UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO OESTE – UNICENTRO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ/ UNICENTRO DOUTORADO EM QUÍMICA APLICADA

LUCIANE MIRANDA

DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES EMERGENTES E AVALIAÇÃO DE SEU COMPORTAMENTO EM AMBIENTES AQUÁTICOS: USO DE SISTEMAS MODELO

GUARAPUAVA – PR 2017

LUCIANE MIRANDA

DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES EMERGENTES E AVALIAÇÃO DE SEU COMPORTAMENTO EM AMBIENTES AQUÁTICOS: USO DE SISTEMAS MODELO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, sob orientação da professora Dra. Sueli Pércio Quináia e coorientação da professora Dra. Vanessa E. dos Anjos, como requisito para a obtenção do título de Doutorado em Química Aplicada, área de concentração: Química Analítica.

GUARAPUAVA – PR 2017

Catalogação na Publicação Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

S355a	Miranda, Luciane Determinação de contaminantes emergentes e avaliação de seu comportamento em ambientes aquáticos: uso de sistemas modelo / Luciane Miranda. – – Guarapuava, 2017 xvii, 120 f. : il. ; 28 cm
	Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, em ampla associação com UEL e UEPG, Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química Analítica, 2017
	Orientadora: Sueli Pércio Quináia Coorientadora: Vanessa E. dos Anjos Banca examinadora: Sueli Pércio Quináia, Elizabeth Weinhardt Scheffer, César Ricardo Teixeira Tarley, Vitor de Cinque Almeida, Mauro Chieirici Lopes
	Bibliografia
	1. Química. 2. Química analítica. 3. Contaminantes de interesse emergentes. 4. Voltametria. 5. Água natural. 6. Fotodegradação. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Química.
	CDD 547.3

AGRADECIMENTOS

À Deus que me dá força a cada dia, especialmente em momentos de desânimo. "Tu, Senhor, guardarás em perfeita paz aquele cujo propósito está firme, porque em Ti confia". (Isaias: 26-3).

À minha família pelo apoio ao longo da minha caminhada acadêmica. Agradeço a compreensão, principalmente nas ausências.

À minha orientadora profa. Dra. *Sueli Pércio Quináia* pela parceria, amizade e dedicação, pelo investimento de tempo e financeiro na realização deste trabalho. Agradeçoa pelo estímulo ajudando-nos a evoluir profissional e pessoalmente.

À *profa*. *Dra*. *Vanessa Égea dos Anjos* pela coorientação e colaboração na realização desse trabalho, pelas sugestões, críticas e correções ao longo do desenvolvimento deste.

Ao colega e amigo *Ismael Laurindo Jr.* pela ajuda com a coleta de amostras de água da Itaipu, e outras contribuições na realização deste trabalho.

À *Vanessa Carvalho Pereira*, pela amizade e contribuição com as medidas durante a iniciação científica, vinculada ao meu projeto.

Ao *Chalder Nogueira Nunes* pela parceria com a validação do método do fármaco alprazolam e também pelas contribuições nas discussões de resultados. Também pelas longas conversas e desabafos nos horários de almoço.

À *Mariane Butik* pela ajuda no laboratório como técnica e a colaboração no processo de formatação do trabalho.

Aos professores membros da banca pelas sugestões e críticas para a melhoria deste trabalho.

Aos demais colegas integrantes e ex-integrantes do LABGATI: *Camila, Fernanda, Irineo, Jucimara, Jeferson, Tatiane, Mariele, Patrícia, Suelen, Verônica* e *Érika* pela convivência e amizade nestes anos de estudos.

À Christiane S. Machado pela colaboração com as medidas em HPLC.

À UNICENTRO pela oportunidade da minha formação através da graduação, mestrado e doutorado e as agências de fomento que financiaram a infraestrutura disponível.

À secretária da PPGQ Neuza pela atenção, paciência e disponibilidade prestando-nos as informações e também na organização de momentos de confraternização com deliciosos quitutes.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para esta conquista...

Muito Obrigada!

"Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre".

Paulo Freire

RESUMO

Os compostos farmacêuticos abrangem um grupo de compostos considerados contaminantes de interesse emergente (CECs) em matrizes ambientais. A quantificação de CECs é normalmente realizada usando métodos cromatográficos que requerem várias etapas de pré-tratamento da amostra. O presente estudo propõe o desenvolvimento de métodos voltamétricos para quantificar diretamente nimesulida (NIM) e estreptomicina (STP) em amostras aquosas e também avaliar o comportamento dos fármacos NIM, STP e alprazolam (ALP) no meio ambiente. A metodologia para a determinação de ALP já havia sido previamente otimizada pelo grupo de pesquisa LabGATI. Inicialmente, os parâmetros voltamétricos foram otimizados utilizando-se a voltametria adsortiva de onda quadrada para STP e pulso diferencial para NIM, a partir do perfil dos voltamogramas e da intensidade da resposta (corrente de pico). Em seguida, a adequação do método analítico foi avaliada utilizando-se critérios de validação, como precisão, seletividade, linearidade, limites de detecção e de quantificação. A linearidade foi avaliada por curva de adição padrão na faixa de concentração de 8,09 a 210,4 μ g L⁻¹ para STP e 0,5 a 130 μ g L⁻¹ de NIM. Os limites de detecção (LQ) foram de 0,18 μg L⁻¹ para STP (com 180 s de acumulação) e de 0,15 μg L⁻¹ para NIM (60 s de acumulação). A precisão e exatidão de cada método foi expressa como porcentagem de recuperação de STP e NIM em soluções fortificadas, e apresentaram desvios abaixo de 20%, aceitáveis de acordo com critérios propostos para analitos em níveis traços, indicando a boa precisão e exatidão dos métodos. Os métodos voltamétricos propostos têm vantagens em relação a outros já descritos em literatura, pois não necessitam de etapas de pré-tratamento de amostras, proporcionando desta forma, análises rápidas e de baixo custo quando comparadas a outros métodos empregados na quantificação desses fármacos. NIM foi detectado em amostras de esgoto de ETE, em níveis de concentração variando de 101,7 a 385,0 µg L⁻¹ (em três amostragens). Entretanto, STP não foi detectado nas amostras. Estudos de degradação foram realizados em escala de bancada para os fármacos STP, NIM e ALP com radiação ultravioleta e radiação solar para NIM e ALP. Os resultados mostraram a degradação de STP com 3 h de exposição à luz UV, indicando que este fármaco é bastante fotossensível. Por outro lado, NIM degradou com 12 h de radiação e ALP com 18 h, portanto, mais resistente à fotodegradação. A degradação de NIM e ALP com radiação solar ocorreu em um período maior, sendo de 125 h para NIM e 212 h para ALP. Outros fatores como concentração, a presença de material particulado em suspensão presentes na matriz também foram avaliados em testes de bancada, para obter informações sobre os fármacos em condições controladas, e propor possíveis comportamentos destes no ambiente aquático.

Palavras chave: Contaminantes de interesse emergentes, voltametria, água natural e fotodegradação.

ABSTRACT

Pharmaceuticals compounds comprise a group of compounds considered to be contaminants of emerging concern (CECs) in environmental matrices. Determinations of CECs are usually performed by chromatographic methods, which require several pretreatment steps of the sample demanding time and supplies. Thus the present work proposed the development and validation of a voltammetric methods to quantify nimesulide (NIM) and streptomycin (STP) in aqueous samples and also to evaluate the behavior of the drugs NIM, STP and alprazolam (ALP) in the environment. The methodology for the determination of ALP had previously been optimized by the LabGATI research group. Initially, the voltammetric parameters were optimized using square wave adsorptive voltammetry for STP and differential pulse for NIM, from the voltammograms profile and the intensity of the response (peak current). Then, the adequacy of the analytical method was evaluated using validation criteria, such as precision, selectivity, linearity, limits of detection and quantification. The linearity was evaluated by standard addition curve in the concentration range of 8.09 to 210.4 μ g L⁻¹ to STP and 0.5 to 130 μ g L⁻¹ of NIM. The limits of detection (LOD) were 0.18 μ g L-1 to STP (with 180 s of accumulation) and 0.15 μ g L⁻¹ to NIM (60 s of accumulation). The accuracy and precision of each method was expressed as percent recovery of STP and NIM in fortified solutions, and showed deviations below 20%, acceptable according to criteria proposed for analytes at trace levels, indicating the good precision and accuracy of the methods. The proposed voltammetric methods have advantages over others already described in the literature, since they do not require steps of pre-treatment of the samples, thus speeding fast and low cost analyzes when compared to other methods used in the quantification of these drugs. NIM was detected in samples of wastewater at concentration from 101.7 to 385.0 μ g L⁻¹, in three samplings. However, STP was not detected, in any of sample. Degradation studies were performed on little scale to STP, NIM and ALP, in laboratory under controlled conditions, with natural and artificial radiation. The behavior of the drugs under radiation showed the rapid degradation of STP with 3 h of exposition to UV radiation, indicating that this drug is quite photosensitive. On the other hand, NIM degraded with 12 h of radiation and ALP with 18 h, so it was the most resistant. The degradation of NIM and ALP with solar radiation occurred in 125 and 212, respectively. Other factors such as concentration of the drug, the presence of suspended particulate matter in the matrix were also evaluated in the tests under controlled conditions and to propose possible behaviors of them in the aquatic environment.

Keywords: contaminants of emerging concern, voltammetry, natural water and photodegradation.

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
SUMÁRIO	v
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xv
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
1. Introdução	1
1.2 Objetivos	3
1.2.1 Objetivo Geral	3
1.2.2 Objetivos específicos	3
1.3 Referências	3
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 Fármacos no ambiente	7
2.1.1 Coeficiente de partição	9
2.1.2 Remoção de fármacos em matrizes aquosas	10
2.1.3 Anti-inflamatório – Nimesulida	13
2.1.4 Antibiótico – Estreptomicina	16
2.1.5 Bezodiazepínico - Alprazolam	18
2.2 Técnicas analíticas usadas na quantificação de fármacos	19
2.2.1 Técnicas cromatográficas	19
2.2.2 Técnicas voltamétricas	
2.2.2.1 O eletrodo de trabalho	
2.2.2.2 Voltametria: características e aplicações	
2.3 Validação de Métodos	
2.3.1 Seletividade	
2.3.2 Linearidade e Faixa Linear	
2.3.3 Precisão	
2.3.4 Exatidão	
2.3.5 Limite de detecção	
2.3.6 Limite de Quantificação	
2.4 Referências	

SUMÁRIO

CAPÍTULO 3 - OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PAR	RA A
QUANTIFICAÇÃO DE NIMESULIDA E ESTREPTOMICINA	53
3.1 Parte Experimental	53
3.1.1 Reagentes e Equipamentos	53
3.1.2 Coleta de Amostras	54
3.1.3 Preparo de Soluções	56
3.1.4 Otimização dos Parâmetros Voltamétricos – STP	57
3.1.4.1 Voltametria Cíclica	57
3.1.4.2 Voltametria Onda Quadrada e Pulso Diferencial	57
3.1.5 Otimização dos parâmetros voltamétricos – NIM	58
3.1.5.1 Voltametria Cíclica	58
3.1.5.2 Voltametria de Pulso Diferencial	58
3.1.6 Validação dos Parâmetros Voltamétricos – STP e NIM	59
3.1.6 1 Linearidade e cálculo de LD e LQ	59
3.1.6.2 Seletividade	60
3.1.6 3 Precisão	61
3.1.6 4 Exatidão	62
3.1.7 Caracterização das amostras e quantificação de NIM e STP	62
3.2 Resultados e Discussão - Estreptomicina (STP)	63
3.2.1 Voltametria Cíclica	63
3.2.2 Voltametria de pulso diferencial e de onda quadrada	64
3.2.3 Variação da concentração hidrogeniônica	65
3.2.4 Otimização dos Parâmetros da Voltametria de Onda Quadrada	66
3.2.5 Validação do método – Quantificação de STP	70
3.2.5.1 Linearidade e cálculo do LD e LQ	70
3.2.5.2 Estudo de interferentes	75
3.2.5.3 Precisão	77
3.2.5.4 Exatidão	77
3.2.6 Caracterização das amostra e aplicações do método na quantificação de STP	·78
3.3 Resultados e Discussão – Nimesulida	80
3.3.1 Voltametria cíclica	80
3.3.2 Estudo do Eletrólito suporte e potencial hidrogeniônico	81
3.3.3 Otimização dos parâmetros voltamétricos para quantificação de NIM	83
3.3.4 Validação da metodologia	88

3.3.4.1 Linearidade e cálculo do LD e LQ8	38
3.3.4.2 Seletividade)1
3.3.4.3 Precisão	94
3.3.4.4 Exatidão	94
3.3.5 Aplicação do método na quantificação de NIM em amostras aquosas9	95
3.4 Considerações finais	97
3.5 Referências)7
CAPÍTULO 4 - ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE FÁRMACOS NO AMBIENT	Έ
USANDO SISTEMAS MODELO)2
4.1 Metodologia10)2
4.1.1 Estudos prévios de degradação de NIM, STP e ALP por radiação UV)2
4.1.2 Estudo de interferência entre os fármacos NIM, STP e ALP)3
4.1.3 Estudo do comportamento dos fármacos em água sintética e na presença de matér	ia
orgânica10)4
4.1.4 Estudo simultâneo de degradação de NIM e ALP com radiação solar)5
4.1.5 Estudo simultâneo de degradação de NIM e ALP com radiação UV10)6
4.2 Resultados e Discussão)6
4.2.1 Estudo do comportamento de STP com radiação UV 10)6
4.2.2 Estudo do comportamento de NIM com radiação UV10)7
4.2.3 Estudo do comportamento de ALP com radiação UV10)8
4.2.4 Estudo do efeito de interferência de NIM e ALP em água sintética e na presenç	ça
de matéria orgânica)9
4.2.5 Estudo de interferência entre os fármacos NIM, STP e ALP11	1
4.2.6 Estudo de degradação simultânea de NIM e ALP com radiação solar11	2
4.2.7 Estudo de degradação simultânea de NIM e ALP com radiação UV11	5
4.3 Referências11	7
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÃO11	19

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Possíveis rotas de exposição e contaminação por fármacos no meio ambiente.
Adaptado de Halling-Sørensen et al., 1998
Figura 2: Estrutura química da nimesulida (NIM) 14
Figura 3: Estrutura química do sulfato de estreptomicina (STP)17
Figura 4: Fórmula estrutural do alprazolam (NUNES et al, 2015)
Figura 5: Modelo de eletrodo de mercúrio modo gotejante, ou gota pendente de mercúrio (SKOOG, et al, 2006). 24
Figura 6: Voltamograma cíclico típico de um processo redox reversível (O + ne- \leftrightarrow R). 25
Figura 7: A) Esquema representando a aplicação de potencial em função do tempo em polarografia de pulso diferencial. A corrente é amostrada em S_1 e S_2 e a diferença entre elas é registrada: I = $I_{S2} - I_{S1}$. B) Voltamograma de pulso diferencial
Figura 8: Variação da corrente faradaica (I _f) e corrente capacitiva (I _c) com o tempo na SWV (SOUZA et al., 2003)
Figura 9: Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada (SOUZA et al., 2003)
Figura 10: Voltamogramas de onda quadrada esquemáticos para um sistema reversível (1)
e para um sistema irreversível (2) (SOUZA et al., 2003)
Figura 11: Localização geográfica dos pontos de coleta (Adaptado de Google Maps) 55
Figura 12: A) Voltamograma cíclico de STP em HMDE. Condições: (CSTP = 61,42 μ g L ⁻¹ , em solução de NaOH 0,01 mol L ⁻¹ , pH 12,0); velocidade 50 mV s ⁻¹ , varredura de potencial (-0,45 a -1,7 V) E _{dep} (-1,2) e t _{ac} (90 s); B) Resposta I _p em função da raiz da velocidade 63
Figura 13: A) Voltamogramas de pulso diferencial da curva de STP, em concentração de 365 a $11,1\times10^3 \mu g L^{-1}$. Condições: em solução de NaOH 0,01 mol L ⁻¹ , pH 9,0; E _{ac} (-1,2 V), faixa de varredura (-1,0/ -1,35 V), t _{ac} (90 s), velocidade de varredura (40 mV s-1), tempo de pulso (40 ms), amplitude de pulso (50 mV). B) Correlação entre concentração de STP e a corrente de pico
Figura 14: A) Voltamogramas de onda quadrada da curva de STP, em concentração de 36,5
a 507,5 μ g L ⁻¹ . Parâmetros da V _{Ads} RC-OQ: E _{ac} (-1,2 V), faixa de varredura (-1,3/ -1,8 V), t _{ac}
(60 s), step de potencial, frequência (100 Hz) e amplitude (50 mV). B) Correlação entre concentração de STP e a corrente de pico

Figura 18: A) Voltamogramas de onda quadrada, variação do incremento de varredura (2 a 8 mV) com uma adição de STP de 61,42 μ g L⁻¹. Condições: E_{ac} -1,2 V, amplitude 50 mV; Frequência 100 Hz e t_{ac} 120 s. B) Correlação entre o incremento e a corrente de pico. 68

 Figura 25: A) Voltamogramas de onda quadrada, variação do incremento de varredura (2 a 8 mV) com uma adição de STP de 61,42 μ g L⁻¹. Condições: E_{ac} -1,2 V, amplitude 50 mV; Frequência 100 Hz e t_{ac} 120 s. B) Correlação entre o incremento e a corrente de pico. 75 Figura 26: A) Voltamogramas de onda quadrada mostrando o sinal do eletrólito e adições de STP 10,19 a 40,58 µg L⁻¹ (diluição 1:10 v/v). B) Curva de adição padrão do efeito de Figura 27: A) Voltamogramas de onda quadrada mostrando o sinal do eletrólito e adições de STP 10,19 a 40,58 μ g L⁻¹ com diluição (1:10 v/v). B) Efeito de interferência da matriz na Figura 28: A) Voltamogramas de onda quadrada mostrando do estudo de recuperação de STP em água ultrapura, adições de 2,04 a 8,01 µg L-1. B) curva de adição padrão de Figura 29: A) Voltamogramas de onda quadrada comparando o perfil obtido numa varredura de -1,4 a -1,8 V para eletrólito na ausência e na presença da amostra, nas condições Figura 30: A) Cromatograma do padrão de STP (50 mg L-1) em 224,7 nm. B) Espectro Figura 31: A) Voltamograma cíclico de NIM na velocidade 50 mV s⁻¹ em HMDE, CNIM = 92 µg L⁻¹, 10 mL de KCl 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0; B) Correlação entre Ip e velocidade de Figura 32: A) Voltamogramas de pulso diferencial para os eletrólitos e adições de NIM. B) voltamogramas da mistura tampão-BR 0,04 mol L⁻¹/ etanol (7:3 v/v) e KCl (0,1 a 1,0 mol L⁻ Figura 33: Voltamograma de pulso diferencial em diferentes eletrólitos: a) mistura tampão-BR 0,04 mol L⁻¹/ etanol (7:3 v/v); b) mistura solução tampão-BR/etanol (7:3 v/v) e KCl (1,0 Figura 34: A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos no estudo de pH de 5 a 8 Figura 35: A) Voltamogramas de pulso diferencial da variação de potencial de acumulação de 0 a -1,0 V, com adição de 45,6 µg L⁻¹ de NIM. B) Correlação entre a variação do potencial **Figura 36:** A) Voltamogramas de pulso diferencial da variação do tempo de equilíbrio (t_{ea}), Figura 37: A) Voltamogramas de pulso diferencial da variação da velocidade de varredura, com adição de 45,56 μ g L⁻¹ de NIM. B) Correlação entre a variação da velocidade de Figura 38: A) Voltamogramas de pulso diferencial da variação de amplitude, com adição Figura 39: A) Voltamogramas de pulso diferencial da variação do tempo de pulso, com adição de 45,56 μ g L⁻¹ de NIM. B) Correlação entre a variação do tempo de pulso e I_p.... 86 Figura 40: A) Voltamogramas de pulso diferencial da variação do tempo de acumulação, com adição de 5,6 μ g L⁻¹ de NIM. B) Correlação entre a variação do tempo de acumulação Figura 41: A) Voltamogramas de PD da curva de calibração de NIM, adições 0,50 a 130,1 µg L⁻¹ em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹, pH 7. B) Curva de padrão externo de NIM, com os Figura 42: Voltamogramas de pulso diferencial do estudo de interferência com AH. Com Figura 43: Voltamogramas de onda quadrada mostrando o sinal do eletrólito (amostra diluídas) em curvas de adição padrão em concentrações de 1,53 a 19,52 μ g L⁻¹ de NIM. Figura 44: A) Curvas de adição de padrão de NIM com diferentes diluições da amostra (1:9; 2:8; 3:7 e 5:5) B) Curvas analíticas de NIM em eletrólito puro e em amostras de águas **Figura 45:** A) Cromatogramas do padrão de NIM (50 mg L⁻¹) monitorado em 302 nm. B) Figura 46: A) Sobreposição dos cromatogramas do padrão de NIM (50 mg L⁻¹) e das amostras 5 e 6 em 302,1 nm. A') Ampliação dos cromatogramas do padrão e amostras...94 Figura 47: Voltamogramas de PD-AdsCSV da curva de adição padrão da amostra 5. a) Amostra, b) 3.05, c) 6.15 e d) 9.22 µg L⁻¹ NIM, em KCl 0,1 mol L⁻¹, pH 7 e t_{ac} 10 s...... 95 Figura 48: Experimento de degradação dos fármacos em câmara luz UV em frasco de vidro de 1,5 L, com lâmpada de mercúrio (250 W, 220 V, 60 Hz, 1,30 A). 103

Figura 49: Voltamogramas de onda quadrada de 80,5 μ g L ⁻¹ de STP no T0 e, em intervalos
de radiação-UV (15 a 180 min). Com correção da linha base 106
Figura 50: A) Voltamogramas de pulso diferencial para 30,0 μ g L ⁻¹ de NIM (T ₀ até 12 h
com radiação-UV). B) Correlação corrente vs tempo de degradação. C) Correlação I_p vs
tempo, com aquecimento à 40 °C por 6 h 108
Figura 51: A) Voltamogramas de pulso diferencial para amostra 10,0 μ g L ⁻¹ de ALP (0 a 18
h) com radiação-UV. A') I_p vs tempo na amostra irradiada. B) I_p vs tempo no experimento
controle
Figura 52: A) Voltamogramas de pulso diferencial para 30,0 µg L-1 de NIM. B) Corrente
de pico em função do nº de experimento (1 ao 4) 110
Figura 53: A) Voltamogramas de pulso diferencial para 10,14 µg L ⁻¹ de ALP. B) Relação
entre intensidade de corrente de pico do ALP na presença de argila, EDTA e COD em função
do nº do experimento (1 ao 4) 110
Figura 54: A) voltamogramas de NIM (amostra sintética) com radiação solar. B) Ip vs
tempo no experimento controle
Figura 55: Solução de NIM irradiada com luz natural solar e solução controle
Figura 56: Esquema dos possíveis produtos de degradação de NIM por irradiação com luz
solar. Adaptado de Hemmateenejad et al., 2008 114
Figura 57: A) voltamogramas amostra de ALP irradiada com radiação solar (0 a 100 h).
Com correção da linha base114
Figura 58: Estrutura do benzodiazepínico alprazolam e produtos de degradação. Adaptado
de Calisto et al. (2011)
Figura 59: A) voltamogramas amostra de NIM (30,08 µg L ⁻¹), em água sintética + argila,
irradiada com radiação UV (com correção da linha base). B) Ip vs tempo de irradiação no
experimento controle
Figura 60: A) voltamogramas de ALP para a amostra irradiada com luz UV (0 a 212 h) e
A') I_p vs tempo para a amostra irradiada com luz UV. B) I_p vs tempo para o controle com
luz UV (0 a 212 h)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudos de detecção de fármacos por cromatografia em matrizes aquosas 21
Tabela 2: Fármacos detecção por técnicas eletroanalíticas em diversas matrizes
Tabela 3 : Pontos de coleta de amostras de água natural e efluente de esgoto. 54
Tabela 4: Parâmetros da voltametria de onda quadrada, otimização da metodologia para
quantificação de STP58
Tabela 5: Parâmetros da voltametria de pulso diferencial, otimização da metodologia para
quantificação de NIM 59
Tabela 6: Programação do gradiente da fase móvel da corrida cromatográfica
Tabela 7: Dados da análise de regressão da curva de STP aplicando o modelo linear e o
quadrático, na faixa de 8,09 a 90,04 μ g L ⁻¹ 71
Tabela 8: Dados da análise de regressão da curva de STP aplicando a função log aos dados
da curva, na faixa de 8,09 a 40,18 µg L-1 de STP
Tabela 9: Comparação de LD do método proposto com trabalhos da literatura para
quantificação de STP, em diferentes matrizes74
Tabela 10: Ensaios de recuperação de STP em água ultrapura e amostra real (n = 3) 78
Tabela 11: Dados de OD, Temperatura e pH das amostras de água e de esgoto, amostragem
de Fev/2016
Tabela 12: Dados da análise de regressão linear de NIM, no nível de 95% de confiança para
a curva na faixa de 0,5 a 50 μ g L ⁻¹
Tabela 13: Comparação de LD do método proposto com a literatura para quantificação de
NIM, em diferentes matrizes
Tabela 14: Ensaios de recuperação de NIM em água ultrapura e amostra real $(n = 3)$ 95
Tabela 15: Determinação de NIM em amostras de água natural e esgoto de seis pontos ao
longo da Bacia do Paraná III, em três períodos de amostragem96
Tabela 16: Estudo de interferência entre os fármacos NIM, STP e ALP durante as medidas
voltamétricas de NIM, STP e ALP104
Tabela 17: Composição da amostra sintética de água natural utilizada nos estudos do
comportamento de fármacos por irradicação UV104
Tabela 18: Avaliação de NIM e ALP em água sintética na presença de EDTA, COD e argila.

Tabela 19	: Resposta	de	corrente	em	nA	para	os	fármacos	NIM,	STP	e ALP	no	estud	o de
interferênc	ia						••••		•••••		•••••			112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais					
ΔEs	Incremento de varredura de potencial					
AH	Ácido Húmico					
ALP	Alprazolam					
BRMs	Biorreatores com membranas					
BDZ	Benzodiazepínico					
E_{ac}	Potencial de acumulação					
ETE	Estação de tratamento de esgoto					
FIA	Do inglês (flow injection analysis)					
HMDE	Do inglês (hanging mercury drop electrode					
Ip	Corrente de pico					
LD	Limite de detecção					
LQ	Limite de quantificação					
NIM	Nimesulida					
POAs	processos oxidativos avançados					
pН	Potencial hidrogeniônico					
PPD	Polarografia de Pulso Diferencial					
SMDE	Do inglês (static mercury drop electrode)					
STP	Estreptomicina					
T _{Acc}	Tempo de acumulação					
UPLC	Do inglês, Ultra Performance Liquid Chromatography					
V _{Ads} RC-OQ	Voltametria adsortiva de redissolução catódica, no modo onda quadrada					
	(V _{Ads} RC-OQ)					
V _{Ads} RC-PD	Voltametria adsortiva de redissolução catódica, no modo pulso diferencial					
	(V _{Ads} RC-PD)					
VC	Voltametria cíclica					

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1. Introdução

A água é um recurso essencial à vida, mas a sua disponibilidade vem diminuindo, devido a processos naturais e antropogênicos (MANAHAN, 1994). Nos últimos anos, estudos relacionados à qualidade da água enfatizam a presença dos contaminantes de preocupação emergente no ambiente aquático, que envolvem um grupo de compostos presentes em produtos de higiene pessoal, surfactantes, medicamentos, hormônios naturais e sintéticos, retardantes de chama, espécies metálicas, drogas de abuso e metabólitos desses compostos. Baixos teores dessas substâncias têm sido encontrados até em água tratada para consumo humano (JEANNE et al., 2009; LOOS et al., 2013; GAFFNEY et al., 2015). Alguns efeitos têm sido associados à presença dos contaminantes emergentes no ambiente, tais como, a toxicidade aos organismos aquáticos, o desenvolvimento de resistência em bactérias patogênicas, genotoxicidade e distúrbios endócrinos (KEMPER, 2008; KÜMMERER, 2009; REGITANO e LEAL, 2010; U.S.EPA, 2017). Os efeitos desses compostos sobre os ecossistemas e para a saúde humana a longo prazo ainda não são claros (GAFFNEY et al., 2014).

No contexto dos contaminantes emergentes encontram-se os fármacos, os quais são substâncias produzidas com a finalidade de tratamento ou de prevenção de doenças (KEMPER, 2008; REGITANO e LEAL, 2010). No entanto, não são isentos de efeitos ao ambiente, pois os fármacos e seus metabolitos estão constantemente chegando às estações de tratamento de esgoto, as quais não removem completamente esse tipo de resíduos (HEBERER, 2002; VERLICCHI, 2010). Entre os fármacos mais consumidos estão analgésicos, anti-inflamatórios, hormônios, antibióticos, antidepressivos (THIELE-BRUHN, 2003; KUMMERER, 2009; HOMEM e SANTOS, 2011; BORGES et al., 2016). Entretanto, a quantidade de fármacos consumidos anualmente é apenas estimada, sendo que o uso ocorre de diversas maneiras: como drogas não-prescritas (automedicação), e aquelas prescritas e consumidas em casa, ou em hospitais e clínicas (HEBERER, 2002).

As criações intensivas de animais (bovinos, suínos e aves) e aquicultura, também representam uma via de entrada de fármacos, tais como, antibióticos e anti-inflamatórios. Desta maneira, caracterizando-se em potenciais fontes de contaminação de ambientes aquáticos e terrestres (STUMPF et al., 1999; BOXALL et al., 2003; TERNES et al., 2004; URASE e KIKUTA, 2005).

Os processos de degradação de contaminantes em ambientes aquáticos podem ocorrer pela ação de agentes abióticos e bióticos, outros compostos persistem no ambiente podendo causar efeitos tóxicos aos organismos em diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar (GHERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990). A luz, principalmente a radiação eletromagnética na região do ultravioleta e visível, é capaz de provocar a quebra de ligações químicas e contribuindo na degradação de algumas substâncias em corpos d'água, por processos de oxidação, hidroxilação, ciclização e desalogenação.

A instrumentação analítica evoluiu com o desenvolvimento de técnicas que permitem detectar e quantificar compostos contaminantes em matrizes ambientais, em concentrações de μ g L⁻¹ e ng L⁻¹ em águas naturais e efluentes de estações de tratamento de esgoto (STUMPF et al., 1999). No caso dos fármacos, as metodologias analíticas comumente empregadas na sua detecção são as cromatográficas (líquida e gasosa), principalmente aliadas à espectrometria de massa (CAFFARO-FILHO, 2013). No entanto, as técnicas cromatográficas apresentam elevado custo e demandam grandes quantidades de solventes e diversas etapas de pré-tratamento das amostras (RADI et al., 2003; GHONEIM et al., 2004).

Com base no exposto, justifica-se a necessidade de desenvolvimento de metodologias sensíveis e de menor custo para a quantificação de fármacos em amostras ambientais. Assim, os detectores eletroquímicos (com modificação ou não) oferecem a possibilidade de monitoramento de fármacos, como muitos desses compostos apresentamse como moléculas eletroativas, ou seja, com, pelo menos, um sítio ativo capaz de reduzirse ou oxidar-se eletroquímicamente (HERNANDEZ-OLMOS et al., 2000). Este fato permite que técnicas voltamétricas sejam utilizadas para a análise de diferentes compostos em matrizes complexas. Estudos da eletroatividade dos fármacos STP e NIM sugerem que estes se adsorvem no eletrodo de trabalho, reduzindo-se em seguida (SIEGERMAN, 1979; WANG e MAHMOUD, 1986; ALVAREZ-LUEJE, 1997; FEDORCHUK et al., 2005). Deste modo, este trabalho descreve no Capítulo 3, a otimização e validação de metodologia analítica para a detecção e quantificação de fármacos em amostras aquosas, utilizando-se as técnicas voltamétricas. Os resultados deste trabalho contribuem com dados sobre a presença de NIM e STP em amostras ambientais.

No presente estudo, no Capítulo 4 serão abordados estudos de degradação dos fármacos STP, NIM e ALP em meio aquoso com radiação ultravioleta (UV) e natural (solar) usando sistemas modelo com experimentos realizados em condições controladas. Nesse sentido foram realizados experimentos para avaliar possíveis efeitos da radiação solar no processo de degradação dos fármacos.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Os objetivos gerais envolvem a otimização de metodologias analíticas envolvendo a voltametria para monitoramento de fármacos em ambientes aquáticos e avaliar o seu comportamento em condições controladas em laboratório. Desta forma, avaliando-se a influência de fatores, tais como, temperatura, radiação, presença de matéria orgânica. Entre os compostos estudados tem-se um antibiótico, anti-inflamatório e benzodiazepínico.

1.2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a eletroatividade de fármacos STP e NIM empregando voltametria cíclica e eletrodo de gota pendente de mercúrio;
- Avaliar os modos de pulso diferencial e onda quadrada na determinação de STP e NIM por voltametria adsortiva de redissolução catódica;
- ✓ Otimizar os parâmetros instrumentais e condições experimentais para a determinação de níveis traço de NIM e STP;
- ✓ Estabelecer as condições de validação intralaboratorial das metodologias desenvolvidas;
- Estudar o comportamento dos fármacos sob condições controladas com ensaios em escala de bancada.

1.3 Referências

ALVAREZ-LUEJE, A.; VÁSQUEZ, P.; NÚÑEZ-VERGARA, L. J.; SQUELLA, J. A. Voltammetric Study of Nimesulide and Its Differential Pulse Polarographic Determination in Pharmaceuticals Electroanalysis. v. 9, n. 15, p. 1209. 1997. *Electroanalysis*, v. 9, p. 1209-1213, 1997.

BORGES, R. M.; MINILLO, A.; LEMOS; E. G. M. L.; Do PRADO, H. F. A.; TANGERINO, E. P. Uso de filtros de carvão ativado granular associado a microrganismos para remoção de fármacos no tratamento de água de abastecimento. *Engenharia Sanitária e Ambiente*, v. 21 n. 4, p. 709-720, 2016.

BOXALL, A.B.A.; KOLPIN, D.W.; HALLING-SØRENSEN, B.; TOLLS, J. Are veterinary

medicines causing environmental risks? *Environmental Sciences and Technology*, v. 37, p. 286A–294A, 2003.

CAFFARO-FILHO, R. A. Avaliação da redução de toxicidade em efluentes industriais. Artigo de opnião. *Revista Brasileira de Química*, 1º trimestre, 2013.

FEDORCHUK, V. A.; PUCHKOVSKAYA, E. S.; ANISIMOVA, L. S.; SLEPCHENKO, G. B. Use of voltammetry for determining antibiotics streptomycin and azitromycin. *Journal of Analytical Chemistry*, v. 60, n. 6, p. 518–522, 2005.

GAFFNEY, V. J.; CARDOSO, V. V.; RODRIGUES, A.; FERREIRA, E.; ALMEIDA, C.M. M. Análise de fármacos em águas por SPE/UPLC-ESI-MS/MS. *Química Nova*, v. 37, p. 138-139, 2014.

GAFFNEY, V.J.; ALMEIDA, C.M.M.; RODRIGUES, A.; FERREIRA, E.; BENOLIEL, M. J.; CARDOSO, V. V. Occurrence of pharmaceuticals in a water supply system and related human health risk assessment. *Water Research*, v. 72, p. 199-208, 2015.

GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A.; ARAÚJO, R. P. A.; RAMOS, M. L. L. C.; Procedimentos para Utilização de Testes de Toxicidade no Controle de Efluentes Líquidos, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). Série Manuais, São Paulo, 1990, 17 p.

GHONEIM, M. M.; BAUMANN, W.; HAMMAM, E.; TAWFIK A. Voltammetric behavior and assay of the contraceptive drug levonorgestrel in bulk, tablets, and human serum at a mercury electrode. *Talanta*, v. 64, p. 857–864, 2004.

HEBERER, T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters*, v. 131 (1-2): p. 5-17, 2002.

HERNANDEZ-OLMOS, M. A.; AGUI, L.; YANÉZ-SEDENO, P.; PINGARRÓN, J. M. Analytical Voltammetry in low-permitivity organic solvents using disk and cylindrical microelectrodes. Determination of thiram in ethyl acetate. *Electrochimica Acta*, v. 46, p. 289-294, 2000.

HOMEM, V.; SANTOS, L. Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices – a review, *Journal of Environmental of. Management.* v. 92, p. 2304–2347, 2011.

JEANNE, K.; ABIGAIL, W. P.; ROBERT, W. M.; GIOMAR, R. C.; ANTHONY, G. H. Biodegradation of Pharmaceutical and Personal Care Products, *Advances in Applied Microbiology*, v. 67, 65-99, 2009.

KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*, v. 8, p. 1-13, 2008.

KUMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – a review – part I, *Chemosphere*, v. 75, p. 417–434, 2009.

LOOS, R.; CARVALHO, R.; ANTÓNIO, D. C.; COMERO, S.; LOCORO, G.; TAVAZZI, S.; PARACCHINI, B.; GHIANI, M.; LETTIERI, T.; BLAHA, L.; JAROSOVA, B.; VOORSPOELS, S.; SERVAES, K.; HAGLUND, P.; FICK, J.; LINDBERG, R. H.; CHWESIG, D.; GAWLIK, B. M. EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in waste water treatment plant effluents. *Water Research*, v. 47, p. 6475–6487, 2013.

MANAHAN, E, S. Environmental Chemistry. 6th ed. Boca Roton: Lewis, 1994.

RADI, A.; WAHDAN, T.; EL-GHANY, N. A. Determination of cefonicid in human urine by adsorptive square-wave stripping voltammetry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 31: p. 1041-1046, 2003.

REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, v. 34, p. 601-616, 2010.

SIEGERMAN, in A. J. BARD (Ed.), *Electroanalytical Chemistry*, v. 11, M. Dekker, New York, 1979, 291 p.

STUMPF, M.; TERNES, T. A.; WILKEN, R.; RODRIGUES, S. V.; BAUMANN, W. Polar drugs residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *The Science of the Total Environment*, v. 225, p.135-141, 1999.

TERNES, T. A., JANEX-HABIBI, M. L., KNACKER, T., KREUZINGER, N., SIEGRIST, H. Detailed report related to the overall project POSEIDON (contract no. EVK1-CT-2000-00047) duration (2001 e 2004). Assessment of technologies for the removal of pharmaceuticals and personal care products in sewage and drinking water facilities to improve the indirect potable water reuse, 2004.

THIELE-BRUHN, S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, v. 166, p. 145-167, 2003.

URASE, T., KIKUTA, T. Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge process. *Water Research*, v. 39, p. 1289-1300, 2005.

USEPA (United States Environmental Protection Agency) - Aquatic life criteria for contaminants of emerging concern - Part I, 2008. Disponível em: https://www.epa.gov/wqc/contaminants-emerging-concern-including-pharmaceuticals-and-personal-care-products. Acesso em: 28 Fev. 2017

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

WANG, J.; MAHMOUD, J. S. Determination of traces of streptomycin and related antibiotics by adsorptive stripping voltammetry. Analytica Chimica Acta, v. 186, p. 31-38, 1986.

CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Fármacos de diversas classes são consumidos em grande quantidade anualmente no mundo, tanto em medicina humana, quanto veterinária (especialmente em criações intensivas de animais) (BOXALL et al., 2003). As principais classes de fármacos incluem analgésicos, anti-inflamatórios, anti-hipertensivos, hormônios, antibióticos, antidepressivos (KUMMERER, 2009; HOMEM e SANTOS, 2011; BORGES et al., 2016). Os produtos farmacêuticos, produtos de higiene pessoal, surfactantes, nanomateriais e drogas de abuso estão incluídas em um grupo de substâncias consideradas potencialmente tóxicas para a vida aquática e até para a saúde humana. Devido ao fato destas substâncias terem sido detectadas em águas superficiais, inclusive em água de abastecimento (FERNANES et al., 2011; BORGES et al., 2016). Essas substâncias são denominadas contaminantes de preocupação emergente, do inglês, *contaminants of emerging concern* (CECs).

Normalmente, os CEC encontram-se em concentrações ordem de ng L⁻¹ a μ g L⁻¹ em matrizes ambientais potencialmente capazes de causar baixa toxicidade aguda, além de efeitos na reprodução de organismos expostos a longo prazo, ou nas fases iniciais de vida de organismos aquáticos como vertebrados e peixes (U.S.EPA, 2008). Além disso, os CEC tais como, os fármacos e seus metabólitos especialmente pela sua baixa volatilidade podem se distribuir no ambiente através do meio aquático, da cadeia alimentar, ou dispersar-se em diferentes direções (TAMBOSI, 2008). Alguns aspectos relacionados aos fármacos e sua presença no ambiente serão abordados neste capítulo.

2.1 Fármacos no ambiente

Após administrados pelas vias oral, tópica, ou injetável, os compostos farmacêuticos são absorvidos, metabolizados principalmente pelo fígado e rins e, por fim excretados através da urina e fezes. Diversos fatores influenciam o metabolismo dos fármacos e a quantidade excretada depende do tipo de substância, a dosagem, a idade do indivíduo e o modo de aplicação (THIELE-BRUHN, 2003; KEMPER, 2008). Para os antibióticos tetraciclinas e sulfonamidas, por exemplo, estudos mostraram que as taxas de excreção variam entre 40 e 90% (KUMMERER et al., 2000, THIELE-BRUHN, 2003). Substâncias inalteradas ativas, metabólitos ou o fármaco na forma conjugada podem ser excretadas e, consequentemente chegar às estações de tratamento de esgoto (ETEs), lagoas de destinação

de resíduos de animais e solo (KOLPIN et al., 2002; ANKLEY et al., 2007; KEMPER, 2008; KÖCK-SCHULMEYER et al., 2011; AMÉRICO et al., 2012).

A Figura 1 mostra um esquema com as possíveis rotas dos fármacos no ambiente proposto por Halling-Sørensen et al. (1998). E esses compostos estão presentes até mesmo em água de consumo humano, com teores encontrados na ordem de ng L⁻¹ a μ g L⁻¹ (JEANNE et al., 2009; LOOS et al., 2013; GAFFNEY et al., 2015)



Figura 1: Possíveis rotas de exposição e contaminação por fármacos no meio ambiente. Adaptado de Halling-Sørensen et al., 1998.

Os fármacos e seus metabólitos quando presentes no ambiente são incluídos em um grupo de compostos denominados contaminantes de preocupação emergentes, pois seus efeitos no ambiente ainda não são monitorados, ou são pouco conhecidos ou, então foram recentemente detectados (DAUGHTON e TERNES, 1999; BARCELÓ, 2003; BORGES et al., 2016). Entre os efeitos considerados associados à presença dos contaminantes

emergentes no ambiente estão a toxicidade, o desenvolvimento de resistência em bactérias patogênicas, genotoxicidade e distúrbios endócrinos (KEMPER, 2008; REGITANO, 2010).

No que diz respeito à presença de fármacos no ambiente aquático, como observado na Figura 1, pode estar relacionada a diversas fontes, no entanto, considera-se como a principal o efluente de ETEs (ANDREOZZI et al., 2003; FENT et al., 2006).

No ambiente aquático ainda não é conhecido o destino dos fármacos e seus produtos de degradação, como estes são moléculas com baixa volatilidade sua dispersão ocorrerá através do transporte aquoso, da cadeia alimentar ou por dispersão.

Nos sistemas de tratamento de esgoto, consideram-se duas formas de eliminar os compostos farmacêuticos, a adsorção nas partículas sólidas do lodo, ou a biodegradação agregando-se aos microrganismos (TAMBOSI, 2008; TAMBOSI et al., 2010). A distribuição de fármacos na fase dissolvida ou lodo e sedimento do esgoto está relacionada ao pH do mesmo e ao pKa do fármaco. Em pH neutro, por exemplo, os fármacos antiinflamatórios não-esteroidais AINEs (ácido acetilsalicílico, ibuprofeno e naproxeno) de caráter ácido (pKa entre 4,9 e 4,1) têm baixa tendência à adsorção no lodo, pois nesse meio apresentam carga negativa e ficarão na fase dissolvida (BUSER et al., 1998; KÜMMERER et al., 1997). Por outro lado, os fármacos de caráter básico ou anfóteros, como os antibióticos fluoroquinolonas, tendem a ficar adsorvidos no lodo (GOLET et al., 2002).

2.1.1 Coeficiente de partição

O coeficiente de partição-n-octanol-água (P) é um parâmetro que permite medir como uma substância química se distribui em relação à dois solventes imiscíveis, sendo o octanol um solvente apolar e água um solvente polar (PANNA, 2006). O coeficiente de distribuição octanol/ água é o grau de equilíbrio de espécies ionizadas e não ionizadas de uma substância em octano e na fase aquosa, em uma dada temperatura (LARINI, 2008)

No ambiente aquático os processos de remoção e degradação de poluentes está relacionado às características físico-químicas dos compostos. Desta maneira, a tendência de os poluentes ficarem dissolvidos na água ou adsorvidos no sedimento depende do coeficiente de partição n-octanol/água (log P) (DÍAZ-CRUZ et al., 2003). Moléculas orgânicas com log P < 5 tendem a ser mais polares e, assim ficam mais na fase dissolvida com baixa tendência à sorção ao sedimento e acumulação em organismos fotossintetizantes presentes no ambiente aquático. Por outro lado, poluentes com P > 5 tem características mais hidrofóbicas

indicando a tendência a acumular-se em material lipídico e a ficarem aderidos ao sedimento (BINELLI e PROVINI, 2003).

Connel (1990) propõe que compostos com $P \ge 2$ são mais hidrofóbicos, e aqueles com P < 2 são mais hidrofílicos. O log P é um parâmetro importante nos estudos de comportamento e impacto de compostos orgânicos no ambiente, e tem sido usado para estimar a bioacumulação em organismos aquáticos, tais como algas, pulgas aquáticas e mexilhões (MCKINNEY e SINGH, 1981).

Conforme abordado, o coeficiente de partição de um composto orgânico é importante para sugerir em qual fase um fármaco tende a ficar no ambiente aquático. Para o fármaco NIM o coeficiente de partição encontrado na literatura foi de 1,79 (SWEETMAN, 2007), do STP 0,88 (BIOSSINTÉTICA[®], 2014) e ALP 2,12 (JENKINS, 2008) a temperatura de 20 °C. De acordo com estes valores de *log P* que dos três fármacos abordados o mais hidrofóbico seria ALP, portanto no ambiente aquático aquele com maior interação com o sedimento. Considerando-se os potenciais riscos dos CECs, a complexidade das matrizes ambientais e os baixos teores, torna-se necessário desenvolver-se métodos com uso de técnicas analíticas sensíveis capazes de quantifica-los em concentrações da ordem de ng L⁻¹ a µg L⁻¹.

2.1.2 Remoção de fármacos em matrizes aquosas

A remoção de fármacos da fase dissolvida do esgoto ocorre principalmente pela biodegradação de modo aeróbio ou anaeróbio. A biodegradação é dependente do tempo de retenção hidráulica, no caso do diclofenaco, por exemplo, seria necessário um tempo mínimo de 8 dias (KREUZINGER et al., 2004). Metcalfe et al. (2003) relata que compostos com baixa biodegradabilidade são pouco removidos de ETEs, no caso da carbamazepina, por exemplo, para a qual menos de 10% foi removido. A avaliação da eficiência de remoção de fármacos em ETEs está baseada em quantificar os teores de compostos farmacêuticos no afluente e efluente. A concentração desses compostos depende de fatores, tais como, tempo de retenção, estrutura física das estações, época do ano e da natureza dos fármacos (TAMBOSI, 2008; TAMBOSI et al., 2010; VERLICCHI et al., 2010).

Entretanto, os sistemas de tratamento não são capazes de remover totalmente do esgoto os fármacos e seus metabolitos (HEBERER, 2002; VERLICCHI, 2010). Após o descarte de compostos farmacológicos no ambiente aquático (rios, lagos) estes passam por processos de degradação que podem ocorrer pela ação de agentes abióticos e bióticos, outros compostos persistem no ambiente podendo causar efeitos tóxicos aos organismos em

diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar (HOLT, 2000; GHERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990). A radiação eletromagnética, principalmente na faixa do ultravioleta e visível, é capaz de provocar a quebra de ligações químicas e contribui significativamente para degradar algumas substâncias em corpos d'água. Assim, é necessário que a radiação penetre no ambiente aquático. No entanto, a matéria orgânica dissolvida e particulada pode absorver parte da radiação solar, diminuindo a intensidade da luz em níveis de água mais profundas, dificultando os processos de degradação (HODGSON, 2004).

Adicionalmente, pode-se empregar processos artificiais na remoção de fármacos em meio aquoso. Em sistemas de tratamento de água e efluentes, por exemplo, são empregados os processos ou tecnologias artificiais para remoção de poluentes orgânicos. Materiais adsorventes como o carvão ativado e turfa são usados na remoção de contaminantes emergentes em água de abastecimento e efluentes aquosos (FERNANES et al., 2011; BORGES et al., 2016) e no tratamento de efluentes líquidos contendo metais (KOBYA, 2004). O carvão ativado apresenta uma ampla área superficial devido a sua estrutura porosa, o que permite o uso no tratamento de água, adsorção de gases poluentes e eliminação de odores, na indústria química e farmacêutica e em tratamento de efluentes (OLIVEIRA et al., 2002).

A possibilidade de regeneração do carvão ativado é considerada uma das principais vantagens do seu uso como adsorvente na remoção de CECs. Haro (2013) empregou carvão ativado na remoção de 100 g mL⁻¹ de bisfenol A em efluente avaliando a capacidade de reuso do adsorvente em ciclos consecutivos de sorção/regeneração e observou-se que a eficiência de regeneração diminuiu a partir de 2 até 6 ciclos avaliados, com remoção de aproximadamente 61% de bisfenol A.

Alguns estudos mostram a possibilidade de uso de outros materiais adsorvente como a turfa, na remoção de contaminantes emergentes em efluentes aquosos. A turfa é usada nesse processo devido à presença de grupos capazes de realizarem troca iônica com espécies metálicas e moléculas orgânicas polares. Fernandes et al. (2011) avaliou o potencial de adsorção da turfa decomposta na remoção de hormônios 17 β -estradiol (E2) e 17 α etinilestradiol (EE2), utilizando-se soluções de 0,10 mg L⁻¹ de hormônio deixado em contato com a turfa (50 a 200 mg em 1 L), por até 36 h. Os percentuais de remoção de hormônio foram de até 76,2% de E2, e de 55,0% de EE2.

Os processos convencionais de tratamento de efluente podem ser combinados com técnicas avançadas para melhorar a eficiência de remoção dos compostos orgânicos. Utilizando-se as tecnologias, tais como, as que empregam biorreatores com membranas (BRMs), os processos oxidativos avançados (POAs) ou combinando estas tecnologias com o uso de materiais adsorventes. Os processos avançados de tratamento visam eliminar do efluente os poluentes orgânicos através da mineralização ou da conversão das moléculas em produtos menos nocivos (IKEHATA et al., 2006; MELO et al., 2009; CADORE et al., 2015).

Sistemas de tratamento de efluentes com BRMs consistem em combinar o tratamento biológico (lodos ativados) com etapas de separação física empregando filtração por membranas. Esse sistema resulta em uma melhor qualidade da água tratada porque aumenta a concentração de microrganismos no reator (BUISSON et al., 1997; CADORE et al., 2015). Kimura et al. (2005) aplicaram o sistema de BRMs acoplado ao sistema de lodo ativado num estudo com 7 fármacos em efluente urbano. A remoção dos fármacos foi maior quando se utilizou BRM do que apenas lodo ativado para dois fármacos cetoprofeno e naproxeno e, no caso dos antibióticos contendo cloro em sua estrutura a eficácia foi menor, possível efeito bactericida.

Outra tecnologia que vem sendo empregada nos sistemas de tratamento de efluentes é a que utiliza agentes oxidantes como o O₃ e o H₂O₂, que se baseia na geração do radical hidroxil ('OH) altamente oxidante, capaz de degradar moléculas de poluentes promovendo a mineralização completa ou parcial destas. Os processos oxidativos avançados (POAs) apresentam algumas vantagens tais como a rapidez devido a geração de radicais 'OH, combinação da POAs com outros processos de tratamento, mineralização completa do poluente e não apenas a transferência de fase, possibilidade de tratamento *in situ*, diminuição do volume de lodo, entra outras. O peróxido de hidrogênio pode ser utilizado combinado com agentes catalizadores como o Fe e a radiação ultravioleta (UV) com alta reatividade, empregado na degradação de contaminantes em águas e efluentes (NAKAJIMA et al., 2005; IKEHATA et al., 2006).

A radiação UV que abrange a faixa de comprimento de onda do espectro eletromagnético de 40 a 400 nm, vem sendo empregada na desinfecção de água, e na degradação de moléculas orgânicas persistentes. A radiação UV fornece energia que ao ser absorvida pelas moléculas promovendo-as para estados de maior energia, ativando reações de fotodegradação (SOBOTKA, 1993; ESPLUGAS et al., 2002). O objetivo da fotodegradação é levar à mineralização das moléculas como mostra a Equação 2.1.

Substrato + $hv \rightarrow$ produtos de degradação + CO_2 + H_2O + sais inorgânicos (Equação 2.1)

Os processos que combinam radiação UV e a reação com catalisadores como o ferro são denominados foto-Fenton, essas reações de degradação são potencializadas pela luz UV que acelera a produção de radicais 'OH (TAMBOSI, 2008; KHANKHASAEVA et al., 2015).

A combinação de radiação e catalisadores pode aumentar a eficiência de degradação e vem sendo testados na remoção de fármacos. Palmisano et al. (2015) utilizaram radiação UV combinada com o catalisador dióxido de titânio (TiO₂) para avaliar a foto-estabilidade de quatro antibióticos (amoxilina, estreptomicina, eritromicina e ciprofloxina). Os autores verificaram que o catalisador potencializa o processo de degradação. Outro trabalho do grupo citado anteriormente comparou a eficiência dos catalisadores ZnO e TiO₂ na remoção de amoxilina, estreptomicina, eritromicina e ciprofloxina e, concluíram que na fotodegradação usando o ZnO a velocidade de degradação foi menor, porém a eficiência do processo aumentou (AMBROSETTI et al., 2015).

Neste contexto serão abordados neste trabalho, três fármacos de diferentes classes: a nimesulida (anti-inflamatório); a estreptomicina (antibiótico) e o alprazolam (psicofármaco). Esses compostos pertencem às classes de medicamentos de alto consumo, sendo nimesulida e alprazolam de uso humano, e estreptomicina de uso veterinário. Outro fator que contribuiu para a escolha dos mesmos é a possibilidade de quantificá-los utilizando a voltametria, pelo fato das moléculas sofrerem redução utilizando-se o eletrodo de mercúrio.

2.1.3 Anti-inflamatório – Nimesulida

A nimesulida (NIM) é um fármaco que pertence à classe dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) (OTTONELLO et al., 1995; WANG et al., 2006). Estes fármacos são considerados entre os medicamentos mais prescritos no mundo (GAFFNEY et al., 2015). Entre os fármacos dessa classe encontram-se a nimesulida, o ácido acetilsalicílico (aspirina), o naproxeno, o ácido mefenâmico, a indometacina, o meloxicam e o paracetamol (SILVA, 2006). A aspirina é um analgésico, antipirético e anti-inflamatório. Esse fármaco foi precursor dessa classe, também é empregado no tratamento de doenças cardiovasculares devido ao efeito antiplaquetário (HOWARD, 2004).

Os AINES em geral são especialmente utilizados no tratamento de inflamações e dores relacionadas com osteoartrites e dores músculo-esquelético que apresentam efeitos analgésico e antipirético. Os AINEs também são utilizados em tratamentos odontológicos. Estes fármacos atuam inibindo a ação da enzima araquidonato ciclo-oxigenase (COX), resultando na inibição das prostaglandinas responsáveis pelo processo inflamatório (SILVA, 2006).

O nome oficial da NIM é N-(4-nitro-2-fenoxifenil) metanossulfonamida, cuja fórmula estrutural está apresentada na Figura 2, é um anti-inflamatório com propriedades analgésicas e antipiréticas (JANIEC, 2005) e atua inibindo a síntese de prostaglandinas responsáveis pelo processo inflamatório (OTTONELLO et al., 1995). A molécula de NIM é um derivado do ácido metanosulfônico com um grupo ácido substituído de fórmula $C_{13}H_{12}N_2O_5S$ considerado um ácido fraco (pK_a = 6,9) (RABASSEDA, 1997). Quanto às características físico-químicas NIM é um pó cristalino, amarelo, solúvel em acetona, clorofórmio e acetato de etila, apresenta baixa solubilidade em etanol e, considera-se insolúvel em água (0,01 mg mL⁻¹). A temperatura de fusão de NIM é de aproximadamente 148 °C, e peso molecular de 308,3 g mol⁻¹ (PIEL et al., 1997).



Figura 2: Estrutura química da nimesulida (NIM).

A NIM pode ser administrada via oral em dosagens de 100 mg, duas vezes ao dia, para tratar inflamações, dor e febre. Também se utiliza NIM em cápsulas de liberação prolongada de 200 mg, supositórios em doses de 50 a 100 mg (2 vezes ao dia), além do uso tópico como gel 3% (2 a 3 vezes ao dia). NIM também tem sido utilizada na forma complexada com betaciclodextrina (SWEETMAN, 2007).

O processo de metabolização de NIM no organismo ocorre especialmente no figado através ação das enzimas do citocromo P450 (BERNAREGGI e RAINSFORD, 2005) e o metabólito principal é a 4-hidroxinimesulida, também considerada farmacologicamente ativa encontrada no plasma após cerca de 0,8 h da administração (BIOSSINTÉTICA[®], 2014).

De acordo com Bernareggi (1998) quando NIM é administrada via oral, o principal metabolito é a 4-hidroxi-nimesulida. A excreção de NIM ocorre principalmente através da urina, teores de 50,5 a 62,5%, dos quais aproximadamente 3% são excretados como fármaco inalterado e pode ocorrer a excreção de 17,9 a 36,2% pelas fezes, sendo que 8,7%

correspondem ao fármaco intacto. De Carvalho (2010) aborda que a NIM apresenta tempo de meia vida de 1 a 5 h e cerca de 98% do fármaco administrado é eliminado dentro de 24 h, sendo a maior parte 73% através da urina.

Carini et al. (1998) desenvolveram um trabalho usando a cromatrografia líquida de alta performance (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) associada à espectrometria de massas (HPLC-MS) na determinação quantitativa dos principais metabólitos de NIM, livres e conjugados, em amostras de urina após 96 h da administração de uma dose de 200 mg de NIM em voluntários saudáveis. Neste trabalho os autores citam 5 metabólitos resultantes de diversas reações na molécula de NIM, os denominaram por M1 até M5 (M1: hidroxilação formando a hidroxinimesulida; M2: resultado da redução no grupo NO₂ da molécula de NIM; M3: resultado de hidroxilação e redução da NIM; M4: composto acetilado a partir de M2; M5: um composto acetilado a partir de M3).

Ao chegar no ambiente os resíduos de fármacos AINs podem estar persistindo e, possivelmente causar efeitos aos organismos, conforme abordam alguns trabalhos a seguir. Oaks et al. (2004), associaram em seu estudo o uso de diclofenaco à queda da população de abutres no Paquistão tornando-se uma espécie ameaçada. A causa das mortes das aves seria a exposição aos resíduos de diclofenaco, pelo consumo de carcaças de animais tratados com esse fármaco usado em animais de criação (em medicina veterinária). Os autores sugeriram que concentrações de 0,007 mg Kg⁻¹ foi suficiente para causar insuficiência renal nestas aves.

Silveira et al. (2013) desenvolveram e validaram um método cromatográfico (HPLC-MS) para quantificar seis compostos incluindo NIM, em amostras de água de abastecimento no Rio Grande do Sul, Brasil. Os teores de NIM encontrados nas amostras estavam abaixo de 0,05 µg L⁻¹. Gaffney, et al., (2015) também utilizaram HPLC para quantificar os fármacos ibuprofeno, diclofenaco e nimesulida em amostras de água sem tratamento e tratada para abastecimento, e nessas matrizes foram encontrados teores de NIM abaixo de 30 ng L⁻¹. Lacey et al. (2012) descrevem um estudo para estabelecer níveis basais de 20 fármacos em três estações de tratamento em Dublin (Irlanda). Entre os fármacos avaliados, 14 foram detectados nas amostras, entre eles a carbamezepina, o ácido metanosulfônico, propranolol e a nimesulida.

Matozzo et al. (2012) investigaram os efeitos do ibuprofeno no sistema imunológico de *Ruditapes philippinarum* (mariscos) expostos ao fármaco em concentrações de 100 a 500 µg L⁻¹, durante 7 dias e observou-se uma potencial imunossupressão nos organismos aquáticos avaliados.

Mezzelani et al. (2016), avaliaram a bioacumulação de AINEs (acetaminofeno, diclofenac, ibuprofeno, cetoprofeno e nimesulida) empregando mexilhões da espécie *Mytilus galloprovincialis* expostos em amostras de laboratório e também coletados do mar do Mediterrâneo. Os autores relatam que detectaram NIM em organismos selvagens em todas as amostras (nível 2,99-6,04 ng/g, peso seco). Considerando-se como o primeiro estudo a fornecer evidências da ocorrência desses fármacos em tecidos de mexilhões selvagens coletados de uma área turística do mar Adriático Central.

2.1.4 Antibiótico – Estreptomicina

Os antibióticos são substâncias naturais (obtidos pela ação de microrganismos) ou sintetizadas, que utilizado em pequenas quantidades impedem o crescimento de microrganismos ou causam a morte destes (GUIMARÃES et al., 2010). A penicilina foi a precursora dos antibióticos sendo descrita pela primeira vez na literatura em 1940 (PROJAN e SHLAES, 2004; GUIMARÃES et al., 2010). Existem diversas classes de antibióticos em uso, tais como, β -lactâmicos, tetracicilinas, peptídicos cíclicos e aminoglicosídeos. Entre os mecanismos de ação dos antibióticos sobre os microrganismos podem ocorrer a inibição da síntese de proteínas bacterianas, inibição da síntese de RNA, impedir a formação da parede celular bacteriana, ou afetam a permeabilidade da membrana bacteriana (PATRICK, 2005; GUIMARÃES et al., 2010).

O sulfato de estreptomicina (STP) é um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos, que são compostos de amino-açúcares conectados por ligações glicosídicas (HARDMAN et al., 1996). O STP apresenta a fórmula molecular $C_{21}H_{34}N_7O_{12}$.1 ½ H_2SO_4 e massa molecular 728,69 g mol⁻¹, é um pó cristalino branco e inodoro, muito solúvel em água e pouco solúvel em álcool, forma soluções ácidas ou levemente ácidas com pH entre 4,5 a 7,0, pKa (10,88 em ácido forte; 11,9 em base forte) (BRASIL, 2010). A Figura 3 mostra a estrutura da molécula de STP.



Figura 3: Estrutura química do sulfato de estreptomicina (STP).

O STP foi sintetizado em 1944 a partir do fungo *Streptomyces griseus* e ainda é utilizado no combate de bactérias gram-negativas sendo considerado um dos primeiros antibióticos efetivos no combate de muitas bactérias patogênicas, incluindo a *Mycobacterium tuberculosis*, o agente causador da tuberculose (SCHATZ et al., 1944; FELDMAN e HINSHAW, 1944 *apud* FEDORCHUK et al., 2005). Aplica-se STP no tratamento de doenças respiratórias em animais, no combate de doenças causadas por bactérias gram-negativas sensíveis, como dos gêneros, leptospirose (*Leptospira* spp.) e pneumonia (*Pasteurella* spp., *Haemophilus* spp. e *Mycoplasma* spp.) (ANVISA, 2009). O STP age inibindo o início da síntese de proteínas dos microrganismos levando a uma leitura errada do RNA mensageiro (STRYER, 1988).

O uso humano de STP ocorre quando outros antibacterianos menos tóxicos não são eficientes, ou estão contraindicados no combate de infecções do trato biliar, infecções ósseas e articulares, infecções do sistema nervoso central, tuberculose, pneumonia, brucelose, entre outras. A aplicação é feita via injetável intramuscular de uma suspensão em água esterilizada em doses de 0,5 a 2 g de STP dependendo da gravidade da infecção (MEDICINANET, 2010).

Antibióticos aminoglicosídeos como STP também são adicionados à alimentação de animais em crescimento. Assim, há a preocupação com os resíduos desses antibióticos em alimentos (por exemplo, leite e derivados), pois considera-se que podem causar intoxicação e danos à saúde humana, mostrando a necessidade de controle de qualidade de fármacos conforme estabelecem os requisitos de farmacopéias e estimativa da quantidade residual em alimentos (STEAD, 2000; FEDORCHUK et al., 2005). Outro fato que contribuiu para a necessidade de estudos relacionados aos antibióticos é o desenvolvimento de genes de resistência bacteriana a esses compostos podendo até inviabilizar o uso de determinado antibiótico, ou demandar a combinação destes para que sejam efetivos (VARALDO, 2002; SILVEIRA et al., 2006). O desenvolvimento de organismos multirresistentes é

especialmente preocupante em centros hospitalares e de terapia intensiva, na qual os pacientes estão mais vulneráveis às infecções hospitalares (De OLIVEIRA et al., 2010).

A cromatografia líquida de alta eficiência é a técnica mais utilizada na quantificação de antibióticos aminoglicosídeos (STEAD, 2000).

As fontes de entrada de antibióticos no ambiente são diversas, ocorrendo a partir da excreção humana, de animais de criação, e de estimação, uso em agricultura (uso de resíduos animais na adubação de culturas), aditivos alimentares na aquicultura, e finalmente o descarte inadequado de fármacos vencidos (BOXALL et al., 2003; THIELE-BRUHN, 2003). À medida que chegam ao ambiente esses fármacos podem atingir os corpos d'água através das chuvas em áreas agrícolas que receberam resíduos de animais e, liberação a partir de estações de tratamento (KOLPIN et al., 2002).

Halling-Sørensen (2000) demonstrou o efeito inibidor de crescimento em algas de água doce *Microcystis aeruginosa e Selenastrum capricornutum* usando estreptomicina, amoxicilina, benzilpenicilina, e tiamulina em concentrações na ordem de 1 μ g L⁻¹. O parâmetro avaliado foi a taxa de concentração de clorofila por extração com álcool e medida por fluorescência. O autor observou que *M. aeruginosa* foi cerca de duas vezes mais sensível do que *S. capricornutum* e que maioria dos compostos foi instável durante o período de ensaio em função de hidrólise ou fotólise (HALLING-SØRENSEN, 2000).

2.1.5 Bezodiazepínico - Alprazolam

O alprazolam é um psicofármaco da classe dos bezodiazepínicos (BDZs). Esses compostos são prescritos para tratamentos de transtornos de ansiedade, ataques de pânico e também como coadjuvante nos tratamentos de depressão moderada (ansiolítico, sedativo e hipnótico) (BALLENGER, 1984; INFARMED, 2011). O mecanismo de ação dos BDZs está associado aos receptores de ácido alfa-aminobutírico (GABA A), permitindo a hiperpolarização das células que atuam facilitando a abertura de canais de cloro (LICATA e ROWLETT, 2008).

O ALP é um sólido branco de fórmula $C_{17}H_{13}CIN_4$, massa molecular 308,8 g mol⁻¹ e ponto de fusão de 228 °C. A nomenclatura do ALP de acordo com a IUPAC é 8-cloro-1metil-6-fenil-4H-1,2,4-triazolo [4,3- α] [1,4] benzodiazepina. Quanto à solubilidade o ALP é considerado insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos como o álcool etílico e metílico. O pKa do ALP é 2,8 (DAILYMED, 2017; INCHEM, 2017). A Figura 4 mostra a estrutura do BDZ alprazolam.


Figura 4: Fórmula estrutural do alprazolam (NUNES et al, 2015).

Os BDZs estão entre os medicamentos mais consumidos, e às vezes por longos períodos, inclusive o consumo como automedicação levando à necessidade de se estabelecer controle da sua prescrição e uso por parte das agências de saúde e autoridades sanitárias (YATES e CATRIL, 2009; BALDISSERA et al., 2010).

Calisto et al. (2011) avaliaram a fotodegradação dos benzodiazepínicos (oxazepam, diazepam, lorazepan e alprazolam) simulando a luz solar em condições controladas e, observaram uma rápida degradação de lorazepam, com tempo de meia vida menor que um dia de sol durante o verão. Enquanto, os outros três compostos mostraram-se mais resistentes indicando que muitos fatores influenciam a persistência das moléculas no ambiente aquático. Esses autores identificaram por espectrometria de massa (ESI-MS) dois possíveis foto-produtos, ALP-I [297 + H]⁺ e ALP-II [299 + H]⁺ que resultam da abertura do anel de sete membros da molécula de ALP seguido da oxidação para uma cetona ou álcool.

Dados de eficiência de estações de tratamento usando o tratamento biológico clássico revelam que a remoção de BDZs é de menos de 10%, com o uso de lodos ativados a remoção é mais eficiente (10 a 50%) resultado de processos de adsorção ao lodo e, não de processos de degradação. Johnson et al. (2008) aborda que os compostos benzodiazepínicos incluindo o ALP, normalmente contém halogênio em sua estrutura causando uma redução na biodegradação desses compostos.

2.2 Técnicas analíticas usadas na quantificação de fármacos

2.2.1 Técnicas cromatográficas

Os fármacos no contexto dos CEC encontram-se em concentrações ordem de ng L^{-1} a µg L^{-1} e em matrizes complexas, tal como as ambientais. Nesses meios, a quantificação dos CEC é feita especialmente usando as técnicas cromatográficas (líquida e gasosa), porque possibilitam a separação, identificação e quantificação de moléculas orgânicas, especialmente quando acopladas à espectrometria de massas (JEANNE et al., 2009; LOOS et al., 2013; GAFFNEY et al., 2015).

As técnicas cromatográficas são consideradas de ampla aplicação por serem baseadas na interação entre duas fases (fase móvel e estacionária) e, a possibilidade de inúmeros combinações entre fases de acordo com a polaridade dos compostos de interesse. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) e a cromatografia gasosa (GC, *gas chromatography*) proporcionaram avanços no uso da cromatografia com o desenvolvimento de colunas com suporte (fase estacionária), utilizando um empacotamento denso e bombas de alta pressão para facilitar a permeabilidade da fase móvel (solvente) (DEGANI, et al., 1998; MALDANER e JARDIM, 2009; MALDANER et al., 2010).

Os detectores utilizados em cromatografia líquida são ultravioleta, fluorescência, índice de refração, eletroquímicos e espectrometria de massas (DEGANI, et al., 1998; Da SILVA e COLLINS, 2011). Ao se utilizar a cromatografia gasosa o analito de interesse deve ser volátil, ou ter a possibilidade de derivatização para torná-lo volátil. Um dos detectores mais utilizado em GC é o espectrômetro de massas, pois permite baixos limites de detecção e a possibilidade de acesso aos dados de espectros de massas utilizando-se *softwares* com uma biblioteca de dados, para fins de comparação e confirmação da estrutura provável da molécula orgânica em estudo (AZEVEDO et al., 2000; Da SILVA e COLLINS, 2011).

As agências oficiais de proteção ambiental, como a U.S.EPA (United States Environmental Protection Agency) empregam técnicas cromatográficos como métodos oficialmente estabelecidos para a quantificação de CECs (BARCELÓ, 1996; Da SILVA e COLLINS, 2011). As técnicas cromatográficas necessitam da aplicação de diversas etapas prévias de tratamento da amostra, devido aos baixos teores dos analitos. Tais tratamentos podem envolver a extração do analito por cromatografia líquido-líquido, pré-concentração e uso de etapas de limpeza (*cleanup*) por extração em fase sólida (GHONEIM et al., 2004; RADI et al., 2003).

Gaffney et al. (2014) propuseram um método por cromatografia líquida de ultra performance, acoplado à espectrometria de massas UPLC-ESI-MS/MS (do inglês, *Ultra Perfomance Liquid Chromatography*) por ionização com electrospray. O método foi usado na análise de 31 fármacos em águas para consumo humano sendo que nove desses fármacos foram quantificados nas amostras aquosas. Petrovic et al. (2004) usando HPLC-MS avaliaram hormônios em amostras de água de rios. Falone (2007) propôs um método por

HPLC UV-Vis para quantificação do hormônio 17α-metiltestosterona em amostras de água e sedimento. Na Tabela 1 encontram-se trabalhos empregando a cromatografia para a determinação de contaminantes emergentes em diferentes matrizes.

Composto	Técnica	Local (amostragem)	Concentração detectada	Referência
Estrógenos e progestógenos	HPLC- MS	Água de rios (Espanha)	0,2-71,1 ng L ⁻¹	PETROVIC et al, 2004.
Esteróides e Hormônios	HPLC- MS	Água de rios (Estados Unidos)	5-2000 ng L ⁻¹	PETROVIC et al, 2004.
17α- Metiltestosterona	HPLC-UV	Sedimentos - Tanques de psicultura (Jan/ 2006) – Socorro- SP	Entrada/ Saída (µg L-1) 203,5/ 168,0 218,5/ 273,0 313,0/ 237,5	FALONE, 2007.
17α- metiltestosterona Progesterona	HPLC- MS/MS	Rio Danúbio (Budapeste)	$< 0.30 \text{ ng L}^{-1}$ $< 0.37 \text{ ng L}^{-1}$	TÖLGYESI et al, 2010.
17β-Estradiol		Água de manancial, Jaboticabal-SP	30,6 ng L ⁻¹	LOPES et al, 2010.
Haloperidol Nimesulida	HPLC- MS/MS	Água superficial (rio Grande)	0,1 μg L ⁻¹ ,05 μg L ⁻¹	SILVEIRA et al, 2013.
Cafeína	UPLC- MS/MS	ETA (Rio Tejo, Portugal)	0,54 a 46 ng L ⁻¹	GAFFNEY et al., 2014.
Carbamazepina		Água subterrânea	1,5 a 9,4 ng L ⁻¹	
Sulfametoxazol		Rio Tejo	0,27 a 7,2 ng L ⁻¹	
Eritromicina		de tratamento	0,09 a 7,1 ng L ⁻¹	
Atenolol		Água de consumo humano – Portugal	0,79 a 1,63 ng L ⁻¹	

Tabela 1: Estudos de detecção de fármacos por cromatografia em matrizes aquosas.

Conforme abordado, as metodologias normalmente empregadas para a análise de contaminantes emergentes e seus resíduos em matrizes ambientais envolvem a quantificação dos analitos por diferentes técnicas cromatográficas (SANTOS et al., 2010; LOPES et al., 2010; PIWOWARSKA et al, 2010). No entanto, esses compostos encontram-se em concentrações da ordem de ng L^{-1} a μ g L^{-1} nas amostras e estas apresentam os componentes da matriz, ou às vezes, a matriz não é compatível com a coluna cromatográfica. Isto demanda

a aplicação de etapas de pré-concentração e *clean-up*, tais como, extração líquido-líquido, extração em fase sólida, filtração em membranas. Com a necessidade de tratamentos prévios as análises tornam-se morosas e elevam os custos das análises as quais também consomem grandes volumes de solventes orgânicos de elevada pureza (RADI et al., 2003; GHONEIM et al., 2004).

Conforme abordado, a quantificação dos contaminantes emergentes em matrizes ambientais é um desafio analítico, pela complexidade das matrizes e as concentrações do analito da ordem de ng L⁻¹ a μ g L⁻¹. Por isso, há interesse em se desenvolver métodos para a determinação desses compostos que sejam sensíveis, mais simples, rápidos e de menor custo. Assim, as técnicas voltamétricas são empregadas nesse sentido.

2.2.2 Técnicas voltamétricas

A voltametria abrange um conjunto de técnicas eletroanalíticas que fornecem informações qualitativas e quantitativas das espécies químicas e sobre os fenômenos que se processam na interface do eletrodo e solução, a partir do registro de curvas de corrente-potencial, obtidas a partir da eletrólise da espécie no interior de uma cela eletroquímica. Essas informações são registradas como curvas de corrente em função do potencial aplicado entre dois eletrodos, realizando-se uma varredura a uma velocidade constante em função do tempo. A curva resultante da corrente em função do potencial é denominada voltamograma (CHRISTIAN, 1986; SKOOG et al., 2006; PACHECO et al., 2013).

Na voltametria o analito deve ser eletroativo, ou seja, capaz de oxidar ou reduzir-se na faixa de potencial avaliada, de acordo com a Equação 2.2. A intensidade de corrente é registrada durante a transferência de elétrons ao longo do processo de oxirredução e, considera-se que a intensidade de corrente seja proporcional à quantidade do analito depositada na interface eletrodo-solução (SOUZA et al., 2003; PACHECO et al., 2013).

O + ne⁻ ↔ R (Equação 2.2) (Forma oxidada) (Forma reduzida)

A corrente resultante do potencial aplicado permite que o processo de oxirredução do analito, a corrente faradaica gerada na superfície do eletrodo é dada pela equação (Equação 2.3):

$$i = zF dn/dt$$
 (Equação 2.3)

Onde: z = é um inteiro de sinal e magnitude da carga iônica da espécie eletroativa; F constante de Faraday (96.484,6 C); dn/dt é a taxa de variação de moles da espécie eletroativa.

Além da difusão podem ocorrer outros dois processos de transporte de massa entre a solução e a superfície do eletrodo. Um deles é a migração de partículas carregadas presentes na solução, em função do campo elétrico. O segundo é a convecção, um processo mecânico que ocorre pela agitação da solução. A migração é minimizada pela adição de um eletrólito inerte (eletrólito de suporte) à solução em uma concentração de 50 a 100 vezes maior do que a substância eletroativa. Enquanto que a convecção é eliminada mantendo-se a solução em repouso e cessando o borbulhamento de gás N_2 instantes antes de aplicar o potencial de trabalho. Assim, apenas a difusão será responsável pelo transporte de massa, e a corrente medida (i_d), pode ser efetivamente expressa como a corrente de difusão (AGOSTINHO et al., 2004; SKOOG et al., 2006; PACHECO et al., 2013).

As células eletrolíticas atuais utilizam três eletrodos, sendo um de trabalho, o qual se polarizará, o eletrodo de referência que mantém o potencial constante (elevada resistência) e o auxiliar, ou contra-eletrodo, o qual pode ser de platina, ouro, carbono vítreo, etc. Esse eletrodo assegura o sistema potenciostático diminuindo a resistência e permitindo a passagem de corrente entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo (ALEIXO, 2003; PACHECO et al., 2013).

2.2.2.1 O eletrodo de trabalho

A voltametria se desenvolveu a partir da polarografia (OSTERYOUNG & O'DEA, 1982), na qual o eletrodo gotejante de mercúrio (EGM) é empregado como eletrodo de trabalho (SKOOG et al., 2006). O eletrodo de mercúrio ainda é utilizado em determinações voltamétricas devido a algumas propriedades físico-químicas, tais como, o alto sobrepotencial para evolução de hidrogênio; formação de gota de área superficial uniforme; possibilidade de renovação da gota a cada medida; amplo intervalo de potencial de redução; formação de uma amálgama entre as espécies reduzidas e o mercúrio (MARTINS, 2008).

O emprego dos eletrodos de mercúrio é bastante discutido, devido ao mercúrio ser considerado um metal tóxico ao ser humano e ao meio ambiente e pela liberação de vapores tóxicos (SHERIGARA et al., 2007). Com isso, a literatura sugere a substituição do eletrodo de mercúrio por outros confeccionados a partir dos metais ouro, platina e irídio (ZHU et al., 2007; SHERIGARA et al., 2007) ou por eletrodos modificados, por exemplo, com filmes

finos, eletrodos impressos, ou com nanopartículas (TADINI, et al., 2014; BUKKITGAR et al. 2016). No entanto, estes fatos não inviabilizaram o uso do eletrodo de mercúrio, pois os equipamentos mais modernos conseguiram reduzir significativamente o volume de metal utilizado durante uma quantificação. Além disso, não há necessidade de polimento do eletrodo para a limpeza e renovação da superfície eletródica, como nos eletrodos sólidos, a qual pode comprometer a reprodutibilidade da superfície do eletrodo (ALEIXO, 2003)

A Figura 5 mostra um modelo de eletrodo de mercúrio disponível comercialmente, que pode operar no modo gotejante e gota pendente de mercúrio, o qual consiste em um tubo capilar muito fino conectado a um reservatório de mercúrio, onde o metal passa através do capilar de vidro contendo um arranjo controlado por um pistão que permite a formação de gotas com diâmetros de 0,5 a 1 mm, com áreas superficiais bastante reprodutíveis. Em algumas aplicações, o tempo da gota é controlado por um martelete mecânico que a desprende, após um tempo fixo de sua formação (SKOOG et al., 2006).



Figura 5: Modelo de eletrodo de mercúrio modo gotejante, ou gota pendente de mercúrio (SKOOG, et al, 2006).

O eletrodo de mercúrio pode ser empregado de diversas modos, tais como, gotejante (DME, do inglês, *droping mercury electrode*), gota estática (SMDE do inglês, *static mercury droping electrode*), ou de gota pendente (HMDE do inglês, *hanging mercury droping electrode*).

2.2.2.2 Voltametria: características e aplicações

A voltametria se divide em voltametria cíclica (VC), voltametria de pulsos e a voltametria linear.

A VC é um método de varredura de potencial que permite estudar os processos do eletrodo e, assim obter informações qualitativas sobre as reações eletroquímicas, diagnóstico do mecanismo de reações na identificação de espécies e intermediários e na análise semiquantitativa de velocidade de reações (WANG, 2000; SKOOG et al., 2006). Porém, a VC não é muito utilizada na análise quantitativa de compostos, porque não promove baixos limites de detecção, como nas técnicas de pulso.

Utilizando-se a VC é possível avaliar a reversibilidade dos processos redox a partir do voltamograma gerado. As varreduras para regiões negativas (catódicas) promovem a redução do analito, quando o potencial atinge um valor em que não ocorre mais reação de redução, a varredura é realizada no sentido contrário até retornar ao potencial inicial. O voltamograma registrado durante a varredura depende do mecanismo de reação do composto sobre o eletrodo (AGOSTINHO et al., 2004; SKOOG et al., 2002). A Figura 6 mostra um voltamograma cíclico característico de um processo reversível, mostrando os picos direto e reverso (WANG, 2000; SKOOG et al., 2006).



Figura 6: Voltamograma cíclico típico de um processo redox reversível (O + ne- \leftrightarrow R).

As técnicas de pulso se baseiam na medida da corrente em função do tempo de aplicação de um pulso de potencial e, as correntes medidas correspondem tanto a largura de pulso quanto ao degrau de potencial aplicado no eletrodo para promover o processo faradaico (SKOOG et al, 2006).

A voltametria de pulsos pode ser dividida em: voltametria de pulso normal,

voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada. Essas técnicas voltaméricas são empregadas, em diferentes áreas, como na indústria para o controle de qualidade, médica e farmacêutica, entre outras, na determinação de compostos orgânicos e inorgânicos.

Na voltametria de pulso normal, as medidas de corrente são resultantes de uma sequência de aplicação de pulsos em função do tempo de duração constante e amplitude crescente, sobreposta a um potencial de base constante, no qual não há processos faradaicos. Uma corrente residual é gerada pela presença de oxigênio dissolvido ou outras impurezas eletroativas. Durante a aplicação do pulso a corrente capacitiva é praticamente nula. O potencial aplicado sobre o eletrodo oxida e/ou reduz o analito gerando uma corrente difusional. A aplicação de pulsos leva ao aumento de potencial do eletrodo, as correntes geradas são coletadas na forma de uma onda sigmoidal, a qual é dependente da concentração do analito em solução (SOUZA et al., 2003).

A voltametria de pulso diferencial possibilitou uma melhoria de sensibilidade em relação ao pulso normal, porque a contribuição da corrente faradaica é maior do que a capacitiva.

Figura 7-A mostra a forma de aplicação de potencial, onde os pulsos de potencial encontram-se sobrepostos em uma rampa de potencial em forma de degraus e a amostragem de corrente é realizada no início antes da aplicação do pulso (S_1) e no final de cada pulso (S_2) . A diferença de correntes amostradas em (S_1) e (S_2) é plotada em função do potencial aplicado. No voltamograma resultante (Figura 7-B), a área de pico é proporcional à concentração do analito em solução (SKOOG et al., 2002; PACHECO et al., 2013).



Figura 7: A) Esquema representando a aplicação de potencial em função do tempo em polarografia de pulso diferencial. A corrente é amostrada em S₁ e S₂ e a diferença entre elas é registrada: $I = I_{S2} - I_{S1}$. **B**) Voltamograma de pulso diferencial.

A forma de amostragem descrita acima para a voltametria de pulso diferencial

minimiza a contribuição da corrente capacitiva possibilitando atingir limites de detecção da ordem de 10⁻⁸ mol L⁻¹ (SKOOG et al., 2002; PACHECO et al., 2013).

A voltametria de onda quadrada (SWV do inglês, *Square Wave Voltammetry*) pode ser empregada em estudos sobre o comportamento redox do sistema, avaliação da cinética e mecanismos do processo eletródico (SOUZA et al., 2003).

As técnicas voltamétricas de pulso apresentam como vantagem a diminuição do efeito de interferência gerado pela corrente capacitiva. Nessa técnica, como a corrente capacitiva é proporcional a e^{-t/RC}, onde t é o tempo, R a resistência da solução e C a capacitância da dupla camada, a corrente faradaica é aproximadamente proporcional a t^{-1/2}, a queda da corrente capacitiva é mais acentuada que a corrente faradaica. Assim, as medidas de corrente são realizadas após a contribuição da corrente capacitiva ter se minimizado, melhorando os resultados. A Figura 8 apresenta a variação da corrente faradaica e capacitiva em função ao tempo e o ponto da medida de corrente é registrada (SOUSA et al., 2003).



Figura 8: Variação da corrente faradaica (I_f) e corrente capacitiva (I_c) com o tempo na SWV (SOUZA et al., 2003).

Na SWV atual, as formas de onda consistem de uma onda quadrada simétrica (amplitude, α) sobreposta a uma "escada de potenciais" (incremento de varredura ΔEs), sendo que um período completo de onda quadrada ocorre para cada período (t) da "escada de potenciais". A largura do pulso, ou t/2, é denominada t_p e a frequência de aplicação dos pulsos, 1/t, é caracterizada por f (RAMALEY & KRAUSE-Jr., 1969 a; RAMALEY & KRAUSE-Jr., 1969 b *apud* SOUZA et al., 2003).

A medida da corrente na SWV é feita no início e ao final dos pulsos diretos (I_d) e reversos (I_r) e o sinal registrado é definido como corrente resultante (ΔI) em forma diferencial com elevada sensibilidade e rejeição das correntes capacitivas. A corrente resultante é dada por $\Delta I = I_r - I_d$. A medida apresenta um tempo inicial (t_i), etapa em que o eletro é polarizado a um potencial onde não ocorrem reações de oxidação ou redução. A Figura 9 apresenta os detalhes da forma de aplicação do potencial típica da SWV (SOUZA et al., 2003).



Figura 9: Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada (SOUZA et al., 2003).

O desenvolvimento de estudos com SWV foi possível graças ao trabalho de dois grupos de pesquisas, o de Janet Osteryoung, e depois de Milivoj Lovric. Eles utilizaram espécies eletroativas (reduzem ou oxidam) como modelo, aliadas aos recursos de programas computacionais, capazes de fornecer informações sobre a reversibilidade, bem como o número de elétrons envolvidos no processo redox (SOUZA et al., 2003).

A Figura 10 apresenta os voltamogramas teóricos que podem ser obtidos em um sistema reversível (1) e um sistema reversível (2)



Figura 10: Voltamogramas de onda quadrada esquemáticos para um sistema reversível (1) e para um sistema irreversível (2) (SOUZA et al., 2003).

A sensibilidade da SWV é similar ao pulso diferencial com limites de detecção

reportados da ordem de 10⁻⁷ a 10⁻⁸ mol L⁻¹ para processos irreversíveis (SKOOG et al., 2006).

A forma de amostragem de corrente desenvolvida com as técnicas de pulso permitiu atingir limites da ordem de 10⁻⁸ mol L⁻¹, devido a minimização da corrente capacitiva. Entretanto, para concentrações abaixo desses limites a corrente faradaica torna-se baixa e, é sobreposta pela corrente residual, similar ao que ocorria na polarografia clássica. Assim, com a aplicação da voltametria de redissolução com etapa de pré-concentração do analito permitiu o aumento da corrente faradaica e a diminuição dos limites de detecção para valores até 10⁻¹¹ mol L⁻¹, possibilitando a aplicação de técnicas voltamétricas em análises multi-elementares e especiação, e na determinação de traços de metais em águas naturais, entre outras aplicações, com a possibilidade de pré-concentração do analito por fatores de 100 a 1000 vezes (WANG, 1985; BARD, 2001; SKOOG et al., 2006; LI et al., 2012).

Na voltametria de redissolução o analito reage previamente com o eletrodo de trabalho antes da varredura e, assim é pré-concentrado em sua superfície aumentando a resposta de corrente. A etapa de pré-concentração ocorre em um potencial controlado por um período de tempo definido e sob condições controladas. Em seguida o analito é redissolvido (*stripping*) e retorna para a solução. A voltametria de redissolução é classificada em catódica e anódica. A voltametria de redissolução anódica (*ASV*, do inglês *Adsorptive Stripping Voltammetry*) é a mais utilizada na análise de íons metálicos, denominada deposição anódica. Ao passo que para compostos orgânicos usualmente emprega-se a redissolução catódica. Para esta técnica o analito é previamente depositado por oxidação, seguido pela redissolução por redução. Para o HMDE, as reações entre o analito (**A**) e o eletrodo podem ser representadas genericamente pelas Equações 2.4 ("a" deposição; "b" redissolução) (WANG, 1985; BARD, 2001; PACHECO et al., 2013).

 $A^{n+} + ne^- + Hg \rightarrow A(Hg)$ (Equação 2.4 a) $A(Hg) \rightarrow A^{n+} + Hg + ne^-$ (Equação 2.4 b)

A interação analito/eletrodo representada na Equação 2.4a ocorre com íons metálicos, bem como para moléculas orgânicas. As moléculas ou íons deslocam-se até o eletrodo por difusão, mas também por convecção, pois na etapa de pré-concentração a solução está sob agitação (PACHECO et al., 2013).

Após a etapa de deposição do analito, a agitação é interrompida e a solução permanece em repouso, para que ocorra a homogeneização da concentração do metal na superfície do eletrodo por difusão, período que varia de acordo com o tipo de eletrodo e, é

chamado tempo de repouso ou equilíbrio. Por fim, o voltamograma é registrado permitindo a construção de curvas da resposta de corrente em função do tempo (BARD, 2001; SKOOG et al., 2006). Como a voltametria de redissolução envolve a acumulação do analito na superfície do eletrodo, em concentrações elevadas ocorre a perda da linearidade por saturação da superfície eletródica (PACHECO et al., 2013).

A Tabela 2 mostra trabalhos utilizando técnicas voltamétricas para a determinação de fármacos em diferentes matrizes. A maioria dos trabalhos empregando técnicas voltamétricas são aplicados na quantificação de fármacos em formulações farmacêuticas (ALVAREZ-LUEJE, et al., 1997; FEDORCHUK et al., 2005; SARTORI et al., 2009; LIMA, et al., 2013) e fármacos em matrizes biológicas (WANG et al., 2006; BARTOSOVÁA et al., 2011; BUKKITGAR et al., 2016).

Alvarez-Lueje, et al. (1997) avaliou a resposta catódica de NIM em eletrodo de carbono vítreo e eletrodo de mercúrio empregando a voltametria de pulso diferencial na determinação de NIM em formulações farmacêuticas. As recuperações obtidas foram de 104,8% com um RSD de 1,3%, mostrando-se um método adequado a esta matriz.

Bukkitgar et al. (2016) desenvolveu um método usando a voltametria de pulso diferencial e o eletrodo de carbono vítreo, modificado com nanopartículas de óxido de zinco dopado com bário a 5%. O método foi aplicado para quantificar nimesulida em formulações farmacêuticas e urina humana fortificada com o fármaco com recuperações próximas a 100%.

Composto	Técnica/ eletrodo	Matriz (amostragem)	Resposta/ Observações	Referência
Nimesulida	Polarografia de Pulso Diferencial (^a GCE)	Formulações farmacêuticas (100 mg)	102,8 ± 1,8 mg	ALVAREZ- LUEJE, et al., 1997
Estreptomicina	Filme de Hg	Leite	Tempo de análise 10	FEDORCHUK
Azitromicina	Eletrodo de carbono vítreo (GCE)	Formulações farmacêuticas	a 15 min (formulações) e 2 h para leite ao invés de 2-3 dias por análise microbiológica.	et al., 2005
Nimesulida	Voltametria- PD (GCE- modificado L-cisteína)	Soro humano (fortificado)	Adições (45,94 a 2003,7 μg L ⁻¹) Recuperações (96,4 a 105,0)	WANG, et al., 2006

Tabela 2: Fármacos detecção por técnicas eletroanalíticas em diversas matrizes.

Ácido acetilsalicílico	Voltametria de onda quadrada (^b BDD)	Formulações farmacêuticas (100 e 500 mg)	Resultados de acordo com método de referência (Farmacopéia)	SARTORI et al., 2009
BDZs	HMDE	Adulterações em formulações de emagrecimento	Detecção de BDZs em 4 amostras de 12	De CARVALHO et al., 2010
Citrato de sildenafil (viagra)	HPLC com detector amperométri co (BDD)	Plasma humano (fortificado)	Método adequado para estudos farmacocinéticos e monitoramento	BARTOSOVÁ A et al., 2011
Nimesulida	Sistema FIA/ Amperometri a (BDD)	Formulações farmacêuticas (100 mg)	$103,5 \pm 0,6 \text{ mg}$ $104,2 \pm 0,6 \text{ mg}$ $104,2 \pm 0,5 \text{ mg}$	Lima, et al., 2013
Bezafibrato	^c V _{Ads} RA-OQ (GCE- nanotubos de carbono)	Formulações farmacêuticas	Método eficiente (comparado ao espectrofotométrico)	Ardila et al., 2014.
17α- metiltestostero na	V _{Ads} RC-OQ (HMDE)	Tanques de psicultura (Guarapuava- Pr)	$54,4 \pm 2,8 \ \mu g \ L^{-1}$ $142,2 \pm 15,5 \ \mu g \ L^{-1}$ $75,6 \pm 0,7 \ \mu g \ L^{-1}$	Miranda et al., 2014
Alprazolam	°V _{Ads} RC-PD (HMDE)	Rio Casvavel (Guarapuava- Pr)	$5.9 \pm 0.5 \ \mu g \ L^{-1}$	Nunes et al., 2015
Quercetina	V _{Ads} RA-PD (Grafite)	Sucos	$\begin{array}{c} 0,16\pm 0,05 \mbox{ mg } L^{-1} \\ 0,59\pm 0,11 \mbox{ mg } L^{-1} \end{array}$	Vu et al., 2015
Nimesulida	V _{Ads} RC-PD ^d BDZONP/G CE	Formulações farmacêuticas e Urina	95,3 -102.4 (RSD = 2,7 %); 99,2 - 100,6 (RSD = 1,3 %)	Bukkitgar et al. 2016.

^aGCE: glassy carbon electrode; ^bBDD: boron-doped diamond electrode; ^cV_{Ads}RC/ V_{Ads}RA: voltametria adsortiva de redissolução catódica ou anódica. ^dBDZONP: barium doped zinc oxide nanoparticles modified glassy carbon.

Na literatura ainda poucos trabalhos abordam o uso da voltametria para a quantificação de contaminantes emergentes em matrizes ambientais. No grupo de estudos do LABGATI (Laboratório de Analítica e Análises de traços) da UNICENTRO tem sido desenvolvido alguns trabalhos nessa área (MIRANDA et al., 2014; NUNES et al., 2015; MIRANDA et al., 2015).

Miranda et. al. (2014 e 2015) desenvolveu e validou um método empregando voltametria de onda quadrada e foi aplicado na quantificação do hormônio 17α -metiltestosterona em amostras aquosas de rio tanque de criação peixes no município de

Guarapuava-PR. Os valores de recuperação para o ensaio de precisão foram de 100,4 e 108,8%, com RSD de 2,85 e 14,1%, respectivamente, mostrando que o método proposto foi preciso e exato na quantificação de 17α -metiltestosterona em águas naturais com análises de baixo custo.

Nunes et al (2015) desenvolveu e validou um método voltamétrico para quantificar ALP em águas naturais. O método apresentou limites de detecção e quantificação foram 0,1 μ g L⁻¹ e 0,4 μ g L⁻¹, respectivamente. As recuperações calculadas para a exatidão foram de 90 a 116%, os valores de RSD na precisão foram menores que 15%, mostrando que o método foi exato. Aplicou-se o método em análises de água do rio Cascavel em Guarapuava-PR, para a amostra coletada a jusante de uma estação de tratamento foi encontrado 5,9 ± 0,5 μ g L⁻¹ de ALP.

As técnicas eletroanalíticas também podem ser empregadas combinadas com outras técnicas, como a cromatografia. Por exemplo, em um método usando HPLC com detecção amperométrica do citrato de sildenafil em plasma humano (BARTOSOVÁA et al., 2011).

Dentro deste contexto, as técnicas eletroanalíticas, compreendem um conjunto de técnicas voltamétricas cada vez mais utilizadas para a análise de diferentes compostos em matrizes complexas, por diversos grupos de pesquisas (HERNANDEZ-OLMOS et al., 2000). As vantagens inerentes a estas técnicas estão relacionadas com o baixo custo das análises, bem como a possibilidade de se monitorar compostos diretamente na própria matriz (RUPP e ZUMAN, 1992; SZCZEPANIAK et al., 1995; SOUZA et al., 2003). As técnicas voltamétricas de redissolução têm sido bastante empregadas em amostras de interesse ambiental (SKOOG et al, 2006).

A voltametria adsortiva com etapas de pré-concentração permite a determinação de espécies químicas que adsorvem na superfície do eletrodo. Assim, é possível aplicar a voltametria no desenvolvimento de métodos analíticos mais sensíveis na quantificação de compostos com propriedades ecotoxicológicas e genotóxicas (VIRE et al., 1989). Essa técnica é aplicável a inúmeras subtâncias orgânicas com propriedades eletroativas, permitindo sua detectabilidade usando eletrodos de mercúrio com LD's de 10^{-11} a 10^{-12} mol L⁻¹ (ALEIXO, 2003).

Os pré-requisitos essenciais à aplicação da voltametria adsortiva por redissolução é a eletroatividade do analito e adsorção na superfície do eletrodo de trabalho. No caso dos metais pode-se aplicar a voltametria de redissolução anódica devido a capacidade do eletrodo de mercúrio formar uma amálgama com muitos metais. Entretanto, em casos em que a determinação direta não é possível pode-se utilizar um agente complexante, tornando o analito eletroativo. As técnicas voltamétricas aplicadas na quantificação de metais e moléculas orgânicas por voltametria adsortiva podem ser a de pulso diferencial e de onda quadrada (ALEIXO, 2003). Compostos orgânicos como fármacos tendem a adsorver-se na superfície do eletrodo de mercúrio em solução aquosa, com tempos de acumulação de 1 a 20 min para soluções em concentrações de 10⁻⁷ a 10⁻⁹ mol L⁻¹ (SKOOG et al., 2006).

2.3 Validação de Métodos

A validação é uma ferramenta usada para garantir que um procedimento ou método é consistente e apropriado para uma determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e produtos farmacêuticos (ANVISA, 2003).

A validação de métodos também é uma ferramenta usada em laboratórios de controle de qualidade de matéria-prima, ou produtos finais. Um procedimento de validação deve seguir diretrizes e normas propostas por agências organizadas e reconhecidas em diversas áreas de atuação (ICH, 1995; US-FDA, 2001; AOAC, 2002; ANVISA, 2003; INMETRO, 2011). De acordo com a ANVISA (2003) "A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados".

De acordo com as etapas aplicadas à validação de um método essa pode ser classificada como intralaboratorial a validação em laboratório (*in house validation*), ou uma validação completa, interlaboratorial (*full validation*). A primeira é empregada para validar um método que está em desenvolvimento, ou para verificar se um método proposto está bem aplicado. Na validação completa são aplicados todos os parâmetros de desempenho, incluindo a reprodutibilidade, uma análise interlaboratorial para verificar o comportamento da metodologia para a mesma matriz em diferentes laboratórios (THOMPSON et al., 2002).

Os parâmetros analíticos avaliados em um processo de validação dependem do guia escolhido e da finalidade do método proposto. A Anvisa estabelece na Resolução 899/03 para a validação de métodos bioanalíticos os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, robustez, precisão e exatidão (ANVISA, 2003).

2.3.1 Seletividade

A seletividade avalia a capacidade de um método determinar o analito de interesse em presença de outros componentes, tais como, impurezas e componentes da matriz. Esse parâmetro pode ser avaliado qualitativamente mostrando a capacidade de um método selecionar, por exemplo, em amostras contendo um fármaco e outros compostos com estrutura semelhante. A seletividade está diretamente relacionada com a linearidade, exatidão e precisão da metodologia (RIBANI et al., 2004).

O método de adição padrão também pode ser utilizado no estudo de seletividade, neste caso, uma curva analítica é construída com adições da substância de interesse na amostra e a inclinação dessa curva é comparada com uma curva na ausência de matriz. Se a inclinação de ambas as curvas for igual considera-se que não há interferência de matriz, permitindo a determinação do analito de interesse. Outra maneira de avaliar a seletividade é analisando a mesma amostra utilizando-se outra técnica e compara-se os resultados (BRUCE et al., 1998; RIBANI et al., 2004).

2.3.2 Linearidade e Faixa Linear

A linearidade permite avaliar a capacidade do método em responder proporcionalmente à concentração do analito, dentro de uma determinada faixa de concentração (ICH, 1995). A linearidade é obtida a partir de curvas padrão interno ou externo e, é expressa matematicamente através de uma equação da reta (y = a x + b), na qual "y" corresponde a resposta medida pelo equipamento (absorbância, altura ou área de pico, corrente de pico, etc) e a concentração do analito é dada por "x". A equação da reta permite calcular a concentração da substância a ser quantificada em uma amostra real. O termo b é a interseção da curva com o eixo y, quando x é igual a zero e a corresponde à inclinação da curva e está diretamente relacionado com a sensibilidade do método (INMETRO, 2011). Uma curva linear deve conter no mínimo cinco pontos, excluindo o ponto zero para evitar possíveis erros (THOMPSON et al., 2002).

A correlação linear da resposta em função da concentração do analito pode ser avaliada pela regressão linear "r" calculado pelo método dos mínimos quadrados. Esse parâmetro indica a adequação da reta, quanto mais próximo de 1,0 for o coeficiente de correlação, menor é a dispersão entre resultados experimentais e menor a incerteza na estimativa dos coeficientes de regressão (BRUCE et al., 1998; RIBANI et al., 2004). De acordo com a Anvisa (2003) o valor mínimo de r deve ser 0,99.

A faixa linear de trabalho deve incluir a faixa de concentração na qual o ensaio será aplicado, ou seja, a concentração de uma amostra deve ser igual ou maior que o limite de detecção do método, para permitir a distinção dos sinais do analito e o branco (INMETRO, 2011). O limite inferior da faixa de concentração de uma curva linear são os limites de

detecção e quantificação, e o limite superior depende da resposta de cada técnica (EURACHEM-GUIDE, 1998).

2.3.3 Precisão

A precisão permite avaliar a dispersão entre resultados de ensaios independentes para uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões em condições definidas previamente. A precisão pode ser expressa pela repetitividade e precisão intermediária por meio do desvio padrão relativo (DRP) ou pelo coeficiente de variação (CV%) e são dependentes da concentração do analito, devendo ser determinada em diferentes concentrações. A Equação 2.5 refere-se ao cálculo do DPR (INMETRO, 2011).

$$DPR = (DP/CMD) \times 100$$
 (Equação 2.5)

Onde, DP é o desvio padrão e CMD a concentração média determinada

A repetitividade avalia o quanto os resultados obtidos em medidas sucessivas concordam entre si, seguindo um mesmo procedimento, realizadas pelo mesmo analista, utilizando o mesmo instrumento e local. Estas medidas devem ser realizadas em curto espaço de tempo (em um mesmo dia) (INMETRO, 2011). A repetitividade avalia a precisão intracorrida (ANVISA, 2003).

A precisão intermediária (precisão inter-corridas) é o grau de concordância entre resultados de análises de um mesmo laboratório, mas realizado em dias diferentes, com analistas e/ou equipamentos diferentes (ANVISA, 2003). A avaliação da precisão intermediária é considerada mais precisa podendo representar melhor a variabilidade dos resultados das análises de acordo como o INMETRO (2011).

2.3.4 Exatidão

A exatidão expressa o quanto o valor determinado concorda com o valor aceito como verdadeiro ou um valor de referência (EURACHEM GUIDE, 1998; INMETRO, 2011). A exatidão pode ser avaliada com o uso de material de referência, por comparação de análises interlaboratoriais e por meio de ensaios de recuperação (INMETRO, 2011).

Os resultados da precisão podem ser avaliados pelo cálculo do coeficiente de variação (CV) dado pela Equação 2.6.

$$CV = \frac{s}{x} \times 100$$

(Equação 2.6)

Na Equação 2.7, o termo *x* corresponde à média e o termo *s* ao desvio padrão entre as replicatas da resposta do método.

A exatidão também pode ser avaliada pela análise de amostras fortificadas com uma concentração conhecida do analito e recuperação é calculada pela Equação 2.7 (ANVISA, 2003).

Recuperação % =
$$\frac{(C_1 - C_2)}{C_3} x \, 100$$
 Equação 2.7

Onde: C_1 = concentração determinada na amostra adicionada, C_2 = concentração determinada na amostra não adicionada, C_3 = concentração adicionada.

2.3.5 Limite de detecção

Em determinações de analitos em níveis traços é importante saber qual a menor concentração que pode ser detectada por um método (INMETRO, 2011).

O limite de detecção (LD), que é a menor concentração de um analito detectada, mas não quantificada (INMETRO, 2016). O LD pode ser calculado de três formas: método visual, método relação sinal ruído, ou pelo método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

O LD calculado a partir dos parâmetros da curva analítica pode ser calculado pela Equação 2.8 (INMETRO, 2016).

$$LD = \frac{3S_B}{b} \qquad (Equação 2.8)$$

Onde, S_B é o desvio padrão da média aritmética do sinal do branco, no potencial equivalente ao pico da molécula e b o valor do coeficiente angular da curva analítica. Em métodos voltamétricos o valor de S_B é o desvio padrão da média aritmética da intensidade de correntes de pico obtidas a partir dos voltamogramas para o eletrólito suporte, na ausência do analito.

2.3.6 Limite de Quantificação

De acordo com o INMETRO "o Limite de Quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão". O LQ calculado a partir dos parâmetros da curva analítica pode ser calculado pela Equação 2.9 (INMETRO, 2016).

$$LQ = \frac{10S_B}{b} \qquad (Equação 2.9)$$

2.4 Referências

AGOSTINHO, S. M. L.; VILLAMIL, R. F. V.; NETO, A. A.; ARANHA, H. O Eletrólito Suporte e suas Múltiplas Funções em Processos de Eletrodo. *Química Nova*, v. 27, No. 5, p. 813-817, 2004.

ALEIXO, M. L. Voltametria: Conceitos e Técnicas. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química São Paulo - SP, 2003. Disponível em: http://www.chemkeys.com. Acesso em: 11 Fev. 2017.

ALVAREZ-LUEJE, A.; VÁSQUEZ, P.; NÚÑEZ-VERGARA, L. J.; SQUELLA, J. A. Voltammetric Study of Nimesulide and Its Differential Pulse Polarographic Determination in Pharmaceuticals Electroanalysis. v. 9, n. 15, p. 1209. 1997. *Electroanalysis*, v.9, p. 1209-1213, 1997.

AMBROSETTI, B.; CAMPANELLA, L.; PALMISANO, R. Degradation of Antibiotics in Aqueous Solution by Photocatalytic Process: Comparing the Efficiency in the Use of ZnO or TiO₂. *Journal of Environmental Science and Engineering A*, v. 4, 273-281, 2015.

AMÉRICO, J. H. P.; ISIQUE, W. D.; MINILLO. A.; CARVALHO, S. L.: TORRES, N. H. Fármacos em uma estação de tratamento de esgoto na região Centro-oeste do Brasil e os riscos aos recursos hídricos. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, Porto Alegre, v. 17, n.3, p.61-67, 2012.

ANDREOZZI, R., MAROTTA, R., PAXEUS N. Pharmaceutical in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, v.50, p.1319-1330, 2003.

ANKLEY, G.T.; BROOKS, B.W.; HUGGETT D.B.; SUMPTER J.P. Repeating history: pharmaceuticals in the environment. *Environmental Science Technology*, v.41, p. 8211-8217, n.10, 2007.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos; Resolução RE nº 899; de 29/05/2003.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Programa de Análise de Resíduos de

Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal. Relatório 2006-2007, Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo (5º e 6º anos de atividade). Jun. 2009.

AOAC, Association of Oficial Analyitical Chemists; Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supple-ments and Botanicals, 2002, 38 p.

ARDILA J. A.; OLIVEIRA, G. G.; MEDEIROS, R. A.; FATIBELLO-FILHO, O. Squarewave adsorptive stripping voltammetric determination of nanomolar levels of bezafibrate using a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes within a dihexadecyl hydrogen phosphate film. *Analyst*, 139, 1762-1768, 2014.

AZEVEDO, D. A.; LACORTE, S.; VINHAS, T., VIANA, P.; BARCELÓ, D. Monitoring of priority pesticides and other organic pollutants in river water from Portugal by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. v. 879, n. 1, p. 13-26, 2000.

BALDISSERA, F. G.; COLET, C. F.; MOREIRA, A. C. Uso irracional de benzodiazepínicos: Uma Revisão. *Revista Contexto & Saúde*. v. 10 n. 19, p. 112-116, 2010.

BALLENGER, J. C. Psychopharmacology of the anxiety disorders. *The Psychiatric Clinics* of North America, v. 7, n. 4, p. 757-771, 1984.

BARCELÓ, D. Em *Applications of LC-MS in Environmental Chemistry*, Journal of Chromatography Library; Barceló, D. ed.; Elsevier: Amsterdam, v. 59, p. VI, 1996.

BARCELÓ, D. Emerging pollutants in water analysis. *Trac Trends in Analytical Chemistry*, v. 22, p. 14-16, 2003.

BARD, A. J.; Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications, Wiley: John Wiley & Sons, 2001.

BARTOSOVÁA, Z.; JIROVSKY, D.; HORNA, A. High-performance liquid chromatographic method with amperometric detection employing boron-doped diamond electrode for the determination of sildenafil, vardenafil and their main metabolites in plasma. Journal of Chromatogr. A, v.1218, n.44, p.7996-8001, 2011.

BERNAREGGI, A. Clinical pharmacokinetics of nimesulide. *Clinical. Pharmacokinet*, v. 35, n. 4, p. p. 247-274, 1998.

BERNAREGGI, A., RAINSFORD, K.D. Pharmacokinects of Nimesulide. In: RAINSFORD, K.D. Nimesulide: actions and uses, Birkhauser, p. 107, 2005.

BINELLI, A.; PROVINI, A. The PCB pollution of Lake Iseo (N. Italy) and the role of biomagnification in the pelagic food web. *Chemosphere*, v. 53, n. 2, p. 143-151, 2003.

BIOSSINTÉTICA[®] (2014) - Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=658591 2015&pIdAnexo=2762278. Acesso em: 21 Abr. 2017.

BORGES, R. M.; MINILLO, A.; LEMOS; E. G. M. L.; Do PRADO, H. F. A.; TANGERINO, E. P. Uso de filtros de carvão ativado granular associado a microrganismos para remoção de fármacos no tratamento de água de abastecimento. *Engenharia Sanitária e Ambiente*, v.21 n.4, 709-720, 2016.

BOXALL, A.B.A.; KOLPIN, D.W.; HALLING-SØRENSEN, B.; TOLLS, J. Are veterinary medicines causing environmental risks? Environmental Sciences and Technology, 37, p. 286A–294A, 2003.

BRASIL. *Farmacopeia Brasileira*, volume 2/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 904 p., 2v/il. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd farmacopeia/pdf/volume2.pdf. Acesso: 13 Set. 2016.

BRITO, N. M.; AMARANTE-Jr, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de Métodos Analíticos: Estratégias e Discussão. *Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 13, p. 129-146, 2003.

BUISSON, H., COTE P., PRADERIE, M., PAILLARD, H. The use of membranes for upgrading wastewater treatment plants. IAWQ Conference on Upgrading of Water and Wastewater System. May 25-28, Kalmar, 1997.

BUKKITGAR, S. D.; SHETTI, N. S.; KULKARNI, R. M.; DODDAMANI, M. R. Electrooxidation of nimesulide at 5% barium-doped zinc oxide nanoparticle modified glassy carbon electrode. Journal of Electroanalytical Chemistry, v. 762, p. 37–42, 2016.

BUSER, H. R.; POIGER, T.; MÜLLER, M. D. Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a lake. *Environ. Sci. Technol.*, v.32, p.3449-3456, 1998.

CADORE, I. R.; SILVA, M. K. da; POLLO, L. D.; TESSARO, I. C.; "Biorreatores com membranas: uma alternativa para o tratamento de efluentes", p. 7043-7050. In: Anais do XX

Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014 [= Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n.2]. São Paulo: Blucher. ISSN 2359-1757, DOI 10.5151/chemeng-cobeq2014-0399-25682-159374. 2015

CALISTO, V. M.; ROSARIO M.; DOMINGUES, R. M.; ESTEVES, V. I. Photodegradation of psychiatric pharmaceuticals in aquatic environments e Kinetics and photodegradation products. *Water Research*, v.45, p. 6097-6106, 2011.

CARINI, M.; ALDINI, G.; STEFANI, R., MARINELLO, C.; FACINO, R. M. Mass spectrometric characterization and HPLC determination of the main urinary metabolites of nimesulide in man. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. v. 18, p. 201-211, 1998.

CARVALHO, W, A. Anti-inflamatórios não esteroides, analgésicos, antipiréticos e drogas utilizadas no tratamento da gota. In___SILVA, P. Farmacologia. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

CHRISTIAN, G. D. Analytical Chemistry, 4th ed., John Wiley & Sons, 1986, New York.

CONNELL, D. W. *Bioaccumulation of xenobiotic compounds*, CRC Press, Boca Raton, Flórida. 1990.

Da SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. *Química Nova*, Vol. 34, No. 4, 665-676, 2011.

DAILYMED. http://dailymed.nlm.nih.gov; http://www.inchem.org. Acesso em: 21 Abr. 2017.

DAUGHTON, C. G.; TERNES, T. A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? Environmental Health Perspectives, v.107, p. 907-938, 1999.

De CARVALHO, L. M.; CORREIA, D.; GARCIA S. C.; De BAIRROS, A. V.; Do NASCIMENTO, P. C. Bohrer D. A new method for the simultaneous determination of 1,4benzodiazepines and amfepramone as adulterants in phytotherapeutic formulations by voltammetry. *Forensic Sci Int.* 202(1-3): 75-81, 2010.

De OLIVEIRA, A. C; SILVA, R. S; DÍAZ, M. E. P.; IQUIAPAZA, R. A. Resistência bacteriana e mortalidade em um centro de terapia intensiva. Revista Latino Americana de Enfermagem, 18(6), p. 201-211, 2010.

DEGANI, A. L.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. *Química Nova na Escola*, Cromatografia N° 7, 1998.

DÍAZ-CRUZ, M. S.; LOPEZ DE ALDA, M. J.; BARCELÒ, D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. Trends in Analytical Chemistry, Amsterdam, v. 22, n. 6, p. 340-351, 2003.

ESPLUGAS, S.; GIMENEZ, J.; CONTRERAS, S.; PASCUAL, E.; RODRÍGUEZ, M. Comparison of different advanced oxidation processes for phenol degradation., *Water Res.*, v.36, p.1034-1042, 2002.

EURACHEM-GUIDE. The fitness purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics. Teddington: LGC, 1998.

FALONE, S. Z. Desenvolvimento de métodos para determinarão do hormônio 17α-Metiltestosterona em amostras de água e de sedimentos de psicultura: ensaios ecotoxicológicos com cladóceros. 2007. 155 p. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos. São Carlos, SP.

FEDORCHUK, V. A.; PUCHKOVSKAYA, E. S.; ANISIMOVA, L. S.; SLEPCHENKO, G.B. Use of Voltammetry for Determining Antibiotics Streptomycin and Azitromycin. Journal of *Analytical Chemistry*, Vol. 60, No. 6, p. 518–522, 2005.

FELDMAN, W. H.; HINSHAW, H. C: Effects of streptomycin on experimental tuberculosis in guinea pigs: A preliminary report, *Proceedings of the staff meetings. Mayo Clinic*, v. 19, 593-599, 1944.

FENT, K.; WESTON, A.A.; CAMINADA D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, v.76, p.122-159, 2006.

FERNANDES, A. N.; GIOVANELA, M.; ALMEIDA, C. A. P.; ESTEVES, V. I.; SIERRA, M. M. D.; GRASSI, M. T. Remoção dos hormônios 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol de soluções aquosas empregando turfa decomposta como material adsorvente. *Química Nova* vol.34 no.9, 2011.

GAFFNEY, V. J.; CARDOSO, V. V.; RODRIGUES, A.; FERREIRA, E.; ALMEIDA, C. M. M. Análise de fármacos em águas por SPE/UPLC-ESI-MS/MS. *Química Nova*, v. 37, p. 138-139, 2014.

GAFFNEY, V.J.; ALMEIDA, C.M.M.; RODRIGUES, A.; FERREIRA, E.; BENOLIEL, M. J.; CARDOSO, V. V. Occurrence of pharmaceuticals in a water supply system and related human health risk assessment. *Water Research*, 72:199-208, 2015.

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

GHONEIM, M. M.; BAUMANN, W.; HAMMAM, E.; TAWFIK A. Voltammetric behavior and assay of the contraceptive drug levonorgestrel in bulk, tablets, and human serum at a mercury electrode. Talanta, v. 64, p. 857–864, 2004.

GOLET E.M., ALDER A.C., GIGER W. Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland. Environ. Sci. Technol., v.36, p.3645-3651, 2002.

GUIMARÃES, D. O, MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. Química Nova, Vol. 33, No. 3, 667-679, 2010.

HALLING-SØRENSEN, B. Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming. Chemosphere 40: 731–739, 2000.

HALLING-SØRENSEN, B.; NIELSEN, S. N.; LANZKY P. F.; INGERSLEV F.; LÜTZHØFT, H. C. H.; JØRGENSEN, S. E. Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment-A Review. *Chemosphere*, v.36, n.2, p.357-394, 1998.

HARDMAN, J.G.; GOLDAM, L.E. As bases farmacológicas da terapêutica: fármacos antimicrobianos. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 9. ed., 812-848, 1996.

HARO, N. K. Remoção de bisfenol-A por adsorção. 134 p. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Escola de Engenharia, Porto Alegre, 2013.

HEBERER, T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. Toxicology Letters, v. 131 (1-2): p.5-17, 2002.

HERNANDEZ-OLMOS, M. A.; AGUI, L.; YANÉZ-SEDENO, P.; PINGARRÓN, J. M. Analytical Voltammetry in low-permitivity organic solvents using disk and cylindrical microelectrodes. Determination of thiram in ethyl acetate. *Electrochimica Acta*, v. 46, p.289-

294, 2000.

HODGSON, E. 2004. Em: *A Textbook of Modern Toxicology*; 3rd ed., John Wiley & Sons: New Jersey, cap. 1. p. 557.

HOLT, M. S. Sources of chemical contaminants and routes into the freshwater environment. *Food Chemical and Toxicology*, v. 38 (1 Supl): S21-7, 2000.

HOMEM, V.; SANTOS, L. Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices – a review, *J. Environ. Manage*. 92, 2304–2347, 2011.

HOWARD, P. A. Nonsteroidal anti-inflamatory drugs and cardiovascular Risk. Journal Am Coll Cardiol. 2004; 43: 519-25.

ICH Q2A – Guideline for industry - Text on validation of analytical procedures: Definitions and terminology (March 1995). Disponível em: https://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm073381.pdf. Acesso em: 18 Jul. 2017.

IKEHATA, K.; NAGHASHKAR, N. J.; EL-DIN M. G. Degradation of aqueous pharmaceuticals by ozonation and advanced oxidation processes: a review. *Ozone: Science Technology*, v. 28, 353-414, 2006.

INCHEM - Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations. Disponível em: www.inchem.org. Acesso em: 21 Abr. 2017.

INFARMED (2011). http://www.infarmed.pt. Acesso em: 28 Abr. 2017

IRANDA, L.; FELSNER, M. L.; TORRES, Y. R.; HOSS, I.; GALLI, A.; QUINÁIA, S. P. Validação intralaboratorial da determinação de metiltestosterona em águas naturais por voltametria usando eletrodo de gota pendente de mercúrio. Quim Nova. v. 38, n. 3, p. 419-426, 2015.

JANIEC, W.; Kompendium farmakologii, PZWL, Warszawa, 2005.

JEANNE, K.; ABIGAIL, W. P.; ROBERT, W. M.; GIOMAR, R. C.; ANTHONY, G. H. Biodegradation of Pharmaceutical and Personal Care Products, *Advances in Applied Microbiology*, v. 67, 65-99, 2009.

JENKINS, A. J. Drug Testing in Alternate Biological Specimens. 1st ed. Totowa, NJ, 2008.

JOHNSON, A.C.; JURGENS, M. D.; WILLIAMS, R. J.; KUMMERER, K., KORTENKAMP, A., SUMPTER, J. P. Do cytotoxic chemotherapy drugs discharged into rivers pose a risk to the environment and human health? An overview and UK case study. *Journal of Hydrology*, v. 348, p. 167-175, 2008.

KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*, v. 8, p. 1-13, 2008.

KHANKHASAEVA, S. Ts.; DAMBUEVA, D. V.; DASHINAMZHILOVA, E. Ts.; GIL, A.; VICENTE, M. A.; TIMOFEEVA, M. N. Fenton degradation of sulfanilamide in the presence of Al,Fe-pillared clay: Catalytic behavior and identification of the intermediates. *Journal of Hazardous Materials*, 293, 21–29, 2015.

KIMURA, K., HARA, H., WATANABE, Y. Removal of pharmaceutical compounds by submerged membrane bioreactors (MBRs). *Desalination*, v.178, p.135-140, 2005.

KOBYA, M. Removal of Cr(VI) from aqueous solutions by adsorption onto hazelnut shell activated carbon: kinetic and equilibrium studies. *Bioresource Technol.*, v.91, p.317-321, 2004.

KÖCK-SCHULMEYER, M.; GINEBREDA, A.; POSTIGO, C.; LÓPEZ-SERNA, R.; PÉREZ, S.; BRIX, R.; LLORCA, M.; ALDA, M. L.; PETROVIĆ, M.; MUNNÉ, A.; TIRAPU, L.; BARCELÓ, D. Wastewater reuse in Mediterranean semi-arid areas: The impact of discharges of tertiary treated sewage on the load of polar micro pollutants in the Llobregat river (NE Spain). *Chemosphere*, Oxford, v. 82, p. 670-678, 2011.

KOLPIN, D.W.; FURLONG, E.T.; MEYER, M.T.; THURMAN, E.M.; ZUAGG, S.D., BARBER, L.B.; BUXTON, H.T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. Environmental Science and Technology 36: 1202–1211, 2002.

KREUZINGER, N., CLARA, M., STRENN, B., KROISS, H. Relevance of the slud geretention time (SRT) as design criteria for wastewater treatment plants for the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals from wastewater. *Water science and technology*, v.50, p.149-156, 2004.

KUMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – a review – part I, *Chemosphere* 75, 417–434, 2009.

KÜMMERER, K., STEGER-HARTMANN T., MEYER M. Biodegradability of the antitumour agent ifosfamide and its occurrence in hospital effluents and communal sewage. *Water Research*, v.31, p.2705-2710, 1997. KUMMERER, K.; AL-AHMAD, A.; MERSCH-SUNDERMANN, V. Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere*, v. 40, p. 701–707, 2000.

LACEY, C.; BASHA, S.; MORRISSEY, A.; TOBIN, J. M. Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater process streams in Dublin, Ireland. *Environmental Monitoring Assess.* 184 (2):1049-1062, 2012.

LARINI, L. Fármacos e medicamentos. Artmed. Porto Alegre, 2008.

LI, B. L.; WU, Z. L.; XIONG, C. H.; LUO, H. Q.; LI, N. B. Anodic stripping voltammetric measurement of trace cadmium at tin-coated carbon paste electrode. *Talanta*, 88, 707-710, 2012

LICATA, S. C.; ROWLETT, J. K. Pharmacol Biochem Behav Abuse and dependence Liability of benzodiazepine-type drugs: GABA A Receptor Modulation and Beyond. *Pharmacol Biochem Behav.* 90 (1): 74–89, 2008.

LIMA, A. B.; CHAVES, S. C.; Da SILVA, L. M.; PEREIRA, P. F.; RICHTER, E. M.; Dos SANTOS, W. T. P. Determinação de nimesulida por análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos. *Quimica Nova*, Vol. 36, No. 9, 1296-1302, 2013.

LOOS, R.; CARVALHO, R.; ANTÓNIO, D. C.; COMERO, S.; LOCORO, G.; TAVAZZI, S.; PARACCHINI, B.; GHIANI, M.; LETTIERI, T.; BLAHA, L.; JAROSOVA, B.; VOORSPOELS, S.; SERVAES, K.; HAGLUND, P.; FICK, J.; LINDBERG, R. H.; CHWESIG, D.; GAWLIK, B. M. EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in waste water treatment plant effluents. Water Research, v. 47, p. 6475–6487, 2013.

LOPES, L.G.; MARCHI, M. R.R.; SOUZA, J. B.G.; MOURA, J. A.; LORENZON, C. S.; CRUZ, C.; AMARAL, L. A. Estrogênios em Águas Naturais e Tratadas da Região de Jaboticabal – São Paulo. *Química Nova*, v. 33, n. 3, p. 639-643, 2010.

MALDANER L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. *Química Nova*, v. 33, n. 7, p. 1559-1568, 2010.

MALDANER, L., JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. *Química Nova*, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MARTINS, D. M. S. Desenvolvimento de eletrodos modificados para determinação de compostos sulfurados em gasolina. Tese Doutorado, UNESP, Araraquara, 2008.

MATOZZO, V.; ROVA, S., MARIN, M. G. The nonsteroidal anti-inflammatory drug, ibuprofen, affects the immune parameters in the clam *Ruditapes philippinarum*. Marine Environmental Research. v. 79, p. 116-121, 2012.

MCKINNEY, J. D.; SINGH, P. Structure-activity relationships in halogenated biphenyls: Unifying hypothesis for structural specificity, *Chemical and Biological Interactive*, v. 33, 271-283, 1981.

MEDICINANET, 2010. Disponível em http://www.medicinanet.com.br/conteudos/medicamentos_injetaveis/3452/estreptomicina.h tm. Acesso em: 18 Jul 2017.

MELO, S. A. S.; TROVÓ, A. G.; BAUTITZ, I. R.; NOGUEIRA, R. F. P. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. *Química Nova*, Vol. 32, No. 1, 188-197, 2009.

METCALFE, C. D., KOENIG, B. G., BENNIE, D. T., SERVOS, M., TERNES, T. A., HIRSCH, R. Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.22, p.2872-2880, 2003.

MEZZELANI, M.; GORBI, S.; DA ROS, Z., FATTORINI, D.; D'ERRICO, G.; MILAN, M.; REGOLI, B. F. Ecotoxicological potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in marine organisms: Bioavailability, biomarkers and natural occurrence in *Mytilus galloprovincialis. Marine Environmental Research.* v. 121, p. 121-131, 2016.

MIRANDA, L.; GALLI, A.; QUINÁIA, S. P. Endocrine Interfering in Natural Waters: Voltammetric Determination of 17α-methyltestosterone. *Revista Virtual de Química*, v. 6, n. 2, p 416- 431, 2014.

NAKAJIMA, A., TAHARA, M., YOSHIMURA, Y., NAKAZAWA, H. Determination of free radicals generated from light exposed ketoprofen. *J. Photochem. Photobiol.* A, v.174, p.89-97, 2005.

NUNES, C. N.; PAULUK, L. E.; Dos ANJOS. V. E.; LOPES, M. C.; QUINÁIA, S. P. New approach to the determination of contaminants of emerging concern in natural water: study

of alprazolam employing adsorptive cathodic voltammetry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 407, p. 6171-6179, 2015.

OAKS, J. L.; GILBERT, M.; VIRANI, M. Z.; WATSON, R. T.; METEYER, C. U.; RIDEOUT, B. A.; SHIVAPRASAD, H. L.; AHMED, S.; CHAUDHRY, M. J. I.; ARSHAD, M.; MAHMOOD, S.; ALI, A.; KHAN, A. A. Diclofenac residues at the cause of vulture population decline in Pakistan. Nature, v. 427, n. 12, 2004.

OLIVEIRA, L. C. A.; RIOS, R. V. R. A.; FABRIS, J. D.; GARG, V.; SAPAG, K.; LAGO R.M. Activated carbon/iron oxide magnetic composites for the adsorption of contaminants in water. Carbon, v. 40, p. 2177-2173, 2002.

OSTERYOUNG, J.; O'DEA, J.J. Square-wave voltametry. In: BARD, A. J. *Electroanalytical Chemistry*. New York: Marcel Dekker. v. 14, p. 209-308. 1982

OTTONELLO, L; DAPINO, P.; SCIROCCO, M.C.; BALBI, A. BEVILACQUA, M.; DALLEGRI, F. Sulphonamides as anti-Inflammatory agents: Old drugs for new therapeutic strategies in neutrophilic inflammation? *Clinic. Science*, 88, 331, 1995.

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCELIO,
R. Q. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. *Revista Virtual de Química*, 5
(4), 516-537, 2013.

PALMISANO, R.; CAMPANELLA, L.; AMBROSETTI, B. Photo-degradation of amoxicillin, Streptomycin, erythromycin and ciprofloxacin by UV and UV/TiO2. Processes. Evaluation of Toxicity Changes Using a Respirometric Biosensor. *Journal of Environmental Analytical Chemistry*, v. 2: p. 1-5, 2015.

PANNA. PESTICIDE ACTION NETWORK NORTH AMERICA (2006). Physicalpropertiesofpesticides.Disponívelem:<http://www.pesticideinfo.org/Docs/ref_waterair1.html> Acesso em: 29 Abr. 2017

PATRICK, G. L.; An Introduction to Medicinal Chemistry, Oxford University Press: New York, 2005, cap.16.

PETROVIC, M.; ELJARRAT, E.; LOPEZ DE ALDA, M.J.; BARCELÓ, D. Endocrine Disrupting Compounds and other emerging contaminants in the environment: A survey on new monitoring strategies and occurrence data. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 378, p. 549-562, 2004.

PIEL, G.; PIROTTE, B.; DELNEUVILLE, I.; NEVEN, P.; LLABRES, G.; DELARGE, J.;

DELATTRE, L. Study of the influence of both cyclodextrins and L-lysine on the aqueous solubility of nimesulide; isolation and characterization of nimesulide-L-lysine-cyclodextrin complexes. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 86, n. 4, p. 475-80, 1997.

PIWOWARSKA, I., RADOWICK, S., PACHECK, I. Simultaneous determination of eight estrogens and their metabolites in serum using liquid chromatography with electrochemical detection. *Talanta*, v. 81, p. L–280, 2010.

PROJAN, S. J.; SHLAES, D. M. Antibacterial drug discovery: is it all downhill from here? Clinical Microbiology and Infection. Vol. 10 (4), 18–22, 2004.

RABASSEDA, X. Safety profile of nimesulide: ten years of clinical experience. Drugs of today, 33 (Suppl.1):1-10, 1997.

RADI, A.; WAHDAN, T.; EL-GHANY, N. A. Determination of cefonicid in human urine by adsorptive square-wave stripping voltammetry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 31, p. 1041 – 1046, 2003.

RAMALEY, L.; KRAUSE Jr., M. S. Analytical Application of Square Wave Voltammetry. *Analytical Chemistry*, v. 41, n. 11, p. 1365-1369, 1969 b.

RAMALEY, L.; KRAUSE Jr., M. S. Theory of square wave voltammetry. *Analytical Chemistry*, v. 41, n. 11, p. 1362-1365, 1969 a.

REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, v. 34, n. p. 601-616, 2010.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação de métodos cromatogáficos e eletroforéticos. Química Nova, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RUPP, E. B.; ZUMAN, P. Polarografic determination of some pesticides. Application to a study of their adsorption on lignin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 40, n 10, p. 2016-2021, 1992.

SANTOS, K.; BRAGA, O.; C. VIEIRA C.; SPINELLI A. Electroanalytical determination of estriol hormone using a boron-doped diamond electrode. *Talanta*, v. 80, p. 1999–2006, 2010.

SARTORI, E. R.; MEDEIROS, R. A.; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Square-wave voltammetric determination of acetylsalicylic acid in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode without the need of previous alkaline

hydrolysis step. Journal of the Brazilian Chemical Society. vol.20 no.2, 2009.

SCHATZ, A., BUGIE, E., and WAKSMAN, S. A.: Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria, Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. v. 55, p. 66-69, 1944.

SHERIGARA, B. S.; SHIVARAJ, Y.; MASCARENHAS, R. J.; SATPATI, A. K.; Simultaneous determination of lead, copper and cadmium onto mercury film supported on wax impregnated carbon paste electrode Assessment of quantification procedures by anodic stripping voltammetry. *Electrochimica. Acta.* v. 52, p. 3137-3142, 2007.

SILVA, P. *Metabolismo das drogas*. In: Farmacologia. 7th. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 72-77, 2006.

SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J. C.; SÁ, M. M.; TERENZI, H. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. Química Nova, vol. 29 (4), p. 844-845, 2006.

SILVEIRA, M. A. K.; CALDAS, S. S.; GUILHERME, J. R.; COSTA, P. F.; GUIMARÃES B. S.; CERQUEIRA, M. B. R. CERQUEIRA, M. B.; SOARES, B. M.; PRIMEL, E. G. Quantification of pharmaceuticals and personal care product residues in surface and drinking water samples by SPE and LC-ESI-MS/MS. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 24, p. 1385-1395, 2013.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A.; *Princípios de análise instrumental*, 5a. ed., Bookman: Porto Alegre, 2002, 1056 p.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER F. J.; CROUCH, S. R., Fundamentos de Química Analítica, Tradução da 8a Edição Norte-Americana, Thomson Learning, São Paulo, 2006, 999 p.

SOBOTKA, J. The efficiency of water treatment and disinfections by means of ultraviolet radiation. *Water science and technology*, v.27, n.3-4, p.343-346, 1993.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de Onda Quadrada. Primeira Parte: Aspectos Teóricos. *Química Nova*, v. 26, n. 1, 81-89, 2003.

STEAD, D.A. Current methodologies for the analysis of aminoglycosides. *Journal of Chromatography B*, v.747, p. 69-93, 2000.

STRYER, L. Biochemistry, 3rd edn. Freeman and Company, New York, 1988.

SWEETMAN, S. C. *Martindale: the complete drug reference*. 35. ed. London: Pharmaceutical, 2007.

SZCZEPANIAK, W.; CZYZOWICZ, B.; REN, M. Voltammetric determination of prometrine in soil and water. *Analytica Chimica Acta*, v. 305, p. 207-211, 1995.

TADINI, M. C.; BALBINO, M. A.; ELEOTERIO, I. C.; DE OLIVEIRA, L. S.; DIAS, L. G.; DEMETS, G. J. F.; DE OLIVEIRA, M. F. Developing electrodes chemically modified with cucurbit[6]uril to detect 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) by voltammetry. *Electrochimica Acta*, v. 121, p. 188-193, 2014.

TAMBOSI, J. L. Remoção de fármacos e avaliação de seus produtos de degradação através de tecnologias avançadas de tratamento. 141 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

TAMBOSI, J. L.; YAMANAKA, L. Y.; JOSÉ, H. J.; MOREIRA, R. F. P. M. Recent Research data on removal of pharmaceuticals from sewage treatment plants (STP). *Química Nova*, v. 33, p. 411-420, 2010.

TERNES, T.A., JANEX-HABIBI, M.L., KNACKER, T., KREUZINGER, N., SIEGRIST, H. Detailed report related to the overall project POSEIDON (contract no. EVK1-CT-2000-00047) duration (2001 e 2004). Assessment of technologies for the removal of pharmaceuticals and personal care products in sewage and drinking water facilities to improve the indirect potable water reuse, 2004.

THIELE-BRUHN, S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, v. 166, p. 145-167, 2003.

THOMPSON, M., ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for singlelaboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). Pure Appl. Chem., Vol. 74, n. 5, pp. 835–855, 2002.

BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M. L. Practical method validation: Validation sufficient for an analytical method. *Mikrochimica acta*, v. 128, p. 93-106, 1998.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Brasil) – DOQ-CGCRE-008 – Orientações sobre validação de Métodos Analíticos. 2011. 20 p.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Brasil) – DOQ-CGCRE-008 – Rev. 05

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Brasil) – DOQ-CGCRE-008 – Ver.: 08 (Ago/ 2016) – Orientações sobre validação de Métodos Analíticos. 2016. 20 p. TÖLGYESI, A.; VEREBEY, Z.; SHARMA, V. K.; KOVACSICS, L.; FEKETE, J. Simultaneous determination of corticosteroids, androgens, and progesterone in river water by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chemosphere*, v. 78, p. 972–979, 2010.

USEPA (United States Environmental Protection Agency) - Aquatic life criteria for contaminants of emerging concern - Part I, 2008. Disponível em: https://www.epa.gov/wqc/contaminants-emerging-concern-including-pharmaceuticals-and-personal-care-products. (Acesso em: 28 Fev. 2017)

US-FDA - United States Food and Drug Administration; Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, 2001.

VARALDO, P. E. Antimicrobial resistance and susceptibility testing: an evergreen topic. Journal of Antimicrob Chemother, 50 (1): 1-4, 2002.

VERLICCHI, P.; GALLETTI, A.; PETROVIC, M.; BARCELO, D. Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options. Journal of Hydrology, Amsterdam, v. 389, p. 416-428, 2010.

VIRE, J. C.; KAUFFMANN, J. C.; PATRIARCHE, G. J. Adsorptive stripping voltammetry applied to drug analysis: A powerful tool. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 12, p. 1323-1335. 1989.

VU, D. L.; ŽABČÍKOVÁ, S.; ČERVENKA, L.; ERTEK, B.; DILGIN, Y. Sensitive Voltammetric Determination of Natural Flavonoid Quercetin on a Disposable Graphite Lead. *Food Technol. Biotechnol.* 53 (4) 379–384, 2015.

WANG, C.; SHAO, X.; LIU, Q.; Qu, Q.; YANG, G.; HU, X. Differential pulse voltammetric determination of nimesulide in pharmaceutical formulation and human serum at glassy carbon electrode modified by cysteic acid/CNTs based on electrochemical oxidation of 1-cysteine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 42, p.237–244, 2006.

Wang, J. Analytical Eletrochemistry. New York. John Wiley. Second Edition, 2000. 209 p.

WANG, J; Stripping Analysis, VCH Publishers: New York, 1985.

YATES, K. T. e CATRIL, M. P. Tendencias en la utilización de benzodiazepinas en farmacia privada. *Revista Chilena de Neuro-psiquiatria*, Santiago, v. 47, n. 1, p. 9-15, 2009.

ZHU, W. W.; LI, N. B.; LUO, H. Q.; Simultaneous determination of chromium (III) and cadmium differential pulse anodic stripping voltammetry on a stannum film electrode.

Talanta, v. 72, p. 1733-1737, 2007.

CAPÍTULO 3 - OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE NIMESULIDA E ESTREPTOMICINA

Este capítulo aborda o desenvolvimento de método voltamétrico para a determinação de nimesulida (NIM) e estreptomicina (STP) em amostras aquosas. Para as análises de NIM foi empregada a voltametria por pulso diferencial e, para determinações de STP a voltametria de onda quadrada. Em ambos os métodos foram otimizadas as condições experimentais através da avaliação de parâmetros, tais como, eletrólito suporte e pH e parâmetros voltamétricos que são necessários para obtenção de um método sensível, rápido e de baixo custo.

Além disso, o desempenho dos métodos analíticos propostos foi avaliado por um processo de validação para verificação de parâmetros, tais como, seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão.

3.1 Parte Experimental

3.1.1 Reagentes e Equipamentos

Os reagentes utilizados na otimização de metodologia foram de grau analítico e incluíram o hidróxido de sódio (Vetec), fosfato de sódio monobásico (Biotec) cloreto de potássio (Sigma Aldrich), etanol (Biotec) ácido nítrico (Biotec), ácido húmico comercial (Sigma Aldrich). Os padrões de fármacos utilizados foram o sulfato de estreptomicina (Sigma Aldrich) e, nimesulida (Pharmanostra) e alprazolam (Pharmanostra).

As medidas voltamétricas foram executadas em um analisador voltamétrico (*Metrohm 757 VA Computrace*), acoplado por uma interface a um micromputador, operando com o software *VA Computrace* para obtenção, armazenamento e tratamento dos dados obtidos. Uma célula eletroquímica de 100 mL, com três eletrodos foi empregada para este estudo, sendo o eletrodo de trabalho o de gota pendente de mercúrio (do inglês, *hanging mercury drop electrode*, HMDE) com área de 0,30 mm², eletrodo de platina como contra eletrodo, e um eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) e sistema de purga com gás N₂ (99,999 %) acoplado para remoção de O₂.

Para as análises cromatográficas utilizou-se um cromatógrafo com um detector de diodos (UV/DAD, Waters 2696) e usando uma coluna C-18 (Phenomenex, Luna $150 \times 4,60$ mm $\times 5 \mu$ m) e uma coluna de proteção C-18 (Phenomenex, 4×3 mm). Como fase móvel

utilizou-se uma mistura metanol água, no modo gradiente. Para a extração dos fármacos das amostras de efluente utilizou-se cartuchos *Strata-X*C-18E (SPE Phenomenex) 500 mg/3 mL.

Os parâmetros oxigênio dissolvido (OD) e temperatura das amostras aquosas foram medidos *in loco* utilizando-se uma sonda (modelo DO 5519).

A água ultrapura foi obtida com um sistema de purificação TKA-GenPure (Thermo Scientific). As medidas de pH foram realizadas com pH-metro modelo 20/21 (Hanna Instruments). No preparo de soluções foi utilizado chapa de aquecimento com agitação (Quimis).

3.1.2 Coleta de Amostras

Com o objetivo de avaliar a presença dos fármacos STP e NIM em amostra reais, coletou-se amostras de águas naturais e efluentes em seis pontos ao longo da Bacia do Paraná III que abrange o Lago de Itaipu (SEMA 2010) conforme mostram as coordenadas na Tabela 3 e o mapa de localização na Figura 11. As amostragens foram realizadas em intervalos de aproximadamente seis meses (agosto/ 2015, fevereiro/ 2016 e julho/ 2016).

Os frascos de vidro para coleta das amostras foram previamente lavados, e enxaguadas com água destilada e do tipo ultrapura e finalmente com álcool etílico e acetona e secos em estufa a 100 °C. Antes da coleta das amostras os recipientes foram ambientados enxaguando-os com água do ambiente em estudo.

	Pontos de coleta	Coordenadas
1	Terminal turístico de Entre Rios, Entre Rios do	24°68'25.65" -
	Oeste Oeste-PR	54°24'62.30"
2	Resort de Santa Helena, Santa Helena-PR	24°83'25.34" -
	Resolt de Salta Helena, Salta Helena FR	54°33'62.82"
3	Terminal turístico de Vila Ipiranga, São Miguel	25°23'.26.14" -
	do Iguaçu-PR	54°22'84.68"
4	Terminal turístico de Três Lagoas, Foz do	25°44'31.80" -
	Iguaçu-PR	54°50'33.57"
5	Entrada da ETE de Santa Helena-PR	24°85'56.47" -
		54°32'30.94"

Tabela 3 : Pontos de coleta de amostras de água natural e efluente de esgoto.
6	Saída da ETE de Santa Helena-PR	24°85'42.42" -
		54°32'24 50"

Fonte: google maps



Figura 11: Localização geográfica dos pontos de coleta (Adaptado de Google Maps).

Os pontos de coleta 5 e 6 correspondem respectivamente a entrada e saída de uma Estação de Tratamento de Esgoto no munícipio de Santa Helena, localizada na região do reservatório de Itapu que opera com lagoas de estabilização.

O Município de Santa Helena possui uma área territorial de 758,227 Km² e população de 24.895 habitantes, de acordo com a estimativa de 2013 (IBGE, 2013). A estação de tratamento de esgoto (ETE) dessa cidade está situada a 24°51'20" S, 54°19'23,8" W e altitude de 243 m.

A rede coletora de esgoto de Santa Helena atende 85,56% da população da área urbana. O esgoto drenado é tratado na ETE com capacidade total de 2.592 m³/dia (PLANO...,

2012). A vazão dessa ETE é de aproximadamente 19,0 L s⁻¹. O sistema de tratamento abrange lagoas de estabilização que foram construídas no início dos anos 80, a partir de uma demanda urgente, pois a cidade se localiza à margem do Lago de Itaipu, praticamente dentro da área de preservação permanente do reservatório (BEM e LAZZARIN, 2009).

O processo de tratamento na ETE de Santa Helena ocorre com o bombeamento do esgoto por 3 estações elevatórias, equipadas por um sistema de gradeamento, no qual, o material grosseiro é retido, antes do bombeamento. A ETE tem uma área total de 73.500 m², com quatro lagoas de estabilização, duas anaeróbias seguidas por duas lagoas facultativas. As lagoas anaeróbias desse sistema, possuem 3,5 m de profundidade, 42 m de largura e 60 m de comprimento. As lagoas facultativas possuem 2,5 m de profundidade, 42 m de largura e 120 m de comprimento. Após o tratamento do esgoto este é lançado no lago de Itaipu (BEM e LAZZARIN, 2009).

A área de estudo também envolve alguns pontos turísticos ao longo do Lago Itaipu. O reservatório de Itaipu apresenta 1.350 km² de área inundada, é o sétimo maior do Brasil, e seu principal objetivo é gerar eletricidade para consumo. O reservatório de Itaipu aproveita o potencial energético do trecho do Rio Paraná adjacente à fronteira entre o Brasil e Paraguai. O local da barragem está localizado a 23,5 km da foz do rio Iguaçu, que marca o limite entre Brasil e Argentina. O volume médio de água do reservatório é de 20 bilhões de m³ e a profundidade de aproximadamente 21,5 m (ITAIPU BINACIONAL, 2012).

3.1.3 Preparo de Soluções

A solução padrão estoque do antibiótico STP foi preparada na concentração de 7,3 mg L⁻¹, pela dissolução do fármaco em água ultrapura. No preparo da solução de NIM 3,09 mg L⁻¹, utilizou-se o etanol 99,5% na dissolução do fármaco. As soluções padrão dos fármacos foram transferidas para frascos de vidro âmbar e armazenadas sob refrigeração, por até um mês. Diariamente, soluções de trabalho de STP e NIM foram preparadas em concentrações de 1,0×10⁻⁵ ou 1,0×10⁻⁶ mol L⁻¹ de acordo com a concentração necessária para as medidas.

O volume de eletrólito suporte adicionado na cela voltamétrica em cada análise foi 10 mL. Nas medidas voltamétricas de STP foi utilizada a solução de NaOH 0,01 mol L^{-1} e no ajuste de pH utilizou-se solução de NaH₂PO₄ 0,1 mol L^{-1} .

Nas análises prévias de NIM as soluções avaliadas como eletrólito foram o tampão-BR 0,04 mol L⁻¹/Etanol (7:3 v/v) (eletrólito 1) e tampão-BR 0,04 mol L⁻¹/etanol (7:3 v/v)/ KCl 1,0 mol L⁻¹ (eletrólito 2), ambos em pH ajustado para 7,0 com NaOH 2,0 mol L⁻¹. No preparo da solução tampão-BR utilizou-se soluções de perclorato de sódio 0,1 mol L⁻¹, ácido fosfórico 0,04 mol L⁻¹, ácido bórico 0,04 mol L⁻¹ e ácido acético 0,04 mol L⁻¹.

No desenvolvimento da metodologia para quantificar a NIM utilizou-se como eletrólito a solução de KCl 1,0 mol L^{-1} em pH ajustado para 7,0. Concentrações de 0,25 a 1,0 mol L^{-1} de KCl foram avaliadas.

3.1.4 Otimização dos Parâmetros Voltamétricos - STP

Para a avaliação de aspectos qualitativos, tais como, o comportamento redox das moléculas foi empregado a voltametria cíclica. A resposta I_p em função da velocidade foi avaliada para verificar processos relacionadas à superfície do eletrodo.

A técnica de voltametria adsortiva de redissolução catódica, no modo onda quadrada (V_{Ads}RC-OQ) e pulso diferencial (V_{Ads}RC-PD) foram utilizadas em estudos quantitativos.

3.1.4.1 Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica foi aplicada para investigar o comportamento eletroquímico da molécula de STP nas velocidades 5 a 90 mV s⁻¹ utilizando-se como eletrólito a solução de NaOH 0,01 mol L⁻¹, em pH 12 com adição de 61,42 μ g L⁻¹ de STP com tempo de pré-concentração 90 s e a faixa de varredura de -0,45 a -1,7 V, usando o potencial de acumulação de -1,2 V.

3.1.4.2 Voltametria Onda Quadrada e Pulso Diferencial

Uma curva de adição de padrão de STP foi preparada, nas concentrações 0,37 a 11,14 mg L⁻¹ com V_{Ads}RC-PD. Na cela voltamétrica foram adicionados 10,0 mL de eletrólito NaOH 0,01 mol L⁻¹ em pH ajustado para 9 com solução NaH₂PO₄ 0,1 mol L⁻¹. Os parâmetros da V_{Ads}RC-PD foram: E_{ac} (-1,2 V), faixa de varredura (-1,0/ -1,4), t_{ac} (90 s), velocidade de varredura (40 mV s⁻¹), tempo de pulso (40 ms), amplitude de pulso (50 mV).

A sensibilidade do método em detectar STP foi avaliada utilizando-se a V_{Ads}RC-OQ, nas concentrações 36,48 a 507,5 mg L⁻¹, empregando como eletrólito NaOH 0,01 mol L⁻¹ em pH 9. Os parâmetros da V_{Ads}RC-OQ foram: E_{ac} (-1,2 V), faixa de varredura (-1,3/ -1,8), t_{ac} (60 s), velocidade de varredura (400 mV s⁻¹) e amplitude (50 mV).

Os parâmetros da voltametria foram avaliados de forma univariada, alterando um dos parâmetros e mantendo constantes os demais. Para estas medidas 61,42 µg L⁻¹ de STP foi adicionada na cela, contendo o eletrólito. A Tabela 4 apresenta os parâmetros voltamétricos escolhidos a partir da resposta (intensidade de corrente I_p) e o perfil voltamétrico, para varreduras de -1,35 a -1,8 V.

Parâmetro	Faixa de variação
Potencial de acumulação (E_{ac})	-1,0 a -1,3 V
Frequência (f)	60 a 140 Hz
Incremento de varredura (ΔE_s)	2 a 8 mV
Amplitude de pulso (<i>a</i>)	20 a 50 mV
Tempo de acumulação (<i>t_{ac}</i>)	60 a 240 s
Tempo de equilíbrio (t_{eq})	0 a 30 s

Tabela 4: Parâmetros da voltametria de onda quadrada, otimização da metodologia para quantificação de STP.

3.1.5 Otimização dos parâmetros voltamétricos - NIM

3.1.5.1 Voltametria Cíclica

Os ensaios de voltametria cíclica foram realizados em velocidade de varredura de 5 a 90 mV s⁻¹ para NIM, em concentração de 92,0 μ g L⁻¹ em solução de KCl em aproximadamente 5, e tempo de pré-concentração 45 s, varredura de potencial de -0,45 a -0,75 V, E_{ac} de 0 V.

3.1.5.2 Voltametria de Pulso Diferencial

Os parâmetros instrumentais para as análises do fármaco NIM utilizando $V_{Ads}RC$ -PD foram otimizados, a fim de obter sinais seletivos e mais intensos. Uma alíquota de 45,6 μ g L⁻¹ de NIM foi adicionada na cela para a avaliação dos parâmetros voltamétros (potencial de acumulação, velocidade de varredura e tempo de pulso, etc). Esses parâmetros foram avaliados de forma univariada e encontram-se na Tabela 5.

Parâmetro	Faixa de variação
Potencial de acumulação (Eac), V	0 a -1,0
Velocidade de varredura (mV s ⁻¹)	20 a 50
Amplitude de pulso (mV)	20 a 80
Tempo de pulso (ms)	20 a 80
*Tempo de acumulação (<i>t_{ac}</i>), s	10 a 120
Tempo de equilíbrio (t_{eq}) , s	0 a 10

Tabela 5: Parâmetros da voltametria de pulso diferencial, otimização da metodologia para quantificação de NIM.

 $C_{NIM} = 5,6 \ \mu g \ L^{-1}$

3.1.6 Validação dos Parâmetros Voltamétricos – STP e NIM

Na validação foram avaliados os parâmetros, tais como, sensibilidade, seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão, entre outros aspectos importantes no desenvolvimento de metodologias analíticas.

3.1.6 1 Linearidade e cálculo de LD e LQ

A partir dos parâmetros avaliados e escolhidos para STP e NIM nos ensaios univariados, curvas de adição de padrão externo, utilizando-se os parâmetros com as melhores respostas foi construída para avaliar a faixa linear para a quantificação de STP por $V_{Ads}RC$ -OQ e NIM com $V_{Ads}RC$ -PD.

Com os parâmetros instrumentais otimizados para as medidas voltamétricas foi preparada uma curva com 14 níveis de concentrações de STP em meio de NaOH 0,01 mol L^{-1} , para verificar a faixa de trabalho do método. A Anvisa (2003) sugere que em um modelo linear a resposta do sinal aumenta linearmente com a concentração do analito, permitindo a construção de uma curva de calibração. As concentrações de STP adicionadas foram de 8,09 a 210,4 µg L^{-1} . As medidas foram registradas em triplicata.

Uma curva de adição de padrão do anti-inflamatório NIM foi construída em meio de KCl 1,0 mol L⁻¹, com os parâmetros instrumentais otimizados, com objetivo de avaliar a faixa linear de trabalho. A concentração de NIM foi avaliada em 18 níveis de 0,50 a 130,1 μ g L⁻¹. As medidas foram registradas em triplicata.

Para a faixa de concentração avaliada para STP e NIM foi aplicado um teste regressão no nível de 95% de confiança, a fim de verificar o comportamento linear e a significância da regressão através dos valores de F de regressão e de falta de ajuste. Para a regressão ser significativa os valores ($F_{regressão} > F_{crítico}$ e p < 0,05). Para que não haja evidências de falta de ajuste do modelo linear os valores ($F_{faj} < F_{crítico}$; p > 0,05).

Um teste-*t* foi aplicado aos resultados das curvas de adição de STP e NIM com o objetivo de verificar a significância dos coeficientes (intercepto e inclinação), no nível de confiança de 95%. Este teste indica se os coeficientes linear (a) e angular (b) devem ser inseridos no modelo, avaliando os valores de *p* (deve ser menor que 0,05) e os valores de *t*_{observado} (maiores que valor de *t*_{critico}). Se o valor de *a* = 0 a curva analítica passa pela origem e sendo representada por y = b x.

Para a determinação do limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) que correspondem a menor concentração de um analito detectada e quantificada, respectivamente, em uma amostra com precisão e exatidão e estes foram determinados pelas Equações 2.8 e 2.9 (Capítulo 2).

3.1.6.2 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada qualitativamente a partir de análises empregando-se o ácido húmico (AH) comercial, pois trata-se de uma substância de elevada massa molecular e considerada abundante em águas naturais (WANG et al., 2012). Neste estudo foi avaliado o efeito da presença de AH na resposta de corrente do fármaco. Alíquotas de uma solução de AH preparada com 0,015 g em balão de 10,0 mL foram adicionadas na cela contendo o eletrólito e o analito (NIM ou STP). A quantidade de AH adicionada foi calculada considerando a porcentagem de 35% de carbono orgânico dissolvido (COD) presente no ácido húmico com base na literatura (SODRÉ, 2005). Assim, foram adicionadas na cela alíquotas que correspondem entre 0,26 a 9,01 mg L⁻¹ de COD.

O efeito de interferência de matriz foi avaliado para os fármacos em amostra de água natural coletada de um rio, próximo ao Campus Cedeteg. A resposta do analito foi avaliado na presença de eletrólito com adição amostra de água natural. Para NIM as diluições para 10,0 mL na cela voltamétrica foram feitas nas seguintes proporções: 1:10; 2:10; 3:10 e 5:10 v/v de água filtrada com filtro quantitativo. Em seguida uma curva de adição padrão foi preparada em cada meio com adições de padrão de NIM de 1,53 a 19,52 μ g L⁻¹.

Para avaliar o efeito de interferência para o fármaco STP foram utilizados 1,0 e 2,0 mL de amostra de água natural, nas proporções 1:10 e 2:10 v/ v e a curva de adição padrão de 10,19 a 40,58 μ g L⁻¹ de STP.

A seletividade de NIM do método foi avaliada qualitativamente pela análise de uma solução padrão estoque 20,0 μ g L⁻¹ de NIM, seguida de adições de 0,26 mg L⁻¹ de COD.

Um estudo de seletividade também foi realizado por uma análise cromatográfica de amostras para as quais NIM foi quantificada por voltametria. Uma solução padrão de NIM (50 mg L⁻¹) foi injetada no modo gradiente, com fase móvel composta por metanol e água conforme as condições propostas na Tabela 6, com fluxo constante de 0,8 mL min⁻¹ durante 15 min. A solução padrão de NIM foi preparada em metanol e 5 µL foi injetado diretamente no sistema HPLC-DAD com seringa de 25 µL. Para a extração de NIM a partir das amostras de efluente utilizou-se em cartuchos Strata-X C-18E (SPE Phenomenex) 500 mg/3 mL. O acondicionamento dos cartuchos foi realizado por lavagem com 3,0 mL de metanol, 3,0 mL de solução metanol/ H₂O (1:1), 3,0 mL de água ultrapura, em seguida a eluição de 9,0 mL da amostra aquosa contendo o analito (3,0 em 3,0 mL). Para a retirada dos interferentes o cartucho foi lavado com 3,0 mL de água ultrapura e, finalmente a amostra foi resuspensa em 3,0 mL de metanol. O processo de eluição foi realizado com fluxo de 1 mL min⁻¹. Uma alíquota de 1,0 mL do extrato metanólico foi evaporado até secagem e reconstituído em 50 μ L de metanol, e em seguida foi injetado 5 μ L no HPLC (pré-concentração = 23 vezes). Os parâmetros de comparação para a seletividade foram os tempos de retenção do padrão de NIM e das amostras, bem como, os espectros de UV-DAD do padrão e das amostras.

Tempo (min)	Metanol (% v/v)	Água (% v/v)
0	5	95
6	95	5
10	95	5
11	5	95

Tabela 6: Programação do gradiente da fase móvel da corrida cromatográfica.

3.1.6 3 Precisão

Os órgãos regulamentadores (ANVISA, 2003 e AOAC, 2002) recomendam calcular a precisão e exatidão de um método pela estimativa da repetitividade e precisão intermediária. Assim, a repetitividade foi calculada a partir de cinco medidas de recuperação do analito em amostras fortificadas com 35,0 μ g L⁻¹ de STP por curva de adição padrão (medidas realizadas em um mesmo dia). A estimativa de precisão intermediária foi calculada com a mesma concentração de STP (em análises realizadas em cinco dias). As curvas de padrão externo nesse estudo foram obtidas com quatro pontos (concentrações de 20,35 a $60,7 \ \mu g \ L^{-1}$) em soluções preparadas em balões volumétricos de 10 mL.

Para NIM a repetitividade foi calculada a partir de recuperação do analito em amostras fortificadas com 5,0 μ g L⁻¹ de NIM, com curvas de adição padrão, com cinco medidas realizadas em um mesmo dia. A precisão intermediária foi calculada também com 5,0 μ g L⁻¹ de NIM (medidas realizadas em cinco dias consecutivos). As curvas de adição padrão foram construídas com concentrações de 1,53 a 6,01 μ g L⁻¹ de NIM.

3.1.6 4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por estudos de recuperação de STP em água ultrapura fortificada com 15,0 e 35,03 μ g L⁻¹ do fármaco. Em amostra de água de rio (diluição 1:10 v/v) construindo uma curva de adição padrão em amostra fortificada com 51,01 μ g L⁻¹, com adições padrão 10,2 a 30,6 μ g L⁻¹ de STP. Para o método proposto para NIM a exatidão foi avaliada por curvas de adição padrão com a recuperação do analito em amostra fortificada com 2,0 μ g L⁻¹ de NIM. Em amostra real utilizou-se a diluição 1:10 v/v fortificada 2,52 μ g L⁻¹. As curvas de adição padrão foram construídas com concentrações de 0,50 a 2,0 μ g L⁻¹ de NIM.

3.1.7 Caracterização das amostras e quantificação de NIM e STP

Alguns parâmetros físico-químicos das amostras foram medidos, entre eles, o oxigênio dissolvido e temperatura foram medidos *in loco* e o pH foi medido no laboratório.

Para os corpos de águas naturais a qualidade da água pode ser avaliada a partir do parâmetro OD, o qual está associado a dinâmica desse ambiente. Em ambientes aquáticos não poluídos, há processos de oxidação por degradação aeróbica dos restos de matéria orgânica (plantas e animais). Portanto, altos valores de oxigênio dissolvido indicam baixa matéria orgânica, devido aos processos de autodepuração (FIORUCCI e BENEDETTI-FILHO, 2005). Por outro lado, se elevada carga de matéria orgânica é lançada nos corpos d'água, por exemplo, através do esgoto doméstico ou de efluentes de industrias, aumenta a taxa de respiração dos microrganismos e a demanda de oxigênio causando um déficit desse gás dissolvido nos corpos hídricos (MOTA, 1995).

Os métodos voltamétricos desenvolvidos foram aplicados na quantificação de STP e NIM foi aplicado em amostras de águas naturais e efluentes coletadas de seis pontos da região de abrangência do Lago de Itaipu.

As amostras foram filtradas em filtros qualitativos, em seguida uma alíquota desta foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL contendo o eletrólito e o pH da amostra foi ajustado de acordo com as condições descritas para STP e NIM. Em seguida, as amostras foram transferidas para a cela voltamétrica para quantificação. Para as análises de STP utilizou-se alíquotas de 1 mL de amostra. Para as medidas de NIM os volumes de amostras foram 0,1 a 1,0 mL, que corresponde às diluições de 10 a 100 vezes.

3.2 Resultados e Discussão - Estreptomicina (STP)

3.2.1 Voltametria Cíclica

Análises empregando voltametria cíclica foram realizadas para investigar o comportamento eletroquímico da molécula de STP. O voltamograma cíclico na Figura 12 mostra uma varredura para STP na velocidade 50 mV s⁻¹. Na Figura 12-B a resposta I_p em função da raiz da velocidade de varredura de 5 a 90 mV s⁻¹ e na Figura 12-C a relação entre o log da velocidade de varredura em função log da resposta de corrente para STP.



Figura 12: A) Voltamograma cíclico de STP em HMDE. Condições: ($C_{STP} = 61,42 \ \mu g \ L^{-1}$, em solução de NaOH 0,01 mol L^{-1} , pH 12,0); velocidade 50 mV s⁻¹; varredura de potencial (-0,45 a -1,7 V) E_{dep} (-1,2) e t_{ac} (90 s); **B**) Resposta I_p em função da raiz da velocidade.

O voltamograma cíclico na Figura 12-A, STP apresenta um pico de redução irreversível no potencial -1,1 V, pois não se verifica pico reverso (GROSSER-Jr, 1993). Na Figura 12-B o comportamento não linear da resposta é um indicativo de processo controlado pela adsorção da espécie na superfície do eletrodo. Com base no coeficiente angular 0,82, pode-se sugerir que o processo é basicamente controlado pela adsorção da espécie eletroativa

na superficie do eletrodo de mercúrio. De acordo com a literatura coeficiente angulares (inclinação) próximo ou igual a 1,0 sugerem esse comportamento (GROSSER-Jr, 1993), o qual está de acordo com o trabalho de Wang e Mahmoud (1986) que obtiveram para a correlação log I_p vesus log v, uma inclinação de 1,03.

3.2.2 Voltametria de pulso diferencial e de onda quadrada

Ensaios voltamétricos prévios foram realizados com STP, utilizando-se a V_{Ads}RC-OQ e V_{Ads}RC-PD, para verificar qual seria o modo com maior sensibilidade.

Uma curva de adição de padrão de STP foi preparada, nas concentrações 365 a $11,1\times10^3 \mu g L^{-1} \text{ com V}_{Ads}RC$ -PD em eletrólito NaOH 0,01 mol L⁻¹ em pH ajustado com solução NaH₂PO₄ 0,1 mol L⁻¹ em pH 9 (Figura 13).



Figura 13: A) Voltamogramas de pulso diferencial da curva de STP, em concentração de 365 a $11,1\times10^3 \mu g L^{-1}$. Condições: em solução de NaOH 0,01 mol L⁻¹, pH 9,0; E_{ac} (-1,2 V), faixa de varredura (-1,0/ -1,35 V), *t_{ac}* (90 s), velocidade de varredura (40 mV s⁻¹), tempo de pulso (40 ms), amplitude de pulso (50 mV). **B**) Correlação entre concentração de STP e a corrente de pico.

Os voltamogramas na Figura 13-A mostram um sinal voltamétrico com pico em -1,27 V, na Figura 13-B a correlação entre concentração de STP e I_p .

A Figura 14 mostra a curva de adição de padrão de STP obtida com $V_{Ads}RC$ -OQ, nas concentrações 36,5 a 507,5 µg L⁻¹.



Figura 14: A) Voltamogramas de onda quadrada da curva de STP, em concentração de 36,5 a 507,5 μ g L⁻¹. Parâmetros da V_{Ads}RC-OQ: E_{ac} (-1,2 V), faixa de varredura (-1,3/ -1,8 V), *t_{ac}* (60 s), step de potencial, frequência (100 Hz) e amplitude (50 mV). **B**) Correlação entre concentração de STP e a corrente de pico.

A partir das respostas nas Figuras 13 e 14 foi possível constatar que a $V_{Ads}RC$ -OQ foi mais sensível para STP. Conforme esses resultados a onda quadrada foi o modo de aplicação de pulsos escolhido para as análises posteriores.

3.2.3 Variação da concentração hidrogeniônica

O eletrólito suporte é responsável por assegurar a condutividade elétrica do sistema garantir a força iônica do meio (AGOSTINHO et al., 2004), justificando-se a importância de avaliar o eletrólito e pH do meio eletrolítico, pois as reações no eletrodo são influenciadas por reações de protonação ou desprotonação da espécie química (BERGAMINI, et al., 2005).

Para as análises voltamétricas de STP utilizou-se como eletrólito NaOH 0,01 mol L⁻¹ com base na literatura (WANG e MAHMOUD, 1986; FEDORCHUK et al., 2005). O pH foi avaliado entre 7 a 10, e para os ajustes de pH foi usado NaH₂PO₄ 0,1 mol L⁻¹ constituindo-se um tampão. As soluções de NaOH 0,01 mol L⁻¹ recém preparadas apresentavam pH próximo a 12 e em seguida ajustava-se ao pH desejado. Uma varredura do eletrólito foi registrada em cada pH e, em seguida adicionou-se STP de 14,54 a 29,02 μ g L⁻¹. Os voltamogramas na Figura 15 mostram os resultados da variação do pH.



Figura 15: Voltamogramas de onda quadrada, variação do pH. Adições de STP (14,54; 21,79 e 29,02 μ g L⁻¹). Eletrólito (NaOH/ NaH₂PO₄): A) pH 7; B) pH 8; C) pH 9 e D) pH 10. Com ajuste de linha base, exceto em D.

A resposta voltamétrica de STP em pH 7 na Figura 15-A, mostra um sinal elevado de corrente, no entanto, o potencial de pico do eletrólito é muito próximo ao do fármaco STP, inviabilizando a quantificação. Com o ajuste do pH 8 (Figura 15 B), a resposta do eletrólito mostrou-se adequada, no entanto, não há aumento do sinal do fármaco com o aumento da concentração. Em pH 9, Figura 15-C, a sensibilidade para STP foi satisfatória, indicando aumento na resposta. Portanto, este foi o pH escolhido para quantificação de STP. Na literatura é sugerido que em soluções aquosas o antibiótico STP seja determinado em pH entre 9,0 e 9,5; nesse meio a molécula é estável na forma de um cátion contendo duas cargas (FEDORCHUK et al., 2005).

3.2.4 Otimização dos Parâmetros da Voltametria de Onda Quadrada

Os parâmetros da $V_{Ads}RC$ -OQ foram avaliados de forma univariada, 61,42 µg L⁻¹ de

STP foi adicionada na cela para a análise dos parâmetros potencial de acumulação, amplitude de pulso, incremento de potencial e tempo de equilíbrio. Para avaliar o t_{ac} , utilizou-se 14,54 µg L⁻¹ de STP. As Figuras 16 a 21 mostram a resposta voltamétrica e a resposta (corrente de pico) para a varredura de -1,35 a -1,75 V.

Os voltamogramas na Figura 16 mostram a variação do E_{ac} com uma adição de 61,42 μ g L⁻¹ de STP na cela, na Figura 16-B foi aplicada a correção da linha base nos potenciais -1,1 e -1,2 V que apresentaram sinal voltamétrico mais intenso.



Figura 16: A) Voltamogramas de onda quadrada, variação do potencial de acumulação, sinal do eletrólito e adição de STP de 61,42 µg L⁻¹; variação E_{ac} : -1,0 a -1,3 V. Condições: Frequência 100 Hz; amplitude 50 mV; step de potencial 4 mV e *tac* 120 s. B) Voltamogramas de onda quadrada para E_{ac} (-1,1 e -1,2 V) com correção de linha base.

A variação do potencial de acumulação (Figura 16-B) mostra a melhor resposta voltamétrica do STP em -1,2 V e concorda com o trabalho de Fedorchuk et al. (2005) que avaliaram esse parâmetro e verificaram uma resposta máxima de -1,2 a -1,3 V.

O parâmetro frequência da aplicação dos pulsos (Figura 17) foi avaliado de 60 a 140 Hz, mostrando na Figura 17-B a resposta de corrente em função da variação da frequência.



Figura 17: A) Voltamogramas de onda quadrada da variação da frequência (60 a 140 Hz), adição de STP de 61,42 μ g L⁻¹. Condições: E_{ac} -1,2 V, amplitude 50 mV; step de potencial 4 mV *e* t_{ac} 120 s. **B**) Correlação entre a frequência e a corrente de pico.

Nos voltamogramas na Figura 17 não se observou variações significativas de corrente na faixa de frequência de 60 a 140 Hz, para os valores de frequências avaliados e os desvios entre as medidas de corrente são baixos, indicando que não há perda na resposta ao escolher como parâmetro a frequência de 120 Hz.

A velocidade de varredura na voltametria de onda quadrada é dada pelo produto da frequência e o incremento de varredura. Assim, aumentando o incremento de varredura espera-se um aumento na resposta de corrente e aumento da sensibilidade do método (De SOUZA et al., 2004). Nesse trabalho o incremento de varredura foi variado de 2 a 8 mV, conforme a Figura 18.



Figura 18: A) Voltamogramas de onda quadrada, variação do incremento de varredura (2 a 8 mV) com uma adição de STP de 61,42 μ g L⁻¹. Condições: E_{ac} -1,2 V, amplitude 50 mV; Frequência 100 Hz e t_{ac} 120 s. **B**) Correlação entre o incremento e a corrente de pico.

Os voltamogramas na Figura 18 a resposta de corrente para a variação de incremento de 2 a 8 mV, resultando em corrente de aproximadamente 20 nA, com base nos menores desvios entre as medidas são menores com incremento de 4 mV, não foi observado uma

variação significativa na resposta voltamétrica, portanto foi o parâmetro escolhido. A velocidade de varredura escolhida foi 480 mV s⁻¹, dada pelo produto do incremento 4 mV e a frequência 120 Hz.

A Figura 19 apresenta os voltamogramas do estudo de variação da amplitude de pulso, a qual foi variada de 20 a 50 mV.



Figura 19: A) Voltamogramas de onda quadrada, variação da amplitude de pulso, com uma adição de STP de 61,42 µg L⁻¹. Condições: E_{ac} -1,2 V; incremento de varredura 4 mV; Frequência 100 Hz e t_{ac} 120 s. **B**) Correlação entre a variação de amplitude e a corrente de pico.

Um aumento de corrente se observa na variação de amplitude entre 20 e 30 mV, esta variação na resposta não foi observada entre 40 e 50 mV, porém os desvios entre as medidas são menores com amplitude de 50 mV, assim, foi a amplitude escolhida.

O tempo de acumulação foi avaliado entre 60 e 240 s, com uma adição 14,54 μ g L⁻¹ de STP na cela voltamétrica (Figura 20).



Figura 20: A) Voltamogramas de onda quadrada, variação tempo de acumulação (20 a 240 s), com uma adição de STP de 14,54 μ g L⁻¹. Condições: E_{ac} -1,2 V, incremento de varredura 4 mV; amplitude 50 mV e Frequência 120 Hz. **B**) Correlação entre a variação t_{ac} e a corrente de pico.

No intervalo de tempo avaliado (Figura 20) observa-se o aumento na resposta até 180 s que foi o tempo escolhido. Entretanto, o t_{ac} pode variar dependendo da amostra, visando uma melhor resposta analítica. Fedorchuk et al. (2005) utilizando o eletrodo de filme de mercúrio avaliaram o t_{ac} para STP até 180 s, na faixa de concentração de 5,0 a 50 µg L⁻¹ e constataram que acima de 50 µg L⁻¹ ocorre a saturação da superfície eletródica quando aplicaram t_{ac} acima de 30 s.

Ao término da etapa de acumulação, a solução fica em repouso por alguns segundos para ocorrer o equilíbrio entre as espécies químicas depositadas na superfície do eletrodo, esta etapa requer alguns segundos. Em HMDE esse tempo é de cerca de 15 a 20 s, para espécies metálicas (ALEIXO, 2003). A Figura 21 mostra a resposta I_p resultantes do estudo do tempo de equilíbrio para o fármaco STP.



Figura 21: Correlação ente I_p e o tempo de equilíbrio (0 a 30 s), com uma adição de STP de 61,42 μ g L⁻¹. Condições: *E_{ac}* -1,2 V, incremento de varredura 4 mV; Frequência 100 Hz e *t_{ac}* 120 s.

A resposta da corrente de STP na Figura 21-B mostra que com aumento do tempo de equilíbrio ocorre uma queda da resposta voltamétrica, assim 2 s foi o tempo escolhido. Esse resultado mostrou que para o moléculas orgânicas, como o caso dos fármacos em estudo, o tempo de equilíbrio foi menor do que o recomendado para análises de metais.

Após a otimização de todos os parâmetros da voltametria de onda quadrada estes foram aplicados na validação do método para quantificação de STP em amostras ambientais.

3.2.5 Validação do método - Quantificação de STP

3.2.5.1 Linearidade e cálculo do LD e LQ

A linearidade é um parâmetro de validação importante para análises quantitativas.

Um modelo é considerado linear quando o sinal analítico aumenta linearmente com a concentração do analito, permitindo assim a construção de uma curva de calibração (ANVISA, 2003).

Uma curva de adição padrão de STP foi avaliada na faixa de concentração 8,09 a 210,4 μ g L⁻¹, conforme a Figura 22. A resposta analítica I_p para STP foi medida com a redução da linha de base nos voltamogramas.



Figura 22: A) Voltamogramas de onda quadrada da curva analítica com adições de STP, em solução de NaOH 0,01 mol L⁻¹, pH 9,0. Parâmetros voltamétricos: f (120 Hz); Δ Es (4 mV); a (50 mV); t_{ac} (180 s); t_{eq} (2 s); **B**) Curva de padrão externo de STP, concentração de 8,09 a 210,4 µg L⁻¹, com os desvios padrões (n= 3).

A Figura 22-A mostra os voltamogramas de STP com pico máximo no potencial -1,6 V. Na faixa de concentração avaliada verificou-se o aumento da resposta até 90 μ g L⁻¹ de STP essa faixa foi verificada por uma análise de regressão, no nível de 95% de confiança (Tabela 7).

Tabela 7: Dados da análise de regressão da curva de STP aplicando o modelo linear e o quadrático, na faixa de 8,09 a 90,04 μ g L⁻¹.

Dados da Regressão	Linear	Quadrático
F (Regressão)	13191	6523
$F_{ m crítico\ (0,05;\ 1,\ 25)}$	4,25	3,39
Valor de p	0,000	0,000
R ²	99,8%	99,8%
Equação de ourre	$I_{\rm p}({\rm nA}) = -35.0 + 3.96$	$I_{\rm p} ({\rm nA}) = -37,55 + 4,082 {\rm C}_{\rm NIM} (\mu {\rm g \ L^{-1}}) -$
Equação da curva	C_{NIM} (µg L ⁻¹)	0,001267 C _{NIM} (µg L ⁻¹)**2

Os gráficos de resíduos (Figura 23 A e B) e os dados da regressão aos modelos linear e quadrático na Tabela 7 sugerem um comportamento não linear, pois na faixa de concentração de STP avaliada verificou-se que há falta de ajuste aos modelos, avaliando-se os valores de *F* da análise de regressão ($F_{faj} < F_{crítico}$; p < 0.05).



Figura 23: Gráficos de resíduos do ajuste aos dados de calibração na faixa de 8,09 a 90,04 μ g L⁻¹ A) Modelo linear. B) Modelo quadrático. (Minitab)

No entanto, aplicando o modelo quadrático não houve melhora no ajuste aos dados experimentais (Tabela 7) e a análise dos gráficos de resíduos continuou a demonstrar falta de ajuste do modelo (Figura 23-B). Este comportamento dos gráficos de resíduos referentes ao ajuste dos modelos linear e quadrático demonstrou haver falta de homogeneidade de variância nos dados de calibração, o que fere os pressupostos da aplicação da técnica (BARROS-NETO et al., 2002).

Uma alternativa para estabilizar a variância entre os dados foi a aplicação de uma transformação linearizante na resposta, na concentração ou em ambas (BARROS-NETO et al., 2002). Várias funções foram pesquisadas e verificou-se que a aplicação da função *log*

aos dados I_p e da função inversa aos dados de concentração e restrição da faixa de trabalho para a faixa de 8,09 a 40,18 µg L⁻¹ resultaram no ajuste de um modelo linear como pode ser observado no gráfico de resíduos (Figura 24) e nos resultados da Tabela 8. Nesta faixa de trabalho pode-se comprovar a linearidade do método.

Tabela 8: Dados da análise de regressão da curva de STP aplicando a função log aos dados da curva, na faixa de 8,09 a 40,18 µg L-1 de STP.

Regressão		Teste	Teste de Falta de		\mathbb{R}^2
Fregressão*	valor de p	F_{faj} **	valor de p	0.000	00.7.0/
5096,82	0,000	2,47	0,101	0,999	99,7 %
Coeficientes da Reta de Regressão		tobservado***	Valor de p		
Intercepto: 2,52		131,94	0,000		
Inclinação: 18,2			71,39	0,000	
Equação da curva de calibi			ração:	$\log I_p$ (nA) = 2,52 - 18,2 [1/C _{STP} (mol L ⁻¹)	

 $F_{crítico(0,05; 1,16)} = 4,494; **F_{crítico(0,05; 4,12)} = 3,259; *** t_{crítico(0,025; 16)} = 2,12$



Figura 24: Gráfico de resíduos para o ajuste do modelo linear após aplicação das funções linearizantes na resposta (log I_p) e na concentração (1/concentração).

O teste-*t* foi aplicado aos resultados da curva de adição de STP, conforme mostra a Tabela 8, no nível de confiança de 95% indica que os coeficientes linear e angular devem ser inseridos no modelo, pois o valor de p é menor que 0,05 e os valores de $t_{observado}$ maiores que valor de $t_{critico}$.

A média das 10 medidas de corrente do sinal do eletrólito no potencial de pico de STP foi de 2,38 ±1,08 nA. A partir do desvio padrão das medidas (S_B) e da inclinação (b) da curva foi calculado o LD e LQ do método voltamétrico para a quantificação do STP. Os valores de LD e LQ calculados foram 0,18 µg L⁻¹ e 0,60 µg L⁻¹, respectivamente. Na Tabela 9 são mostrados alguns trabalhos e seus respectivos LD's obtidos para STP por diferentes técnicas, a fim de comparar com o método proposto.

Técnica	Observação	LD (µg L ⁻¹)	Aplicação (matriz)	Ref.
V _{Ads} RC-OQ	NaOH 0,01 mol L ⁻¹ ; HMDE	0,18	Água natural e efluente	Este trabalho
PPD	NaOH 0,01 mol L ⁻¹ ; SMDE	0,51	Urina	WANG E MAHMOUD, 1986.
Determinação fluorimétrica	-	3,05	Formulações farmacêuticas e plasma humano	BELAL et al., 2001.
ELISA	-	20,0	Leite	ANVISA, 2009
HPLC/MS	-	1,0 a 2,0	Mel e leite	BRUIJNSVOORT et al. 2004.
PD	0,01 M NaOH, eletrodo (filme de mercúrio)	0,02	Formulações farmacêuticas e leite	FEDORCHUK et al., 2005.
HPLC/MS	Extração líquido/líquido ou em fase sólida	17,5	Leite	PIETRO, 2009.

Tabela 9: Comparação de LD do método proposto com trabalhos da literatura para quantificação de STP, em diferentes matrizes.

O LD do método para STP (Tabela 9) apresenta valor inferir ao do método voltamétrico desenvolvido por Wang e Mahmoud (1986) para quantificação de STP em formulações farmacêuticas, bem como, em relação aos métodos cromatográficos propostos para quantificação de STP em alimentos (BRUIJNSVOORT et al., 2004; PIETRO, 2009). Entretanto, em amostras o LD e LQ foi recalculado considerando-se o sinal do eletrólito solução NaOH 0,01 mol L⁻¹ preparado em uma mistura de 1,0 mL de água natural de rio, diluída em 9,0 mL água ultrapura. O desvio da resposta (*S*_{*B*}) nesse meio foi 0,64 nA, e a inclinação de uma curva de adição padrão nesse meio (y = 21,64 + 0,42 x), com base nesses dados os valores de LD e LQ foram 13,5 µg L⁻¹ e 45,0 µg L⁻¹, respectivamente.

3.2.5.2 Estudo de interferentes

O efeito da presença de interferentes de matriz na resposta de STP foi avaliado com adições de COD. A Figura 25-A mostra os voltamogramas da adição de 30,48 μ g L⁻¹ de STP e adições 0,26 a 9,01 mg L⁻¹ de COD, presente nas alíquotas de AH. A Figura 25-B mostra o efeito da adição de AH na resposta I_p .



Figura 25: A) Voltamogramas de onda quadrada, estudo de interferência com adição de STP de 61,42 μ g L⁻¹, com adições de COD de 0,26 a 9,01 mg L⁻¹. B) Correlação I_p em função das adições de AH.

A relação entre a concentração de STP e a corrente, na Figura 25-B mostra uma queda na corrente de aproximadamente 10 nA com a adição de 0,26 mg L⁻¹ de COD presente na alíquota de AH.

O efeito de interferência de matriz na resposta para o STP foi avaliado em amostra de água de rio (mistura diluída 1:10). O pH da mistura foi ajustado, conforme descrito na otimização. A Figura 26 mostra os voltamogramas da resposta para análise da amostra e adições de 10,19 a 40,58 μ g L⁻¹ de STP.



Figura 26: A) Voltamogramas de onda quadrada mostrando o sinal do eletrólito e adições de STP 10,19 a 40,58 μ g L⁻¹ (diluição 1:10 v/v). **B**) Curva de adição padrão do efeito de interferência da matriz na resposta de corrente.

Conforme abordado no ensaio usando COD, no qual se observou o efeito de interferência, o estudo em amostra real também mostrou esse efeito, a partir da adição de $15,27 \ \mu g \ L^{-1}$ de STP se verifica o sinal de pico característico de STP.

A Figura 27 mostra os voltamogramas da resposta na diluição 2:10 (v/v), uma diluição de 5 vezes.



Figura 27: A) Voltamogramas de onda quadrada mostrando o sinal do eletrólito e adições de STP 10,19 a 40,58 μ g L⁻¹ com diluição (1:10 v/v). **B**) Efeito de interferência da matriz na resposta de corrente.

A partir das Figuras 26 e 27 se observa a interferência de matriz na amostra de água de rio. Na Figura 27 utilizando-se 2,0 mL de amostra o sinal do analito só aparece quando a concentração adicionada na cela é de 30,48 µg L⁻¹, se verifica que o efeito de interferência aumentou proporcionalmente com o aumento de amostra real na mistura.

3.2.5.3 Precisão

A precisão intermediária foi calculada em ensaios de recuperação realizados em cinco dias consecutivos em amostras fortificadas com $35,0 \ \mu g \ L^{-1}$ de STP. Os valores médios de recuperação foram de $35,77 \ \mu g \ L^{-1}$ que corresponde a 102,0%, com desvio de 8,11% entre as medidas. Para a repetitividade a média recuperada foi $37,6 \ \mu g \ L^{-1}$, e a recuperação obtida foi de 106,5%, e RSD de 8,51%. Esses valores confirmam a precisão do método para a determinação de STP, desvios de até 20% são aceitáveis para a determinação de analitos em níveis de concentrações traço (RIBANI et al., 2004).

3.2.5.4 Exatidão

A exatidão do método proposto foi avaliada por estudos de recuperação de STP em eletrólito puro, por adição de padrão em solução fortificada com 15,0 e 35,03 μ g L⁻¹ de STP. A análise em amostra real com 51,01 μ g L⁻¹ do fármaco e as concentrações recuperadas encontram-se na Tabela 10. Em amostra de água de rio foi utilizado a diluição 1:10 mL.

A Figura 28 apresenta os voltamogramas e a curva de adição padrão fortificada com $15,0 \ \mu g \ L^{-1}$ de STP.



Figura 28: A) Voltamogramas de onda quadrada mostrando os resultados do estudo de recuperação de STP em água ultrapura, adições de 2,04 a 8,01 μ g L⁻¹. **B**) curva de adição padrão de STP.

A curva de adição padrão na Figura 28, mostrou uma correlação linear até a adição de 6,01 μ g L⁻¹.

Amostra	Cstp Adicionada (µg L ⁻¹)	CSTP Recuperada (µg L ⁻¹)	Recuperação (%)
Ultrapura	15,0	$12,74 \pm 0,60$	85,0
Ultrapura	35,03	36,06 ± 1,50	103,03
Amostra (1:10 v/v)	51,01	49,28 ± 2,43	96,63

Tabela 10: Ensaios de recuperação de STP em água ultrapura e amostra real (n = 3).

Os valores de recuperação de STP calculados mostram que o método pode ser considerado validado, apresentando recuperações superiores a 80%. O guia de validação AOAC (2000) recomenda recuperações entre 60-115% (nível do analito $\geq 1 \ \mu g \ L^{-1}$). No entanto, o estudo de interferência mostrou que o efeito é elevado para amostras aquosas, justificando-se a diluição das amostras.

3.2.6 Caracterização das amostra e aplicações do método na quantificação de STP

Os parâmetros OD, temperatura e pH foram avaliados nas amostras e os resultados da amostragem de Fev/ 2016 para os seis pontos de coleta encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11: Dados de OD, Temperatura e pH das amostras de água e de esgoto, amostragem de Fev/2016.

	Local de Amostragem	OD	Temperatura	pН
	Local de Amiostragem	(mg L ⁻¹)	(°C)	
1	Terminal turístico de Entre Rios, Entre	6,5	29,3	6,92
	Rios do Oeste Oeste-PR			
2	Resort de Santa Helena, Santa Helena-PR	8,7	30,0	6,85
3	Terminal turístico de Vila Ipiranga, São	7,1	31,5	7,19
	Miguel do Iguaçu-PR			
4	Terminal turístico de Três Lagoas, Foz do	7,0	31,8	7,31
	Iguaçu-PR			
5	Entrada da ETE de Santa Helena-PR	1,1	28,5	6,78
6	Saída da ETE de Santa Helena-PR	3,6	29,6	7,09

Os dados da amostragem de na Tabela 11 mostraram a temperatura das amostras no momento da coleta. O pH das amostras encontrava-se próximo de 7. A menor taxa de OD foi medida nas amostras da entrada e saída da ETE devido a elevada carga de matéria orgânica, a qual demanda alto consumo de oxigênio (MOTA, 1995).

Em seguida, o método $V_{Ads}RC$ -OQ otimizado e validado foi aplicado nas amostras de água, e águas residuais coletadas de seis pontos ao longo da Bacia do Paraná III (Rio Paraná) em três amostragens. Nessas medidas de STP uma alíquota de 1,0 mL de amostra filtrada foi utilizada (diluição de 10 vezes). Os voltamogramas na Figura 29 mostram o perfil voltamétrico numa varredura nas condições otimizada de STP registrado em eletrólito puro e para a mistura da amostra 6 da amostragem de 03/ 2015.



Figura 29: Voltamogramas de onda quadrada comparando o perfil obtido numa varredura de -1,4 a -1,8 V para eletrólito na ausência e na presença da amostra, nas condições voltamétricas otimizadas para STP (amostra 6). Sem ajuste da linha base.

Na faixa de potencial -1,4 a -1,8 V avaliada não se verificou pico característico de STP indicando que não foi detectado em nenhuma das amostras, resultados similares foram observados em todas as amostragens.

A Figura 30, o cromatograma mostra o perfil em HPLC do padrão de STP, com tempo de retenção de 7,39 min e espectro cromatográfico.



Figura 30: A) Cromatograma do padrão de STP (50 mg L⁻¹) em 224,7 nm. **B**) Espectro cromatográfico de HPLC-DAD do pico a 7,39 min.

As análises voltamétricas das amostras aquosas da Bacia do Paraná III mostraram que STP não foi detectado nas amostras nas três amostragens ao longo deste estudo. Também as análises qualitativas por HPLC-DAD não indicaram a presença de pico cromatográfico de STP nas amostras 5 e 6 (entrada e saída da ETE). Além disso, os resultados do estudo de degradação no Capítulo 4 mostram que o STP degrada rapidamente com radiação UV.

3.3 Resultados e Discussão - Nimesulida

3.3.1 Voltametria cíclica

Ensaios usando voltametria cíclica foram realizados para avaliar o comportamento redox de NIM na superfície do eletrodo. A velocidade de varredura foi variada de 5 a 90 mV s⁻¹. Um voltamograma cíclico (Figura 31-A) mostra a resposta de NIM na velocidade 50 mV s⁻¹. A Figura 31-B apresenta a correlação da corrente com a raiz quadrada da velocidade e, na Figura 31-C o log da corrente *vs* log da velocidade.



Figura 31: A) Voltamograma cíclico de NIM na velocidade 50 mV s⁻¹ em HMDE, $C_{\text{NIM}} =$ 92 µg L⁻¹, 10 mL de KCl 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0; **B**) Correlação entre I_p e velocidade de varredura; **C**) Função log da corrente log *vs* da velocidade.

O voltamograma cíclico na varredura catódica de -0,45 e -0,75 V (Figura 31-A) mostra um pico irreversível da molécula de NIM no potencial -0,65 \pm 0,02 V, o qual corresponde a redução do grupo nitro (NO₂) na posição 4 da molécula de NIM, conforme propõe o trabalho de Alvarez-Lueje et al (1997). Neste estudo também os autores sugerem que no processo redox ocorre a transferência de quatro elétrons e quatro prótons na superfície eletródica, de acordo com a Equação 3.1 (ALVAREZ-LUEJE et al., 1997). Na Figura 32-B a correlação entre a resposta I_p e a raiz quadrada da velocidade mostra o aumento de I_p na faixa de 5 a 70 mV s⁻¹, em velocidades acima de 70 mV s⁻¹ o processo de redução de NIM não foi favorecido. A relação entre a corrente e a raiz da velocidade não foi linear, indicando que o processo eletroquímico da molécula de NIM sobre a superfície do eletrodo é adsortivo (ALVAREZ-LUEJE et al., 1997). O processo adsortivo foi confirmado pela equação y = 1,25 + 1,12x resultante da relação (log *v*) versus (log I_p) apresentando coeficiente de correlação re 0,998. A inclinação da curva foi de 1,12 (inclinações próximas de 1,0 indicam adsorção do analito na superfície do eletrodo) (GROSSER-Jr, 1993).

$$RNO_2 + Hg \rightarrow Hg [R-NO_2]_{Ads}$$
$$Hg [R-NO_2]_{Ads} + 4e_{-} + 4 H_{+} \rightarrow Hg + [RNHOH] + H_2O \quad (Equação 3.1)$$

Em determinações quantitativas a técnica voltamétrica utilizada foi a de pulso diferencial (PD-AdsCSV) com base em trabalhos prévios da literatura. Furlanetto et al. (2000) quantificou NIM usando PD-AdsCSV também com HMDE em formulação farmacêutica. Bukkitgar et al. (2016) desenvolveu um método usando voltametria diferencial de pulso para detecção de NIM em comprimidos usando o eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de óxido de zinco dopado com 5% de bário. As semelhanças entre o presente trabalho e os citados foram o pH de 7,0 e o uso de voltametria diferencial de pulso.

3.3.2 Estudo do Eletrólito suporte e potencial hidrogeniônico

Estudos foram realizados com $V_{Ads}RC$ -PD utilizando diferentes eletrólitos para obtenção da melhor resposta voltamétrica. Inicialmente foi avaliado o tampão-BR 0,04 mol L⁻¹/Etanol (7:3 v/v) (eletrólito 1) em pH de 7, em seguida o tampão-BR 0,04 mol L⁻¹/etanol (7:3 v/v)/ KCl 1,0 mol L⁻¹ (eletrólito 2), ambos em pH ajustado para 7,0 com NaOH 2,0 mol L⁻¹, como descrito por Furlanetto et al. (2000). A resposta voltamétrica para os eletrólitos 1

e 2 encontra-se na Figura 32-A a avaliados na faixa de varredura de -0,2 a -0,7 V e a resposta da molécula de NIM nesses meios.

A Figura 32-B mostra a resposta voltamétrica de NIM com a variação da concentração de KCl de 0,1 a 1,0 mol L⁻¹, na mistura tampão-BR/etanol na concentração 2,76 mg L⁻¹ de NIM.



Figura 32: A) Voltamogramas de pulso diferencial para os eletrólitos e adições de NIM. B) voltamogramas da mistura tampão-BR 0,04 mol L^{-1} / etanol (7:3 v/v) e KCl (0,1 a 1,0 mol L^{-1}) com ajuste da linha base (faixa de varredura de -0,2 a -0,45 V).

Os voltamogramas na Figura 32 mostram que com a adição de KCl (eletrólito 2) diminui a intensidade do pico da resposta voltamétrica do eletrólito, além disso, desloca o pico de NIM para potenciais menos catódicos (- 0,43 para - 0,35), permitindo a separação dos mesmos. A corrente aumentou com a concentração de KCl no meio, sendo a melhor resposta para a solução tampão mais KCl 1,0 mol L⁻¹ (Figura 32-B). Em seguida, foi realizado um teste com solução KCl 1,0 mol L⁻¹, na ausência da mistura tampão-BR/etanol. A Figura 33 mostra os voltamogramas comparando os três meios avaliados.



Figura 33: Voltamograma de pulso diferencial em diferentes eletrólitos: **a**) mistura tampão-BR 0,04 mol L^{-1} / etanol (7:3 v/v); **b**) mistura solução tampão-BR/etanol (7:3 v/v) e KCl (1,0 mol L^{-1}); **c**) solução KCl 1,0 mol L^{-1} . Sem ajuste da linha base.

Após a escolha da solução de KCl 1,0 mol L⁻¹ como eletrólito suporte o pH desse meio foi avaliado de 5 a 8 na presença de 30,8 μ g L⁻¹ de NIM. Os ajustes de pH foram realizados com NaOH 0,01 mol L⁻¹ e a resposta de NIM foi avaliada pela correlação com pH (Figura 34).



Figura 34: A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos no estudo de pH de 5 a 8 mostrando uma adição de 30,8 μ g L⁻¹ de NIM. **B**) Variação de I_p vs pH.

A resposta voltamérica de NIM mostrou um pico catódico bem resolvido com intensidades de corrente similares, na faixa de pH avaliada. Os resultados indicaram a independência do sinal analítico em função do valor do pH. Assim, foi escolhido trabalhar com KCl 1,0 mol L⁻¹ em pH 7 como o eletrólito de suporte, priorizando as condições neutras. Este resultado concorda com outros estudos que observaram este comportamento (ALVAREZ-LUEJE et al., 1997; BUKKITGAR et al., 2016).

3.3.3 Otimização dos parâmetros voltamétricos para quantificação de NIM

Os parâmetros instrumentais para as análises do fármaco NIM utilizando $V_{Ads}RC$ -PD foram otimizados, a fim de obter sinais seletivos e mais intensos. Uma alíquota de 45, 6 μ g L⁻¹ de NIM foi adicionada na cela para avaliação dos parâmetros da voltametria (Potencial de acumulação, velocidade de varredura e tempo de pulso, etc). Esses parâmetros foram avaliados de forma univariada e encontram-se descritos a seguir.

O E_{ac} foi variado de 0 a -1,0 V. Na Figura 35 os voltamogramas mostram a resposta de corrente em função do potencial. Esse parâmetro permite a pré-concentração seletiva da espécie química, o qual é semelhate ao potencial de deposição, nessa etapa ocorrerá a adsorção do analito sobre a superfície do eletrodo (ALEIXO, 2003).



Figura 35: A) Voltamogramas de pulso diferencial da variação de potencial de acumulação de 0 a -1,0 V, com adição de 45,6 μ g L⁻¹ de NIM. **B**) Correlação entre a variação do potencial de acumulação e I_p.

A resposta obtida nos voltamogramas na Figura 35 mostram que o potencial de acumulação é um parâmetro essencial nas medidas voltamétricas de NIM mostrando que em -0,4 V foi o potencial com a maior resposta com 21,7 nA e também a melhor resolução dos voltamogramas, portanto partir dessa análise o E_{ac} -0,4 V foi escolhido para os ensaios posteriores. O potencial de acumulação otimizado é diferente, por exemplo, do encontrado no trabalho de Furlanetto et al. (2000) para NIM que utiliza 0 V, também usando HMDE e voltametria de pulso diferencial, mostrando a importância da otimização desse parâmetro.

Outro parâmetro avaliado foi o tempo de equlíbrio, período em que a solução fica em repouso após a deposição do analito na superfície do eletrodo para o sistema entrar em equilíbrio e, em seguida registrar a corrente (ALEIXO, 2003). O t_{eq} foi avalidado de 0 a 10 s conforme a Figura 36.



Figura 36: A) Voltamogramas de pulso diferencial da variação do tempo de equilíbrio (t_{eq}), com adição de 45,56 µg L⁻¹ de NIM. **B**) Correlação entre a variação de t_{eq} e I_p .

No período de 4 a 10 s de equilíbrio não se verifica variação significativa tanto na

resposta de corrente, quanto no perfil voltamétrico, assim, 6 s foi o tempo escolhido, considerando-se os baixos desvios entre as medidas.

Em seguida foi avaliado o parâmetro velocidade de varredura de 20 a 50 mV s⁻¹ (Figura 37). A velocidade de varredura de potencial pode ser definida como a variação do potencial aplicado durante determinado tempo. Este parâmetro pode ser variado para tornar as análises mais rápidas, porém o aumento da velocidade de varredura pode afetar a resolução dos picos (Aleixo, 2003).



Figura 37: A) Voltamogramas de pulso diferencial da variação da velocidade de varredura, com adição de 45,56 μ g L⁻¹ de NIM. **B**) Correlação entre a variação da velocidade de varredura e I_p .

Na Figura 37 se observa o amento da intensidade de corrente com a velocidade de varredura. Contudo, em velocidades mais elevadas há uma diminuição do número de pontos coletados, comprometendo a definição dos picos podendo também aumentar os desvios entre as medidas de corrente. Com base no exposto 40 mV s⁻¹ foi a velocidade escolhida, esta velocidade coincide com Furlanetto et al. (2000) que a partir de um estudo com design experimental utilizou as velocidades 20 e 40 mV s⁻¹ e escolheu o valor superior.

A amplitude de pulso é um parâmetro voltamétrico que está diretamente relacionado com a sensibilidade do método e foi avaliada de 20 a 80 mV (Figura 38). A otimização da amplitude do pulso diferencial permite minimizar a contribuição da corrente de fundo (não faradaica) (ALEIXO, 2003).



Figura 38: A) Voltamogramas de pulso diferencial da variação de amplitude, com adição de 45,56 μ g L⁻¹ de NIM. B) Correlação entre a variação de amplitude e I_p.

A resposta voltamétrica da variação da amplitude (Figura 38) mostra um deslocamento do potencial de pico para região mais anódica. A amplitude de pulso escolhida foi 80 mV, com voltamogramas bem definidos. Na literatura recomenda-se amplitudes entre 50 e 100 mV, amplitudes mais elevadas podem resultar em picos alargados e com baixa resolução (BARD e FAULKNER, 2001; ALEIXO, 2003).

O tempo de pulso está relacionado com o período de aplicação dos pulsos de potencial e a corrente é medida no início e final do pulso, a corrente inicial é diminuída da inicial para subtrair a corrente capacitiva da faradaica (De SOUZA et al., 2003). Este parâmetro foi avaliado de 20 a 80 ms (Figura 39).



Figura 39: A) Voltamogramas de pulso diferencial da variação do tempo de pulso, com adição de 45,56 μ g L⁻¹ de NIM. **B**) Correlação entre a variação do tempo de pulso e I_p .

O tempo de pulso está relacionado à capacidade de detecção do método analítico. Observa-se que a intensidade de corrente decai com o tempo, assim um tempo de pulso relativamente alto pode diminuir o sinal analítico (SKOOG et al., 2006), como se observa na resposta de NIM na Figura 39. O tempo de pulso escolhido foi 20 ms com base na resposta de corrente, a simetria dos voltamogramas e desvios entre as medidas.

Os parâmetros voltamétricos descritos anteriormente foram aplicados na análise do tempo de acumulação (t_{ac}). É essencial otimizar o tempo de aplicação do potencial de acumulação, porque a concentração de contaminantes em matrizes ambientais geralmente é baixa. Portanto, pré-concentrar o analito na superfície eletródica permite sua quantificação por voltametria. Nesse ensaio utilizou-se 5,6 µg L⁻¹ de NIM, a concentração do fármaco foi menor do que a usada nos ensaios dos parâmetros descritos anteriormente para evitar a saturação do eletrodo, comprometendo a avaliação do tempo de acumulação, o qual foi variado de 10 a 120 s, Figura 40.



Figura 40: A) Voltamogramas de pulso diferencial da variação do tempo de acumulação, com adição de 5,6 μ g L⁻¹ de NIM. **B**) Correlação entre a variação do tempo de acumulação e I_p .

Pode-se observar nos voltamogramas na Figura 40 que ocorreu um deslocamento do potencial para região mais anódica (~0,02 V). O tempo de acumulação escolhido foi 60 s com a corrente de pico média de 3,0 nA e não se observa um aumento significativo na resposta de NIM em tempos superiores, por exemplo, entre 60 e 120 s o aumento médio de I_p é de 0,67 nA e, apresenta desvios elevados. Como o tempo de acumulação está relacionado com a concentração do analito é necessário avalia-lo nas quantificações, ás vezes, pode ser necessário aumentar o diminuir esse período. Após a otimização de todos os parâmetros da técnica de pulso diferencial estes foram aplicados na validação do método para quantificação de NIM em amostras ambientais.

3.3.4 Validação da metodologia

3.3.4.1 Linearidade e cálculo do LD e LQ

Uma curva de padrão externo do anti-inflamatório NIM foi construída em KCl 1,0 mol L⁻¹ utilizando os parâmetros instrumentais otimizados, com objetivo de avaliar a faixa linear de trabalho. A concentração de NIM foi avaliada em 18 níveis de 0,50 a 130,1 μ g L⁻¹. Cada ponto na curva analítica foi avaliado em triplicata e a resposta I_p registrada na altura máxima de pico referente a NIM, com correção da linha base. A Figura 41-A mostra os voltamogramas de NIM no potencial -0,6 ± 0,02 V e a Figura 41-B a correlação concentração em função da concentração de NIM.



Figura 41: A) Voltamogramas de PD da curva de calibração de NIM, adições 0,50 a 130,1 μ g L⁻¹ em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹, pH 7. **B**) Curva de padrão externo de NIM, com os desvios padrões (n = 3) e t_{ac} 60 s.

Para a faixa de concentração avaliada observa-se o aumento da corrente até a concentração de 50 μ g L⁻¹ (Figura 41-B). Para verificar a linearidade no intervalo de 0,5 a 50 μ g L⁻¹ de NIM, uma análise de regressão linear e um teste de falta de ajuste no nível de 95% de confiança foram aplicados aos dados da curva para verificar o ajuste ao modelo proposto, conforme mostra a Tabela 12.

a curve no foixe de 0.5×50 ug L ⁻¹		1	-
Tubelli 121 Budob du analise de regressuo inicui de ranta, no inicer de se vo de comfança para	a curva na faixa de 0.5 a 50 µg I ⁻¹		
Tabela 12: Dados da análise de regressão linear de NIM, no nível de 95% de contiança para	Tabela 12: Dados da análise de regressão linear de NII	M, no nivel de 95%	de confiança para

Regressão		Teste de Falta de		R	\mathbb{R}^2
$F_{regressão}*$	valor de <i>p</i>	F_{faj} **	valor de <i>p</i>	0 9990	99.6 %
9595,71	0,000	0,17	0,999	0,7770	<i>,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,</i>

Coeficientes da Reta de Regressão	tobservado***	Valor de p
Intercepto: - 0,148	2,53	0,134
Inclinação: 0,464	51,48	0,000
Equação da curva de calibraç	I_p (nA) = -0,148 + 0,464 C _{NIM} (µg L ⁻¹)	

* $F_{crítico\ (0,025;\ 1,27)} = 5,63;$ ** $F_{crítico\ (0,025;\ 8,19)} = 2,96;$ *** $t_{crítico\ (0,025;27)} = 2,05$

A curva de adição de padrão de NIM apresenta linearidade nas concentrações de 0,5 a 50 µg L⁻¹ no nível de 95% com R² = 99,6% indicando que o modelo linear se ajusta aos dados experimentais nessa faixa de concentração. Os dados mostram que a regressão linear é significativa ($F_{calculado} > F_{tabelado}$; p < 0,05) e não há evidências de falta de ajuste ao modelo linear (F_{faj} (calculado) < F_{faj} (tabelado); p > 0,05) (Tabela 12).

A fim de verificar a significância dos coeficientes (intercepto e inclinação), um testet foi aplicado aos resultados da curva de adição de padrão de NIM conforme os dados mostrados na Tabela 12. No nível de 95% de confiança os dados indicam que os coeficientes linear e angular devem ser inseridos no modelo, pois o valor de p é menor que 0,05 e os valores de *t*_{observado} maiores que valor de *c*_{rítico}.

A resposta de corrente de 10 medidas do sinal do eletrólito (solução de KCl 1,0 mol l⁻¹) no potencial de pico de NIM foi 0,023 nA. Com base no desvio padrão das medidas (*S_B*) da resposta do eletrólito e da inclinação (*b*= 0,464) da curva foi calculado o LD e LQ do método voltamétrico proposto para a quantificação de NIM. Os valores de LD e LQ foram 0,15 μ g L⁻¹ (4,87×10⁻¹⁰ mol L⁻¹) e 0,50 μ g L⁻¹ (1,62×10⁻⁹ mol L⁻¹), respectivamente.

O desvio padrão S_B do sinal voltamétrico para o eletrólito no potencial de NIM foi 0,023 nA, e a inclinação da curva analítica b = 0,464. Assim, o LD e LQ calculados foram 0,15 e 0,50 µg L⁻¹, respectivamente, usando 60 s de acumulação. A Tabela 13 apresenta trabalhos propostos para quantificação de NIM e os LD's, em matrizes como formulações farmacêuticas, biológicas e aquosas, para comparação com o método proposto.

Métodos eletroanalíticos aplicados para este fármaco foram encontrados para quantificação de NIM em formulações farmacêuticas, empregando pulso diferencial e eletrodo de mercúrio HMDE (FURLANETTO et al., 2000) e DME (ALVAREZ-LUEJE, 1997); por múltiplos pulsos amperométricos com sistema FIA e eletrodo de diamante dopado boro (LIMA et al., 2013). Wang et al. (2006) propuseram um método com eletrodo modificado com cisteína para quantificar NIM em formulações farmacêuticas e soro humano. O único trabalho para determinação de NIM em amostras aquosas foi desenvolvido por Gaffney et al. (2014), utilizando HPLC com extração em fase sólida.

Técnica	Observação	LD (µg L ⁻¹)	Aplicação (matriz)	Ref.
V _{Ads} RC-PD	KCl 1,0 mol L ⁻¹ ; HMDE	0,15	Água natural e efluente	Este trabalho
PPD	Tampão BR/ Etanol 0,04 mol L ⁻ ¹ (70/30); DME	770,8	Formulações Farmacêuticas	ALVAREZ- LUEJE, 1997.
V _{Ads} RC-PD	Acetato de amônia 0,015 mol L ⁻¹ ; HMDE	0,41	Formulações Farmacêuticas	FURLANETTO et al., 2000.
V _{Ads} RC-PD	GCE/modificado com cisteína	15,4	Formulações Farmacêuticas e soro humano	WANG et al. 2006.
HPLC/UV	-	>4,4	Formulações Farmacêuticas	TUBIC, et al., 2007.
HPLC/UV	-	0,18 a 41,5	Formulações Farmacêuticas	PANUSA et al., 2007.
Sitema FIA/ Amperometria	Fosfato 0,1 mol L ⁻ ¹ ; Diamante dopado com boro	Potential de pulsos (V): 0,8 : 24,9 0,6 : 31,8 0,4 : 1069,8	Formulações Farmacêuticas	LIMA et al., 2013.
HPLC-ESI- MS/MS	Extração em fase sólida (SPE)	0,01 a 0,2	Água superficial e água de abastecimento	SILVEIRA et al., 2013.
UPLC- MS/MS	Extração em fase sólida (SPE)	2,1×10 ⁻⁴ 9,0×10 ⁻⁵	Água de abastecimento Água superficial	GAFFNEY et al., 2014.
PD-AdsASV	Tampão Fosfato 0,2 mol L ⁻¹	0,55	Urina	BUKKITGAR et al. 2016.

Tabela 13: Comparação de LD do método proposto com a literatura para quantificação de NIM, em diferentes matrizes.

O LD do método voltamétrico proposto para a quantificação de NIM foi similar ou inferior a valores citados usando técnicas eletroanalíticas, como o método desenvolvido por Wang et al. (2006) com eletrodo modificado com cisteína. O método também se mostrou mais sensível do que os métodos cromatográficos propostos por Tubic, et al. (2007) e Panusa et al., (2007) mostrando que o método pode ser aplicado na quantificação de NIM em concentrações da ordem de ng L⁻¹ a μ g L⁻¹ nas amostras aquosas. Além disso, métodos voltamétricos apresentam baixos custos e podem ser considerados rápidos, sem aplicação de etapas de *clean-up* e pré-concentração em colunas conforme demandam os métodos usando HPLC-DAD.
Em amostra aquosa diluída o LD e LQ foram calculados considerando-se o sinal do eletrólito a solução de KCl 1,0 mol L⁻¹ preparada em uma mistura de 1,0 mL de água natural de rio (diluída 1:9 mL). O desvio da resposta (*S_B*) nesse meio foi 0,062 nA, e a inclinação de uma curva de adição padrão nesse meio (y = 0,15 + 0,49 x), com base nesses dados os valores de LD e LQ foram 0,38 µg L⁻¹ e 1,27 µg L⁻¹, respectivamente.

3.3.4.2 Seletividade

O critério seletividade permite avaliar a capacidade do método em medir com exatidão o analito de interesse na presença de componentes da matriz (ANVISA, 2003). Para o fármaco NIM a seletividade foi avaliada presença AH e em águas naturais com diferentes diluições. A Figura 42-A mostra os voltamogramas da adição de 20,2 μ g L⁻¹ NIM e 0,26 mg L⁻¹ de COD, respectivamente. A Figura 42-B mostra a resposta voltamétrica do ácido húmico na ausência de NIM com adições de 0,26 a 9,01 mg L⁻¹ de COD (presente nas alíquotas de HA) mostrando um pico em aproximadamente 0,6 V, potencial de pico característico de NIM.



Figura 42: A) Voltamogramas de pulso diferencial do estudo de interferência de COD na resposta de NIM. **B**) Voltamogramas de pulso diferencial do COD com adições HA. Com correção de linha base.

Os voltamogramas de 20,2 μ g L⁻¹ de NIM e da adição de 0,26 mg L⁻¹ de COD mostram a mudança do perfil voltamétrico em relação ao sinal característico de NIM mostrando o efeito de interferência da matéria orgânica nas medidas de corrente. Esse efeito também foi avaliado em ensaios com adição de 1, 2, 3 e 5 mL de amostra de água de rio, completando o volume para 10,0 mL com solução de KCl para 1,0 mol L⁻¹, em ajustado para 7. Portanto, as diluições das amostras foram de 10; 5; 3,3 e 2 vezes, respectivamente. A Figura 43 mostra os voltamogramas da curva de adição padrão de NIM na faixa de 1,53 a 19,52 µg L⁻¹, nas diferentes proporções de amostra real.



Figura 43: Voltamogramas de onda quadrada mostrando o sinal do eletrólito (amostra diluídas) em curvas de adição padrão em concentrações de 1,53 a 19,52 μ g L⁻¹ de NIM. Diluições: A) 1:10; B) 2:10; C) 3:10; D) 5:10.

O efeito de interferência de matriz foi mais significativo nos ensaios contendo 3 e 5 mL de amostra. A resposta voltamétrica de NIM na Figura 44-A, apresenta a inclinação das curvas de NIM em amostras diluídas na faixa de concentração 1,53 a 19,52 μ g L⁻¹ para os ensaios com 1 a 5 mL de amostra avaliados. A Figura 44-B mostra as diluições de 1 e 2 mL de amostra comparando sua inclinação à de uma curva em eletrólito e em água ultrapura com adições de alíquotas de NIM nas mesmas concentrações.



Figura 44: A) Curvas de adição de padrão de NIM com diferentes diluições da amostra (1:9; 2:8; 3:7 e 5:5) **B)** Curvas analíticas de NIM em eletrólito puro e em amostras de águas naturais (diluição de 1:9; 2:8).

A Figura 44-B mostra a inclinação da curva de NIM em eletrólito e das amostras reais diluídas 5 e 10 vezes. As inclinações (coeficientes angulares) foram de 0,36 para a curva em água ultrapura e 0,25 e 0,27, respectivamente, nas amostras diluías. As diferentes inclinações entre as curvas em água ultrapura e nas amostras indicam a necessidade o uso do método de adição padrão na quantificação de NIM em águas naturais. O processo de diluição não interferiu na quantificação de NIM nas amostras, pois o método permite a préconcentração do analito durante o processo de redução do fármaco. Em medidas voltamétricas como estas o tempo de acumulação pode ser aumentado, conforme descrito na otimização dos parâmetros, caso seja necessário melhorar a sensibilidade.

Para confirmar a seletividade do método cromatográfico os perfis dos espectros UV-DAD do padrão e dos picos atribuídos ao composto presente nas amostras de efluente foram analisados, demonstrando assim, similaridade nos perfis dos espectros UV-DAD do padrão e nas amostras (Figura 45).



Figura 45: A) Cromatogramas do padrão de NIM (50 mg L⁻¹) monitorado em 302 nm. B) Espectro cromatográfico de HPLC-DAD do pico a 10,9 min.

A presença de NIM verificada nas amostras de efluentes por voltametria e foi confirmada através de análses qualitativas por HPLC-DAD comparando o tempo de retenção e o perfil similar dos espectros UV-DAD das amostras com o padrão de NIM. A Figura 46 mostra os cromatogramas sobrepostos em 302,1 nm da solução padrão de NIM e das amostras da entrada e saída da ETE, com picos bem definidos, no tempo de retenção em 10,9 min.



Figura 46: A) Sobreposição dos cromatogramas do padrão de NIM (50 mg L^{-1}) e das amostras 5 e 6 em 302,1 nm. A') Ampliação dos cromatogramas do padrão e amostras.

A comparação dos tempos de retenção das amostras na Figura 46 com o do padrão de NIM mostrou-se similar ao observado para o padrão, mas menor intensidade do pico cromatográfico.

3.3.4.3 Precisão

A precisão do método foi avaliada pela estimativa da repetitividade e precisão intermediária avaliada a partir da estimativa da concentração recuperada em amostras fortificadas com 5,0 μ g L⁻¹ de NIM. As recuperações médias de cinco medidas foram 100,2 % para a repetitividade e, 94,02 % para a precisão intermediária, com desvios padrões de 8,96 e 10,25, respectivamente. Estes valores foram abaixo de 20% considerados aceitáveis no nível de concentração avaliado (RIBANI et al., 2004).

3.3.4.4 Exatidão

A Tabela 14 apresenta os resultados do ensaio de exatidão do método voltamétrico foi avaliada pela recuperação de NIM em água ultrapura fortificada de 2,02 μ g L⁻¹ e 5,10 μ g L⁻¹ do fármaco, respectivamente. Para amostra real foi adicionado a concentração de 2,52 μ g L⁻¹ de NIM cela.

A exatidão foi calculada pela recuperação de NIM em água ultrapura e em amostra (água de rio; diluição 1:10 v/v), fortificadas com 2,0 e 2,52 μ g L⁻¹, apresentando recuperações de 111,4% e 119,8%, respectivamente.

Amostro	CNIM Adicionada	CNIM Recuperada	Recuperação	
Amostra	(µg L ⁻¹)	(µg L ⁻¹)	(%)	
Água ultrapura	2,02	$2,25 \pm 0,24$	111,4	
Água Ultrapura	5,10	$5,27 \pm 0,10$	103,3	
Amostra (1:10 v/v)	2,52	$3,02 \pm 0,39$	119,8	

Tabela 14: Ensaios de recuperação de NIM em água ultrapura e amostra real (n = 3).

Os valores de recuperação obtidos para NIM mostram que o método foi validado, de acordo com a literatura o método apresenta boa exatidão, desvios de até 20% são aceitáveis para a quantificação de analitos em níveis de concentrações traço (RIBANI et al., 2004).

3.3.5 Aplicação do método na quantificação de NIM em amostras aquosas

O método PD-AdsCSV otimizado e validado foi aplicado na quantificação de NIM em amostras de água, e águas residuais coletadas de seis pontos ao longo da Bacia do Paraná III (Rio Paraná) em três diferentes amostragens, de acordo com os resultados na Tabela 15. As amostras foram diluídas de 20 a 100 vezes. A Figura 47 mostra a curva de quantificação para a amostra 5 (amostragem 3) com adição padrão de NIM de 3,05 a 9,22 μ g L⁻¹. Uma alíquota de 100 μ L de amostra filtrada foi utilizada nesta determinação.



Figura 47: Voltamogramas de PD-AdsCSV da curva de adição padrão da amostra 5. **a**) Amostra, **b**) 3,05, **c**) 6,15 e **d**) 9,22 μ g L⁻¹ NIM, em KCl 0,1 mol L⁻¹, pH 7 e *t_{ac}* 10 s.

Os resultados encontrados de NIM em águas residuais indicam que as drogas

farmacêuticas estão sendo lançadas e persistindo em esgoto urbano. Além disso, os processos de tratamento aplicados não foram suficientes para removê-los, como discutido em outros trabalhos (HEBERER, 2002; VERLICCHI et al., 2012; WING-LEUNG et al, 2013). As amostras 1 a 4 das "praias artificiais" foram diluídas 10 vezes e apresentaram aspecto límpido e inodoro. Nestas amostras não foi detectado NIM. Entretanto, as amostras de esgoto apresentavam a cor amarela e forte odor.

Amostra		C _{NIM} (µg L ⁻¹)		
Amostra	Local da coleta	Amostragem 1	Amostragem 2	Amostragem 3
1	Terminal turístico de Entre Rios, Entre Rios do Oeste Oeste-PR	< 0,15	< 0,15	< 0,15
2	Resort de Santa Helena, Santa Helena-PR	< 0,15	< 0,15	< 0,15
3	Terminal turístico de Vila Ipiranga, São Miguel do Iguaçu- PR	< 0,15	< 0,15	< 0,15
4	Terminal turístico de Três Lagoas, Foz do Iguaçu-PR	< 0,15	< 0,15	< 0,15
5	Entrada da ETE de Santa Helena- PR	186,5	385,0	316,4
6	Saída da ETE de Santa Helena-PR	< 0,15	101,7	121,6

Tabela 15: Determinação de NIM em amostras de água natural e esgoto de seis pontos ao longo da Bacia do Paraná III, em três períodos de amostragem.

Os teores de NIM detectados em amostras de água do mar foram elevados em comparação com valores reportados para águas naturais. Silveira et al. (2013) determinaram em amostras de água potável 0,05 μ g L⁻¹ de NIM, utilizando HPLC-ESI-MS/MS com préconcentração em coluna SPE e 134 μ g L⁻¹, em águas superficiais. Gaffney et al. (2015), monitoraram três anti-inflamatórios, ibuprofeno, diclofenaco e nimesulida, em água de abastecimento de água tratada, encontraram concentrações abaixo de 30 ng L⁻¹.

Mezzelani et al. (2016) avaliaram a bioacumulação de AINEs (acetaminofeno, diclofenaco, ibuprofeno, cetoprofeno e nimesulida) em mexilhões da espécie *Mytilus galloprovincialis*. Os autores observaram bioacumulação de diclofenaco ($14,9 \pm 7,89 \text{ ng/ g}$), ibuprofeno ($1,63 \pm 1,0 \text{ ng/ g}$) e NIM ($30,22 \pm 13,50 \text{ ng/ g}$) em organismos expostos a esses fármacos no laboratório. No mesmo trabalho, espécimes dos mexilhões foram coletados no Mar Mediterrâneo e posteriormente analisados para avaliar a possível bioacumulação de AINEs. NIM foi detectado em todas as amostras testadas de organismos selvagens em níveis

médios de 4,4 \pm 1,53 ng / g (peso seco).

3.4 Considerações finais

O método para quantificação de STP e NIM foi otimizada, avaliando todos os parâmetros de forma univariada, estes foram escolhidos com base no melhor perfil voltamétrico e resposta I_p , para garantir a sensibilidade na quantificação dos analitos.

O parâmetro t_{ac} otimizado foi 180 s, para STP e 60 s para NIM. No entanto, pode ser maior ou menor de acordo com a amostra a ser analisada. Em eletrólito a faixa linear de trabalho para STP foi de 8,09 a 40,18 µg L⁻¹ e, para NIM de 0,5 a 50 µg L⁻¹. Os resultados da análise de regressão aplicada aos dados das curvas, mostraram para ambos os fármacos mostraram na faixa de concentração avaliada não havar falta de ajuste ao modelo linear. Os limites de detecção e quantificação para STP em água ultrapura foram 0,18 µg L⁻¹ e 0,60 µg L⁻¹, respectivamente. Em solução contendo a mistura água de rio diluída em água ultrapura LD e LQ foram 13,5 µg L⁻¹ e 45,0 µg L⁻¹. Para o fármaco NIM o LD calculado foi 0,15 e LQ 0,50 µg L⁻¹. No entanto, os resultados de estudos de interferência mostraram que a matéria orgânica exerce forte interferência na quantificação de STP e NIM, tanto na presença de COD, quanto em amostras de água. Esse efeito foi contornado com diluições das amostras, permitindo a quantificação dos fármacos em amostras aquosas.

STP não foi detectado nas amostras coletadas em diversos pontos da região de abrangência do Lago de Itaipu. NIM foi quantificada nas amostras de esgoto da ETE de Santa Helena, sua presença foi confirmada por análise em HPLC nos ensaios de seletividade.

Os parâmetros de validação dos métodos propostos para STP e NIM mostraram que estes se encontram validados e apresentam precisão e exatidão. Além disso, os métodos voltamétricos com etapas de pré-concentração do analito no eletrodo permitem limites de detecção da ordem de grandeza de métodos cromatográficos, considerados métodos padrão para análises de fármacos.

3.5 Referências

AGOSTINHO, S. M. L.; VILLAMIL, R. F. V.; NETO, A. A.; ARANHA, H. O Eletrólito Suporte e suas Múltiplas Funções em Processos de Eletrodo. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 813-817, 2004. ALEIXO, M. L. Voltametria: Conceitos e Técnicas. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química São Paulo - SP, 2003. Disponível em: http://www.chemkeys.com. Acesso em 05 Abr. 2017.

ALVAREZ-LUEJE, A.; VÁSQUEZ, P.; NÚÑEZ-VERGARA, L. J.; SQUELLA, J. A. Voltammetric Study of Nimesulide and Its Differential Pulse Polarographic Determination in Pharmaceuticals. *Electroanalysis*. v. 9, n. 15, p. 1209. 1997.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos; Resolução RE nº 899; de 29/05/2003.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal. Relatório 2006-2007, Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo (5º e 6º anos de atividade). Jun. 2009.

AOAC, Association of Oficial Analyitical Chemists; Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, **2002**, 38 p.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. *Electrochemical methods: fundamentals and applications*.2a edição, editora John Wiley & Sons, Inc, 2001.

BARROS-NETO, B.; SCARMINIO, I. E.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: aplicações na ciência e na indústria. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. 414p.

BELAL, F., EL-ASHRY, S. M., EL-KERDAWY, M. M, EL-WASSEEF, D. R. Spectrofluorimetric determination of streptomycin in dosage forms and in spiked plasma using 9,10-phenanthraquinone. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. v. 26, n. 3, p. 435–441, 2001.

BEM, J. F; LAZZARIN, L. Estudo de caso comparativo entre o tratamento de esgoto doméstico em RALF, UASB e lagoas. (2009) 61 f. Trabalho de conclusão de curso, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2009.

BERGAMINI, M. F.; SANTOS, A. L.; STRADIOTTO N. R.; ZANONI M. V. B. A disposable electrochemical sensor for the rapid determination of levodopa, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 39, p. 54-59, 2005.

BRITO, N. M.; AMARANTE-Jr, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de Métodos Analíticos: Estratégias e Discussão. Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente, v. 13, p. 129-146, 2003.

BRUIJNSVOORT, M. V., OTTINK, S. J. M., JONKER, K. M. e BOER, E. Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1058, p. 137-142, 2004.

BUKKITGAR, S. D.; SHETTI, N. S.; KULKARNI, R. M.; DODDAMANI, M. R. Electrooxidation of nimesulide at 5% barium-doped zinc oxide nanoparticle modified glassy carbon electrode. J Electroanal Chem. 2016; Journal of Electroanalytical Chemistry 762, 37–42, 2016.

De SOUZA, D.; CODOGNOTO, L.; MALAGUTTI, A. R.; TOLEDO, R. A. PEDROSA, R. T. S.; L, R. T. S.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Voltametria de Onda Quadrada. Segunda Parte: Aplicações. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 790-797, 2004.

De SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S. AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. *Química Nova*, v. 26, n.1, p. 81-89, 2003.

FEDORCHUK, V. A.; PUCHKOVSKAYA, E. S.; ANISIMOVA, L. S.; SLEPCHENKO, G. B. Use of voltammetry for determining antibiotics streptomycin and azitromycin. *Journal of Analytical Chemistry*, v. 60, n. 6, p. 518–522, 2005.

FIORUCCI, A. R.; BENEDETTI-FILHO, E. A importância do oxigênio dissolvido em ecossistemas aquáticos. Química Nova na Escola, nº 22, 10-16, 2005.

FURLANETTO, S.; ORLANDINI, S.; ALDINI, G.; GOTTI, R.; DREASSI, E.; PINZAUTI, S. Designing experiments to optimise and validate the adsorptive stripping voltammetric determination of nimesulide. *Analytica Chimica Acta*. v. 413, p. 229–239, 2000

GAFFNEY, V. J.; ALMEIDA, C. M. M.; RODRIGUES, A.; FERREIRA, E.; BENOLIEL, M. J.; CARDOSO, V. V. Occurrence of fharmaceuticals in a water supply system and related human health risk assessment. *Water Research*, v. 72, p. 199-208. 2015.

GAFFNEY, V. J.; CARDOSO, V. V.; RODRIGUES, A.; FERREIRA, E.; ALMEIDA, C.M. M. Análise de fármacos em águas por SPE/UPLC-ESI-MS/MS. *Química Nova*, v. 37, p. 138-139, 2014.

GROSSER Jr., D. K. Cyclic voltametry: simulation and analysis of reaction mechanisms. New York: [s.n.], 1993. 153 p.

HEBERER, T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. Toxicology Letters, v. 131 (1-2): p.5-17, 2002.

IBGECIDADES.Paraná.2013.Disponívelem:<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/uf.php?lang=&coduf=41&search=parana>.Acessoem:12 ago. 2014.Acesso em:1 Maio 2017

Itaipu Binacional (2012). http://www.itaipu.gov.br/energia/geracao. Accesso 30 Abr 2017.

LIMA, A. B.; CHAVES, S. C.; Da SILVA, L. M.; PEREIRA, P. F.; RICHTER, E. M.; Dos SANTOS, W. T. P. Determinação de nimesulida por análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos. *Quim. Nova*, v. 36, n. 9, p. 1296-1302, 2013.

MEZZELANI, M.; GORBI, S.; DA ROS, Z., FATTORINI, D.; D'ERRICO, G.; MILAN, M.; REGOLI, B. F. Ecotoxicological potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in marine organisms: Bioavailability, biomarkers and natural occurrence in *Mytilus galloprovincialis. Marine Environmental Research.* v. 121, p. 121-131, 2016.

MOTA, S. Preservação e conservação de recursos hídricos. Rio de Janeiro: ABES, 1995.

PANUSA, A., MULTARI, G., INCARNATO, G., GAGLIARDI, L. High-performance liquid chromatography analysis of anti-inflammatory pharmaceuticals with ultraviolet and electrospray-mass spectrometry detection in suspected counterfeit homeopathic medicinal products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; v. 43, n. 4, p. 1221-1227, 2007.

PIETRO, A. C., Desenvolvimento de métodos cromatográficos para o controle de qualidade e para a análise de resíduos em leite bovino de medicamentos veterinários. 241 p. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2008.

PLANO MUNICIPAL DE SANEAMENTO BÁSICO MUNICÍPIO DE SANTA HELENA/PR. Sistema de abastecimento de água potável e esgotamento sanitário, limpeza urbana e manejo de resíduos sólidos, drenagem e manejo das águas pluviais. 1 ed., 2012.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação de métodos cromatogáficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SEMA - Secretaria de Estado e Meio Ambiente e Recursos Hídricos - Paraná (2010) Unidades geográficas de gestão de recursos hídricos http://www.meioambiente.pr.gov.br/arquivos/File/corh/Revista_Bacias_Hidrograficas_do_ Parana.pdf. Accesso 10 Ago 2016.

SILVEIRA, M. A. K.; CALDAS, S. S.; GUILHERME, J. R.; COSTA, P. F.; GUIMARÃES B. S.; CERQUEIRA, M. B. R. CERQUEIRA, M. B.; SOARES, B. M.; PRIMEL, E. G. Quantification of pharmaceuticals and personal care product residues in surface and drinking water samples by SPE and LC-ESI-MS/MS. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 24, p. 1385-1395, 2013.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER F.J.; CROUCH, S.R., Fundamentos de Química Analítica, Tradução da 8a Edição Norte-Americana, Thomson Learning, São Paulo, 2006, 999 p.

SODRÉ, F. F. Especiação do cobre em águas naturais: Influência de fatores associados à urbanização. Tese (Doutorado em ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 165 p., 2005.

TUBIC, B.; IVKOVI, B.; ZECEVI, M.; VLADIMIROV, S. Simulataneous determination of nimesulide and its impurities in pharmaceutical formulations by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Acta Chim. Slov.* 54, 583–590. 2007.

VERLICCHI, P.; AUKIDY, M. A.; ZAMBELLO, E. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment e a review. *Science of Total Environmental*, v. 429, p. 123-155, 2012.

WANG, C.; SHAO, X.; LIU, Q.; Qu, Q.; YANG, G.; HU, X. Differential pulse voltammetric determination of nimesulide in pharmaceutical formulation and human serum at glassy carbon electrode modified by cysteic acid/CNTs based on electrochemical oxidation of L-cysteine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 42, p.237–244, 2006.

WANG, J.; MAHMOUD, J. S. Determination of traces of streptomycin and related antibiotics by adsorptive stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta*, v. 186, p. 31-38, 1986.

WANG, M.; LIAO, L.; ZHANG, X.; LI, Z. Adsorption of low concentration humic acid from water by palygorskite. *Applied Clay Science*, v. 67-68, p. 164-168, 2012.

WING-LEUNG, H.; LING, J.; SI, W.; MIRABELLE, M. P. T.; BINGSHENG, Z.; LIPING, J.; PAK-CHUEN, C.; YIU-KAN, C.; BURKHARDT-MURPHY, M.; KWAN-SING, P. Pharmaceuticals in Tap Water: Human Health Risk Assessment and Proposed Monitoring Framework in China, Environmental Health Perspectives, v. 127, n. 7, p. 839-846, 2013.

CAPÍTULO 4 - ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE FÁRMACOS NO AMBIENTE USANDO SISTEMAS MODELO

As substâncias farmacêuticas e seus metabólitos podem chegar ao ambiente aquático por diversas rotas, sendo a principal o lançamento de esgoto doméstico tratados ou não. Outras possíveis fontes de entrada de fármacos no ambiente são efluentes rurais e de indústria farmacêutica (MELO et al., 2009). Os processos de remoção desses compostos dos corpos d'água pode ocorrer por processos naturais, tais como, a biodegradação, a degradação pela luz, e absorção por organismos ao longo da cadeia alimentar (HODGSON, 2004; ZHAN et al., 2006; MELO et al., 2009).

Neste capítulo, serão abordados estudos sobre o comportamento de alguns fármacos em água sob a influência de radiação solar, radiação ultravioleta, na presença de argila e água sintética usando sistemas modelo. Um sistema modelo pode ser definido como experimentos realizados em condições controladas. Portanto, o objetivo dessa etapa do estudo foi avaliar o comportamento dos fármacos NIM, STP e ALP com radiação ultravioleta e natural (solar). Assim, foi utilizado um experimento que recebeu radiação, enquanto outro foi protegido (o experimento controle) para avaliar o tratamento com radiação teria efeito no processo de degradação dos fármacos.

4.1 Metodologia

4.1.1 Estudos prévios de degradação de NIM, STP e ALP por radiação UV

Para avaliar o comportamento dos fármacos NIM, STP e ALP em meio solução aquosa, com radiação UV, soluções individuais dos fármacos foram irradiadas com lâmpada de vapor de mercúrio (modelo 11E S37, 4 A, 250 V) acoplada à um reator externo (250 W, 220 V, 60 Hz, 1,30 A) em uma câmara escura e fechada. As concentrações das soluções padrão dos fármacos (403,0 μ g_{STP} L⁻¹, 151,1 μ g_{NIM} L⁻¹ e 50,0 μ g_{ALP} L⁻¹) foram preparadas, em balões de 250 mL, e transferidas para recipientes de vidro de 1,5 L sendo um aberto para irradiação e um protegido com papel alumínio para controle (Figura 48).



Figura 48: Experimento de degradação dos fármacos em câmara luz UV em frasco de vidro de 1,5 L, com lâmpada de mercúrio (250 W, 220 V, 60 Hz, 1,30 A).

Alíquotas de 2,0 mL de solução foram coletadas antes e após a irradiação com luz UV, em intervalos definidos para acompanhar a degradação dos fármacos e analisadas por voltametria, em triplicata. Os parâmetros avaliados foram a intensidade de corrente e o perfil voltamétrico do composto nas condições otimizados previamente de cada fármaco. O fármaco STP foi acompanhado com a retirada de alíquotas por 3 horas de irradiação em solução de 403,0 µg L⁻¹, enquanto, NIM foi avaliado por 12 h numa solução de 151 µg L⁻¹.

As análises de ALP foram realizadas utilizando as condições voltamétricos otimizados por Nunes et al. (2015), usando seguintes parâmetros: potencial de acumulação (-0,8 V); tempo de acumulação (120 s); velocidade de varredura (25 mV s⁻¹); amplitude de pulso (80 mV); tempo de pulso (40 ms). O período de radiação da solução de ALP nesse estudo foi de 18 h.

Como no interior da câmara de radiação UV há aumento da temperatura foi avaliado se este fator interfere no processo de degradação do fármaco. Desta maneira, uma solução de 151,1 μ g L⁻¹ de NIM foi colocada em agitador *shaker* com temperatura controlada a 40 °C e retiradas alíquotas para medidas com 4 e 6 h de exposição ao calor, na ausência de luz.

4.1.2 Estudo de interferência entre os fármacos NIM, STP e ALP

Para avaliar a possibilidade de estudos simultâneos de degradação dos fármacos NIM, STP e ALP por irradiação, abordados neste trabalho foi avaliado o efeito de interferência entre os mesmos a partir de medidas voltamétricas (Tabela 16). Na 2ª coluna da Tabela 16 encontram-se as concentrações do fármaco avaliado, em seguida, na 3ª coluna as concentrações do fármaco interferente.

Fármaco	Concentração do	Concentração dos interferentes
avaliado	fármaco (µg L ⁻¹)	(µg L ⁻¹)
NIM	10,2	STP (21,4) e ALP (10,0)
STP	21,4	NIM (10,3) e ALP (10,0)
ALP	10,0	STP (21,4) e NIM (10,2)

Tabela 16: Estudo de interferência entre os fármacos NIM, STP e ALP durante as medidas voltamétricas de NIM, STP e ALP.

4.1.3 Estudo do comportamento dos fármacos em água sintética e na presença de matéria orgânica

Um estudo para avaliar o comportamento dos fármacos NIM e ALP foi realizado em água sintética. A água sintética foi preparada para simular uma matriz mais próxima de uma água natural seguindo as proporções de metais, EDTA e ácido húmico, conforme Campbell (1995), 1 L de água sintética foi preparada de acordo com as concentrações indicadas na Tabela 17.

Composição	Concentração (mg L ⁻¹)		
Cd^{+2}	0,0015		
Cu ⁺²	0,0040		
Fe ⁺²	0,025		
Pb ⁺³	0,0030		
Zn^{+2}	0,0020		
Cl-	7,6		
CO3 ⁻²	5,4		
SO4 ⁻²	11,0		
Ca ⁺²	35,0		
Mg ⁺²	4,0		
Na ⁺	5,4		
K^+	8,4		
EDTA	1,5		
Ácido húmico (COD)*	0,25		

Tabela 17: Composição da amostra sintética de água natural utilizada nos estudos do comportamento de fármacos por irradicação UV.

*COD: Carbono orgânico dissolvido considerando presente em 35% no ácido húmico (AH).

O perfil voltamétrico dos fármacos foram avaliados em amostras de água sintética e também na presença de 0,50 mg L^{-1} de argila (Argel), EDTA e HA. Em balões de 25 mL foi

adicionado água sintética e em seguida os fármacos NIM + ALP (1); NIM + ALP + EDTA (2); NIM + ALP + COD (3); NIM + ALP + Argila, nas concentrações dadas na Tabela 18. As misturas foram transferidas para béqueres de 50 mL protegidos da luz com papel alumínio e deixadas em repouso por 24 h. Após esse período foram retiradas alíquotas de 100 μ L para análise. A mistura contendo argila foi centrifugada por 30 min antes da retirada da alíquota.

1	2	3	4
NIM (30,0 µg L ⁻¹)	NIM + EDTA	NIM + COD $(0,25 \text{ mg L}^{-1})$	NIM + Argila
	$(1,5 \text{ mg } \text{L}^{-1})$		$(0,50 \text{ mg } \text{L}^{-1})$
ALP (10,0 µg L ⁻¹)	ALP + EDTA	$ALP + COD (0,25 \text{ mg } L^{-1})$	ALP + Argila
	$(1,5 \text{ mg } \text{L}^{-1})$		$(0,50 \text{ mg } \text{L}^{-1})$

Tabela 18: Avaliação de NIM e ALP em água sintética na presença de EDTA, COD e argila.

4.1.4 Estudo simultâneo de degradação de NIM e ALP com radiação solar

A avaliação simultânea do comportamento de NIM e ALP em solução aquosa (água sintética), com luz natural foi realizada entre janeiro a março de 2016, período de verão com temperaturas variando entre 18 e 31 °C em Guarapuava-PR (25°23'03.8"S 51°29'16.0"W), com altas taxas de precipitação e índice de radiação UV em níveis elevados (CLIMATEMPO, 2016). Com o tempo nublado ou chovendo os frascos contendo as soluções dos fármacos foram mantidos sob refrigeração, conforme também descreve Hemmateenejad et al. (2008).

O ALP (1,0 mg L⁻¹), NIM (3,02 mg L⁻¹) e água sintética foram misturados em balão de 250 mL. A solução dos fármacos foi transferida para o recipiente de vidro (sem tampa) e exposto à luz solar. O recipiente contendo a amostra controle foi protegido da luz com dupla camada de papel alumínio. Em dias de maior incidência solar a amostra e o controle eram expostos ao sol entre as 10 e 16 h. Após às 16 h, a amostra e o controle eram guardados em refrigerador. Antes da coleta das alíquotas de 100 μ L de cada recipiente, o volume evaporado dos frascos era completado com água sintética até 250 mL e a solução homogeneizada. As alíquotas da amostra e controle em cada intervalo foram transferidas para a cela voltamétrica com os respectivos eletrólitos, KCl 1,0 mol L⁻¹ para NIM e tampão fosfato para ALP. As medidas da corrente e o perfil dos voltamogramas foram os parâmetros utilizados ao avaliar a fotodegradação. Na cela voltamétrica as concentrações de NIM e ALP foram inicialmente 30,15 e 10,0 μg L⁻¹, respectivamente.

4.1.5 Estudo simultâneo de degradação de NIM e ALP com radiação UV

Um estudo similar ao descrito anteriormente (item 4.1.4) foi realizado com lâmpada UV, com as concentrações 3,02 mg L⁻¹ de NIM e 1,0 mg L⁻¹ de ALP. Além dos componentes da água sintética apresentados na Tabela 17, foi adicionado argila (Argel) a fim de observar o comportamento dos fármacos na presença de material particulado em suspensão. Nesse caso, como foi utilizado luz artificial, assim não foi necessário interromper o experimento por longos períodos, somente o tempo necessário para retirada da alíquota para análise.

4.2 Resultados e Discussão

4.2.1 Estudo do comportamento de STP com radiação UV

O comportamento da molécula de STP irradiado com lâmpada UV foi avaliado conforme mostrou a Figura 49. O período de radiação foi avaliado foi de 15 a 180 min e a resposta voltamétrica comparada com o voltamograma no T₀ na concentração de 80,5 μ g L⁻¹ de STP, a partir de uma alíquota de 2 mL da solução. Para a solução controle protegida com papel alumínio foram retiradas alíquotas nos mesmos intervalos da aplicados para a amostra irradiada e a resposta de corrente média foi de 166 ± 10 nA e o potencial de pico se manteve em -1,62 ± 0,01 V.



Figura 49: Voltamogramas de onda quadrada de 80,5 μ g L⁻¹ de STP no T₀ e, em intervalos de radiação-UV (15 a 180 min). Com correção da linha base.

Os voltamogramas do estudo de STP com radiação UV na Figura 49 mostra o deslocamento de potencial do fármaco de -1,63 V para -1,66 V e o alargamento dos picos voltamétricos a partir de 15 min de irradiação UV. Observou-se que com 120 min a formouse um segundo pico em -1,77 V, sugerindo a formação de produtos de degradação. No entanto, após 180 min, não foi observado pico voltamétrico, indicando a degradação do STP, ou a diminuição da resposta para níveis não detectados pelo método proposto.

Palmisano et al. (2015), avaliaram a foto-estabilidade à radiação UV para os antibióticos amoxilina, streptomicina, eritromicina e ciprofloxina, com detecção por HPLC comparando a fotólise (sem catalisador) e foto-catálise, usando o catalisador TiO₂. A diferença de eficiência da fotólise e fotocatálise para STP foi de 63% para 99,9%, com 60 min de irradiação. Pode-se observar que mesmo sem catalisador o fármaco STP apresentou alta taxa de degradação. Para STP não foi encontrado na literatura quais seriam os possíveis produtos formados no processo de degradação resultantes da fotodegradação.

4.2.2 Estudo do comportamento de NIM com radiação UV

Nesse estudo foi avaliado a degradação de NIM com radiação UV com a retirada de alíquotas de 2,0 mL de solução padrão de NIM 30,0 μ g L⁻¹ na alíquota. As alíquotas de solução irradiada foram coletadas de 4 até 12 h e a resposta encontra-se na Figura 50 A e B. Para o experimento controle (solução não irradiada) foram retiradas alíquotas no mesmo intervalo da solução irradiada e a resposta I_p foi 6,2 ± 0,7 nA, no potencial -0,506 ± 0,003 V. Conforme observado a lâmpada UV aquece o interior da câmara de irradiação, assim o efeito da temperatura foi avaliado numa solução 30,0 μ g L⁻¹ de NIM nas alíquotas utilizando um equipamento *shaker* com temperatura controlada a 40° C, com a solução protegida da luz, retirou-se uma alíquota em 0; 4 e 6 h de aquecimento (Figura 50-C), e verificou-se que o aumento de temperatura não modificou a resposta voltamétrica, indicando que não houve degradação.



Figura 50: A) Voltamogramas de pulso diferencial para 30,0 μ g L⁻¹ de NIM (T₀ até 12 h com radiação-UV). **B**) Correlação corrente *vs* tempo de degradação. **C**) Correlação I_p *vs* tempo, com aquecimento à 40 °C por 6 h.

A reposta na Figura 50-A mostra a diminuição na resposta voltamétrica de NIM e a mudança no perfil voltamétrico, após 12 h de radiação o pico caraterístico de NIM desapareceu sugerindo a degradação ou a formação de possíveis produtos de degradação. Na literatura são encontrados como possíveis produtos de degradação de NIM o ácido metanossulfônico e 2-fenoxi-4-nitroanilina (HEMMATEENEJAD et al. 2008), os quais serão abordados mais detalhadamente no item 4.2.6 (degradação simultânea de NIM e ALP com radiação solar). Na Figura 50-C, a resposta voltamétrica da amostra aquecida até 40 °C, mostrou que não houve alteração do perfil voltamétrico, indicando que não ocorreram processos de degradação de NIM, na ausência de radiação. De acordo com Gálvez et al. (2001) a temperatura não influencia significativamente a velocidade de reações iniciadas com absorção de fótons.

4.2.3 Estudo do comportamento de ALP com radiação UV

A persistência do fármaco ALP em meio aquoso foi previamente avaliada com radiação-UV retirando-se alíquotas de 2 mL contendo 10,0 μ g L⁻¹ de ALP (no T₀). A Figura 51 mostra os voltamogramas de ALP e a resposta de corrente de pico do ALP em função do tempo de radiação por 18 h.



Figura 51: A) Voltamogramas de pulso diferencial para amostra 10,0 µg L⁻¹ de ALP (0 a 18 h) com radiação-UV. **B**) I_p *vs* tempo na amostra irradiada.

A queda do sinal voltamétrico de ALP foi verificada até o desaparecimento do sinal voltamétrico no potencial -0.87 ± 0.01 V com 18 h de exposição à luz UV. No frasco não irradiado a resposta I_p de ALP nas alíquotas foi 10 ± 0.6 nA, indicando que não houve degradação do fármaco nessa condição.

Os testes de fotodegradação mostraram que quanto mais tempo de exposição à radiação maior a quantidade de solvente (H₂O) evaporada, diminuindo significativamente o volume de solução aquosa do fármaco. Também foi verificado que a retirada de 2,0 mL a cada alíquota para as medidas era um volume elevado. Assim, nos estudos posteriores foi necessário aumentar a concentração dos fármacos e retirar alíquotas de 100 μ L. Além disso, antes da coleta de alíquotas para análise o volume de solvente evaporado era reposto e a solução homogeneizada, para evitar o efeito de pré-concentração do analito por evaporação. Com os resultados das análises prévias de NIM, ALP e STP por radiação UV verificou-se que NIM e ALP foram mais resistentes.

4.2.4 Estudo do efeito de interferência de NIM e ALP em água sintética e na presença de matéria orgânica

A solução de água sintética foi preparada para uso como uma matriz simulando uma água natural, esta é composta diversos metais. Também foi avaliado neste meio o possível efeito de interferência com de EDTA e substâncias húmicas. Além disso, foi avaliado o efeito da adição de argila na solução contendo os fármacos NIM e ALP. A Figura 52-A mostra os voltamogramas de NIM antes e após as adições de argila, EDTA e COD, respectivamente. A resposta I_p encontra-se na Figura 52-B para seguintes situações ou experimentos numerados

de 1 a 4, de acordo com sua composição: NIM (1); NIM + Argila (2); NIM + EDTA (3) e NIM + COD (4).



Figura 52: A) Voltamogramas de pulso diferencial para 30,0 μ g L⁻¹ de NIM. B) Corrente de pico em função do nº de experimento (1 ao 4).

Os voltamogramas na Figura 52-A mostram um deslocamento no potencial de pico de NIM de -0,50 para -0,48 V e, um alargamento do pico com a adição de 0,25 mg L^{-1} de COD, comportamento também verificado na validação do método. Entretanto, com variação pequena na intensidade de corrente (Figura 52-B). Essa análise mostrou uma baixa interação de NIM com particulado (argila), indicando que o fármaco permaneceu na fase aquosa.

Os mesmos experimentos de 1 a 4 descritos para NIM foram aplicados ao ALP para verificar a interação deste com os componentes presentes na água sintética de acordo com a Figura 53.



Figura 53: A) Voltamogramas de pulso diferencial para 10,14 μ g L⁻¹ de ALP. **B**) Relação entre intensidade de corrente de pico do ALP na presença de argila, EDTA e COD em função do nº do experimento (1 ao 4).

Os voltamogramas de ALP em diferentes meios (Figura 53-A) indicaram a queda na corrente do ALP nos diferentes meios avaliados, especialmente com adição da argila, indicando a possibilidade da interação do fármaco com o material particulado em suspensão e com os agentes complexantes. Desta forma, sugere-se que o ALP não esteja completamente na fase aquosa em um ambiente aquático. A tendência do fármaco a ficar no sedimento ou na fase diluída indica uma característica de cada classe e do caráter ácido/ básico dos mesmos. Buser et al. (1998) avaliou a degradação de um fármaco não esteroidal, o diclofenaco, em água superficial relatando que este se encontra principalmente na fase dissolvida.

O estudo cujos resultados foram discutidos anteriormente foi conduzido na ausência de luz, com o objetivo de avaliar interação dos fármacos com os componentes da matriz. No entanto, a literatura aborda que este podem interferir nos processos de degradação. Em um estudo de fotodegradação de fármacos benzodiazepínicos realizado por Calisto et al. (2011), utilizando HA, ácido fúlvico e XAD4 verificaram que o HA influenciou na diminuição da taxa de fotodegradação, enquanto que o ácido fúlvico e o XAD4 potencializaram a degradação dos fármacos. No entanto, a razão para a diferença não ficou totalmente claro segundo os autores. Kümmerer et al. (1997), em estudos de biodegrabilidade do agente antitumoral ifosfamida em esgoto hospitalar verificaram que não ocorreu biodegradação e nem adsorção do fármaco no lodo do esgoto, pois os teores encontrados antes e após o processo foram da mesma ordem de grandeza.

4.2.5 Estudo de interferência entre os fármacos NIM, STP e ALP

As condições voltamétricas para análise de STP, NIM e ALP são distintas. Apesar disso, foi realizado um estudo para avaliar a possibilidade de estudos simultâneos de degradação utilizando radiação, ou mesmo verificar se haveria interferência entre eles caso estivessem presentes em uma mesma amostra. A Tabela 19 mostra a corrente média no potencial de STP, NIM e ALP nas condições voltamétricas otimizadas para os mesmos, seguida da resposta após adição simultânea dos outros dois fármacos. As concentrações adicionadas de NIM, STP e ALP foram de 10,2; 21,4 e 10,0 µg L⁻¹, respectivamente.

NIM		STP		ALP	
I_p (NIM)	I _p adição de interferentes (STP e ALP)	I_p (STP)	I _p adição de interferentes (NIM e ALP)	I _p (ALP)	<i>I_p</i> adição de interferentes (NIM e STP)
$1,54 \pm 0,025$	$1,46 \pm 0,054$	155,2 ± 3,98	116 ± 4,57	$3,55 \pm 0,1$	$3,59 \pm 0,03$

Tabela 19: Resposta de corrente em nA para os fármacos NIM, STP e ALP no estudo de interferência.

As respostas I_p na Tabela 19 indicam que os fármacos NIM e ALP interferem entre si, permitindo as análises de degradação em experimentos simultâneos. Por outro lado, para STP a corrente diminui drasticamente com a adição de NIM e ALP, mostrando elevado efeito de interferência. Além disso, o estudo prévio com radiação UV mostrou a rápida degradação deste fármaco, assim apenas NIM e ALP foram avaliados nos estudos posteriores.

4.2.6 Estudo de degradação simultânea de NIM e ALP com radiação solar

Uma solução preparada em água sintética com adição de 1,0 mg L^{-1} de ALP e 3,02 mg L^{-1} de NIM em balão de 250 mL foi transferida para o recipiente de vidro aberto e exposto à luz solar. Para controle uma solução nas mesmas concentrações foi preparada e transferida para um recipiente fechado e protegido da luz.

A Figura 54 apresenta o perfil dos voltamogramas da resposta de NIM, inicialmente a corrente foi de $4,8 \pm 0,4$, após 4 h de exposição à luz solar diminuiu para $3,570 \pm 0,002$. Após 12 h de exposição à radiação solar o perfil voltamétrico diminuição da corrente e mudança no perfil voltamétrico. Após 16 h de exposição verificou-se o deslocamento do pico para potenciais menos negativos (Figura 54-A). A reposta de NIM foi acompanhada até 28 h de radiação solar, após 10 dias de experimento mantendo as soluções sob refrigeração em dias nublados ou chuvosos. Simultaneamente no intervalo de 0 a 28 h foi investigado a resposta da solução controle na Figura 54-B a partir da corrente em função do tempo se observa baixas variações entre as réplicas indicando que não ocorreu degradação de NIM no experimento controle nesse período.



Figura 54: A) voltamogramas de NIM (amostra sintética) com radiação solar. B) I_p vs tempo no experimento controle.

Ao término do experimento de degradação foi observado que a solução irradiada mudou de amarelo, a coloração característica das soluções aquosas de NIM para incolor, evidenciado a fotodegradação do composto (Figura 55).



Figura 55: Solução de NIM irradiada com luz natural solar e solução controle.

Hemmateenejad et al. (2008) avaliaram os produtos de degradação da NIM em solução metanólica usando luz solar. Os autores indicaram como principais produtos de degradação, o ácido metanossulfónico (produto gerado a partir da hidrólise do grupo metil sulfonamida) e o 2-fenoxi-4-nitroanilina em uma 2^a etapa por duas possíveis rotas (1) oxidação do NH₂ para NO₂, ou (2) quebra da ligação C-O formando os compostos 4nitroanilina e fenol (Figura 56). Estes produtos de degradação haviam sido propostos previamente por Kovaríková et al. (2003) em um estudo da foto-estabilidade de NIM usando cromatografia (líquida e de camada delgada) para fins de controle de qualidade.



Figura 56: Esquema dos possíveis produtos de degradação de NIM por irradiação com luz solar. Adaptado de Hemmateenejad et al., 2008.

Conforme anteriormente abordado esse estudo foi realizado simultaneamente para NIM e ALP (etapa da degradação) retirando-se uma alíquota para análise de cada fármaco até 28 h. A Figura 57 apresenta os voltamogramas da resposta para amostra irradiada com luz solar e do experimento controle até 100 h de exposição.

A resposta de ALP foi diminuindo até o desaparecimento do sinal característico do fármaco, similar a resposta observada com radiação UV. Com base no exposto se verifica que a degradação do fármaco, ou a formação de produtos de degradação que não respondem nas mesmas condições voltamétricas do ALP. Esse estudo foi realizado em um período o qual foi acompanhado por 52 dias, somando ao longo do processo 100 h de exposição do experimento à luz solar.



Figura 57: Voltamogramas amostra de ALP irradiada com radiação solar (0 a 100 h). Com correção da linha base.

Calisto et al. (2011) avaliaram a degradação de quatro benzodiazepínicos (oxazepam, diazepam, lorazepan e alprazolam) em experimentos separados simulando a radiação solar em soluções aquosas de 10 mg L⁻¹ do fármaco, sob condições controladas com adição de matéria orgânica. Entre os fármacos avaliados eles observaram uma rápida degradação de lorazepam, com tempo de meia vida menor que um dia de sol de verão. Enquanto, oxazepam, diazepam e alprazolam se mostraram mais resistentes à fotodegradação, com tempos de meia vida de 4, 7 e 228 dias, respectivamente, sugerindo que o processo de eliminação de ALP do ambiente aquático pode levar meses. Como produto da fotodegradação de ALP, Calisto et al. (2011) usando espectrometria de massa (ESI-MS) identificaram dois foto-produtos, ALP-I [297 + H]⁺ e ALP-II [299 + H]⁺ resultantes da abertura do anel de sete membros acompanhado da oxidação para uma cetona ou álcool (Figura 58).



Figura 58: Estrutura do benzodiazepínico alprazolam e produtos de degradação. Adaptado de Calisto et al. (2011).

4.2.7 Estudo de degradação simultânea de NIM e ALP com radiação UV

A resposta de NIM em água sintética e com adição de argila são apresentadas na Figura 59. A concentração de NIM na alíquota inicial foi de 30,1 μ g L⁻¹. A relação I_p em função do tempo na Figura 59-B refere-se ao controle, não exposto à luz.



Figura 59: A) voltamogramas amostra de NIM (30,08 μ g L⁻¹), em água sintética + argila, irradiada com radiação UV (com correção da linha base). **B**) Corrente de pico *vs* tempo de irradiação no experimento controle.

O perfil dos voltamogramas na Figura 59-A foi similar ao obtido no estudo prévio com radiação UV (Figura 59-A) mostrando o desaparecimento do pico característico de NIM. Para a retirada de 100 μ L ao invés de 2 mL nesta análise 3,02 mg L⁻¹ de NIM foi colocado para degradar, bem superior em relação ao estudo prévio, no qual utilizou-se 150,0 μ L⁻¹. Observou-se que o tempo de degradação de NIM aumentou de 12 para 125 h, mostrando que a eficiência de remoção é diretamente proporcional à concentração do fármaco.

A resposta de ALP na Figura 60-A mostra a queda na resposta I_p até a não detecção de ALP no potencial -0,87 ± 0,01 V após 212 h de radiação UV. As análises do experimento controle para ALP (Figura 60-C) mostram variações na corrente entre as alíquotas sugerindo a possibilidade de interações do fármaco com o material particulado (argila), conforme observado, por exemplo, na resposta de 99 h de radiação, no qual a alíquota foi retirada com a mistura em repouso (5,35 ± 0,66 nA), em seguida a mistura foi agitada e retirou-se uma nova alíquota (9,0 ± 0,37 nA).



Figura 60: A) voltamogramas de ALP para a amostra irradiada com luz UV (0 a 212 h) e **B**) I_p *vs* tempo para a amostra irradiada com luz UV. C) I_p *vs* tempo para o controle com luz UV (0 a 212 h).

Nos resultados dos experimentos abordados anteriormente para NIM e ALP, observou-se que a medida que a concentração do fármaco aumentou e adicionou-se outros componentes à mistura, o tempo necessário para a degradação também aumentou. Nos processos de degradação a intensidade da luz da fonte de irradiação é de extrema importância, porque em geral a fotodegradação das moléculas ocorre pela oxidação ou quebra de ligações, em ambos os processos há energia envolvida, em comprimentos de onda específicos, então quanto maior a intensidade da luz maior a velocidade de degradação (HEMMATEENEJAD et al., 2008).

Com base nos estudos de degradação foi possível constatar que a persistência dos três fármacos é distinta, no qual se verificou que o benzodiazepínico ALP foi mais persistente que o anti-inflamatório NIM, e o que degradou mais rápido foi o STP. Conforme abordado por Calisto et al. (2011) dentro de uma mesma classe de fármacos o tempo de degradação pode ser distinto. Os autores mostraram o tempo de meia vida dos BDZs variaram de 1 a 228 dias, sendo que o ALP foi o mais persistente. No ambiente aquático há outros fatores que também interferem na degradação e na persistência dos fármacos que não foram abordados aqui no ambiente simulado.

4.3 Referências

BUSER H.R., POIGER T., MÜLLER, M.D. Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a lake. *Environ. Sci. Technol.*, v.32, p.3449-3456, 1998.

CALISTO, V. M.; ROSARIO M.; DOMINGUES, R. M.; ESTEVES, V. I. Photodegradation of psychiatric pharmaceuticals in aquatic environments e cinetics and photodegradation products. *Water Research*, v.45, p. 6097-6106, 2011.

CAMPBELL, P. G. C. Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the free ion activity model. In: Metal speciation and bioavailability in aquatic systems,

CLIMATEMPO - www.climatempo.com.br/previsao-do-tempo/273/guarapuava-pr. Acesso em: 16.01.2016.

GÁLVEZ, J. B.; RODRÍGUEZ, S. M.; GASCA, C. A. E.; BANDALA, E. R.; GELOVER, S.; LEAL, T. Purificación de aguas por fotocatálisis heterogénea: estado del arte. Parte 1. In: CYTED. Eliminación de contaminantes por catálise heterogénea, 2001.

HEMMATEENEJAD, B.; JAVIDNIAB, K.; SAEIDI-BOROUJENI, M. Spectrophotometric monitoring of nimesulide photodegradation by a combined hard–soft multivariate curve resolution-alternative least square method. J. Pharm Biomed Anal. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008; 47: 625–630.

HODGSON, E. Em A Textbook of Modern Toxicology; 3rd ed., John Wiley & Sons: New Jersey, cap. 1, p. 557, 2004.

KOVARÍKOVÁ, P.; MOKRÝ, M.; KLIMES J. Photochemical stability of nimesulide. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 31, 827-832, 2003.

KÜMMERER, K.; STEGER-HARTMANN, T.; MEYER, M. Biodegradability of the antitumour agent ifosfamide and its occurrence in hospital effluents and communal sewage. *Water Research*, v.31, p.2705-2710, 1997.

MELO, S. A. S.; TROVÓ, A. G.; BAUTITZ, I. R.; NOGUEIRA, R. F. P. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. *Química Nova*, v. 32, n. 1, p. 188-197, 2009.

NUNES, C. N.; PAULUK, L. E.; Dos ANJOS. V. E.; LOPES, M. C.; QUINÁIA, S. P. New approach to the determination of contaminants of emerging concern in natural water: study of alprazolam employing adsorptive cathodic voltammetry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 407, p. 6171-6179, 2015.

PALMISANO, R.; CAMPANELLA, L.; AMBROSETTI, B. Photo-degradation of amoxicillin, Streptomycin, erythromycin and ciprofloxacin by UV and UV/TiO2. Processes. Evaluation of Toxicity Changes Using a Respirometric Biosensor. *Journal of Environmental Analytical Chemistry*, v. 2: p. 1-5, 2015.

ZHAN, M.; YANG, X.; XIAN, Q.; KONG, L. Photosensitized degradation of bisphenol A involving reactive oxygen species in the presence of humic substances. v. 63, n. 3, p. 378-386, 2006.

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÃO

A importância da quantificação de compostos farmacêuticos em matrizes ambientais especialmente em águas naturais justifica-se na possível ação destas substâncias aos organismos aquáticos, sendo considerados potenciais causadores de desequilíbrio e mutações.

A otimização e validação dos parâmetros voltamétricos foram importantes etapas na obtenção de um método sensível e seletivo em relação aos fármacos avaliados. Além disso, foi possível realizar análises diretas, sem necessidade de etapas de clean-up e uso de colunas de pré-concentração do analito nas amostras. A possibilidade de pré-concentrar o analito, permite utilizar a voltametria na detectecção de analitos em concentrações da ordem de μ g L⁻¹ ou até mesmo ng L⁻¹, utilizando-se a voltametria. Também, quando se utilizam eletrodos sólidos na quantificação de moléculas orgânicas, estas podem adsorver-se na superfície eletródica dificultando a reprodutibilidade das medidas. Este fato, mostra as vantagens do uso do eletrodo de mercúrio em modo HMDE, para o qual uma nova superfície eletródica é obtida a cada medida, sem a necessidade de polimento do eletrodo para a limpeza, como nos eletrodos sólidos.

Com os métodos voltamétricos propostos e otimizados foi possível aplicá-los na quantificação de NIM e STP em amostras de interesse de forma rápida e de menor custo, em relação às técnicas cromatográficas, em geral empregadas em análises de fármacos. Em relação aos limites de detecção e quantificação o método mostrou-se sensível, considerandose o tempo de pré-concentração relativamente baixos comparado com outros métodos reportados na literatura utilizando-se a voltametria, mostrando a viablilidade do emprego desta técnica.

Mediante os resultados apresentrados e discutidos os métodos mostraram-se adequados na determinação de NIM e STP com o uso de curvas de adição de padrão em amostras reais, permitindo avaliar os ambientes aquáticos para detecção de possíveis fontes de poluição antrópicas.

Os resultados do estudo de fotodegradação de NIM, STP e ALP foram interessantes do ponto de vista ambiental, pois indicaram que há diversos fatores que interferem nos processos de remoção de fármacos e seus resíduos no ambiente aquático. Também foi possível verificar que o antibiótico STP degrada mais rapidamente, quando se compara sua persistência com NIM e ALP, os outros dois fármacos avaliados. Do ponto de vista ambiental este é um ponto positivo, pois se considera que STP tem elevada toxicidade aos seres humanos e outros animais, além da possibilidade de alguns antibióticos causarem resistência em microrganismos quando usados sem um devido controle.