

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

Joseline Altissimo

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE
ESTATINAS EM EFLUENTE HOSPITALAR E ESTUDO DE
DEGRADAÇÃO OXIDATIVA AVANÇADA**

Santa Maria, RS
2015

Joseline Altissimo

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE ESTATINAS EM
EFLUENTE HOSPITALAR E ESTUDO DE DEGRADAÇÃO OXIDATIVA
AVANÇADA**

Dissertação 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 **Mestre em Química.**

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

Santa Maria, RS
2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Altissimo, Joseline
Desenvolvimento de Método de Quantificação de
Estatinas em Efluente Hospitalar e Estudo de Degradação
Oxidativa Avançada / Joseline Altissimo.-2015.
110 p.; 30cm

Orientador: Ayrton Figueiredo Martins
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2015

1. Quantificação de estatinas em efluente hospitalar
2. Métodos de extração e microextração de estatinas em
efluente hospitalar 3. Degradação oxidativa de estatinas
4. Avaliação de risco ambiental I. Figueiredo Martins,
Ayrton II. Título.

Joseline Altissimo

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE ESTATINAS EM
EFLUENTE HOSPITALAR E ESTUDO DE DEGRADAÇÃO OXIDATIVA
AVANÇADA**

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

Aprovado em 18 de dezembro de 2015:

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

Elvis Carissimi, Dr. (UFSM)

Ênio Leandro Machado, Dr. (UNISC)

Santa Maria, RS
2015

**Dedico esta Dissertação aos meus queridos pais
Estela e Jair (*in memoriam*).**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Emérito Tit. Dr. Ayrton Figueiredo Martins pela oportunidade e orientação ao longo deste trabalho.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, financiador desta dissertação.

Aos professores Elvis Carissimi e Ênio Leandro Machado pela participação na banca examinadora e sugestões.

Ao professor Elvis Carissimi e Carlos Alberto Araújo de Almeida pelas consideráveis sugestões prestadas no exame de qualificação.

Aos demais professores que direta ou diretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do PPGQ.

Aos colegas e ex-colegas do LATER pelo convívio, paciência e apoio no desenvolvimento desta dissertação.

Às ICs Júlia Antunes, Loisleini Saldanha e Raiara Araújo pela imensa ajuda, principalmente na fase de conclusão deste trabalho.

À Dr^a. Carla da Silveira Frank pelas sugestões no exame de qualificação e, acima disso, por se tornar minha amiga, companheira, incentivadora e colaborar tanto com o meu trabalho.

À Daiane Skupin da Silva pela amizade de longa data, apoio, colaboração e conselhos durante a realização deste trabalho.

À Layz Lorencini Deangeli pelo carinho, companheirismo, incentivo e por estar em minha vida todos os dias, mesmo que distante fisicamente.

À minha mãe, Estela Altissimo e meu irmão, Jaderson Altissimo pelo estímulo e apoio incondicional e por serem meu refúgio e referência, e a meu pai, Jair Antônio Altissimo, que partiu cedo, mas que deixou em meu coração um amor maior do mundo e me ensinou a lutar pelos meus sonhos.

E a Deus por me dar coragem e persistência para seguir adiante e, muitas vezes, ser a única companhia em dias nebulosos.

“Quem deserta da luta, por achar que a luta está muito grande, não tenha dúvida: vai encontrar uma luta muito maior pela frente!”.

Chico Xavier

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE ESTATINAS EM EFLUENTE HOSPITALAR E ESTUDO DE DEGRADAÇÃO OXIDATIVA AVANÇADA

AUTORA: JOSELINE ALTISSIMO

ORIENTADOR: PROF. EMÉRITO TIT. DR. AYRTON FIGUEIREDO MARTINS

Neste trabalho foi desenvolvida metodologia analítica para a quantificação de estatinas – Atorvastatina e Sinvastatina, em efluente hospitalar (Hospital Universitário de Santa Maria), utilizando Extração em fase sólida e Microextração dispersiva líquido-líquido seguida de cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos. As principais variáveis da Microextração dispersiva líquido-líquido foram investigadas utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta através de um delineamento composto central rotacional. As taxas de recuperação da Extração em fase sólida foram de 95,8% para Atorvastatina e 83,5% para Sinvastatina, em solução aquosa e 92,0% para Atorvastatina e 81,5% para Sinvastatina em efluente hospitalar. Já para a Microextração dispersiva líquido-líquido as taxas de recuperação foram de 85,5% para Atorvastatina e 89,4% para Sinvastatina, em solução aquosa e 83,0% para Atorvastatina e 83,1% para Sinvastatina, em efluente hospitalar. A amostragem foi feita em dois pontos de coleta, denominados “Efluente PA” e “Efluente Geral”. A concentração média detectada no efluente foi de 30,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ no Efluente PA e 29,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ no Efluente Geral para Atorvastatina e 37,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ no Efluente PA e 36,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ no Efluente Geral para Sinvastatina. Ozonização e eletrocoagulação foram aplicados na degradação/remoção das estatinas. As principais variáveis da eletrocoagulação foram investigadas utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta através de um delineamento composto central. As taxas de degradação obtidas na ozonização foram de 100% para Atorvastatina, em 25 min de reação, para solução aquosa e efluente hospitalar; e 100% para Sinvastatina em 4 min em solução aquosa, e 10 min em efluente hospitalar. Já para a eletrocoagulação as taxas de remoção foram de 75,9% em solução aquosa e 70,9% em efluente hospitalar para Atorvastatina; e 100% para solução aquosa e efluente hospitalar para Sinvastatina, em 60 min de reação. A análise preliminar de risco ambiental revelou que as estatinas apresentam baixo risco ambiental, com PEC/PNEC < 1.

Palavras-Chave: Estatinas. Efluente Hospitalar. Extração em fase sólida. Microextração dispersiva líquido-líquido. Processos Avançados de Oxidação. Ozonização. Eletrocoagulação.

ABSTRACT**METHOD DEVELOPMENT OF STATINS QUANTIFICATION IN HOSPITAL EFFLUENT AND STUDY OF ADVANCED OXIDATIVE DEGRADATION**

AUTHOR: JOSELINE ALTISSIMO

ADVISOR: EMERITUS PROFESSOR TIT. DR. AYRTON FIGUEIREDO MARTINS

In this study, an analytical method was developed for the quantification of statins – Atorvastatin and Simvastatin, in hospital effluent (University Hospital of Santa Maria, using Solid phase extraction and Dispersive liquid-liquid microextraction, followed in liquid chromatography coupled to diode array detector. The principal variables of Dispersive liquid-liquid microextraction were investigated with aid of experimental central composite design. The recovery rates of Solid phase extraction varied from 95% for Atorvastatin and 83.2% for Simvastatin, in aqueous solution, and 92.0% for Atorvastatin and 81.5% for Simvastatin, in hospital effluent. As for the Dispersive liquid-liquid microextraction the recovery rates ranged from 85.5% for Atorvastatin and 89.4% for Simvastatin, in aqueous solution, and 83.0% for Atorvastatin and 83.1% for Simvastatin, in hospital effluent. The sampling was carried out in two sample points called “Emergency Effluent” and “General Effluent”. The concentration rates detected in the effluent were 30.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ in Emergency Effluent and 29.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ in General Effluent for Atorvastatin and 37.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ in Emergency Effluent and 36.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ in GE for Simvastatin. Ozonation and electrocoagulation were applied for the degradation/removal of statins. The principal variables of electrocoagulation were investigated with aid of experimental central composite design. The degradation rate obtained in ozonation was 100% for Atorvastatin, in 25 minutes reaction for aqueous solution and hospital effluent; and 100% for Simvastatin, in 4 minutes reaction for aqueous solution and 10 minutes reaction in hospital effluent. As for the electrocoagulation the removal rate was 75.6% in aqueous solution and 70.9% in hospital effluent for Atorvastatin; and 100% in aqueous solution and hospital effluent for Simvastatin in 60 minutes reaction. A preliminary risk evaluation revealed that the statins showed a low environmental risk, PEC/PNEC < 1.

Keywords: Statins. Hospital effluent. Solid phase extraction. Dispersive liquid-liquid microextraction. Advanced oxidation processes. Ozonation. Electrocoagulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxo de medicamentos no meio ambiente: rotas percorridas até os diferentes receptores ambientais.....	21
Figura 2 - Representação esquemática de um sistema de tanque séptico (A) conjugada a filtro anaeróbio (B), adotado no tratamento de efluentes do HUSM.....	26
Figura 3 - Representação esquemática sobreposta à imagem de satélite do sistema de esgotos e de tratamento de efluentes do HUSM.	26
Figura 4 - Etapas da SPE: (1) Condicionamento do sorvente, (2) Introdução da amostra, (3) Lavagem e (4) Eluição dos analitos.	30
Figura 5 - Etapas da DLLME: (1) Amostra, (2) Injeção da mistura de solventes, (3) Formação da solução turva, (4) Centrifugação e (5) Retirada da fase sedimentada.....	31
Figura 6 - PAOs que envolvem a geração de radicais HO [•]	32
Figura 7 - Mecanismos da ozonização.....	33
Figura 8 - Distribuição geométrica cúbica dos pontos experimentais do modelo de planejamento experimental por Metodologia de Superfície de Resposta para três variáveis.	40
Figura 9 - Fluxograma experimental das etapas dos procedimentos analíticos e oxidativos avançados.....	42
Figura 10 - Representação esquemática do sistema de esgotos e sistema de tratamento de efluentes do HUSM.	43
Figura 11 - Fluxograma experimental do procedimento de SPE para a determinação de estatinas.....	46
Figura 12 - Fluxograma experimental do procedimento de DLLME para estatinas.	49
Figura 13 – Reator de dispersão de bolhas utilizado na Ozonização: (1) Imagem do reator desenvolvido para o processo; (2) Imagem da parte interna: tubo de distribuição da corrente de ar ozonizado e (3) Esquema do sistema de ozonização: (a) entrada de O ₃ ; (b) saída de O ₃ residual; (c) orifício para coleta de amostra; (d) tubo de vidro; (e) mangueira anular, multiperfurada para dispersão de microbolhas de ar ozonizado..	50
Figura 14 – Sistema eletroquímico de Eletrocoagulação: (a) reator; (b) fonte redutora de tensão; (c) multímetro digital; (d) reostato; (e) agitador magnético. Diagrama representativo do reator: (A) Vista frontal: (a) eletrodos e (B) Vista superior: (a) orifícios para fixação de eletrodos em posições variáveis e (b) orifício para coleta de amostras.	52

Figura 15 - Montagem de cromatogramas HPLC-DAD para estatinas: (A) ATO ($360 \mu\text{g L}^{-1}$) – t_R 3,2 min; 254 nm; (B) SIN ($600 \mu\text{g L}^{-1}$) – t_R 8,9 min; 238 nm.....	57
Figura 16 – Curvas analíticas para (A) ATO e (B) SIN.	59
Figura 17 – Gráficos Box & Whisker para verificação de valores discrepantes da curva analítica: (A) ATO e (B) SIN.	59
Figura 18 – Montagem de cromatogramas do teste de estabilidade de soluções-padrão de estatinas 5 mg L^{-1} , no primeiro e no trigésimo dia nas condições avaliadas: (1) 4°C ; (2) 4°C na ausência de luz; (3) temperatura ambiente na presença de luz e (4) temperatura ambiente na ausência de luz. Picos correspondentes (a) ATO; 254 nm; (b) SIN; 238 nm.....	61
Figura 19 - Gráficos de barras para os sorventes testados em solução aquosa e em efluente hospitalar.	62
Figura 20 – Diagrama de Pareto para os efeitos estimados (valores absolutos) para DLLME em solução aquosa de (A) ATO e (B) SIN. A linha vertical pontilhada define o nível de 95% de confiança; (L) significa variável linear e (Q) significa variável quadrática.	67
Figura 21 - Perfil das variáveis independentes pH da amostra, força iônica, volume de solvente extrator e volume de solvente dispersor relacionados à desejabilidade da recuperação de ATO por DLLME em solução aquosa.	67
Figura 22 – Superfícies de resposta relacionadas a recuperação de ATO em solução aquosa por DLLME. (A) efeito combinado entre volume de solvente extrator e volume de solvente dispersor e diagrama de contorno volume de solvente extrator vs volume de solvente dispersor, (B) efeito combinado entre volume de solvente extrator e pH da amostra e (C) efeito combinado entre volume de solvente extrator e pH da amostra.	68
Figura 23 - Perfil das variáveis independentes pH da amostra, força iônica, volume de solvente extrator e volume de solvente dispersor relacionados à desejabilidade da recuperação de SIN por DLLME em solução aquosa.	69
Figura 24 - Superfícies de resposta relacionadas a recuperação de SIN em solução aquosa por DLLME. (A) efeito combinado entre volume de solvente extrator e volume de solvente dispersor e diagrama de contorno volume de solvente extrator vs volume de solvente dispersor, (B) efeito combinado entre volume de solvente extrator e pH da amostra e (C) efeito combinado entre volume de solvente extrator e pH da amostra.	70

- Figura 25 - Diagrama de Pareto para os efeitos estimados (valores absolutos) para DLLME em efluente hospitalar de (A) ATO e (B) SIN. A linha vertical pontilhada define o nível de 95% de confiança; (L) significa variável linear e (Q) significa variável quadrática..... 72
- Figura 26 - Perfil das variáveis independentes pH da amostra, força iônica, volume de solvente extrator e volume de solvente dispersor relacionados à desejabilidade da recuperação de ATO por DLLME em efluente hospitalar. 72
- Figura 27 - Superfícies de resposta relacionadas a recuperação de ATO em efluente hospitalar por DLLME. (A) efeito combinado entre volume de solvente extrator e volume de solvente dispersor e diagrama de contorno volume de solvente extrator vs volume de solvente dispersor, (B) efeito combinado entre volume de solvente extrator e pH da amostra e (C) efeito combinado entre volume de solvente extrator e pH da amostra. 73
- Figura 28 - Perfil das variáveis independentes pH da amostra, força iônica, volume de solvente extrator e volume de solvente dispersor relacionados à desejabilidade da recuperação de SIN por DLLME em efluente hospitalar. 74
- Figura 29 - Superfícies de resposta relacionadas a recuperação de ATO em efluente hospitalar por DLLME. (A) efeito combinado entre volume de solvente extrator e volume de solvente dispersor e diagrama de contorno volume de solvente extrator vs volume de solvente dispersor, (B) efeito combinado entre volume de solvente extrator e pH da amostra e (C) efeito combinado entre volume de solvente extrator e pH da amostra. 74
- Figura 30 - Concentrações diárias de estatinas detectadas nos pontos de coleta. (A) Efluente PA e (B) Efluente Geral utilizando DLLME; (C) Efluente PA e (D) Efluente Geral utilizando SPE..... 77
- Figura 31 – Degradação das estatinas por ozonização em diferentes valores de pH. Em solução aquosa: (A) ATO e (B) SIN; e em efluente hospitalar (C) ATO e (B) SIN. 80
- Figura 32 - Espectros de absorção das estatinas em solução aquosa submetidas à ozonização durante 60 minutos. (A) ATO e (B) SIN. 81
- Figura 33 - Decaimento da concentração das estatinas em função do tempo em solução aquosa: (A) ATO e (B) SIN; e em efluente hospitalar: (C) ATO e (D) SIN..... 82
- Figura 34 - Cinética de reação para degradação de estatinas por ozonização em solução aquosa: (A) ATO e (B) SIN; e em efluente hospitalar; (C) ATO e (D) SIN..... 83

- Figura 35 – Diagrama de Pareto para valores absolutos para a eletrocoagulação de (A) ATO e (B) SIN em solução aquosa. A linha vertical pontilhada define o nível de 95% de confiança; (L) significa variável linear e (Q) significa variável quadrática..... 86
- Figura 36 - Superfícies de resposta relacionadas à remoção por eletrocoagulação, em solução aquosa: Efeito combinado entre distância dos eletrodos e concentração de eletrólito. (A) ATO e (B) SIN..... 86
- Figura 37 - Superfícies de resposta relacionadas a remoção de estatinas em solução aquosa por eletrocoagulação: Efeito combinado entre distância dos eletrodos e o pH da amostra, e o efeito combinado entre [NaCl] e pH da amostra. (A) ATO e (B) SIN. . 87
- Figura 38 - Perfil das variáveis independentes pH da amostra, concentração de eletrólito e distância dos eletrodos relacionados à desejabilidade da remoção das estatinas por eletrocoagulação em solução aquosa..... 88
- Figura 39 - Diagrama de Pareto para valores absolutos para a eletrocoagulação para (A) ATO e (B) SIN em efluente hospitalar. A linha vertical pontilhada define o nível de 95% de confiança; (L) significa variável linear e (Q) significa variável quadrática. 90
- Figura 40 – Diagrama de contorno para eletrocoagulação das estatinas em efluente hospitalar. (A) ATO e (B) SIN..... 90
- Figura 41 - Perfil das variáveis independentes pH da amostra, concentração de eletrólito e distância dos eletrodos relacionados à desejabilidade da remoção das estatinas por eletrocoagulação em efluente hospitalar. 91
- Figura 42 – Decaimento da concentração das estatinas em função do tempo em solução aquosa: (A) ATO e (B) SIN; e em efluente hospitalar: (C) ATO e (D) SIN..... 94
- Figura 43 – Cinética de reação para remoção de estatinas por eletrocoagulação em solução aquosa: (A) ATO e (B) SIN; e em efluente hospitalar: (C) ATO e (D) SIN..... 94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das principais estatinas.	23
Tabela 2 - Estruturas e propriedades físico-químicas das estatinas.	24
Tabela 3 – Compostos determinados pelo LATER no efluente do HUSM.	27
Tabela 4 - Concentrações médias de estatinas em afluentes, efluentes e em águas superficiais.	29
Tabela 5 - Condições cromatográficas utilizadas na separação de estatinas.	45
Tabela 6 - Combinações de solventes extrator e dispersor empregados na DLLME de estatinas.....	47
Tabela 7 – Variáveis e níveis de significância utilizados no DCCR para a DLLME.	48
Tabela 8 - Especificações do reator de ozonização.....	51
Tabela 9 – Especificações do sistema de eletrocoagulação.	53
Tabela 10 - Valores utilizados no delineamento composto central para a eletrocoagulação...	53
Tabela 11 - Parâmetros físico-químicos médios do efluente do HUSM.....	55
Tabela 12 – Figuras-de-mérito para determinação de estatinas por HPLC-DAD.	58
Tabela 13 – Equações de regressão linear	58
Tabela 14 – Valores de $C_{calculado}$ para a curva analítica das estatinas.	60
Tabela 15 – Recuperações médias para cada sorvente de SPE testado.	63
Tabela 16 - Validação da SPE para estatinas em solução aquosa e em efluente hospitalar utilizando-se sorvente Chromabond C18 ec.	64
Tabela 17 – Matriz do DCCR para a otimização das variáveis de extração dispersiva líquido- líquido em solução aquosa.	66
Tabela 18 - Matriz do DCCR para a otimização das variáveis de extração dispersiva líquido- líquido em efluente hospitalar.....	71
Tabela 19 - Validação da DLLME para estatinas em solução aquosa e em efluente hospitalar.	76
Tabela 20 – Dados de ecotoxicidade e dados de bioacumulação relatados.	79
Tabela 21 – Concentração ambiental predita (PEC) e quociente de risco (QR) das estatinas.	79
Tabela 22 – Parâmetros otimizados na eletrocoagulação de estatinas em solução aquosa e efluente hospitalar.	83
Tabela 23 - Matriz do DCC para a otimização das variáveis da eletrocoagulação para solução aquosa.	85

Tabela 24 - Matriz do DCC para a otimização das variáveis de eletrocoagulação para efluente hospitalar.	89
Tabela 25 – Parâmetros otimizados na eletrocoagulação de estatinas em solução aquosa e efluente hospitalar.	95
Tabela 26 - Teste de Controle de qualidade ATO	107
Tabela 27 - Teste de Controle de qualidade SIN.....	108
Tabela 28 – Níveis de concentração da curva de calibração em solvente (Acetonitrila).	109
Tabela 29 – Níveis de concentração da curva de calibração em efluente hospitalar.....	109
Tabela 30 – Concentrações diárias de estatinas detectadas nos pontos de coleta através de DLLME.	110
Tabela 31– Concentrações diárias de estatinas detectadas nos pontos de coleta através de SPE.	110

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Ampere
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATO	Atorvastatina
BCF	do inglês, <i>Bioconcentration Factor</i>
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DCC	Delineamento Composto Central
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DLLME	do inglês, <i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EC	Eletrocoagulação
EMEA	do inglês, <i>European Medicines Evaluation Agency</i>
ETA	Estação de Tratamento de Água
ETE	Estação de Tratamento de Efluentes
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
LD	Limite de Detecção
LDL	do inglês, <i>Low Density Lipoproteins</i>
log K_{ow}	Coefficiente de Partição Octanol/Água
LQ	Limite de Quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NOEC	do inglês, <i>Non-Observed-Effects Concentration</i>
PAO	Processos Avançados de Oxidação
PEC	do inglês, <i>Predicted Environmental Concentration</i>
pK_a	Constante de Acidez
PNEC	do inglês, <i>Predict No-Effect Environmental Concentration</i>
POP	Poluentes Orgânicos Persistentes
PCCP	do inglês, <i>Pharmaceuticals and Personal Care Products</i>
QR	Quociente de Risco
r^2	Coefficiente de regressão linear
SIN	Sinvastatina
SPE	do inglês, <i>Solid Phase Extraction</i>
$t_{1/2}$	Tempo de Meia-vida
TGD	do inglês, <i>Technical Guidance Document on Risk Assessment</i>
t_R	Tempo de retenção
EU	União Europeia
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1.	Fármacos no meio ambiente.....	21
2.2.	As estatinas.....	22
2.3.	Efluente hospitalar.....	25
2.4.	Técnicas de extração e determinação cromatográfica de estatinas	28
2.4.1.	Extração em fase sólida (SPE)	29
2.4.2.	Microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME).....	30
2.5.	Processos avançados de oxidação	32
2.5.1.	Ozonização	33
2.5.2.	Eletrocoagulação (EC)	35
2.6.	Avaliação de risco ambiental	37
2.7.	Planejamento Experimental.....	39
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1.	Reagentes e soluções	42
3.2.	Fluxograma experimental.....	42
3.3.	Amostragem	43
3.4.	Caracterização físico-química do efluente hospitalar	44
3.5.	Método cromatográfico	44
3.6.	Estabilidade dos padrões analíticos	45
3.7.	Métodos de extração.....	46
3.7.1.	Extração em Fase Sólida (SPE).....	46
3.7.2.	Extração Dispersiva Líquido-Líquido (DLLME).....	47
3.8.	Avaliação preliminar de risco ambiental.....	49
3.9.	Processos avançados de oxidação	50
3.9.1.	Ozonização	50
3.9.2.	Eletrocoagulação (EC)	52
3.10.	Gerenciamento de resíduos	54
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1.	Caracterização físico-química do efluente hospitalar	55
4.2.	Método cromatográfico	56
4.3.	Estabilidade dos padrões analíticos.....	60

4.4.	Métodos de extração	62
4.4.1.	Extração em fase sólida	62
4.4.1.1.	Validação do método de SPE.....	64
4.4.2.	Microextração dispersiva líquido-líquido.....	64
4.4.2.1.	DCCR em solução aquosa	65
4.4.2.2.	DCCR em efluente hospitalar	70
4.4.2.3.	Efeito das variáveis.....	75
4.4.2.4.	Desejabilidade versus resultados reais.....	76
4.4.2.5.	Validação do método de DLLME.....	76
4.5.	Determinação de estatinas em efluente hospitalar	77
4.6.	Avaliação preliminar de risco ambiental	78
4.7.	Aplicação de PAOs á degradação e remoção de estatinas	80
4.7.1.	Ozonização.....	80
4.7.1.1.	Estudo cinético da Ozonização	81
4.7.2.	Eletrocoagulação (EC).....	84
4.7.2.1.	DCC em Solução Aquosa	84
4.7.2.2.	DCC em Efluente Hospitalar	89
4.7.2.3.	Influência da concentração de eletrólito	92
4.7.2.4.	Influência do pH da amostra	92
4.7.2.5.	Influência da distância dos eletrodos	93
4.7.2.6.	Estudo cinético da Eletrocoagulação	93
4.7.3.	Comparação entre os processos utilizados para degradação/remoção de estatinas ...	95
5.	CONCLUSÕES	96
6.	SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	97
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
	APÊNDICES.....	106

1. INTRODUÇÃO

Efluentes hospitalares costumam apresentar uma grande variedade de poluentes e contaminantes orgânicos e inorgânicos, substâncias recalcitrantes e persistentes no ambiente. A maioria destes analitos pertence ao grupo genérico “contaminantes emergentes”, sendo que, ultimamente, a sigla PPCPs (do inglês, *pharmaceuticals and personal care products*) também vem sendo empregada como sinônimo. Contaminantes emergentes são entendidos como substâncias com capacidade de bioacumulação, persistência e toxicidade, com potencial para afetar a qualidade da água e representar ameaça à saúde pública e dos ecossistemas (VERLICCHI *et al.*, 2010; PAL *et al.*, 2013; MENDOZA *et al.*, 2014).

As estatinas são fármacos prescritos para pacientes com hipercolesteremia, com finalidade de reduzir a mortalidade relacionada à doenças cardiovasculares. Devido à alta persistência de agentes reguladores de lipídios em ambientes aquáticos, pesquisas sobre sua presença em água potável e efluentes têm se tornado relevante (PIECHA *et al.*, 2010).

A presença destas substâncias em efluentes e águas superficiais tem sido observada em níveis de $\leq \mu\text{g L}^{-1}$. Essas substâncias entram no meio aquático e, portanto, são potenciais poluentes para o ecossistema, devido às suas propriedades químicas, com diferentes grupos funcionais e propriedades biológicas, podem manter-se inalteradas por tempo indeterminados causando, assim, diversos efeitos sobre os organismos aquáticos (CERMOLA *et al.*, 2006).

A ocorrência de fármacos em águas superficiais tem sido extensivamente analisada, bem como o destino destes xenobióticos no ambiente. Estes produtos podem ser transformados por meio de processos (como hidrólise e fotólise) em produtos diferentes, o que tem gerado pesquisas sobre a identidade desses produtos de transformação (CERMOLA *et al.*, 2006).

Compostos farmacêuticos, especialmente os polares, tais como anti-inflamatórios e reguladores de lipídios, merecem atenção especial. Devido as suas propriedades físico-químicas (alta solubilidade e, muitas vezes, baixa degradabilidade), os fármacos são capazes de permear todas as etapas naturais de filtração e chegar à águas subterrâneas, e finalmente, à água potável (PETROVIĆ *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, o Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Efluentes e Resíduos (LATER) vem realizando estudos voltados à determinação e à degradação de microcontaminantes ambientais, tendo como matriz de investigação efluentes hospitalares, em especial, do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Maria (HUSM) —

sempre desenvolvendo metodologias analíticas avançadas e estudos de degradação oxidativa e de avaliação do risco ambiental (ALMEIDA, *et al.*, 2013; WILDE, *et al.*, 2014).

Este trabalho propõe-se, além dos aspectos de estudo de desenvolvimento de métodos cromatográficos de traços, de degradação oxidativa avançada e de avaliação de ecotoxicidade, a ampliar o leque de categorias de fármacos, contaminantes, investigados pelo LATER até o momento, inserindo a classe das Estatinas.

Frente a isso, o presente trabalho tem como objetivos específicos:

- Desenvolver e otimizar um método de determinação de estatinas em efluente hospitalar por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por arranjo de diodos (DAD).
- Desenvolver e otimizar uma técnica de extração em fase sólida (SPE) para *clean up* e pré-concentração dos analitos.
- Desenvolver e otimizar uma técnica de microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME) para comparação com a SPE.
- Estudar a degradação dos analitos por Processos Avançados de Oxidação (PAOs), ozonização e eletrocoagulação.
- Empregar planejamento multivariado de experimentos para definição de melhores condições de todos os procedimentos e determinações analíticas.
- Promover análise preliminar do risco ecotoxicológico representado pela ocorrência de traços residuais de estatinas no efluente do HUSM.

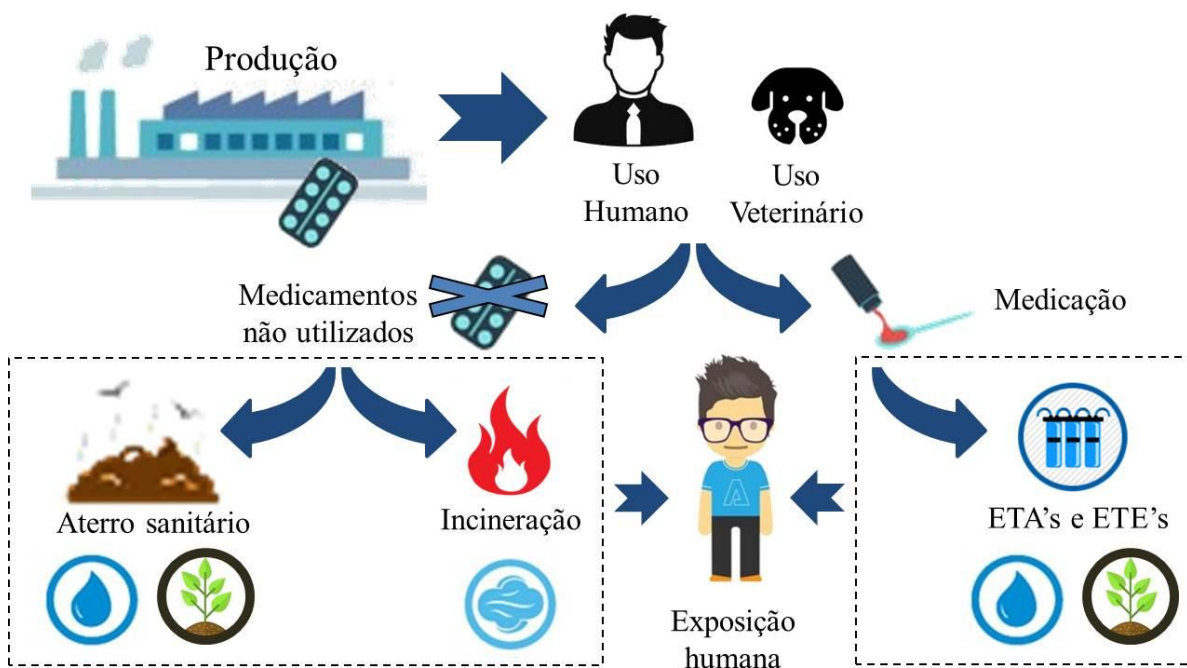
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. FÁRMACOS NO MEIO AMBIENTE

Ao longo das últimas décadas o consumo mundial de produtos farmacêuticos tem aumentado e a determinação de fármacos em águas residuais e superficiais tornou-se uma necessidade. Águas residuais têm sido apontadas como uma das principais vias de entrada de fármacos no meio ambiente, uma vez que, os medicamentos ingeridos são excretados, sejam inalterados ou como metabólitos (SANTOS *et al.*, 2013).

Para compreender as consequências ambientais induzidas pelos fármacos, é importante que se examine as rotas percorridas desde o seu uso na sociedade até a chegada aos diferentes receptores no meio ambiente – Figura 1 (PAIVA, 2009).

Figura 1 - Fluxo de medicamentos no meio ambiente: rotas percorridas até os diferentes receptores ambientais.



Fonte: (PAIVA, 2009). Legenda: : Água; : Solo; : Ar.

Entre os fármacos mais prescritos estão os anti-inflamatórios/analgésicos, antibióticos, reguladores de lipídios, β -bloqueadores, esteroides e hormônios. Estes compostos são projetados para ter um modo específico de ação, muitos apresentam metabolismo lento e são persistentes no ambiente (CHRISTEN *et al.*, 2010).

Trabalhos demonstram que as concentrações de fármacos em águas superficiais e residuais estão geralmente na faixa de ng L^{-1} ou até $\mu\text{g L}^{-1}$. Nos últimos anos, as técnicas de escolha para a determinação e quantificação de fármacos têm aumentado devido ao desenvolvimento contínuo de novas tecnologias analíticas, capazes de detectar compostos em muito baixas concentrações em, praticamente, qualquer tipo de matriz. Contudo, as informações sobre o destino e a ação dos fármacos no meio ambiente ainda são muito incipientes (CHRISTEN *et al.*, 2010).

Os níveis de concentração de fármacos nas águas superficiais não dependem apenas das estações de tratamento de efluentes (ETEs); uma vez no fluxo aquático, podem ocorrer diferentes graus de diluição e sujeição a diferentes processos de atenuação, como biodegradação, fotodegradação e adsorção ao material particulado em suspensão ou acumulação nos sedimentos (COLLADO *et al.*, 2014).

Preocupação sobre a ocorrência e possíveis efeitos nocivos dos fármacos no ambiente tem surgido e aumentado nos últimos anos. Vários estudos demonstram efeitos adversos quanto à exposição de longa data, mesmo em baixas doses, tanto para a fauna aquática como terrestre (GÓMEZ *et al.*, 2006; LANGFORD & THOMAS, 2009; ORTIZ DE GARCÍA *et al.*, 2013).

As atividades hospitalares podem ser apontadas como fontes pontuais relevantes de emissão de produtos farmacêuticos. Os efluentes hospitalares apresentam uma grande carga complexa de substâncias químicas, representadas pelos mais diversos fármacos, geralmente, excretados em proporções variáveis, metabolizadas ou não (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Diversos fatores contribuem para a emissão de fármacos via efluente hospitalar; elevado percentual de pacientes utilizando medicamentos que não são, normalmente, dispensados em farmácias comuns, grande uso e consumo de água, atividades diversificadas (diagnósticos, investigações, lavanderia, oficinas), etc. (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

2.2. AS ESTATINAS

As estatinas são fármacos da classe das drogas hipolipêmicas ou hipolipemiantes. Sua ação está baseada na inibição da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), que atua limitando a velocidade de biossíntese do colesterol. Tal

inibição leva a redução do colesterol tecidual e a um consequente aumento na expressão dos receptores de LDL (FONSECA, 2005; KRACUN *et al.*, 2009).

Nesta classe, destacam-se seis estatinas como as mais prescritas: Lovastatina, Pravastatina, Sinvastatina, Fluvastatina, Atorvastatina e Rosuvastatina. De acordo com sua formulação são classificadas como: naturais, semissintéticas e sintéticas; a Tabela 1 apresenta as principais formulações de acordo com esta classificação (NIROGI *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2009; SILVA, 2009).

Tabela 1 - Classificação das principais estatinas.

Formulação	Nome genérico	Nome comercial
Natural	Lovastatina	Mevacor [®]
Semissintética	Sinvastatina	Zocor [®]
Semissintética	Pravastatina	Pravachol [®]
Sintética	Atorvastatina	Lipitor [®]
Sintética	Fluvastatina	Lescol [®]
Sintética	Rosuvastatina	Crestor [®]

Fonte: NIROGI *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2009; SILVA, 2009.

Estas substâncias existem em duas formas, lactona e hidróxi-ácidos de anel aberto. A forma de hidróxi-ácido é a forma ativa do fármaco, enquanto que a forma lactona é inativa (pró-fármaco); porém, quando hidrolisada, transforma-se no fármaco ativo; assim, as duas formas atuam baixando o colesterol no plasma (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2008).

As estatinas são substâncias lipossolúveis, o que determina sua seletividade de atuação. Atuam, primeiramente, no fígado, onde um sistema especial de transporte permite que sejam incorporadas no tecido hepático para biotransformação, formação de metabólitos ativos e posterior eliminação pela bile (FONSECA, 2005).

A estatina mais vendida é a Atorvastatina que, em 2003, tornou-se o medicamento, mas vendido na história (SIMONS, 2003). No entanto, ainda existem poucas publicações sobre estas substâncias. Segundo Evgenidou *et al.* (2015) há somente um artigo disponível sobre a presença dos metabólitos das estatinas em águas residuais. Onde Vandeford e Snyder (2006) quantificaram p-hidróxi-atorvastatina e o-hidróxi-atorvastatina, como metabólitos da Atorvastatina, e, hidróxi-ácido de sinvastatina, como metabólitos da Sinvastatina, nas concentrações de 280 ng L⁻¹, 196 ng L⁻¹ e 10 ng L⁻¹, respectivamente, em efluentes e estações de tratamento de águas residuais.

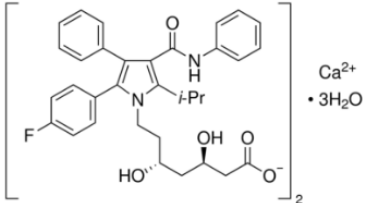
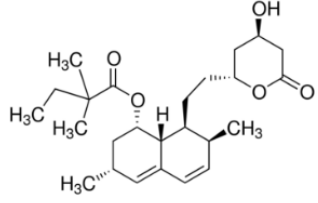
A Atorvastatina (ATO) e a Sinvastatina (SIN) foram escolhidas para o presente estudo porque são os dois únicos medicamentos, desta classe, utilizados no HUSM (dados da farmácia do HUSM).

A SIN é um pró-fármaco, portanto, é administrado na forma de lactona inativa. É absorvida no trato gastrointestinal onde é hidrolisada para a forma ativa, sendo transformada em ácido β -hidróxi no fígado. Cerca de 85% da dose administrada pode ser determinada nas fezes como metabólito e, 10 a 15% na urina, na forma inativa (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2008).

A ATO, por sua vez, é administrada na forma de hidróxi-ácido de anel aberto – na forma ativa. É absorvida no trato gastrointestinal e é metabolizada no fígado, onde seus metabólitos são produzidos – dois ativos, orto-hidróxi atorvastatina e para-hidróxi atorvastatina; e três inativos correspondentes à forma de lactona. É excretada pelas fezes em menor quantidade quanto à excretada pela urina (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2008).

A Tabela 2 apresenta as estruturas e algumas propriedades físico-químicas da ATO e da SIN.

Tabela 2 - Estruturas e propriedades físico-químicas das estatinas.

Propriedade	Atorvastatina Cálcica	Sinvastatina
Estrutura		
CAS nº.	344423-98-9	79902-63-9
Peso molecular	1209,42	418,57
Solubilidade *	Muito pouco solúvel	Praticamente insolúvel
pK _a ^a	4,5	13,2
log K _{ow} ^a	4,46	4,68

^a Fonte: MARTÍN, *et al.*, 2011; * em água (g L⁻¹ à 25 °C).

A ATO apresenta em sua molécula a presença de um grupo *para*-fluorfenila; a presença de flúor numa posição particular da molécula pode aumentar a sua estabilidade metabólica ou modular as suas propriedades físico-químicas, tais como lipofilicidade, acidez ou basicidade. A fluoração pode aumentar a afinidade do fármaco a uma proteína-alvo e

interferir na ação enzimática específica devido a uma combinação de fatores (DOLBIER, 2005).

O grupo *para*-fluorfenila é uma das principais diferenças estruturais entre as estatinas do grupo 1 (SIN), das estatinas mais recentes do grupo 2 (ATO). Este grupamento está associado a diversas vantagens frente às estatinas do grupo 1, como, por exemplo, resistência às enzimas metabólicas, probabilidade reduzida de interações fármaco-fármaco e, ainda, maior potência em termo de princípio ativo (KIRK, 2006).

2.3. EFLUENTE HOSPITALAR

Nos últimos anos, os efluentes hospitalares têm sido objeto de pesquisas em vários países. Como são considerados de matriz muito complexa, incluindo, não apenas produtos farmacêuticos e seus metabólitos, mas também agentes de diagnóstico, desinfetantes e muitas outras substâncias geradas nas mais diversas atividades hospitalares, constituem risco potencial para os ecossistemas. (VERLICCHI *et al.*, 2015; MAYER, 2013; SANTOS *et al.*, 2013).

Após o consumo, os fármacos são excretados pelos pacientes através da urina ou das fezes, quer como compostos de origem, conjugados ou metabólitos (LANGFORD & THOMAS, 2009).

O consumo de medicamentos em um hospital pode variar, devido à predominância de doenças e da atividade hospitalar diferenciada. Essas mudanças têm impacto direto nos fármacos detectados no efluente hospitalar, uma vez que estão diretamente relacionados com as substâncias e suas quantidades administradas (SANTOS *et al.*, 2013).

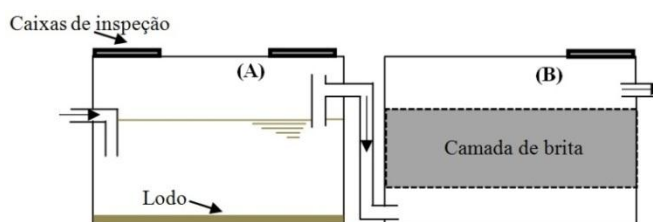
Na maioria dos países, os efluentes hospitalares são descartados em esgotos públicos, sem tratamento prévio e, assim, introduzidos nas redes de águas residuais municipais, onde, posteriormente, são tratados juntamente com outros efluentes. A maioria das estações de tratamento de esgotos municipais é despreparada para a eficaz remoção dos compostos presentes em efluentes hospitalares, pois são projetadas para a remoção de compostos facilmente biodegradáveis, remoção de carbono, nitrogênio, fósforo e organismos microbiológicos (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

O Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) é uma importante instituição de saúde da região central do Rio Grande do Sul. Conta com 291 leitos de Unidade de Internação simples e 37 leitos de Unidade de Tratamento Intensivo. A equipe de colaboradores conta

com 166 docentes, 1355 funcionários de apoio, 443 funcionários terceirizados e 342 estagiários (<http://www.husm.ufsm.br/>).

O HUSM trata seu efluente através de um sistema simples de filtros aeróbios (tanque séptico), conjugado a filtro anaeróbio, representado na Figura 2 em que ao final o efluente tratado é descartado no córrego que corta o campus (WILDE, 2011).

Figura 2 - Representação esquemática de um sistema de tanque séptico (A) conjugada a filtro anaeróbio (B), adotado no tratamento de efluentes do HUSM.



Fonte: WILDE, 2011; SILVA, 2012.

Após tratamento, o esgoto do HUSM é dispensado inicialmente em dois locais, Figura 3 (a) e (b), denominados “Efluente PA” e “Efluente Geral”, respectivamente. O Efluente PA compreende o esgoto da unidade de pronto atendimento, acrescido à ala sul do HUSM; já, o Efluente Geral contém a maior parte do esgoto lançado, porém, recebe ainda, o esgoto gerado pela biblioteca central da UFSM (WILDE, 2011).

Figura 3 - Representação esquemática sobreposta à imagem de satélite do sistema de esgotos e de tratamento de efluentes do HUSM.



Fonte: WILDE, 2011; SILVA, 2012; Brenner, 2013; imagem aérea Google.

O consumo de água no HUSM é em torno de 1,3 m³ por paciente por dia e o lançamento de esgoto possui fluxo médio de aproximadamente 190 m³ por dia (VASCONCELOS *et al.*, 2009; WILDE 2011).

Nos últimos anos, o efluente do HUSM vem sendo investigado pelo LATER; trabalhos voltados à determinação e à degradação de microcontaminantes foram desenvolvidos e, assim, uma ampla gama de compostos já foram avaliados. A Tabela 3 apresenta dados compilados a partir dos trabalhos desenvolvidos ao longo destes anos.

Tabela 3 – Compostos determinados pelo LATER no efluente do HUSM.

(continua)

Composto	Compra anual (kg) ^a	Técnica analítica	Concentração média determinada (µg L⁻¹)
Amoxicilina	5,81	SPE + HPLC-UV	27,00
Atenolol	0,09	SPE + HPLC-FLD	1,55
Propranolol	0,17	SPE + HPLC-FLD	0,58
Metoprolol	0,07	SPE + HPLC-FLD	2,21
Ciprofloxacina	1,67	SPE + HPLC-DAD LC-MS/MS-Q Trap	21,00
Cefazolina	2,5	SPE + HPLC-DAD LC-MS/MS-Q Trap	*
Ceftazidima	3,0	SPE + HPLC-DAD LC-MS/MS-Q Trap	*
Diclofenaco	0,03	SPE + HPLC-DAD	1,70
Dexametazona	2,51	SPE + HPLC-DAD	2,63
Sulfametoxazol	5,41	LC-MS/MS-Q Trap	27,80
Trimetoprima	-	LC-MS/MS-Q Trap	6,65
Acetato de Ciproterona	0,17	SPE + HPLC-DAD	2,20
Flutamida	0,45	SPE + HPLC-DAD	9,00
Citrato de Tamoxifeno	1,56	SPE + HPLC-DAD	n.d.
Espironolactona	0,33	SPE + HPLC-DAD	4,00
Azitromicina	1,50	SPE + HPLC-MS MS-Q Trap	1,32
Claritromicina	0,90	SPE + HPLC-MS MS-Q Trap	0,22
Eritromicina	0,60	SPE + HPLC-MS MS-Q Trap	n.d.
Roxitromicina	-	SPE + HPLC-MS MS-Q Trap	n.d.
Carbamazepina	1,00	SPE + LC-MS	3,00
Diazepam	0,18	SPE + LC-MS	21,00
Clonazepam	0,02	SPE + LC-MS	0,30
Lorazepam	0,01	SPE + LC-MS	0,60
Bromazepam	-	SPE + LC-MS	2,60
Benzeno	-	SBSE + HPLC-FLD	1,20
Tolueno	-	SBSE + HPLC-FLD	10,40

Tabela 3 – Compostos determinados pelo LATER no efluente do HUSM

Composto	Compra anual (kg) ^a	Técnica analítica	(conclusão)
			Concentração determinada ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Etilbenzeno	-	SBSE + HPLC-FLD	1,80
Tolueno	-	SBSE + HPLC-FLD	10,40
Xileno	-	SBSE + HPLC-FLD	15,90
Metil parabeno	-	SPE + HPLC-DAD	2,01
Etil parabeno	-	SPE + HPLC-DAD	0,87
Propil parabeno	-	SPE + HPLC-DAD	1,90
Butil parabeno	-	SPE + HPLC-DAD	n.d.
Benzil parabeno	-	SPE + HPLC-DAD	1,04

^a Fonte: Farmácia do HUSM; * Somente metabólitos; n.d. = não detectado.

2.4. TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE ESTATINAS

A análise de poluentes orgânicos persistentes (POPs) em amostras ambientais envolve diversas etapas: amostragem, preparo da amostra e procedimentos de quantificação. O controle de qualidade em cada uma dessas etapas tem fundamental importância para que os resultados finais sejam confiáveis (JIANG; OUYANG, 2015).

Os métodos cromatográficos estão em constante evolução, e, hoje, permitem quantificação em nível de ultra-traços dos mais diversos contaminantes; porém, ainda se faz necessário o emprego de técnicas de extração com intuito de pré-concentração dos analitos de interesse, bem como, para o *clean up* das amostras, principalmente, em caso de amostras com matrizes complexas (MAYER, 2013).

Miao e Metcalfe (2003) publicaram um estudo onde determinaram a concentração de Atorvastatina, Lovastatina, Pravastatina, Sinvastatina e Mevastatina em amostras de afluentes e efluentes de uma estação de tratamento de efluentes e águas superficiais em Peterborough no Canadá. Utilizaram LC-ESI-MS/MS combinada com duas técnicas de extração: Soxhlet e extração em fase sólida e seus resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Concentrações médias de estatinas em afluentes, efluentes e em águas superficiais.

Analito	Afluente (ng L⁻¹)	Efluente (ng L⁻¹)	Água superficial (ng L⁻¹)
ATO	76 ± 3	37 ± 2	1 ± 0
SIN	4 ± 0	1 ± 0	ND

Fonte: MIAO & METCALFE, 2003.

A determinação de estatinas em amostras de águas superficiais, geralmente, envolve SPE seguida por quantificação por HPLC, com diversos detectores, p. ex., DAD e espectrometria de massas. No entanto, pode haver co-extração significativa dos componentes da matriz, além dos analitos-alvos, e supressão do sinal na espectrometria de massa (MARTÍN *et al.*, 2011).

Uma saída para as interferências da matriz e supressão de sinal é a utilização de outro método de extração. Ultimamente, a extração sortiva em barra magnética (SBSE) e a microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME) vêm se tornando muito relevantes.

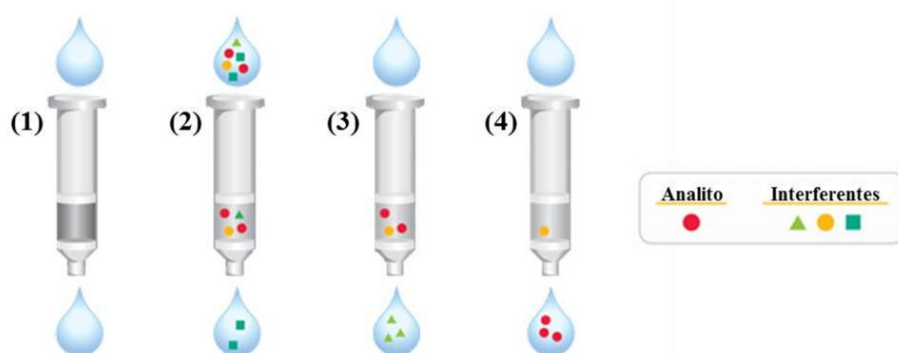
Recentemente, a DLLME tem sido utilizada como alternativa à SPE, com o objetivo de diminuir a supressão do sinal durante a espectrometria de massa. Tem-se observado resultados muito bons na aplicação de DLLME para pesticidas e bifenilas policloradas em águas superficiais e outras matrizes mais complexas, tais como águas residuais (MARTÍN *et al.*, 2011).

2.4.1. Extração em fase sólida (SPE)

O princípio da SPE envolve a partição de solutos entre duas fases, uma líquida (matriz da amostra) e uma sólida (sorvente). Os analitos devem ter mais afinidade com a fase sólida. Essa técnica permite a concentração e purificação da substância a ser analisada a partir do mecanismo de adsorção (CAMEL, 2003; PAVLOVIC *et al.*, 2007).

A técnica consiste, basicamente, na passagem da amostra líquida através de um cartucho contendo o adsorvente que irá reter os analitos. Depois que toda a amostra é passada pelo adsorvente, os analitos retidos são recuperados mediante a eluição com um solvente apropriado (CAMEL, 2003). A Figura 4 apresenta todas as etapas da SPE.

Figura 4 - Etapas da SPE: (1) Condicionamento do sorvente, (2) Introdução da amostra, (3) Lavagem e (4) Eluição dos analitos.



Fonte: <http://www.johnmorris.com.au/>.

A escolha do sorvente pode satisfazer parâmetros como seletividade, afinidade e capacidade de retenção dos analitos. Esta escolha está ligada ao analito de interesse e as interações do adsorvente escolhido através dos grupos funcionais. No entanto, o tipo de matriz e de suas interações com ambas as fases, tem grande influência. A SPE, em geral, possui certo número de variáveis, tais como: fluxo, composição e quantidade de solventes para eluição e condicionamento. Essas variáveis acabam por exigir etapas experimentais diversas, que devem ser otimizadas (PAVLOVIC *et al.*, 2007; MAYER, 2013).

A SPE é uma técnica que apresenta muitas aplicações e diversas vantagens na determinação de substâncias-traço, como, por exemplo, a conservação das espécies, pré-concentração (para melhora dos limites de detecção), facilidade de automação e possível acoplamento às diversas técnicas instrumentais. Os principais objetivos são redução de custos, de utilização de solventes e de tempo para preparação da amostra, bem como, concentração de analitos e remoção de interferentes (CAMEL, 2003; JARDIM, 2010).

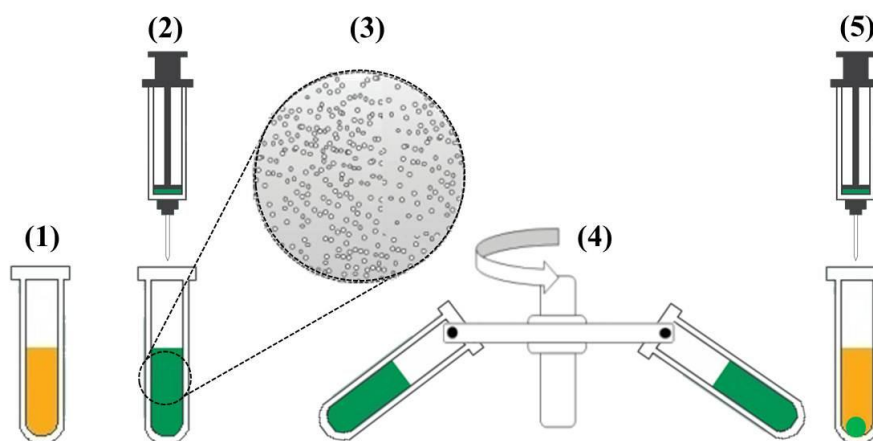
2.4.2. Microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME)

A DLLME baseia-se em um sistema de extração de três componentes. Esta mistura é composta por um solvente de alta densidade (extrator) e um solvente polar miscível em água (dispersor) que é rapidamente introduzido na amostra aquosa para formar uma solução turva (MARTÍN *et al.*, 2011).

É chamada de microextração, pois se enquadra nos critérios de miniaturização, baixo custo, rapidez e eficiência, com alto potencial para aplicação direta em campo. Outras vantagens incluem simplicidade de operação, alto fator de enriquecimento e baixo consumo de solventes, o que faz com que seja incluída no princípio da química verde (REZAEI, *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2012).

Quando a mistura de solventes é injetada na amostra, é produzida uma “turbulência”. Esta turbulência dá origem à formação de pequenas gotículas, que se dispersam ao longo da amostra. Forma-se, então, uma solução turva, e o estado de equilíbrio é alcançado rapidamente, e, assim, o tempo de extração é curto. Após centrifugação da solução, forma-se uma fase sedimentada com os analitos extraídos (REZAEI, *et al.*, 2010). A Figura 5 apresenta as fases da DLLME.

Figura 5 - Etapas da DLLME: (1) Amostra, (2) Injeção da mistura de solventes, (3) Formação da solução turva, (4) Centrifugação e (5) Retirada da fase sedimentada.



Fonte: MARTINS *et al.*, 2012.

Esta técnica vem apresentando uma variedade de aplicações. Mostra-se adequada na extração e pré-concentração em uma grande variedade de compostos orgânicos e íons metálicos. Podem-se destacar, entre suas aplicações, a agrotóxicos, fármacos e outros POPs. A DLLME mostra-se muito versátil, pois, seus extratos podem ser empregados em diversos métodos de análise (MARTINS *et al.*, 2012).

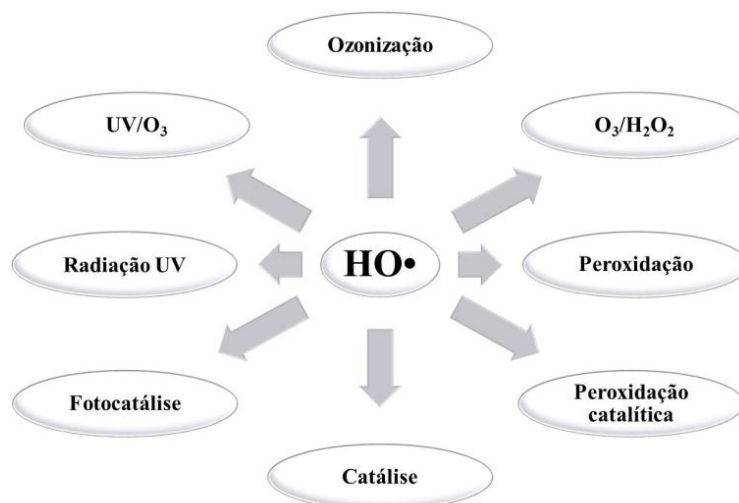
2.5. PROCESSOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO

A fim de reduzir a carga de contaminantes nos efluentes e águas residuais, o processo de tratamento convencional deve ser melhorado através de tecnologias de tratamento mais recentes, que são capazes de remover eficientemente microcontaminantes. Entre tais tecnologias estão: desinfecção UV (águas), adsorção em carbono ativado, troca iônica, eletrodíálise e processos avançados de oxidação - PAOs (RODAYAN *et al.*, 2013).

Os PAOs são tecnologias emergentes para o tratamento de efluentes e águas residuais, uma vez que o radical hidroxila (HO^\bullet) gerado apresenta forte poder oxidante. Esse radical pode degradar, parcial ou completamente, um largo espectro de compostos orgânicos e inorgânicos, recalcitrantes a processos convencionais (MARTINS *et al.*, 2005). Eles garantem alta reatividade com baixa seletividade, características necessárias para degradação dos diferentes poluentes (PIECHA *et al.*, 2010).

Entre os PAOs, pode-se destacar foto-Fenton, fotocatalise e ozonização, de particular interesse para a remoção de contaminantes (RODAYAN *et al.*, 2013). Na Figura 6 é apresentado um esquema dos principais PAOs que geram radical HO^\bullet .

Figura 6 - PAOs que envolvem a geração de radicais HO^\bullet .

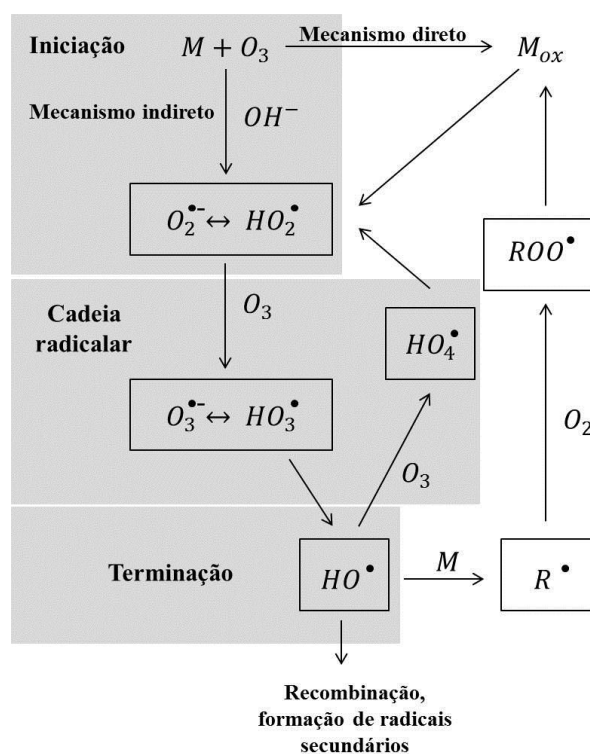


Fonte: SILVA, 2012.

2.5.1. Ozonização

O ozônio é um oxidante forte ($E^\circ = 2,07 \text{ eV}$), que se decompõe em água para formar o radical hidroxil (HO^\bullet), agente oxidante muito forte ($E^\circ = 2,80 \text{ eV}$). O ozônio pode agir de duas maneiras (Figura 7): modo indireto (radicalar), induzindo a oxidação dos analitos via radical HO^\bullet ou, modo direto (molecular), onde, devido a sua natureza dipolar, atua como eletrófilo, nucleófilo ou, em reações de adição dipolar, atacando seletivamente certos grupos funcionais de moléculas orgânicas através de um mecanismo eletrofílico (KLAVARIOTI *et al.*, 2009).

Figura 7 - Mecanismos da ozonização.



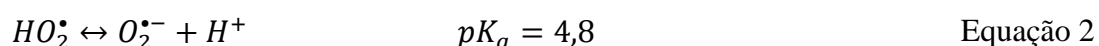
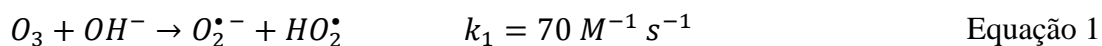
Fonte: MAHMOUD, 2006; BRENNER, 2013. R: produto de reação. M: micropolvente.

Geralmente, a ozonização é favorecida pelo aumento do pH devido ao aumento da produção dos radicais hidroxila. Pode-se aumentar o desempenho do tratamento combinando a ozonização com irradiação de luz, peróxido de hidrogênio ou complexos de ferro ou de cobre, que atuam como catalizadores (KLAVARIOTI *et al.*, 2009).

Como visto na Figura 7, o mecanismo de ozonização pode ser dividido em três etapas, que estão descritas abaixo (MAHMOUD, 2006; BRENNER, 2013).

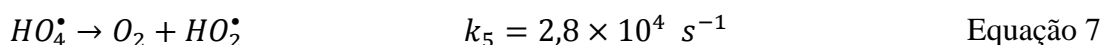
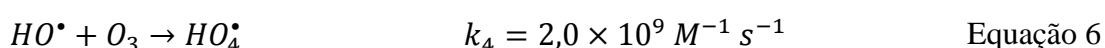
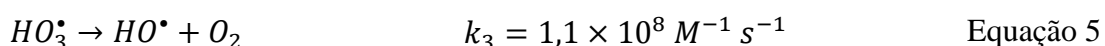
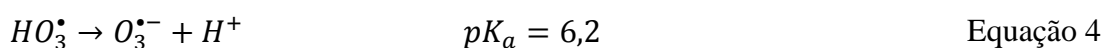
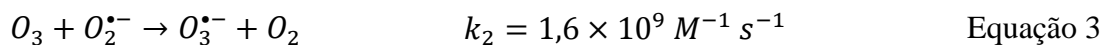
1ª Etapa: Iniciação

A reação entre o íon hidroxila e o ozônio promove a formação do ânion radicalar superóxido ($O_2^{\bullet -}$) e radicais hidroperoxila (HO_2^{\bullet}) – que encontra-se em equilíbrio ácido-base (Equações 1 e 2).



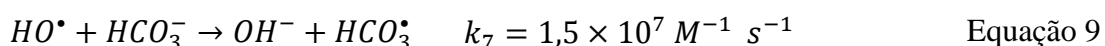
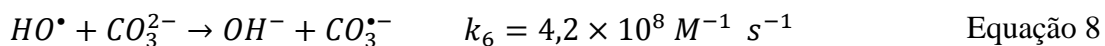
2ª Etapa: Cadeia radicalar

O ânion radicalar ozonídeo ($O_3^{\bullet -}$), formado pela reação entre ozônio e o ânion radicalar superóxido (Equação 3), se decompõe imediatamente em radical hidroxila, que pode reagir com microcontaminantes, compostos orgânicos, com o radical hidroxila ou, ainda, com o ozônio, gerando HO_4^{\bullet} ; que se decompõe gerando oxigênio e radical hidroperoxila (Equações 4 – 7). Assim, a cadeia radicalar pode começar novamente.

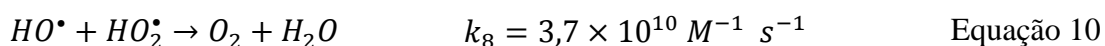


3ª Etapa: Terminação

Alguns compostos orgânicos e inorgânicos podem reagir com os radicais hidroxila, formando radicais secundários, interrompendo a geração de radicais $O_2^{\bullet -}$ e HO_2^{\bullet} :



Outra opção para a reação de terminação é a reação entre dois radicais.



A combinação destas reações mostra que três moléculas de ozônio podem produzir dois radicais hidroxila:



Nos últimos anos, muito se tem pesquisado sobre a utilização da ozonização para a remoção de contaminantes emergente em águas e efluentes. Já foi demonstrado que a ozonização é eficaz na remoção de vários micropoluentes, removendo cerca de 95% da carga de poluentes. A molécula de ozônio pode reagir com muitos compostos orgânicos, em particular, com os que apresentam anéis aromáticos, heteroátomos ou insaturações (ROSAL *et al.*, 2010; RODAYAN *et al.*, 2014).

O reator de ozonização é uma peça muito importante no processo; vários parâmetros influenciam a ocorrência da reação entre o gás e o líquido, como, por exemplo, o comportamento hidrodinâmico e a transferência de massa; características importantes na avaliação dos resultados experimentais. Durante o processo, o ozônio, que está na forma de gás, é transferido para a fase líquida. O contato gás-líquido e a dispersão eficaz, aumentam as taxas de transferência de massa, que dependem da área interfacial e do tamanho das bolhas formadas (GOTTSCHALK, *et al.*, 2004; MATHESWARAN e MOON, 2009).

Os reatores mais utilizados são tipo coluna (de bolhas) e tanque agitado. Os reatores tipo coluna, geralmente, apresentam resultados mais satisfatórios, pois proporcionam melhor interação entre as fases, desde que a relação entre altura e diâmetro seja grande (GOTTSCHALK, *et al.*, 2004).

2.5.2. Eletrocoagulação (EC)

A EC é um processo eletroquímico que pode ser utilizado na remoção de POPs de águas superficiais e efluentes através da desestabilização de contaminantes suspensos, emulsificados ou dissolvidos em meio aquoso – por meio da ação de uma corrente elétrica (BARIŞCI *et al.*, 2015; GARCIA-GARCIA *et al.*, 2015).

Em sua forma mais simples, um reator de eletrocoagulação pode ser constituído por uma célula eletrolítica com um ânodo e um cátodo. O ânodo é chamado de “eletrodo de

sacrifício”, que se dissolve, dando origem a íons não estáveis (GARCIA-GARCIA *et al.*, 2015; PADILLA-ROBLES *et al.*, 2015).

Para a compreensão do processo de EC deve-se considerar a eficiência do contato das espécies (mistura) e a cinética de remoção dos poluentes. Enquanto a forma de contato determina a interação entre as espécies (coagulante, poluente e bolhas), a cinética é entendida como a velocidade de redução da concentração do poluente no meio (MERMA, 2008).

Vários processos físico-químicos são combinados dentro do reator e, assim, o mecanismo global de remoção dos contaminantes é complexo; há, porém, duas formas principais de remoção: ação da gravidade e flotabilidade. Estas resultam em sedimentação e flotação, principais caminhos para a remoção dos contaminantes (MERMA, 2008).

O processo da EC ocorre em três etapas.

1. Oxidação eletrolítica do eletrodo de sacrifício para formação do coagulante. Quando a corrente elétrica é aplicada, o eletrodo começa a “dissolver-se” e há a formação de cátions correspondentes ao tipo de eletrodo utilizado (BRENNER, 2009; BARIŞCI *et al.*, 2015). Representada pela Equação 12:



2. Desestabilização dos contaminantes, partículas em suspensão e quebra de emulsões. Pode ocorrer redução eletroquímica direta dos cátions do metal (Me^{n+}) na superfície do cátodo (BRENNER, 2009).

Os radicais hidroxila formados no cátodo aumentam o pH do efluente induzindo a precipitação de íons do metal como hidróxidos correspondentes. A Equação 13 demonstra essa reação:



3. Agregação das fases desestabilizadas para a formação dos flocos.

Quando uma concentração crítica é atingida, os íons formam flocos insolúveis, hidrofóbicos. Os flocos funcionam como uma espécie de armadilha, que aprisiona em sua estrutura os contaminantes, acontecendo a remoção. Diversos tipos de eletrodos podem ser utilizados, tais como ferro e alumínio (BARIŞCI *et al.*, 2015; PADILLA-ROBLES *et al.*, 2015).

As Equações 14 e 15 demonstram esse processo com uso de eletrodos de alumínio:



Para que a EC seja eficaz devem ser consideradas algumas variáveis que são fundamentais no processo, como, por exemplo, complexidade da amostra, pH, densidade de corrente, material, quantidade e configuração dos eletrodos. Estas variáveis afetam o tempo total do tratamento, a cinética e, também, a eficiência da remoção dos contaminantes (BUTLER *et al.*, 2011).

2.6. AVALIAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL

A ocorrência de produtos farmacêuticos em ambientes aquáticos é uma questão bem estabelecida e tornou-se uma questão de preocupação científica e pública. Diferentes classes de fármacos entram no meio ambiente através dos sistemas de tratamento de águas residuais e esgotos, após sua utilização (humana e animal) e, excreção, em graus variáveis. Estes compostos apresentam mecanismos de ação específicos e muitos demonstram lento metabolismo e persistência no meio ambiente. (GINEBREDA *et al.*, 2010; CHRISTEN *et al.*, 2010).

Considerando que os fármacos apresentam ocorrência bem documentada, seus efeitos a longo prazo e as consequências ambientais são questão de pesquisa ativa. Se uma substância é persistente e bioacumulável, a duração no ambiente e o nível de exposição dos organismos vivos aumentam, o que pode levar a efeitos irreversíveis, dificilmente detectados nas fases iniciais (HERNANDO *et al.*, 2007; GINEBREDA *et al.*, 2010).

Diversos fatos estão associados a essa problemática, e podem ser resumidos da seguinte maneira: fármacos são compostos bioativos, portanto, são capazes de causar potenciais efeitos danosos aos seres vivos. Há um aumento contínuo na utilização de medicamentos, portanto, seu fluxo de entrada no meio ambiente acompanha esse aumento. Centenas de produtos farmacêuticos são utilizados, concomitantemente, ficando suscetíveis às interações e aos efeitos sinérgicos, basicamente, pouco conhecidos (GINEBREDA *et al.*, 2010).

Neste sentido, a evidência de que alguns fármacos de grande uso apresentam implicações ambientais depõe para a necessidade de estudos abrangentes de avaliação de risco. Princípios gerais para esta avaliação estão disponíveis no Documento de Orientação Técnica de Avaliação de Risco, TGD (do inglês, *Technical Guidance Document on Risk Assessment*), do ano de 2003, e na diretriz da Agência Europeia de Medicamentos, EMEA (do inglês, *European Medicines Evaluation Agency*), do ano de 2006 (TGD, 2003; EMEA, 2006; HERNANDO *et al.*, 2006).

Nos dois documentos, a avaliação de risco é baseada em valores da Concentração Ambiental Predita, PEC (do inglês, *Predict Environmental Concentration*) e da Concentração Ambiental Predita que Não Causa Efeito, PNEC (do inglês, *Predict No-Effect Environmental Concentration*), estimada a partir de testes de toxicidade padrão (HERNANDO *et al.*, 2006).

Para a avaliação preliminar de risco, a EMEA propõe três etapas de estudo: a primeira compreende a avaliação da concentração ambiental predita através do valor de PEC, ou seja, pela avaliação teórica da quantidade de fármaco lançada no meio ambiente de acordo com seu uso e exposição. Esta fase tem um limite de avaliação de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$, isto é, se o fármaco possui concentração abaixo deste limite assume-se que o mesmo não apresenta, em geral, risco ao meio ambiente, porém, esse limite não se aplica a todas as substâncias, por exemplo, ao desreguladores endócrinos (EMEA, 2006; WILDE, 2011).

Se o PEC for maior ou igual a $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$, então, o fármaco passa para a segunda fase, que envolve estudos de toxicidade, destino e efeitos no meio ambiente. Aqui, são efetuados cálculos mais realísticos de dosagens diárias do fármaco, taxas de excreção humana e taxas de remoção em sistemas de tratamento. E, por fim, a terceira fase consiste em maior refinamento, avaliando-se comportamentos específicos e riscos (EMEA, 2006; WILDE, 2011).

O PEC para o estudo de um caso específico, como, por exemplo, de um hospital, pode ser calculado através da Equação 16 (WILDE, 2011).

$$PEC_{Efl.} = \frac{A \cdot E}{V_{Efl.} \cdot 365} \quad \text{Equação 16}$$

Onde $PEC_{Efl.}$ é a concentração predita no efluente (g L^{-1}), A é o 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}).

Outro indicador de avaliação de risco ambiental é o Quociente de Risco (QR), calculado através da razão PEC/PNEC. O QR apresenta valor limite de 1; quando o fator

excede a unidade, indica que a concentração da substância apresenta risco ecotoxicológico. Uma análise mais detalhada do valor de QR pode ser admitida, onde $QR < 0,1$ indica risco mínimo para os organismos aquáticos, $0,1 \leq QR < 1$ indica risco médio e, finalmente, $QR \geq 1$ risco alto (HERNANDO *et al.*, 2006).

Hernando *et al.* (2006) propuseram o cálculo do QR utilizando a Concentração Ambiental Medida, MEC (do inglês, *Measured Environmental Concentration*), que obedece o mesmo critério de valor para indicação de risco do bioacumulação.

Outro parâmetro utilizado para o estudo da avaliação do risco potencial é o valor de $\log K_{ow}$, que reflete a polaridade da substância em estudo e, conseqüentemente, seu potencial de bioacumulação no ambiente. Porém, caso a substância apresente $\log K_{ow} > 4,5$, a avaliação de risco deve prosseguir de acordo com o TGD, que introduz outro parâmetro na avaliação de risco: o Fator de Bioconcentração, BCF (do inglês, *Bioconcentration Factor*) (TGD, 2003; EMEA, 2006; ARSAND, 2010).

O BCF é mensurado a partir da relação entre a concentração no organismo e a concentração em água num estado de equilíbrio (TGD, 2003). Segundo Hernando *et al.*, 2007 o Fator de Bioconcentração é a medida mais ampla de bioacumulação, o valor de $\log K_{ow}$ só deve ser utilizado como indicador quando o BCF não for conhecido. Para que uma substância seja considerada bioacumulável deve apresentar $BCF > 2000$.

2.7. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A otimização de parâmetros experimentais é uma etapa crítica no desenvolvimento de um trabalho analítico, neste aspecto, o planejamento experimental multivariado torna-se uma importante ferramenta, sendo possível obter-se máximo desempenho nas condições em que um procedimento é desenvolvido (PERALTA-ZAMORA *et al.*, 2005; BEZERRA *et al.*, 2008).

Após definir quais os parâmetros mais importantes a serem otimizados, determina-se o planejamento experimental mais adequado para englobar um intervalo mais apropriado de variáveis para a otimização (WILDE, 2011).

A Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) foi desenvolvida por Box e colaboradores, na década de 50. Este termo originou-se da perspectiva gráfica gerada pelo modelo matemático, e seu uso é amplamente difundido na quimiometria. A RSM consiste em

um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas baseadas no ajuste de modelos empíricos para os dados experimentais obtidos em relação ao desenho experimental. Para este objetivo são empregadas funções polinomiais quadrática e linear para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, para explorar as condições experimentais até sua otimização (BEZERRA *et al.*, 2008).

A RSM é um modelo de segunda ordem, que se mostra bem adequado para a montagem de uma superfície quadrática e, normalmente, funciona bem para a otimização de processos. Engloba cinco níveis de significância $(-\alpha, -1, 0, 1, +\alpha)$ e o número total de experimentos pode ser calculado de acordo com a Equação 17 (MONTGOMERY, 2001; KASIRI *et al.*, 2008).

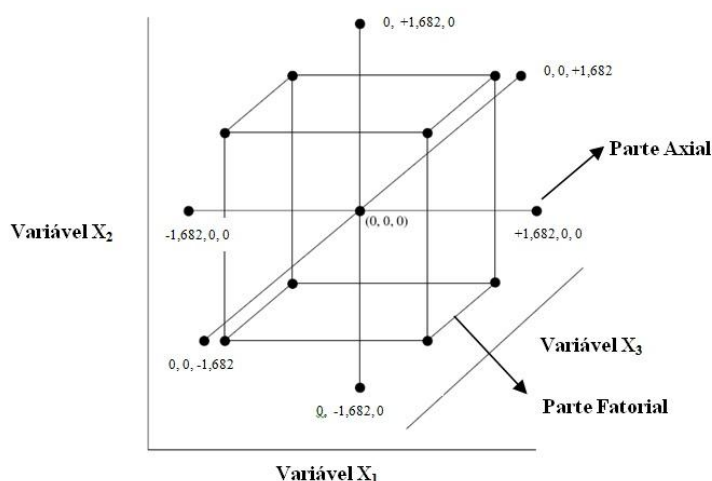
$$N^{\circ} \text{ de Exp.} = 2^k + 2 \cdot k + C_p \quad \text{Equação 17}$$

Onde k é o número de variáveis e C_p é o número de replicatas do ponto central. A porção 2^k consiste na parte fatorial do planejamento, enquanto que $2k$ se refere à parte axial.

A Figura 8 apresenta a distribuição geométrica cúbica dos pontos experimentais de um modelo de planejamento experimental de RSM para três variáveis, apresentando as partes fatorial e axial. A parte axial é representada por α e para três variáveis, por exemplo, assume o valor de 1,683, que é calculado a partir da Equação 18 (MONTGOMERY, 2001).

$$\alpha = 2^{(k-p)/4} \quad \text{Equação 18}$$

Figura 8 - Distribuição geométrica cúbica dos pontos experimentais do modelo de planejamento experimental por Metodologia de Superfície de Resposta para três variáveis.



Na maior parte dos estudos por RSM, a forma do relacionamento entre a variável resposta e os fatores é desconhecida. A qualidade das estimativas depende do método de estimativa utilizado e da utilização de planos adequados para a coleta de dados. Esses planos são denominados delineamento para superfície de resposta. Dentre os mais “econômicos”, destacam-se os Delineamentos Compostos Centrais (DCC) (MENDONÇA, 2012).

É importante que um delineamento tenha estabilidade de distribuição da variância dos valores preditos da resposta. Assim, um conceito de rotacionalidade é considerado como critério para a escolha de α ; o DCC será rotacional quando as variâncias das predições da resposta dependerem apenas da distância em relação ao ponto central. Portanto, um DCC será chamado rotacional (DCCR) quando (MENDONÇA, 2012):

$$\pm\alpha = \pm\sqrt[4]{2^k}$$

Equação 19

Onde k é o número de variáveis.

A principal vantagem do DCC, quando comparado ao fatorial completo, é o menor número de combinações entre os níveis e as variáveis, assumindo assim, uma propriedade importante, a rentabilidade do delineamento, que está associada ao menor custo e à maior qualidade no ajuste da superfície de resposta (MENDONÇA, 2012).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

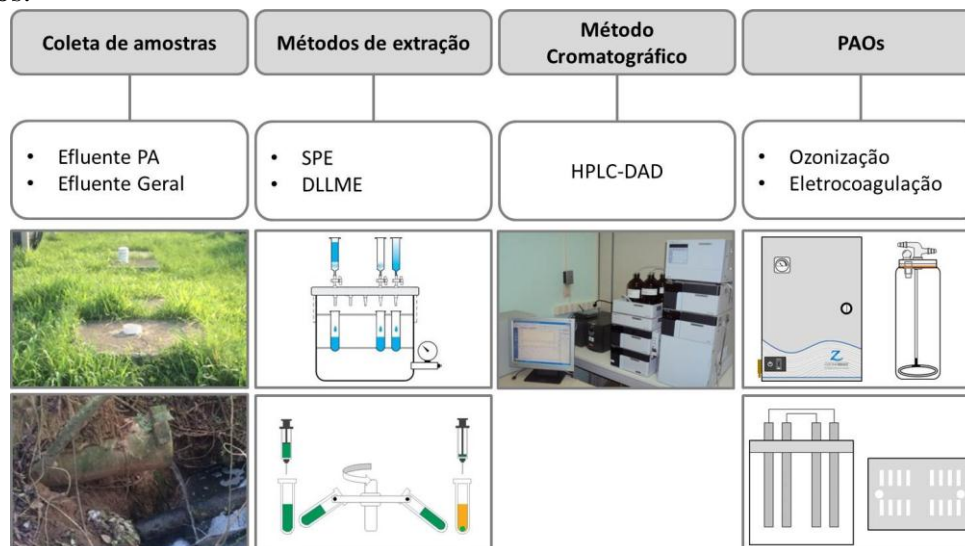
Foram utilizados reagentes, no mínimo, com grau analítico, e, as soluções injetadas no cromatógrafo líquido, foram preparadas com água ultra pura (18 MΩ cm), de um aparelho Direct-Q 3 Ultrapure Water Systems (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). Todos os solventes utilizados nas análises cromatográficas foram de grau HPLC.

Os padrões de trabalho de ATO e SIN foram preparados com a matéria-prima adquirida em uma farmácia de manipulação local com pureza de 99% e 101%, respectivamente (certificados de análise de controle de qualidade no Apêndice A). As soluções de trabalho das estatinas foram preparadas em uma concentração de 500 mg L⁻¹ pela diluição da matéria-prima em metanol grau HPLC (J.T. Baker, Xalostoc, México).

3.2. FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL

A Figura 9 apresenta o fluxograma de trabalho, em que são demonstradas todas as etapas de análise, tais como, coletas de amostra de efluente hospitalar, desenvolvimento de método para quantificação de estatinas por HPLC-DAD, métodos de extração das amostras e aplicação de PAOs.

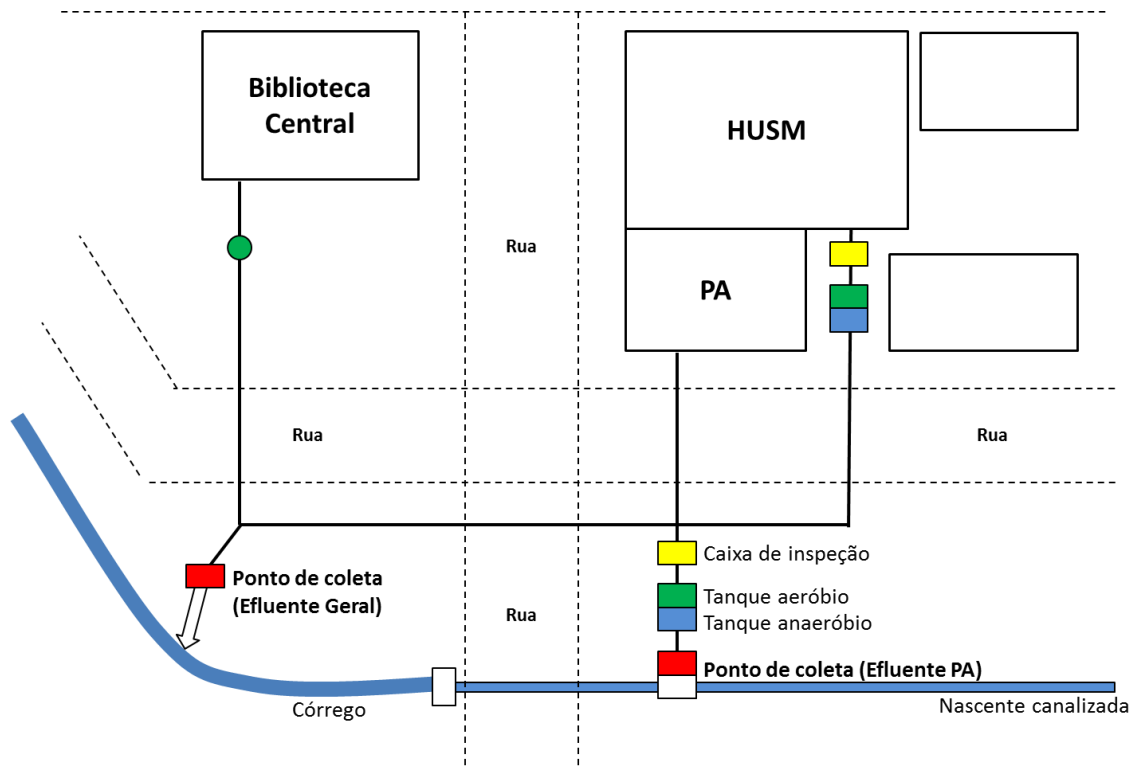
Figura 9 - Fluxograma experimental das etapas dos procedimentos analíticos e oxidativos avançados.



3.3. AMOSTRAGEM

Esta pesquisa foi efetuada na cidade de Santa Maria, localizada na região central do Rio Grande do Sul, no Campus da UFSM. As amostras foram coletadas em dois pontos distintos, no final do Sistema de Tratamento de Efluentes do HUSM. Os pontos de amostragem são mostrados na Figura 10, denominados como Efluente PA (PA) e Efluente Geral (EG).

Figura 10 - Representação esquemática do sistema de esgotos e sistema de tratamento de efluentes do HUSM.



Fonte: WILDE, 2011; SILVA, 2012; BRENNER, 2013.

A coleta do efluente tratado no ponto PA foi feita na caixa de inspeção localizada após os filtros de tratamento; já do ponto EG, a coleta foi feita na saída da canalização. O procedimento de coleta adotado foi o de amostragem composta.

As coletas foram feitas durante 7 dias consecutivos (17 a 23 de agosto de 2015), das 8 h às 18 h (após esse horário, devido ao acesso restrito, não foram feitas coletas), de hora em hora. Nos horários determinados coletou-se 1 L de efluente em cada ponto. As amostras foram imediatamente filtradas em filtro qualitativo de celulose, 26 μ m, e, ao fim do dia, foram

homogeneizadas e acondicionadas em frascos de polietileno e mantidas sob refrigeração (4-8 °C).

Como medida de segurança e de higiene ocupacional, todos os pesquisadores envolvidos foram imunizados contra tétano e hepatite A e B. Durante as coletas foram utilizados Equipamentos de Proteção Individual, permanentemente.

3.4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EFLUENTE HOSPITALAR

A análise dos parâmetros físico-químicos do efluente hospitalar do HUSM foi efetuada de acordo com a metodologia descrita no Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012).

Os parâmetros físico-químicos avaliados foram os seguintes: DBO₅, DQO, A_{UV}, nitrogênio amoniacal, nitrogênio total, alcalinidade, cloreto, fosfato, nitrato, sulfato, potássio, sódio, sólidos suspensos, sólidos totais, pH e temperatura média.

As análises foram feitas a partir de amostras diferentes, coletadas nos pontos de amostragem (citados no item 3.3), por diversos analistas do LATER, em diferentes períodos de tempo e, também, no Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA) do Departamento de Química da UFSM.

3.5. MÉTODO CROMATOGRÁFICO

O sistema de cromatografia líquida utilizado para a determinação das estatinas foi um equipamento Shimadzu Prominence (Kyoto, Japão) constituído por bomba quaternária (LC-20AT), degaseificador (DGU-20A₅), amostrador automático (SIL-20A), detector de arranjo de diodos (SPD-M20A), módulo comunicador (CBM-20A) e Software LC Solution (Sinc do Brasil, São Paulo, Brasil).

Para a separação cromatográfica utilizou-se coluna de fase reversa C18 Phenomenex Luna (150 x 4,6 mm x 5 µm) e pré-coluna Phenomenex C18 (4 x 3,0 mm). Na Tabela 5 estão apresentadas as condições cromatográficas para a determinação de estatinas.

Tabela 5 - Condições cromatográficas utilizadas na separação de estatinas.

Condições cromatográficas	
Coluna	Phenomenex Luna C18 (150 x 4,6 mm x 5 µm)
Pré-coluna	Phenomenex C18 (4 x 3,0 mm)
Fase móvel	Fase orgânica: MeCN; Fase aquosa: Tampão acetato de amônio 0,02 mol L ⁻¹ pH 3,5* ; 75:25 (v/v)
Vazão da fase móvel	0,7 mL min ⁻¹
Temperatura	30°C
Eluição	Modo isocrático
Comprimento de onda	254 nm (ATO); 238 nm (SIN)
Volume de injeção	20 µL
Tempo de retenção (min)	3,2 (ATO) e 8,9 (SIN)
Corrida cromatográfica	10 minutos

*Acidificado com ácido acético glacial.

A validação do método cromatográfico foi efetuada segundo normas da ANVISA (2003), do INMETRO (2011) e do MAPA (2011).

3.6. ESTABILIDADE DOS PADRÕES ANALÍTICOS

A estabilidade dos analitos foi verificada adotando-se dois procedimentos: avaliação das soluções estoque e avaliação das soluções de trabalho.

Para a verificação da estabilidade das soluções estoque, o procedimento de verificação deu-se da seguinte maneira: imediatamente ao preparo da solução, diluída em metanol, na concentração de 500 mg L⁻¹, as amostras foram injetadas no cromatógrafo para obtenção da intensidade e da área dos picos cromatográficos. Em período de tempo determinado, geralmente, semanalmente, efetuou-se a comparação destes cromatogramas com o obtido inicialmente.

Para o teste de estabilidade das soluções estoque, as amostras foram avaliadas somente na condição de armazenamento: refrigeração, a 4-8 °C, em frasco de vidro âmbar.

A estabilidade dos analitos nas soluções de trabalho foi verificada em soluções preparadas a partir das soluções estoque, diluídas em acetonitrila (constituente em maior proporção da fase móvel), na concentração de 5 mg L⁻¹.

Para este teste, as amostras foram armazenadas em diferentes condições: temperatura ambiente, com e sem a incidência de luz, e refrigeração, a 4-8 °C, com e sem a incidência de luz, no período de um mês.

3.7. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Foram investigados dois métodos de extração de estatinas em efluente hospitalar: extração em fase sólida (SPE), adaptado da literatura (Martín *et al.*, 2011), e microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME), desenvolvido inteiramente novo.

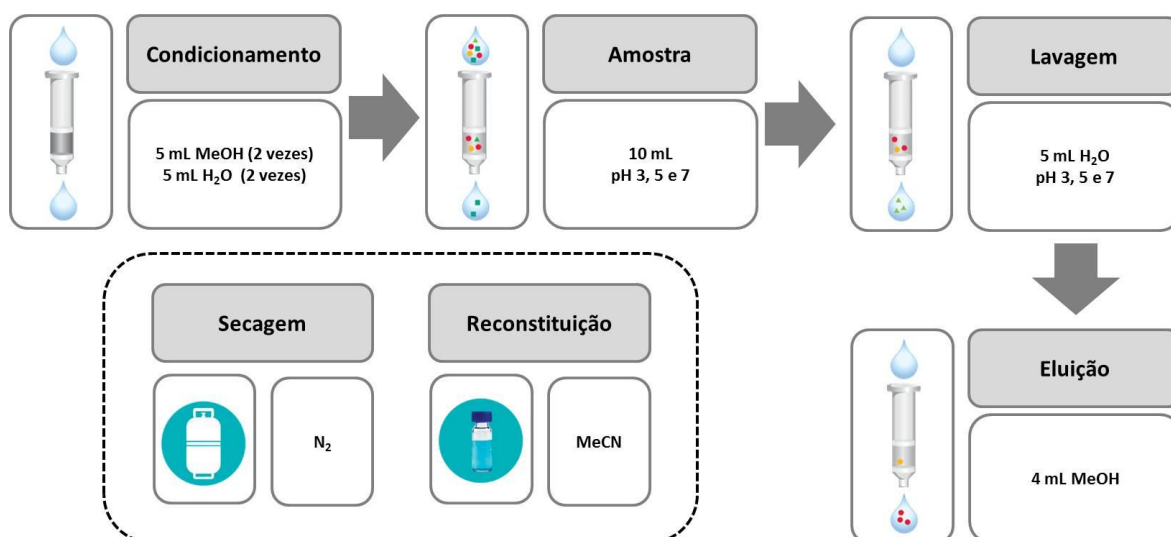
3.7.1. Extração em Fase Sólida (SPE)

A otimização do procedimento de SPE foi feita de maneira univariada, a partir de testes de escolha do melhor sorvente. Diferentes sorventes foram testados: Chromabond C18ec (500 mg/6 mL) (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), Strata C18-E (500 mg/6 mL) (Phenomenex, Torrence, EUA) e Strata X-CW (200 mg/3 mL) (Phenomenex, Torrence, EUA).

Variáveis como pH da amostra e pH da água de lavagem foram consideradas. A otimização foi feita utilizando solução aquosa e efluente hospitalar.

Os experimentos foram conduzidos, inicialmente, com 10 mL de amostra, sem pré-concentração; a concentração final para a leitura no HPLC-DAD foi avaliada em 3 níveis distintos, escolhidos para verificar possíveis perdas na etapa de lavagem e adsorção dos analitos. Os níveis de concentração foram escolhidos dentro da faixa linear da curva analítica: para ATO 45, 360 e 900 $\mu\text{g L}^{-1}$ e, para SIN 75, 600 e 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$. O procedimento geral de SPE está descrito no fluxograma representado pela Figura 11.

Figura 11 - Fluxograma experimental do procedimento de SPE para a determinação de estatinas.



Para o procedimento de SPE, foi utilizado um sistema manifold a vácuo Varian, (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA) e bomba de vácuo modelo SRA-5CFM Surya, (Arsystem, Caxias do Sul, Brasil). A passagem da amostra pelos sorventes, nesta etapa de otimização, foi na ordem de 2 mL min^{-1} .

Com a finalidade de aproximar as concentrações dos analitos ao LQ do método cromatográfico e chegar à quantificação dos compostos no efluente hospitalar, uma pré-concentração de 100 vezes foi definida.

A validação do método de SPE foi efetuada em solução aquosa e em efluente hospitalar. A precisão do método foi avaliada intra e inter-dias, utilizando três níveis de concentração dos analitos, dentro da faixa linear do método (ATO 45, 360 e $900 \mu\text{g L}^{-1}$ e, para SIN 75, 600 e $1500 \mu\text{g L}^{-1}$), durante três dias. Todos os procedimentos foram efetuados em triplicata.

3.7.2. Extração Dispersiva Líquido-Líquido (DLLME)

A otimização do procedimento da DLLME foi iniciado a partir da escolha da mistura mais adequada de solventes extrator e dispersor para a extração das estatinas; a Tabela 6 apresenta as misturas de solventes testadas.

Tabela 6 - Combinações de solventes extrator e dispersor empregados na DLLME de estatinas.

Combinação	Dispersor	Extrator
1	Acetona	Tetracloroeto de carbono
2	Acetona	Clorofórmio
3	Acetona	Clorobenzeno
4	Acetonitrila	Tetracloroeto de carbono
5	Acetonitrila	Clorofórmio
6	Acetonitrila	Clorobenzeno
7	Metanol	Tetracloroeto de carbono
8	Metanol	Clorofórmio
9	Metanol	Clorobenzeno

Para a escolha da melhor combinação de solventes partiu-se da metodologia de DLLME descrita em Martín *et al.*, 2011; assim, fixou-se uma proporção inicial de mistura

10:1 (v/v), de solvente dispersor e extrator, respectivamente; e variou-se o pH da amostra entre 3, 5 e 7.

O volume de amostra utilizado foi de 5 mL e, da mistura de solventes, 0,5 mL. Nesta etapa também foram feitos testes com uso de ultrassom para promover a interação da mistura de solventes com a amostra.

Para a otimização da DLLME de estatinas, foram avaliadas estratégias de delineamento experimental visando maior recuperação dos analitos, baseado em valores ótimos de variáveis distintas independentes do processo. As variáveis analisadas foram: pH, força iônica, volume de solvente extrator e volume de solvente dispersor. Utilizou-se um planejamento completo – delineamento composto central rotacional (DCCR) – para as quatro variáveis independentes analisadas, com 16 combinações possíveis para os 2 níveis estudados (2^4), acrescidas de 8 ensaios axiais e de 2 repetições no ponto central, totalizando 26 experimentos. Os níveis de significância utilizados nos ensaios de planejamento estão apresentados na Tabela 7. Os resultados foram avaliados no *software* Statistica 8.0 (StatSoft. Inc., Tulsa, EUA).

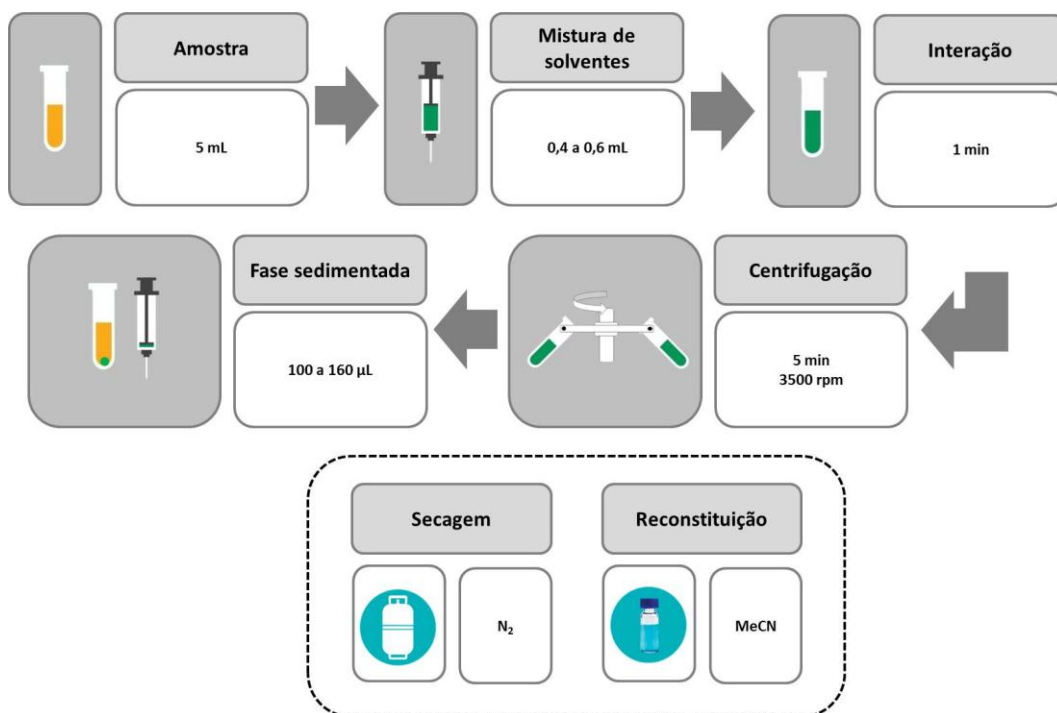
Tabela 7 – Variáveis e níveis de significância utilizados no DCCR para a DLLME.

Variáveis	Níveis				
	-2	-1	0	1	2
pH	3	4	5	6	7
Concentração de NaCl (mol L⁻¹)	0	0,1	0,2	0,3	0,4
Volume de solvente extrator (µL)	20	60	100	140	180
Volume de solvente dispersor (µL)	300	350	400	450	500

O volume de amostra utilizado foi de 5 mL. O tempo de interação da mistura foi fixado em 1 minuto e, de centrifugação, 5 minutos. Para o procedimento foi utilizada centrífuga 80-2B-15ML (Centribio Co. LTDA, China).

O procedimento geral está demonstrado no fluxograma experimental da Figura 12.

Figura 12 - Fluxograma experimental do procedimento de DLLME para estatinas.



A validação do método de DLLME foi efetuada em solução aquosa e em efluente hospitalar. A precisão do método foi avaliada intra e inter-dias, utilizando-se três níveis de concentração dos analitos, dentro da faixa linear do método (ATO 45, 360 e 900 $\mu\text{g L}^{-1}$ e, para SIN 75, 600 e 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$), durante três dias, com pré-concentração de 100 vezes. Os procedimentos foram efetuados utilizando seis replicatas.

3.8. AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE RISCO AMBIENTAL

O risco potencial representado por cada composto foi avaliado segundo EMEA, 2006 e TGD, 2003, utilizando-se os seguintes parâmetros de avaliação:

- $\log K_{ow}$ dos analitos;
- Quociente de risco (QR), através da razão PEC/PNEC e,
- QR, através da razão MEC/PNEC.

3.9. PROCESSOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO

Foram investigados dois processos para a degradação e remoção de estatinas: ozonização e eletrocoagulação. Esses processos foram avaliados, respectivamente, pela eficiência de degradação e de remoção das estatinas, ATO e SIN, em solução aquosa e em efluente hospitalar.

3.9.1. Ozonização

Os experimentos de ozonização foram conduzidos em reator de microdispersão de bolhas desenvolvido especialmente para este trabalho; o esquema do reator pode ser visto na Figura 13 e as especificações estão relatadas na Tabela 8.

O gerador de ozônio utilizado é da marca Ozonebras (São José dos Campos, Brasil), com tecnologia de efeito corona, utilizando ar seco. A produção média é de cerca $1,5 \text{ g h}^{-1}$ de O_3 (com alimentação de ar seco).

Figura 13 – Reator de dispersão de bolhas utilizado na Ozonização: (1) Imagem do reator desenvolvido para o processo; (2) Imagem da parte interna: tubo de distribuição da corrente de ar ozonizado e (3) Esquema do sistema de ozonização: (a) entrada de O_3 ; (b) saída de O_3 residual; (c) orifício para coleta de amostra; (d) tubo de vidro; (e) mangueira anular, multiperfurada para dispersão de microbolhas de ar ozonizado.

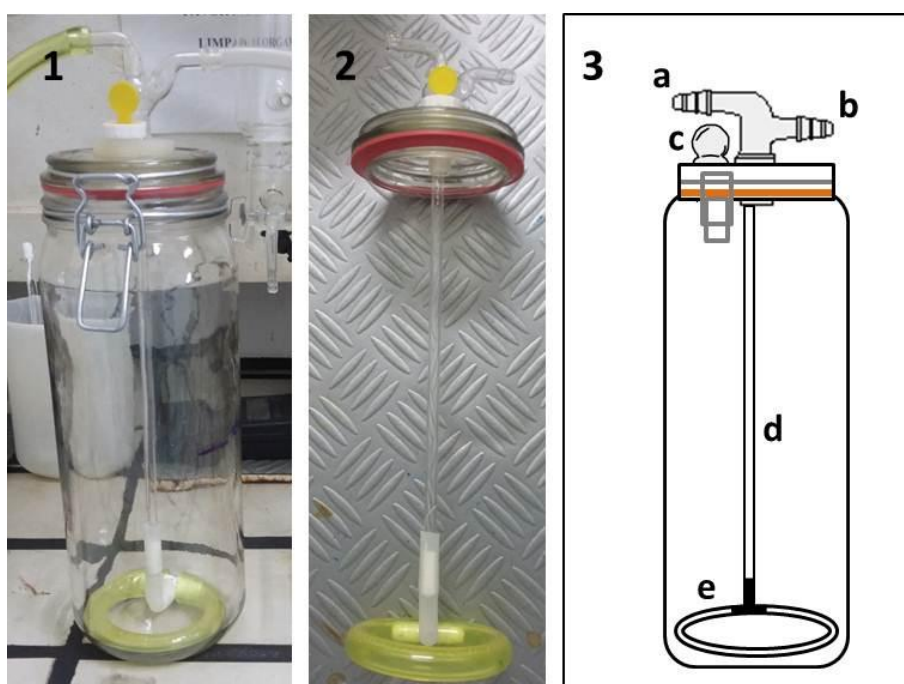


Tabela 8 - Especificações do reator de ozonização.

Característica	Especificação
Dimensões internas	27 x 9 cm
Capacidade	2000 mL
Material	Vidro
Dimensões da mangueira de dispersão de O ₃	20 cm (comp); ϕ 1 cm
Quantidade de furos da mangueira de dispersão de O ₃	150 furos/comprimento
Vazão de O ₃ (ar ozonizado)	2,1 L min ⁻¹

A otimização do procedimento de ozonização iniciou-se a partir da determinação da geração de O₃. Para tal, utilizou-se o método volumétrico de iodometria: neste procedimento utilizou-se 1 L de solução de iodeto de potássio 2% (*m/v*), que foi submetida à ozonização durante 60 min. Desta solução, recolheu-se 3 alíquotas de 20 mL e titulou-se com tiosulfato de sódio. A produção de O₃ foi calculada através da Equação 20.

$$mg\ min^{-1} = \frac{V_{Na_2C_2O_3} \times []_{Na_2C_2O_3} \times 24}{t} \quad \text{Equação 20}$$

Onde $V_{Na_2C_2O_3}$ é o volume de Na₂C₂O₃; $[]_{Na_2C_2O_3}$ é a concentração de Na₂C₂O₃ em normalidade; t é o tempo de reação, em min.

Para a avaliação do decaimento da concentração dos analitos foi efetuada a otimização do procedimento a partir da variação do pH da solução submetida a ozonização. Os valores de pH de avaliação foram 5, 7 e 9. A otimização do procedimento foi efetuada em solução aquosa e em efluente hospitalar.

No decorrer de 60 min de ozonização, foram coletadas alíquotas de 100 μ L da seguinte maneira: até 5 min de reação - a cada 30 seg; de 5 a 30 min - a cada 5 min e, finalmente, de 30 a 60 min - a cada 15 min; totalizando 18 amostra. Antes da injeção no HPLC-DAD, as amostras foram diluídas em acetonitrila, na concentração de 1 mg L⁻¹.

Para a injeção, as amostras de efluente hospitalar submetidas a ozonização foram filtradas em filtro qualitativo (45 μ m) antes da ozonização e, posteriormente, em filtro de seringa de membrana de 0,45 μ m, PTFE Chromafil[®] (Macherey-Nagel GmbH&Co. KG, Düren, Germany).

No espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu, Kyoto, Japão) obteve-se o espectro de absorção para ATO e SIN em solução aquosa para verificação da degradação dos analitos em 60 min de ozonização. A avaliação da eficiência do tratamento foi feita a partir da degradação

das estatinas em solução aquosa e em efluente hospitalar por HPLC-DAD como descrito no item 3.2.

3.9.2. Eletrocoagulação (EC)

Para o processo de eletrocoagulação empregou-se o sistema eletroquímico ilustrado na Figura 14, constituído por reator de vidro provido de quatro eletrodos de alumínio, que podem ser dispostos em diferentes distâncias com auxílio das fendas na tampa do reator. As especificações técnicas e características do sistema de EC estão apresentadas na Tabela 9.

O sistema é composto de fonte redutora de tensão (Leitz, Germany) multímetro digital ET-1110A (Minipa, São Paulo, Brasil) e reostato (Phywe, Göttingen, Germany). A agitação da solução foi feita com o auxílio de um agitador magnético C-MAG HS 7 (Ika, Campinas, Brasil) com barra de agitação de 2,5 cm de comprimento.

Figura 14 – Sistema eletroquímico de Eletrocoagulação: (a) reator; (b) fonte redutora de tensão; (c) multímetro digital; (d) reostato; (e) agitador magnético. Diagrama representativo do reator: (A) Vista frontal: (a) eletrodos e (B) Vista superior: (a) orifícios para fixação de eletrodos em posições variáveis e (b) orifício para coleta de amostras.

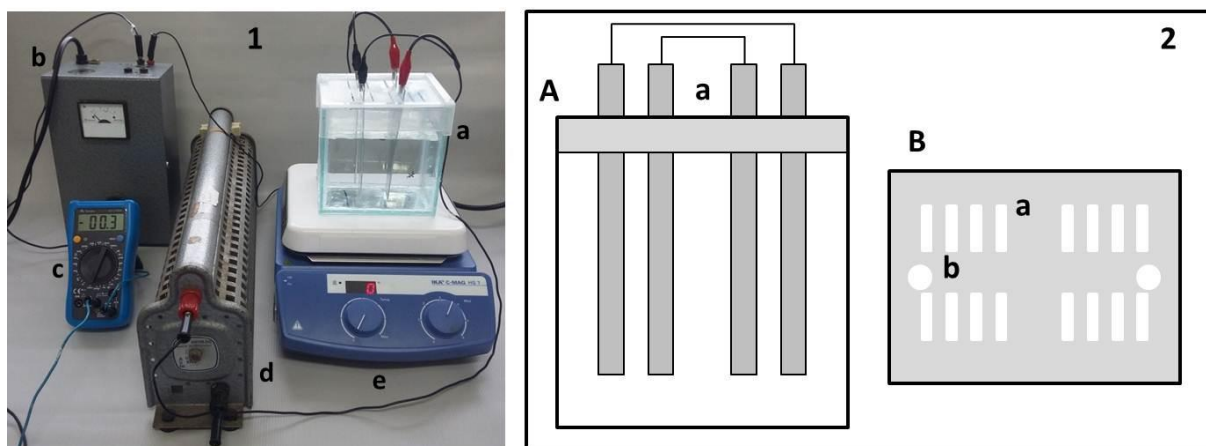


Tabela 9 – Especificações do sistema de eletrocoagulação.

Característica	Especificação
Reator	
Dimensões	12,5 x 10,5 x 12 cm
Capacidade	1000 mL
Material	Vidro
Fonte redutora de tensão	8 A
Reostato	0,6 A; $\Omega = 1000$ ohm
Eletrodos	
Dimensões	3 x 11 cm
Material	Alumínio
Corrente elétrica	0,30 A
Densidade de corrente	45,4 A m ⁻²

Para a otimização da eletrocoagulação de estatinas foram avaliadas estratégias de delineamento experimental visando condições ótimas de degradação dos analitos, baseadas em distintas variáveis independentes do processo. As variáveis analisadas foram: pH, concentração de eletrólito e posição dos eletrodos. Utilizou-se planejamento completo – delineamento composto central (DCC) – para as três variáveis independentes analisadas, com 8 combinações possíveis para os 2 níveis estudados (2^3), acrescidas de 6 ensaios axiais e de 2 repetições no ponto central, totalizando 16 experimentos. Os níveis de significância utilizados nos ensaios de planejamento estão apresentados na Tabela 10. Os resultados foram avaliados no *software* Statistica 8.0 (StatSoft. Inc., Tulsa, EUA).

Tabela 10 - Valores utilizados no delineamento composto central para a eletrocoagulação.

Variáveis	Níveis de significância				
	-2	-1	0	1	2
pH	3	5	7	9	11
Concentração de NaCl (mol L⁻¹)	0	0,1	0,2	0,3	0,4
Distância entre eletrodos (cm)	2	4	6	8	10

O DCC foi aplicado para os experimentos em solução aquosa e em efluente hospitalar fortificado, na concentração de 1 mg L⁻¹. As alíquotas, de 1 mL, foram coletadas nos seguintes tempos de reação: zero, 1 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min, 30 min, 45 min e 60 min; totalizando 10 amostras para cada experimento.

As amostras de efluente hospitalar foram filtradas em filtro qualitativo (45 μ m), antes da eletrocoagulação. Todas as amostras (solução aquosa e efluente hospitalar) foram filtradas

em filtro de seringa de membrana de 0,45 μm , PTFE Chromafil[®] (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany), antes da injeção, no HPLC-DAD.

A avaliação da eficiência do tratamento foi feita a partir da remoção das estatinas presentes no efluente hospitalar, medindo-se as concentrações residuais por HPLC-DAD, como descrito no item 3.2.

3.10. GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS

Os resíduos de estatinas gerados neste trabalho foram segregados e, da mesma maneira que todos os resíduos gerados no LATER, armazenados em frascos apropriados, de acordo com sua classe e reatividade.

Semanalmente, quando não recuperáveis, os resíduos gerados são encaminhados ao Almoxarifado de Química, para o Programa de Gerenciamento de Resíduos Químicos do Departamento de Química da UFSM, que dá a destinação final, através de empresa especializada e credenciada para tal atividade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EFLUENTE HOSPITALAR

O efluente hospitalar apresenta alguns parâmetros físico-químicos fora dos limites permissíveis estabelecidos pelos órgãos reguladores (Resolução nº 430 do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA, 2011 e Resolução nº 128 do Conselho Estadual do Meio Ambiente – CONSEMA, 2006) e pode ser considerado um efluente complexo. As características físico-químicas do efluente do HUSM podem ser vistas na Tabela 11.

Tabela 11 - Parâmetros físico-químicos médios do efluente do HUSM.

Parâmetro	Limites (CONAMA)	Limites (CONSEMA)	Efluente
DBO ₅ (mg L ⁻¹)*	≤ 120	≤ 120	303,7
DQO (mg L ⁻¹)	-	≤ 330	200-612
A _{UV 254} *	-	-	1,254
Nitrogênio amoniacal (mg L ⁻¹)*	20	20	52,0
Nitrogênio total (mg L ⁻¹)*	10	20	59,1
Alcalinidade (mg L ⁻¹ HCO ₃ ⁻)	-	-	149,0
Cloreto (mg L ⁻¹)	-	-	27,9
Fosfato (mg L ⁻¹)	1	-	3,1
Nitrato (mg L ⁻¹)	<10	-	0,3
Sulfato (mg L ⁻¹)	-	-	8,5
Potássio (mg L ⁻¹)	-	-	8,1± 0,2
Sódio (mg L ⁻¹)	-	-	27,2 ± 1,1
Sólidos suspensos (mg L ⁻¹)	≤ 150	≤ 140	16,0
Sólidos totais (mg L ⁻¹)	-	-	248,7
Ph	5-9	6-9	7,7
Temperatura média (°C)	< 40	< 40	23,0

Fonte: WILDE *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012. *Dados de trabalhos anteriores do grupo de pesquisa.

Com base em análise da Tabela 11, constata de imediato alguns problemas com o efluente tratado do HUSM. Mesmo após tratamento, apresenta ainda alta carga orgânica, variável, expressa pelos valores de DBO (303,7 mg L⁻¹), de DQO (200 – 612 mg L⁻¹) e de sólidos totais (248,7 mg L⁻¹); e, ainda, com outros parâmetros menos importantes acima dos limites estabelecidos pelos órgãos reguladores.

Outros indicadores do efluente do HUSM foram relatados, em trabalhos anteriores, com concentrações acima dos limites determinados pelos órgãos reguladores: nitrogênio total

(59,1 mg L⁻¹) e nitrogênio amoniacal (52,0 mg L⁻¹). A concentração de nitrogênio amoniacal está diretamente ligada aos indicadores de matéria orgânica; altos valores indicam alto teor de matéria orgânica no efluente.

Verlicchi *et al.* (2015) publicaram revisão de literatura em que dão uma visão geral sobre efluentes hospitalares em todo o mundo, nos últimos vinte anos; descrevem as principais características físico-químicas encontradas nas mais diversas publicações. Valores de nitrogênio total entre 60 e 98 mg L⁻¹, e nitrogênio amoniacal, entre 10 e 68 mg L⁻¹, são relatados.

Segundo Baur (2012), a determinação da forma predominante de nitrogênio pode fornecer indicações acerca do grau de poluição gerada pelo lançamento de efluente em um curso de água. Se a poluição é recente, o nitrogênio estará basicamente na forma de nitrogênio orgânico ou amoniacal; se antiga, na forma de nitrato - desde que se leve em conta a ocorrência de quantidade suficiente de oxigênio dissolvido para permitir a nitrificação.

4.2. MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Iniciou-se o desenvolvimento do método cromatográfico por HPLC-DAD, descrito no item 3.5, a partir de consulta à literatura, voltada à determinação de estatinas em amostras ambientais. Porém, são escassas as publicações referentes às estatinas e, as poucas referências encontradas, utilizam LC-MS/MS para a quantificação. Assim, foram necessários muitos testes preliminares na fase de desenvolvimento da metodologia analítica.

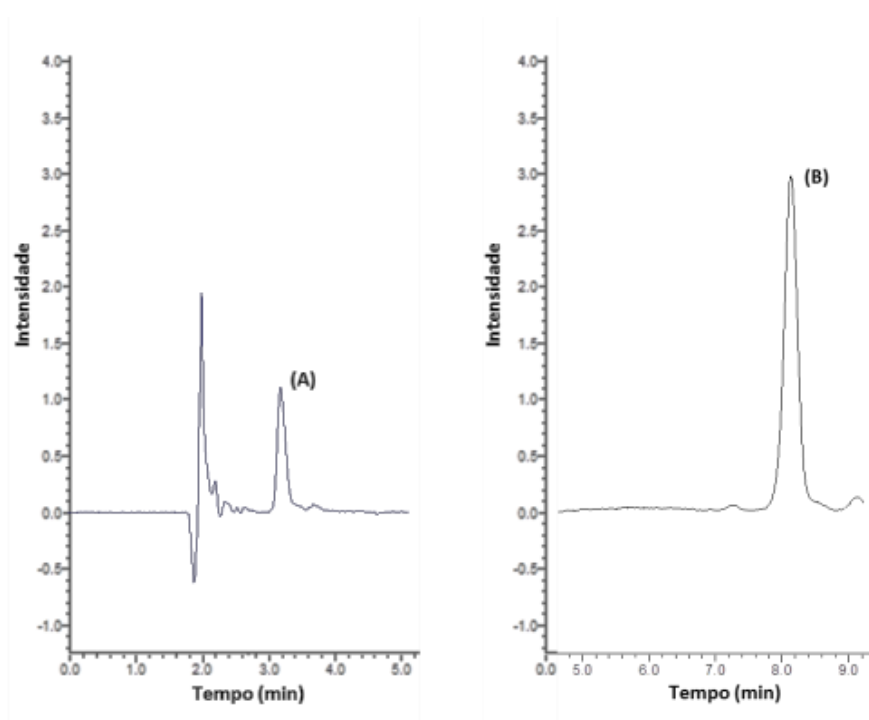
Como principal orientação foi utilizado o método desenvolvido por Nunes, 2010, para a determinação do teor de ATO em insumo farmacêutico ativo, para comprimidos. Contudo, foram necessárias várias adaptações para chegar-se a um método aplicável à determinação de estatinas em efluente hospitalar.

A separação cromatográfica escolhida deu-se em modo isocrático, utilizando-se a mistura de acetonitrila e tampão acetato de amônio como fase móvel, conforme descrito na Tabela 5. Antes da primeira injeção, a coluna cromatográfica foi equilibrada com fase móvel durante 10 min. As condições cromatográficas foram ajustadas levando-se em conta a complexidade da matriz (efluente hospitalar), visando corrida cromatográfica com menos interferentes e melhor resolução de picos de analitos.

O melhor comprimento de onda para cada analito foi determinado através de avaliação

de cromatogramas de 200 a 300 nm, em que foram considerados para escolha, a intensidade do pico cromatográfico e menor quantidade de interferentes. Para ATO, o comprimento de onda que se mostrou mais adequado foi de 254 nm e, para SIN, 238 nm. A ATO apresentou tempo de retenção (t_R) de 3,2 min e a SIN, 8,9 min. O cromatograma HPLC-DAD obtido para estatinas em efluente hospitalar está apresentado na Figura 15.

Figura 15 - Montagem de cromatogramas HPLC-DAD para estatinas: (A) ATO ($360 \mu\text{g L}^{-1}$) – t_R 3,2 min; 254 nm; (B) SIN ($600 \mu\text{g L}^{-1}$) – t_R 8,9 min; 238 nm.



4.2.1. Validação do método cromatográfico

Para garantir o desempenho do método analítico desenvolvido e fornecer informações confiáveis, foram estabelecidos a faixa linear de trabalho da curva de calibração e os limites de detecção e de quantificação para cada analito estudado, em solvente (acetonitrila) e em efluente hospitalar.

A confecção da curva de calibração para validação do método cromatográfico foi feita através de adição de padrão em sete níveis de concentração (Tabela 28 e Tabela 29 – Apêndice B). A precisão do método cromatográfico foi avaliada intra e inter-dias, durante três dias, utilizando-se seis replicatas.

Os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) foram obtidos através de cálculos da relação sinal ruído, como demonstrado nas Equações 21 e 22, em sextuplicata; os valores de LD foram de 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ATO e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ para SIN e LQ, 45 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ATO e 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ para SIN.

$$LD = C_s \cdot \frac{3}{S/N} \quad \text{Equação 21}$$

$$LQ = C_s \cdot \frac{10}{S/N} \quad \text{Equação 22}$$

Onde C_s é a concentração do analito injetada e S/N é a razão sinal ruído.

As figuras-de-mérito obtidas na validação do método cromatográfico estão apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12 – Figuras-de-mérito para determinação de estatinas por HPLC-DAD.

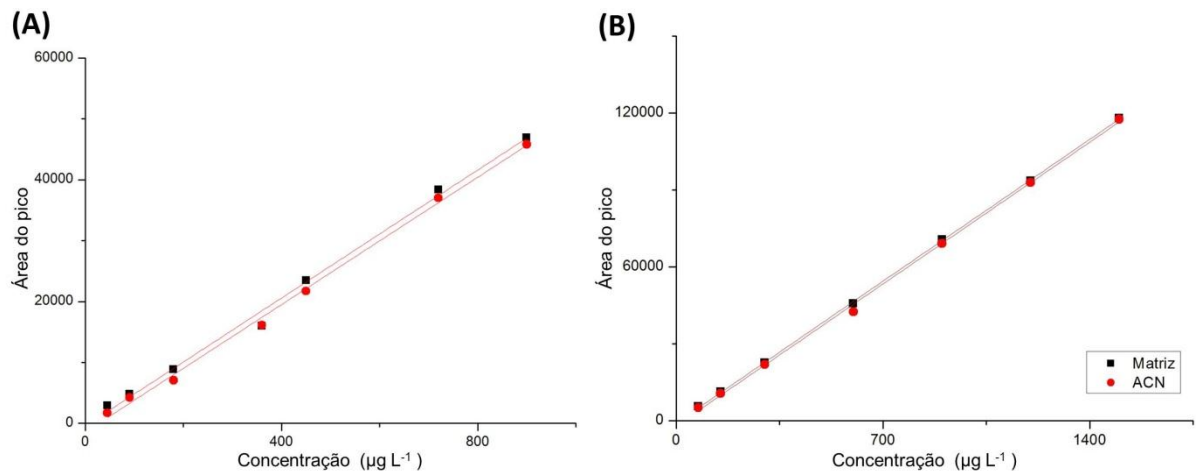
	Analito	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Acetonitrila	ATO	45 - 900	15	45
	SIN	75 - 1500	25	75
Efluente hospitalar	ATO	45 - 900	15	45
	SIN	75 - 1500	25	75

A linearidade do método foi determinada obtendo-se a equação de regressão linear, aplicação do teste de Grubbs (GRUBBS, 1969) para verificação de valores discrepantes e teste de Cochran (KANJI, 2006) para verificação de homocedastidade. As equações de regressão linear e os coeficientes de correlação (r^2) estão apresentados na Tabela 13; as curvas analíticas para ATO e SIN estão apresentadas na Figura 16.

Tabela 13 – Equações de regressão linear

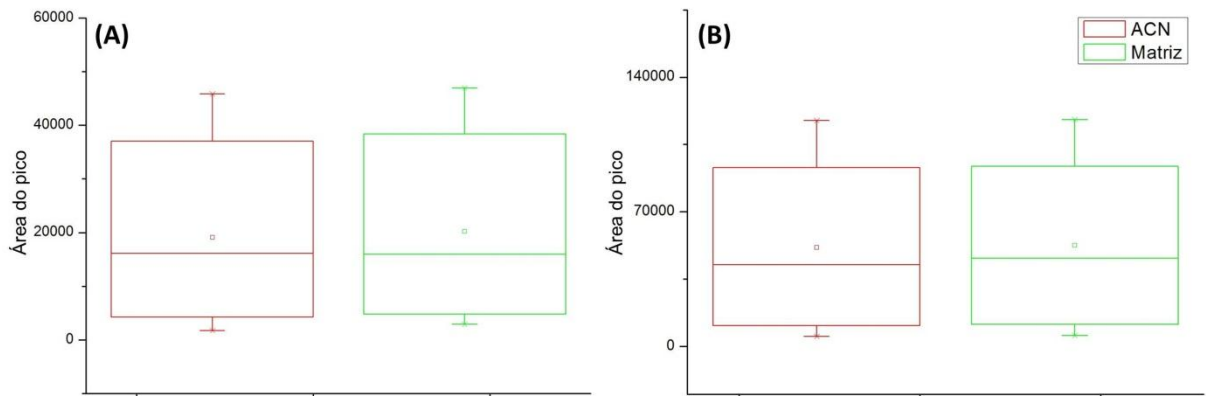
	Analito	Equação de regressão linear	Coefficiente de correlação (r^2)
Acetonitrila	ATO	$y = -1406,0 + 52,291x$	0,9986
	SIN	$y = -1883,0 + 78,940x$	0,9995
Efluente hospitalar	ATO	$y = -425,4 + 52,535x$	0,9975
	SIN	$y = -804,1 + 78,949x$	0,9999

Figura 16 – Curvas analíticas para (A) ATO e (B) SIN.



O teste de Grubbs demonstrou a inexistência de valores discrepantes para avaliação de cada nível de concentração, considerando como valor crítico 1,94 para 5% de significância (GRUBBS, 1969); a Figura 17 apresenta os gráficos Box & Whisker para a variância média determinada; que demonstra que não há a ocorrência de valores discrepantes.

Figura 17 – Gráficos Box & Whisker para verificação de valores discrepantes da curva analítica: (A) ATO e (B) SIN.



O teste de Cochran foi utilizado para avaliar a homocedasticidade dos níveis da curva de calibração, assim, é possível determinar se a variância apresenta-se constante. Para que o conjunto de dados atenda ao critério de homocedasticidade, efetuou-se o cálculo de C (denominado de $C_{calculado}$) com a utilização da Equação 23 e comparou-se com o valor de $C_{tabelado}$.

$$C = \frac{s_{max}^2}{\sum_{i=1}^k s_i^2} \quad \text{Equação 23}$$

Onde k é o número de níveis do fator e s_i^2 é a variância amostral.

Segundo Kanji (2006), o valor de $C_{tabelado}$ aplicado ao presente trabalho é de 0,397 ($k=7$ e $n=6$); os valores de $C_{calculado}$ para a curva analítica estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Valores de $C_{calculado}$ para a curva analítica das estatinas.

	ACN	Matriz
ATO	0,338	0,367
SIN	0,336	0,338

Como $C_{calculado} < C_{tabelado}$ em todos os casos, conclui-se que a variância é homogênea para os níveis da curva analítica, apresentando, portanto, homocedasticidade satisfatória.

A seletividade do método cromatográfico foi comprovada com a comparação das curvas analíticas preparadas em Acetonitrila e em efluente hospitalar (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**); segundo Ribani *et al.* (2004) deve-se comparar as duas curvas analíticas, e caso elas sejam paralelas, não há interferência da matriz na determinação da substância de interesse, sendo, assim, o método, seletivo.

4.3. ESTABILIDADE DOS PADRÕES ANALÍTICOS

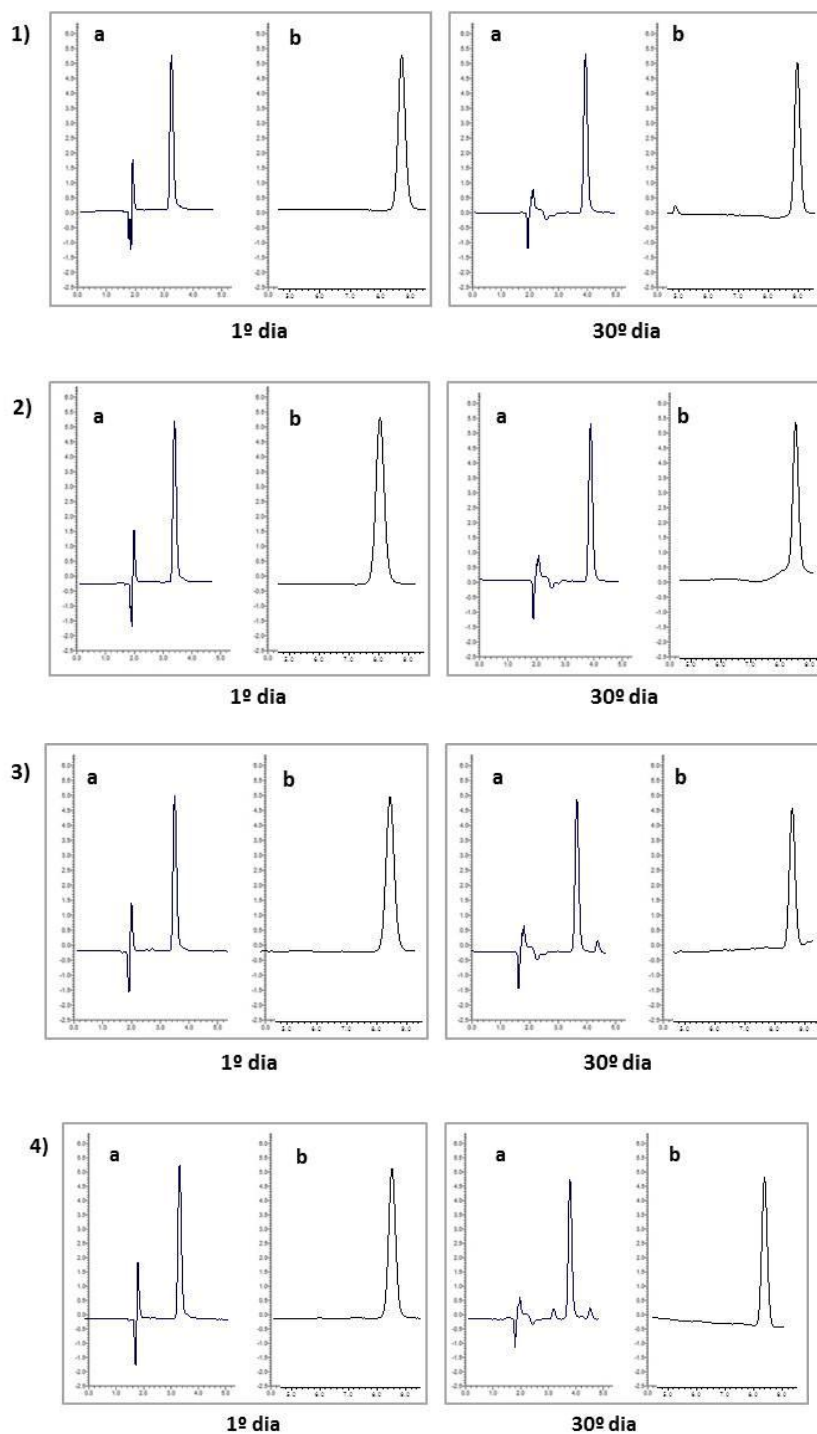
A verificação da estabilidade das soluções estoque foram feitas somente sob as condições normais de armazenamento (frasco âmbar sob refrigeração, 4-8 °C), em períodos de tempo determinado, geralmente, semanalmente, comparando-se o cromatograma obtido inicialmente com o do dia em questão. Caso a solução apresentasse diminuição detectável na intensidade dos picos cromatográficos, era descartada e uma nova solução estoque era preparada.

As soluções de trabalho foram submetidas às diferentes condições de armazenagem: temperatura ambiente, com e sem a incidência de luz, e refrigeração, a 4-8 °C, com e sem a incidência de luz, no período de um mês.

Como pode ser observado na Figura 18, não houve diminuição significativa na área dos picos das estatinas durante os dias de teste da estabilidade, demonstrando assim, que os analitos em questão são estáveis nas diferentes condições a que foram submetidos. Os

chromatograms of the remaining days of evaluation of the standard solutions, present similarity to those demonstrated in the figure below, for all conditions evaluated.

Figura 18 – Montagem de cromatogramas do teste de estabilidade de soluções-padrão de estatinas 5 mg L^{-1} , no primeiro e no trigésimo dia nas condições avaliadas: (1) 4°C ; (2) 4°C na ausência de luz; (3) temperatura ambiente na presença de luz e (4) temperatura ambiente na ausência de luz. Picos correspondentes (a) ATO; 254 nm ; (b) SIN; 238 nm .



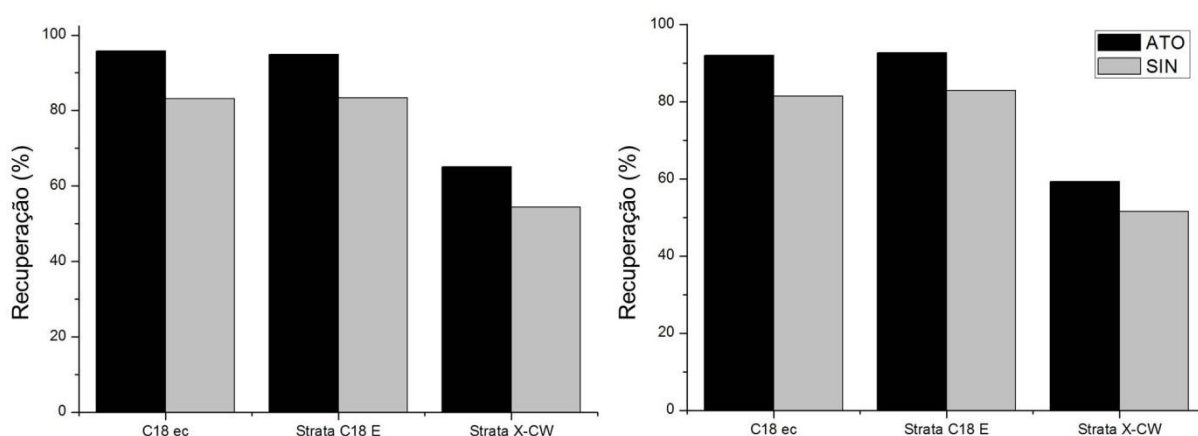
Segundo o MAPA (2011), uma solução é considerada estável quando for observada uma degradação máxima de até 2% em relação a uma referência recém-preparada e analisada. A estabilidade das soluções-padrão deve ser avaliada sempre avaliada, mais especialmente, sempre que não houver referência prévia para o seu prazo de validade. Assim, após análise dos cromatogramas referentes aos testes de estabilidade, é possível concluir que os analitos apresentaram estabilidade nas condições a que foram submetidas.

4.4. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

4.4.1. Extração em fase sólida

A otimização do procedimento da SPE deu-se inicialmente com a escolha do sorvente mais adequado para a extração das estatinas. Primeiramente, foram testados três diferentes sorventes, já citados no item 3.7.1. A Figura 19 apresenta os gráficos de barras para as recuperações obtidas com cada um dos sorventes testados em solução aquosa e em efluente hospitalar.

Figura 19 - Gráficos de barras para os sorventes testados em solução aquosa e em efluente hospitalar.



Dois sorventes apresentaram recuperações acima de 80%: Chromabond C18 ec e Strata C18-E. Optou-se pela utilização do Chromabond C18 ec devido ao preço mais baixo que o Strata C18-E. A Tabela 15 apresenta as recuperações obtidas para os três sorventes testados em solução aquosa e em efluente hospitalar.

Tabela 15 – Recuperações médias para cada sorvente de SPE testado.

Solução aquosa	Chromabond C18 ec		Strata C18 E		Strata X-CW	
	Rec (%) ^a	RSD%	Rec (%) ^a	RSD%	Rec (%) ^a	RSD%
ATO	95,8	0,9	94,9	2,1	65,1	0,5
SIN	83,2	1,8	83,4	4,2	54,4	1,1
Efluente hospitalar	Chromabond C18 ec		Strata C18 E		Strata X-CW	
	Rec (%) ^a	RSD%	Rec (%) ^a	RSD%	Rec (%) ^a	RSD%
ATO	92,0	0,4	92,7	3,5	59,3	3,3
SIN	81,5	1,7	82,9	2,0	51,6	1,0

^a n=3

Após escolha do sorvente mais adequado, a próxima etapa na otimização foi a de condicionamento. O condicionamento do sorvente foi conduzido com duas alíquotas de 5 mL de metanol, seguidas por duas alíquotas de 5 mL de água ultrapura, pH 7. Segundo Camel (2003), a etapa de condicionamento do sorvente é de extrema importância e tem a finalidade de remover interferentes potenciais e garantir somente a retenção dos analitos de interesse.

As amostras tiveram o pH ajustado para 7 porque, também segundo Camel (2003), este parâmetro deve ser cuidadosamente otimizado, pois, além de assegurar a retenção eficaz dos analitos, ainda tem fundamental importância para a pré-concentração.

Os sorventes apolares, como C18 ec, apresentam como mecanismo principal forças de van de Waals, porém, interações secundárias como ligações dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio também podem ocorrer (WILDE, 2011). Assim, os analitos devem estar, preponderantemente, não ionizados, facilitando a interação com sorventes apolares, como o C18 ec, que não possui grupos silanóis (Si-OH).

As estatinas são ácidos fracos; a ATO apresenta K_a igual a $3,16 \times 10^{-5}$ e a SIN apresenta K_a igual a $6,31 \times 10^{-14}$. Ácidos fracos são pouco ionizáveis em pH neutro, facilitando a interação com sorventes apolares, como no caso do C18 ec - o que leva às taxas de recuperação obtidas com o uso deste sorvente.

A lavagem do sorvente foi feita com 5 mL de água ultrapura com pH 7; esta etapa tem a finalidade de remover interferentes, porém, deve ser cuidadosamente otimizada para que somente os interferentes sejam removidos.

4.4.1.1. Validação do método de SPE

O método de SPE foi validado em solução aquosa e em efluente hospitalar, em três níveis de concentração (dentro da faixa linear do método), fortificados 100 vezes com concentrações conhecidas de estatinas. A Tabela 16 mostra a recuperação média alcançada com seus respectivos RSD% para estatinas em solução aquosa e efluente hospitalar. A precisão do método foi avaliada intra e inter-dias, durante três dias.

Tabela 16 - Validação da SPE para estatinas em solução aquosa e em efluente hospitalar utilizando-se sorvente Chromabond C18 ec.

Analito	Solução aquosa		Efluente hospitalar	
	Rec (%) ^a	RSD%	Rec (%) ^a	RSD%
ATO	95,8	0,7	92,0	8,0
SIN	83,2	1,3	81,5	3,0

^a Recuperação média de três dias de validação, $n=3$.

Os valores obtidos nos ensaios de recuperação utilizando a SPE foram de 95,8% ($\pm 0,7\%$) para ATO e 83,2% ($\pm 1,3\%$) para SIN em solução aquosa; e, 92,0% ($\pm 8,0\%$) para ATO e 81,5% ($\pm 3,0\%$) para SIN em efluente hospitalar.

O método de SPE desenvolvido para extração de estatinas demonstrou ser adequado, pois, segundo Ribani *et al.* (2004), os intervalos aceitáveis de recuperação para a análise de resíduos geralmente variam em torno de 70 e 120%, com precisão de $\pm 20\%$; e, dependendo da complexidade analítica e da amostra, estes valores ainda podem variar de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$.

4.4.2. Microextração dispersiva líquido-líquido

A fim de eliminar algumas variáveis do processo, a otimização do método de DLLME foi iniciada com testes de escolha dos solventes extrator e dispersor; as misturas de solventes que foram testadas estão apresentadas na Tabela 6, que se encontra na seção 3.7.2.

Para este teste fixou-se uma proporção da mistura de solventes, sendo esta 10:1 (dispersor:extrator), e variou-se o pH da amostra entre 3, 5 e 7. Estes parâmetros foram fixados levando-se em conta a metodologia descrita por Martín *et al.* (2011). O volume de

amostra utilizado foi de 5 mL e, da mistura de solventes, 0,5 mL. A mistura de solvente que se mostrou mais adequada para a extração de estatinas foi a combinação 1: acetona e tetracloreto de carbono.

Outro teste desta etapa inicial consistiu na utilização de ultrassom, imediatamente após a adição da mistura de solventes na amostra. Segundo Chang Chen *et al.* (2012), a vibração ultrassônica melhora a eficiência da extração, pois produz gotículas menores, que ocasionam melhor interação mistura de solventes e amostra; porém, esta etapa não apresentou influência significativa na extração de estatinas.

Sabe-se que vários fatores exercem influência nas recuperações da DLLME: volume de solventes (dispensor e extrator), pH e força iônica, são as mais significativas. Um modelo de planejamento experimental foi utilizado para a otimização da metodologia, levando-se em conta o número de variáveis a serem exploradas e optando-se pela utilização de um planejamento completo: delineamento composto central rotacional - DCCR. A otimização da metodologia foi feita em solução aquosa e em efluente hospitalar.

4.4.2.1. DCCR em solução aquosa

A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para o desenho experimental e otimização da metodologia; para tal, o DCC foi escolhido; pois, como sugere Kasiri *et al.* (2008), este é um modelo de segunda ordem que se mostra bem adequado para a montagem de uma superfície quadrática e, que, normalmente, funciona na otimização de processos.

Como os valores de α obedecem a Equação 19, o DCC assume os critérios de rotacionalidade; assim, foi utilizado o DCCR para a otimização da DLLME.

A Tabela 17 apresenta a matriz do DCCR para a otimização da DLLME em solução aquosa, em que podem ser encontrados os níveis estudados e as recuperações obtidas para cada analito.

Tabela 17 – Matriz do DCCR para a otimização das variáveis de extração dispersiva líquido-líquido em solução aquosa.

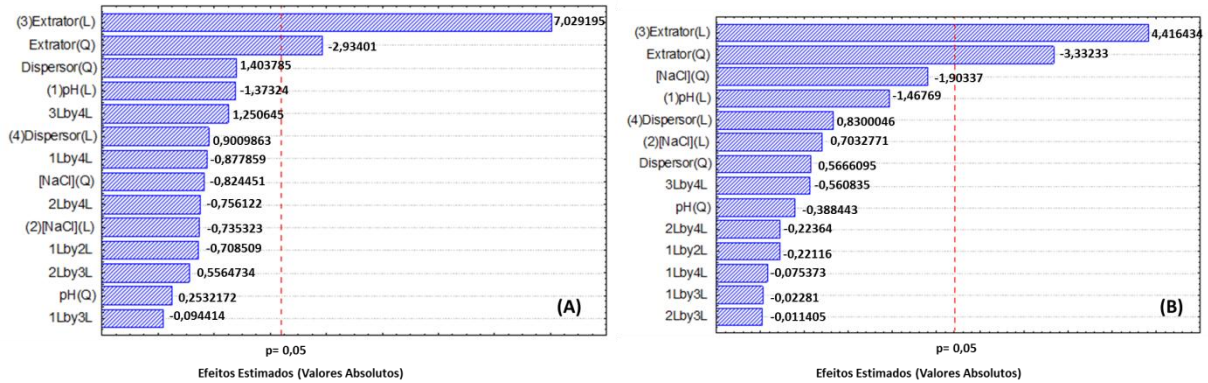
Item	Variáveis↓	Níveis→				
		-2	-1	0	+1	+2
X ₁	pH da amostra	3	4	5	6	7
X ₂	Força iônica [NaCl] (mol L ⁻¹)	0	0,1	0,2	0,3	0,4
X ₃	Volume de solvente extrator (μL)	20	60	100	140	180
X ₄	Volume de solvente dispersor (μL)	300	350	400	450	500

Exp.	pH da amostra	Força iônica	Volume de solvente extrator	Volume de solvente dispersor	Rec. _{ATO} (%)	Rec. _{SIN} (%)
1	4	0,1	60	350	66,92	59,93
2	6	0,1	60	350	62,78	50,08
3	4	0,3	60	350	63,45	68,16
4	6	0,3	60	350	63,62	64,93
5	4	0,1	140	350	74,53	79,03
6	6	0,1	140	350	74,98	77,72
7	4	0,3	140	350	80,50	78,73
8	6	0,3	140	350	80,42	77,92
9	4	0,1	60	450	64,41	66,92
10	6	0,1	60	450	68,83	71,32
11	4	0,3	60	450	69,46	70,72
12	6	0,3	60	450	50,93	63,14
13	4	0,1	140	450	93,69	78,11
14	6	0,1	140	450	86,23	72,61
15	4	0,3	140	450	94,04	89,31
16	6	0,3	140	450	79,56	79,75
17	3	0,2	100	400	81,19	78,73
18	7	0,2	100	400	69,93	59,20
19	5	0	100	400	71,75	54,89
20	5	0,4	100	400	60,30	53,76
21	5	0,2	20	400	6,19	15,50
22	5	0,2	180	400	88,53	65,59
23	5	0,2	100	300	85,53	76,78
24	5	0,2	100	500	85,95	79,59
25	5	0,2	100	400	75,97	79,71
26	5	0,2	100	400	76,97	80,74

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para determinar os parâmetros relevantes que afetam cada variável de interesse. A ANOVA para ATO em solução aquosa apresentou r^2 igual a 0,87294, o que significa que 87,29% da variância total foi explicada pelo modelo; já para SIN em solução aquosa, o r^2 resultante foi de 0,7928, ou seja, 79,28% da variância total é explicada pelo modelo.

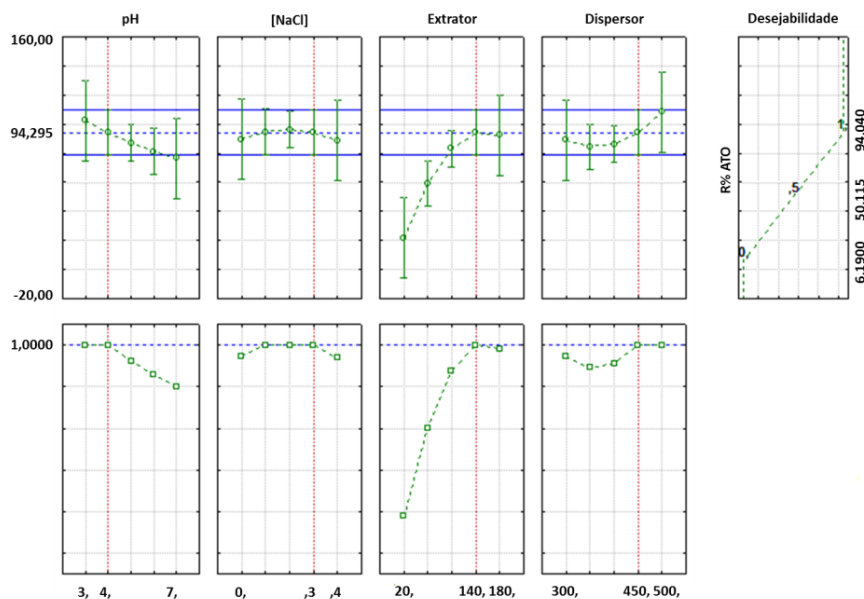
Segundo o diagrama de Pareto para a DLLME em solução aquosa (Figura 20), a variável significativa foi o volume de extrator (L + Q), para os dois analitos. A variável apresentou efeito positivo, isso significa que na variação do nível -1 para o nível +1 há aumento na recuperação.

Figura 20 – Diagrama de Pareto para os efeitos estimados (valores absolutos) para DLLME em solução aquosa de (A) ATO e (B) SIN. A linha vertical pontilhada define o nível de 95% de confiança; (L) significa variável linear e (Q) significa variável quadrática.



Os perfis das variáveis independentes em função da desejabilidade (Figura 21), para valores mínimo (0) e máximo (1) de recuperação de ATO, apontam que as melhores condições para a DLLME de ATO foram: pH da amostra 4, concentração de NaCl 0,3 mol L⁻¹, volume de solvente extrator 140 μ L e volume de solvente dispersor 450 μ L.

Figura 21 - Perfil das variáveis independentes pH da amostra, força iônica, volume de solvente extrator e volume de solvente dispersor relacionados à desejabilidade da recuperação de ATO por DLLME em solução aquosa.



A Figura 22 apresenta as superfícies de respostas relacionadas à recuperação de ATO por DLLME (R% ATO considerada variável dependente), relacionando o volume de solvente

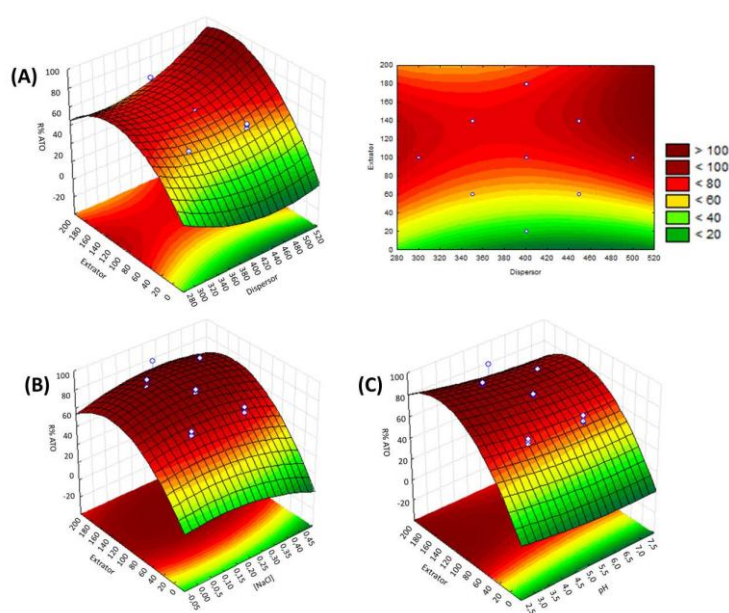
extrator com as demais variáveis independentes (volume de solvente dispersor, pH da amostra e força iônica).

Analisando isoladamente o volume de solvente extrator em todos os gráficos de superfície de resposta, é possível afirmar que as maiores recuperações foram alcançadas quando este era de 140 μL . Por meio da análise da superfície de resposta e do diagrama de contorno para a ATO, na Figura 22 (A), pode-se afirmar que as maiores recuperações foram alcançadas quando a relação dispersor:extrator foi de 450:140 μL .

A Figura 22 (B) apresenta a influência da força iônica sobre a extração; conforme demonstrado no diagrama de Pareto, esta não apresentou significância na DLLME da ATO, ainda que a utilização de NaCl esteve relacionada com maiores recuperações quando comparada aos experimento que não fizeram uso do sal. Obtiveram-se valores de recuperação similares com concentrações distintas de NaCl – 93,69% utilizando 0,1 mol L⁻¹ de NaCl e, 94,04% utilizando 0,3 mol L⁻¹ de NaCl.

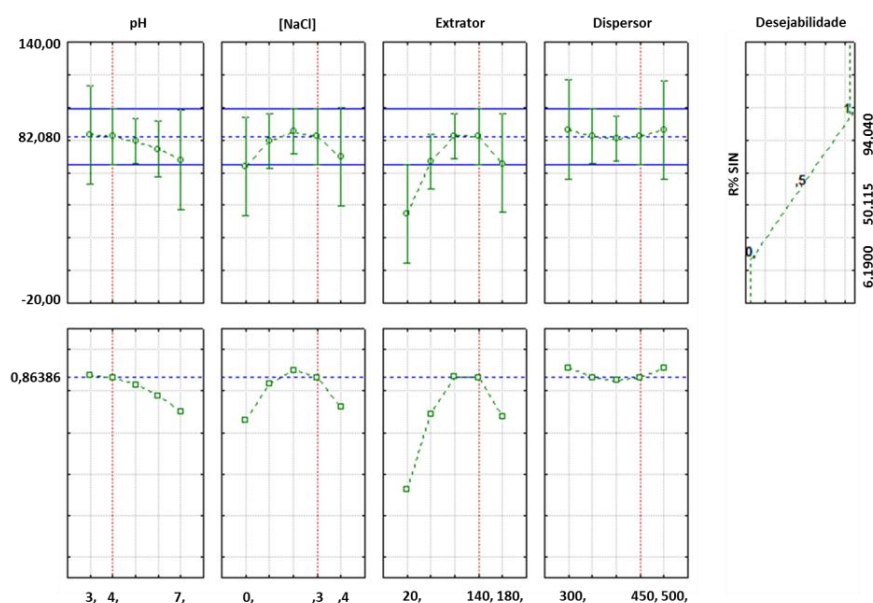
Maiores valores de recuperação foram obtidos quando o pH da amostra foi trabalhado abaixo de 5 - Figura 22 (C).

Figura 22 – Superfícies de resposta relacionadas a recuperação de ATO em solução aquosa por DLLME. (A) efeito combinado entre volume de solvente extrator e volume de solvente dispersor e diagrama de contorno volume de solvente extrator vs volume de solvente dispersor, (B) efeito combinado entre volume de solvente extrator e pH da amostra e (C) efeito combinado entre volume de solvente extrator e pH da amostra.



Aplicando a função de desejabilidade, para a máxima recuperação de SIN, os valores otimizados podem ser visualizados na Figura 23. Analisando o perfil de cada variável independente associado a sua desejabilidade pode-se verificar que as condições ótimas para a extração de SIN foram as mesma que para a extração de ATO, já demonstrado acima.

Figura 23 - Perfil das variáveis independentes pH da amostra, força iônica, volume de solvente extrator e volume de solvente dispersor relacionados à desejabilidade da recuperação de SIN por DLLME em solução aquosa.



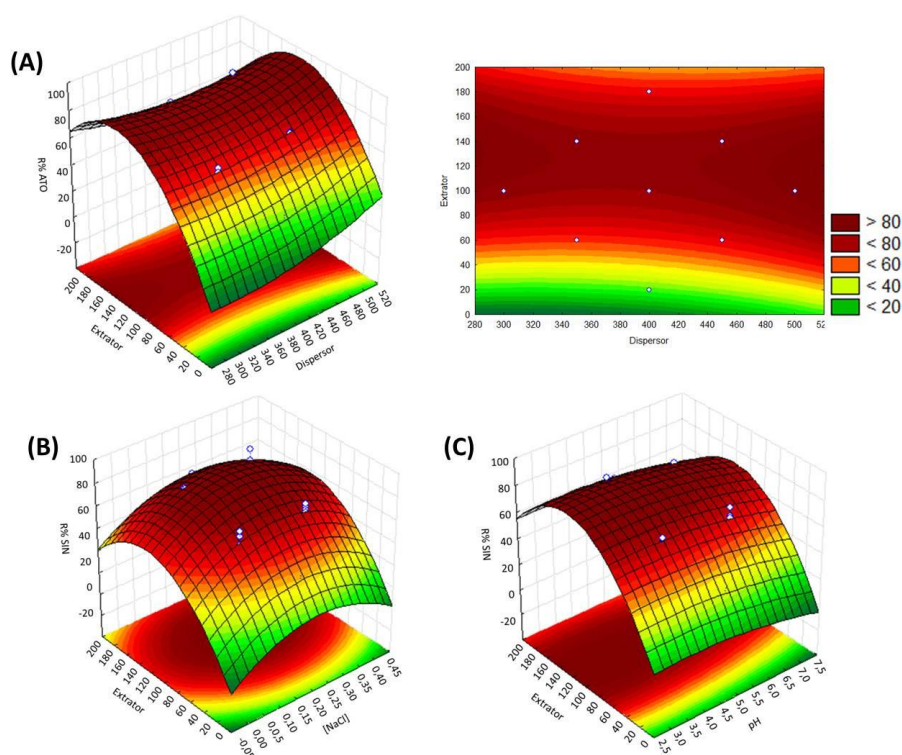
A Figura 24 apresenta as superfícies de respostas relacionadas a recuperação de SIN por DLLME (R% SIN considerada variável dependente), relacionando o volume de solvente extrator com as demais variáveis independentes (volume de solvente dispersor, pH da amostra e força iônica).

Da mesma maneira que a ATO, para a DLLME de SIN, se observa que maiores recuperações foram alcançadas quando o volume de solvente extrator foi de 140 μL . Analisando o diagrama de contorno, Figura 24 (A), as maiores recuperações foram alcançadas quando a relação dispersor:extrator foi de 450:140 μL .

A Figura 24 (B) confirma o que foi demonstrado no diagrama de Pareto; a força iônica não foi uma variável significativa no processo, ainda que sua utilização esteja associada a melhores recuperações, sua concentração não foi um fator determinante na recuperação do analito.

Aqui, novamente, vemos que valores de pH abaixo de 5 estão relacionados com melhores recuperações, ainda que, os valores acima de 5, apresentam recuperações na faixa de 70% - Figura 24 (C).

Figura 24 - Superfícies de resposta relacionadas a recuperação de SIN em solução aquosa por DLLME. (A) efeito combinado entre volume de solvente extrator e volume de solvente dispersor e diagrama de contorno volume de solvente extrator vs volume de solvente dispersor, (B) efeito combinado entre volume de solvente extrator e pH da amostra e (C) efeito combinado entre volume de solvente extrator e pH da amostra.



4.4.2.2. DCCR em efluente hospitalar

A Tabela 18 apresenta a matriz do DCCR para a otimização da DLLME em efluente hospitalar, onde podem ser encontrados os níveis estudados e as recuperações obtidas para cada analito.

Tabela 18 - Matriz do DCCR para a otimização das variáveis de extração dispersiva líquido-líquido em efluente hospitalar.

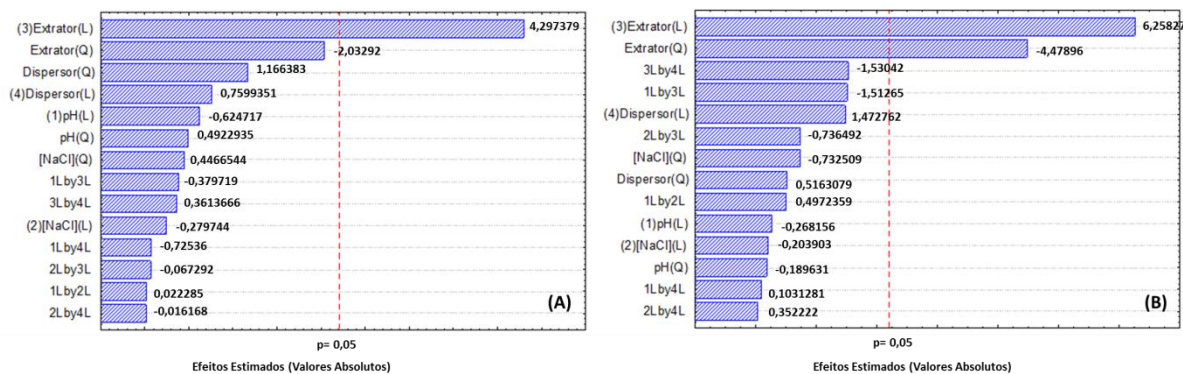
Item	Variáveis↓	Níveis→				
		-2	-1	0	+1	+2
X ₁	pH da amostra	3	4	5	6	7
X ₂	Força iônica [NaCl] (mol L ⁻¹)	0	0,1	0,2	0,3	0,4
X ₃	Volume de solvente extrator (μL)	20	60	100	140	180
X ₄	Volume de solvente dispersor (μL)	300	350	400	450	500

Exp.	pH da amostra	Força iônica	Volume de solvente extrator	Volume de solvente dispersor	Rec. _{ATO} (%)	Rec. _{SIN} (%)
1	4	0,1	60	350	67,68	41,02
2	6	0,1	60	350	66,59	50,72
3	4	0,3	60	350	68,48	50,54
4	6	0,3	60	350	65,32	58,94
5	4	0,1	140	350	75,05	86,60
6	6	0,1	140	350	73,19	75,26
7	4	0,3	140	350	75,12	72,71
8	6	0,3	140	350	75,53	72,98
9	4	0,1	60	450	64,97	63,54
10	6	0,1	60	450	68,98	69,32
11	4	0,3	60	450	67,98	60,12
12	6	0,3	60	450	69,55	68,73
13	4	0,1	140	450	84,77	79,94
14	6	0,1	140	450	75,84	76,62
15	4	0,3	140	450	81,95	82,02
16	6	0,3	140	450	76,28	81,23
17	3	0,2	100	400	79,19	78,22
18	7	0,2	100	400	69,04	64,39
19	5	0	100	400	77,90	70,24
20	5	0,4	100	400	69,33	64,18
21	5	0,2	20	400	5,77	19,67
22	5	0,2	180	400	87,13	58,23
23	5	0,2	100	300	76,69	80,51
24	5	0,2	100	500	86,31	72,75
25	5	0,2	100	400	68,51	70,26
26	5	0,2	100	400	73,48	81,37

A ANOVA demonstrou que, em efluente hospitalar, 73,6% da variância total foi explicada pelo modelo para ATO, ou seja, seu r^2 foi 0,73567; já para SIN, o r^2 foi de 0,87474, o que significa que 87,5% da variância total é explicada pelo modelo.

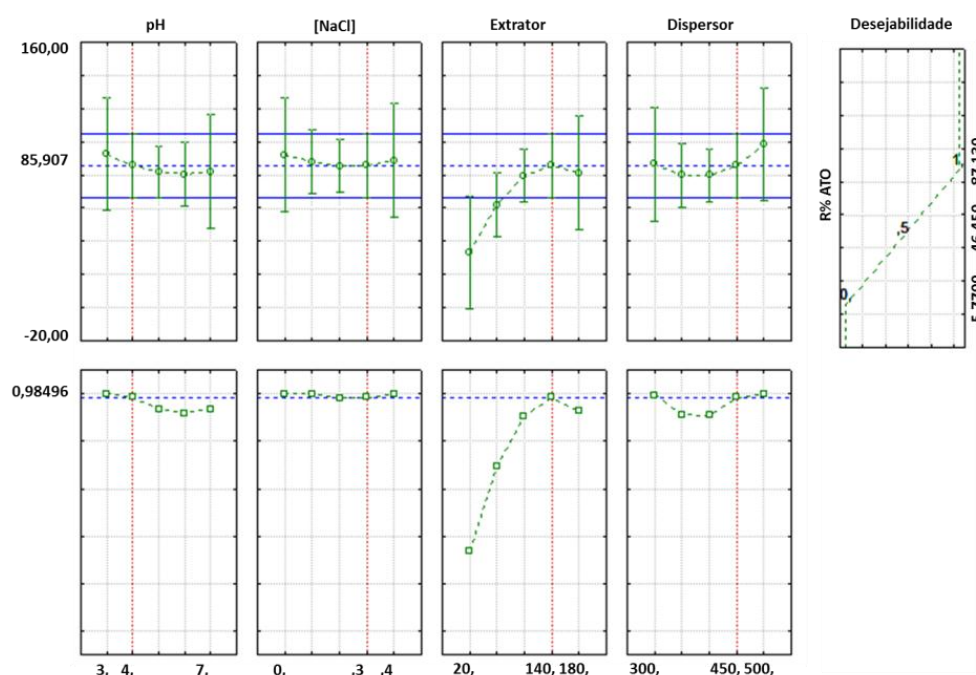
Da mesma maneira que em solução aquosa, o diagrama de Pareto para DLLME em efluente hospitalar (Figura 25), a variável que se mostrou significativa foi o volume de solvente extrator. Nos dois casos, a variável apresentou efeito positivo, fazendo com que o aumento na recuperação dos analitos seja favorecida com a variação do nível -1 para o nível +1, ou seja, quando aumenta-se o volume de solvente extrator de 60 μL para 140 μL.

Figura 25 - Diagrama de Pareto para os efeitos estimados (valores absolutos) para DLLME em efluente hospitalar de (A) ATO e (B) SIN. A linha vertical pontilhada define o nível de 95% de confiança; (L) significa variável linear e (Q) significa variável quadrática.



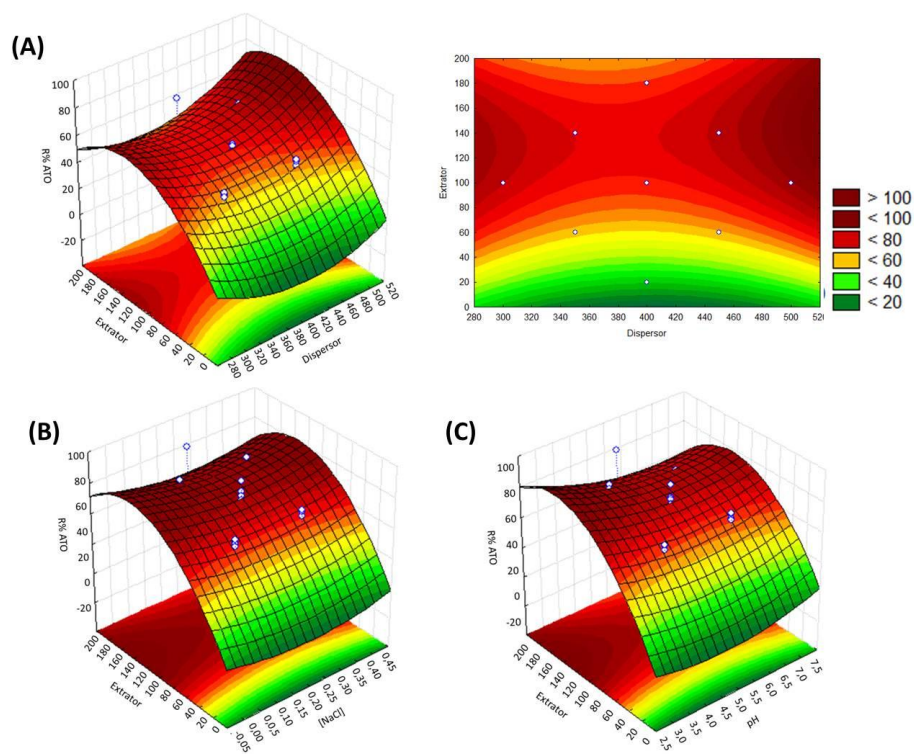
A função de desejabilidade para a ATO em efluente hospitalar está apresentada na Figura 26, nela é possível verificar que, assim como em solução aquosa, a condições ótimas são: pH 4, concentração de NaCl $0,3 \text{ mol L}^{-1}$, volume de solvente extrator $140 \mu\text{L}$ e volume de solvente dispersor $450 \mu\text{L}$.

Figura 26 - Perfil das variáveis independentes pH da amostra, força iônica, volume de solvente extrator e volume de solvente dispersor relacionados à desejabilidade da recuperação de ATO por DLLME em efluente hospitalar.



A Figura 27 mostra a interação entre o volume de solvente extrator com as demais variáveis na DLLME de ATO em efluente hospitalar; percebe-se claramente a similaridade quando comparada a Figura 22. Os gráficos de superfície de resposta apresentam o mesmo perfil, tanto para solução aquosa como para efluente hospitalar.

Figura 27 - Superfícies de resposta relacionadas a recuperação de ATO em efluente hospitalar por DLLME. (A) efeito combinado entre volume de solvente extrator e volume de solvente dispersor e diagrama de contorno volume de solvente extrator vs volume de solvente dispersor, (B) efeito combinado entre volume de solvente extrator e pH da amostra e (C) efeito combinado entre volume de solvente extrator e pH da amostra.



Mais uma vez, a função de desejabilidade se mostra compatível com as que já foram apresentadas; podemos verificar esta afirmação analisando a Figura 28 que apresenta o gráfico relacionado à extração da SIN em efluente hospitalar.

O mesmo pode ser observado quando se analisa as superfícies de resposta para a DLLME de SIN em efluente hospitalar- Figura 29. As variáveis se comportam da mesma maneira quando se compara com a extração em solução aquosa - Figura 22.

Figura 28 - Perfil das variáveis independentes pH da amostra, força iônica, volume de solvente extrator e volume de solvente dispersor relacionados à desejabilidade da recuperação de SIN por DLLME em efluente hospitalar.

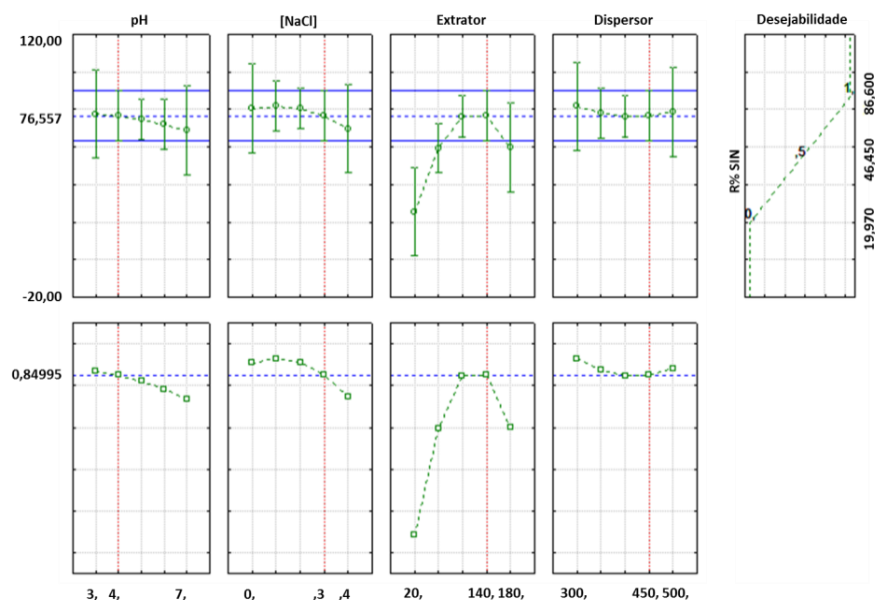
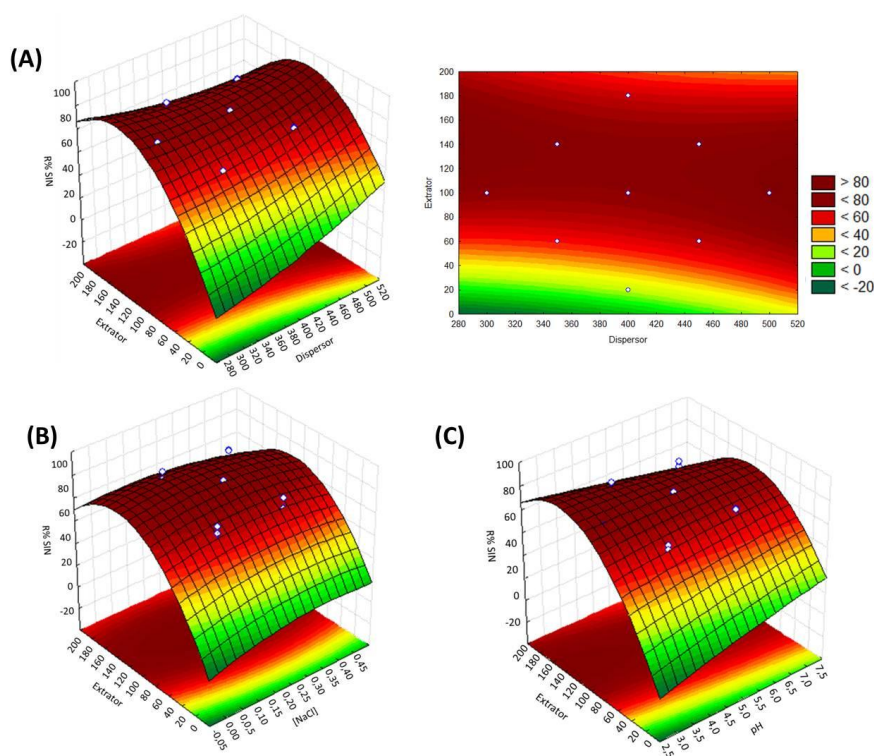


Figura 29 - Superfícies de resposta relacionadas a recuperação de ATO em efluente hospitalar por DLLME. (A) efeito combinado entre volume de solvente extrator e volume de solvente dispersor e diagrama de contorno volume de solvente extrator vs volume de solvente dispersor, (B) efeito combinado entre volume de solvente extrator e pH da amostra e (C) efeito combinado entre volume de solvente extrator e pH da amostra.



4.4.2.3. Efeito das variáveis

Como já citado anteriormente, a DLLME é influenciada por diversos fatores, assim, para a otimização do método, efetuou-se a avaliação de quatro variáveis que são as mais significativas: pH da amostra, força iônica, volume de solvente extrator e volume de solvente dispersor.

O DCCR aplicado demonstrou melhores recuperações quando o pH da amostra foi na ordem de 4. Este resultado está plenamente de acordo quando se analisa a SIN (pK_a 13,5); o valor de pK_a mais elevados sugere que a mesma não apresenta porção ácida, assim, sua extração é favorecida em pH ácido. Já, a ATO, que apresenta o grupo carboxílico (pK_a 4,5), costuma ter recuperações ligeiramente mais baixas em pH ácido.

Martín *et al.* (2011) verificaram a influência de pH 3 e 7 na DLLME de estatinas em águas residuais e água de rio, a ATO apresentou comportamento semelhante, pois apresentou recuperações bem maiores a pH 3 quando comparado com o pH 7. Martín *et al.* (2011) e Martins *et al.* (2012) afirmaram que, geralmente, compostos ácidos, requerem acidificação na amostra para permanecer na forma molecular, facilitando a partição dos analitos nas microgotas do solvente extrator.

A força iônica também foi avaliada, e uma concentração de NaCl de $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ esteve associada às maiores recuperações das estatinas; porém, como foi apresentado nos diagramas de Pareto (Figura 20 e Figura 25), esta não foi uma variável significativa no processo. Caldas *et al.* (2011) afirmaram que a adição de NaCl apresenta grande variação nos trabalhos publicados, observando-se desde a não utilização até a adição de 0,5 a 10%.

Celano *et al.* (2015) avaliaram a influência da força iônica para DLLME de PPCPs em matrizes aquosas, consideraram três concentrações de NaCl (0, 5 e 10%). A adição de 5% de sal melhorou significativamente a eficiência da extração para todos os analitos. Já, Martín *et al.* (2011), avaliaram o efeito de 10% de NaCl para a DLLME de estatinas e não observaram influência significativa.

Segundo Caldas *et al.* (2011), o aumento na concentração de NaCl aumenta o volume da gota (fase sedimentada) devido à diminuição da solubilidade do solvente extrator na presença do sal. Porém, esta influência depende das características de cada analito.

4.4.2.4. Desejabilidade versus resultados reais

Usando as condições otimizadas acima, as recuperações obtidas foram de 94% para ATO e de 89,3% para SIN em solução aquosa, e, 82% para ATO e 82% para SIN em efluente hospitalar.

Observando os perfis de desejabilidade para ATO (Figura 21 e Figura 26) e para SIN (Figura 23 e **Erro! Fonte de referência não encontrada.**) esperava-se, segundo o modelo proposto, recuperações de 94,3% para ATO e 82,1% para SIN em solução aquosa, e, 85,9% para ATO e 76,6% para SIN em efluente hospitalar.

Os valores reais obtidos estão bem próximos aos preditos pelos gráficos de desejabilidade. Algumas variações podem ocorrer, relacionadas às diferentes condições laboratoriais, tais como, mudanças de solventes, na vidraria e equipamentos utilizados, ou diferenças operacionais, entre outros.

Embora o ajuste de modelo para a SIN, tanto em solução aquosa como em efluente hospitalar, tenha ficado abaixo de 0,9, é capaz de prever as condições otimizadas da DLLME, satisfatoriamente.

4.4.2.5. Validação do método de DLLME

O método de DLLME foi validado em solução aquosa e em efluente hospitalar, em três níveis de concentração (dentro da faixa linear do método), fortificados 100 vezes com concentrações conhecidas de estatinas. A Tabela 19 mostra a recuperação média alcançada com seus respectivos RSD% para estatinas, em solução aquosa e em efluente hospitalar. A precisão do método foi avaliada intra e inter-dias, durante três dias.

Tabela 19 - Validação da DLLME para estatinas em solução aquosa e em efluente hospitalar.

Analito	Solução aquosa		Efluente hospitalar	
	Rec (%) ^a	RSD%	Rec (%) ^a	RSD%
ATO	86,5	2,7	83,0	1,7
SIN	89,4	0,4	83,1	2,0

^a Recuperação média de três dias de validação, $n=6$.

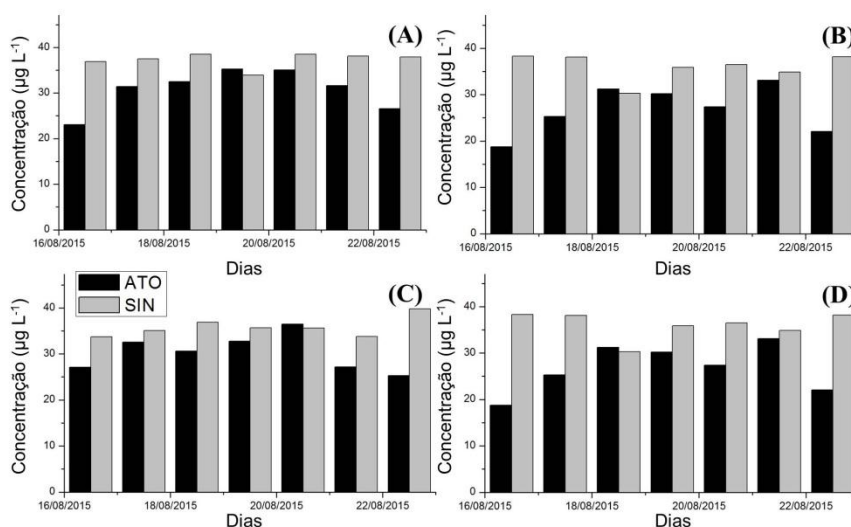
Os valores obtidos nos ensaios de recuperação utilizando a DLLME foram de 86,5% ($\pm 2,7\%$) para ATO e 89,4% ($\pm 0,4\%$) para SIN em solução aquosa; e, 83,0% ($\pm 1,7\%$) para ATO e 83,1% ($\pm 2,0\%$) para SIN em efluente hospitalar. Portanto, a metodologia de DLLME proposta para a extração de estatinas em efluente hospitalar se mostra adequada, alcançando recuperações satisfatórias segundo ANVISA (2003) que determina que os intervalos de recuperação aceitáveis devam estar compreendidos entre 70 e 120%.

4.5. DETERMINAÇÃO DE ESTATINAS EM EFLUENTE HOSPITALAR

Após a validação do método de separação/quantificação e dos métodos de extração, foi possível efetuar a análise de exposição ambiental de estatinas no efluente hospitalar do HUSM.

A avaliação da exposição das estatinas lançadas no meio ambiente através do efluente tratado do HUSM foi avaliada durante sete dias consecutivos, conforme descrito no item 3.3. As amostras compostas foram submetidas à extração e *clean-up* através de dois métodos: SPE e DLLME, ambos com fator de pré-concentração de 100 vezes. A Figura 30 mostra as concentrações encontradas nos dois pontos de coleta do sistema de efluentes do HUSM para os dois métodos de extração.

Figura 30 - Concentrações diárias de estatinas detectadas nos pontos de coleta. (A) Efluente PA e (B) Efluente Geral utilizando DLLME; (C) Efluente PA e (D) Efluente Geral utilizando SPE.



A Figura 30 (A) e (B) apresenta as concentrações médias encontradas no Efluente PA e GE, respectivamente, utilizando-se DLLME como método de extração. A concentração média de ATO foi de $31,6 \mu\text{g L}^{-1}$ ($\pm 13,4\%$) no Efluente PA e $27,4 \mu\text{g L}^{-1}$ ($\pm 17,7\%$) no Efluente Geral, e de SIN foi de $37,6 \mu\text{g L}^{-1}$ ($\pm 4,0\%$) no Efluente PA e $36,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ($\pm 7,3\%$) no Efluente Geral.

A Figura 30 (C) e (D) apresenta as concentrações medidas utilizando-se SPE como processo de extração. A concentração média de ATO foi de $28,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ($\pm 11,5\%$) no Efluente PA e $30,6 \mu\text{g L}^{-1}$ ($\pm 12,1\%$) no Efluente Geral, e de SIN, $36,6 \mu\text{g L}^{-1}$ ($\pm 6,7\%$) no Efluente PA e $35,6 \mu\text{g L}^{-1}$ ($\pm 5,4\%$) no Efluente Geral.

Analisando-se os gráficos da Figura 30 é possível observar-se que as concentrações das estatinas parecem constantes ao longo da semana; ademais, os medicamentos à base de estatinas são de uso contínuo e de largo consumo, o que explica as altas concentrações encontradas. As concentrações medidas em cada dia de coleta podem ser encontradas na Tabela 30 e Tabela 31 no Apêndice C.

Comparando-se os dois métodos de extração se observa que os resultados obtidos foram próximos, para ambas as estatinas, o que demonstra que os dois métodos de extração podem ser utilizados, satisfatoriamente.

4.6. AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE RISCO AMBIENTAL

A capacidade de bioacumulação das estatinas foi avaliada, inicialmente, através do valor de $\log K_{ow}$, como apresentado na Tabela 20; a ATO apresenta valor de 4,46 e a SIN, de 4,68. Analisando-se apenas o valor de $\log K_{ow}$, inicialmente, concluir-se-ia que as estatinas apresentam capacidade de bioacumulação. Porém, caso uma substância exiba $\log K_{ow} > 4,5$, a avaliação de risco deve ser aprofundada segundo a Orientação Técnica de Avaliação dos Riscos (TGD, 2003).

Uma forma de avaliar o risco de bioacumulação nas espécies aquáticas é usando-se o Fator de Bioconcentração (BCF). O BCF é mensurado a partir da relação entre a concentração no organismo e a concentração em água, em um estado de equilíbrio (TGD, 2003).

Segundo Hernando *et al.* (2007), o BCF é a medida mais ampla de bioacumulação; o valor de $\log K_{ow}$ só deve ser utilizado como indicador quando o BCF não for conhecido. Para que uma substância seja considerada bioacumulável deve apresentar $\text{BCF} > 2000$. A Tabela

20 apresenta os dados de ecotoxicidade e de bioacumulação, onde estão demonstrado valores de toxicidade aguda e crônica, bem como o BCF para as estatinas alvo deste estudo.

Tabela 20 – Dados de ecotoxicidade e dados de bioacumulação relatados.

Analito	Toxicidade aguda		Toxicidade crônica		Bioacumulação	
	Organismo de teste	PNEC*	Organismo de teste	NOEC*	BCF	log K _{ow}
ATO	Peixe	0,01	Peixe	86	56	4,46
SIN	Alga Verde	0,01	Peixe	56	800	4,68

Fonte: HERNANDO *et al.*, 2007; RUIZ I ARANDES, 2009. * $\mu\text{g L}^{-1}$.

Os valores de log K_{ow} de ATO e SIN excedem o critério estabelecido pela EMEA e pela UE (log K_{ow} > 4,5), indicando a alta lipofilicidade e, portanto, bioacumulação. No entanto, os valores de BCF são de 56 para ATO e 800 para SIN, e, assim, não seriam bioacumuláveis.

Os valores de PEC foram estimados pela Equação 17. A Tabela 21 apresenta os dados para a avaliação de risco das estatinas usadas no HUSM.

Tabela 21 – Concentração ambiental predita (PEC) e quociente de risco (QR) das estatinas.

Analito	Excreção ¹ (%)	Consumo anual ² (kg ano ⁻¹)	PEC ($\mu\text{g L}^{-1}$)	QR (PEC/PNEC)
ATO	5	2,88	$2,1 \times 10^{-4}$	0,021
SIN	15	14,4	$3,1 \times 10^{-3}$	0,31

Fonte: ¹ NOVÁKOVÁ *et al.*, 2008; ² Farmácia do HUSM.

Como pode ser observado na Tabela 21, a ATO apresenta QR igual a 0,021, o que confirma baixo risco ao ecossistema aquático; já, a SIN, apresenta QR igual a 0,31, abaixo de 1, podendo ser considerada de risco moderado. Estes valores de QR podem ser comparados aos de BCF, os quais, apesar de indicarem que a SIN não apresenta propriedade de bioacumulação, esta propriedade é ligeiramente superior à da ATO.

Por outro lado, usando-se a razão MEC/PNEC, chega-se a um valor para QR muito superior (QR > 2000), o que demonstra que a concentração de estatinas lançadas no córrego que corta a UFSM, através do efluente tratado do HUSM, concentração esta originária não só do tratamento de pacientes, mas do uso contínuo por parte de pacientes, equipes médica e técnica, e visitantes, representa, sim, um alto risco toxicológico potencial aos ecossistemas e à saúde pública.

4.7. APLICAÇÃO DE PAOS À DEGRADAÇÃO E REMOÇÃO DE ESTATINAS

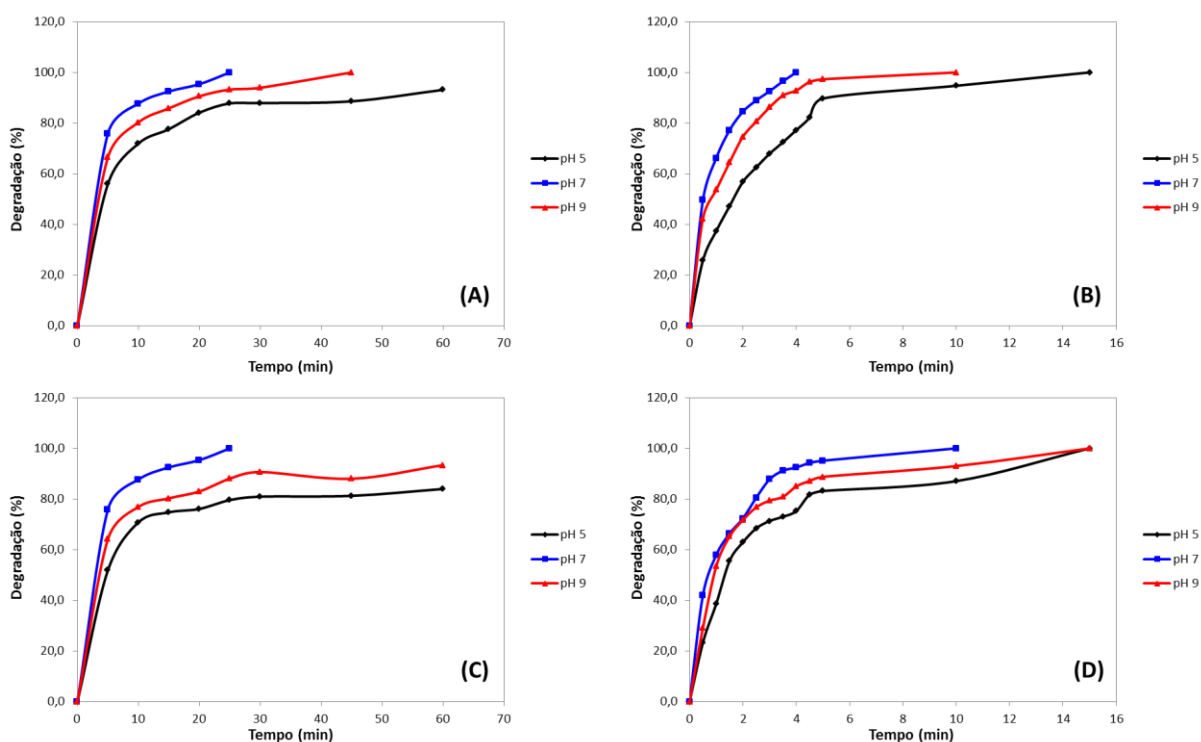
4.7.1. Ozonização

A produção de O_3 , calculada através de iodometria, foi de $0,571 \text{ mg min}^{-1}$. O pH, sabidamente, é um dos fatores mais importante no processo de ozonização; assim, este parâmetro foi estudado para determinar a melhor condição para a degradação das estatinas. Os experimentos foram conduzidos em solução aquosa e em efluente hospitalar, durante 60 minutos. Os valores de pH utilizados na otimização do processo foram 5, 7 e 9.

As soluções foram fortificadas na concentração de 10 mg L^{-1} ; para a injeção no cromatógrafo (conforme item 3.5), as amostras foram diluídas em acetonitrila, e assim, injetadas na concentração de 1 mg L^{-1} .

Nos gráficos abaixo (Figura 31) pode ser vista a degradação das estatinas nos valores de pH testados, em solução aquosa e em efluente hospitalar. Como pode ser observado, a degradação total da ATO (Figura 31 – A e C), em pH 7, ocorre aos 25 min de reação, já, para SIN (Figura 31 – B e D), o mesmo ocorre em 5 min de reação.

Figura 31 – Degradação das estatinas por ozonização em diferentes valores de pH. Em solução aquosa: (A) ATO e (B) SIN; e em efluente hospitalar (C) ATO e (D) SIN.

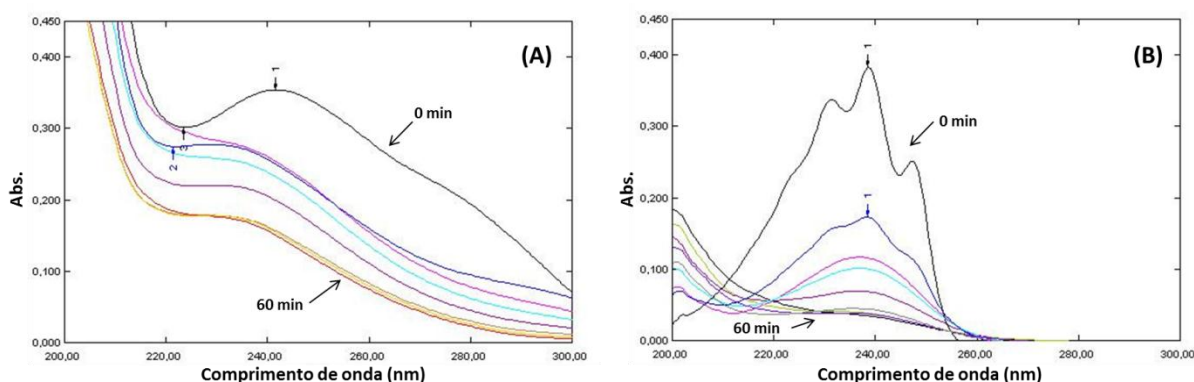


Geralmente, a taxa de decomposição do ozônio aumenta com o aumento do pH da solução, uma vez que os íons hidroxila catalisam a decomposição do ozônio para formar os radicais e espécies reativas. Em geral, em $\text{pH} < 4$, o principal mecanismo da ozonização é a reação direta (molecular) com os compostos orgânicos, enquanto que para pH entre 4 e 9 estão presentes a reação direta e radicalar. Em $\text{pH} > 9$, predomina o mecanismo de degradação por meio de radicais livres (LI *et al.*, 2008; VON GUNTEN, 2015).

Os melhores resultados de degradação das estatinas foram observados em pH 7, contrariando o esperado para o mecanismo da ozonização. Porém, diversos autores têm observado efeito semelhante em seus trabalhos. Li *et al.* (2008) avaliaram a ozonização na degradação de antibióticos em estações de tratamento de águas e efluentes; as melhores degradações ocorreram em pH 7. Balcioglu & Ötker (2003) obtiveram 88% de redução de DQO em pH 7 para antibióticos de uso veterinário em águas residuais, frente a 79% de redução em pH 9.

A Figura 32 apresenta os espectros de degradação das estatinas em pH 7 durante os 60 minutos de ozonização, em que é possível verificar-se, claramente, o decaimento da absorvância dos analitos em 60 min de reação para a melhor condição otimizada.

Figura 32 - Espectros de absorção das estatinas em solução aquosa submetidas à ozonização durante 60 minutos. (A) ATO e (B) SIN.



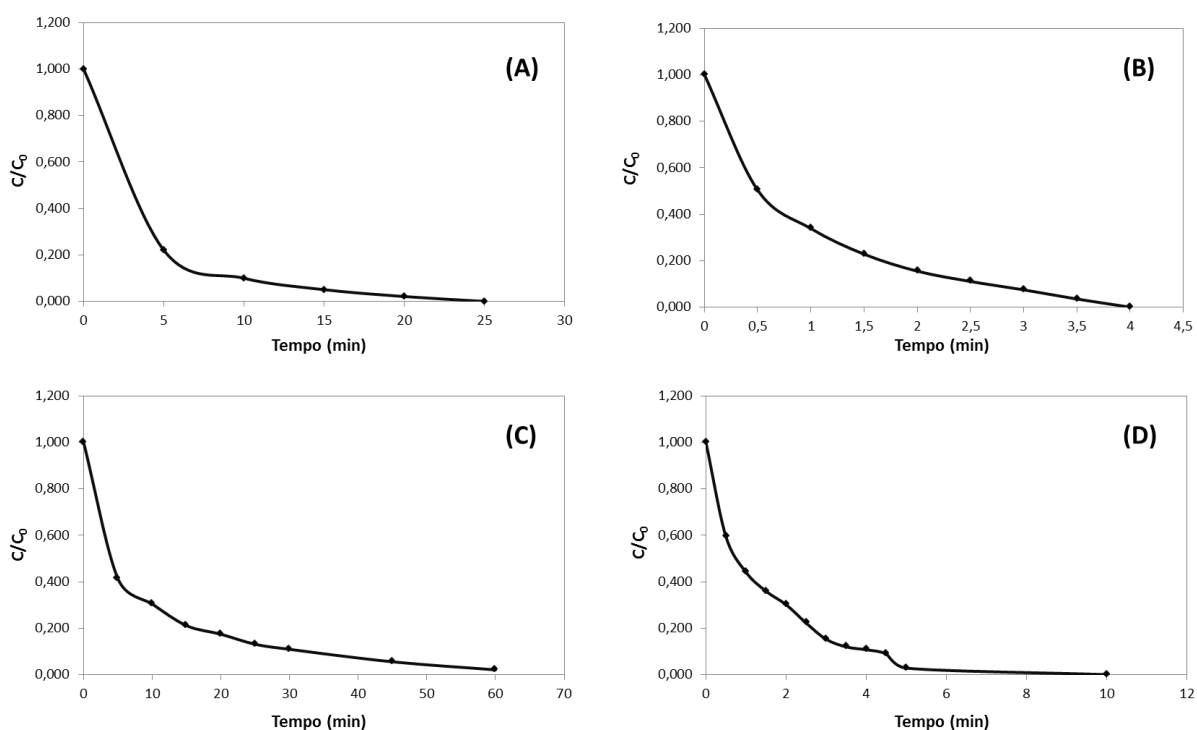
4.7.1.1. Estudo cinético da Ozonização

A partir da otimização da degradação das estatinas em função do pH foi feito o estudo cinético em solução aquosa e em efluente hospitalar. Para a ATO, as alíquotas foram

coletadas a cada 5 minutos até a completa degradação; já, para a SIN, as alíquotas foram coletadas a cada 30 segundos, visto que sua degradação total ocorre em 5 minutos.

A Figura 33 apresenta o decaimento da concentração das estatinas no processo de ozonização no decorrer do tempo, a razão $\frac{C}{C_0}$ indica a relação da concentração inicial (C_0) e a concentração no decorrer do tempo. É possível verificar que o decaimento da concentração ocorre de forma exponencial, o que determina que a reação seja de primeira ordem.

Figura 33 - Decaimento da concentração das estatinas em função do tempo em solução aquosa: (A) ATO e (B) SIN; e em efluente hospitalar: (C) ATO e (D) SIN.



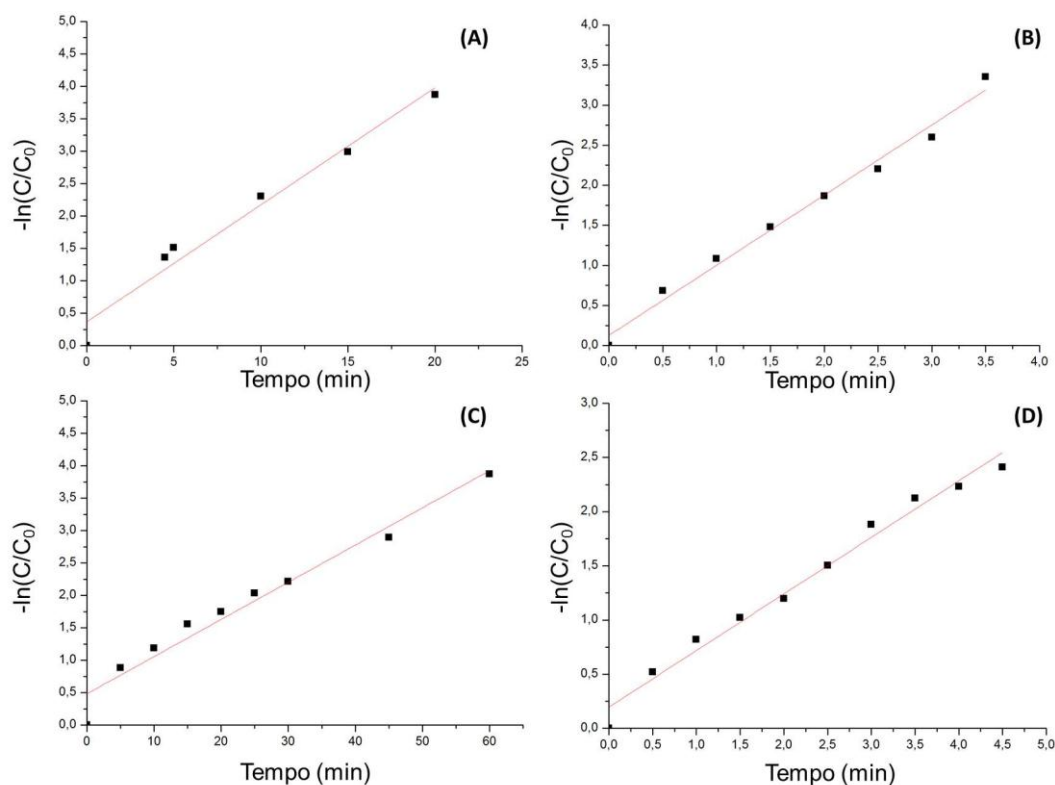
Utilizando-se a Equação 24 construiu-se o gráfico de $-\ln\left(\frac{C}{C_0}\right)$ em função do tempo, e utilizou-se o coeficiente angular da equação da reta para determinar a constante de velocidade da reação. Os gráficos de $-\ln\left(\frac{C}{C_0}\right)$ versus o tempo para as estatinas em solução aquosa e efluente hospitalar estão apresentados na Figura 34.

$$\ln\left(\frac{C}{C_0}\right) = kt$$

Equação 24

Onde C_0 é a concentração inicial, C é a concentração no decorrer do tempo, t é o tempo (em minutos) e k é a constante de remoção de primeira ordem (min^{-1}).

Figura 34 - Cinética de reação para degradação de estatinas por ozonização em solução aquosa: (A) ATO e (B) SIN; e em efluente hospitalar; (C) ATO e (D) SIN.



Através da análise do decaimento da concentração em função do tempo (Figura 33) e da curva $-\ln\left(\frac{C}{C_0}\right)$ versus tempo (Figura 34) confirmou-se que a reação é de primeira ordem. Na Tabela 22 são apresentados os coeficientes de regressão, constantes cinéticas e tempo de meia vida para as estatinas em solução aquosa e efluente hospitalar, obtidos a partir dos gráficos apresentados acima.

Tabela 22 – Parâmetros otimizados na eletrocoagulação de estatinas em solução aquosa e efluente hospitalar.

Analito	Solução aquosa			Efluente hospitalar		
	k (min^{-1}) ¹	r^2	$t_{1/2}$ (min) ²	k (min^{-1})	r^2	$t_{1/2}$ (min)
ATO	$1,7 \times 10^{-1}$	0,9688	3,9	$5,7 \times 10^{-2}$	0,9639	12,1
SIN	$8,7 \times 10^{-1}$	0,9875	0,8	$9,8 \times 10^{-1}$	0,9823	1,3

¹ Constante cinética. ² Tempo de meia-vida.

4.7.2. Eletrocoagulação (EC)

A otimização do processo de eletrocoagulação foi feita em solução aquosa e em efluente hospitalar; as especificações do reator utilizado estão apresentadas na Tabela 9, na seção 3.9.2.

No processo de eletrocoagulação alguns parâmetros devem ser observados para a remoção eficiente de contaminantes específicos. Estes parâmetros são: pH da solução, condutividade (influenciada pela concentração de eletrólito), densidade da corrente elétrica e material do eletrodo (MOHAMMAD *et al.*, 2004).

4.7.2.1. DCC em Solução Aquosa

Levando-se em conta o número de variáveis a serem exploradas, optou-se pela utilização de um planejamento completo: delineamento composto central – DCC, com três variáveis independentes. A corrente elétrica foi fixada em 0,3 A, e, as variáveis independentes utilizadas foram: pH, concentração de eletrólito e distância dos eletrodos.

Neste caso, o delineamento não será chamado rotacional, pois o valor de $\pm\alpha$ não será igual a $\pm\sqrt[4]{2^k}$. Para que o DCCR seja assumido, neste caso, o valor de $\pm\alpha$ deveria ser $\pm 1,68$, porém, como a variação da distância dos eletrodos não poderia seguir essa variação, devido à configuração do reator, foi assumido o valor de $\pm\alpha$ como ± 2 .

As variáveis, os níveis de significância e de remoção para cada analito, pelo processo de eletrocoagulação, podem ser observados na Tabela 23.

Tabela 23 - Matriz do DCC para a otimização das variáveis da eletrocoagulação para solução aquosa.

Item	Variáveis↓	Níveis→				
		-2	-1	0	+1	+2
X ₁	pH da amostra	3	5	7	9	11
X ₂	Concentração de eletrólito [NaCl] (mol L ⁻¹)	0	0,1	0,2	0,3	0,4
X ₃	Distância entre eletrodos (cm)	2	4	6	8	10

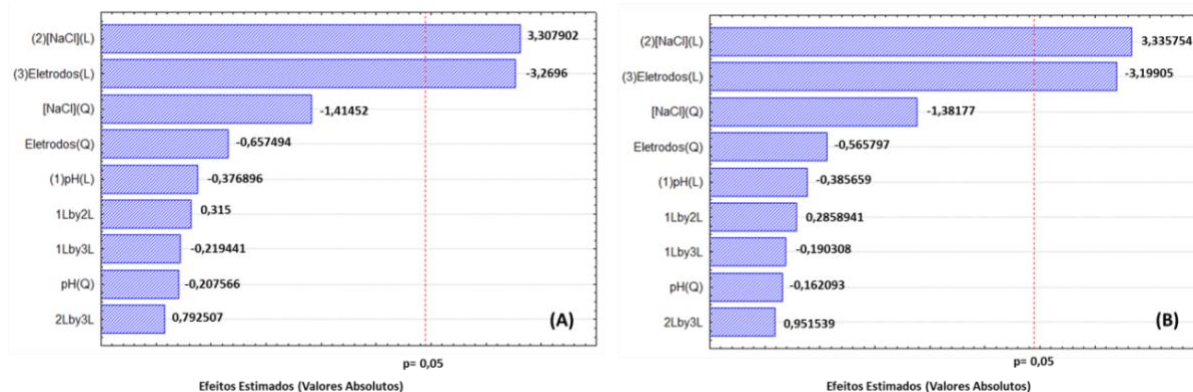
Exp.	pH da amostra	[NaCl]	Eletrodos	Rem. _{ATO} (%) [*]	Rem. _{SIN} (%) [*]
1	5	0,1	4	68,20	90,21
2	5	0,1	8	45,60	60,31
3	5	0,3	4	72,80	97,30
4	5	0,3	8	56,30	74,50
5	9	0,1	4	60,78	81,40
6	9	0,1	8	39,06	52,00
7	9	0,3	4	75,60	100,00
8	9	0,3	8	50,55	67,90
9	3	0,2	6	52,56	70,50
10	11	0,2	6	51,70	68,40
11	7	0	6	6,74	8,92
12	7	0,4	6	67,69	90,10
13	7	0,2	2	65,50	86,60
14	7	0,2	10	27,64	39,10
15	7	0,2	6	53,99	70,90
16	7	0,2	6	55,40	73,30

* A porcentagem de degradação foi calculada a partir de diminuição da área do pico cromatográfico.

A ANOVA foi utilizada para determinar os parâmetros relevantes para as variáveis de interesse. A ANOVA para ATO, em solução aquosa, apresentou r^2 igual a 0,80184, o que significa que 80,2% da variância total foi explicada pelo modelo; já, para SIN, em solução aquosa, o r^2 resultante foi de 0,79948, ou seja, 79,9% da variância total é explicada pelo modelo.

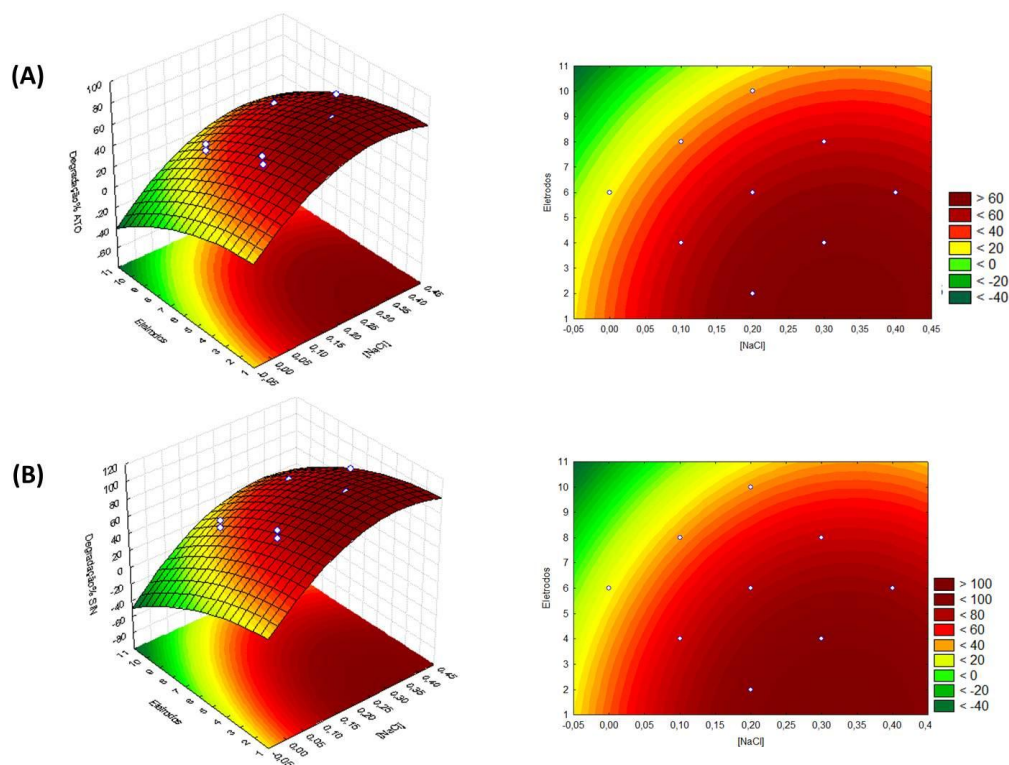
O diagrama de Pareto (Figura 35) mostra que as variáveis significativas para o processo de eletrocoagulação foram: concentração de NaCl e distância dos eletrodos. A concentração de NaCl teve efeito positivo, o que significa que a remoção das estatinas aumenta quando a concentração de NaCl é aumentada de 0,1 mol L⁻¹ (nível -1) para 0,3 mol L⁻¹ (nível +1). Já, a distância dos eletrodos, apresentou efeito negativo, ou seja, a remoção aumenta quando a distância entre os eletrodos é diminuída.

Figura 35 – Diagrama de Pareto para valores absolutos para a eletrocoagulação de (A) ATO e (B) SIN em solução aquosa. A linha vertical pontilhada define o nível de 95% de confiança; (L) significa variável linear e (Q) significa variável quadrática.



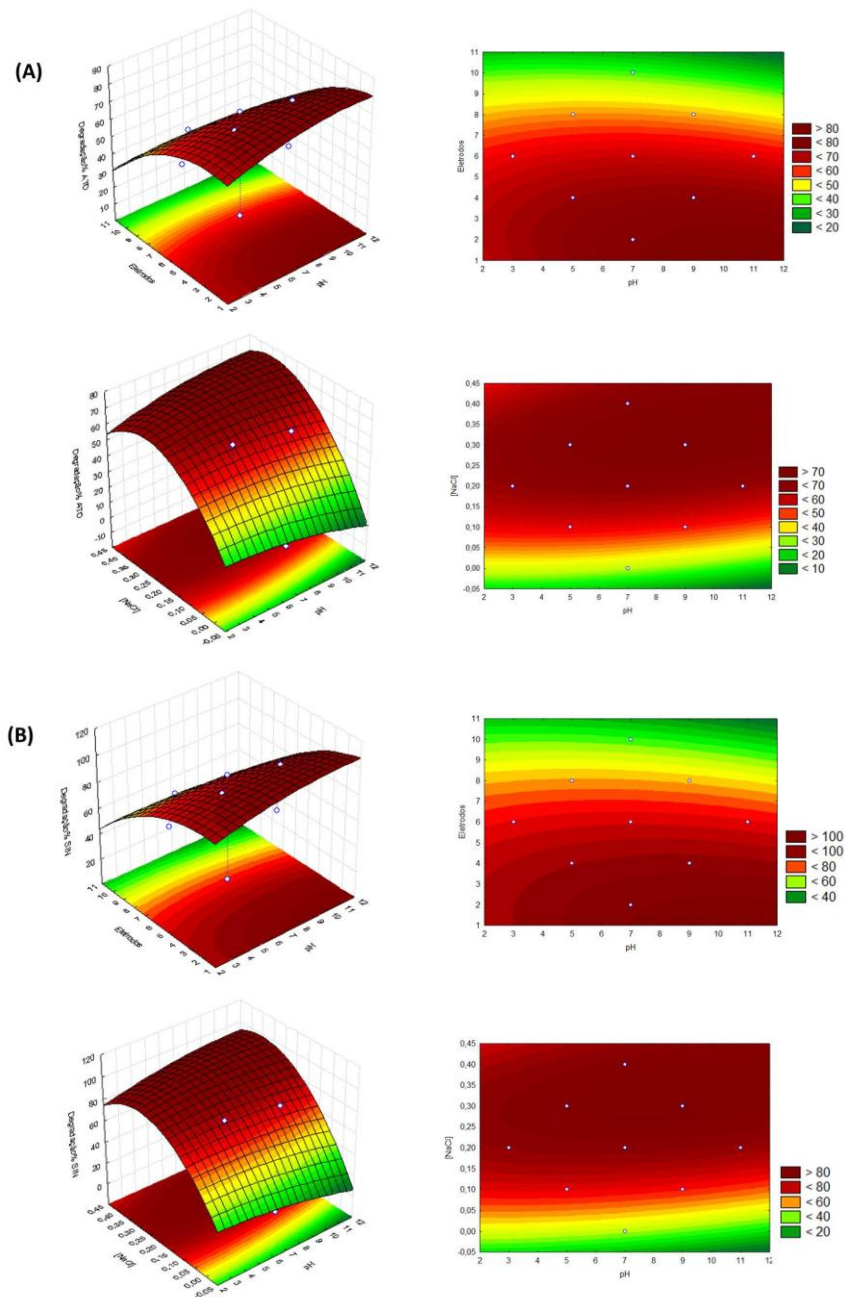
A Figura 36 representa a superfície de resposta para a remoção das estatinas em solução aquosa, em que estão correlacionadas as duas variáveis que apresentaram significância, segundo o diagrama de Pareto: distância dos eletrodos e concentração de eletrólito. É possível observar-se que as maiores remoções ocorreram quando se trabalhou com concentrações maiores de eletrólito e, também, em distância menores entre os eletrodos.

Figura 36 - Superfícies de resposta relacionadas à remoção por eletrocoagulação, em solução aquosa: Efeito combinado entre distância dos eletrodos e concentração de eletrólito. (A) ATO e (B) SIN.



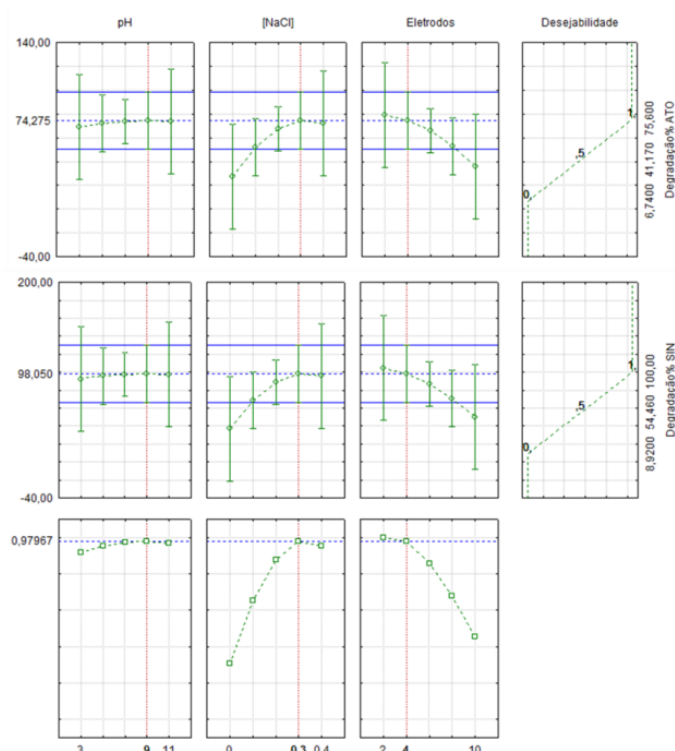
A Figura 37 confirma o diagrama de Pareto, e mostra que o pH da amostra não foi uma variável determinante na remoção das estatinas por eletrocoagulação em solução aquosa. Analisando-se os gráficos de superfície de resposta, verificam-se as variáveis que estão associadas a maiores remoções são, de fato, a distância dos eletrodos e a concentração de eletrólito; é possível observar-se que a máxima remoção segue um “linha” que abrange todos os valores de pH estudados.

Figura 37 - Superfícies de resposta relacionadas a remoção de estatinas em solução aquosa por eletrocoagulação: Efeito combinado entre distância dos eletrodos e o pH da amostra, e o efeito combinado entre [NaCl] e pH da amostra. (A) ATO e (B) SIN.



Os perfis das variáveis independentes em função da desejabilidade (Figura 38), para valores mínimo (0) e máximo (1) de remoção das estatinas, apontam que as melhores condições para a eletrocoagulação foram: pH da amostra 9, concentração de NaCl 0,3 mol L⁻¹ e distância dos eletrodos 4 cm.

Figura 38 - Perfil das variáveis independentes pH da amostra, concentração de eletrólito e distância dos eletrodos relacionados à desejabilidade da remoção das estatinas por eletrocoagulação em solução aquosa.



Observando os perfis de desejabilidade para remoção das estatinas por eletrocoagulação, esperava-se, segundo o modelo proposto, remoção de 74,3% para ATO e de 98,1% para SIN, em solução aquosa. Usando-se estas condições, obteve-se, na prática, remoção de 75,6% para ATO e de 100% para SIN. O ajuste do modelo, 0,97967, comprova que é capaz de prever as condições otimizadas de forma satisfatória.

4.7.2.2. DCC em Efluente Hospitalar

A Tabela 24 apresenta a matriz do DCC para eletrocoagulação de estatinas em efluente hospitalar.

Tabela 24 - Matriz do DCC para a otimização das variáveis de eletrocoagulação para efluente hospitalar.

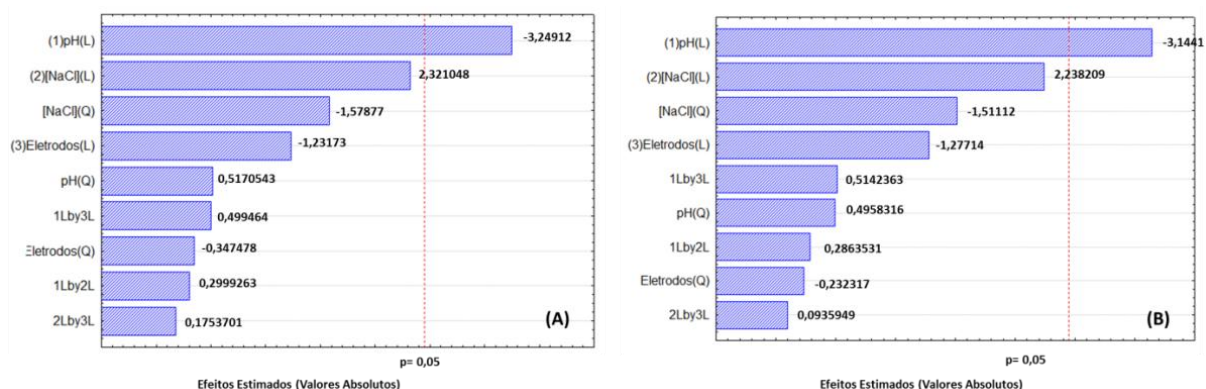
Item	Variáveis↓	Níveis→				
		-2	-1	0	+1	+2
X ₁	pH da amostra	3	5	7	9	11
X ₂	Concentração de eletrólito [NaCl] (mol L ⁻¹)	0	0,1	0,2	0,3	0,4
X ₃	Distância entre eletrodos (cm)	2	4	6	8	10
Exp.	pH da amostra	[NaCl]	Eletrodos	Rem. _{ATO} (%) [*]	Rem. _{SIN} (%) [*]	
1	5	0,1	4	66,67	94,90	
2	5	0,1	8	55,30	79,10	
3	5	0,3	4	69,42	97,90	
4	5	0,3	8	59,72	84,60	
5	9	0,1	4	42,83	60,41	
6	9	0,1	8	38,36	56,93	
7	9	0,3	4	49,26	70,41	
8	9	0,3	8	48,78	68,80	
9	3	0,2	6	70,90	100,00	
10	11	0,2	6	32,69	46,17	
11	7	0	6	7,40	10,60	
12	7	0,4	6	48,36	69,31	
13	7	0,2	2	49,48	73,60	
14	7	0,2	10	34,38	48,53	
15	7	0,2	6	45,37	65,90	
16	7	0,2	6	46,42	63,90	

* A porcentagem de degradação foi calculada a partir de diminuição da área do pico cromatográfico.

Os resultados da ANOVA para eletrocoagulação de efluente hospitalar demonstrou que, para ATO, 79% da variância total foi explicada pelo modelo, com r^2 de 0,79021; e, para SIN, 78% da variância total foi explicada pelo modelo, com r^2 de 0,77998.

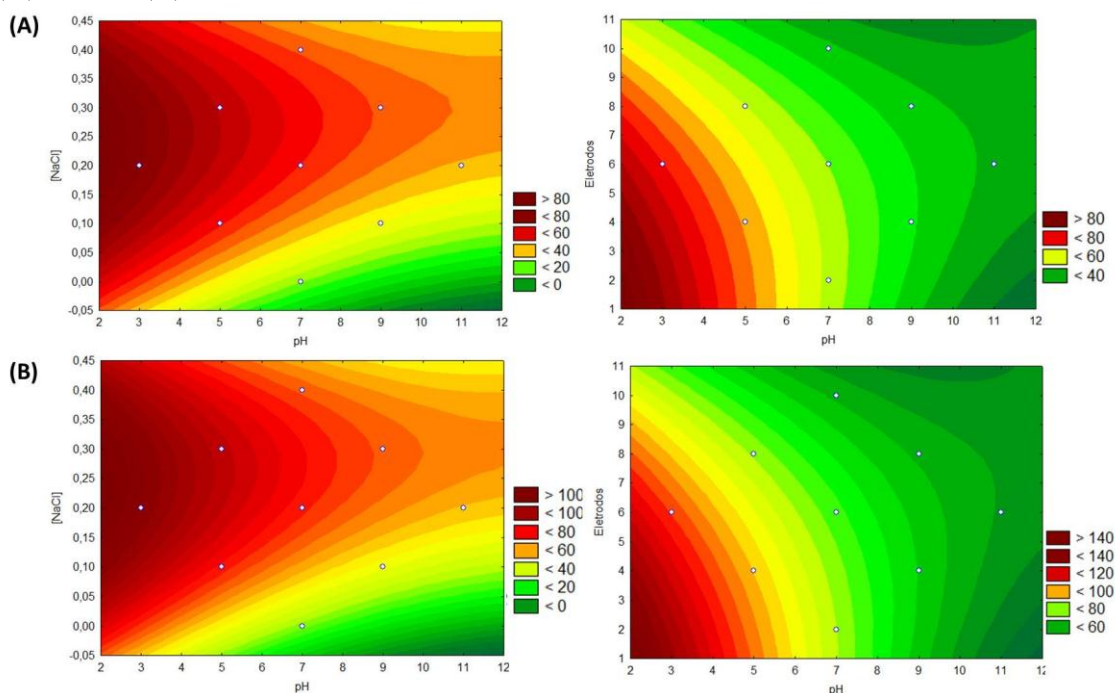
O diagrama de Pareto (Figura 39) apresenta a variável significativa para o processo de eletrocoagulação de estatinas em efluente. Segundo o diagrama, a variável que apresentou significância foi o pH da amostra; que teve efeito negativo, demonstrando que quanto menor o pH da amostra, maior é a taxa de remoção das estatinas no efluente hospitalar.

Figura 39 - Diagrama de Pareto para valores absolutos para a eletrocoagulação para (A) ATO e (B) SIN em efluente hospitalar. A linha vertical pontilhada define o nível de 95% de confiança; (L) significa variável linear e (Q) significa variável quadrática.



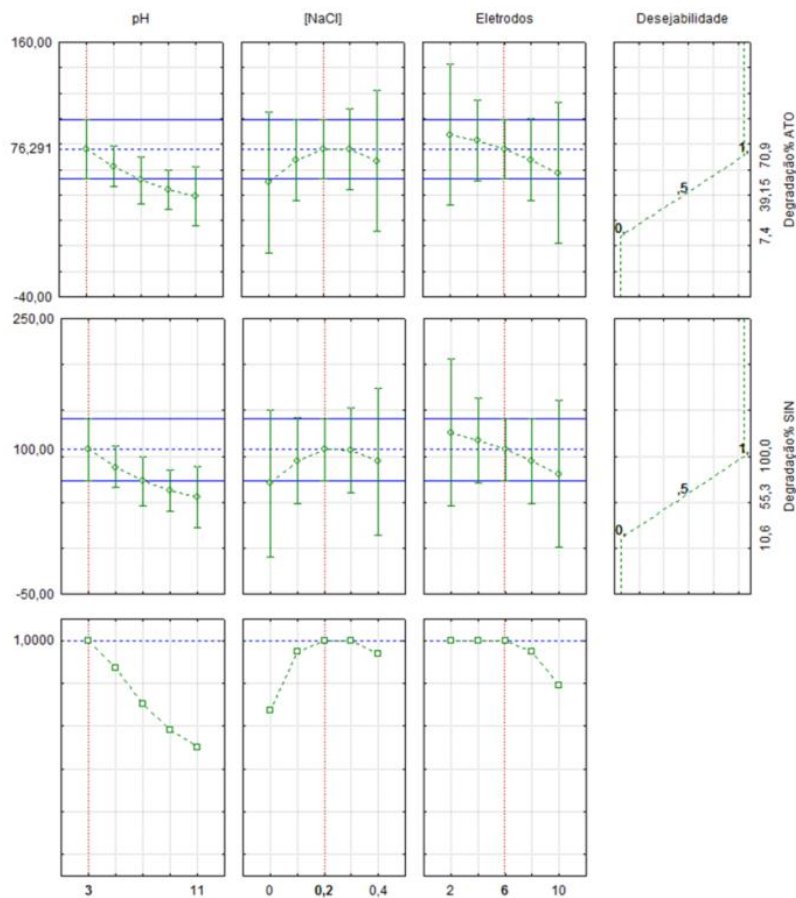
A Figura 40 apresenta as superfícies de resposta, representadas na forma de diagramas de contorno, para a eletrocoagulação das estatinas em efluente hospitalar; os diagramas apresentam a variável significativa do processo (pH) *versus* as demais variáveis – concentração de eletrólito e distância dos eletrodos. Facilmente se identifica o comportamento parecido para ATO (A) e SIN (B); maiores remoções estão associadas a pH ácido. Mais uma vez observa-se que maiores concentrações de eletrólito e menor distância entre os eletrodos estão ligadas a maior remoção dos analitos.

Figura 40 – Diagrama de contorno para eletrocoagulação das estatinas em efluente hospitalar. (A) ATO e (B) SIN.



Os perfis das variáveis independentes em função da desejabilidade (Figura 41), para valores mínimo (0) e máximo (1) de remoção das estatinas em efluente hospitalar, apontam que as melhores condições para a eletrocoagulação foram: pH da amostra 3, concentração de NaCl 0,2 mol L⁻¹ e distância dos eletrodos 6 cm.

Figura 41 - Perfil das variáveis independentes pH da amostra, concentração de eletrólito e distância dos eletrodos relacionados à desejabilidade da remoção das estatinas por eletrocoagulação em efluente hospitalar.



Os perfis de desejabilidade para a remoção das estatinas por eletrocoagulação em efluente hospitalar apontam remoção de 76,3% para ATO e de 100% para SIN, em efluente hospitalar. Com as condições otimizadas acima, na prática, obteve-se remoção de 70,9% para ATO e 100% para SIN. O ajuste do modelo (1,0000) prevê satisfatoriamente as condições ótimas para a eletrocoagulação em efluente hospitalar.

4.7.2.3. *Influência da concentração de eletrólito*

O uso de NaCl como eletrólito aumenta a condutividade da água ou do efluente a ser tratado. A condutividade está diretamente relacionada com a ação da eletrólise, pois, quanto maior a condutividade maior será a transmissão de corrente (BENSADOK *et al.*, 2008; OTENIO *et al.*, 2010).

A variável que apresentou maior significância na eletrocoagulação das estatinas em solução aquosa foi a concentração de eletrólito; as melhores remoções estão associadas a concentração de $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl.

Embora a concentração de eletrólito não tenha sido considerada uma variável significativa na eletrocoagulação em efluente hospitalar, maiores remoções estão associadas à concentração de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl.

O efluente hospitalar é uma matriz muito complexa, isso significa que, muitos outros compostos e íons estão presentes, considerado em sua totalidade, o que faz com que a concentração de NaCl, necessária para que ocorra a eletrólise, seja algo menor que em solução aquosa.

A utilização de NaCl apresenta, também, outras vantagens; os íons cloreto podem reduzir os efeitos adversos causados pela presença de outros íons, como, por exemplo, carbonato e sulfato. A existência de íon carbonato leva à precipitação do íon Ca^{2+} , que forma uma camada isolante na superfície do cátodo (DANESHVAR *et al.*, 2006).

4.7.2.4. *Influência do pH da amostra*

O pH é um fator de influência importante para o processo de eletrocoagulação. Dependendo do tipo de eletrodo, o pH do meio pode sofrer alterações durante o processo. Por outro lado, a eletrocoagulação apresenta também uma capacidade de tamponamento, especialmente em meio alcalino, o que evita alterações em pH elevado (BAYRAMOGLU *et al.*, 2004; GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2015).

Bayramoglu *et al.* (2004) demonstraram os valores de pH associados ao material do eletrodo, comparando eletrodos compostos de ferro e alumínio. Concluíram que, para eletrodos de alumínio, as maiores eficiências de remoção são obtidas em pH ácido, enquanto que no de ferro, pH neutro ou fracamente alcalino é mais eficiente. Já García-García *et al.*

(2015), utilizaram eletrodos de cobre no processo de eletrocoagulação e obtiveram melhores resultados utilizando pH 4.

A remoção das estatinas em solução aquosa (pH 9) apresentou comportamento contraditório ao esperado, já, que, a eletrocoagulação apresenta maior eficiência em pH ácido quando utilizando-se eletrodos de alumínio; já, em efluente hospitalar, o pH 3 demonstrou maior eficiência, estando assim, de acordo com o que foi referenciado acima.

4.7.2.5. *Influência da distância dos eletrodos*

Para a eletrocoagulação de estatinas em solução aquosa, uma das variáveis significativas no processo foi a distância dos eletrodos. Como foi demonstrado no diagrama de Pareto (Figura 35), esta variável apresentou afeito negativo, ou seja, quanto menor a distância dos eletrodos, maior a eficiência de remoção.

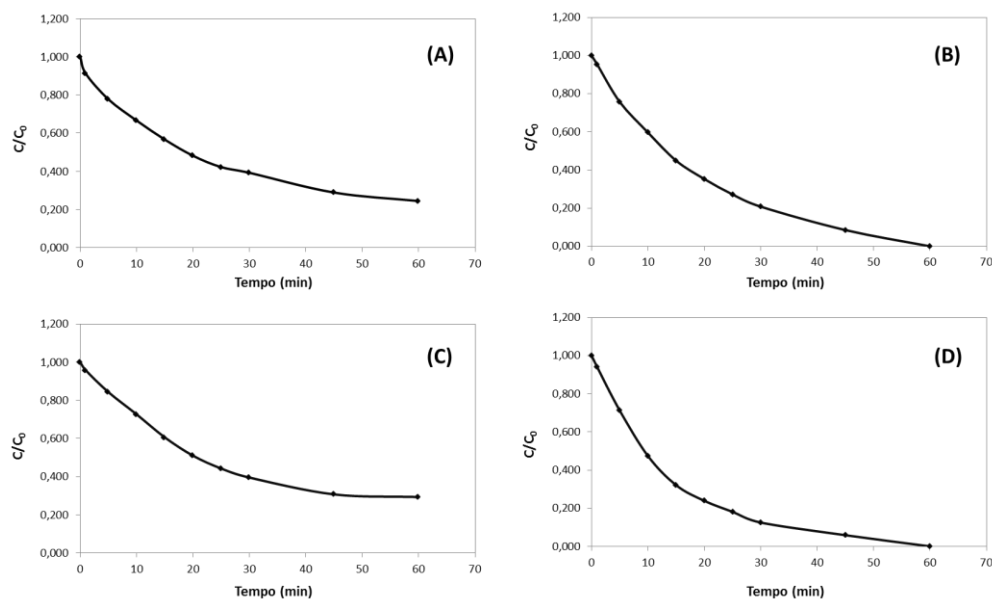
Gatsios *et al.* (2015) analisaram o efeito da distância dos eletrodos na remoção de metais em águas residuais, sob uma corrente constante de 0,3 A, com diferentes combinações de eletrodos. Seus resultados apontaram que as melhores remoções foram obtidas com distâncias menores entre eletrodos.

4.7.2.6. *Estudo cinético da Eletrocoagulação*

A partir das condições ótimas resultantes do DCC aplicado para a eletrocoagulação, foi feito o estudo cinético para a remoção das estatinas em solução aquosa e em efluente hospitalar. Ao todo, foram coletadas 10 alíquotas, em diferentes intervalos de tempo: 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 e 60 minutos.

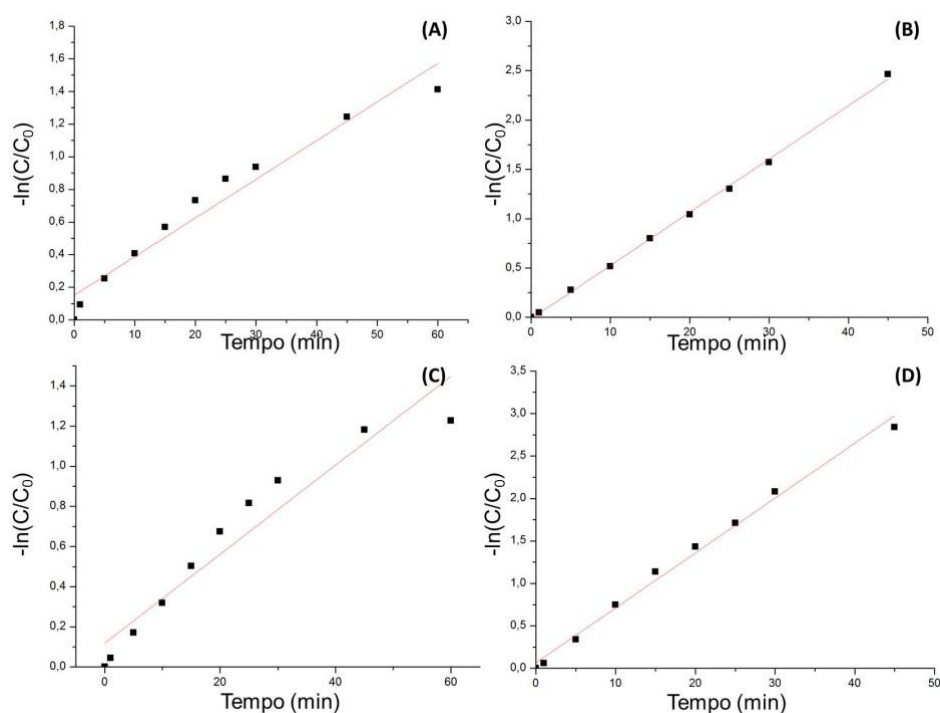
A Figura 42 apresenta o decaimento da concentração das estatinas no processo de eletrocoagulação no decorrer do tempo; a partir dos resultados, investigou-se a ordem da reação.

Figura 42 – Decaimento da concentração das estatinas em função do tempo em solução aquosa: (A) ATO e (B) SIN; e em efluente hospitalar: (C) ATO e (D) SIN.



A partir da Equação 21 foi construído o gráfico de $\ln\left(\frac{C_0}{C}\right)$ em função do tempo, assim, utilizando-se o coeficiente angular da equação da reta, determinou-se a constante da velocidade da reação. Os gráficos de $\ln\left(\frac{C_0}{C}\right)$ versus o tempo para as estatinas em solução aquosa e efluente hospitalar estão apresentados na Figura 43.

Figura 43 – Cinética de reação para remoção de estatinas por eletrocoagulação em solução aquosa: (A) ATO e (B) SIN; e em efluente hospitalar: (C) ATO e (D) SIN.



A análise do decaimento da concentração em função do tempo (Figura 42) e da curva $-\ln\left(\frac{c}{c_0}\right)$ versus tempo (Figura 43) confirma que a reação é de primeira ordem. Na Tabela 25 são apresentados os coeficientes de regressão, constantes cinéticas e tempo de meia vida para as estatinas em solução aquosa e efluente hospitalar, obtidos a partir dos gráficos apresentados acima.

Tabela 25 – Parâmetros otimizados na eletrocoagulação de estatinas em solução aquosa e efluente hospitalar.

Analito	Solução aquosa			Efluente hospitalar		
	k (min^{-1}) ¹	R^2	$t_{1/2}$ (min) ²	k (min^{-1})	R^2	$t_{1/2}$ (min)
ATO	$2,4 \times 10^{-2}$	0,9543	29,2	$2,2 \times 10^{-2}$	0,9249	31,2
SIN	$5,4 \times 10^{-2}$	0,9988	12,8	$6,5 \times 10^{-2}$	0,9928	11,8

¹ Constante cinética. ² Tempo de meia-vida.

4.7.3. Comparação entre os processos utilizados para degradação/remoção de estatinas

Diversos parâmetros podem ser utilizados na comparação dos diferentes processos de degradação/remoção; dados de cinética de velocidade de reação podem ser usados, uma vez que diversos processos podem ser englobados por esse parâmetro (WILDE, 2011).

Entre os processos de degradação/remoção utilizados, a ozonização apresentou constantes cinéticas menores que os alcançados com a eletrocoagulação, o que demonstra que a degradação/remoção das estatinas ocorreu de forma mais rápida no primeiro processo citado.

O ozônio é um oxidante forte ($E^\circ = 2,07$ eV) que se decompõe em água para formar o radical hidroxil ($E^\circ = 2,80$ eV), assim, a ozonização é capaz de remover contaminantes muito complexos em minutos. Já no processo de eletrocoagulação a formação do radical hidroxil se dá através de reações eletroquímicas, e, em muitos casos, ocorre apenas a mudança de fase do contaminante. Neste caso, os contaminantes migram para o floco formado, onde ficam em uma espécie de “armadilha de contaminantes”.

Para os dois processos utilizados a SIN foi degradada/removida mais rapidamente do que a ATO; isso pode ser explicado quando suas estruturas são avaliadas. A ATO apresenta

uma estrutura muito mais complexa, apresentando anéis aromáticos e ligações com nitrogênio e flúor.

5. CONCLUSÕES

Os métodos de extração desenvolvidos apresentaram boas taxas de recuperação, com destaque para a microextração dispersiva líquido-líquido: uma nova opção para a extração de estatinas em efluentes (aqui, hospitalar). As taxas de recuperação da SPE foram de 95,8% ($\pm 0,7\%$) para ATO e 83,2% ($\pm 1,3\%$) para SIN em solução aquosa; e, 92,0% ($\pm 8,0\%$) para ATO e 81,5% ($\pm 3,0\%$) para SIN em efluente hospitalar. Já para a DLLME as taxas de recuperação foram de 86,5% ($\pm 2,7\%$) para ATO e 89,4% ($\pm 0,4\%$) para SIN em solução aquosa; e, 83,0% ($\pm 1,7\%$) para ATO e 83,1% ($\pm 2,0\%$) para SIN em efluente hospitalar.

O método cromatográfico desenvolvido para a quantificação de ATO e SIN, também, se mostrou adequado aos propósitos, com curva de calibração ($r^2 > 0,996$), seletivo, rápido (< 10 min) e com limites de detecção satisfatórios (DAD ~ 15 - $25 \mu\text{g L}^{-1}$).

As concentrações das estatinas medidas no efluente hospitalar ($27,9$ a $36,7 \mu\text{g L}^{-1}$) são relativamente altas considerando-se outros fármacos já analisados no grupo de pesquisa; mas deve-se levar em conta que as estatinas são de largo e contínuo uso, sendo não apenas oriundas de medicamentos providos pelo HUSM, mas, e principalmente, por meio de aquisição externa ao hospital.

A análise de risco teórica, preliminar, utilizando-se os valores de BCF e de QR (PEC/PNEC) como indicadores, assevera que as estatinas oferecem baixo e moderado risco. Porém, usando-se a razão MEC/PNEC, calculada, chega-se a um valor para QR > 2000 , o que, definitivamente, demonstra que a concentração global de estatinas no efluente do HUSM representa potencial risco aos ecossistemas.

Os dois processos utilizados na remoção/degradação das estatinas se mostraram adequados para ATO e SIN, com destaque para a ozonização, que apresentou maior eficiência de degradação. A ozonização levou à total degradação de ATO em 20 min de reação ($k = 5,7 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$) e, de SIN, em 4 min ($k = 9,8 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$). Já, a EC chegou a 70,9% de remoção de ATO em 60 min de reação ($k = 2,2 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$) e de 100% de remoção de SIN ($k = 6,5 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$).

A utilização de ferramenta multivariada, baseada na Metodologia de Superfície de Resposta (RSM), permitiu a otimização eficiente das variáveis experimentais da DLLME e da EC, com economia de muitos experimentos, tempo e gastos desnecessários.

6. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

- Desenvolver novas metodologias de microextração de estatinas em efluente hospitalar.
- Investigar metabólitos e subprodutos gerados nos processos utilizados na degradação das estatinas.
- Aplicar outros processos avançados de oxidação para degradação de estatinas.
- Estudar biodegradabilidade e toxicidade das estatinas e seus subprodutos.
- Comparar a degradação das estatinas com a utilização de outros reatores de PAOs.
- Estudar testes de toxicidade para estatinas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, C. A. A., BRENNER, C. G. B., MINETTO L., MALLMANN, C. A., MARTINS, A. F., Determination of anti-anxiety and anti-epileptic drugs in hospital effluent and a preliminary risk assessment, **Chemosphere**, v. 93, p. 2349-2355, 2013.

ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

APHA-AWWA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 21th ed., American Public Health Association, USA, 2012.

ARANDES, M. M. R. **Avaliação de risco ambiental de produtos farmacêuticos na Catalunha**. Universidade Autônoma de Barcelona: Faculdade de Ciências, 2009.

ARSAND, D. R. 2010. **Anti-inflamatório Dexametasona: Estudos de biodegradabilidade, ecotoxicidade, ocorrência e degradação oxidativa avançada em efluente hospitalar**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, RS.

BALCIOGLU, A., ÖTKER, M.. Treatment of pharmaceutical wastewater containing antibiotics by O₃ and O₃/H₂O₂ processes. **Chemosphere**, v. 50, p. 85–95, 2003.

BARIŞCI S., ULU F., SILLANPÄÄ M., DIMOGLO A., Evaluation of flurbiprofen removal from aqueous solution by electrosynthesized ferrate(VI) ion and electrocoagulation process, **Chemical Engineering Journal**, v. 262, p. 1218-1225, 2015.

BAUR, L., 2012. **Estudo e identificação de nitrogênio em efluente de curtume**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul

BAYRAMOGLU, M., KOBYA, M., CAN, O. T., SOZBIR, M., Operating cost analysis of electrocoagulation of textile dye wastewater, **Separation and Purification Technology**, v.e 37, p. 117-125, 2004.

BENSADOK, K., BENAMMAR, S. F., LAPICQUE, G. N., Electrocoagulation of cutting oil emulsions using aluminium plate electrodes, **Journal of Hazardous Materials**, v. 152, p. 423-430, 2008.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965–77, 2008. 2014.

BRENNER, C. G. B. 2009. **Antimicrobiais Sulfametoxazol e Trimetoprima em Efluente Hospitalar: Determinação, Degradação através de Eletrocoagulação e Identificação de Subprodutos**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, RS.

BRENNER, C. G. B. 2013. **Antiandrogênio em efluente hospitalar: extração com barras poliméricas, quantificação, identificação de metabólitos e subprodutos, proposição de**

rotas de degradação por processos avançados de oxidação. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, RS.

BUTLER, E., HUNG, Y.-T., YEH, R.Y.-L., AL AHMAD, M.S. Electrocoagulation in wastewater treatment. **Water**, v. 3, p. 495–525, 2011.

CALDAS, S. S., GONÇALVES, F. F., PRIMEL, E. G., PRESTES, O. D., MARTINS, M. L., ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, p 1604-1617, 2011.

CAMEL V., Solid phase extraction of trace elements, **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 58, p. 1177-1233, 2003.

CELANO, R., PICCINELLI, A. L., CAMPONE, L. RASTRELLI, L. Ultra-preconcentration and determination of selected pharmaceutical and personal care products in different water matrices by solid phase extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction prior to ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis. **Journal of Chromatography A**. v. 1355, p. 26-35, 2014.

CERMOLA, F.; DELLAGRECA, M.; IESCE, M. R.; *et al.* Photochemical behavior of the drug atorvastatin in water. **Tetrahedron**, v. 62, n. 31, p. 7390–7395, 2006.

CERMOLA, F.; DELLAGRECA, M.; IESCE, M. R.; *et al.* Irradiation of fluvastatin in water. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 189, n. 2-3, p. 264–271, 2007.

CHANG CHEN, H., HSIEN DING, W., Determination of aqueous fullerene aggregates in water by ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction with liquid chromatography–atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, v. 1223, p. 15-23, 2012.

CHEN H., DING W., Determination of aqueous fullerene aggregates in water by ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction with liquid chromatography–atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, v. 1223, p. 15-23, 2012.

CHRISTEN V., HICKMANN S., RECHENBERG B., FENT K., Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems: A concept for their identification based on their mode of action, **Aquatic Toxicology**, v. 96, p. 167-181, 2010.

COLLADO, N.; RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; GROS, M.; *et al.* Pharmaceuticals occurrence in a WWTP with significant industrial contribution and its input into the river system. **Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)**, v. 185, p. 202–12, 2014.

DANESHVAR, N., OLADEGARAGOZE, A., DJAFARZADEH, N., Decolorization of basic dye solutions by electrocoagulation: An investigation of the effect of operational parameters, **Journal of Hazardous Materials**, v. 129, p. 116-122, 2006.

DOLBIER, W. R. J. Fluorine chemistry at the millennium. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 126, p. 157-163, 2005.

EMA & European Medicines Agency, 2006. **Committee for medicinal products for human use (CHMP). Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/4447/00.** Disponível em: www.emea.europa.eu/pdfs/human/swp/444700en.pdf. Acesso em: abril de 2015.

EUROPEAN COMMISSION. **Technical Guidance Document on Risk Assessment. Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market Part II.** 2003.

EVGENIDOU E. N., KONSTANTINOOU I. K., LAMBROPOULOU D. A., Occurrence and removal of transformation products of PPCPs and illicit drugs in wastewaters: A review, **Science of The Total Environment**, v. 505, p. 905-926, 2015.

FONSECA, F. A. H. Farmacocinética das estatinas Pharmacokinetics of statins. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, p. 9–14, 2005.

GARCÍA-GARCÍA, A., MARTÍNEZ-MIRANDA, V., IVÁN, G. MARTÍNEZ-CIENFUEGOS, ALMAZÁN-SÁNCHEZ, P. T., CASTAÑEDA-JUÁREZ, M., LINARES-HERNÁNDEZ, I., Industrial wastewater treatment by electrocoagulation–electrooxidation processes powered by solar cells, **Fuel**, v. 149, p. 46-54, 2015.

GATSIOS, E., HAHLADAKIS, J. N. GIDARAKOs E., Optimization of electrocoagulation (EC) process for the purification of a real industrial wastewater from toxic metals, **Journal of Environmental Management**, v. 154, p. 117-127, 2015.

GINEBREDÁ, A., MUÑOZ, I., LÓPEZ DE ALDA, M., BRIX, R., LÓPEZ-DOVAL, J., BARCELÓ, D. Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: Relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain), **Environment International**, v. 36, p. 153-162, 2010.

GÓMEZ, M. J.; PETROVIĆ, M.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R.; BARCELÓ, D. Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. **Journal of chromatography. A**, v. 1114, n. 2, p. 224–33, 2006.

GOTTSCHALK, C., LIBRA, J. A.; SAUPE, A. Ozonation of water and waste water. WILEY-VCH, Alemanha: 2004.

GRUBBS, F. E., Procedure of detecting outlying observations in samples. **Taylor & Francis Groups**. v. 11, p. 1-21, 1969.

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

HERNANDO, M. D., AGÜERA, A.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. LC-MS analysis and environmental risk of lipid regulators. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, p.1269-85, 2007.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos - DOQ-CGCRE-008**, 2011.

JARDIM I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n.º.1, p. 13-25, 2010.

KANJI, G. K. **100 Statistical Tests**. SAGE Publications Ltd: London, 3rd Edition, 2006.

KASIRI, M. B., ALEBOYEH, H., ALEBOYEH, A. Modeling and Optimization of Heterogeneous Photo-Fenton Process with Response Surface Methodology and Artificial Neural Networks. **Environ. Sci. Technol.** v. 42, p. 7970–7975, 2008.

KIRK, K. L. Fluorine in medicinal chemistry: Recent therapeutic applications of fluorinated small molecules. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 127, p. 1013 - 1029, 2006.

KLAVARIOTI M., MANTZAVINOS D., KASSINOS D., Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes, **Environment International**, v.35, p. 402-417, 2009.

KRACUN, M.; KOCIJAN, A.; BASTARDA, A.; *et al.* Isolation and structure determination of oxidative degradation products of atorvastatin. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 50, n. 5, p. 729–36, 2009.

KRUBE A., REBANE R., KIPPER K., OLDEKOP M., EVARD H., HERODES K., RAVIO P., LEITO I., Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I, **Analytica Chimica Acta**, v. 870, p. 29-44, 2015.

LANGFORD, K. H.; THOMAS, K. V. Determination of pharmaceutical compounds in hospital effluents and their contribution to wastewater treatment works. **Environment international**, v. 35, n. 5, p. 766–70, 2009.

LEE, H.-B.; PEART, T. E.; SVOBODA, M. L.; BACKUS, S. Occurrence and fate of rosuvastatin, rosuvastatin lactone, and atorvastatin in Canadian sewage and surface water samples. **Chemosphere**, v. 77, n. 10, p. 1285–91, 2009.

LEONARD, C., FERRASSE, J.-H. BOUTIN, LEFEVRE, O. S., VIAND, A. Bubble column reactors for high pressures and high temperatures operation, **Chemical Engineering Research and Design**, v. 100, p. 391-421, 2015.

LI, K., YEDILER, A., YANG, M., SCHULTE-HOSTEDE, S., WONG, M. H., Ozonation of oxytetracycline and toxicological assessment of its oxidation by-products, **Chemosphere**, v. 72, p. 473-478, 2008.

MAHMOUD, A. 2006. **Avaliação de métodos emergentes visando aumentar a eficiência do ozônio na mineralização do azocorante Preto Remazol B**. (Dissertação de mestrado) Universidade de São Paulo.

MAPA. Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica, 2011.

MARTÍN, J.; BUCHBERGER, W.; ALONSO, E.; HIMMELSBACH, M.; APARICIO, I. Comparison of different extraction methods for the determination of statin drugs in wastewater and river water by HPLC/Q-TOF-MS. **Talanta**, v. 85, n. 1, p. 607–15, 2011.

MARTINS, A. F.; VASCONCELOS, T. G.; WILDE, M. L. Influence of variables of the combined coagulation-Fenton-sedimentation process in the treatment of trifluraline effluent. **Journal of hazardous materials**, v. 127, n. 1-3, p. 111–9, 2005.

MARTINS, M. L., PRIMEL, E. G., CALDAS, S. S., PRESTES, O. D., ADAIME, M. B., ZANELLA, R. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica** 4(1):35-51, 2012.

MATHESWARAN, M., SHIK MOON I., Influence parameters in the ozonation of phenol wastewater treatment using bubble column reactor under continuous circulation, **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 15, p. 287-292, 2009.

MAYER, F. M, 2013. **Parabenos em efluente hospitalar: Quantificação e identificação de metabólitos e subprodutos de oxidação avançada**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, RS.

MENDONÇA, L. A, 2012. **desempenho de delineamento composto central em experimentos com alti coeficiente de variação**. Dissertação (Mestrado em Estatística e Biometria) - Universidade de Viçosa.

MENDOZA, A; LÓPEZ DE ALDA, M.; GONZÁLEZ-ALONSO, S.; *et al.* Occurrence of drugs of abuse and benzodiazepines in river waters from the Madrid Region (Central Spain). **Chemosphere**, v. 95, p. 247–55, 2014.

MERMA, A. G. (2008) **Eletrocoagulação aplicada a meios aquosos contendo óleo**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais e Metalurgia) - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

MIAO, X.; METCALFE, C. D. Determination of cholesterol-lowering statin drugs in aqueous samples using liquid chromatography – electrospray ionization tandem mass spectrometry. , v. 998, p. 133–141, 2003.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Guia de validação e controle de qualidade analítica : fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários**. Brasília : Mapa/ACS, 2011.

MOHAMMAD, Y.A., MOLLAH, P. M., JEWEL, A.G. GOMES, M. K., PARGA, J, COCKE, D.L., Fundamentals, present and future perspectives of electrocoagulation, **Journal of Hazardous Materials**, v. 114, p. 199-210, 2004.

MONTGOMERY, D.C.. **Design and analysis of experiments** 5th ed., N.Y.: John Wiley & Sons, 2001.

NIROGI, R.; MUDIGONDA, K.; KANDIKERE, V. Chromatography-mass spectrometry methods for the quantitation of statins in biological samples. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 44, n. 2, p. 379–87, 2007.

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

NUNES, N.M, 2010. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica do teor de Atorvastatina Cálcica em insumo farmacêutico ativo em comprimido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária). Fundação Osvaldo Cruz.

O HUSM. Disponível em: <<http://www.husm.ufsm.br>>. Acesso em: 16/1/2014.

ORTIZ DE GARCÍA, S.; PINTO PINTO, G.; GARCÍA ENCINA, P.; IRUSTA MATA, R. Consumption and occurrence of pharmaceutical and personal care products in the aquatic environment in Spain. **The Science of the total environment**, v. 444, p. 451–65, 2013.

OLIVEIRA, T. S.; MURPHY M.; MENDOLA N.; WONG V.; CARLSON D.; WARING L. Characterization of Pharmaceuticals and Personal Care products in hospital effluent and waste water influent/effluent by direct-injection LC-MS-MS, **Science of The Total Environment**, v. 518–519, p. 459-478, 2015.

OTENIO, M. H.; PANCHONI, L. C.; CRUZ, G. C. A.; RAVANHANI, C.; BIDOIA, E. D.; Avaliação (em escala laboratorial) da aplicação do processo eletrolítico em efluente de lagoa de estabilização de esgoto urbano. **Química Nova**, v. 31, p. 508, 2008.

PADILLA-ROBLES, B.G., ALONSO, A., MARTÍNEZ-DELGADILLO, S.A., GONZÁLEZ-BRAMBILA, M., JAÚREGUI-HAZA, U.J., RAMÍREZ-MUÑOZ, J., Electrochemical degradation of amoxicillin in aqueous media, **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 94, p. 93-98, 2015.

PAIVA, O. J. M, 2009. **Estudo ecotoxicológico de medicamentos e outros químicos de Farmácias**. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade de Aveiro, Portugal.

PAL, R.; MEGHARAJ, M.; KIRKBRIDE, K. P.; NAIDU, R. Illicit drugs and the environment — A review. **Science of The Total Environment**, v. 463-464, p. 1079–1092, 2013.

PAVLOVIĆ D. M., BABIĆ S., HORVAT A. J. M., KAŠTELAN-MACAN M., Sample preparation in analysis of pharmaceuticals, **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26,p. 1062-1075, 2007.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L. DE; NAGATA, N. Por que otimização multivariada. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, p. 106–110, 2005.

PETROVIĆ, M.; HERNANDO, M. D.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, n. 1-2, p. 1–14, 2005.

PIECHA, M.; SARAKHA, M.; TREBŠE, P. Photocatalytic degradation of cholesterol-lowering statin drugs by TiO₂-based catalyst. Kinetics, analytical studies and toxicity

evaluation. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 213, n. 1, p. 61–69, 2010.

Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: maio de 2015.

REZAEI, M., ASSADI, Y., HOSSEINI, M. R. M., AGHAEE, E., AHMADI, F., BERIJANI, S., Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction, **Journal of Chromatography A**, v. 1116, p. 1-9, 2006.

REZAEI M., YAMINI Y., FARAJI M., Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method, **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2342-2357, 2010.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, Vol. 27, No. 5, 771-780, 2004

RODAYAN A., SEGURA P. A., YARGEAU V., Ozonation of wastewater: Removal and transformation products of drugs of abuse, **Science of The Total Environment**, v. 487, p. 763-770, 2014.

ROSAL R., RODRÍGUEZ A., PERDIGÓN-MELÓN J. A., PETRE A., GARCÍA-CALVO E., GÓMEZ M. J., AGÜERA A., FERNÁNDEZ-ALBA A. R., Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation, **Water Research**, v. 44, , p. 578-588, 2010.

SANTOS, J. E. 2008. **Difusão e cinética de decomposição de ozônio no processo de fumigação de grãos de milho (*Zea mays*)**. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, MG.

SANTOS, L. H. M. L. M.; GROS, M.; RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; *et al.* Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: identification of ecologically relevant pharmaceuticals. **The Science of the total environment**, v. 461-462, p. 302–16, 2013.

SILVA, D. S. DA, 2012. **BTEX: Desenvolvimento de barras de extração sortiva, determinação em efluente hospitalar e degradação por meio de fotocatalise heterogênea com Tio₂ suportado em polímeros**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, RS.

SILVA, T. D, 2009. **DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E DE FORMULAÇÕES PARA ESTATINAS**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Minas Gerais.

SIMONS, J. The 10 billion pill. **Fortune Magazine**, 2003.

TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT ON RISK ASSESSMENT – TGD (2003) IN SUPPORT OF COMMISSION DIRECTIVE 93/67/EEC, Commission Regulation (EC) No 1488/94 and Directive 98/8/EC. European Commission – Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Chemicals Bureau (ECB). Disponível em: <https://echa.europa.eu/documents/10162/16960216/tgdpart2_2ed_en.pdf>. Acesso em: agosto de 2015.

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.

VANDERFORD, B. J.; SNYDER, S. A. Analysis of pharmaceuticals in water by isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Environmental Science Technology**, v. 40, p. 7312 - 7320, 2006.

VERLICCHI, P.; GALLETI, A.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options. **Journal of Hydrology**, v. 389, n. 3-4, p. 416-428, 2010.

VERLICCHI P., AL AUKIDY M., ZAMBELLO E., What have we learned from worldwide experiences on the management and treatment of hospital effluent? — An overview and a discussion on perspectives, **Science of The Total Environment**, v. 514, p. 467-491, 2015.

VON GUNTEN, U., Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation, **Water Research**, v. 37, p. 1443-1467, 2015.

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., MONTIPÓ S., MARTINS A. F., Degradation of β -blockers in hospital wastewater by means of ozonation and Fe^{2+} /ozonation, **Water Reserch**, v. 48, p. 280-295, 2014.

APÊNDICES

**APÊNDICE A – TESTE DE CONTROLE DE QUALIDADE DE MATÉRIA PRIMA
DOS PADRÕES**

Composto Atorvastatina Cálcica
Condições de armazenagem Temperatura ambiente

Tabela 26 - Teste de Controle de qualidade ATO

Teste	Especificação	Resultado
Descrição	Pó cristalino branco a quase branco	Pó cristalino quase branco
Solubilidade	Facilmente solúvel em metanol; pouco solúvel em ácido absoluto; muito pouco solúvel em água; em tampão fosfato pH 7,4 e em acetonitrila; insolúvel em soluções aquosas com pH abaixo de 4	Conforme
Identificação	IV – O aspecto da amostra esta de acordo com o padrão	Conforme
Umidade	Positivo para cálcio 3,5% - 5,5%	Conforme 4,8%
Metais pesados	≤ 20 ppm	< 20 ppm
Substâncias relacionadas	Impureza A ≤ 0,3% Impureza B ≤ 0,3% Impureza C ≤ 0,3% Impureza D ≤ 0,1% Impurezas desconhecidas ≤ 0,1% Total ≤ 1,0%	0,10% 0,07% Não detectado 0,02% 0,10% 0,55%
Pureza enantiomérica	≤ 0,3%	0,05%
Solventes residuais	Etanol ≤ 5000 ppm N-hexano ≤ 290 ppm Tolueno ≤ 890 ppm	47,93 ppm Não detectado Não detectado
Teor (base anidra)	98,0% - 102,0%	98,91%
Densidade aparente	Sem comparação	0,30 g mL ⁻¹
Parecer técnico	Aprovado	

Composto Sinvastatina
Condições de armazenagem Temperatura ambiente

Tabela 27 - Teste de Controle de qualidade SIN

Teste	Especificação	Resultado
Descrição	Pó cristalino branco a quase branco	Pó quase branco
Solubilidade	Facilmente solúvel em clorofórmio; facilmente solúvel em metanol; facilmente solúvel em álcool; ligeiramente solúvel em propilenoglicol; muito pouco solúvel em hexano; praticamente insolúvel em água	Conforme
Identificação	IV – O aspecto da amostra esta de acordo com o padrão	Conforme
	HPLC – O tempo de retenção da amostra corresponde ao tempo de retenção do padrão	Conforme
Perda por dessecação	Máximo 0,5% (3 horas/60°C à vácuo)	0,22%
Metais pesados	Máximo: 0,002%	< 0,002%
Substâncias relacionadas	Hidroxiácido sinvastatina: máximo 0,4%	Não detectado
	Acetil sinvastatina: máximo 0,4%	Não detectado
	Anidro sinvastatina: máximo 0,4%	Não detectado
	Sinvastatina dimer: máximo 0,4%	Não detectado
	Metileno sinvastatina: máximo 0,4%	0,07%
	Lovastatina e Epilovastatina: 1,0%	Não detectado
	Impureza individual: máximo 0,1%	0,06%
	Total de impurezas, exceto epilovastatina: máximo 1,0%	0,13%
Pureza enantiomérica	≤ 0,3%	0,05%
Solventes residuais	Metanol: máximo 3000 ppm	Não detectado
	Diclorometano: máximo 600 ppm	Não detectado
	Etanol: máximo 5000 ppm	Não detectado
	Acetato de etila: máximo 5000 ppm	109,86 ppm
	Tetrahidrofurano: máximo 720 ppm	Não detectado
	Ciclohexano: máximo 880 ppm	Não detectado
Teor (base anidra)	98,0% - 102,0%	101,06%
Densidade aparente	Sem comparação	0,24 g mL ⁻¹
Parecer técnico	Aprovado	

APÊNDICE B – NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

Tabela 28 – Níveis de concentração da curva de calibração em solvente (Acetonitrila).

	Nível	Concentração	Área do pico*	%RSD
ATO	1	45	1725,50	32,74
	2	90	4225,00	19,23
	3	180	7104,83	7,76
	4	360	16132,00	0,72
	5	450	23356,00	0,94
	6	720	37013,83	1,05
	7	900	45811,00	1,91
SIN	1	75	5149,67	1,53
	2	15	10636,33	1,48
	3	300	21920,67	1,86
	4	600	42529,67	1,88
	5	900	69156,33	1,92
	6	1200	92895,17	1,70
	7	1500	117966,33	1,36

* Média da avaliação de precisão intra e inter-dias, durante 3 dias. $n=6$.

Tabela 29 – Níveis de concentração da curva de calibração em efluente hospitalar.

	Nível	Concentração	Área do pico*	%RSD
ATO	1	45	2932,83	17,46
	2	90	4778,50	3,36
	3	180	8822,67	1,87
	4	360	15970,00	0,28
	5	450	23453,50	1,88
	6	720	38333,50	0,06
	7	900	46942,75	1,16
SIN	1	75	5548,00	3,77
	2	15	11313,83	0,95
	3	300	22574,83	1,14
	4	600	45695,50	0,96
	5	900	70672,67	2,48
	6	1200	93632,33	2,17
	7	1500	117525,50	1,67

* Média da avaliação de precisão intra e inter-dias, durante 3 dias. $n=6$.

**APÊNDICE C – CONCENTRAÇÕES DIÁRIAS DE ESTATINAS DETECTADAS NOS
PONTOS DE COLETA.**

Tabela 30 – Concentrações diárias de estatinas detectadas nos pontos de coleta através de DLLME.

DLLME	Geral		PA	
	ATO	SIN	ATO	SIN
17/ago	18,8	38,3	23,1	36,9
18/ago	25,3	38,1	31,4	37,5
19/ago	31,2	30,3	32,5	38,5
20/ago	30,2	35,9	35,3	33,9
21/ago	27,4	36,5	35,1	38,5
22/ago	33,1	34,9	31,6	38,1
23/ago	22,1	38,2	26,6	37,9
Média	27,4	36,5	31,6	37,9
%RSD	17,75	7,31	13,42	4,00

Tabela 31 – Concentrações diárias de estatinas detectadas nos pontos de coleta através de SPE.

SPE	Geral		PA	
	ATO	SIN	ATO	SIN
17/ago	20,9	39,8	27,1	33,7
18/ago	26,2	36,6	32,6	35,1
19/ago	28,5	32,9	30,6	36,9
20/ago	31,1	36,8	32,8	35,7
21/ago	29,2	33,1	36,5	35,6
22/ago	29,8	33,4	27,2	33,8
23/ago	25,9	36,7	25,3	39,8
Média	28,5	36,6	30,6	35,6
%RSD	11,54	6,68	12,15	5,40