V onde, o subproduto da Flutamida *m/z* 232,0 foi identificado e fragmentado, o íon precursor e os íons produtos gerados com esta energia de colisão aplicada pode ser observados (Figura 99).

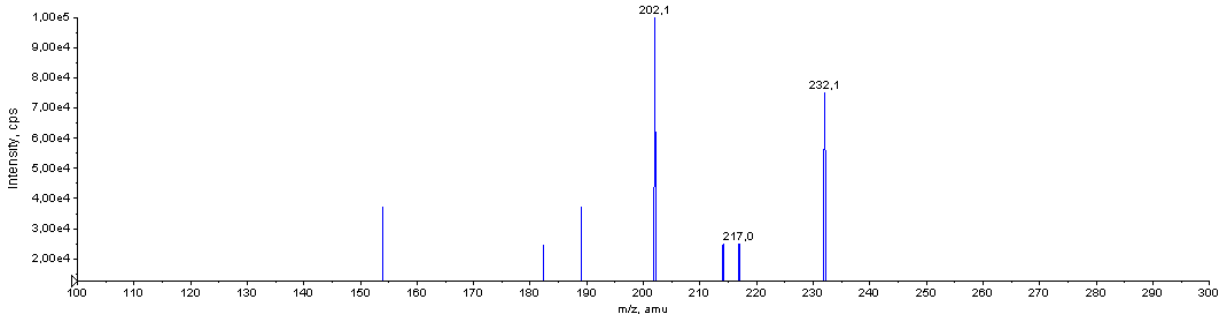


Figura 99- Espectro de massas EPI do produto de degradação da Flutamida *m/z* 232,0. Experimento -PREC (202) + EPI com EC -24 V. Solução aquosa submetida à ozonização.

Espectro de massas EPI do subproduto da Flutamida *m/z* 202,0, identificado e fragmentado com uma CE de -24 V (Figura 100).

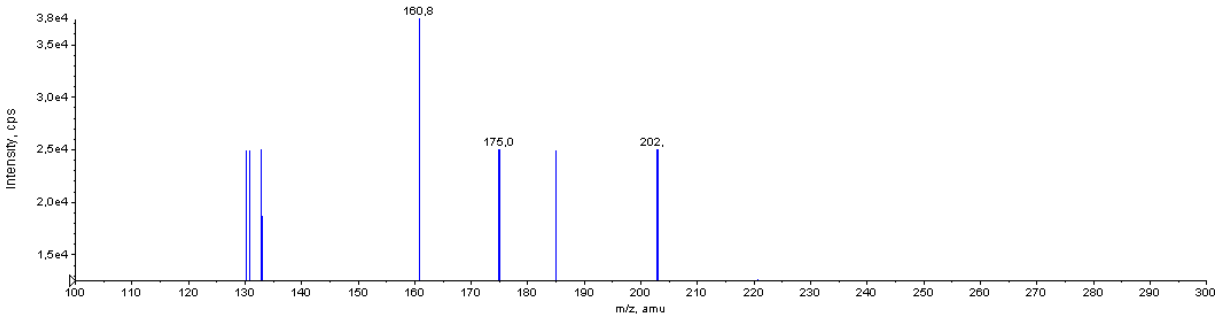


Figura 100 - Espectro de massas EPI do produto de degradação da Flutamida *m/z* 202,0. Experimento -PREC (202) + EPI com CE -24 V. Solução aquosa submetida à ozonização.

Os dois subprodutos de reação pela aplicação do processo de ozonização à solução aquosa de Flutamida foram identificados por experimentos de MS-IDA/-PREC(202) seguido de EPI com as CE aplicadas para obtenção das melhores fragmentações estruturais para cada subproduto sendo que, suas estruturas foram propostas partindo da estrutura da Flutamida onde tem-se o subproduto *m/z* 232,0 pela saída do dióxido de nitrogênio, abertura de uma das duplas ligações do anel aromático e, desta forma, entrada de 2 hidrogênios à estrutura. E, o outro subproduto identificado em todas as amostras e processos estudados *m/z* 202,0 como previamente descrita é formada pela saída do isobutiraldeido e mais 3 hidrogênios da Flutamida (Figura 101).

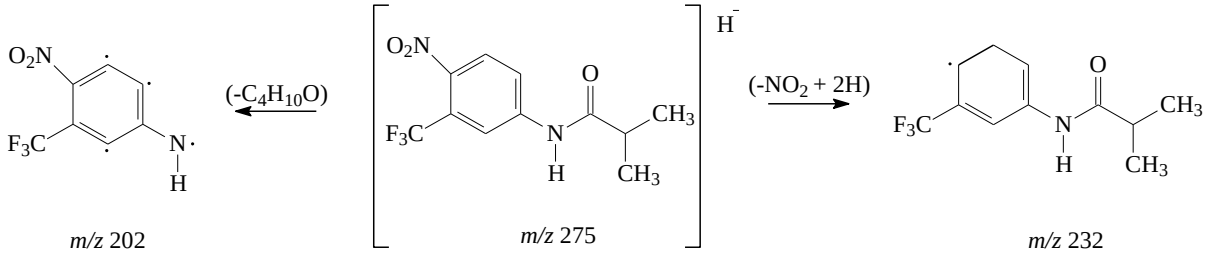


Figura 101 - Flutamida e subprodutos de degradação identificados após a aplicação do processo de ozonização aplicado à solução aquosa do composto.

5.4.5.8 Ozonização aplicado ao efluente hospitalar fortificado com Flutamida

Após 60 min de reação por ozonização a amostra de efluente hospitalar foi submetida ao experimento IDA -PREC (202) com uma EC de -24 V e, o espectro de massas gerado pode ser observado na figura 102.

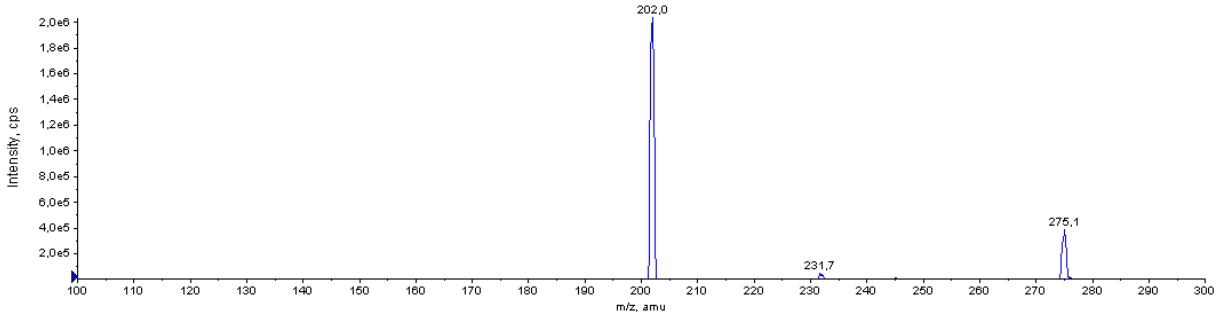


Figura 102 - Espectro de massas do experimento -PREC (202) com CE -24 V. Subprodutos da Flutamida em efluente hospitalar submetido à ozonização.

Como pode-se observar no espectro de massas do experimento -PREC (202), foram identificados os mesmos subprodutos obtidos em solução aquosa submetida ao processo de ozonização *m/z* 232, 0 e 202,0. No estudo de fragmentação estrutural para estes compostos observa-se em amostra de efluente hospitalar o mesmo comportamento nos espectros EPI, portanto, as estruturas, bem como, a rota de degradação partindo da estrutura molecular da Flutamida foi proposta no item 5.4.5.7 figura 101.

5.4.5.9 Fotólise aplicada à solução aquosa de Ciproterona

Para a identificação dos subprodutos da Ciproterona pela aplicação de fotólise à solução aquosa do composto nos 60 min reacionais utilizou-se um experimento IDA PREC (357), fragmento este, característico dos compostos de acetato de Ciproterona, especialmente nos estudos de fragmentação estrutural realizados neste trabalho. Uma EC de 30 V foi utilizada neste experimento para obtenção dos subprodutos (Figura 103).

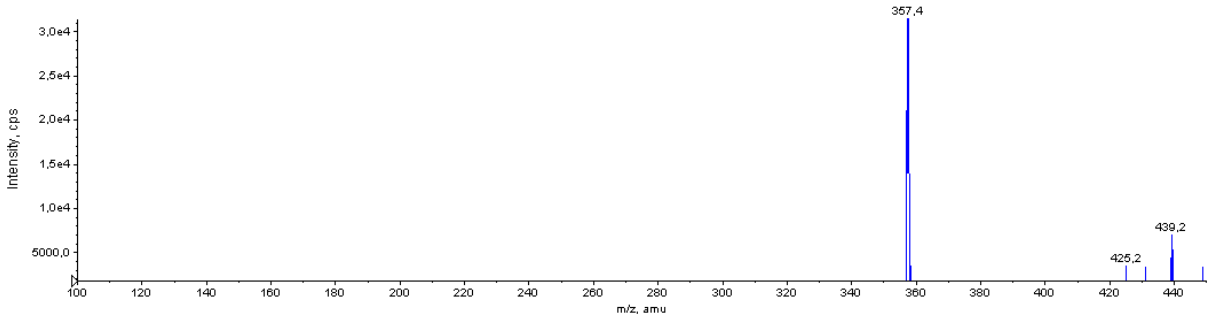


Figura 103 – Espectro de massas do experimento PREC (357) com CE de 30 V. Subprodutos da Ciproterona em solução aquosa submetida à fotólise.

No espectro de PREC (357) acima descrito, observa-se que 3 subprodutos foram obtidos nos 60 min de reação *m/z* 439,0; 425,0 e 357,0. O espectro de massas EPI obtido para o subproduto *m/z* 439,0 encontra-se na figura 104.

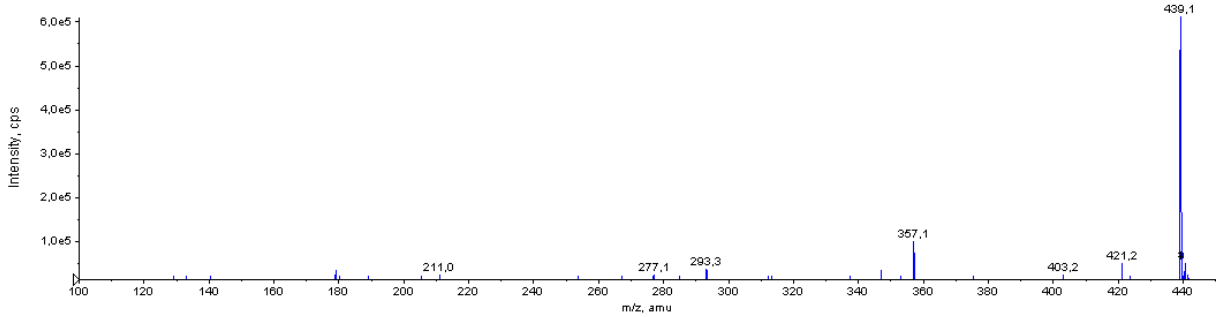
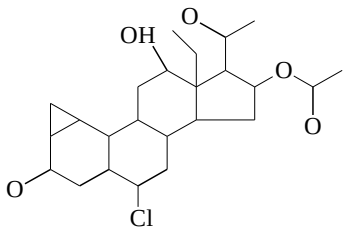


Figura 104 – Espectro de massas EPI do produto de degradação da Ciproterona *m/z* 439,0. Experimento PREC (357) + EPI com CE 30 V. Solução aquosa submetida à fotólise.

Observa-se no espectro EPI para o subproduto *m/z* 439,0, o fragmento característico da Ciproterona *m/z* 357,0 o que, adere uma maior confiabilidade estrutural ao subproduto obtido. A partir da estrutura molecular da Ciproterona *m/z* 417,0 sugere-se a entrada de uma hidroxila e abertura de todas as duplas ligações da molécula, resultando assim, na estrutura molecular de *m/z* 439,0 (Figura 105).



m/z 439,0

Figura 105 - Estrutura molecular do subproduto da Ciproterona *m/z* 439,0.

Na figura 106 encontra-se espectro de massas EPI obtido para o subproduto *m/z* 425,0.

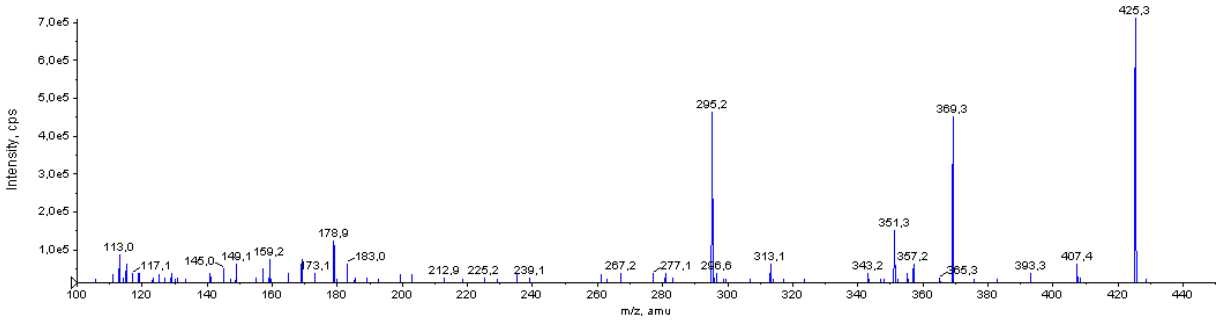
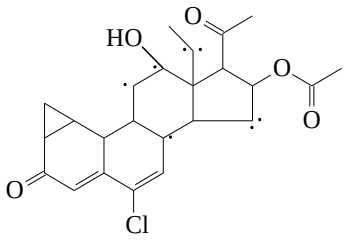


Figura 106 – Espectro de massas EPI do produto de degradação da Ciproterona *m/z* 425,0. Experimento PREC (357) + EPI com CE 30 V. Solução aquosa submetida à fotólise.

Pela análise deste espectro EPI para o subproduto *m/z* 425,0, obtido em solução aquosa da Ciproterona submetida à fotólise, observa-se a presença do íon precursor com maior intensidade (cps) e, seus íons produto, dentre eles, o fragmento *m/z* 357,0 mesmo em baixa intensidade. Para formação estrutural deste subproduto *m/z* 425,0 (Figura 107), sugere-se a entrada de uma hidroxila e saída de 7 hidrogênios da estrutura molecular da Ciproterona.



m/z 425,0

Figura 107 - Estrutura molecular do subproduto da Ciproterona *m/z* 425,0.

O espectro de massas EPI obtido para o subproduto *m/z* 357,0 encontra-se na figura 108.

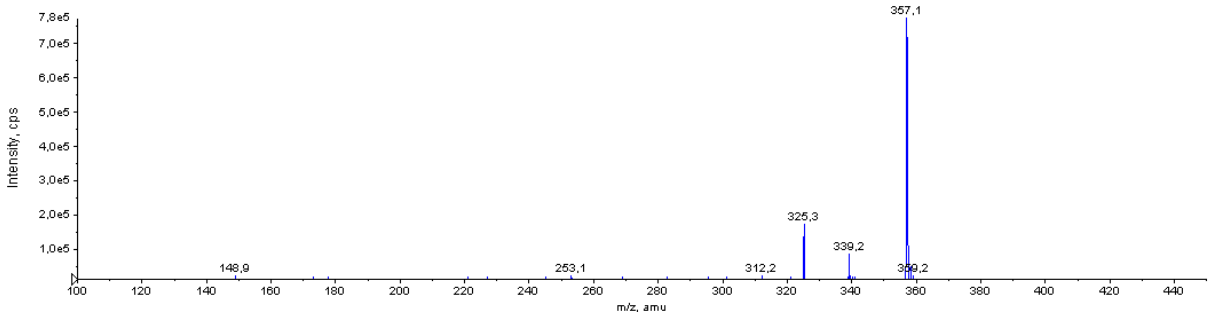
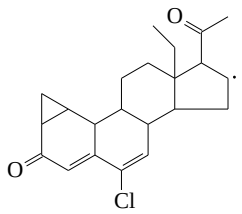


Figura 108 – Espectro de massas EPI do produto de degradação da Ciproterona *m/z* 357,0. Experimento PREC (357) + EPI com EC 20 V. Solução aquosa submetida à fotólise.

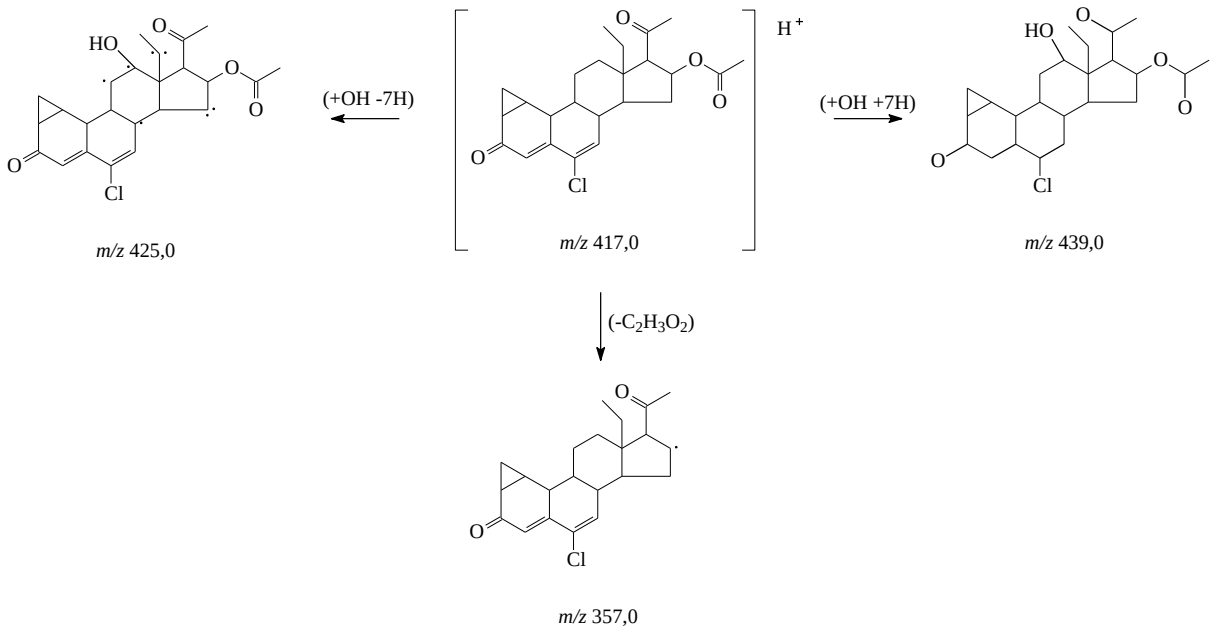
Como este subproduto é um fragmento característico do acetato de Ciproterona propõe-se a saída do grupamento acetato da mesma e formação do subproduto *m/z* 357,0 (Figura 109).



m/z 357,0

Figura 109 – Estrutura molecular do subproduto da Ciproterona *m/z* 357,0.

De acordo com as *m/z* encontradas nos experimentos de MS-IDA-PREC(357) seguido de EPI com as EC aplicadas para obtenção das melhores fragmentações estruturais para cada subproduto, observa-se a estrutura molecular de Ciproterona, seguida das estruturas propostas e previamente comentadas para cada um de seus subprodutos formados (Figura 110).



m/z 425,0 *m/z* 417,0 *m/z* 439,0

m/z 357,0

Figura 110- Ciproterona e subprodutos de degradação identificados após a aplicação do processo de fotólise aplicado à solução aquosa do composto.

5.4.5.10 Fotocatálise heterogênea aplicada ao efluente hospitalar enriquecido de Ciproterona

Pela aplicação do experimento PREC (357) em amostra de efluente hospitalar submetido a 60 min de fotocatálise heterogênea exatamente os mesmos subprodutos da fotólise aplicada à solução aquosa do composto (item 4.4.5.8) foram identificados (Figura 111).

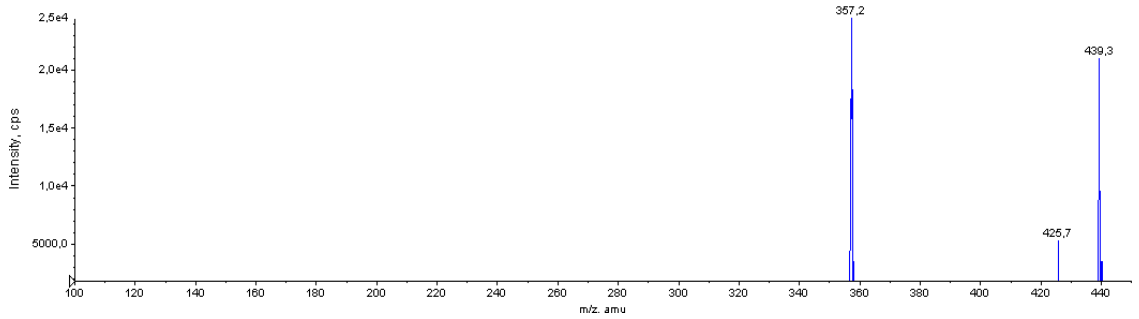


Figura 111 – Espectro de massas do experimento PREC (357) com CE de 30 V. Subprodutos da Ciproterona em efluente hospitalar submetido à fotocatálise heterogênea.

Na figura 112, encontra-se o espectro de massas EPI obtido para o subproduto *m/z* 439,0 identificado em amostra de efluente hospitalar.

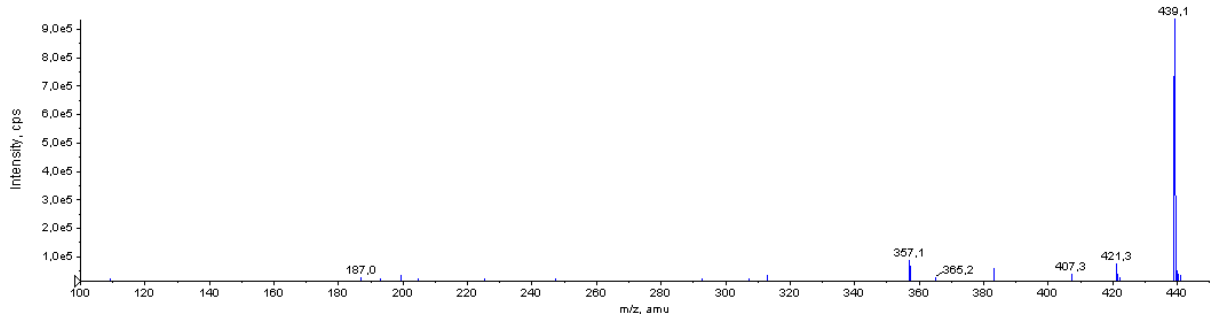


Figura 112 – Espectro de massas EPI do produto de degradação da Ciproterona *m/z* 439,0. Experimento PREC(357) + EPI com CE 20 V. Efluente hospitalar submetido à fotocatálise heterogênea.

Comparando com o mesmo espectro EPI obtido para este subproduto pela aplicação da fotólise em solução aquosa (Figura 104, pag. 234), observaram-se os íons produto *m/z* 421,0 e 357,0 em ambos os espectros, embora, as CE aplicadas não tenham sido as mesmas. A estrutura molecular previamente proposta para este subproduto encontra-se na figura 105, pag. 235.

O espectro de massas EPI obtido para o subproduto *m/z* 425,0 identificado em amostra de efluente hospitalar encontra-se na figura 113.

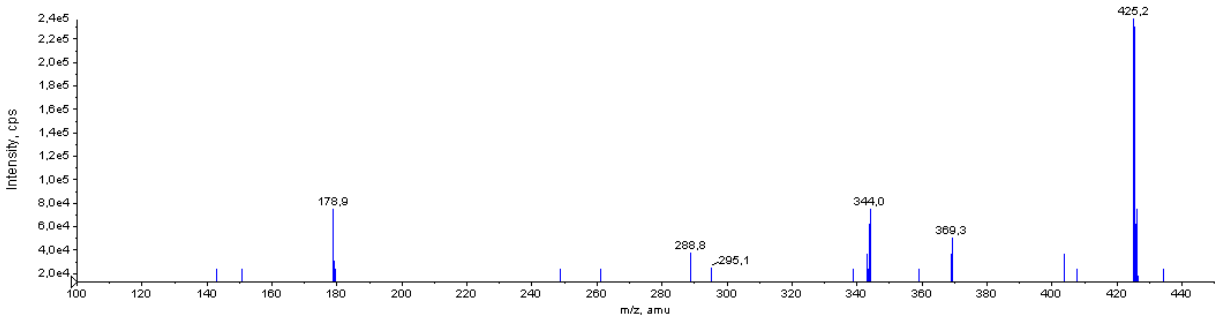


Figura 113 – Espectro de massas EPI do produto de degradação da Ciproterona *m/z* 425,0. Experimento PREC (357) + EPI com CE 20 V. Efluente hospitalar submetido à fotocatálise heterogênea.

Aplicando uma CE diferente do espectro EPI obtido em solução aquosa para este subproduto os íons produto identificados nos dois espectros de massas de ambas as amostras foram *m/z* 369,0; 295,0 e 179,0. Da mesma forma, a estrutura molecular para este subproduto foi previamente proposta no item 4.4.5.8, figura 107, pag. 236.

O subproduto *m/z* 357,0 identificado na amostra de efluente hospitalar encontra-se no espectro de massas EPI (Figura 114).

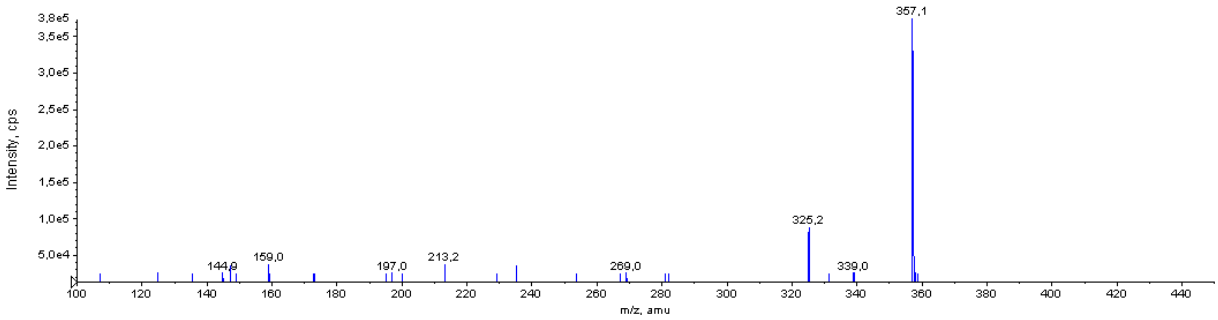


Figura 114 – Espectro de massas EPI do produto de degradação da Ciproterona *m/z* 357,0. Experimento PREC (357) + EPI com CE 30 V. Efluente hospitalar submetido à fotocatálise heterogênea.

Pela comparação com o espectro de massas EPI obtido para fotólise em solução aquosa com CE de 20 V para este subproduto *m/z* 357,0 os fragmentos *m/z* 339,0 e 325,0 foram os de maior intensidade nos dois espectros. A estrutura molecular previamente proposta para este subproduto pode ser observada na figura 109, pag. 237.

Como os subprodutos obtidos em solução aquosa submetida à fotólise foram os mesmos do que os obtidos por fotocatálise heterogênea em efluente hospitalar o Caminho de degradação de Ciproterona e seus subprodutos identificados após a aplicação do processo foi previamente proposto.

5.4.5.11 Ozonização aplicado à solução aquosa de Ciproterona

O experimento PREC (357) em solução aquosa de Ciproterona submetida a 60 min de ozonização apresentou os subprodutos *m/z* 413,0; 375,0 e 357,0 (Figura 115).

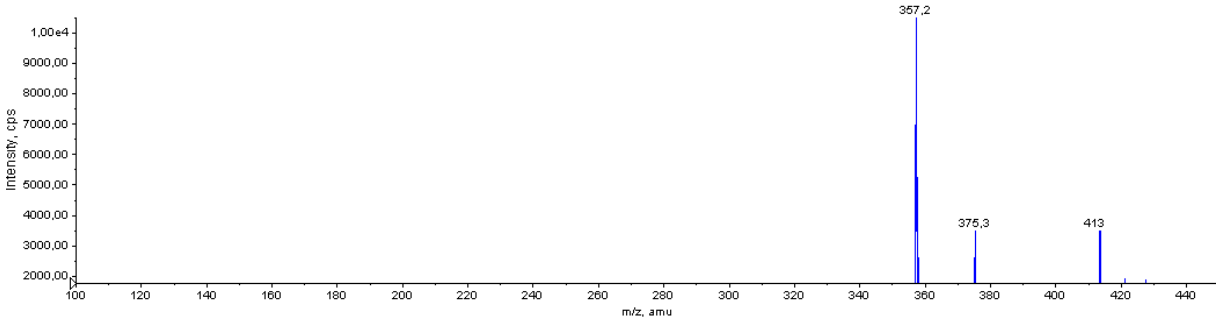


Figura 115 – Espectro de massas do experimento PREC (357) com CE de 30 V. Subprodutos da Ciproterona em solução aquosa submetida à ozonização.

O espectro de massas EPI obtido para o subproduto *m/z* 413,0 encontra-se na figura 116.

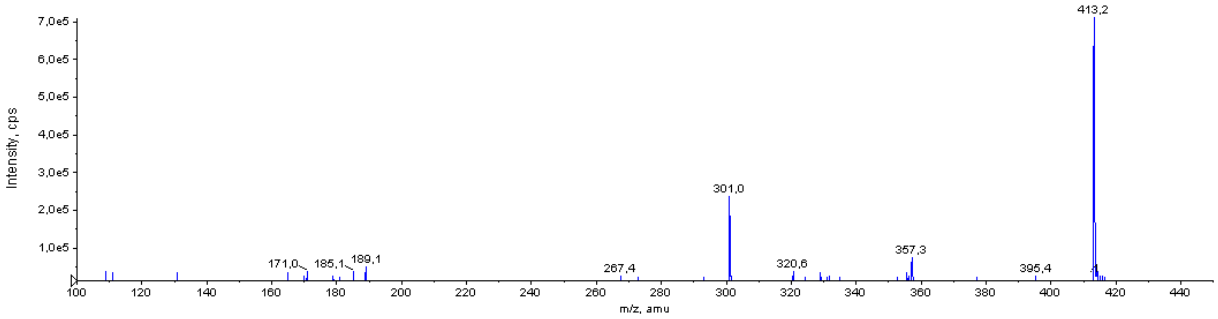
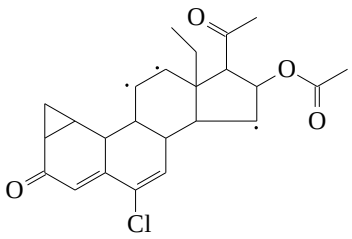


Figura 116 – Espectro de massas EPI do produto de degradação da Ciproterona *m/z* 413,0. Experimento PREC (357) + EPI com CE 30 V. solução aquosa submetida à ozonização.

Analisando o espectro de massas EPI obtido para este subproduto *m/z* 413,0 em solução aquosa submetida ao processo de ozonização observa-se o íon precursor *m/z* 413,0 com maior intensidade (cps) e os principais íons produto obtidos aplicando-se uma CE de 30 V. Para formação estrutural deste subproduto propõe-se a saída de 3 hidrogênios da estrutura molecular da Ciproterona (Figura 117).



m/z 413,0

Figura 117- Estrutura molecular do subproduto da Ciproterona *m/z* 413,0.

O espectro de massas EPI obtido para o subproduto *m/z* 375,0 encontra-se na figura 118.

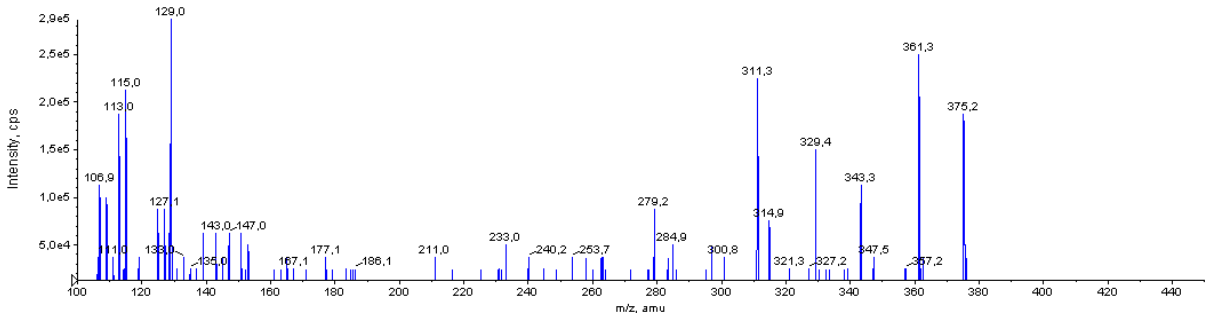
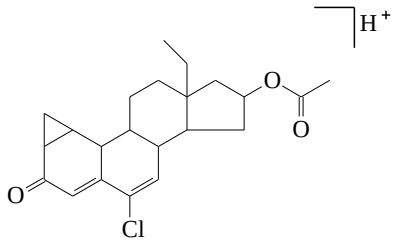


Figura 118 – Espectro de massas EPI do produto de degradação da Ciproterona *m/z* 375,0. Experimento PREC (357) + EPI com CE 30 V. solução aquosa submetida à ozonização.

Ao observar o espectro de massas EPI para o subproduto *m/z* 375,0, pode-se perceber uma grande quantidade de fragmentos/íons produto formados a partir do íon precursor *m/z* 375,0 com essa CE de 30 V. Pela saída do grupamento etanol da estrutura molecular da Ciproterona forma-se o subproduto acima identificado (Figura 119).



m/z 375,0

Figura 119 - Estrutura molecular do subproduto da Ciproterona *m/z* 375,0.

Também pela aplicação do processo de ozonização em solução aquosa do composto o subproduto *m/z* 357,0 foi identificado pelo experimento PREC (357) e o íon precursor foi fragmentado pelo experimento EPI com uma EC de 30 V (Figura 120).

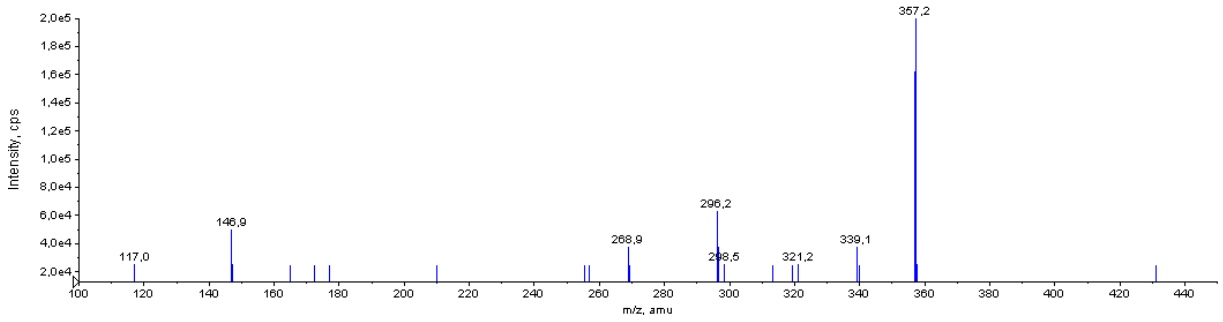


Figura 120 – Espectro de massas EPI do produto de degradação da Ciproterona *m/z* 357,0. Experimento PREC (357) + EPI com CE 30 V. solução aquosa submetida à ozonização.

O fragmento/íon produto de *m/z* 339,0, também identificado nos experimentos de fotólise e fotocatálise heterogênea em ambas as amostras analisadas encontra-se presente neste espectro de massas EPI. Portanto a estrutura molecular do subproduto da Ciproterona *m/z* 357 foi previamente proposta na figura 109, pag. 237.

De acordo com as *m/z* encontradas nos experimentos de MS-IDA-PREC(357) seguido de EPI para estudo das fragmentações obtidas, observa-se a estrutura molecular do acetato de Ciproterona, seguida das estruturas propostas e previamente comentadas para cada um de seus subprodutos formados (Figura 121).

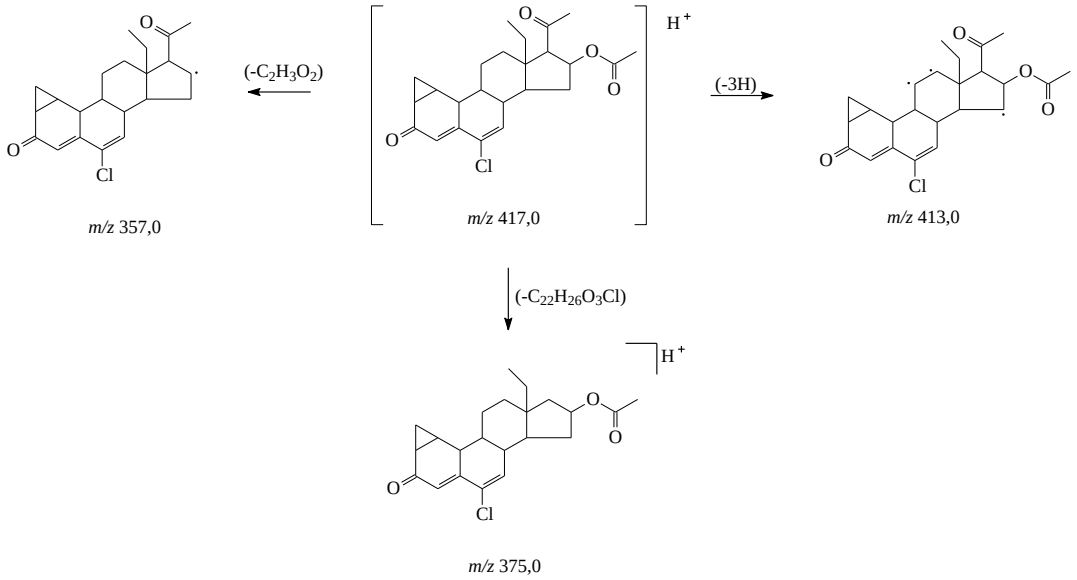


Figura 121 - Acetato de Ciproterona e subprodutos de degradação identificados após a aplicação do processo de ozonização à solução aquosa do composto.

5.4.5.12 Ozonização aplicado ao efluente hospitalar fortificado de Ciproterona

Para identificação e estudo dos subprodutos da Ciproterona em amostra de efluente hospitalar enriquecido do composto e submetido ao processo de ozonização por 60 min aplicou-se o experimento PREC (357) com CE de 30 V seguido de EPI (Figura 122).

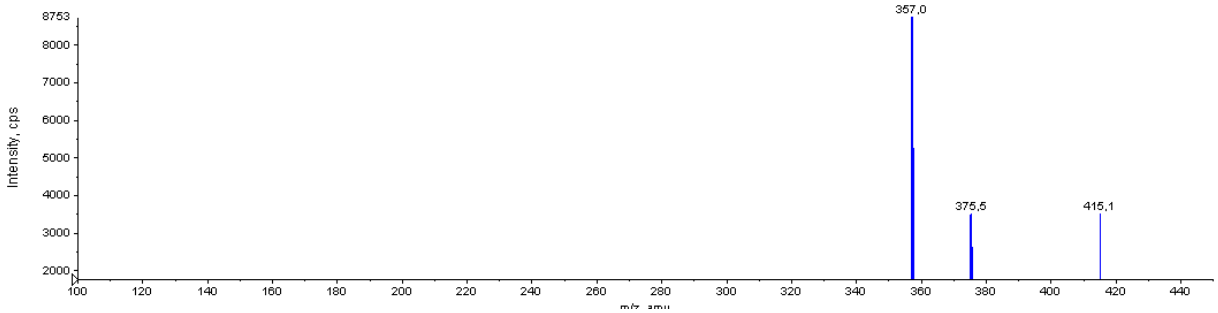


Figura 122 – Espectro de massas do experimento PREC (357) com CE de 30 V. Subprodutos da Ciproterona em efluente hospitalar submetido à ozonização.

Pelo espectro PREC (357) obtido em amostra de efluente hospitalar submetida ao processo de ozonização obteve-se os subprodutos *m/z* 415,0; 375,0 e 357,0, sendo que os dois últimos citados foram previamente identificados em solução aquosa do composto submetida à ozonização.

O espectro de massas EPI para o subproduto de *m/z* 415,0 pode ser observado na figura 123.

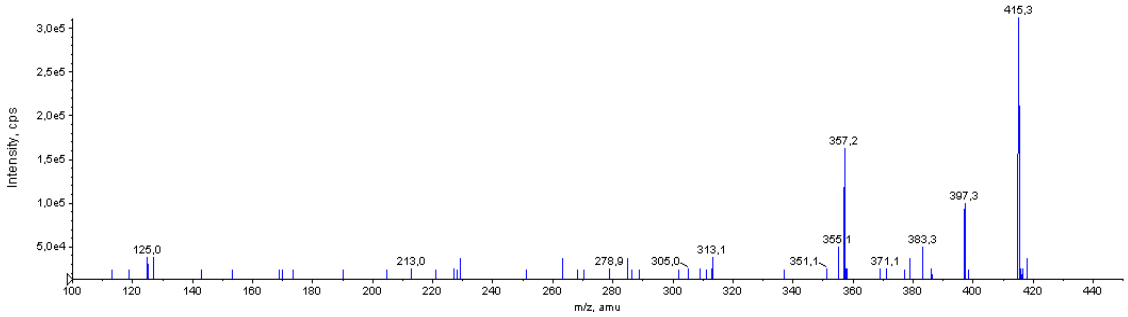
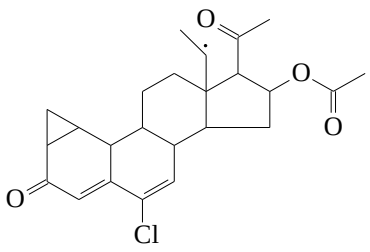


Figura 123 – Espectro de massas EPI do produto de degradação da Ciproterona *m/z* 415,0. Experimento PREC (357) + EPI com CE 30 V. Efluente hospitalar submetido à ozonização.

Por meio do espectro de massas EPI obtido em amostra de efluente hospitalar submetido à ozonização obteve-se o íon precursor *m/z* 415,0 e os íons produto da fragmentação utilizando uma CE de 30 V, sendo que, os mais intensos foram os fragmentos *m/z* 397,0 e 357,0. Partindo da estrutura molecular da Ciproterona observa-se a saída de um hidrogênio e formação do subproduto *m/z* 415,0 (Figura 124).



m/z 415,0

Figura 124 - Estrutura molecular do subproduto da Ciproterona *m/z* 415,0.

Espectro de massas EPI do subproduto *m/z* 375,0 encontrado em efluente hospitalar submetido à ozonização (Figura 125).

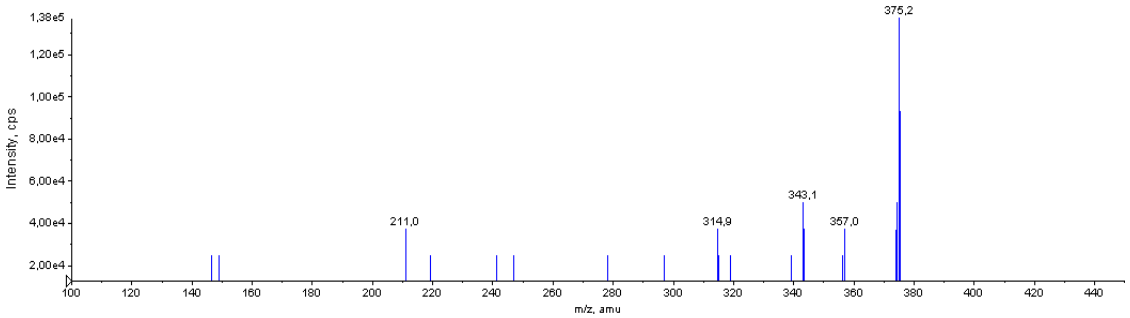


Figura 125 – Espectro de massas EPI do produto de degradação da Ciproterona *m/z* 375,0. Experimento PREC (357) + EPI com CE 20 V. Efluente hospitalar submetido à ozonização.

Como referido anteriormente este subproduto foi previamente identificado pela aplicação do processo de ozonização em solução aquosa do composto, sendo que, pela aplicação de diferentes CE para uma melhor fragmentação estrutural em ambas as matrizes

apenas os íons produto *m/z* 357,0 e 343,0 foram identificados em ambos os espectros EPI. A fragmentação estrutural proposta para este subproduto foi previamente discutida e exposta na figura 119, pag. 242.

Assim como em todos os outros processos fotólise, fotocatálise heterogênea e ozonização aplicados em ambas às amostras, solução aquosa e efluente hospitalar, também, pela aplicação do processo de ozonização em efluente hospitalar o subproduto *m/z* 357,0 foi obtido e, o espectro de massas EPI do composto encontra-se na figura 126.

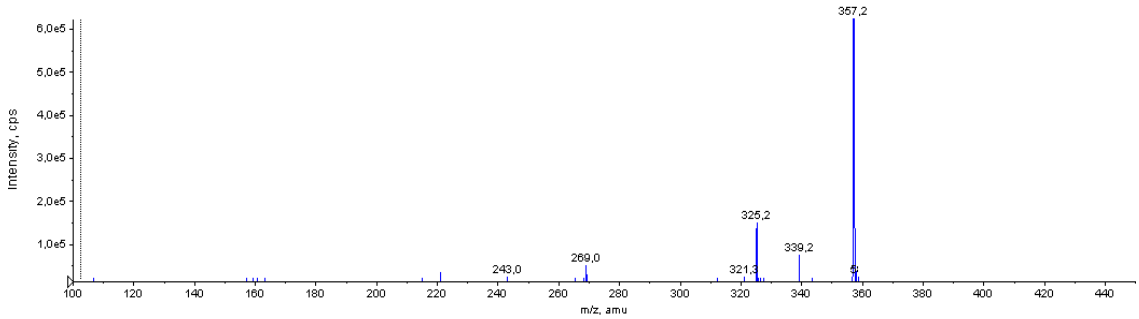


Figura 126 – Espectro de massas EPI do produto de degradação da Ciproterona *m/z* 357,0. Experimento PREC (357) + EPI com EC 20 V. Efluente hospitalar submetido à ozonização.

Os íons produtos *m/z* 339,0 e 325,0 foram observados nos outros espectros EPI deste subproduto, portanto, pode-se concluir que ambos os íons produto são característicos da fragmentação estrutural deste composto. A estrutura molecular para o subproduto *m/z* 357,0 foi previamente proposta na figura 109, pag. 237.

De acordo com as *m/z* encontradas nos experimentos de MS-IDA-PREC(357) seguido de EPI para estudo das fragmentações obtidas, observa-se a estrutura molecular do acetato de Ciproterona, seguida das estruturas propostas e previamente comentadas para cada um de seus subprodutos formados (Figura 127).

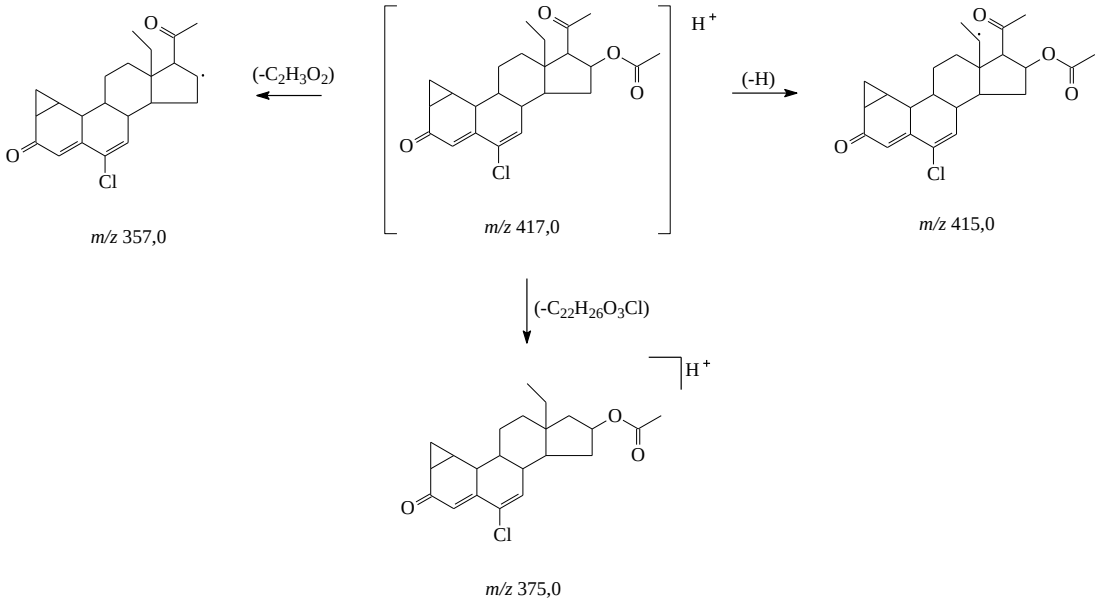


Figura 127- Acetato de Ciproterona e subprodutos de degradação identificados após a aplicação do processo de ozonização ao efluente hospitalar enriquecido do composto.

5.4.5.13 Fotólise aplicada à solução aquosa de Tamoxifeno

Em solução aquosa, foram identificados 11 subprodutos do composto Tamoxifeno. Os produtos de degradação *m/z* 371,0; 354,0; 362,0; 385,0; 369,0; 417,0; 408,0; 356,0; 389,0; 229,0 e 393,0 foram identificados através do experimento IDA EMS com EPI aplicando-se 3 CE 10, 25 e 50 V. Na figura 128, encontra-se o espectro de massas EPI no qual o subproduto *m/z* 371,0 foi encontrado e fragmentado.

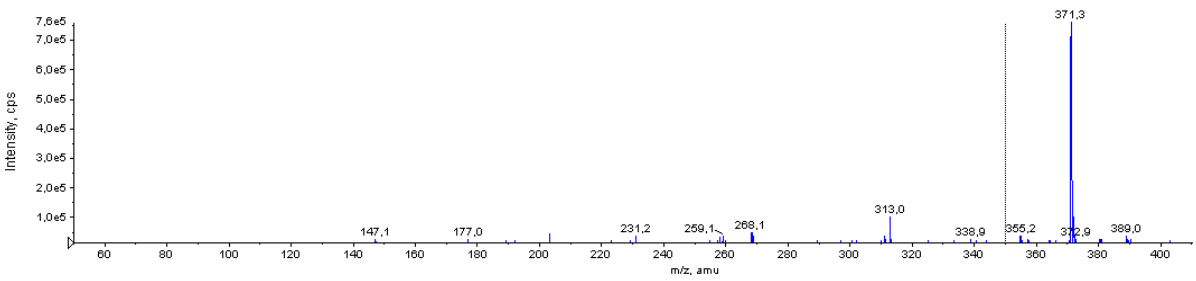


Figura 128 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 371,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V.

O fragmento de *m/z* 389,0 resulta da clivagem do anel aromático da estrutura molecular do Tamoxifeno *m/z* 372,0 e entrada do radical hidroxila, seguindo-se da perda deste radical e de um hidrogênio do anel da origem a estrutura do subproduto do Tamoxifeno identificado de *m/z* 371,0. Na figura 129 encontra-se a estrutura do fragmento *m/z* 389,0 e do subproduto *m/z* 371,0.

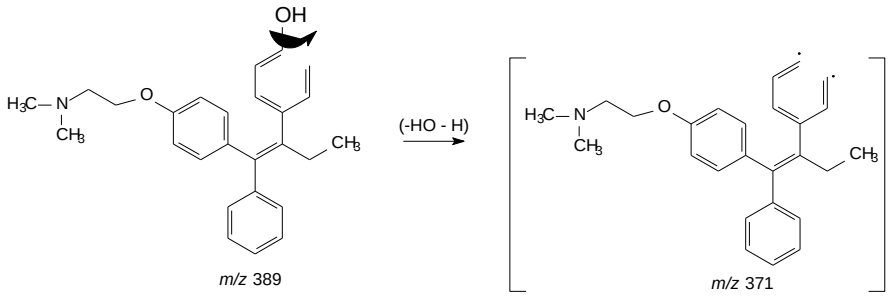


Figura 129 - Estrutura molecular dos fragmentos originários do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 371,0.

O espectro de massas EPI no qual o subproduto *m/z* 354,0 foi encontrado e fragmentado pode ser observado na figura 130.

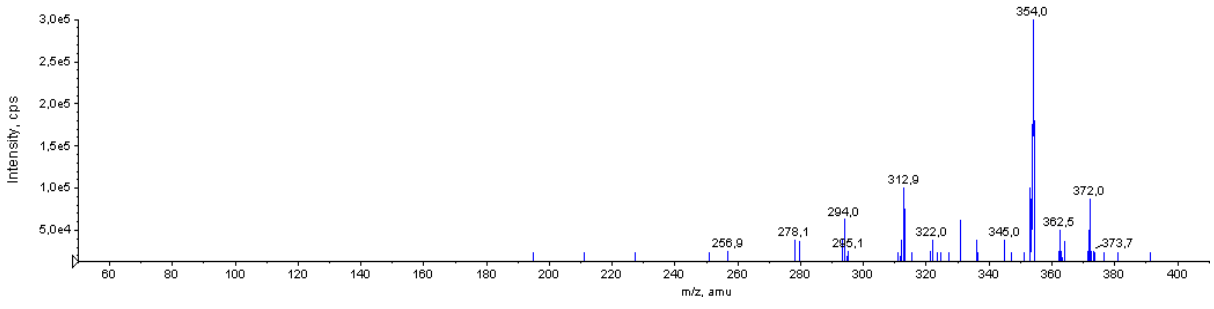


Figura 130 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 354,0. Experimento EMS + EPI com EC 10 V.

O espectro de massas que deu origem a rota de fragmentação do subproduto de *m/z* 354,0 sugere o fragmento de *m/z* 374,0 este, como sendo resultado da clivagem do anel aromático da estrutura do Tamoxifeno com a ruptura de duas duplas ligações ocorre a entrada de 2 hidrogênios na molécula. Seguindo-se da saída de 2 hidrogênios dá-se o fragmento de *m/z* 372,0 observado no espectro, este, por sua vez, perdendo um carbono do anel aromático resulta no fragmento de *m/z* 363,0 que perde 9 hidrogênios de sua molécula originando o subproduto do Tamoxifeno de *m/z* 354,0. As estruturas dos fragmentos que originaram o subproduto *m/z* 354,0 segundo o espectro de massas obtido, podem ser observadas na figura 131.

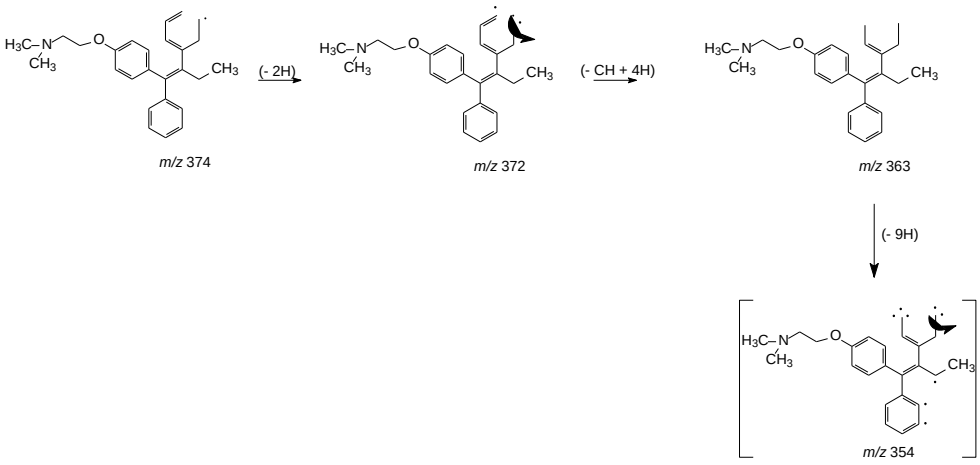


Figura 131 - Estrutura molecular dos fragmentos originários do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 354.

O subproduto *m/z* 362,0 foi encontrado e fragmentado e o espectro de massas EPI pode ser observado na figura 132.

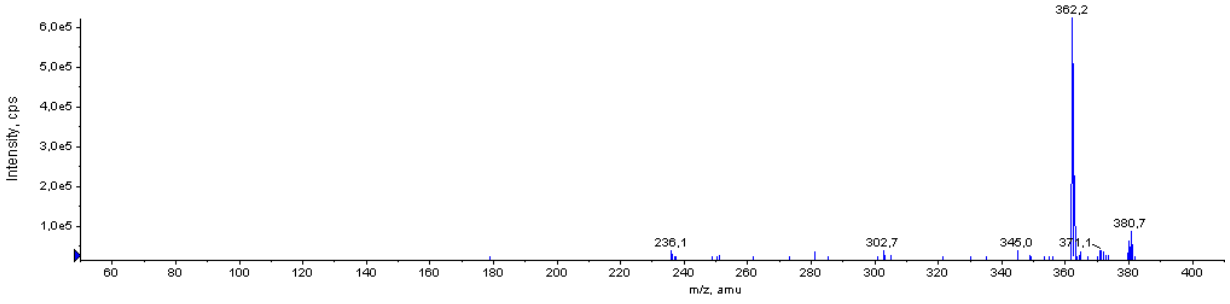


Figura 132 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 362,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V.

O fragmento de *m/z* 381,0 encontrado no espectro de massas com energia de colisão 25 V, é proveniente da ligação de uma hidroxila no anel aromático da estrutura molecular do Tamoxifeno e a saída de 5 hidrogênios. A perda da hidroxila e a entrada dos 5 hidrogênios nesta estrutura de *m/z* 381,0 resulta no fragmento de *m/z* 371,0 este, por sua vez, tem seu anel aromático rompido, perde um CH e as duplas ligações do anel aromático são rompidas para entrada de 4 hidrogênios resultando no subproduto de degradação de *m/z* 362,0. Na figura 133, estão demonstradas as estruturas dos fragmentos que originaram o subproduto *m/z* 362,0 de acordo com espectro de massas obtido.

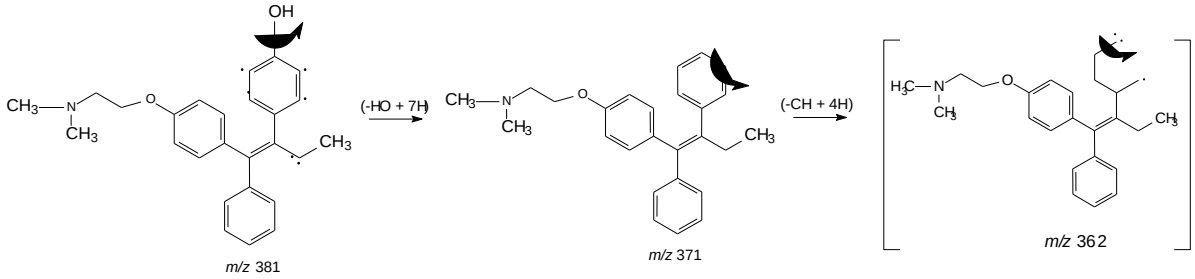


Figura 133 - Estrutura molecular dos fragmentos originários do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 362.

Da mesma forma o fragmento *m/z* 385,0 foi identificado e pode ser observado no espectro de massas EPI (Figura 134), como íon precursor e seus fragmentos.

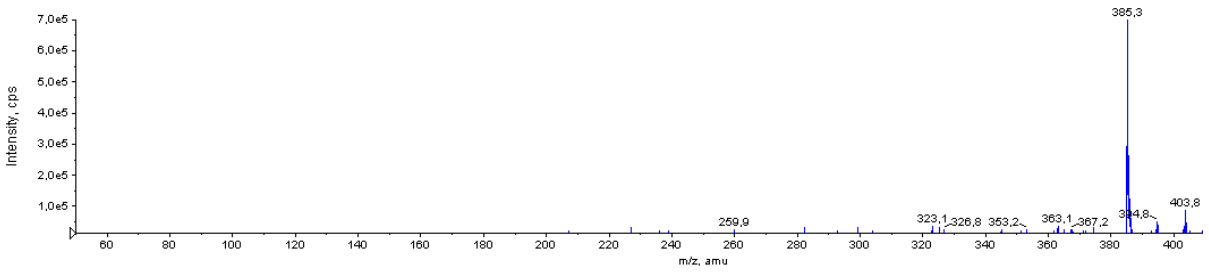


Figura 134 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 385,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V.

A fragmentação proposta para o subproduto de *m/z* 385,0 inicia-se com o fragmento de *m/z* 404,0 proveniente da clivagem do anel do Tamoxifeno e entrada de duas hidroxilas na molécula e saída de um hidrogênio, a fragmentação segue com o fragmento de *m/z* 395,0 proveniente da perda de um carbono e entrada de 3 hidrogênios com a ruptura de 2 duplas ligações na estrutura seguindo-se da perda de um carbono e entrada de 2 hidrogênios pela ruptura da terceira dupla ligação do anel aromático resultando no fragmento de *m/z* 385,0. As estruturas destes fragmentos acima citados podem ser observadas na figura 135.

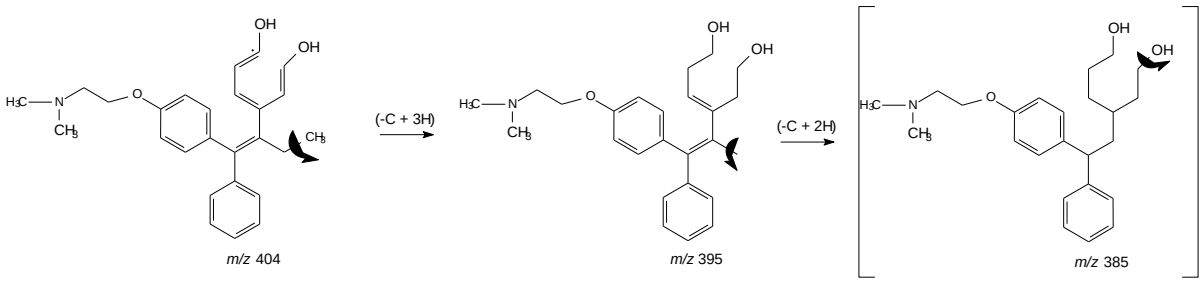


Figura 135 - Estrutura molecular dos fragmentos originários do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 385,0.

O subproduto *m/z* 369,0 foi encontrado e fragmentado e o espectro de massas EPI pode ser observado na figura 136.

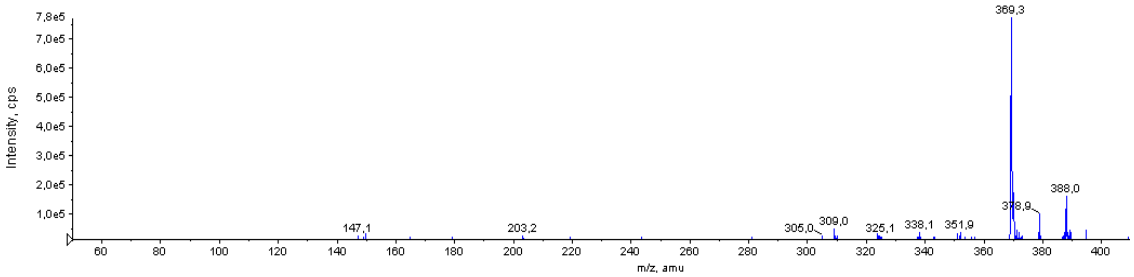


Figura 136 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 369,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V.

O fragmento de *m/z* 388,0 encontrado no espectro de massas com CE 10 V é proveniente da clivagem do anel aromático e entrada da hidroxila e saída de 3 hidrogênios da estrutura molecular do Tamoxifeno. Seguindo a fragmentação tem-se o fragmento de *m/z* 379,0 este, origina-se pela saída de um carbono do anel e abertura de uma dupla ligação e entrada de um hidrogênio a esta molécula, esta, com a ruptura de outras duas duplas ligações da molécula e saída de um grupamento metila e entrada de 5 hidrogênios à estrutura tem-se o subproduto de *m/z* 369,0 como observado na figura 137.

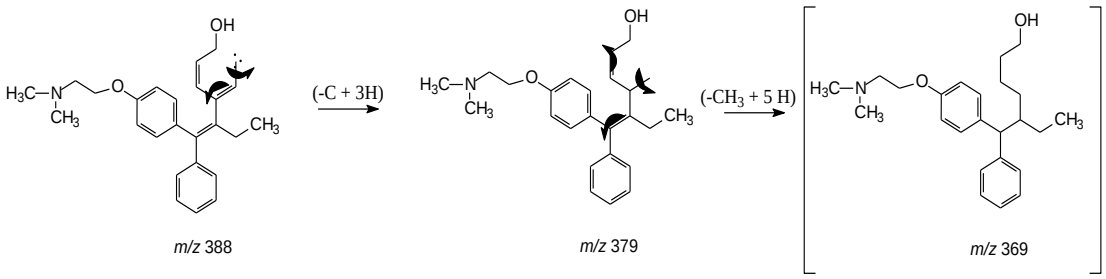


Figura 137 - Estrutura molecular dos fragmentos originários do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 369,0.

O espectro de massas EPI no qual o subproduto *m/z* 417,0 foi encontrado e fragmentado pode ser observado na figura 138.

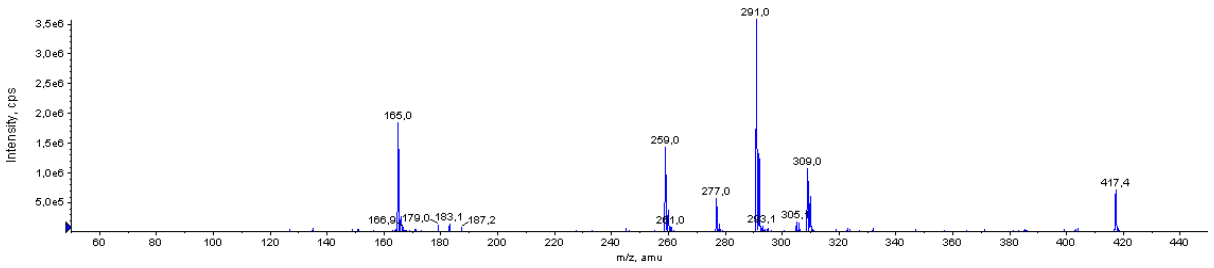


Figura 138 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 417,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V.

O subproduto *m/z* 417,0 resulta da entrada de 3 hidroxilas e saída de dois hidrogênios da estrutura molecular do Tamoxifeno. A estrutura originária pode ser observada na figura 139.

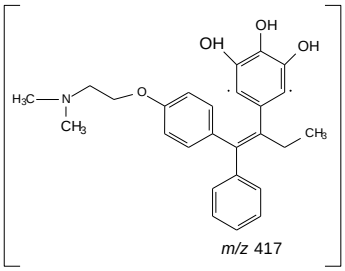


Figura 139 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 417,0.

O produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 408,0 proveniente do processo de fotólise do fármaco foi identificado utilizando o experimento de IDA EMS + EPI com 3 CE (Figura 140).

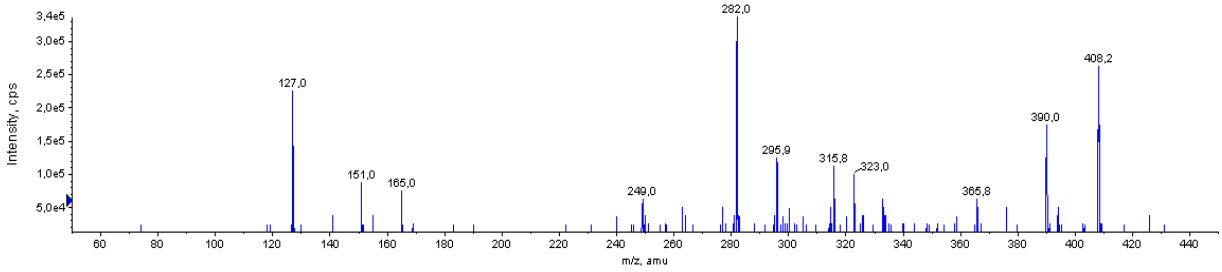


Figura 140 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 408,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V.

O subproduto de *m/z* 408,0 (Figura 141) é proveniente da entrada de duas hidroxilas, ruptura das duplas ligações e saída de mais um hidrogênio do anel aromático da estrutura do produto Tamoxifeno.

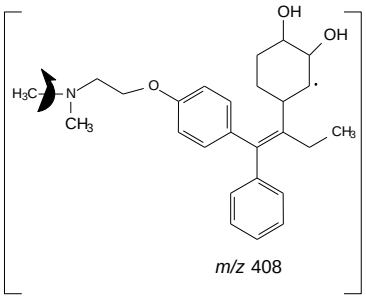


Figura 141 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z*408,0.

O fragmento *m/z* 356,0 foi identificado e pode ser observado no espectro de massas EPI, como íon precursor e seus fragmentos (Figura 142).

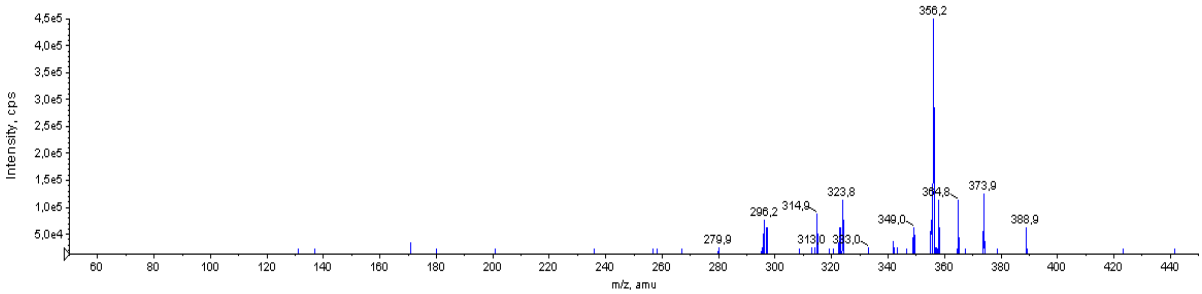


Figura 142 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 356,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V.

O fragmento de *m/z* 389,0 encontrado no espectro de massas EPI com energia de colisão de 10 V, acima descrito como sendo espectro onde o subproduto *m/z* 356,0 também identificado como fragmento do subproduto 371,0 (Figura 130)**.** Originou-se da clivagem e entrada de uma hidroxila no anel aromático na estrutura do Tamoxifeno. Este fragmento perde a hidroxila do anel e uma dupla ligação é rompida ocorrendo a entrada de 2 hidrogênios originando o fragmento de *m/z* 374,0 que perde um CH_2 e suas duplas ligações são rompidas possibilitando a entrada de 5 hidrogênios à estrutura formando dessa foram o fragmento de *m/z* 365,0. O subproduto de *m/z* 356,0 é formado pela perda de um CH_2 e da ruptura de 3 duplas ligações possibilitando a entrada de 6 hidrogênios à molécula. As estruturas destes fragmentos acima citados podem ser observadas na figura 143.

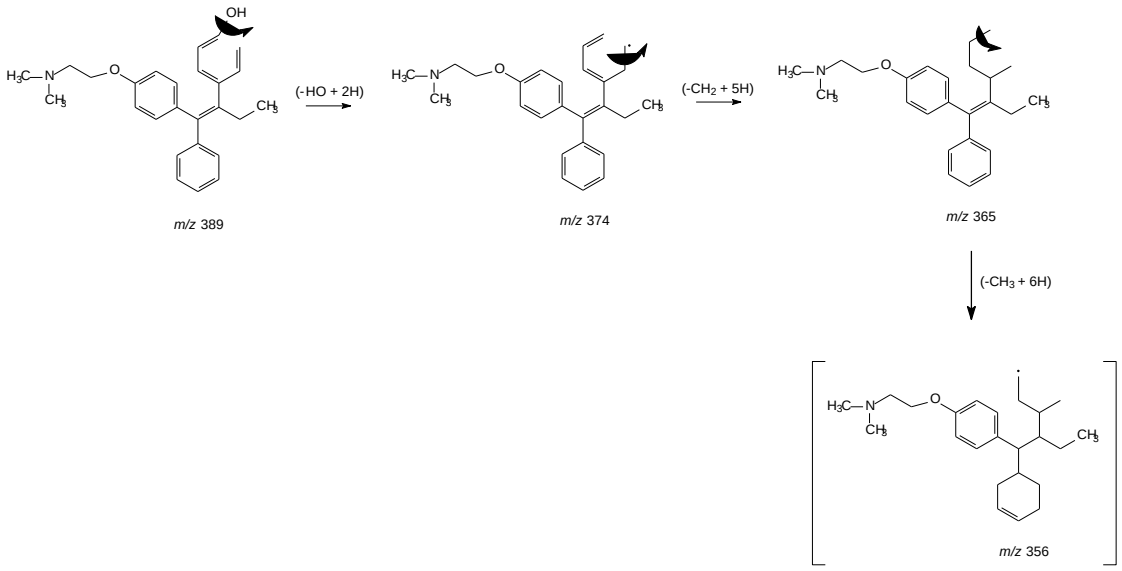


Figura 143 - Estrutura molecular dos fragmentos originários do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 356,0.

O espectro de massas EPI no qual o subproduto *m/z* 389,0 foi encontrado e fragmentado pode ser observado na figura 144.

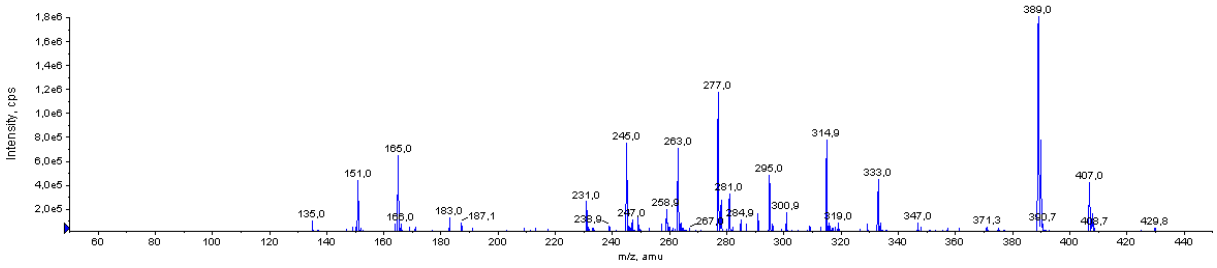


Figura 144 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 389,0. Experimento EMS + EPI com EC 25 V.

O subproduto do Tamoxifeno *m/z* 389,0 forma-se partindo do fragmento *m/z* 430,0 originado pela entrada de 4 hidroxilas à estrutura molecular do Tamoxifeno, este fragmento libera uma hidroxila mais 5 hidrogênios e forma o fragmento *m/z* 407,0 que, por sua vez, libera uma molécula de água e forma o subproduto do Tamoxifeno identificado pelo espectro

de massas acima. Na figura 145 estão demonstradas as estruturas dos fragmentos que originaram o subproduto *m/z* 389,0 segundo o espectro de massas obtido.

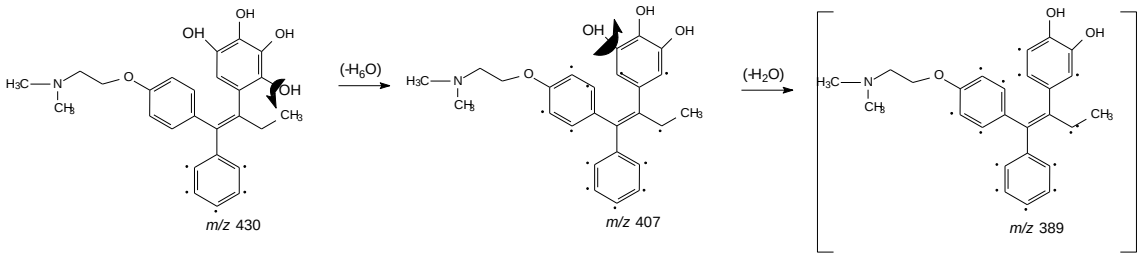


Figura 145 - Estrutura molecular dos fragmentos originários do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 389.

Da mesma forma o fragmento *m/z* 229,0 foi identificado e pode ser observado no espectro de massas EPI (Figura 146), como íon precursor e seus fragmentos.

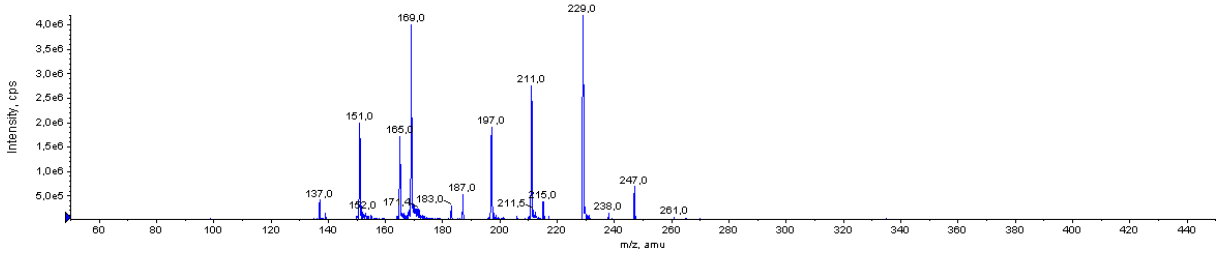


Figura 146 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 229,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V.

O fragmento *m/z* 261,0 observado no espectro de massas que deu origem ao subproduto *m/z* 229,0 origina-se da saída do grupamento oxipropilamina e do grupamento etila da molécula de Tamoxifeno este, por sua vez, com a clivagem do anel libera um CH_2 e forma o fragmento observado *m/z* 247,0 que, com o rompimento de mais uma dupla ligação, entrada de 3 hidrogênios e saída de um CH_2 forma o fragmento *m/z* 238,0. A formação do

subproduto *m/z* 229,0 ocorre pela saída de um grupamento metila e abertura das duplas ligações do anel aromático do fragmento *m/z* 238,0 (Figura 147).

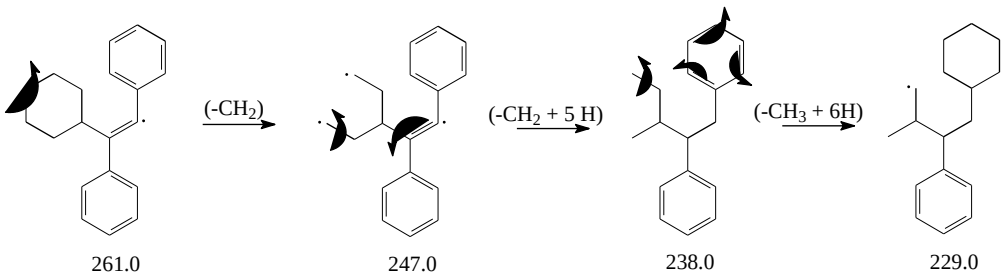


Figura 147 - Estrutura molecular dos fragmentos originários do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 229,0.

O produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 393,0 proveniente do processo de fotólise do fármaco foi identificado utilizando o experimento de IDA EMS + EPI com 3 EC (Figura 148).

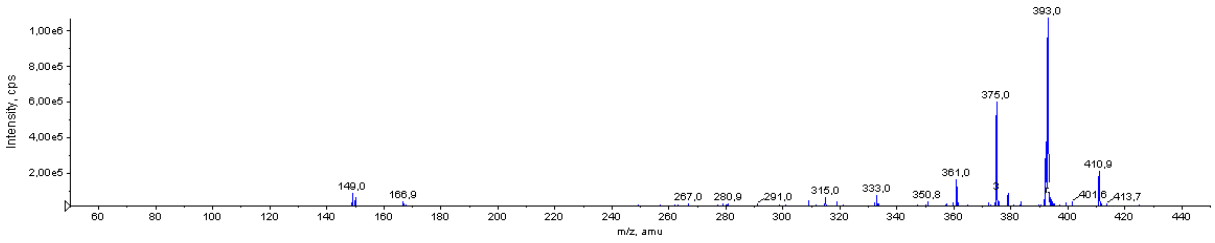


Figura 148 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 393,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V.

O fragmento de *m/z* 411,0 observado no espectro de massas com energia de colisão 10 V foi obtido a partir do Tamoxifeno *m/z* 372,0 pela entrada de 3 hidroxilas na molécula e saída de 8 hidrogênios. Partindo deste fragmento, pela perda de uma molécula de água tem-se o subproduto do Tamoxifeno *m/z* 393,0. Estas estruturas moleculares citadas podem ser observadas na figura 149.

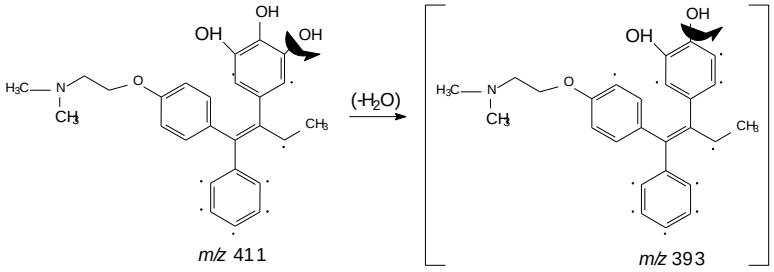


Figura 149 - Estrutura molecular do fragmento e do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 393,0.

Na figura 150 encontram-se as estruturas moleculares do Tamoxifeno e estruturas moleculares propostas para seus subprodutos formados pelo processo de fotólise em solução aquosa de acordo com as *m/z* encontradas nos experimentos de MS-IDA-XIC (Espectrometria de massas – informação dependente da aquisição - cromatograma de íons extraídos).

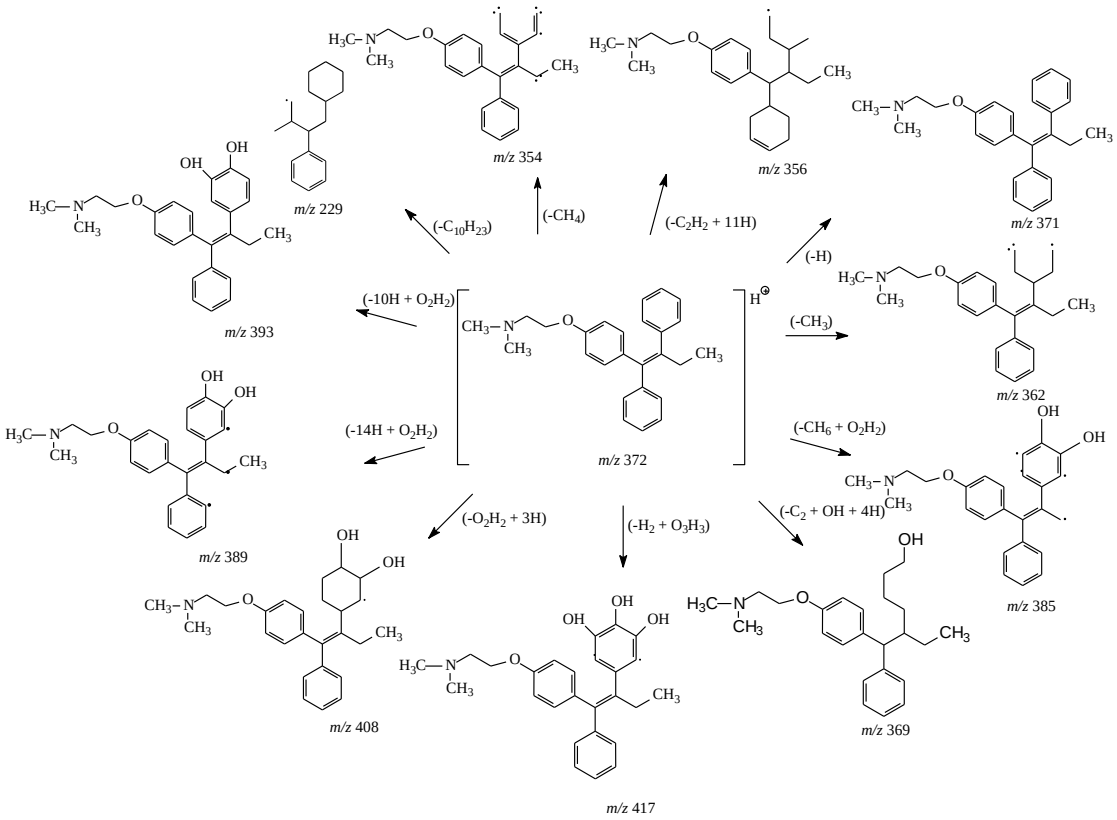


Figura 150 - Tamoxifeno e subprodutos de degradação identificados após a aplicação do processo de fotólise em solução aquosa.

DELLAGRECA et al. (2007) estudaram a transformação do Tamoxifeno em água por irradiação solar prolongada. Os principais fotoprodutos, isolados por técnicas cromatográficas, foram identificados, por meio de espectroscopia. Fotociclização, fotoisomerização, e, em menor grau, fotooxigenação parecem estar envolvidas na degradação da droga. O subproduto de *m/z* 371,0 também foi identificado pelos autores por meio de ionização por elétrons e espectrometria de massas EI-MS.

5.4.5.14 Fotocatálise heterogênea aplicada ao efluente hospitalar fortificado de Tamoxifeno

Em efluente hospitalar, foram identificados 12 subprodutos do composto Tamoxifeno. Os produtos de degradação *m/z* 389,0; 212,0; 370,0; 409,0; 427,0; 354,0; 425,0; 359,0; 412,0; 407,0; 434,0 e 379,0 foram identificados através do experimento IDA EMS com EPI nas 3 CE 10, 25 e 50 V previamente selecionadas. O espectro de massas EPI no qual encontra-se o subproduto *m/z* 389,0 e seus produtos fragmentados pode ser observado na figura 151.

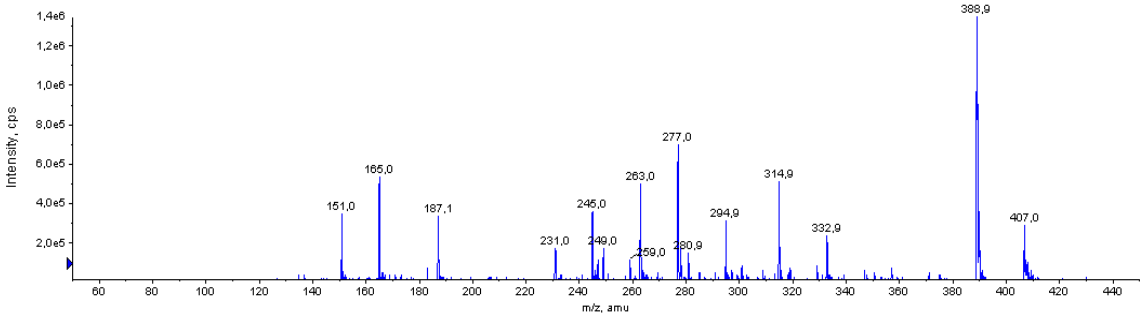


Figura 151 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 389,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V.

Este subproduto do Tamoxifeno também foi encontrado em solução aquosa enriquecida do composto pela aplicação de fotólise espectros de massas EPI figuras 128, pag. 247 e 144, pag. 255 onde, o espectro também sugere o fragmento de *m/z* 407,0. As estruturas moleculares propostas para este subproduto e seus fragmentos podem ser observadas nas figuras 129, pag. 248 e 145, pag. 256.

O produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 354,0 proveniente do processo de fotocatálise do fármaco em efluente hospitalar foi identificado utilizando o experimento de IDA EMS + EPI com 3 CE, sendo que, a energia de colisão que obteve melhor fragmentação no espectro de EPI foi 10 V como pode-se na figura 152.

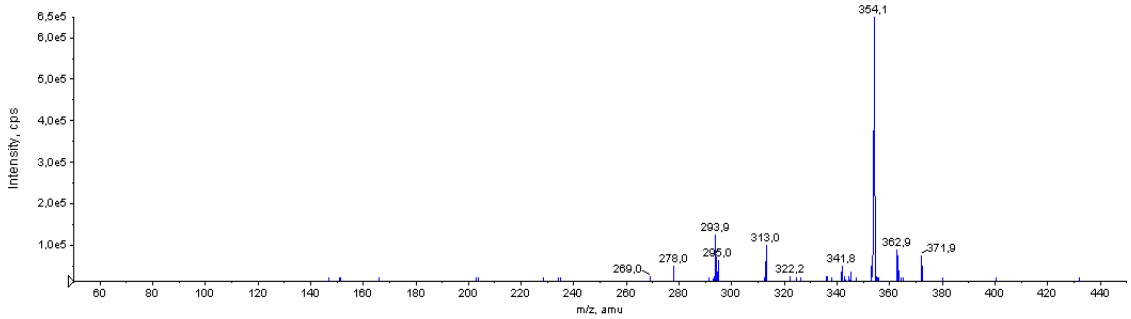


Figura 152 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 354,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V.

O mesmo subproduto do Tamoxifeno foi encontrado pela aplicação de fotólise em solução aquosa, apresentando praticamente a mesma fragmentação estrutural, como pode ser observado na figura 131, pag. 249 onde as estruturas para este subproduto foram propostas.

O espectro de massas onde o subproduto *m/z* 369,0 proveniente da fotocatálise em amostra de efluente hospitalar enriquecido pode ser observado na figura 153.

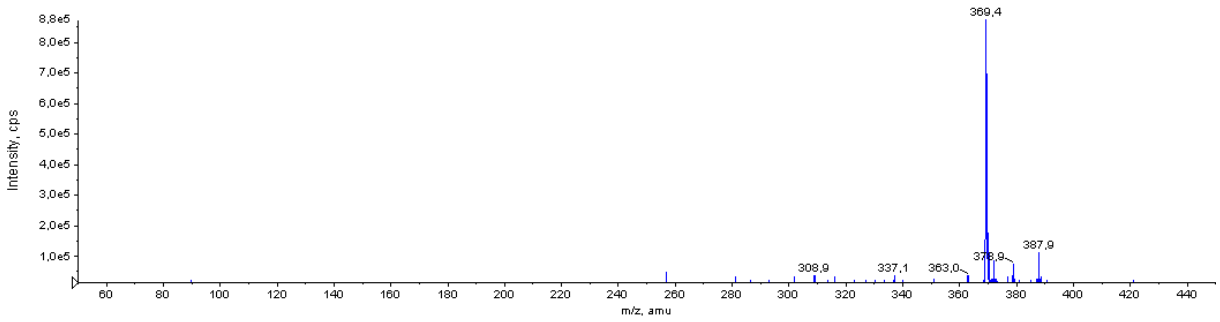


Figura 153 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 369,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V.

O espectro de massas com a mesma fragmentação inicial para o subproduto de *m/z* 369,0 na mesma energia de colisão, ou seja, 10 V foi obtido pela aplicação da fotólise em solução aquosa, sendo assim, as estruturas foram previamente propostas para o subproduto e seus fragmentos originários e podem ser observadas na figura 137, pag. 252.

Na figura 154 encontra-se o espectro de massas onde o subproduto *m/z* 379,0 foi identificado e fragmentado por EPI com CE 25 V.

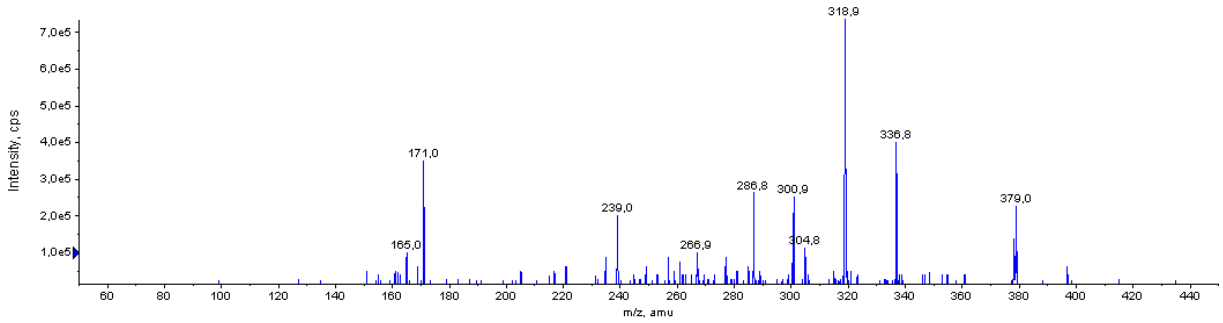


Figura 154 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 379,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V.

A estrutura molecular para este subproduto *m/z* 379,0 foi previamente proposta na figura 137, pag. 252, como fragmento originário do subproduto *m/z* 369,0 encontrado em solução aquosa pela aplicação de fotólise.

Outro subproduto do Tamoxifeno identificado em efluente hospitalar enriquecido e submetido à fotocatálise heterogênea foi *m/z* 407,0, espectro de massas EPI EC 25 V (Figura 155).

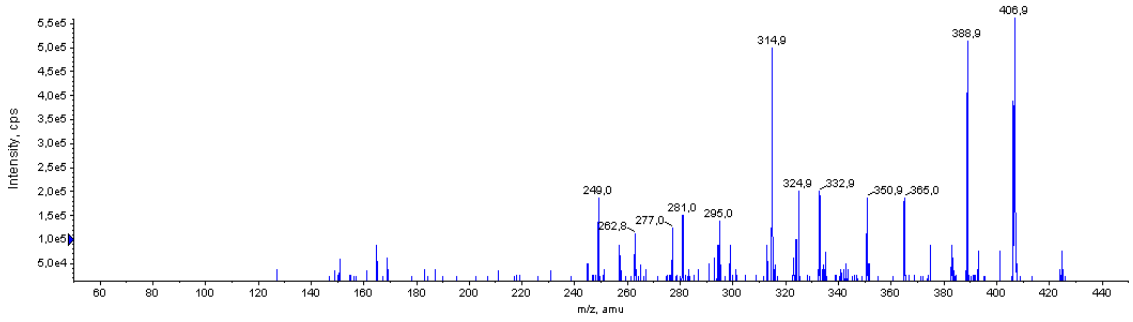


Figura 155 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z*407,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V.

Fragmento este encontrado no espectro do subproduto *m/z* 389,0 identificado em solução aquosa no espectro EPI também com EC de 25 V (Figura 144, pag. 255) e a estrutura molecular foi proposta para este subproduto e, encontra-se na figura 145, pag. 256.

O subproduto de *m/z* 412,0 foi identificado no espectro de massas gerado pelo experimento EMS + EPI com EC 25 V em amostra de efluente hospitalar fortificado. O espectro de massas EPI do subproduto e seus fragmentos encontram-se na figura 156.

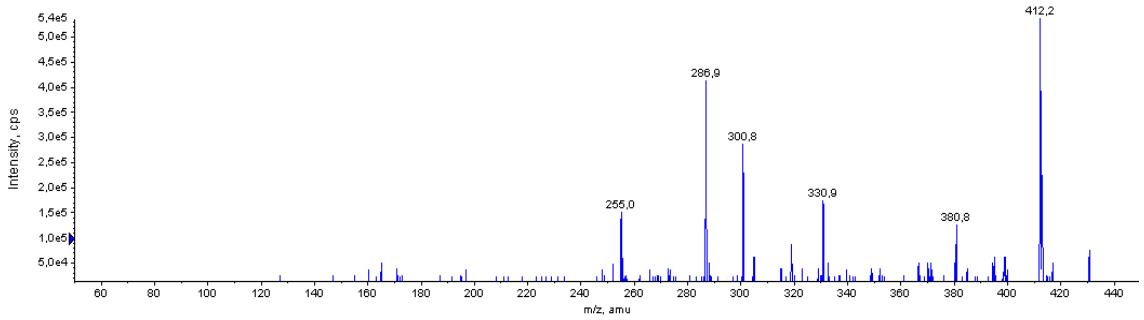
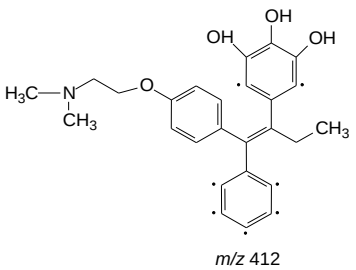


Figura 156 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 412,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V.

Sugere-se a entrada de 3 hidroxilas e saída de 7 hidrogênios da estrutura molecular do Tamoxifeno gerando o subproduto *m/z* 412,0. Na figura 157, pode-se observar a estrutura molecular proposta para este subproduto.



m/z 412

Figura 157 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 412,0.

Através do experimento EMS + EPI com EC 25 V também identificou-se o subproduto do Tamoxifeno *m/z* 409,0, este foi identificado e seu íon precursor foi fragmentado e o espectro obtido pode ser observado na figura 158.

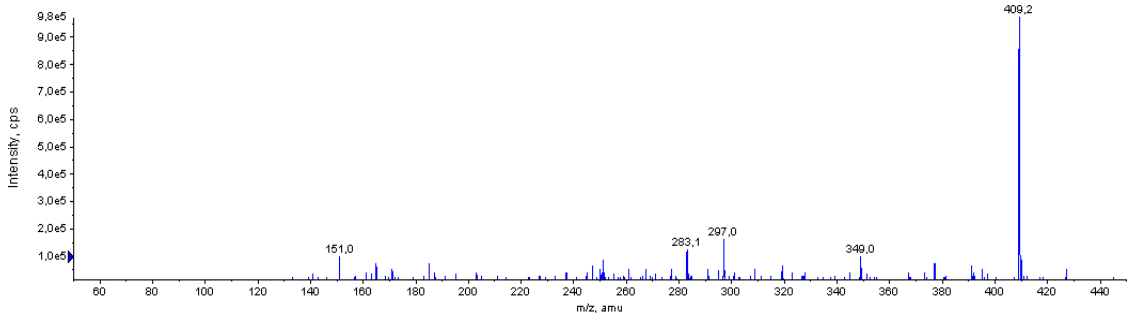
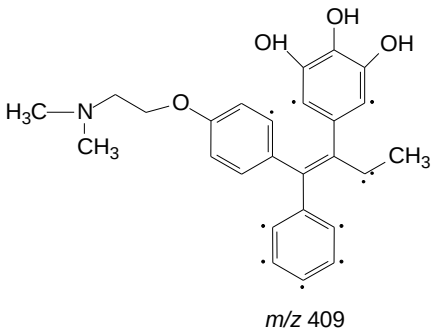


Figura 158 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 409,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V.

Para a formação do subproduto *m/z* 409,0 sugere-se também entrada de 3 hidroxilas e saída de 10 hidrogênios da estrutura molecular do Tamoxifeno gerando o subproduto *m/z* 409,0. Na figura 159, pode-se observar a estrutura molecular proposta para este subproduto.



m/z 409

Figura 159 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 409,0.

Outro subproduto do Tamoxifeno identificado em amostra de efluente hospitalar submetida ao processo de fotocatálise heterogênea foi o *m/z* 434,0. O espectro EPI EC 25 V no qual o subproduto foi encontrado encontra-se na figura 160.

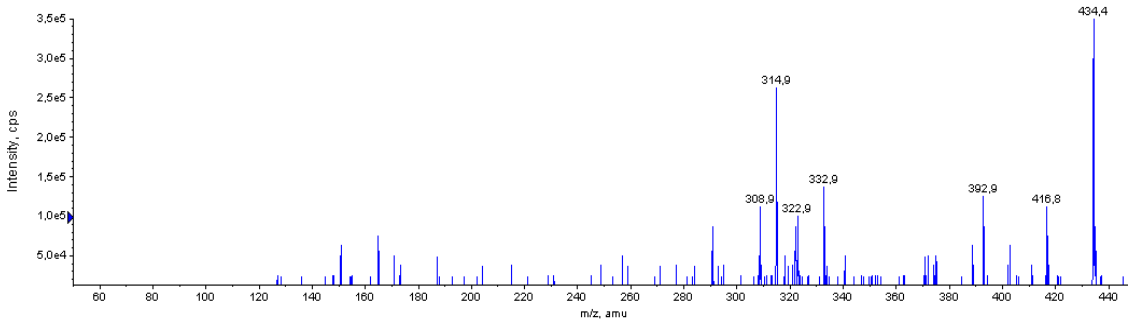
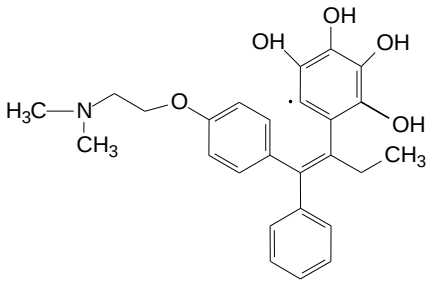


Figura 160 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 434,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V.

A estrutura proposta (Figura 161) para este subproduto *m/z* 434,0 sugere a entrada de 4 hidroxilas e perda de 1 hidrogênio da estrutura molecular do composto Tamoxifeno.



m/z 434

Figura 161 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 434,0.

O subproduto *m/z* 427,0 também identificado pelo experimento EMS + EPI CE 25 V pode ser observado no espectro abaixo (Figura 162), bem como, os fragmentos gerados pela quebra da estrutura molecular do mesmo.

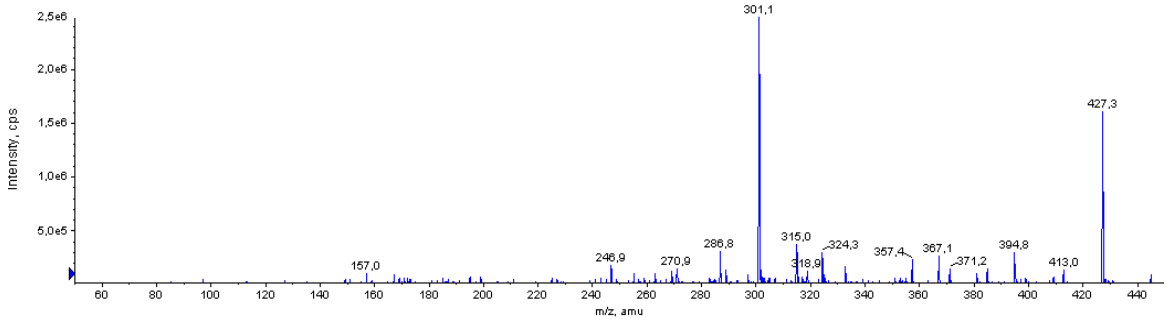
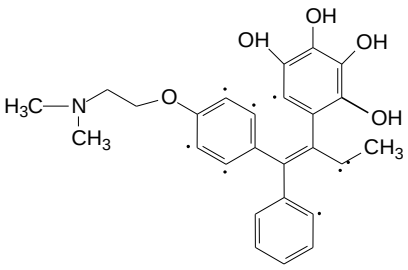


Figura 162 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 427,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V.

A estrutura molecular proposta (Figura 163) sugere a entrada de 4 hidroxilas à molécula de Tamoxifeno e a saída de 8 hidrogênios da mesma.



m/z 427

Figura 163 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 427,0.

Na figura 164, tem-se o espectro de massas EPI (íon precursor e seus produtos de fragmentação) para o subproduto do Tamoxifeno identificado pela *m/z* 425,0.

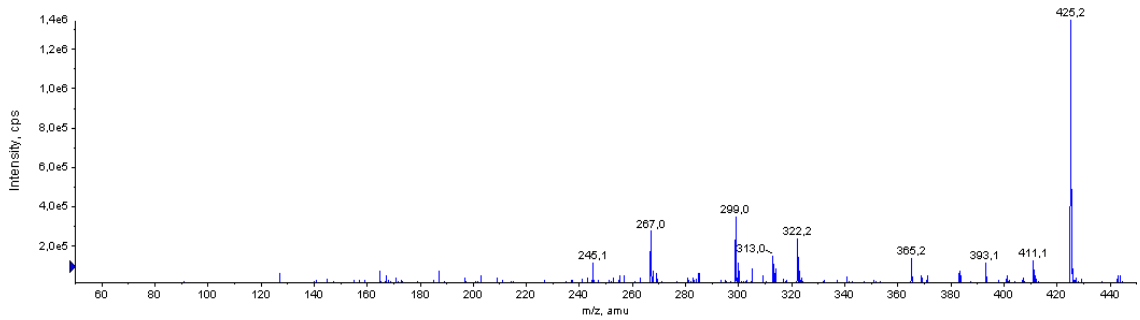
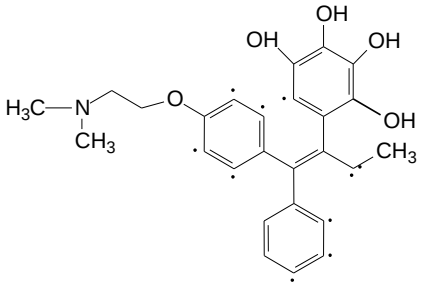


Figura 164 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 425,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V.

A estrutura abaixo (Figura 165) proposta como sendo subproduto do Tamoxifeno com *m/z* 425,0 sugere a entrada de 4 hidroxilas à molécula do composto Tamoxifeno e a saída de 10 hidrogênios da mesma.



m/z 425

Figura 165 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 425,0.

O espectro de massas EPI onde o subproduto do Tamoxifeno *m/z* 370,0 foi identificado pode ser observado na figura 166.

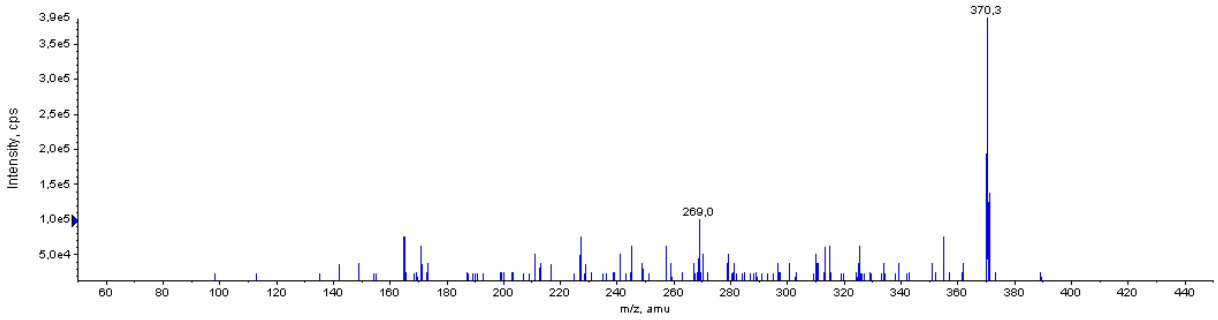
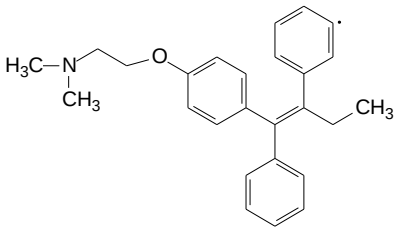


Figura 166 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 370,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V.

A estrutura proposta para o subproduto do Tamoxifeno *m/z* 370,0 pode ser observada na figura 167 e propõe-se para esta a perda de 2 hidrogênios da estrutura molecular do Tamoxifeno ionizada.



m/z 370

Figura 167 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 370,0.

O último subproduto do Tamoxifeno identificado em amostra de efluente hospitalar submetida ao processo de fotocatálise heterogênea foi o subproduto *m/z* 212,0. O espectro de massas EPI EC 25 V do produto e seus fragmentos pode ser observado na figura 168.

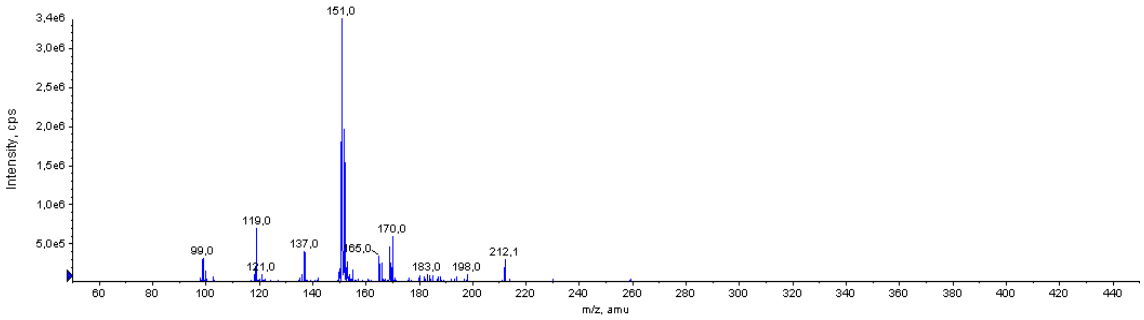
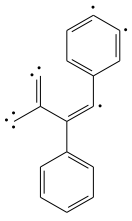


Figura 168- Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 212,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V.

A estrutura molecular proposta para este subproduto pode ser observada na figura 169 e sugere a perda do grupamento etila, do grupamento oxietil-dietilamina com abertura do anel aromático e saída de 3 carbonos e 2 hidrogênios deste anel.



m/z 212

Figura 169 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 212,0.

De acordo com as *m/z* encontradas nos experimentos de MS-IDA-XIC seguido de EPI com as CE aplicadas para obtenção das melhores fragmentações estruturais para cada um dos subprodutos identificados, abaixo descritas encontram-se a estrutura do Tamoxifeno e estruturas moleculares propostas para seus subprodutos formados pelo processo de fotocatálise heterogênea em efluente hospitalar enriquecido do composto (Figura 170).

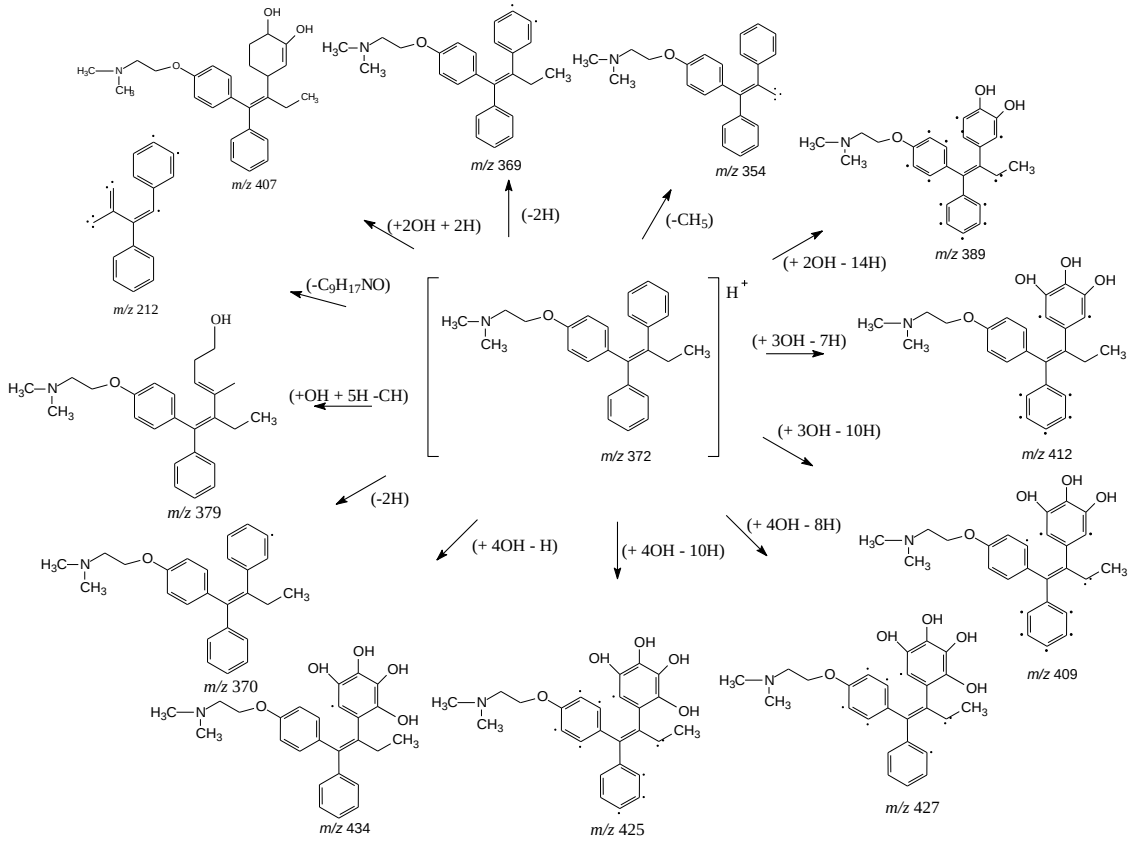


Figura 170 - Tamoxifeno e subprodutos de degradação identificados após a aplicação do processo de fotocatálise heterogênea ao efluente hospitalar fortificado.

5.4.5.15 Ozonização aplicado à solução aquosa de Tamoxifeno

Em solução aquosa submetida ao processo de ozonização, foram identificados 10 subprodutos do composto Tamoxifeno. Os produtos de degradação *m/z* 371,0; 354,0; 363,0; 210,0; 291,0; 350,0; 386,0; 421,0; 420,0 e 430,0 foram identificados através do experimento IDA EMS com EPI aplicando-se 3 energias de colisão 10, 25 e 50 V onde, a EC que apresentou melhor fragmentação do produto identificado foi utilizada. Na figura 171

encontra-se o espectro de massas EPI no qual o subproduto *m/z* 371,0 foi encontrado e fragmentado.

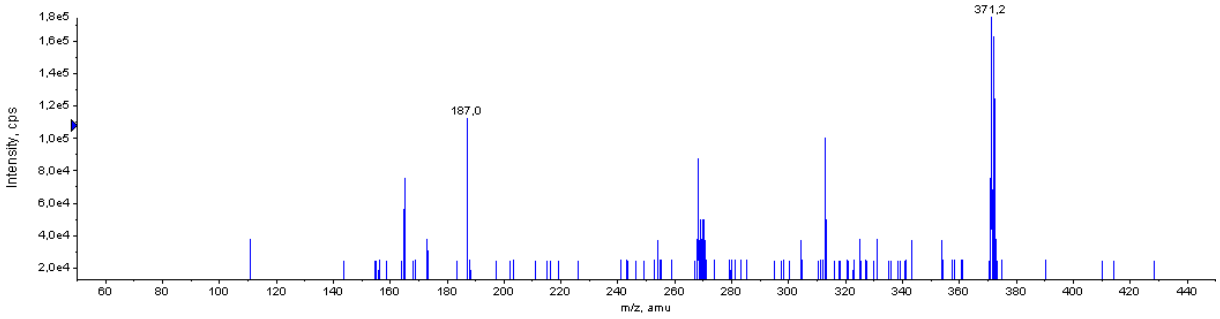
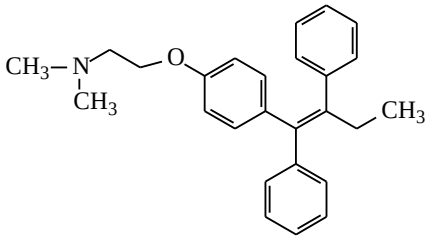


Figura 171 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 371,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V.

O subproduto de *m/z* 371,0 também foi identificado em solução aquosa pela aplicação de fotólise à mesma. Desta forma a estrutura molecular referente a este produto de reação do Tamoxifeno sugere a saída de um hidrogênio da molécula (Figura 172).



m/z 371

Figura 172 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 371,0.

Na figura 173 encontra-se o espectro de massas EPI para o subproduto *m/z* 354,0 identificado em solução aquosa submetida ao processo de ozonização.

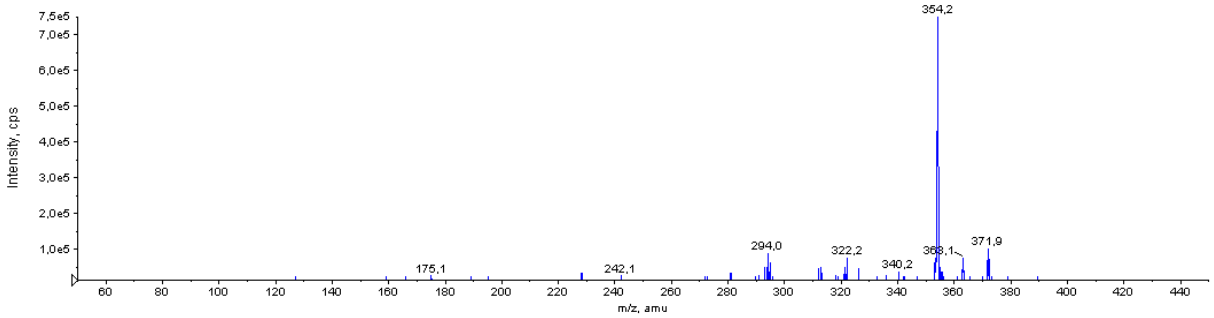


Figura 173 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 354,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V.

As estruturas moleculares propostas para este subproduto podem ser observadas na Figura 132, devido ao fato de o mesmo espectro EPI ter sido encontrado em solução aquosa submetida à fotólise, em amostra de efluente hospitalar submetida ao processo de fotocatálise heterogênea, e, também, neste caso, em solução aquosa submetida a ozonização.

O subproduto *m/z* 363,0 identificado no espectro de massas EPI em solução aquosa, com CE 25 V pode ser observado na figura 174.

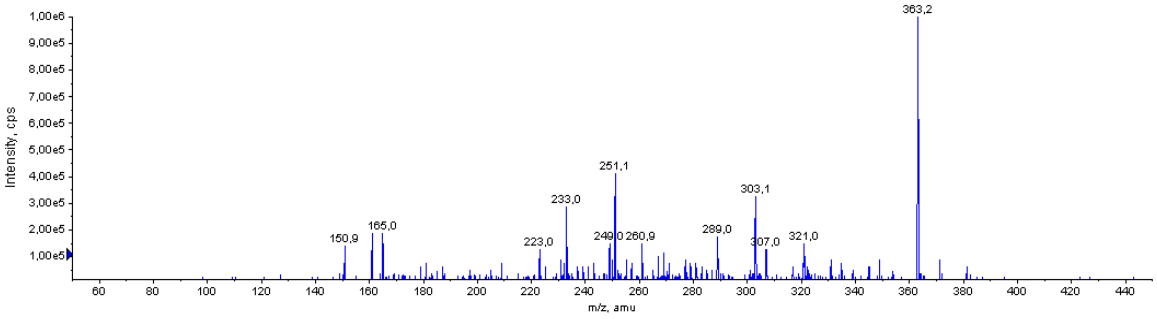
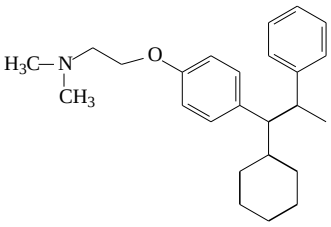


Figura 174 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 363,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V.

Esta *m/z* 363,0 também foi identificada no espectro de massas EPI com CE de 10 V, como sendo um dos fragmentos originários do subproduto *m/z* 354,0 pela aplicação de fotólise à solução aquosa. Sua estrutura molecular foi proposta pela saída do grupamento metila e saída das duplas ligações do anel aromático. Esta estrutura pode ser observada na figura 175.



m/z 363

Figura 175 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 363,0.

O espectro de massas EPI onde o subproduto do Tamoxifeno *m/z* 430,0 foi identificado encontra-se na figura 176.

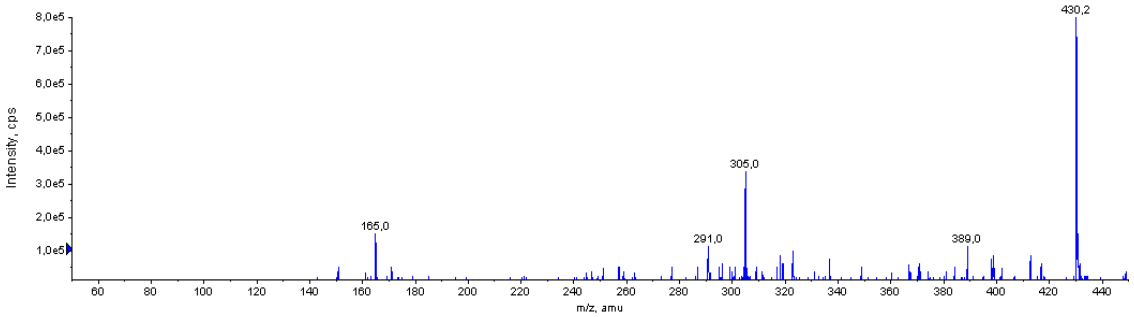


Figura 176 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 430,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V.

Este subproduto *m/z* 430,0 foi identificado no espectro de massas EPI com EC 25 V como fragmento que deu origem ao subproduto do Tamoxifeno *m/z* 389,0 pela aplicação de fotólise à solução aquosa e, sua estrutura molecular proposta pode ser observada na figura 146, pag. 256.

O espectro de massas EPI com EC 25 V (Figura 177) foi obtido pelo experimento IDA EMS para o subproduto do Tamoxifeno *m/z* 421,0 em solução aquosa.

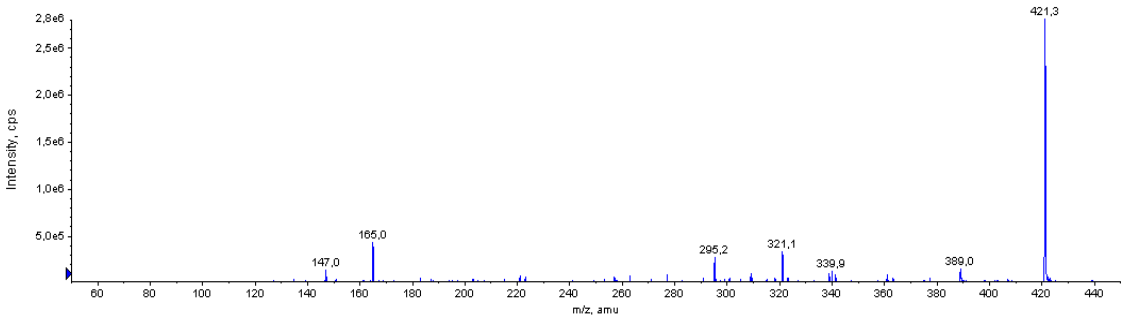
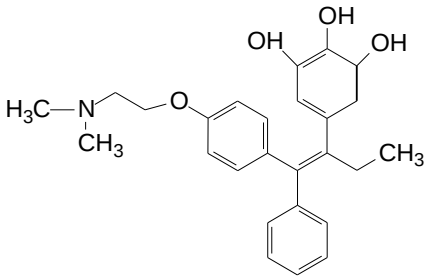


Figura 177 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 421,0. Experimento EMS + EPI com EC 25 V.

Partindo da estrutura molecular do Tamoxifeno propõe-se para o subproduto *m/z* 421,0 a entrada de 3 hidroxilas ao anel aromático e a ruptura de uma dupla ligação deste anel (Figura 178).



m/z 421

Figura 178 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 421,0.

Na figura 179 encontra-se o espectro de massas EPI EC 25 V para o subproduto do Tamoxifeno identificado com *m/z* 420,0.

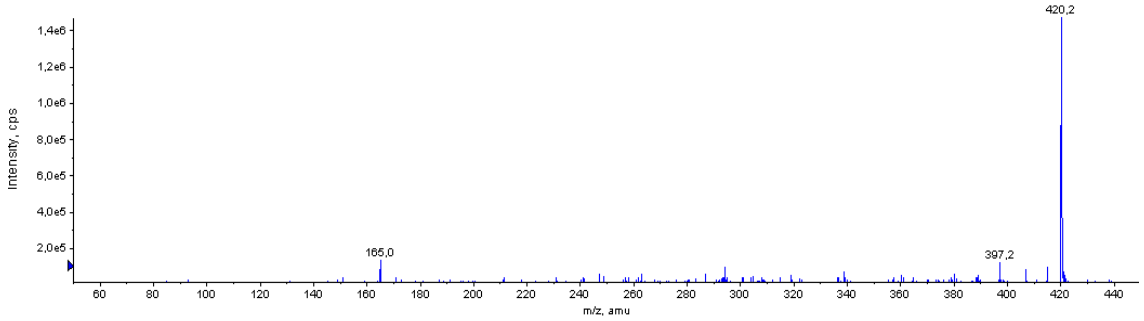
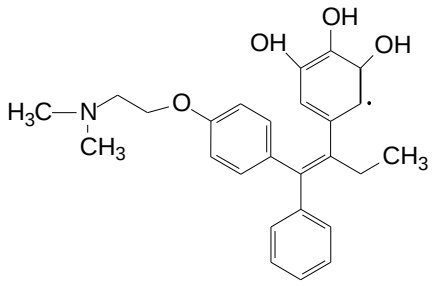


Figura 179 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 420,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V.

Propõe-se para o subproduto *m/z* 420,0 a entrada de 3 hidroxilas ao anel aromático da estrutura molecular do Tamoxifeno, a ruptura de uma dupla ligação e saída de um hidrogênio deste anel (Figura 180).



m/z 420

Figura 180 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 420,0.

O espectro de massas EPI para o subproduto identificado com *m/z* 386,0 encontra-se na figura 181.

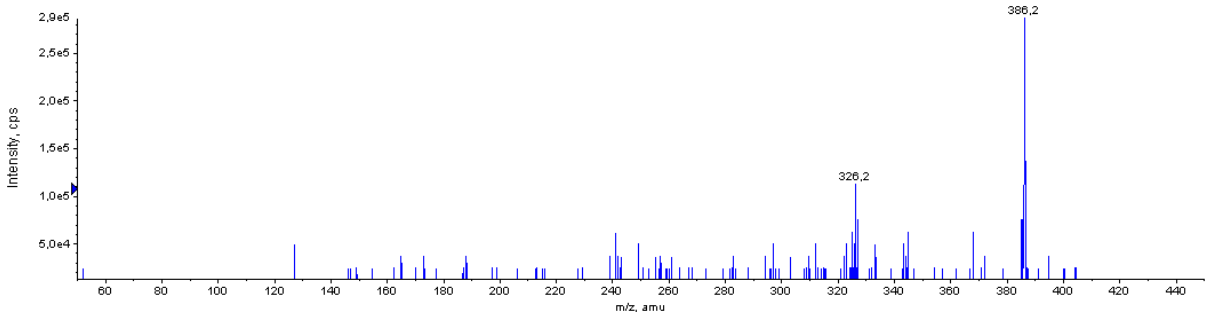
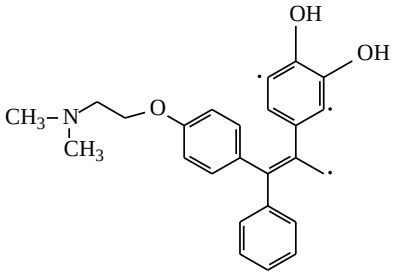


Figura 181 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 386,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V.

Para este subproduto *m/z* 386,0 identificado no espectro acima descrito propõe-se a entrada de 2 hidroxilas, saída de uma metila e 3 hidrogênios da estrutura molecular do Tamoxifeno. A estrutura proposta pode ser observada na figura 182.



m/z 386

Figura 182 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 386,0.

O subproduto *m/z* 350,0 foi identificado no espectro EPI com CE de 25 V e pode ser observado na figura 183.

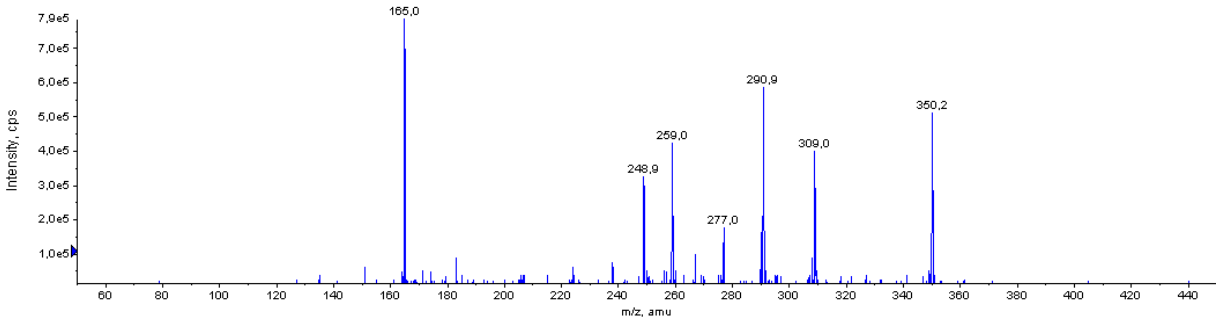


Figura 183 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 350,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V.

A elucidação estrutural deste subproduto (Figura 184) a partir do Tamoxifeno dá-se pela saída do grupamento metila, bem como, pela retirada de 6 hidrogênios que encontravam-se ligados à estrutura molecular do composto pai.

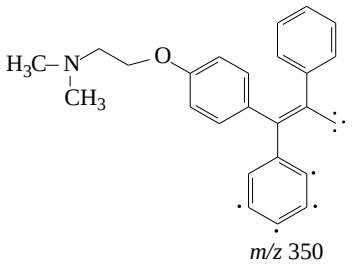


Figura 184 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 350,0.

O espectro de massas EPI para o subproduto do Tamoxifeno identificado com *m/z* 291,0 encontra-se na figura 185.

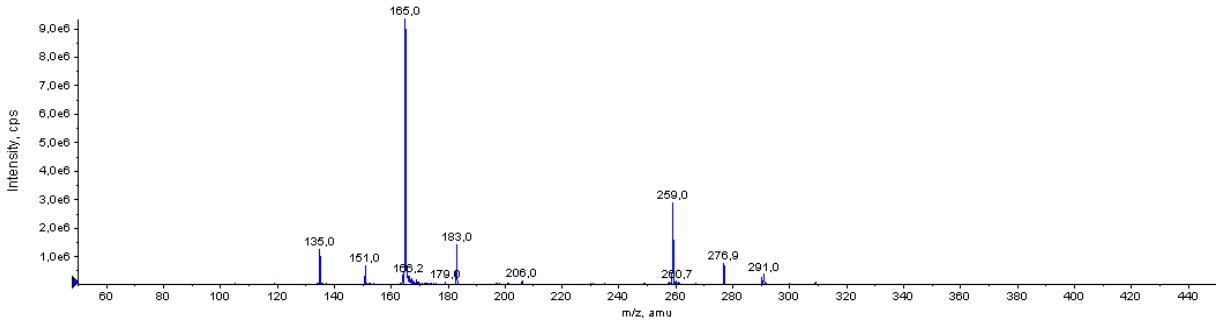
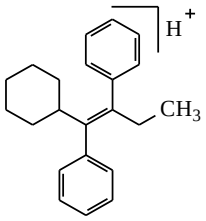


Figura 185 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 291,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V.

A partir da estrutura molecular do Tamoxifeno sugere-se a perda do grupamento oxietil-dietilamina, rompimento das duplas ligações do anel aromático e entrada de um hidrogênio à molécula do subproduto de *m/z* 291,0 que pode ser visualizada na figura 186.



m/z 291

Figura 186 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 291,0.

O espectro de massas EPI para o subproduto do Tamoxifeno identificado com *m/z* 210,0 encontra-se na figura 187.

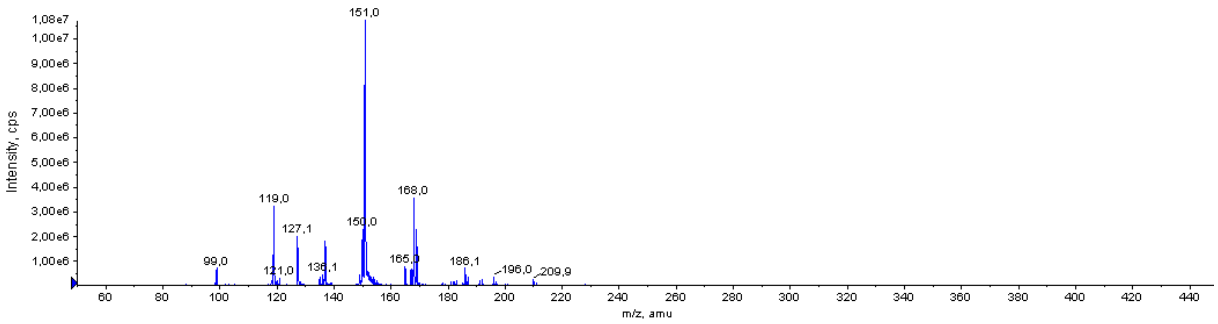
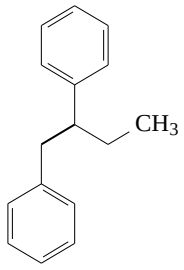


Figura 187 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 210,0. Experimento EMS + EPI com CE 25 V.

Este subproduto do Tamoxifeno encontrado no espectro EPI acima origina-se da saída do grupamento fenil-oxietil-dimetilamina e da abertura de uma das duplas ligações da estrutura molecular do Tamoxifeno dando origem a molécula de *m/z* 210,0 (Figura 188).



m/z 210

Figura 188 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 210,0.

De acordo com as *m/z* encontradas nos experimentos de MS-IDA-XIC seguido de EPI com as EC aplicadas para obtenção das melhores fragmentações estruturais para cada um dos subprodutos identificados. Na figura 189 encontram-se a estrutura molecular do Tamoxifeno seguida das estruturas propostas para seus subprodutos formados pelo processo de ozonização em solução aquosa enriquecida do composto.

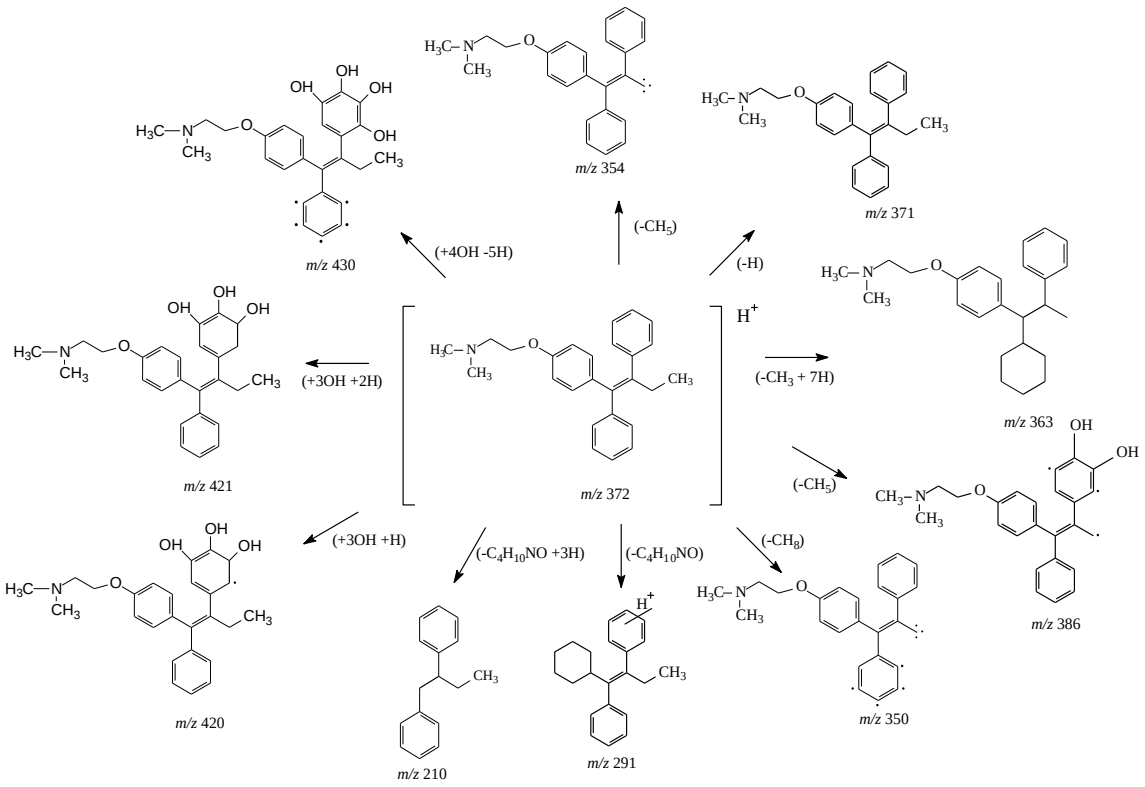


Figura 189 - Tamoxifeno e subprodutos de degradação identificados após a aplicação do processo de ozonização à solução aquosa.

5.4.5.16 Ozonização aplicado ao efluente hospitalar fortificado de Tamoxifeno

Em amostra de efluente hospitalar submetida ao processo de ozonização por 60 min foram identificados 9 subprodutos do composto Tamoxifeno. Os produtos de degradação *m/z*354,0; 369,0; 427,0; 430,0; 383,0; 375,0; 353,0; 270,0 e 204,0 foram identificados através do experimento IDA EMS com EPI nas 3 CE 10, 25 e 50 V previamente selecionadas. O espectro de massas EPI no qual encontra-se o subproduto *m/z* 354,0 e seus produtos fragmentados pode ser observado na figura 190.

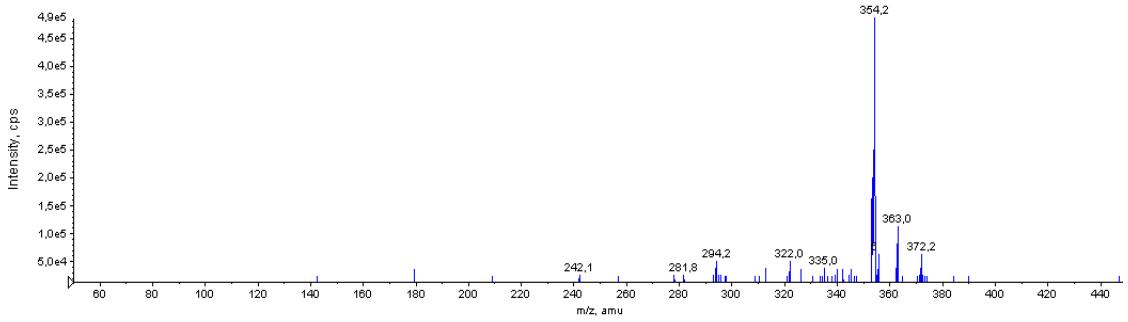


Figura 190 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 354,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V.

O subproduto *m/z* 354,0 foi encontrado no espectro de massas do experimento EMS-EPI em solução aquosa submetida à fotocatálise, no espectro de massas EPI da amostra de efluente hospitalar submetida ao processo de fotocatálise heterogênea, no espectro de massas EPI da solução aquosa submetida à ozonização, bem como, em amostra de efluente hospitalar ozonizada. A melhor fragmentação em todos os espectros EPI foi obtida utilizando uma EC de 10 V. Os fragmentos de massas que deram origem ao subproduto *m/z* 354,0 como íon produto nos espectros, foram os mesmos nos experimentos EPI feitos com amostra de efluente hospitalar submetido ao processo de fotocatálise heterogênea e submetida ao processo de ozonização, bem como, para ozonização em solução aquosa. Portanto, as estruturas de massas propostas para este subproduto podem ser observadas na figura 131, pag. 249.

O espectro de massas EPI para o subproduto *m/z* 369,0 previamente identificado em solução aquosa e em amostra de efluente hospitalar submetidos aos processos de fotólise e fotocatálise heterogênea respectivamente encontra-se na figura 136, pag. 251.

O espectro de massas EPI onde o subproduto do Tamoxifeno *m/z* 369,0 foi encontrado em amostra de efluente hospitalar submetida ao processo de ozonização encontra-se na figura 191.

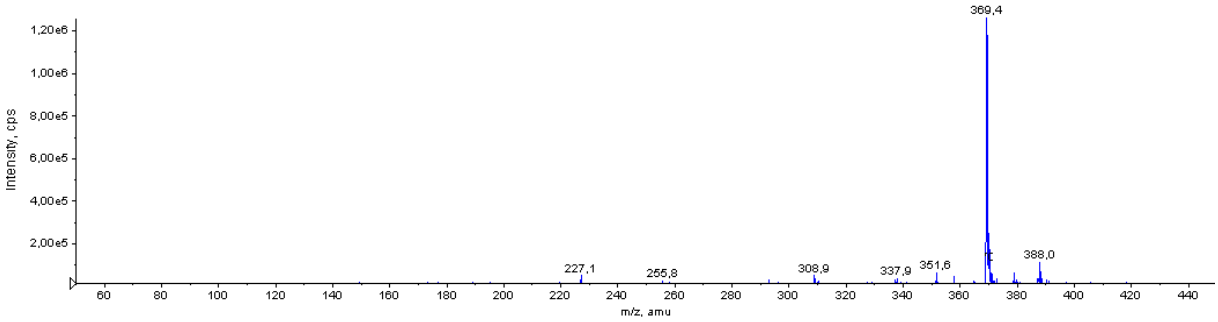


Figura 191 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 369,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V.

O fragmento de *m/z* 388,0 encontrado no espectro de massas com CE 10 V é proveniente da clivagem do anel aromático e entrada da hidroxila e saída de 3 hidrogênios da estrutura molecular do Tamoxifeno. A partir desta estrutura tem-se a saída da hidroxila e mais 2 hidrogênios da molécula formando o subproduto *m/z* 369,0 como pode-se observar na figura 192.

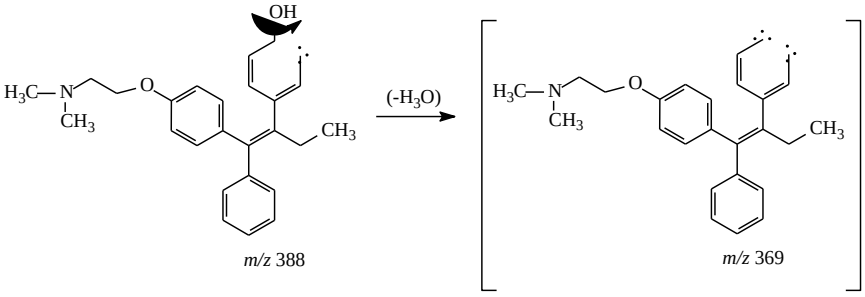


Figura 192 - Estrutura molecular do fragmento e do subproduto do Tamoxifeno *m/z*369,0.

O subproduto de *m/z* 427,0 foi encontrado em amostra de efluente hospitalar pela aplicação de ambos os processos oxidativos fotocatálise heterogênea e ozonização. Na figura 193, encontra-se o espectro de massas EPI onde o subproduto foi identificado em amostra de efluente hospitalar.

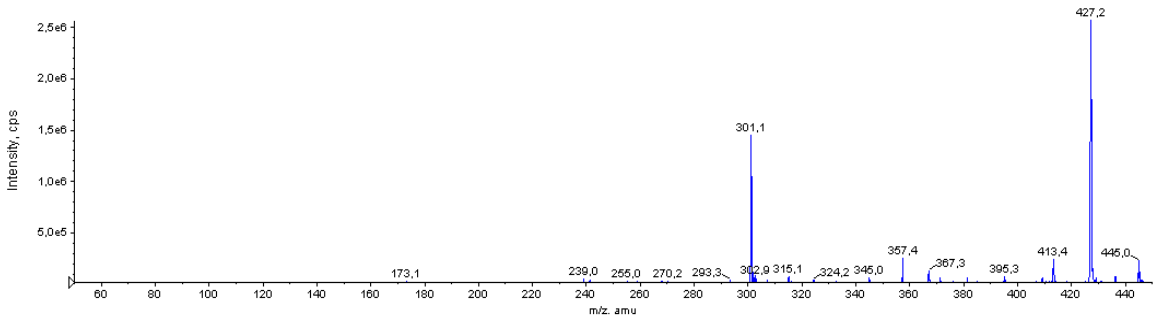


Figura 193 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 427,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V.

Observando o espectro de massas EPI acima tem-se o fragmento de *m/z* 445,0 este, sugere a entrada de 5 hidroxilas a estrutura molecular do Tamoxifeno que possui *m/z* 372,0 e, saída de 6 hidrogênios da mesma. Seguindo-se para a formação do subproduto *m/z* 427,0 tem-se a saída de uma hidroxila e mais um hidrogênio da estrutura molecular do fragmento *m/z* 445,0. Na figura 194 estão as estruturas moleculares propostas.

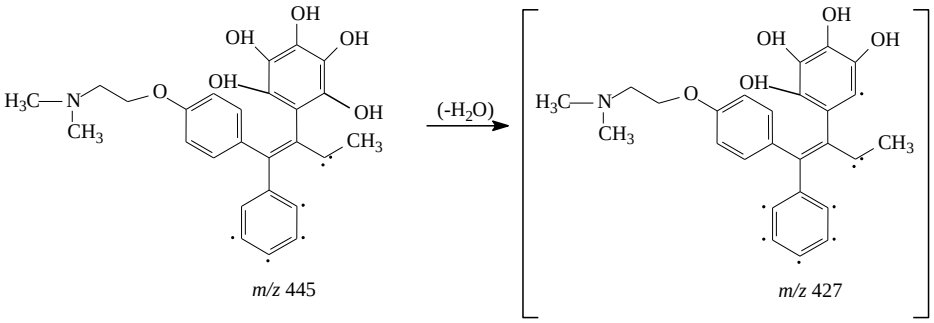


Figura 194 - Estrutura molecular do fragmento e do subproduto do Tamoxifeno *m/z*427,0.

O espectro de massas EPI com EC 10 V referente ao subproduto *m/z* 430,0 encontra-se na figura 195.

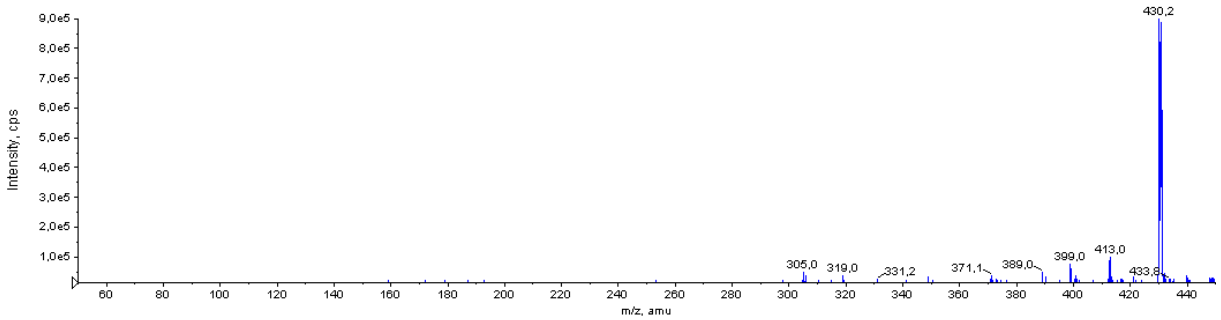


Figura 195 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 430,0. Experimento EMS + EPI com EC 10 V.

Este subproduto *m/z* 430,0 foi identificado no espectro de massas EPI como fragmento que deu origem ao subproduto do Tamoxifeno *m/z* 389,0 pela aplicação de fotólise, bem como, no espectro de massas EPI como subproduto do Tamoxifeno pela aplicação do processo de ozonização em solução aquosa, ambos os espectros com CE 25 V. E, também, em amostra de efluente hospitalar ozonizado. Sua estrutura molecular já foi proposta e pode ser observada na figura 145, pag. 256.

O espectro de massas EPI obtido para o fragmento *m/z* 383,0 pode ser observado na figura 196.

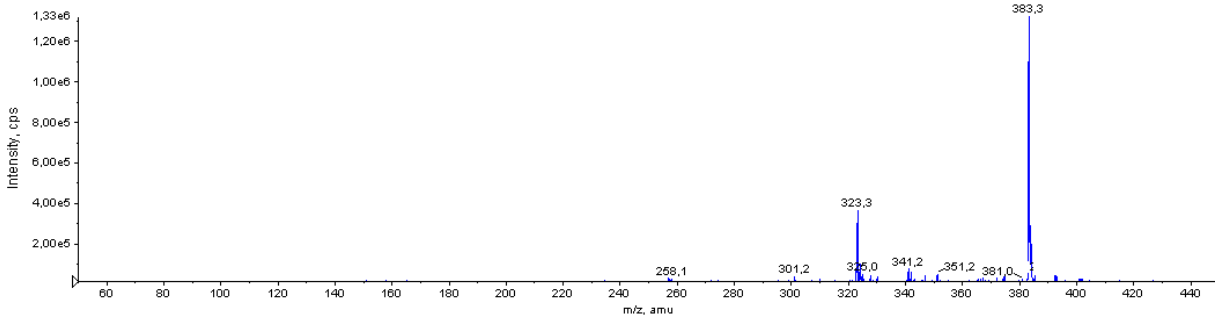
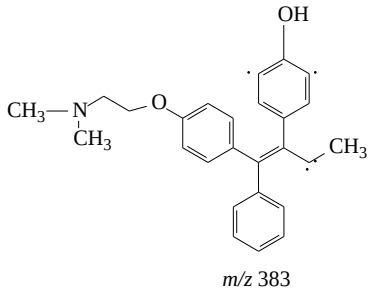


Figura 196 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 383,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V.

A estrutura molecular proposta para o subproduto de degradação *m/z* 383,0 (Figura 197) sugere a entrada de uma hidroxila e saída de 4 hidrogênios da estrutura molecular do produto Tamoxifeno.



m/z 383

Figura 197 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 383,0.

O espectro de massas EPI com CE 10 V onde o subproduto *m/z* 375,0 foi identificado encontra-se na figura 198.

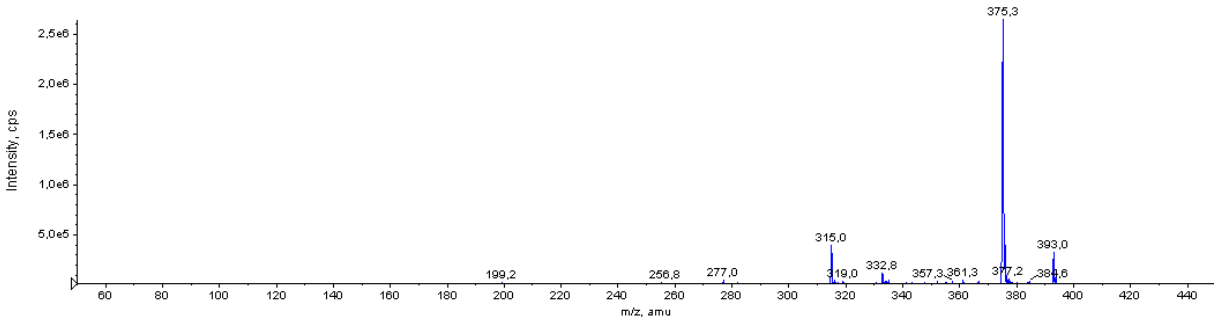


Figura 198 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 375,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V.

A partir da estrutura molecular do Tamoxifeno sugere-se para o fragmento de *m/z* 393,0 a entrada de 2 hidroxilas à molécula e saída de 10 hidrogênios da mesma. E, para a formação do subproduto partindo desta estrutura tem-se a saída de uma hidroxila e um hidrogênio da molécula. Estas estruturas propostas podem ser observadas na figura 199. O fragmento de *m/z* 393,0 foi identificado como subproduto de degradação do Tamoxifeno pela aplicação de fotólise à solução aquosa (Figura 149, pag. 258).

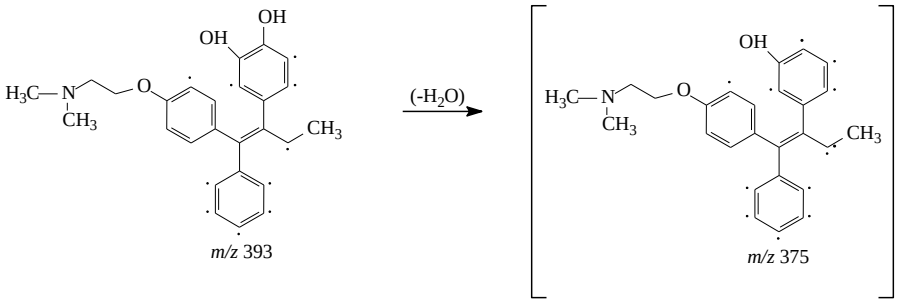


Figura 199- Estrutura molecular do fragmento e do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 375,0.

Na figura 200 encontra-se o espectro de massas EPI com EC 10 V onde o subproduto do Tamoxifeno *m/z* 353,0 foi identificado e fragmentado.

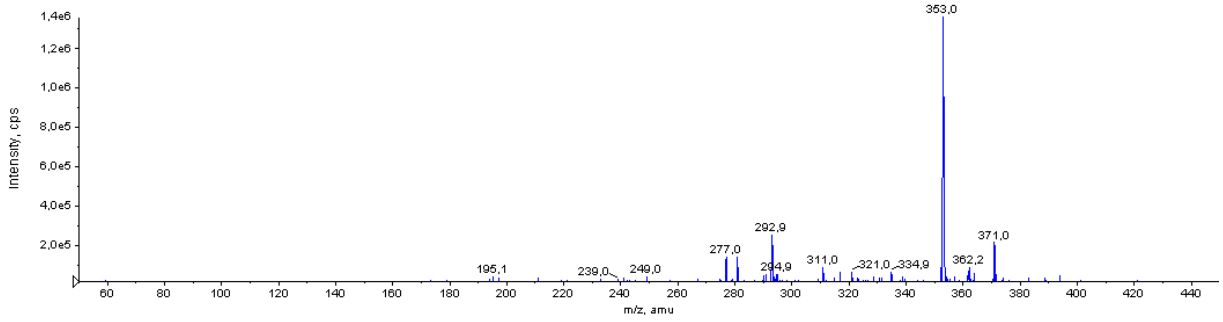


Figura 200- Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 353,0. Experimento EMS + EPI com EC 10 V.

Os fragmentos *m/z* 371,0 e 362,0 foram identificados como subproduto do Tamoxifeno pela aplicação de fotólise e, encontram-se no espectro EPI (Figura 200) como fragmentos do subproduto *m/z* 353,0 em efluente hospitalar submetido à ozonização. As estruturas moleculares propostas estão dispostas (Figura 201) e propõe-se a saída de um dos grupamentos metila e quebra de 3 duplas ligações para entrada de 6 hidrogênios formando a molécula de *m/z* 362,0. E, para formação do subproduto referente ao espectro (Figura 200), tem-se a saída de um grupamento metila e, mais 3 hidrogênios da estrutura molecular de *m/z* 371,0 formando a molécula *m/z* 353,0.

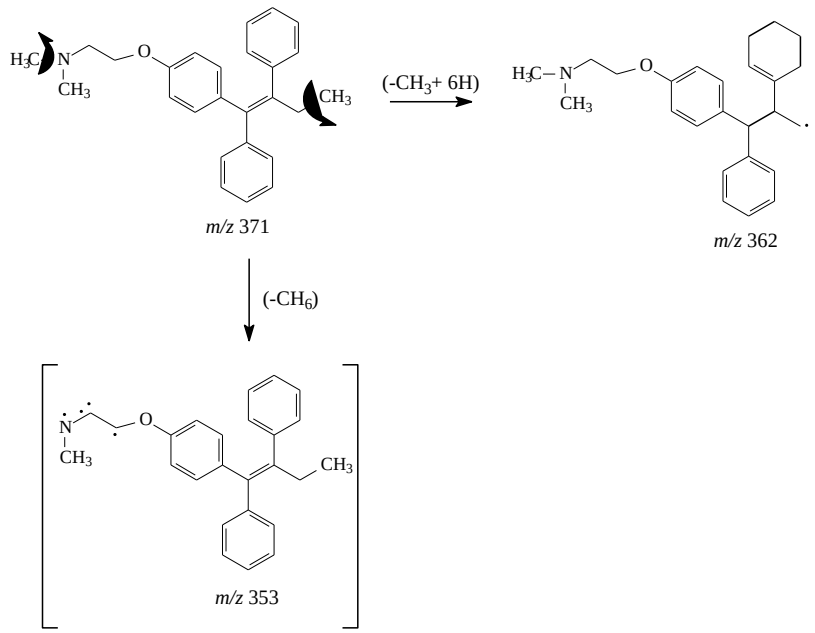


Figura 201 - Estrutura molecular dos fragmentos e do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 353,0.

No espectro EPI da figura 202, encontra-se o subproduto do Tamoxifeno *m/z* 270,0.

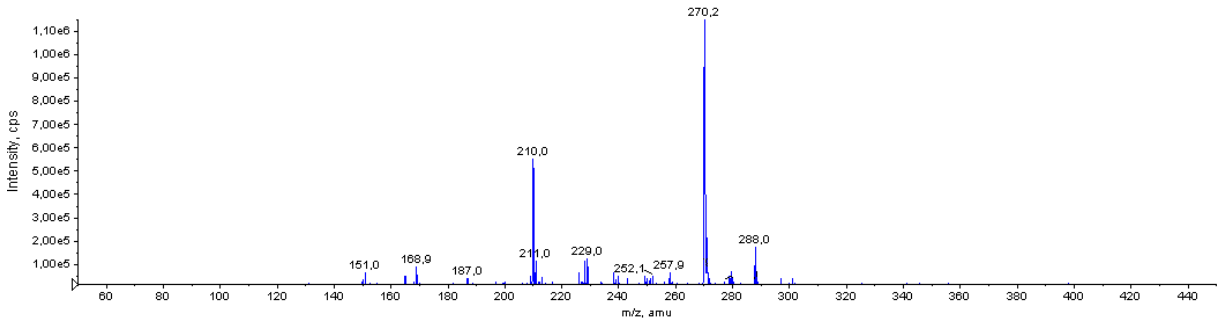


Figura 202 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 270,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V.

Partindo da estrutura molecular do Tamoxifeno se propõe a *m/z* 288,0 pela saída do grupamento etil-dimetilamina, do grupamento metila e, rompimento de duas duplas ligações para entrada de 4 hidrogênios. Partindo desta estrutura tem-se a saída do oxigênio e mais dois hidrogênios formando, desta maneira, o subproduto identificado *m/z* 270,0. As estruturas propostas para o fragmento e o subproduto podem ser observadas na figura 203.

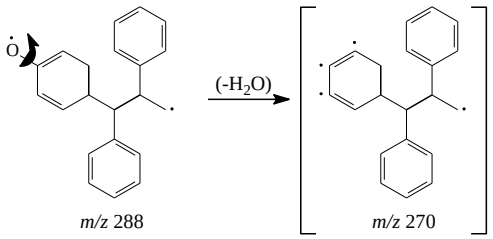


Figura 203 - Estrutura molecular do fragmento e do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 270,0.

O último fragmento identificado para o Tamoxifeno em amostra de efluente submetido ao processo de ozonização foi o *m/z* 204,0, seu espectro EPI CE 10 V pode ser observado na figura 204.

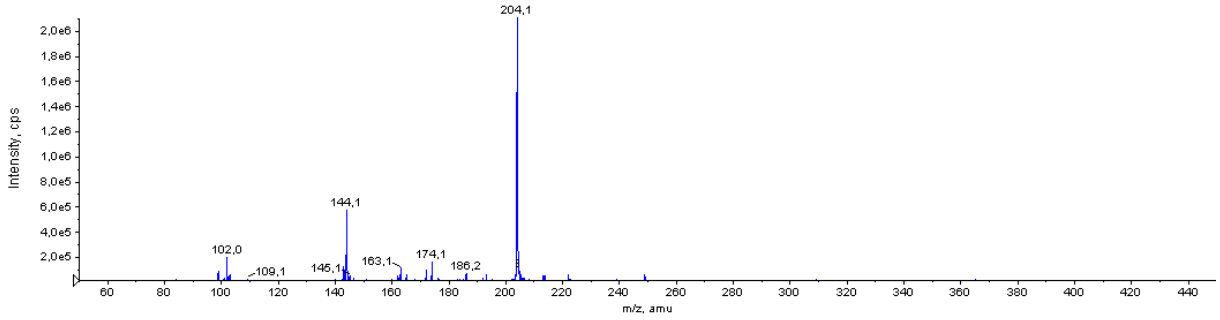


Figura 204 - Espectro de massas EPI do produto de degradação do Tamoxifeno *m/z* 204,0. Experimento EMS + EPI com CE 10 V.

Para a formação do subproduto *m/z* 204,0 (Figura 205) partindo da estrutura molecular do Tamoxifeno com *m/z* 372,0 tem-se a saída do grupamento oxietil-dimetilamina, seguindo da clivagem do anel aromático com a saída de C_4H_3 deste anel, e, saída do grupamento etila.

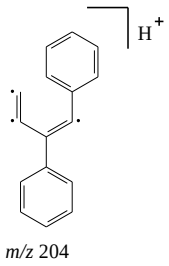


Figura 205 - Estrutura molecular do subproduto do Tamoxifeno *m/z* 204,0.

De acordo com as *m/z* encontradas nos experimentos de MS-IDA-XIC seguido de EPI com as CE aplicadas para obtenção das melhores fragmentações estruturais para cada um dos subprodutos identificados, na figura 206 encontram-se a estrutura molecular do Tamoxifeno seguida das estruturas propostas para seus subprodutos formados pelo processo de ozonização em efluente hospitalar enriquecido do composto.

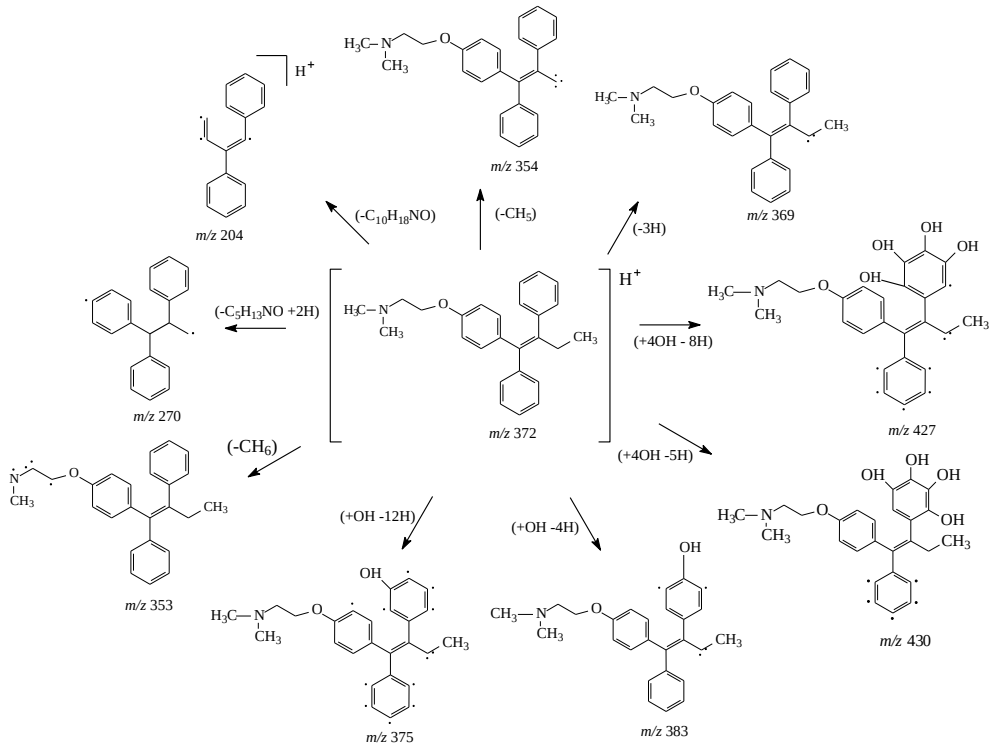


Figura 206 - Tamoxifeno e subprodutos de degradação identificados após a aplicação do processo de ozonização ao efluente hospitalar.

CONCLUSÕES GERAIS

6.0 CONCLUSÕES

A metodologia analítica de HPLC-DAD desenvolvida e validada para a quantificação de EFCT em efluente hospitalar, assistida por SPE, mostrou-se adequada aos propósitos. O emprego das técnicas de LLME e SBSE (embora eficientes em solução aquosa), não foi possível para a quantificação de EFCT em efluente hospitalar em razão da insuficiente sensibilidade instrumental, que exige maior pré-concentração dos analitos.

Embora as recuperações dos EFCTs nos níveis de concentração estudados, empregando-se LLME, tenham sido satisfatórias, a determinação destes no efluente hospitalar não foi possível devido ao LQ instrumental mais elevado do equipamento de HPLC-DAD. Para utilizar esta técnica analítica de quantificação, uma etapa adicional de pré-concentração se faria necessária. Sugere-se, também, a LLME como etapa preliminar de preparo de amostras/*clean up* para a quantificação de EFCTs por LC-MS/MS.

A LLME é conhecida, ainda, por exigir precisão e atenção do analista na retirada da fase aquosa e, também, na rápida manipulação da amostra devido à volatilidade dos solventes extratores. Em compensação, apresenta muitas vantagens: baixo custo geral e reduzido consumo de solventes (μL); volume reduzido de amostra; possibilidade de quantificação direta por LC (após secagem em fluxo de nitrogênio e reconstituição em metanol), entre outras.

A técnica de extração com barras de PU (7 mm x 3,5 mm diâmetro) mostrou-se adequada para solução aquosa e efluente hospitalar, nas mesmas concentrações do estudo da LLME. As melhores condições para a extração de EFCT foram: adição de NaCl 1 mol L^{-1}; pH 5; temperatura de adsorção 25 °C; tempo de adsorção 60 min; temperatura de dessorção 50 °C e tempo de dessorção 60 min, em solução aquosa, e, em efluente hospitalar, sem adição de NaCl; pH 9; temperatura de adsorção 50 °C; tempo de adsorção 60 min; temperatura de dessorção 25 °C e tempo de dessorção 60 min. Da mesma forma que para LLME, a SBSE não pode ser utilizada para a determinação de EFCT em efluente hospitalar, requerendo para isto etapa de pré-concentração adicional para alcançar o LQ instrumental do HPLC-DAD. Também, aqui, sugere-se a SBSE como etapa preliminar de preparo de amostras/*clean up* para a determinação por LC-MS/MS. A grande vantagem da utilização da técnica de extração (SBSE) em barras de agitação, artesanais, empregando-se materiais de construção simples,

são: custo muito baixo comparado ao produto comercial; possibilidade de quantificação direta dos analitos por cromatografia líquida (LC) e boa recuperação dos analitos.

Para a determinação de EFCT em amostras de efluente PA e efluente geral do HUSM, a técnica escolhida foi SPE devido à necessidade de pré-concentração dos analitos. A metodologia SPE seguida de HPLC-DAD foi validada segundo as diretrizes das agências reguladoras responsáveis pela validação de métodos para a determinação de fármacos em matrizes ambientais.

As concentrações médias e os respectivos RSDs medidos para EFCT em efluente hospitalar PA-HUSM foram: Espironolactona 2,7 μg L^{-1} (±7,5%); Flutamida 7,4 μg L^{-1} (±3,7%); Ciprotenona 2,6 μg L^{-1} (±5,0%) e Tamoxifeno 1,0 μg L^{-1} (±5,3%), respectivamente. No efluente geral-HUSM: Espironolactona 3,4 μg L^{-1} (±5,4%); Flutamida 5,0 μg L^{-1} (±1,7%); Ciprotenona 0,9 μg L^{-1} (±3,2%) e Tamoxifeno <LOQ, respectivamente.

Praticamente, não há dados na literatura sobre as concentrações de EFCT em amostras ambientais, particularmente, em efluente hospitalar.

Foi feita uma avaliação preliminar do risco potencial da ocorrência de EFCT em efluente hospitalar. Xenobióticos log Kow 4,5 ou superior são classificados como substâncias de risco, devido à fácil bioacumulação, sem uma exigência de estudos adicionais. Neste contexto, o analito com maior risco ambiental é o Tamoxifeno, e o que representa menor risco, a Espironolactona (de alta hidrossolubilidade), relativamente. Com relação aos valores PEC, todos os analitos estudados, exceto o Tamoxifeno, apresentaram valor de $PEC_{Efl.}$ maior do que 0,01 μg L^{-1}. Para Tamoxifeno, o Coeficiente de Risco calculado foi de 3,59, o que indica alto risco para o meio ambiente. Estes valores demonstram a relevância deste estudo para a discussão ecotoxicológica relativa à emissão de antiandrogênios para o meio ambiente.

Os metabólitos de EFCT foram identificados nas amostras de efluente hospitalar do PA-HUSM bem como, do efluente geral-HUSM, e foram estudadas por meio de experimentos IDA utilizando a ferramenta analítica LC-ESI-QqLIT-MS/MS. Os metabólitos da Espironolactona identificados e estudados nas amostras de efluente PA-HUSM e geral-HUSM foram 7-α-tiometil-espironolactona, canrenoato de potássio e 6-β-hidroxi-7-α-tiometil-espironolactona. Os metabólitos da Flutamida foram identificados por experimentos IDA em modo negativo de ionização nas amostras de efluente PA-HUSM e geral-HUSM, sendo estes: 2-hidroxiflutamida, Flu-1, Flu-3, Flu-5, Flu-6. Os metabólitos da Ciproterona, identificados em amostra de efluente, foram 15-hidroxiciproterona e 15-beta-hidroxi Ciproterona, ambos em amostra de efluente PA-HUSM. Os metabólitos do Tamoxifeno identificados em amostras de efluente hospitalar PA-HUSM e, também, geral-HUSM por experimentos IDA foram: N-

desmetil Tamoxifeno, N-desmetil Tamoxifeno-d5, 4-OH-Tamoxifeno, 4-OH-Tamoxifeno-d5 e endoxifeno-d5.

A metodologia analítica LC-ESI-MS/MS foi utilizada com êxito fornecendo informações estruturais relevantes dos compostos para outros estudos e comparações com a metodologia LC-ESI-QqLIT-MS/MS.

Na fotocatálise heterogênea, a imobilização de TiO_2 em barras de PU demonstrou grande aplicabilidade e eficiência na degradação de EFCT em efluente da complexidade do hospitalar, tanto que, os resultados dos testes de desempenho do sistema com TiO_2 suportado nas barras poliméricas é bem superior ao demonstrado pelo TiO_2 em suspensão (e, maior ainda, comparado à fotólise simples). Para a solução aquosa, totalmente transparente, a fotólise direta apresentou maior eficiência na degradação de EFCT. A influência negativa da matriz complexa do efluente hospitalar ficou evidenciada pela menor eficiência da fotólise; na fotocatálise, as barras poliméricas com TiO_2 suportado induzem maior formação de radicais (hidroxil), aumentando a fotodegradação dos analitos.

As melhores condições do planejamento fatorial para a degradação completa de EFCT em solução aquosa foram: fotólise, pH 9 e temperatura intermediária de 30 °C; condições utilizadas para os estudos cinéticos e para o estudo dos subprodutos da fotodegradação dos analitos. E, em efluente hospitalar fortificado: fotocatálise com barras de PU/TiO_2, pH 5 e temperatura 30 °C; condições utilizadas para estudos cinéticos e dos subprodutos da fotodegradação de EFCT no efluente hospitalar fortificado.

A aplicação da fotocatálise heterogênea utilizando barras de PU/TiO_2 elimina a morosa e dispendiosa etapa de filtração (0,45 μm), indispensável, quando se faz uso de catalisador em suspensão. Além do baixo custo no tratamento de efluente hospitalar, este procedimento ainda proporcionou o reuso das barras poliméricas com TiO_2 durante diversos ensaios de degradação (aproximadamente 20 ensaios), sem perda perceptível de eficiência.

Estudos de cinética de reação foram realizados para cada um dos compostos EFCT em ambas as amostras solução aquosa e efluente hospitalar, sendo que, cinéticas de ordem zero e de primeira ordem foram obtidas para os fármacos nas matrizes estudadas.

Na otimização do processo de ozonização, o pH 5 foi a melhor condição para a degradação de EFCT, de acordo ensaios prévios, em solução aquosa e em efluente hospitalar; e, o tempo reacional total, de min de ozonização. As constantes cinéticas de reação em solução aquosa apresentaram melhores coeficientes de regressão aplicando-se cinética de ordem zero para Tamoxifeno e, primeira ordem, para os demais analitos. Em efluente hospitalar, todos os coeficientes de regressão tiveram melhores valores aplicando-se cinética

de reação de primeira ordem, ou seja, pseudo primeira ordem, devido ao fato de outras reações ocorrerem concomitantemente, pois, a matriz efluente hospitalar é de grande complexidade.

A técnica de LC-ESI-QqLIT-MS/MS utilizada para a identificação e estudo dos subprodutos gerados pelos processos oxidativos aplicados em solução aquosa e em efluente hospitalar mostrou-se de grande eficiência.

Para a Espironolactona foram feitos experimentos de PREC (107), este experimento proporcionou a identificação de 4 subprodutos da fotólise e, para a fotocatálise em efluente hospitalar, 3 subprodutos foram identificados por este método, diferenciando-se apenas na *m/z* de um único composto. Na ozonização em solução aquosa e em efluente hospitalar foram gerados 3 subprodutos de degradação, diferenciando-se apenas na *m/z* de um dos subprodutos.

O experimento PREC (202) em modo negativo de ionização, foi adequado para a identificação dos subprodutos da Flutamida, onde, obteve-se 4 subprodutos do processo de fotólise em solução aquosa; e na fotocatálise, em amostra de efluente hospitalar, apenas 2 subprodutos. A ozonização em solução aquosa também deu origem a 2 subprodutos e, em efluente hospitalar, os mesmos subprodutos foram identificados pelo experimento referido.

Para identificação dos subprodutos da Ciproterona utilizou-se, com êxito, o experimento PREC (357), em que, por meio de fotólise foram identificados 3 produtos de degradação em solução aquosa; e, em efluente hospitalar submetido à fotocatálise, os mesmos subprodutos. Por meio de ozonização em solução aquosa foram identificados 3 subprodutos; e, em efluente hospitalar ozonizado, também 3 produtos de degradação foram identificados pelo experimento em modo positivo de ionização.

Para Tamoxifeno melhores resultados no estudo e identificação dos compostos gerados por processos oxidativos foram obtidos pela utilização do experimento IDA EMS com EPI aplicando-se 3 energias de colisão (10, 25 e 50 V). Pela fotólise em solução aquosa foram identificados 11 subprodutos do Tamoxifeno e, em efluente hospitalar, por fotocatálise heterogênea, foram identificados 12 subprodutos. Pela ozonização em solução aquosa foram identificados 10 subprodutos do Tamoxifeno e, em efluente hospitalar, após 60 min de ozonização, foram identificados 9 produtos de degradação através deste experimento.

TRABALHOS FUTUROS

7.0 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Pesquisar outras drogas anticâncer mais utilizadas nas instituições de saúde (como p. ex., anastrazol, letrozol, acetato de megestrol);
- Desenvolver metodologias analíticas para a determinação e o estudo da ocorrência de drogas anticâncer, seus metabólitos e produtos da degradação para outras matrizes ambientais (águas de abastecimento público e superficial, solos e sedimentos, e efluentes diversos), como também alimentos, em especial (carnes, laticínios e derivados);
- Estudar a biodegradabilidade e a toxicidade de anticancerígenos em geral;
- Aprofundar estudo de aplicação de planejamento multivariado de experimentos;
- Aplicar, também, outros PAOs ao estudo de degradação de antiandrogênios e subprodutos gerados;
- Aprofundar estudo de novas técnicas de microextração; Aliar SBSE à LLME para promover a pré-concentração dos analitos para possível quantificação em efluente hospitalar;
- Utilizar novos materiais de construção para as barras de adsorção: diferentes tipos de polímeros, grafeno e nano-TiO_2.
- Avaliar reatores contínuos para POA.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUINACO, A. et al. Photocatalyticozonation to remove the pharmaceutical diclofenac from water: Influence of variables. **Chemical Engineering Journal**, 189–190, 275– 282, 2012.

AL-ODAINI, N.A. et al. Multi-residue analytical method for human pharmaceuticals and synthetic hormones in river water and sewage effluents by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1217, 6791–6806, 2010.

ALTMANN, D. et al. Impact of ozonation on ecotoxicity and endocrine activity of tertiary treated wastewater effluent.**Water research**, 46, 3693-3702, 2012.

ARANDA, E.O. et al. Development of a methodology to quantify tamoxifen and endoxifen in breast cancer patients by micellar liquid chromatography and validation according to the ICH guidelines. **Talanta**, 84, 314-318, 2011.

ARAGÃO, N.M. et al. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (clae) e os princípios da "química verde" na determinação de metilxantinas em bebidas. **Quimica Nova**, Vol. 32, No. 9, 2476-2481, 2009.

ARDREY, R.E. LiquidChromatography– Mass Spectrometry: An Introduction. JohnWiley&Sons, Ltd: UK, 2003.

ARSAND, D.R. 2010. **Anti-inflamatório dexametasona: Estudos de biodegradabilidade, toxicidade, ocorrência e degradação oxidativa avançada em efluente hospitalar**. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, RS.

BARCO-BONILLA, N. et al. Comprehensive analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater using stir bar sorptive extraction and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 693, 62-71, 2011.

BASHEER, C.; LEE, H.K.; OBBARD, J.P. Determination of organochlorine pesticides in seawater using liquid-phase hollow fibre membrane microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 968, 191–199, 2002.

BAZHDANZADEH, S. et al.A simple and reliable stir bar sorptive extraction-liquid chromatography procedure for the determination of chlorpromazine and trifluoperazinein

human serum using experimental design methodology. **Journal of Separation Science**, 34, 90–97, 2011.

BEDENDO, G.C.; CARASEK, E. Simultaneous liquid–liquid microextraction and polypropylene microporous membrane solid-phase extraction of organochlorine pesticides in water, tomato and strawberry samples. **Journal of Chromatography A**, 1217, 7–13, 2010.

BEHERA.K.B. et al. Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea. **Science of the Total Environment**, 409, 4351-4360, 2011.

BELTRÁN, F. J.; AGUINACO, A; GARCÍA-ARAYA, J. F. Mechanism and kinetics of sulfamethoxazole photocatalytic ozonation in water. **Water Research**, 43, 1359–1369, 2009.

BELTRÁN, F.J. et al. Ozone and photocatalytic processes to remove the antibiotic sulfamethoxazole from wáter. **Water research**, 42, 3799-3808, 2008.

BENITEZ, F.J. et al. Ozonation of pharmaceutical compounds: Rate constants and elimination in various water matrices. **Chemosphere**, 77, 53–59, 2009.

BESSE, J.P., GARRIC, J. Progestagens for human use, exposure and hazard assessment for the aquatic environment. **Environmental Pollution**, 157, 3485–3494, 2009.

BESSE, J.-P.et al. Anticancer drugs in surface waters. What can we say about the occurrence and environmental significance of cytotoxic, cytostatic and endocrine therapy drugs? **Environment International**, 39, 73–86, 2012.

BEZERRA, M. A. et al. Response Surface Methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, 76, 965-977, 2008.

BILA, D.M., DEZOTTI, M., Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. **Quimica Nova**, Vol. 30, No. 3, 651-666, 2007.

BINKHORST, L., et al. Quantification of tamoxifen and three of its phase-I metabolites in human plasma by liquid chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 56, 1016-1023, 2011.

BJERGAARD, S.P.; RASMUSSEN, K.E. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid–liquid extraction. **Journal of Chromatography A**, 1184, 132–142, 2008.

BOGUSZ, M.J., et al. Application of LC–ESI–MS–MS for detection of synthetic adulterants in herbal remedies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 41, 554–564, 2006.

BOLEDA, R.; GALCERAN, T.; VENTURA, F. Behavior of pharmaceuticals and drugs of abuse in a drinking water treatment plant (DWTP) using combined conventional and ultrafiltration and reverse osmosis (UF/RO) treatments. **Environmental Pollution**, 159, 1584-1591, 2011.

BOUZAZA, A.; LAPLANCHE, A. Photocatalytic degradation of toluene in the gas phase: comparative study of some TiO_2 supports. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, 150, 207-212, 2002.

BRENNER, C. G. B. et al. Determination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim and Their Metabolites in Hospital Effluent. **Clean-Soil Air Water**, 39, 28-34, 2011.

BROECKER, S., HERRE, S., PRAGST, F. General unknown screening in hair by liquid chromatography–hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC–QTOF-MS). **Forensic Science International**, 218, 68–81, 2012.

CALLESEN, A.K. et al. Reproducibility of mass spectrometry based protein profiles for diagnosis of ovarian cancer across clinical studies: A systematic review. **Journal of Proteomics**, 75, 2758–2772, 2012.

CARPINTEIRO, I. et al. Combining stir-bar sorptive extraction and large volume injection-gas chromatography- mass spectrometry for the determination of benzotriazole UV stabilizers in wastewater matrices. **Journal of Separation Science**, 35, 459–467, 2012.

CASTILHO, I.N.B. et al. Comparison of three different sample preparation procedures for the determination of traffic-related elements in airborne particulate matter collected on glass fiber filters. **Talanta**, 88, 689-695, 2012.

CHAVES, A.R.; QUEIROZ, M. E. Extração sortiva em barra de agitação para análise de fármacos em fluidos biológicos. **Quimica Nova**, v. 31, n. 7, p. 1814-1819, 2008.

CHHABIL, D. **Fundamentals of contemporary mass spectrometry**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2007.

CHRISTEN, V. et al. Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems: A concept for their identification based on their mode of action. **Aquatic Toxicology**, 96, 167-181, 2010.

CHRISTENSEN, A.M. et al. Probabilistic environmental risk characterization of pharmaceuticals in sewage treatment plant discharges. **Chemosphere**, 77, 351-358, 2009.

CHRISTIAENS, B., et al. Fully automated method for the liquid chromatographic–tandem mass spectrometric determination of cyproterone acetate in human plasma using restricted access material for on-line sample clean-up. **Journal of Chromatography A**, 1056, 105–110 2004.

CHUANG, L.-C.; LUO, C.-H.; LIN, C.-J. Degradation Characteristics of Sulfamethoxy pyridazine in Water by Ozonation and Photocatalysis**. Procedia Engineering**, 15, 5133 – 5137, 2011.

CIOLA , R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho – HPLC**. Editora Edgard Blucher, 2000.

COLLINS, H. C.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia.** Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2006.

COLTON, H.F.W., FRANCIS, P.W.T., TERENCE, S.M.W. A broad-spectrum equine urine screening method for free and enzyme-hydrolysed conjugated drugs with ultra performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 697, 48–60, 2011.

CONAMA, 2011. **Conselho Nacional do Meio Ambiente**. Resolução Nº 430, de 13 de maio de 2011.

DAHMANE E. et al. An ultra performance liquid chromatography–tandem MS assay for tamoxifen metabolites profiling in plasma: First evidence of 4´-hydroxylated metabolites in breast cancer patients. **Journal of Chromatography B**, 878, 3402-3414, 2010.

DAVID, F.; SANDRA, P. Stir bar sorptive extraction for trace analysis. **Journal of Chromatography A**, 1152, 54-69, 2007.

DAVID, K.G., et al. Multiple human D5 dopamine receptor genes: A functional receptor and two pseudogenes. **Physiology/Pharmacology**, Vol. 88, 9175-9179, 1991.

DA SILVA, S.D. **BTEX: Desenvolvimento de barras de extração sortiva, determinação em efluente hospitalar e degradação por meio de fotocatálise heterogênea com tio_2 suportado em polímeros**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2012-a.

DA SILVA, D.S. et al. PDMS extraction bars for the determination of volatile aromatic hydrocarbons in water and wastewater. **Journal of Separation Science**, 36, 362–368, 2013-b.

DA SILVA L.L.; DONNICI, C.L.; LOPES, J.C.D. Investigação eletroquímica e calorimétrica da interação de novos agentes antitumorais biscatiônicos com DNA. **Quim. Nova**,Vol. 35, No. 7, 1318-1324, 2012-c.

DE ARAGÃO, N. M.;VELOSO, M. C. DA C.;DE ANDRADE, J.B. validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da "química Verde" na determinação de metilxantinas em bebidas. **Quim. Nova**,Vol. 32, No. 9, 2476-2481, 2009.

DE HOFFMAN, E., STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. Toronto: Wiley, 2003. pp. 133.

DE HOFFMANN, E., STROOBANT, V. **Mass spectrometry: principles and applications.** England: John Wiley & Sons Ltd, 2007. 3rd ed.

DE OLIVEIRA, A.R.M. et al. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Quim. Nova**,Vol. 31, No. 3, 637-644, 2008.

DELLAGRECA, M., et al. Phototransformation products of tamoxifen by sunlight in water.Toxicity of the drug and its derivatives on aquatic organisms. **Chemosphere**, 67, 1933–1939, 2007.

EINSIEDL, F., RADKE, M., MALOSZEWSKI, P. Occurrence and transport of pharmaceuticals in a karst groundwater system affected by domestic wastewater treatment plants**. Journal of Contaminant Hydrology**, 117, 26-36, 2010.

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

FERNÁNDEZ. C., et al. Occurrence of pharmaceutically active compounds in surface waters of the henares-jarama-tajo river system (Madrid, Spain) and a potential risk characterization. **Science of the Total Environment,** 408, 543-551, 2010.

FLORES, J. R., et al. Nonaqueous capillary electrophoresis method for the analysis of tamoxifen, imipramine and their main metabolites in urine. **Talanta,** 65, 155–162, 2005.

FRAM, M.S.; BELITZ, K. Occurrence and concentrations of pharmaceutical compounds in groundwater used for public drinking-water supply in California. **Science of the Total Environment**, 409, 3409-3417, 2011.

FRITH, R.G., PHILLIPOU, G. 15-hydroxycyproterone acetate and cyproterone acetate levels in plasma and urine. **Journal of Chromatography**, 338, 179-186, 1985.

GIBS, J. et al. Persistence of pharmaceuticals and other organic compounds in chlorinated drinking water as a function of time. **Science of the Total Environment**, 373, 240-249, 2007.

GODA, R., et al. Detection of a new n-oxidized metabolite of flutamide, n-[4-nitro-3-(trifluoromethyl)phenyl]hydroxylamine, in human liver microsomes and urine of prostate cancer patients. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Vol. 34, No. 5, 2006.

GONZALEZ, M. G. et al. Vacuum-ultraviolet photolysis of aqueous reaction systems. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, 5, 225-246, 2004.

GOTTSCHAL, N. et al. Pharmaceutical and personal care products in groundwater, subsurface drainage, soil, and wheat grain, following a high single application of municipal biosolids to a field. **Chemosphere**, 87, 194-203, 2012.

GOTTSCHALK, C., LIBRA, J.A. & SAUPE, A., 2000.*Ozonation of water and wastewater: a practical guide to understanding ozone and its application*, Ed. Wiley-VCH, Alemanha.

GRACIA-LOR, E. et al. Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia. **Chemosphere**, 87, 453-462, 2012.

GROS, M. et al. Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. **Environment International**, 36, 15-26, 2010.

GULTEKIN, I.; INCE, N. H. Synthetic endocrine disruptors in the environment and water remediation by advanced oxidation processes. **Journal of Environmental Management**, 85, 816–832, 2007.

HAQUE, M.M.; MUNEER, M. Photodegradation of norfloxacin in aqueous suspensions of titanium dioxide. **J. Hazard. Mater**, 145, 51-57, 2007.

HASHIMOTO, K.; IRIE, H.; FUJISHIMA, A. TiO_2photocatalysis: a historical overview and future perspectives. **Journal of Applied Physics**, 44, 8269-8285, 2005.

HASSONVILLE, S. et al. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of cyproterone acetate in human skin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 36, 133–143, 2004.

HENGEL, S. M., GOODLETT, D.R. A review of tandem mass spectrometry characterization of adenosine diphosphate-ribosylated peptides. **International Journal of Mass Spectrometry**, 312, 114-121, 2012.

HENRIQUES, D.M. et al. Nonylphenol polyethoxylate in hospital wastewater: A study of the subproducts of electrocoagulation. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, 47, 497–505, 2012.

HERNÁNDEZ, J.M. et al. Are human progestagens among the causes of amphibian extinction? **Bioscience Hypotheses**, 2, 186-187, 2009.

HERRMANN, J. Photocatalysis fundamentals revisited to avoid several misconceptions. **Applied Catalysis B: Environmental**, 99, 461-468, 2010.

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

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

HISANAGA, T.; TANAKA, K. Photocatalytic degradation of benzene on zeolite-incorporated TiO_2 film. **Journal of Hazardous Materials**, 93, 331-337, 2002.

HOVE, E.R.A.V.; SMITH, D.F.; HEEREN, R.M.A. A concise review of mass spectrometry imaging. **Journal of Chromatography A**, 1217, 3946–3954, 2010.

HUANG, X.; LIN, J.; YUAN, D. Simple and sensitive determination of nitroimidazole residues in honey using stir bar sorptive extraction with mixed mode monolith followed by liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, 34, 2138–2144, 2011.

HUERTA-FONTELA, M.; GALCERAN, M.T.; VENTURA, F. Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment.**Water research**, 45, 1432-1442, 2011.

JARDIM, W. DE-F.; TEIXEIRA, C. P. DE-A. B, 2004. *Processos Oxidativos avançados: conceitos teóricos*. Caderno temático, v 3. Campinas: UNICAMP.

JELIC, A. et al. Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. **Water research**, 45, 1165-1176, 2011.

JOLLY, C. et al. Detection of the anti-androgenic effect of endocrine disrupting environmental contaminants using in vivo and in vitro assays in the three-spined stickleback. **Aquatic Toxicology**, 92, 228–239, 2009.

KANG, P. et al. Bioactivation of Flutamide Metabolites by Human Liver Microsomes. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, DMD** 36, 1425-1437, 2008.

KANG, P. et al. Identification of a Novel Glutathione Conjugate of Flutamide in Incubations with Human Liver Microsomes. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**, DMD 35, 1081-1088, 2007.

KASHTIARAY, A. et al. Trace Determination of Tamoxifen in Biological Fluids Using Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction Followed by High-Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet Detection. **American Journal of Analytical Chemistry**, 2, 429-436, 2011.

KASPER, P. Cyproterone Acetate: A Genotoxic Carcinogen? **Pharmacology & Toxicology**, 88, 223-231, 2001.

KAWAGUCHI, M. et al. Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption - gas chromatography – mass spectrometry for determination of chlorophenols in water and body fluid samples. **Analytica Chimica Acta**, 533, 57-65, 2005.

KAWAGUCHI, M. et al. Stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for trace analysis of benzophenone and its derivatives in water sample. **Analytica Chimica Acta**, 557, 272-277, 2006-a.

KAWAGUCHI, M. et al. Novel stir bar sorptive methods for environmental and biomedical analysis. **J. Pharm. Biomed. Anal**, 40, 500-508, 2006-b.

KHAN, U. et al. UV and solar TiO_2 photocatalysis of brevetoxins (PbTxs). **Toxicon**, 55, 1008-1016, 2010.

KING, N., HITTINGER, C.T., CARROLL, S.B. Evolution of key cell signaling and adhesion protein families predates animal origins. **Science**, 361-363, 2003.

KLAVARIOTI, M.; MANTZAVINOS, D.; KASSINOS, D. Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. **Environment International**, 35, 402–417, 2009.

KOLE, P. L.; MILLERSHIP, J.; MCELNAY, J. C. Determination of diclofenac from paediatric urine samples by stir bar sorptive extraction (SBSE)–HPLC–UV technique. **Talanta**, 85, 1948–1958, 2011.

KOZLOWSKA-T, K.; NAMIEŚNIK, J.; GÓRECKI, T. Determination of Estrogenic Endocrine Disruptors in Environmental Samples - **A Review of Chromatographic Methods. Critical Reviews in Analytical Chemistry** 40, 3, 194-201, 2010.

KRÜGER, O. et al. Comparison of stir bar sorptive extraction (SBSE) and liquid–liquid extraction (LLE) for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in complex aqueous matrices. **Talanta**, 85, 1428-1434, 2011.

KUMAR, A.; XAGORARAKI, I. Pharmaceuticals, personal care products and endocrine-disrupting chemicals in U.S. surface and finished drinking waters: A proposed ranking system. **Science of the Total Environment**, 408, 5972-5989, 2010.

KÜMMERER K,; AL-AHMAD, A,; BERTRAM B,; WIEßLER, M. Biodegradability of antineoplastic compounds in screening tests: influence of glucosidation and of stereochemistry. **Chemosphere** 40 (7), 767-73, 2001.

LAMBROPOULOU, D.A.; ALBANIS, T.A. Liquid-phase micro-extraction techniques in pesticide residue analysis. **J. Biochem. Biophys.Methods**, 70, 195–228, 2007.

LAMSAL, R.; WALSH, M. E.; GAGNON, G. A. Comparison of advanced oxidation processes for the removal of natural organic matter. **Water Research**, 45, 3263-3269, 2011.

LEUNG, H.W. et al. Distribution, fate and risk assessment of antibiotics in sewage treatment plants in Hong Kong, South China. **Environment International**, 1–9, 2011.

LI, S. Simultaneous determination of 15 steroidal oral contraceptives in water using solid-phase disk extraction followed by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1216, 5416–5423, 2009.

LIN, A.Y.; YU,T.; Lateef, S.K. Removal of pharmaceuticals in secondary wastewater treatment processes in Taiwan. **Journal of Hazardous Materials**, 167, 1163-1169, 2009.

LIU, W.; WANG, H.; GUAN, Y. Preparation of stir bars for sorptive extraction using sol–gel technology. **Journal of Chromatography A**, 1045, 15-22, 2004.

LIU, Z. et al. Occurrence, fate and removal of synthetic oral contraceptives (SOCs) in the natural environment: A review. **Science of the Total Environment**, 409, 5149-5161, 2011.

LÓPEZ-SERNA, R. et al. Fully automated determination of 74 pharmaceuticals in environmental and waste waters by online solid phase extraction–liquid chromatography-electrospray–tandem mass spectrometry. **Talanta**, 83, 410–424, 2010.

MALATO, S. et al. Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends. **Catalysis Today**, 147, 1-59, 2009.

MARCH, R.E., TODD, J.F.J. *Quadrupole ion trap mass spectrometry*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2005. V165 - 2nd ed.

MARONA, H.R.N. et al. Flutamida: Revisão de suas propriedades farmacológicas e físico-químicas. Métodos de análise em formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 50(1), 37-44, 2004.

MARTENDAL, E.; CARASEK, E.A new optimization strategy for gaseous phase sampling by an internally cooled solid-phase microextraction technique. **Journal of Chromatography A**, 1218, 367–372, 2011.

MARTINS, A.F. et al. A Study of Photocatalytic Processes Involving the Degradation of the Organic Load and Amoxicillin in Hospital Wastewater. **Clean-Soil Air Water**, 37(4–5), 365 – 371, 2009.

MARTINS, A.F. et al. Concentration of Ciprofloxacin in Brazilian hospital effluent and preliminary environmental risk assessment: A Case Study. **Clean-Soil Air Water**, 36, 264-269, 2008.

MARTINS, A.F. et al. Occurrence of the Antimicrobials Sulfamethoxazole and Trimethoprim in Hospital Effluent and Study of Their Degradation Products after Electrocoagulation. **Clean-Soil Air Water**, 39, 21-27, 2011.

MASCOLO, G. et al. Effective organics degradation from pharmaceutical wastewater by an integrated process including membrane bioreactor and ozonation. **Chemosphere**, 78, 1100–1109, 2010.

MATEJÍCEK, D.; KUBAN, V. High performance liquid chromatography/ion-trap mass spectrometry for separation and simultaneous determination of ethynylestradiol, gestodene, levonorgestrel, cyproterone acetate and desogestrel. **Analytica Chimica Acta**, 588 304–315, 2007.

MAZUQUELI, A.C. **Estudo de bioequivalência entre duas formulações contendo 2mg de acetato de Ciproterona e 0,035mg de etinilestradiol em voluntárias sadias através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, SP, 2008.

LLMEO, P.A. et al. Sample preparation methods for subsequent determination of metals andon-metals in crude oil—A review. **AnalyticaChimicaActa**, 746, 15–36, 2012.

LLMEO, S.S.A. et al. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Quimica Nova**, Vol. 32, No. 1, 188-197, 2009.

MELO, L. P. et al. Polydimethylsiloxane/polypyrrole stir bar sorptive extraction and liquid chromatografy (SBSE/LC-UV) analysis of antidepressants in plasma samples. **Analytica Chimica Acta**, 633, 57-64, 2009.

MENEZES, M., & STORTI, M.P.B. Determination of Flutamide in Tablets by High-Performance Liquid Chromatography. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, 24 (2), 246-9, 2005.

MIÈGE, C. et al. Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants – Conception of a database and first results. **Environmental Pollution**, 157, 1721-1726, 2009.

MOLINARI, R. et al. Heterogeneous photocatalytic degradation of pharmaceuticals in water by using polycrystalline TiO_2 and a nano filtration membrane reactor. **Catal.Today**, 118, 205-213, 2006.

MOLINARI, R., et al. Degradation of the drugs Gemfibrozil and Tamoxifen in pressurized and de-pressurized membrane photo reactors using suspended polycrystalline TiO_2 as catalyst. **Journal of Membrane Science**, 319, 54–63, 2008.

MOMPELAT, S.; Le Bot, B.; Thomas, O. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. **Environment International**, 35, 803-814, 2009.

MOZIA, S.; MORAWSKI, A.W. The performance of a hybrid photocatalysis–MD system for the treatment of tap water contaminated with ibuprofen. **Catalysis Today**, 193, 213-220, 2012.

NIC, M.; JIRAT, J.; KOSATA, B. "precursor ion". *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. 2006 (Online ed.)-a.

NIC, M.; JIRAT, J.; KOSATA, B. "product ion". *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. 2006 (Online ed.)-b.

NUSSBAUMER, S. et al. Analysis of anticancer drugs: A review. **Talanta** 85, 2265-2289, 2011.

OCHIAI, N. et al. Sequential stir bar sorptive extraction for unifor enrichment of trace amounts of organic pollutants in water samples. **Journal of Chromatography A**, 1200, 72-79, 2008.

OHTANI, B. Photocatalysis A to Z—What we know and what we do not know in a scientific sense. **Journal of Photochemistry and Photobiology C**, 11, 157-178, 2011.

OLIVEIRA, A.R.M. et al. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 637-644, 2008.

PÉREZ-CARRERA, E. et al. Simultaneous determination of pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in seawater and interstitial marine water samples, using stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1170, 82-90, 2007.

POCOSTALES, P.; ÁLVAREZ, P.; BELTRÁN, F.J. Catalytic ozonation promoted by alumina-based catalysts for the removal of some pharmaceutical compounds from water. **Chemical Engineering Journal**, 168, 1289–1295, 2011.

PRIETO, A. et al. Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimization, novel applications, limitations and potential solutions. **Journal of Chromatography A**, 1217, 2642-2666, 2010.

PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. et al. Developments in liquid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, Vol. 22, No. 10, 2003.

RADJENOVIĆ. J., PETROVIĆ. M., BARCELÓ. D. Complementary mass spectrometry and bioassays for evaluating pharmaceutical-transformation products in treatment of drinking water and wastewater. **Trends in Analytical Chemistry**, Vol. 28, No. 5, 562-580, 2009.

RASMUSSEN, K.E.; BJERGAARD, S.P. Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, Vol. 23, No. 1, 2004.

RAZAVI, B. et al. Treatment of statin compounds by advanced oxidation processes: Kinetic considerations and destruction mechanisms. **Radiation Physics and Chemistry**, 80, 453-461, 2011.

REUNGOAT, et al. Ozonation and biological activated carbon filtration of wastewater treatment plant effluents. **Water Research**, 46, 863-872, 2012.

RIBANI, M., et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim.Nova**, Vol. 27, No. 5, 771-780, 2004.

RICHARDSON, S.D. & TERNES A.T. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. **Analytical Chemistry**, 83, 4614–4648, 2011.

RIZZO, L. et al. Heterogenous photocatalytic degradation kinetics and detoxification of an urban wastewater treatment plant effluent contaminated with pharmaceuticals. **Water research**, 43, 4070–4078, 2009.

ROBERTS, P.H.; THOMAS, K.V. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. **Science of the Total Environment**, 356, 143– 153, 2006.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos*. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

ROKHINA, E. V. et al. Ozonation of a mixture of estrogens and progestins in aqueous solution: Interpretation of experimental results by computational methods. **Chemosphere**, 89, 1323–1329, 2012.

ROSAL, R. et al. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. **Water research**, 44, 578–588, 2010.

ROY, G; VUILLEMIN., R.; GUYOMARCH, J. On-site determination of poly nuclear aromatic hydrocarbons in sea water by stir bar sorptive extraction (SBSE) and thermal desorption GC–MS. **Talanta**, 66, 540-546, 2005.

SANDALL, J.M. et al. Development and validation of an HPLC method for the determination of spironolactone and its metabolites in pediatric plasma samples. **Journal of Chromatography B**, 839, 36-44, 2006.

SANTOS, L.H.L.M. et al. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment**. Journal of Hazardous Materials**, 175, 45–95, 2010.

SCHAAR, H. et al. Micropollutant removal during biological wastewater treatment and a subsequent ozonation step. **Environmental Pollution**, 158, 1399–1404, 2010.

SCOTT E., VAN B. **An Introduction to Mass Spectrometry**. England: University - Department of Chemistry, 1998.

SEBIRE, M. et al. The model anti-androgen flutamide suppresses the expression of typical male stickleback reproductive behavior. **Aquatic Toxicology**, 90, 37–47, 2008.

SHAABAN, H.; GÓRECKI, T. Green ultra-fast high-performance liquid chromatographic method using a short narrow-bore column packed with fully porous sub-2µm particles for the simultaneous determination of selected pharmaceuticals as surface water and wastewater pollutants. **Journal of Separation Science**, 36, 252–261, 2013.

SILVA, C. G.; FARIA, J. L. Photocatalytic oxidation of benzene derivatives in aqueous suspensions: Synergic effect induced by the introduction of carbon nanotubes in a TiO_2 matrix. **Applied Catalysis B: Environmental**, 101, 81-89, 2010.

SILVA, C. P.; OTERO, M.; ESTEVES, V. Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: A review. **Environmental Pollution**, 165, 38-58, 2012.

SIM, W. et al. Assessment of fates of estrogens in wastewater and sludge from various types of wastewater treatment plants. **Chemosphere**, 82, 1448-1453, 2011.

SITRUK-WARE, R. New progestagens for contraceptive use. **Human Reproduction Update**, Vol.12, No.2 pp. 169–178, 2006.

SKOOG, H.; NIEMAN. *Princípios de Análise Instrumental*. 5ª ed., Bookman, Porto Alegre, 2002.

SORA, D.I. et al. Analytical issues in HPLC/MS/MS simultaneous assay of furosemide, spironolactone and canrenone in human plasma samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 52, 734-740, 2010.

STÖCKL, D., D'HONDT, H., THIENPONT, L.M. Method validation across the disciplines—Critical investigation of major validation criteria and associated experimental protocols. **Journal of Chromatography B**, 877, 2180–2190, 2009.

STRECK, G. Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environment. **Trends in Analytical Chemistry**, Vol. 28, No. 6, 635-652, 2009.

SU, S. et al. Degradation of amoxicillin in aqueous solution using sulphate radicals under ultrasound irradiation. **Ultrasonics Sono chemistry**, 19, 469–474, 2012.

SUAREZ, S.; LEMA, J.M.; OMIL, F. Pre-treatment of hospital wastewater by coagulation-flocculation and flotation. **Bioresource Technology**, 100, 2138–2146, 2009.

SUI, M. et al. Heterogeneous catalytic ozonation of ciprofloxacin in water with carbon nanotube supported manganese oxides as catalyst. **Journal of Hazardous Materials**, 227– 228, 227– 236, 2012.

SUMPTER, J.P. Endocrine Disrupters in the Aquatic Environment: An Overview. **Acta hydrochimica et hydrobiologica**, 33, 9–16, 2005.

SUN, L., et al. Simultaneous determination of 15 steroidal oral contraceptives in water using solid-phase disk extraction followed by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1216, 5416–5423, 2009.

TEUNISSEN, S.F. et al. Bioanalytical methods for determination of tamoxifen and its phase I metabolites: A review. **Analytica Chimica Acta**, 683, 21–37, 2010.

TEUNISSEN, S.F. et al. Development and validation of a quantitative assay for the analysis of tamoxifen with its four main metabolites and the flavonoids daidzein, genistein and glycitein in human serum using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, 877, 2519–2529, 2009.

TEVELL, A. et al. Flutamide metabolism in four different species in vitro and identification of flutamide metabolites in human patient urine by high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**, DMD 34, 984-992, 2006.

TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P.; LEAL, E. S. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Quim. Nova**, v. 27, n. 3, 441-446, 2004.

THIBERT, V. et al. Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymers for the selective extraction of cocaine and its metabolite benzoylecgonine from hair extract before LC–MS analysis. **Talanta**, 88, 412–419, 2012.

TOURAUD, E. et al. Drug residues and endocrine disruptors in drinking water: Risk for humans? **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, 214, 437- 441, 2011.

TSOUKLERIS, D. S. et al. Photocatalytic degradation of volatile organics on TiO_2 embedded glass spherules. **Catalysis Today**, 129, 96-101, 2007.

UDAGAWA, C. Photochemistry of flutamide in various media: Investigation of the reaction mechanism as revealed by external magnetic field effects on product yields. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, 226, 57– 63, 2011.

UNCETA, N. et al. Development of a stir bar extraction based HPLC-FLD method for the quantification of serotonin reuptake inhibitors in plasma, urine and brain tissue samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 51, 178-185, 2010.

VALCÁRCEL, Y.; GONZÁLES, A. S.; RODRÍGUEZ-GIL, J.L., Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the Madrid Region (Spain) and potential ecotoxicological risk. **Chemosphere**, 84, 1336–1348, 2010.

VASCONCELOS, T.G. 2006. **Antimicrobial ciprofloxacina em efluente hospitalar: exposição ambiental, avaliação de risco e degradação através de processos avançados de oxidação**. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, RS.

VASCONCELOS, T. G. et al. Ciprofloxacin in hospital effluent: Degradation by ozone and photoprocesses. **Journal of Hazardous Materials**, 169, 1154-1158, 2009-a.

VASCONCELOS, T. G. et al. Photo-degradation of the antimicrobial ciprofloxacin at high pH: Identification and biodegradability assessment of the primary by-products. **Chemosphere** 76, 487-493, 2009-b.

VULLIET.E., CREN-OLIVÉ. C. Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and ground waters intended to human consumption. **Environmental Pollution**, 159, 2929-2934, 2011.

WANG, H. et al. Analysis of TiO_2 photocatalysis in pulsed discharge system for phenol degradation. **Journal of Electrostatics**, 67, 886-889, 2009.

WANG. C. et al. Investigation of pharmaceuticals in Missouri natural and drinking water using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Water research**, 45, 1818-1828, 2011-a.

WANG, H.; CHEN, X. Kinetic analysis and energy efficiency of phenol degradation in a plasma-photocatalysis system. **Journal of Hazardous Materials**, 186, 1888-1892, 2011-b.

WANG, H-X.; ZHOU, Y.; JIANG, Q-W. Simultaneous screening of estrogens, progestogens, and phenols and their metabolites in potable water and river water by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of- flight mass spectrometry. **Microchemical Journal**, 100, 83-94, 2012.

WEN, B. et al. Comparison of in Vitro Bioactivation of Flutamide and Its Cyano Analogue: Evidence for Reductive Activation by Human NADPH: Cytochrome P450 Reductase. **Chemical Research in Toxicology**, 21(12), 2393-2406, 2008.

WILDE, M.L. 2011**. Beta-bloqueadores em efluente hospitalar: ocorrência, degradação por processos avançados de oxidação e identificação de subprodutos**. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, RS.

WILDE, M.L. et al. Multivariate Optimization of Analytical Methodology and a First Attempt to an Environmental Risk Assessment of β-Blockers in Hospital Wastewater. **J. Braz. Chem. Soc**. Vol. 00, No. 00, 1-9, 2012.

WILKOWSKA, A., BIZIUK, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. **Food Chemistry**, 125, 803–812, 2011.

WOLS, B.A. & HOFMAN-CARIS, C. H. M. Review of photochemical reaction constants of organic micropollutants required for UV advanced oxidation processes in water. **Water Research**, 46, 2815-2827, 2012.

WU, J. et al. Review on the Analysis of Emerging Contaminants in Aquatic Environment. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, 40: 4, 234-245, 2010.

YANG, H. et al. Photocatalytic degradation kinetics and mechanism of environmental pharmaceuticals in aqueous suspension of TiO2: A case of sulfa drugs. **Catalysis Today**, 153, 200–207, 2010.

YANG, L.; YU, L.E.; RAY, M.B. Degradation of paracetamol in aqueous solutions by TiO_2 Photocatalysis. **Water Research**, 42, 3480 – 3488, 2008.

YIANTZI, E. et al. Vortex-assisted liquid–liquid microextraction of octylphenol, nonylphenol and bisphenol-A. **Talanta**, 80, 2057–2062, 2010.

YURDAKAL, S. et al. Photodegradation of pharmaceutical drugs in aqueous TiO_2 suspensions: Mechanism and kinetics. **Catalysis Today**, 129, 9–15, 2007.

ZHANG, W. et al. Effect of water composition on TiO_2photocatalytic removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) and estrogenic activity from secondary effluent. **Journal of Hazardous Materials**, 252 - 258, 2012.

ZHOU, J.L. et al. Pharmaceutical residues in wastewater treatment works effluents and their impact on receiving river water. **Journal of Hazardous Materials**, 166, 655–661, 2009.

ANEXOS

9. 1 ANEXO A – CAPÍTULO 4

Tabela 1 – Matriz experimental do planejamento fatorial fracionado (3^{4-1}) da LLME, variáveis independentes e resultados da recuperação de EFC em solução aquosa.

Variáveis / **Níveis**	**X_1** Vol. Solvente (µL)	**X_2** Tempo (seg)	**X_3** NaCl (M)	**X_4** pH			
(-1)	25	15	0,1	5			
(0)	50	30	0,5	7			
(1)	100	60	1	9			
Exp.	X_1	X_2	X_3	X_4	E (%)	F (%)	C(%)
1	-1	-1	-1	-1	67,61	79,75	59,68
2	-1	-1	0	1	49,33	67,07	39,76
3	-1	-1	1	0	64,79	62,16	52,10
4	-1	0	-1	1	77,62	95,16	71,84
5	-1	0	0	0	59,33	59,20	46,38
6	-1	0	1	-1	65,69	87,64	42,42
7	-1	1	-1	0	57,67	58,07	52,20
8	-1	1	0	-1	88,50	85,91	72,20
9	-1	1	1	1	40,24	32,34	30,26
10	0	-1	-1	1	38,01	32,99	26,11
11	0	-1	0	0	78,00	81,70	65,54
12	0	-1	1	-1	73,64	94,22	74,79
13	0	0	-1	0	59,22	55,74	40,92
14	0	0	0	-1	87,63	82,52	67,83
15	0	0	1	1	92,45	102,22	78,48
16	0	1	-1	-1	102,56	98,91	78,76
17	0	1	0	1	56,80	64,45	36,57
18	0	1	1	0	42,87	94,39	22,37
19	1	-1	-1	0	44,83	34,47	23,54
20	1	-1	0	-1	46,11	90,79	66,82
21	1	-1	1	1	55,51	100,00	73,86
22	1	0	-1	-1	100,00	100,00	99,87
23	1	0	0	1	36,24	66,82	58,14
24	1	0	1	0	85,32	67,10	87,11
25	1	1	-1	1	50,44	100,00	68,18
26	1	1	0	0	80,48	99,87	96,04
27	1	1	1	-1	86,34	100,00	80,10

Tabela 2 – Matriz experimental do planejamento fatorial fracionado (3^{4-1}) da LLME, variáveis independentes e resultados da recuperação de EFC em efluente hospitalar.

Variáveis / **Níveis**	**X_1** Vol. Solvente (µL)	**X_2** Tempo (seg)	**X_3** NaCl (M)	**X_4** pH			
(-1)	25	15	0,1	5			
(0)	50	30	0,5	7			
(1)	100	60	1	9			
Exp.	X_1	X_2	X_3	X_4	E (%)	F (%)	C(%)
1	-1	-1	-1	-1	16,25	19,93	17,06
2	-1	-1	0	1	29,23	32,38	1,55
3	-1	-1	1	0	31,68	45,84	53,88
4	-1	0	-1	1	40,51	43,03	13,62
5	-1	0	0	0	22,48	20,84	19,36
6	-1	0	1	-1	35,12	40,66	23,01
7	-1	1	-1	0	79,54	86,76	45,46
8	-1	1	0	-1	49,37	52,79	139,47
9	-1	1	1	1	69,66	74,64	19,18
10	0	-1	-1	1	51,55	56,04	31,63
11	0	-1	0	0	23,06	25,95	21,83
12	0	-1	1	-1	25,97	29,11	34,36
13	0	0	-1	0	69,37	74,53	62,49
14	0	0	0	-1	108,01	111,36	12,62
15	0	0	1	1	13,75	16,05	44,28
16	0	1	-1	-1	88,31	94,72	2,40
17	0	1	0	1	96,45	120,12	25,8
18	0	1	1	0	98,80	114,06	5,90
19	1	-1	-1	0	118,81	125,50	85,20
20	1	-1	0	-1	92,42	100,42	0,00
21	1	-1	1	1	99,46	113,89	12,58
22	1	0	-1	-1	36,86	39,52	10,57
23	1	0	0	1	70,85	76,87	10,71
24	1	0	1	0	24,93	34,81	15,39
25	1	1	-1	1	26,04	33,08	72,84
26	1	1	0	0	139,66	163,46	26,06
27	1	1	1	-1	119,77	123,20	19,44

9.2 ANEXO B – CAPÍTULO 4

Tabela 1 – Matriz experimental do planejamento fatorial fracionado (2^{6-2}) da SBSE, variáveis independentes e resultados da recuperação de EFCT em solução aquosa.

Variáveis / Níveis	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6				
	[NaCl]	pH	Temperatura de adsorção (°C)		Tempo de adsorção (min)		Temperatura dessorção (°C)		Tempo de dessorção (min)	
(-1)	0	5	25		15		25		15	
(0)	0,5	7	35		30		35		30	
(1)	1	9	50		60		50		60	
Exp.	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	E	F	C	T
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	30,92	93,78	102,11	68,60
2	1	-1	-1	-1	1	-1	42,27	105,58	115,44	100,96
3	-1	1	-1	-1	1	1	43,29	88,51	98,82	65,04
4	1	1	-1	-1	-1	1	38,16	109,72	85,05	116,62
5	-1	-1	1	-1	1	1	46,30	114,55	51,17	30,04
6	1	-1	1	-1	-1	1	56,26	151,16	101,84	81,71
7	-1	1	1	-1	-1	-1	31,13	106,73	113,00	116,47
8	1	1	1	-1	1	-1	42,76	116,94	97,95	85,99
9	-1	-1	-1	1	-1	1	56,57	145,35	98,32	99,02
10	1	-1	-1	1	1	1	81,39	106,34	103,50	84,18
11	-1	1	-1	1	1	-1	34,65	120,22	94,57	95,73
12	1	1	-1	1	-1	-1	44,05	100,28	103,57	116,31
13	-1	-1	1	1	1	-1	43,03	127,07	90,97	107,12
14	1	-1	1	1	-1	-1	54,38	99,23	97,75	54,01
15	-1	1	1	1	-1	1	38,39	112,16	103,26	108,05
16	1	1	1	1	1	1	44,60	149,35	96,42	105,20
17 (PC)	0	0	0	0	0	0	34,92	73,78	100,11	78,60
18 (PC)	0	0	0	0	0	0	48,27	85,58	120,44	99,96
19 (PC)	0	0	0	0	0	0	53,29	68,51	78,82	55,04

9.3 ANEXO C – CAPÍTULO 4

Tabela 1 – Matriz experimental do planejamento fatorial fracionado (2^{6-2}) da SBSE, variáveis independentes e resultados da recuperação de EFCT em efluente hospitalar.

Variáveis / **Níveis**	**X_1**	**X_2**	**X_3**	**X_4**	**X_5**	**X_6**				
	[NaCl]	pH	Temperatura de adsorção (°C)		Tempo de adsorção (min)		Temperatura dessorção (°C)		Tempo de dessorção (min)	
(-1)	0	5	25		15		25		15	
(0)	0,5	7	35		30		35		30	
(1)	1	9	50		60		50		60	
Exp.	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	E	F	C	T
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	51,51	93,99	80,06	59,62
2	1	-1	-1	-1	1	-1	64,17	92,70	92,48	72,42
3	-1	1	-1	-1	1	1	58,88	110,90	66,36	53,87
4	1	1	-1	-1	-1	1	62,68	116,06	85,69	74,20
5	-1	-1	1	-1	1	1	72,21	151,38	103,81	56,02
6	1	-1	1	-1	-1	1	67,89	123,08	96,68	69,57
7	-1	1	1	-1	-1	-1	49,37	99,60	86,65	72,40
8	1	1	1	-1	1	-1	61,31	101,11	90,84	61,64
9	-1	-1	-1	1	-1	1	55,43	93,56	67,58	42,37
10	1	-1	-1	1	1	1	69,17	100,87	81,45	54,20
11	-1	1	-1	1	1	-1	50,18	100,08	66,54	38,96
12	1	1	-1	1	-1	-1	65,90	121,31	87,45	80,02
13	-1	-1	1	1	1	-1	63,44	105,79	91,65	69,62
14	1	-1	1	1	-1	-1	63,76	113,53	92,83	91,18
15	-1	1	1	1	-1	1	78,56	101,09	93,23	87,88
16	1	1	1	1	1	1	80,12	143,14	103,19	74,48
17 (PC)	0	0	0	0	0	0	41,51	83,99	70,06	49,62
18 (PC)	0	0	0	0	0	0	54,17	92,80	72,48	52,42
19 (PC)	0	0	0	0	0	0	48,88	90,90	46,36	33,87

APÊNDICES

10.1 APÊNDICE A – Teste de controle de qualidade da matéria prima dos padrões de EFCT.

Tabela 1 – Testes de Controle de Qualidade EP/USP (matéria prima EFCT).

COMPOSTO	TESTES	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADO
Espironolactona	Descrição	Pó branco amarelado ou branco (EP)	De acordo
	Solubilidade	- Praticamente insolúvel em água (EP/USP); - Solúvel em álcool (EP/USP) amostra triturada e álcool 96%; - Facilmente solúvel em benzeno e clorofórmio (USP); - Solúvel em acetato de etila (USP); - Pouco Solúvel em metanol (USP)	De acordo
	Identificação	- Por espectrofotometria infravermelho (EP/USP); - Por espectro UV-Visível (USP); - Reação característica: Formação de precipitado marrom a preto (USP); - Reação característica: Produção de solução amarela-esverdeada com opalescência ou precipitado (EP)	De acordo
	Perda por pesagem	- Máximo 0,5% em 1g a 105 °C por 2 a 3 horas (EP/USP)	0,18%
	Doseamento	- Por UV-Visível 97,0 a 102,0% em substância seca (EP)	101,07%
	Ponto de fusão	- Entre 198 °C a 209 °C com decomposição (USP)	206,6 °C
	Rotação específica	- 33,0° a 37,0° em substância seca (EP/USP);	-34,67°
	Cinza sulfatada	- Máximo 0,1% determinado em 1g (EP)	0,08%
	Densidade	Aparente	0,2356 g/mL
	Mercapto livre	- Solução desenvolve cor azul com iodo 0,01 N - Máximo 0,1 mL de iodo 0,01 N é consumido (USP)	0,05 m\L
	Substâncias relatadas	- (283 nm) alguma impureza: Não mais que 1,0%	0,02%
		- (254 nm) impurezas totais: Não mais que 1,0%	0,55%
		- Soma de todas as impurezas: Não mais que 1,0%	0,57%
	Substâncias relatadas	- Impurezas totais: Não mais que 2,0%	De acordo
	Cromo	- Não mais que 50 ppm	De acordo
	Solventes residuais	- Metanol < 3000 ppm	28 ppm
		- Acetato de etila < 5000	27 ppm
	Impurezas orgânicas voláteis	- Cumpre com requerimento (USP)	De acordo
	Tamanho de partícula	- 99% não mais que 30 microns	De acordo
Flutamida	Descrição	Pó cristalino amarelo pálido (USP)	De acordo
	Identificação	- IV – O espectro da amostra está de acordo com o padrão (USP)	De acordo
	Solubilidade	- Facilmente solúvel em acetona, acetato de etila e em metanol; Solúvel em clorofórmio e em éter; Praticamente insolúvel em água, óleo mineral e éter de petróleo (USP)	De acordo
	Ponto de fusão	110 °C – 114 °C (USP)	110,87 °C
	Perda por dessecação	≤ 0,5% (3 horas a 60 °C a vácuo) (USP)	0,26%

	Resíduo por ignição	≤ 0,1 % (USP)	0,05%
	Densidade aparente	Informativo (Sem compactação) (Met. Geral FB IV)	0,28 g/mL
	Compostos relacionados	- Metilacetanilida: ≤ 0,2% (USP)	Não detectado
		- Metilanilina: ≤ 0,15% (USP)	0,14%
		- Trifluormetilanilina: ≤ 0,2% (USP)	Não detectado
		- Metilpropionanilida: ≤ 0,3% (USP)	0,07%
		- Butiranilida: ≤ 0,2% (USP)	Não detectado
		- Flutamida: ≤ 0,2% (USP)	Não detectado
		- Impureza individual: ≤ 0,1% (USP)	0,01%
		- Impureza total: ≤ 0,4% (USP)	0,22%
	Metais pesados	≤ 10 ppm (USP)	< 10 ppm
	Teor (sob base anidra)	98,0 – 101,0% (USP)	99,36%
Ciproterona acetato	Descrição	Pó cristalino branco ou quase branco (EP)	De acordo
	Solubilidade	- Praticamente insolúvel em água; (EP) - Muito solúvel em cloreto de metileno; (EP) - Facilmente solúvel em acetona; (EP) - Solúvel em metanol; (EP) - Ligeiramente solúvel em etanol. (EP)	De acordo
	Ponto de fusão	Em torno de 210 °C (EP)	208,6 °C
	Identificação	- IV – O espectro da amostra está de acordo com o padrão (EP)	De acordo
	Perda por dessecação	≤ 0,5% (2 horas a 80 °C a vácuo com pressão não excedendo 0,7 kpa) (EP)	0,25%
	Cinzas	≤ 0,1% (EP)	0,09%
	Teor (base anidra)	97,0 – 103,0% (EP)	100,33%
	Substâncias relacionadas (HPLC)	Impurezas Totais: ≤ 0,5% (EP)	0,44%
	Rotação específica	152° - 157° (EP)	156°
	Solventes residuais	- Acetona: ≤ 2000 ppm (EP)	88 ppm
		- Éter isopropílico: ≤ 500 ppm (EP)	Não detectado
		- Acetato de etila: ≤ 500 ppm (EP)	Não detectado
		- Diclorometano: ≤ 300 ppm (EP)	Não detectado
		- Metanol: ≤ 2000 ppm (EP)	49 ppm
	Densidade aparente	Informativo (sem compactação) (Met. Geral FB IV)	0,16 g/mL
Tamoxifeno citrato	Descrição	Pó fino cristalino branco (USP)	De acordo
	Solubilidade	- Muito pouco solúvel em água, acetona, clorofórmio e, em álcool; (USP) - Solúvel em metanol (amostra triturada) (USP)	De acordo
	Identificação	- Por espectrofotometria no infravermelho - Por espectrofotometria no UV-Visível (USP)	De acordo
	Perda por secagem	À 105 °C por 4 horas (Max 0,5%) (USP)	0,14%
	Doseamento	Por potenciometria: 99,0 – 101,0% (substância seca) (USP)	99,16%
	Densidade	Aparente (USP)	0,3150 g/mL
	Ponto de fusão	Cerca de 142 °C (com decomposição) (USP)	141,0 °C
	Resíduo por ignição	Não mais que 0,2% (USP)	0,1%
	Metais pesados	Não mais que 0,001% (USP)	< 0,001%
	Ferro	Não mais que 0,005% (USP)	0,0017%

	Substâncias relatadas	Individual: não mais que 0,5% (USP)	0,17%
	Impurezas orgânicas voláteis	Cumpre com o requerimento (USP)	De acordo

10.2 APÊNDICE B – Antiandrogênios e seus metabólitos em águas: determinação e identificação através de LC-ESI-MS/MS.

O estudo descrito no resumo do presente artigo foi desenvolvido durante intercâmbio acadêmico na Universidade de Ciências e Engenharia – CUCEI na cidade de Guadalajara, Jalisco, México. O intercâmbio teve duração de três meses (Dez/2011 a Mar/2012) e objetivou o treinamento de alunos de iniciação científica do Laboratório de Farmacocinética coordenado pelo Prof. Dr. Alejandro A. P. Lucano.

ANTIANDROGÊNIOS E SEUS METABÓLITOS EM ÁGUAS: DETERMINAÇÃOE IDENTIFICAÇÃO ATRAVÉS DE LC-ESI-MS/MS

Carla G. B. Brenner[1,2], Daiane S. da Silva[1], Francieli M. Mayer[1], Alejandro A. P. Lucano[2], Ayrton F. Martins[1*].

[1]LATER – Laboratory of Research and Treatment of Effluents and Residues, Chemistry Department of the Federal University of Santa Maria – UFSM, Santa Maria, RS – Brazil.

[2]Laboratory of Pharmacokinetics - University of Sciences and Engineering – CUCEI, University of Guadalajara, Guadalajara, Jalisco – Mexico.

RESUMO

É cada vez maior a preocupação com relação à contaminação da água através de compostos farmacêuticos, mesmo que estes compostos estejam em baixas concentrações na faixa de ng L^{-1} a μg L^{-1}, sua entrada no meio ambiente é contínua, o que faz destes compostos recalcitrantes. Sabendo-se que estes compostos são de difícil biodegradabilidade no meio ambiente e que os tratamentos aplicados aos esgotos e águas para uso doméstico e para beber não são eficazes para degradar as estruturas destes compostos, desenvolveu-se uma metodologia analítica através de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas tandem com ionização electrospray LC-ESI-MS/MS, para determinar os medicamentos antiandrogênios Espironolactona, Flutamida, acetato de Ciproterona e citrato de Tamoxifeno, bem como, seus metabólitos em águas, potável (uso doméstico), superficial e águas comercializadas na cidade de Guadalajara, México. Para detecção/determinação dos compostos estudados neste trabalho em águas superficiais, subterrâneas e águas engarrafadas, na cidade de Guadalajara, México, a metodologia analítica utilizada foi LC-ESI-MS/MS, validada sem a necessidade de manipulação da amostra (etapas de pré-concentração) as

recuperações nestas matrizes ficaram entre (120- 67,0% com RSD variando de 1,5-20,0%). As concentrações quantificadas para os compostos EFCT em amostras de água ficaram na faixa de LD-52,0 μg L^{-1}, (RSD 0,2-11,6%). A injeção direta da amostra no aparelho espectrômetro de massas (MS/MS), ou seja, sem passar pelo sistema cromatográfico foi utilizada para identificação e estudo dos metabólitos nestas amostras de água utilizando os experimentos MS2 SCAN (varredura das massas), MS2 SIM (monitoramento do íon selecionado) e íon produto (PI). Caminhos de fragmentação foram propostos para os metabólitos (7-α-tiometil-Espironolactona, 15-β-hidroxi-Ciproterona acetato, N-desmetil-Tamoxifeno, 4-OH-tamoxifeno, N,N-didesmetil-tamoxifeno, endoxifeno, 2-hidroxiflutamida, Flu-1, Flu-2, Flu-3, Flu-5, Flu-6, M1 Dihidroxiflutamida e M3 Trihidroxiflutamida) identificados nas amostras de águas.

Palavras-chave: antiandrogênios, metabólitos, águas, LC-ESI-MS/MS