

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

JÚLIO CÉSAR

**AVALIAÇÃO E MONITORAMENTO DOS SUBPRODUTOS DA
FOTODEGRADAÇÃO DE FÁRMACOS E DISRUPTORES ENDÓCRINOS EM
MEIO AQUOSO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA
RESOLUÇÃO.**

Belo Horizonte

2014

UFMG/ICEx/DQ. 1022^a

T. 467^a

JÚLIO CÉSAR

**AVALIAÇÃO E MONITORAMENTO DOS SUBPRODUTOS DA
FOTODEGRADAÇÃO DE FÁRMACOS E DISRUPTORES ENDÓCRINOS EM
MEIO AQUOSO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA
RESOLUÇÃO.**

Tese apresentada no
Departamento de Química
do Instituto de Ciências
Exatas da Universidade
Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para
a obtenção do grau de
Doutor – Ciências Químicas.

Belo Horizonte

2014

SILVA, Julio Cesar Cardoso da
Avaliação e monitoramento dos subprodutos da
fotodegradação de fármacos e disruptores endócrinos em
meio aquoso por espectrometria de massas de alta
resolução [manuscrito] / Julio Cesar Cardoso da Silva.
2014.

128p.: il.

S5861

2014

T

Orientador: Rodinei Augusti

Co-orientador: Robson José De Cássia Franco Afonso

Tese (doutorado) - UFMG/ICEx/Depto Química

1. Fotocatálise - Teses 2. Espectrometria - Teses
3. Fotometria - Teses I. Augusti, Rodnei,
Orientador II. Afonso, Robson José De Cássia Franco,



"Avaliação e Monitoramento dos Subprodutos da Fotodegradação de Fármacos e Disruptores Endócrinos em Meio Aquoso por Espectrometria de Massas de Alta Resolução"

Júlio César Cardoso da Silva

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Rodinei Augusti - Orientador
UFMG

Prof. Robson José de Cassia Franco Afonso - Coorientador
UFOP

Profa. Raquel Fernandes Pupo Nogueira
UNESP

Profa. Maria Cristina Canela Gazotti
Universidade Estadual do Norte Fluminens

Profa. Zenilda de Lourdes Cardeal
UFMG

Profa. Clésia Cristina Nascentes
UFMG

Belo Horizonte, 07 de julho de 2014.

“No meio de qualquer dificuldade encontra-se a oportunidade.”

Albert Einstein

Agradecimentos

À Deus pela Luz, Vida e Força em mais essa caminhada.

Ao Professor Rodinei Augusti pela oportunidade, orientação, ensinamentos e amizade.

Ao Professor Robson Afonso pela cooperação, estímulo e amizade.

Ao Professor Sérgio pela contribuição, disponibilidade e amizade.

Aos meus pais José Francisco da Silva e Maria de Fátima, e meus irmãos Fernando e Maria Gabriela, pelo incentivo e ajuda.

À Amanda, pela compreensão, paciência e apoio incondicional.

Aos companheiros dos Laboratórios 167, 171 e 191, Bruna, Fabrício, Helvécio, Isabela, Janaína, Júnia, Marcio, Marcos, Maria José e Miriany. Obrigado pela convivência, aprendizagem e amizade.

Às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

À todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

RESUMO

A ocorrência de contaminantes orgânicos no ambiente tem se tornado um assunto de interesse nos últimos anos. Dentre os diversos grupos que compõem essa classe de contaminantes, há uma preocupação em especial com a classe dos fármacos. Deste modo, o objetivo deste trabalho é identificar e monitorar os subprodutos recalcitrantes da degradação de fármacos de diferentes classes terapêuticas (ibuprofeno, bezafibrato, diclofenaco, sulfametoxazole, etinilestradiol), incluindo o disruptor endócrino bisfenol A, em meio aquoso, utilizando dois métodos distintos: fotólise direta (empregando a radiação UV-C e UV-A) e fotocatalise (utilizando os sistemas UV-C/TiO₂ e UV-A/TiO₂). A primeira etapa do trabalho consistiu em avaliar a eficiência destes procedimentos na degradação destes fármacos. Assim, alíquotas foram coletadas entre 0 e 120 minutos e analisadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (LC-HRMS) para avaliar a eficiência de remoção. A avaliação da eficiência de degradação foi realizada por análises de carbono orgânico total (COT). Em uma segunda etapa do trabalho, as mesmas alíquotas foram analisadas por inserção direta no espectrômetro de massas para identificação dos subprodutos resultantes. As análises foram realizadas nos modos positivo e negativo de ionização por electrospray. Na terceira etapa do trabalho foram realizados testes de ecotoxicidade utilizando *Artemia Salina*. Os ensaios com cada alíquota foram realizados em triplicata para estimar a toxicidade dos subprodutos de fotodegradação. Com relação aos resultados, observou-se que os sistemas UV-C, UV-C-TiO₂ e UV-A-TiO₂ foram eficientes na remoção dos compostos, com exceção, do hormônio etinilestradiol que se mostrou mais recalcitrante. Apesar das altas taxas de remoção, as taxas de degradação foram menores, demonstrando a formação e persistência dos subprodutos gerados nos sistemas de degradação. Com tais resultados foi possível gerar um perfil de comportamento destes subprodutos em função do tempo de exposição aos sistemas de degradação. Os testes de ecotoxicidade demonstraram que alguns subprodutos persistentes apresentaram um maior grau de toxicidade em relação aos compostos originais.

Palavras-Chave: Fármacos, fotólise, fotocatalise, espectrometria de massas de alta resolução, caracterização de subprodutos, testes de ecotoxicidade.

ABSTRACT

The occurrence of organic contaminants in the environment has become a subject of interest in recent years. Among the many classes of compounds that comprise this large group, drugs have received particular concern. The objective of the present study is therefore to identify and monitor recalcitrant by-products resulting from the degradation of several drugs from different therapeutic classes (ibuprofen, bezafibrate, diclofenac, sulfamethoxazole, ethinylestradiol, and the endocrine disruptor bisphenol A) in aqueous medium. Two distinct processes, direct photolysis (employing UV-A and UV-C radiations) and photocatalysis (using the TiO₂/UV-A and TiO₂/UV-C systems), were investigated herein. The first step of the present work consisted of the evaluation of the effectiveness of these procedures in the degradation of the selected drugs. Hence, aliquots were collected directly from the reaction vessel after assorted exposure times (from 0 to 120 minutes) and analyzed by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) to evaluate the removal efficiency. To evaluate the degradation efficiency, total organic carbon (TOC) measurements were also performed. In a second stage, the same aliquots were analyzed by direct infusion mass spectrometry aiming at identifying resulting by-products. The analyses were conducted by electrospray ionization in the positive and negative modes. Ecotoxicity tests using brine shrimp (*Artemia Salina*) were also conducted with each aliquot collected. These assays were carried out in triplicate to estimate the toxicity of the by-products. The experimental results showed that the UV-C, UV/C-TiO₂ and UV/A-TiO₂ systems were efficient in removing all compounds, excepting ethinylestradiol, the most recalcitrant of them. Despite the high removal rates, degradation rates were lower, indicating the formation and persistence of degradation products generated under these conditions. The behavior of each by-product as a function of exposure time to the degradation systems was also appraised. Finally, the tests against *Artemia Salina* demonstrated that some recalcitrant by-products possess higher toxicity than the primary precursor.

Keywords: Drugs, photolysis, photocatalysis, high-resolution mass spectrometry, characterization of by-products, ecotoxicity tests.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1- Rotas de exposição de fármacos no ambiente (adaptado [4]).....	6
Figura 2.2- Publicações sobre contaminação de fármacos no meio ambiente desde a última década (fonte: Advanced Research in Science Direct, data: 31-01-2014, palavras-chave usadas: occurrence/pharmaceuticals/wastewater – surfacewater – groundwater) .	7
Figura 2.3- Classes terapêuticas de fármacos detectadas no meio ambiente expressas em porcentagem (adaptado [3]).....	8
Figura 2.4- Taxa de remoção média para diferentes classes terapêuticas (adaptado [22])	11
Figura 2.5- Mecanismo simplificado para a fotoativação de um semicondutor, Fonte: Suriet.al. [26].	13
Figura 2.6- Publicações referentes à fotodegradação de fármacos em água desde a última década (fonte: Advanced Research in Science Direct, data: 31-01-2014, palavras-chave usadas: pharmaceuticals/ photodegradation/ water).....	16
Figura 2.7- Estruturas químicas para os compostos: IBP e seus metabólitos de excreção (a), BZF (b), SMX (c), DCF (d), EE2 (e) e BPA (f).	22
Figura 3.1- Sistema <i>Jar-test</i> utilizado para os ensaios de degradação. (a) Desenho esquemático de uma das cubas do <i>jar-test</i> contendo as partes: (1) cuba de vidro; (2) tubo de quartzo; (3) lâmpada fluorescente; (4) agitador mecânico e (5) amostrador. (b) Fotografia do sistema <i>Jar-test</i>	33
Figura 4.1- Cromatogramas de íons extraídos (IBP, BZF, DCF, SMX, EE2 e BPA), obtidos por HPLC-MS-IT-TOF no modo negativo de ionização por electrospray.....	39
Figura 4.2- Espectro de absorção das soluções aquosas na concentração de 5,0 mg L ⁻¹ de IBP, BZF, SMX, DCF, BPA e EE2.	42
Figura 4.3- Espectros ESI-MS no modo negativo de ionização das alíquotas de degradação de IBP recolhidas a partir do sistema TiO ₂ /UV-C, nos tempos de 0, 30, 60 e 120 minutos de reação.	46
Figura 4.4- Cromatograma em <i>Full Scan</i> e EIC (<i>m/z</i> 205,1234, 221,1183 e 133,0651 para IBP, e os subprodutos 1 e 9, respectivamente) para uma alíquota coletada no tempo de 60 minutos de degradação no sistema UV-A/TiO ₂	49
Figura 4.5- Gráfico da porcentagem relativa de área (A _i /A) para os subprodutos de IBP (1, 6, 8, 10 e 11) em função do tempo de degradação para os sistemas: (a) UV-C/TiO ₂ , (b) UV-C. (c) UV-A/TiO ₂ e (d) UV-A. A _i e A referem-se as áreas dos picos	

cromatográficos, onde, A representa a maior área e A_t as áreas nos demais tempos de reação para cada subproduto.....	50
Figura 4.6- Rota de degradação proposta para IBP por fotocatalise heterogênea (UV-C/TiO ₂ e UV-A/TiO ₂) e fotólise (UV-C)	52
Figura 4.7- Porcentagem de mortalidade para os testes de ecotoxicidade de IBP com <i>Artemia Salina</i> para os sistemas: (a) UV-C/TiO ₂ , (b) UV-C, (c) UV-A/TiO ₂ , (d) UV-A e (e) hidrólise.....	54
Figura 4.8- Espectros ESI-MS no modo negativo obtidos das alíquotas da degradação de BZF por UV-C/TiO ₂ , nos tempos de 0, 30, 60 e 120 minutos de reação.	56
Figura 4.9- Espectros de massas medidos (azul) e teóricos (vermelho), para os subprodutos 3 (a) e 4 (b).....	58
Figura 4.10- Cromatograma em <i>Full Scan</i> e EIC (m/z 360,1003, 256,0980 e 230,0231, para BZF e os subprodutos 4 e 9, respectivamente) para uma alíquota coletada no tempo de 120 minutos para o sistema UV-C.....	60
Figura 4.11- Gráfico da porcentagem relativa de área (A_t/A) para os subprodutos de de BZF (2, 5, 7, 8, 10 e 11) em função do tempo de degradação para os sistemas: (a) UV-C/TiO ₂ , (b) UV-C e (c) UV-A/TiO ₂ . A_t e A refere-se as áreas dos picos cromatográficos, onde, A representa a maior área e A_t as áreas nos demais tempos de reação para cada subproduto.. ..	61
Figura 4.12- Rota proposta para a BZF por fotocatalise heterogênea (UV-C/TiO ₂ e UV-A/TiO ₂) e fotólise (UV-C).....	63
Figura 4.13- Porcentagem de mortalidade para os testes de ecotoxicidade de BZF com <i>Artemia Salina</i> para os sistemas: (a) UV-C/TiO ₂ , (b) UV-C, (c) UV-A/TiO ₂ , (d) UV-A e (e) hidrólise.....	64
Figura 4.14- Espectros ESI-MS no modo negativo de ionização obtidos das alíquotas da degradação de DCF por UV-C/TiO ₂ , nos tempos de 0, 5, 15 e 120 minutos de reação.	66
Figura 4.15- Cromatograma em <i>Full Scan</i> e EIC (m/z 294,0086, 258,0322 e 240,0661, para DCF e os subprodutos 2 e 3, respectivamente) para uma alíquota coletada no tempo de 30 minutos para o sistema UV-C.....	69
Figura 4.16- Gráfico da porcentagem relativa de área (A_t/A) para os subprodutos de de DCF (1-7) em função do tempo de degradação para os sistemas: (a) UV-C/TiO ₂ , (b) UV-C e (c) UV-A/TiO ₂ . A_t e A refere-se as áreas dos picos cromatográficos, onde, A	

representa a maior área e A_t as áreas nos demais tempos de reação para cada subproduto.	70
Figura 4.17- Rota de degradação proposta para DCF por fotocatalise heterogênea (UV-C/TiO ₂ e UV-A/TiO ₂) e fotólise (UV-C).	72
Figura 4.18- Porcentagem de mortalidade para os testes de ecotoxicidade do DCF com <i>Artemia Salina</i> para os sistemas: (a) UV-C/TiO ₂ , (b) UV-C, (c) UV-A/TiO ₂ , (d) UV-A e (e) hidrólise.....	74
Figura 4.19- Espectros ESI-MS no modo negativo de ionização obtidos das alíquotas da degradação do SMX por TiO ₂ /UV-C, nos tempos de 0, 5, 15 e 120 minutos de reação.....	76
Figura 4.20- Cromatograma em <i>Full Scan</i> e EIC (m/z 252,0448, 266,0236 e 172,0068 para SMX, e os subprodutos 2 e 5, respectivamente) para uma alíquota coletada no tempo de 5 minutos para o sistema UV-C.....	78
Figura 4.21- Gráfico da porcentagem relativa de área (A_t/A) para os subprodutos de SMX (1, 3, 4, 5, 7 e 9) em função do tempo de degradação para os sistemas: (a) UV-C/TiO ₂ , (b) UV-C e (c) UV-A/TiO ₂ . A_t e A refere-se as áreas dos picos cromatográficos, onde, A representa a maior área e A_t as áreas nos demais tempos de reação para cada subproduto..	79
Figura 4.22- Rota de degradação proposta para SMX por fotocatalise heterogênea (UV-C/TiO ₂ e UV-A/TiO ₂) e fotólise (UV-C).	81
Figura 4.23- Porcentagem de mortalidade para os testes de ecotoxicidade de SMX com <i>Artemia Salina</i> para os sistemas: (a) UV-C/TiO ₂ , (b) UV-C, (c) UV-A/TiO ₂ , (d) UV-A e (e) hidrólise.....	83
Figura 4.24- Espectros ESI-MS no modo negativo obtidos das alíquotas da degradação de BPA por TiO ₂ /UV-C, nos tempos de 0, 30, 60 e 120 minutos de reação.....	85
Figura 4.25- Cromatograma em <i>Full Scan</i> e EIC (m/z 227,1072, 243,1021 e 259,0970 para BPA e os subprodutos 1 e 2, respectivamente) para uma alíquota coletada no tempo de 60 minutos para o sistema UV-C.....	88
Figura 4.26- Gráfico da porcentagem relativa de área (A_t/A) para os subprodutos de BPA (1-7) em função do tempo de degradação para os sistemas: (a) UV-C/TiO ₂ , (b) UV-C e (c) UV-A/TiO ₂ . A_t e A refere-se as áreas dos picos cromatográficos, onde, A representa a maior área e A_t as áreas nos demais tempos de reação para cada subproduto.	89

Figura 4.27- Rota de degradação proposta para o BPA por fotocatalise heterogênea (UV-C/TiO ₂ e UV-A/TiO ₂) e fotólise (UV-C).....	91
Figura 4.28- Porcentagem de mortalidade para os testes de ecotoxicidade de BPA com <i>Artemia Salina</i> para os sistemas: (a) UV-C/TiO ₂ , (b) UV-C, (c) UV-A/TiO ₂ , (d) UV-A e (e) hidrólise.....	93
Figura 4.29- Espectros ESI-MS no modo negativo obtidos das alíquotas da degradação de EE2 por TiO ₂ /UV-C, nos tempos de 0, 30, 60 e 120 minutos de reação.	95
Figura 4.30- Cromatograma em <i>Full Scan</i> e (<i>m/z</i> 295,1704, 311,1653 e 345,1707 para EE2 e os subprodutos 1 e 6, respectivamente) para uma alíquota coletada no tempo de 60 minutos para o sistema UV-C.....	98
Figura 4.31- Gráfico da porcentagem relativa de área (A_t/A) para os subprodutos de EE2 (1-7) em função do tempo de degradação para os sistemas: (a) UV-C/TiO ₂ , (b) UV-C e (c) UV-A/TiO ₂ . A_t e A refere-se as áreas dos picos cromatográficos, onde, A representa a maior área e A_t as áreas nos demais tempos de reação para cada subproduto.	99
Figura 4.32- Rota de degradação proposta para EE2 por fotocatalise heterogênea (UV-C/TiO ₂ e UV-A/TiO ₂) e fotólise (UV-C).	101
Figura 4.33- Porcentagem de mortalidade para os testes de ecotoxicidade de EE2 com <i>Artemia Salina</i> para os sistemas: (a) UV-C/TiO ₂ , (b) UV-C, (c) UV-A/TiO ₂ , (d) UV-A e (e) hidrólise.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1- Potencial redox de alguns oxidantes.	12
Tabela 2.2- Sistemas típicos de Processos Oxidativos Avançados.	12
Tabela 4.1- Porcentagem de remoção em cada sistema de degradação após 120 minutos para os analitos IBP, BZF, DCF, SMX, EE2 e BPA.	40
Tabela 4.2- Coeficiente de correlação (R^2), constante cinética (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para os experimentos utilizando radiação UV-C.	43
Tabela 4.3- Coeficiente de correlação (R^2), constante cinética (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para os experimentos utilizando radiação UV-A.	43
Tabela 4.4- Taxa de mineralização após 120 minutos de experimento de degradação.	44
Tabela 4.5- Fórmula molecular de IBP e seus subprodutos de degradação (calculados através dos dados de ESI-HRMS).	47
Tabela 4.6- Estrutura química propostas para os subprodutos de degradação do IBP.	48
Tabela 4.7- Fórmula molecular do BZF e seus subprodutos de degradação (calculados através dos dados de ESI-HRMS).	57
Tabela 4.8- Estruturas químicas propostas para os subprodutos de degradação do BZF.	59
Tabela 4.9- Fórmula molecular do DCF e seus subprodutos de degradação (calculados através dos dados de ESI-HRMS).	67
Tabela 4.10- Estruturas químicas propostas para os subprodutos de degradação do DCF.	68
Tabela 4.11- Fórmula molecular do SMX e seus subprodutos de degradação (calculados através dos dados de ESI-HRMS).	77
Tabela 4.12- Estruturas químicas propostas para os subprodutos de degradação do SMX.	77
Tabela 4.13- Fórmula molecular do BPA e seus produtos de degradação (calculados através dos dados de ESI-HRMS).	86
Tabela 4.14- Estruturas químicas propostas para os subprodutos de degradação do BPA.	87
Tabela 4.15- Fórmula molecular do EE2 e seus produtos de degradação (calculados através dos dados de ESI-HRMS).	96
Tabela 4.16- Estruturas químicas propostas para os subprodutos de degradação do EE2.	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINE	antiinflamatório não-esteroidal
AOP	<i>advanced oxidation processes</i>
APCI	ionização química à pressão atmosférica
BC	banda de condução
BPA	bisfenol A
BV	banda de valência
BZF	bezafibrato
CDL	curved desolvation line
CI	carbono inorgânico
CID	<i>collision-induced dissociation</i>
COT	carbono orgânico total
DBE	<i>double bond equivalence</i>
DCF	diclofenaco
E2	estradiol
EE2	etinilestradiol
EIC	<i>extracted-ion chromatogram</i>
ESI	ionização por <i>electrospray</i>
ESI-HRMS	espectrometria de massas de alta resolução com ionização <i>electrospray</i>
ETEs	estações de tratamento de esgoto
EUA	Estados Unidos da América
HPLC	cromatografia líquida de alto desempenho. cromatografia líquida de alto desempenho
HPLC-HRMS	acoplada à espectrometria de massas de alta resolução cromatografia líquida de alto desempenho
HPLC-MS-IT-TOF	acoplada a um espectrômetro de massas contendo dois analisadores em série: <i>ion trap</i> e TOF.
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
IBP	ibuprofeno

IT	<i>ion trap</i>
LC-MS	cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
MS	espectrometria de massas
POA	processos oxidativos avançados
ppb	parte por bilhão
SMX	sulfametoxazol
STP	<i>sewage treatment plant</i>
TOC	<i>total organic carbon</i>
TOF	<i>time-of-flight</i>

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	iv
Resumo.....	v
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas.....	xi
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	xii

CAPÍTULO 1: JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS..... 1

CAPÍTULO 2: ASPECTOS GERAIS 4

2.1 Fontes de Contaminação de Fármacos e suas Rotas de Exposição para o Ambiente.....	5
2.2 Ocorrência de Fármacos no Meio Ambiente e Seus Efeitos Toxicológicos.....	7
2.3 Remoção de Fármacos nas Estações de Tratamento de Esgoto (ETE).....	9
2.4 Processos Oxidativos Avançados (POAs)	11
2.4.1 Sistemas Heterogêneos.....	13
2.4.2 Fotoativação com TiO ₂	13
2.5 Processos de Fotólise e Fotocatálise Heterogênea na Remoção de Contaminantes.	15
2.6 Monitoramento de fármacos e seus subprodutos de degradação.	16
2.7 Avaliação da Toxicidade de Fármacos e seus Subprodutos de Degradação.	17
2.8 - Comentários Gerais - Compostos Alvos e Aspectos Relevantes.	18
2.8.1 Ibuprofeno	18
2.8.2 Bezafibrato	19
2.8.3 Sulfametoxazol.....	19
2.8.4 Diclofenaco Sódico	20
2.8.5 17 α -Ethinilestradiol.....	21
2.8.6 Bisfenol A	21
2.9 Referências Bibliográfica.....	22

CAPÍTULO 3: PROCEDIMENTOS DE DEGRADAÇÃO E TÉCNICAS ANALÍTICAS 32

3.1 Testes de Degradação	33
3.1.1 Montagem do sistema de degradação.....	33
3.1.2 Experimentos de degradação.....	34

3.2 Determinações Analíticas	35
3.2.1 Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas	35
3.2.2 Carbono Orgânico Total.....	36
3.2.3 Testes de Ecotoxicidade – Artemia Salina.....	36
3.3 Referências Bibliográficas	37
CAPÍTULO 4: ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO DE FÁRMACOS E DESRUPTORES ENDÓCRINOS	38
4.1 Avaliação da Eficiência de Remoção e Mineralização.....	39
4.2 Avaliação da formação de subprodutos e o seu grau de toxicidade	45
4.2.1 Ibuprofeno	45
4.2.1.1 Identificação dos subprodutos: proposta de uma rota de degradação.	45
4.2.1.2 Testes de Ecotoxicidade com Artemia salina para IBP.....	53
4.2.2 Bezafibrato	55
4.2.2.1 Identificação dos subprodutos: proposta de uma rota de degradação.	55
4.2.2.2 Testes de Ecotoxicidade com Artemia salina para BZF.....	63
4.2.3 Diclofenaco	64
4.2.3.1 Identificação dos subprodutos: proposta de uma rota de degradação.	64
4.2.3.2 Testes de Ecotoxicidade com Artemia salina para DCF	73
4.2.4 Sulfametoxazol.....	75
4.2.4.1 Identificação dos subprodutos: proposta de uma rota de degradação.	75
4.2.4.2 Testes de Ecotoxicidade com Artemia salina para SMX	81
4.2.5 Bisfenol A	83
4.2.5.1 Identificação dos subprodutos: proposta de uma rota de degradação.	83
4.2.5.2 Testes de Ecotoxicidade com Artemia salina para BPA	92
4.2.6 17 α -Ethinilestradiol.....	94
4.2.6.1 Identificação dos subprodutos: proposta de uma rota de degradação.	94
4.2.6.2 Testes de Ecotoxicidade com Artemia salina para EE2	101
4.3 Referências Bibliográficas	103
CAPÍTULO 5: CONSIDERAÇÕES FINAIS	108
ANEXOS: Artigos Publicados.....	111

CAPÍTULO 1: JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

Nas últimas décadas, o foco principal das análises de poluentes ambientais era apenas nos chamados poluentes prioritários. Substâncias caracterizadas por serem persistentes, bioacumulativas e tóxicas. Recentemente, os “micropoluentes”, compostos orgânicos presentes em concentrações da ordem de microgramas por litro, têm ganhado a atenção da comunidade científica.

Dentre as diversas classes de substâncias químicas, há uma preocupação em especial com a classe dos fármacos. Uma grande quantidade destes compostos é consumida anualmente e, depois do uso, são parcialmente metabolizados e excretados através da urina e fezes. Subseqüentemente estes contaminantes juntamente com outros constituintes orgânicos e inorgânicos, entram nas estações de tratamento de esgoto (ETE) através dos efluentes. Entretanto, tem sido demonstrado, que os tratamentos convencionais a que esses efluentes são submetidos, não são tão eficientes para a completa remoção desta classe de contaminantes, pois eles vêm sendo constantemente reportados em matrizes ambientais, como por exemplo, águas de rio.

Com isso, nos últimos anos, novas tecnologias como os Processos Oxidativos Avançados (POAs) surgiram como técnicas promissoras para tratamentos alternativos na degradação de contaminantes orgânicos em água. Diferentes POAs têm sido aplicados com sucesso na remoção de contaminantes orgânicos em geral, inclusive para diferentes classes terapêuticas de fármacos, apresentando ótimos resultados, apesar das elevadas complexidades estruturais das moléculas-alvo e das baixas concentrações destas substâncias no ambiente.

No entanto, apesar dos ótimos resultados obtidos na remoção destas classes de contaminantes, muitas vezes nota-se que as taxas de degradação são relativamente baixas, ou seja, as moléculas alvo apresentam apenas uma mineralização parcial, gerando produtos de degradação que persistam mesmo ao final dos processos de degradação. Dessa forma, existe hoje um grande interesse em estudos que possam, além de avaliar os processos de remoção, caracterizar os possíveis produtos de degradação que venham a ser gerados e avaliar o seu potencial de toxicidade. Essas avaliações são de suma importância para garantir a efetividade e segurança da aplicação de tais processos no tratamento de efluentes.

Levando em consideração os aspectos abordados, o objetivo geral desse trabalho é avaliar e monitorar os subprodutos de degradação de fármacos de diferentes classes terapêuticas, incluindo o disruptor endócrino bisfenol A, em meio aquoso, utilizando dois sistemas de degradação: a fotólise direta e fotocatalise heterogênea aplicando um

fotocatalisador à base de TiO_2 . Para ambos os processos serão avaliadas as fontes de radiação UV-A e UV-C. A caracterização e o monitoramento dos subprodutos de degradação serão avaliados por espectrometria de massas de alta resolução e cromatografia líquida de alta eficiência. Por fim, será avaliado também o grau de toxicidade das alíquotas degradadas frente às alíquotas dos compostos alvos.

Desse modo, este trabalho é composto de cinco capítulos. Na Revisão Bibliográfica são apresentadas discussões em relação ao monitoramento, sistemas de degradação e a aplicação da espectrometria de massas na determinação de fármacos e seus produtos de degradação no ambiente. No capítulo Procedimentos de Degradação e Métodos Analíticos se faz uma descrição dos métodos aplicados na degradação dos compostos em estudo e as técnicas analíticas que deram suporte à investigação desses sistemas de degradação. Nos demais capítulos são discutidos aspectos específicos observados para cada sistema avaliado, tais como degradação dos contaminantes orgânicos, avaliação dos intermediários gerados durante os processos de degradação e a toxicidade dessas soluções de degradação. E por fim, o último capítulo traz as conclusões e considerações finais.

CAPÍTULO 2: ASPECTOS GERAIS

2.1 Fontes de Contaminação de Fármacos e suas Rotas de Exposição para o Ambiente

Os primeiros relatos da presença de fármacos no ambiente foram por volta da década 70 nos Estados Unidos (EUA) [1,2]. No entanto, somente em meados dos anos 90, com o avanço das técnicas analíticas, é que foram possíveis as análises de contaminantes a níveis traço de concentração, aumentando, assim, o interesse e o reconhecimento da importância de uma avaliação mais criteriosa com relação à contaminação dessa classe de substâncias no ambiente [3].

Os fármacos são considerados compostos químicos moderadamente solúveis em água e biologicamente ativos. As suas principais formas de administração são por inalação, administração oral ou injeções.

A principal fonte de contaminação de resíduos de fármacos no meio ambiente é através do lançamento dos efluentes após os procedimentos realizados nas Estações de Tratamento de Esgoto (ETE). A maior parte dos resíduos de fármacos que chegam às ETE é proveniente da excreção dos princípios ativos na forma intacta através de fezes e urinas [3].

Deve-se levar, ainda, em consideração outras fontes antropogênicas, destacando-se dentre elas os efluentes de indústrias farmacêuticas e a disposição inadequada de fármacos após a data de validade. As principais vias de exposição ao ambiente para os diferentes tipos de fármacos podem ser mostradas na Figura 2.1.

Exposição

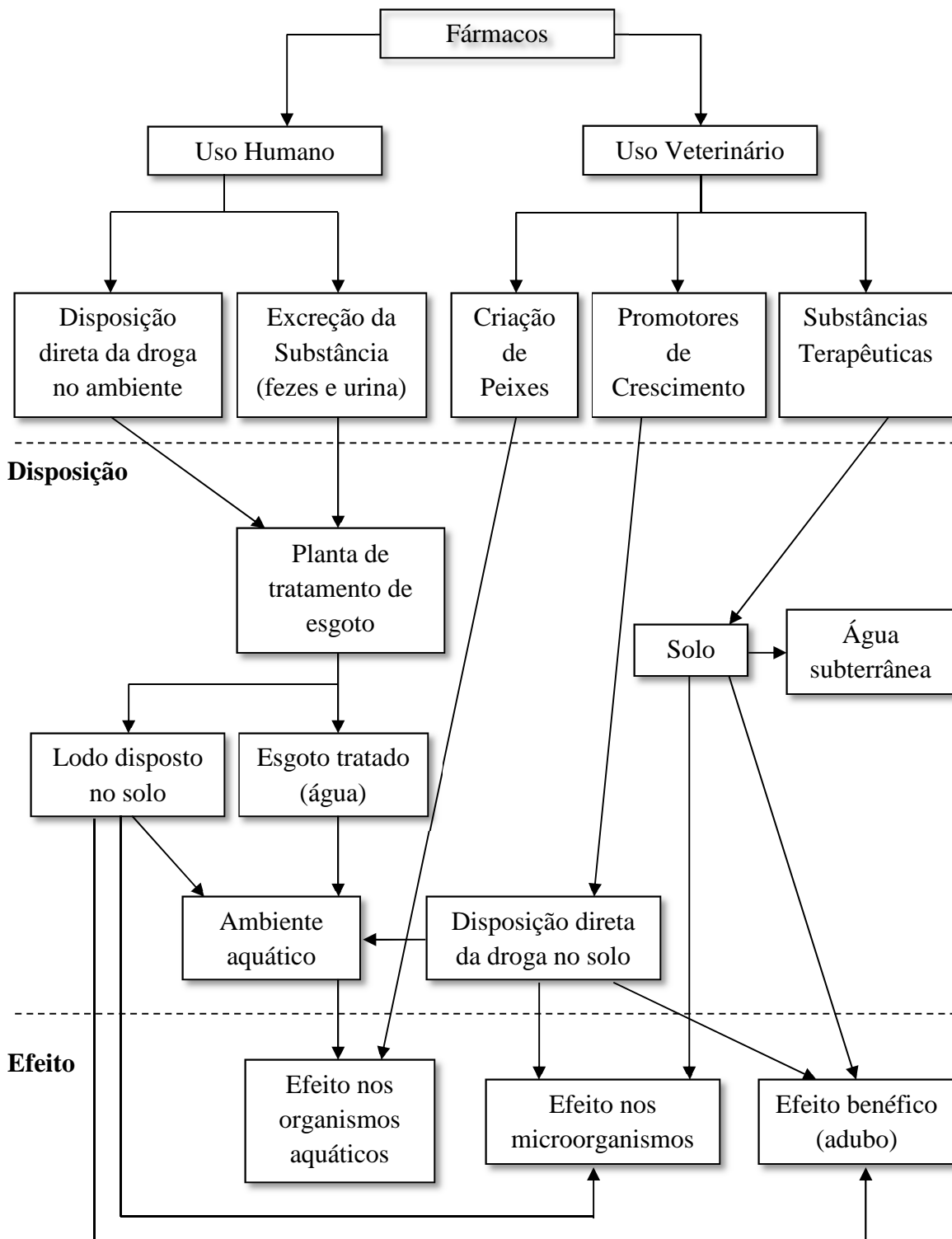


Figura 2.1- Rotas de exposição de fármacos no ambiente (adaptado [4])

2.2 Ocorrência de Fármacos no Ambiente e Seus Efeitos Toxicológicos.

Nos últimos anos, a preocupação em relação à ocorrência, destino, e os efeitos adversos que resíduos de fármacos possam causar no ambiente vêm aumentando. Mesmo assim, ainda não existe uma legislação específica que exija estudos mais minuciosos para avaliar os efeitos da exposição a essas drogas, como por exemplo, testes em doses baixas com exposição prolongada, ou mesmo testes de toxicidade da mistura desses compostos [5]. Desta forma, as informações sobre as consequências que a presença desses compostos no ambiente possa causar aos seres humanos ainda são desconhecidas.

Os fármacos têm sido detectados em uma grande variedade de amostras ambientais, como esgotos, águas superficiais e águas subterrâneas, em concentrações que atingem até níveis de parte por bilhão (ppb). Mesmo sendo um tema relativamente novo, diversos trabalhos já foram publicados na literatura sobre o estudo de resíduos farmacêuticos no ambiente. A Figura 2.2 mostra o aumento dos estudos sobre a ocorrência de fármacos em diferentes matrizes de água desde a última década.

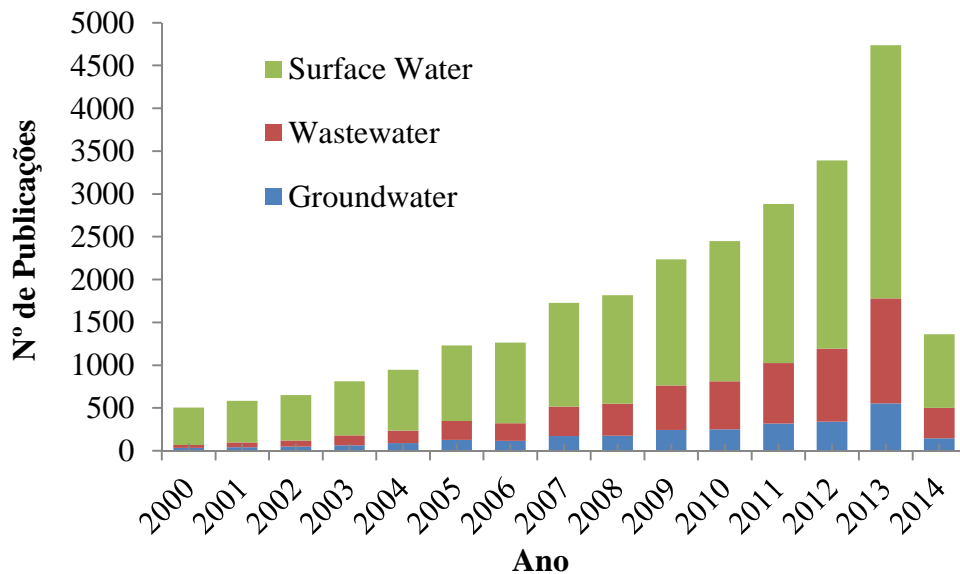


Figura 2.2- Publicações sobre contaminação de fármacos no ambiente desde a última década (fonte: Advanced Research in Science Direct, data: 31-01-2014, palavras-chave usadas: occurrence/pharmaceuticals/wastewater – surfacewater – groundwater)

Santos *et. al.* [3] fizeram um levantamento entre os anos de 1997 a 2009 das diferentes classes terapêuticas de fármacos detectados no meio ambiente. De acordo com a Figura 2.3, pode-se notar que as classes dos hormônios sexuais, reguladores

lipídicos, antibióticos e antiinflamatórios não-esteroidais correspondem a mais de 50% das ocorrências.

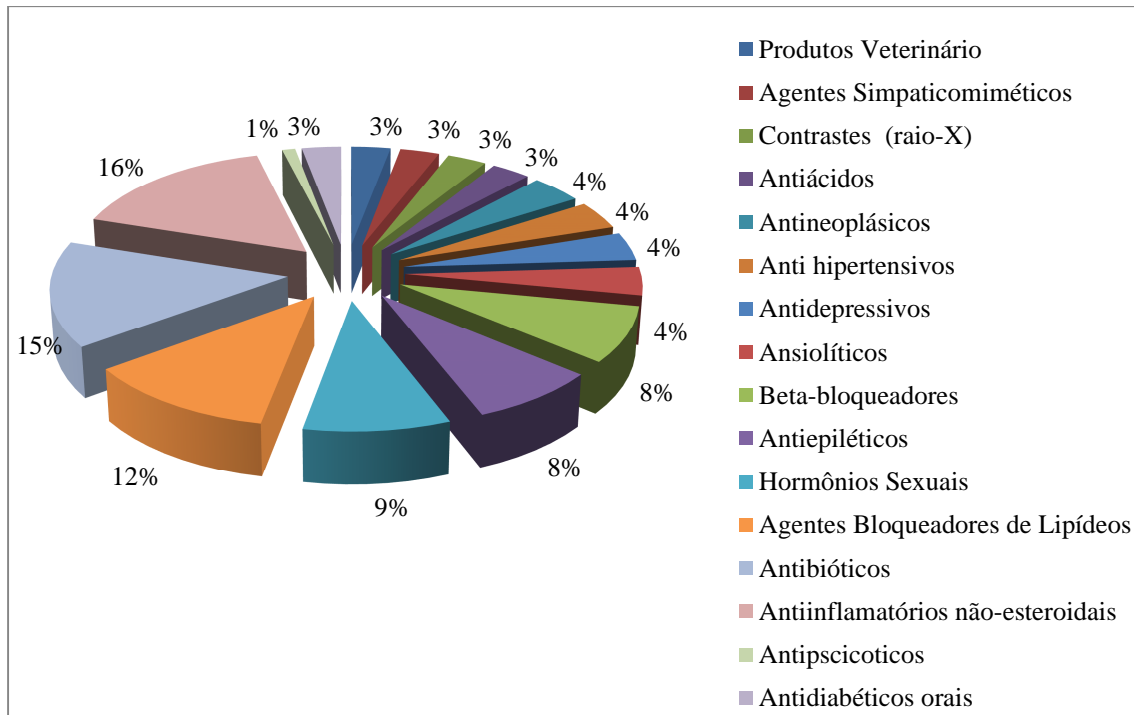


Figura 2.3- Classes terapêuticas de fármacos detectadas no ambiente expressas em porcentagem (adaptado [3]).

Como observado (Figura 2.3), a classe dos antiinflamatórios não-esteroidais é um dos grupos mais comumente encontrados em efluentes ambientais. Dentre os fármacos desta classe destacam-se o diclofenaco e o ibuprofeno. Em um estudo de toxicidade aguda, o diclofenaco foi o fármaco desta classe que apresentou o maior grau de toxicidade em concentrações abaixo de 100 mg L^{-1} [6]. Em ensaios de toxicidade crônica realizados em trutas também foram evidenciadas alterações citológicas no fígado, rins e nas brânquias após 28 dias de exposição ao fármaco numa concentração de $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Já para concentrações de $5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ foram evidenciadas lesões no fígado, e bioacumulação no fígado, nos rins, nas guelras e músculos [7,8]. Estudos relacionados à exposição de peixes a diferentes concentrações do fármaco ibuprofeno ao longo de seis semanas evidenciaram toxicidade crônica, observado pelo aumento de peso no fígado [9].

Da classe dos reguladores lipídicos, o grupo dos fibratos são os mais frequentemente encontrados no ambiente ([10], *apudi Santos et. al.* [3]). Em um estudo de toxicidade envolvendo dois fármacos dessa classe, Quinn *et. al.* [11] constataram que

o fármaco genfibrozil pode ser classificado como tóxico (EC_{50} entre 1 e 10 mg L⁻¹) e o fármaco bezafibrato como prejudicial para organismos não-alvo (EC_{50} entre 10 e 100 mg L).

Com relação à toxicidade da classe dos antibióticos, uma das classes mais reportadas na literatura segundo Joner *et. al.* [12], são classificados como extremamente tóxicos para microorganismos (EC_{50} abaixo de 0,1 mg L⁻¹) e muito tóxicos para algas (EC_{50} entre 0,1 e 1 mg L⁻¹). Alguns testes de toxicidade crônica em algas indicaram maior sensibilidade aos agentes antibacterianos com a inibição do crescimento [13]. Em testes com vertebrados (como peixes), estes foram expostos diretamente a baixos níveis de concentração de antibióticos e aparentemente não foi observado nenhum efeito adverso [14,15].

Os hormônios sexuais são compostos biológicos extremamente ativos, produzindo intensos efeitos terapêuticos mesmo em doses muito baixas. Eles são comumente prescritos como contraceptivos orais, contribuindo indiretamente para o aumento das concentrações encontradas no ambiente [16]. Os hormônios sexuais estrogênicos são os mais encontrados no ambiente podendo existir tanto na forma natural como na forma sintética e são classificados como disruptores endócrinos [17]. Um exemplo dessa classe terapêutica é o etinilestradiol, um estrogênio sintético encontrado em pílulas anticoncepcionais. Estudos revelam que a exposição de peixes a concentrações inferiores a 1 ng L⁻¹ de etinilestradiol causa uma redução significativa na fertilização e a diminuição de características sexuais masculinas [18].

Apesar das informações citadas acima, estudos relacionados aos efeitos causados nos seres humanos pela exposição crônica a estas e outras classes terapêuticas de fármacos ainda são escassos.

2.3 Remoção de Fármacos nas Estações de Tratamento de Esgoto (ETE)

As estações de tratamento de esgoto (ETE), geralmente, utilizam processos convencionais. Estes tratamentos constam, principalmente, de dois processos importantes: remoção física através da adsorção em sólidos suspensos (lodo de esgoto) e biodegradação. O processo de adsorção vai depender das características do fármaco, como por exemplo, hidrofobicidade e interações eletrostáticas. Dessa forma, o fármaco pode se agregar com partículas ou microorganismos e, assim, ser removido na forma de lodos. Geralmente, os fármacos de caráter ácido têm pouca tendência de adsorção no lodo, ocorrendo, principalmente, na fase dissolvida no efluente. Portanto, conforme

reportado em alguns estudos, as concentrações desses fármacos no lodo e nos sedimentos são relativamente baixas [19,20]. Já os fármacos de caráter básico e anfotéricos podem adsorver no lodo de forma mais significativa, como é o caso do etinilestradiol [21].

Quando um composto farmacêutico encontra-se presente, principalmente, na fase dissolvida do efluente, geralmente, o processo de eliminação é baseado na degradação biológica. Essa biodegradação pode ocorrer de dois modos: aeróbio ou anaeróbio. A ineficiência para a completa remoção dos fármacos residuais pelas ETE, geralmente, está ligada ao fato da maioria desses compostos possuírem ações biocidas e estruturas químicas muitas vezes não passíveis à biodegradação, atingindo assim os cursos de águas naturais.

Em um estudo reportado por Deblond *et. al.* [21] fez-se um levantamento sobre a taxa de remoção de algumas classes terapêuticas nas ETE, onde foi considerada a concentração na entrada (afluente) e na saída (efluente) das ETE. A Figura 2.4, apresenta alguns resultados adaptados desse levantamento, onde está apresentada a porcentagem média de remoção nas ETE para diferentes classes de compostos terapêuticos.

Pode-se notar que os fármacos pertencentes às classes terapêuticas dos antibióticos, dos betabloqueadores, dos reguladores lipídicos e dos diuréticos, apresentam taxas de remoção entre 50 e 60%. Já os fármacos pertencentes às classes terapêuticas dos antiinflamatórios e dos contrastes apresentam taxas ainda menores (entre 30 e 40%). Para o bisfenol A, e para os fármacos da classe dos psico-estimulantes e dos antidepressivos, as porcentagens de remoção são mais altas (71%, 97% e 98%, respectivamente). Levando em consideração o levantamento realizado por Santos *et. al.* [3] (Figura 2.3), pode-se notar que reguladores lipídicos, antibióticos e antiinflamatórios não-esteroidais são uma das classes que mais contribuem para a contaminação ambiental, condizentes com as menores taxas de remoção reportadas por Deblond *et. al.* [21] (Figura 2.4).

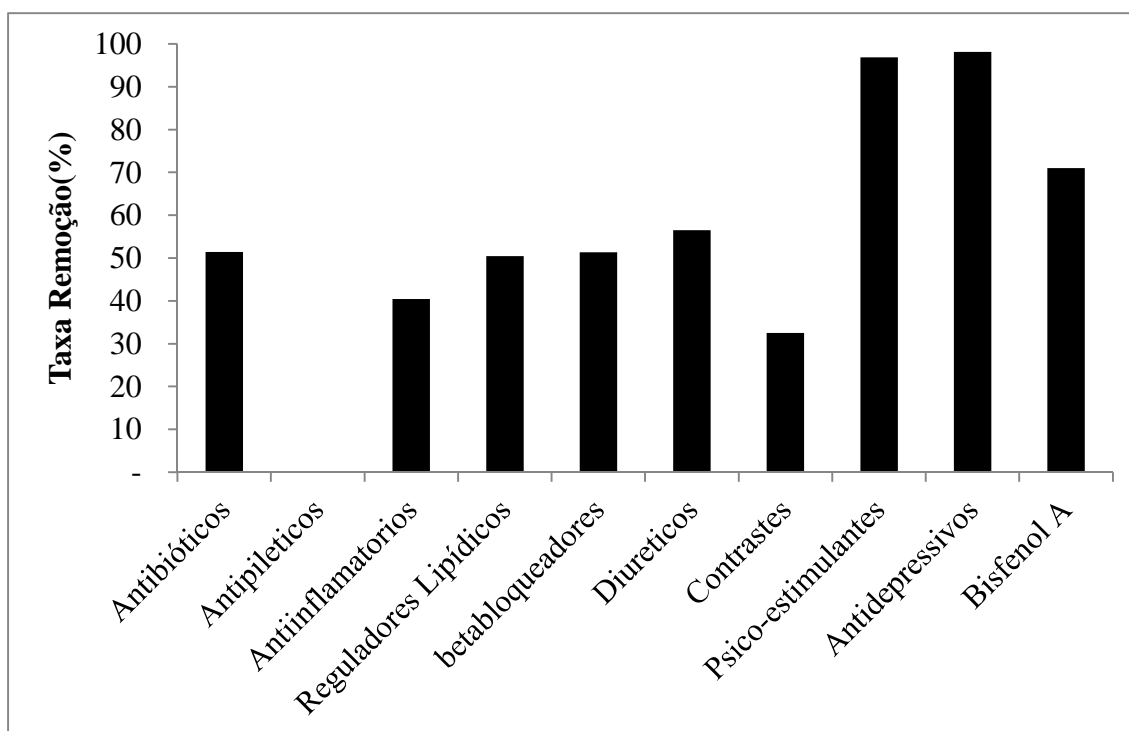


Figura 2.4- Taxa de remoção média para diferentes classes terapêuticas (adaptado [21])

2.4 Processos Oxidativos Avançados (POAs)

Dentre as diversas técnicas estudadas para a aplicação na remoção de contaminantes orgânicos, os processos oxidativos avançados ganharam destaque nos últimos anos. Os POAs são caracterizados por reações de oxidação química induzidas por radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) [22], espécies extremamente reativas e pouco seletivas. O potencial redox do radical hidroxila (Tabela 2.1), muito superior ao dos oxidantes convencionais, faz com que atuem de maneira mais eficiente na oxidação de uma grande variedade de substâncias.

Esses radicais hidroxila são gerados através de reações envolvendo oxidantes fortes, como ozônio (O_3) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), semicondutores como dióxido de titânio (TiO_2) e óxido de zinco (ZnO) e radiação ultravioleta (UV) [23]. Os processos que contam com a presença de catalisadores sólidos são heterogêneos enquanto que os demais são homogêneos. Os principais sistemas POAs são apresentados na Tabela 2.2.

Tabela 2.1- Potencial redox de alguns oxidantes.

Espécie	Potencial redox (V)
Fluor	3,03
Radical hidroxila	2,80
Oxigênio atômico	2,42
Ozônio	2,07
Peróxido de hidrogênio	1,78
Permanganato	1,68
Dióxido de cloro	1,57
Cloro	1,36
Iodo	0,54

Tabela 2.2- Sistemas típicos de Processos Oxidativos Avançados.

Sistemas Homogêneos	Com Radiação O ₃ /UV H ₂ O ₂ /UV Feixe de elétrons US H ₂ O ₂ /US UV/US
	Sem Radiação O ₃ /H ₂ O ₂ O ₃ /OH ⁻ H ₂ O ₂ /Fe ²⁺
Sistemas Heterogêneos	Com Radiação TiO ₂ /O ₂ /UV TiO ₂ /H ₂ O ₂ /UV
	Sem Radiação Eletro-Fenton

Fonte: Huang *et. al* [23]

2.4.1 Sistemas Heterogêneos

Nos sistemas heterogêneos há presença de semicondutores que atuam como fotocatalisadores e possuem duas regiões energéticas: a região de energia mais baixa que corresponde à banda de valência (BV), onde os elétrons não possuem movimento livre, e a região de energia mais alta é a banda de condução (BC), onde os elétrons são livres para se moverem através do cristal produzindo condutividade elétrica similar aos metais [24]. Entre essas duas regiões, existe a zona de “*band-gap*”. A energia de “*band-gap*” é a energia mínima necessária para excitar o elétron e promovê-lo de uma banda de menor para outra de maior energia.

Nos catalisadores semicondutores, existe uma descontinuidade de energia entre as bandas BV e BC, porém os elétrons, em algumas condições, podem superá-la, sendo promovidos da BV para a BC, gerando um par elétron/lacuna (e^-/h^+) e, com isso, apresentar condutividade elétrica. A representação esquemática de um semicondutor está apresentada na Figura 2.5.

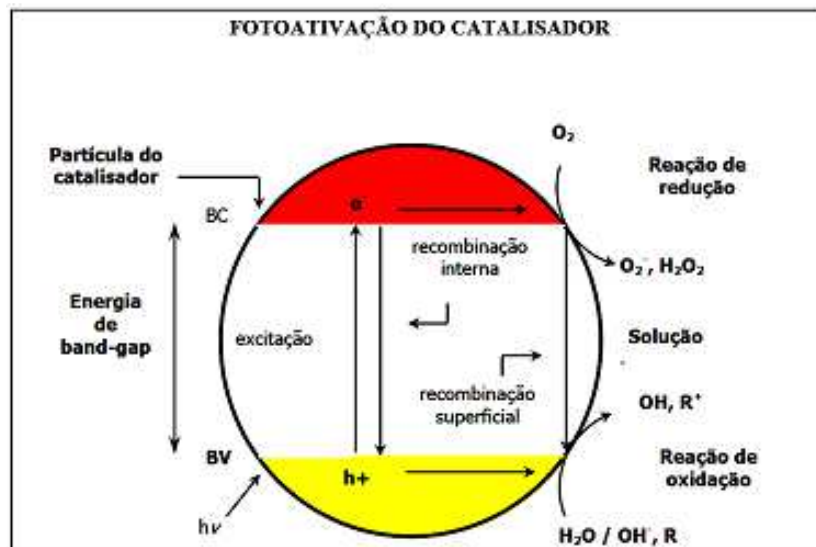


Figura 2.5- Mecanismo simplificado para a fotoativação de um semicondutor, Fonte: Suriat.al. [25].

2.4.2 Fotoativação com TiO_2

O TiO_2 é um semicondutor, isto é, em seu estado normal seus níveis de energia não são contínuos e, com isso, não conduz eletricidade. Entretanto, quando irradiado com fótons ($h\nu$) de energia igual ou superior à energia de “*band-gap*” (3,2 eV) ocorre uma excitação eletrônica e o elétron é promovido da banda de valência para a banda de

condução, gerando um par elétron/lacuna. Esse par pode sofrer recombinação interna. Na superfície, ele pode sofrer recombinação externa ou participar de reações de oxirredução, com absorção de espécies como H₂O, OH⁻, O₂ e compostos orgânicos.

As reações de oxidação podem ocorrer entre a lacuna da banda de valência e a água ou com os íons hidroxila, produzindo o radical hidroxila. As reações de redução podem ocorrer entre o elétron da banda de condução e o oxigênio, produzindo o íon radical superóxido (O₂^{-•}), o qual pode produzir peróxido de hidrogênio; este, por sua vez, produz radicais hidroxila [25]. Os mecanismos dessas reações estão apresentados a seguir.

A fotoativação da partícula do semiconductor se dá quando esta partícula é irradiada com fótons de energia maior do que a energia de “*band-gap*”; o elétron é então transferido da BV para a BC, gerando um par elétron/lacuna (e_{BC}⁻/h_{BV}⁺), como pode ser visto na equação (1).



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



Reação entre a lacuna da banda de valência e os grupos OH⁻ na superfície da partícula de TiO₂:



Formação do íon radical superóxido:



Formação de peróxido de hidrogênio:



Geração de radicais hidroxila pela quebra de peróxido de hidrogênio:



2.5 Processos de Fotólise e Fotocatálise Heterogênea na Remoção de Contaminantes.

A radiação UV do espectro eletromagnético está situada na faixa de 40 a 400 nm de comprimento de onda, entre os raios-X e a luz visível, que pode ser dividida em [26]:

- UV vácuo – 40 a 200 nm
- UV-C – 200 a 280 nm
- UV-B – 280 a 315 nm
- UV-A – 315 a 400 nm

Os processos de fotólise baseiam-se na decomposição ou dissociação de compostos químicos causados pela absorção de luz (natural ou artificial). Normalmente, dois processos são aplicados, a fotólise direta e a fotólise indireta. No primeiro caso, os compostos orgânicos absorvem a energia, normalmente a radiação UV, podendo reagir com outros constituintes na matriz ou sofrerem autodecomposição [28,29]. A fotólise indireta envolve a fotodegradação por fotosensibilizadores, produzindo os radicais hidroxila ou peróxil [30]. Estes oxidantes podem ser produzidos através da fotólise de substâncias constituintes da matriz aquosa, como ácidos húmicos e substâncias inorgânicas ou mesmo pela adição externa de algum oxidante, como peróxido de hidrogênio. Embora os processos por fotólise direta e indireta possam ocorrer simultaneamente, a fotólise direta é considerada a mais importante na degradação dos contaminantes [30].

A eficiência dos processos fotolíticos depende, especificamente, do espectro de absorção dos compostos alvo, da intensidade e frequência da radiação, bem como do tipo de matriz [31]. As diferentes matrizes aquosas apresentam substâncias que podem inibir ou aumentar o processo de degradação (matéria orgânica) ou a geração de espécies oxidantes (substâncias húmicas e inorgânicas, tais como metais dissolvidos). A fotólise com radiação solar tem sido considerada uma das formas mais importantes na degradação de antibióticos no ambiente aquático natural [32].

Os processos de fotocatálise heterogênea com a utilização de dióxido de titânio (TiO_2) como método de remoção de contaminantes em água tem ganhado destaque nos últimos anos [33].

Em uma pesquisa realizada no banco de dados *Science Direct* pode-se observar o número crescente de trabalhos reportados na literatura utilizando a fotodegradação como método para remoção de resíduos farmacêuticos no ambiente. A figura 2.6 mostra

o crescente aumento desses estudos aplicados à fotodegradação de fármacos em diferentes matrizes de água desde a última década.

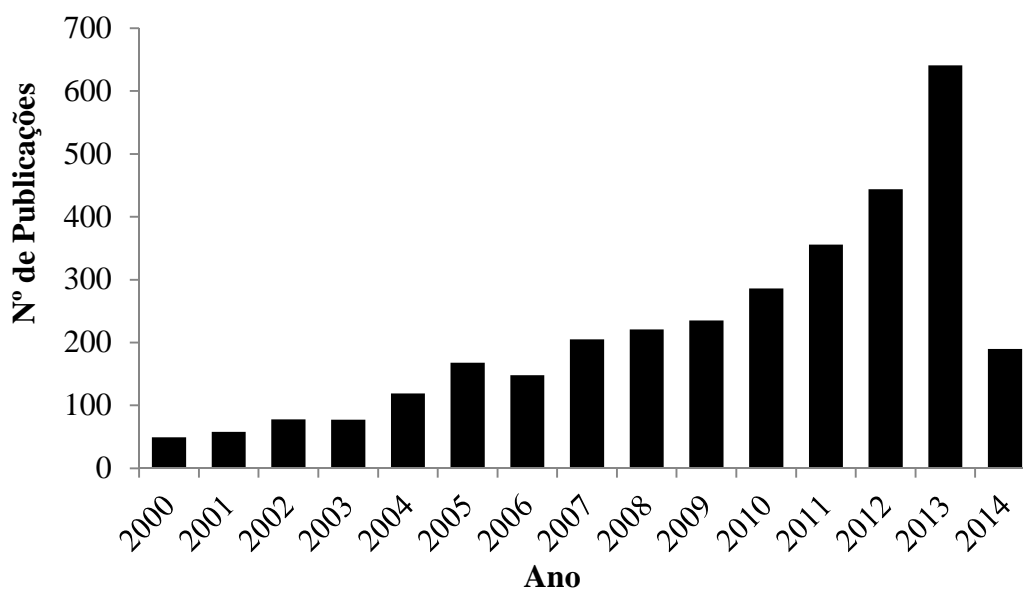


Figura 2.6- Publicações referentes à fotodegradação de fármacos em água desde a última década (fonte: Advanced Research in Science Direct, data: 31-01-2014, palavras-chave usadas: pharmaceuticals/ photodegradation/ water).

As aplicações tanto de métodos oxidativos avançados como de outros métodos para remoção de poluentes recalcitrantes têm se expandido nos últimos anos, estimulando estudos cinéticos visando aperfeiçoar os parâmetros operacionais para obtenção de melhores eficiências de remoção [34]. No entanto, a remoção de fármacos e outros poluentes orgânicos só fornecem uma indicação parcial da eficiência dos vários métodos de tratamento, pois, como já comentado anteriormente, ainda são escassas as informações sobre a possível formação de produtos de degradação, que podem até mesmo virem a ser até mais tóxicos e mais resistentes à degradação que os próprios compostos alvos [35].

2.6 Monitoramento de fármacos e seus subprodutos de degradação.

O monitoramento e a identificação de fármacos e seus subprodutos de degradação requerem a aplicação de ferramentas analíticas mais sofisticadas. As técnicas de espectrometria de massas, acopladas ou não às técnicas de cromatografia (líquida e gasosa), vem ganhando destaque, pois são técnicas seletivas e sensíveis,

podendo fornecer as informações necessárias para elucidação da estrutura de fármacos e seus produtos de degradação no ambiente [36-38].

A espectrometria de massas (MS) tem revolucionado o campo da química analítica, permitindo análise de contaminantes orgânicos a níveis traço de concentração no ambiente. A análise por MS, não só pode gerar padrões de fragmentação para identificação de uma determinada molécula, como também fornecer a massa exata dessa molécula e sua possível composição elementar, de modo a garantir uma maior seletividade.

A técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) vem sendo apontada como a principal técnica para a identificação de subprodutos, uma vez que a grande maioria dos fármacos são moléculas polares contendo grupos funcionais como ácidos carboxílicos, fenóis e aminas. Além disso, a técnica LC-MS com analisadores de massa/carga de alta resolução, como no caso dos analisadores TOF (*Time-of-Flight*), permite determinar com grande exatidão a massa molar dos subprodutos formados, facilitando assim a sua identificação.

De acordo com a literatura, a técnica de ionização por *electrospray* (ESI) é a mais aplicada para a determinação de subprodutos de degradação [36, 39-54], pois, geralmente, os subprodutos que podem ser gerados durante esses processos tendem a possuir um caráter mais polar. Caso os compostos apresentem caráter menos polar e sejam termicamente inertes, pode-se usar também a técnica de Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI) como fonte de ionização [40, 47, 50, 55].

2.7 Avaliação da Toxicidade de Fármacos e seus Subprodutos de Degradação.

Para a avaliação de estudos ambientais, atualmente existe a sugestão de se trabalhar a associação de respostas químicas às respostas biológicas em organismos de diferentes níveis tróficos. Este tipo de pesquisa leva a considerações importantes, como, por exemplo, quão genotóxico pode ser um agente poluente a uma cadeia de organismos, podendo chegar ao ser humano [56]. Com esta visão sugere-se que em alguns casos de degradação de poluentes, os subprodutos gerados, podem se apresentar mais tóxicos que seus próprios precursores. Com o intuito de avaliar essa associação entre as respostas químicas e biológicas, alguns pesquisadores têm utilizado a *Artemia salina* como um organismo bioindicador de poluição e, conseqüentemente, toxicidade [57-59]. A escolha da utilização desse tipo de microrganismo se dá por se tratar de uma espécie que tem uma ampla distribuição geográfica, cultura relativamente simples e de

fácil manuseio, alta resistência à manipulação, ciclo de vida curto, alta fecundidade e uma sensibilidade notável para xenobióticos [60]. No Brasil, atualmente, existe a indicação de testes ecotoxicológicos e genotóxicos sugeridos pelo Ministério do Meio Ambiente/IBAMA e outros órgãos de proteção ambiental, principalmente com a utilização deste tipo de microrganismo [56].

2.8 - Comentários Gerais - Compostos Alvos e Aspectos Relevantes.

Apesar do surgimento de novas tecnologias aplicadas à degradação de contaminantes orgânicos, em especial os fármacos, as informações referentes às vias de degradação e, principalmente, aos subprodutos envolvidos nos processos aplicados ainda são escassas. Dessa forma, este trabalho apresentará a investigação e caracterização de subprodutos formados durante tratamentos fotolíticos e fotocatalíticos heterogêneos. Abaixo, uma breve descrição de aspectos relevantes para a escolha de cada um dos compostos alvo deste trabalho.

2.8.1 Ibuprofeno

Ibuprofeno (IBP), quimicamente denominado ácido 2-(4-isobutilfenil)-propiónico (Figura 2.7a), é um dos produtos farmacêuticos mais consumidos no mundo [61]. É um agente não-esteróide, analgésico, antipirético e antiinflamatório, usado no combate à febre e para aliviar dores em geral [61]. Depois de administrada, apenas 15 % da dose ingerida é eliminada na forma original, enquanto que 26 % são excretados nas formas hidróxi-ibuprofeno e 43 % como carboxi-ibuprofeno [62].

Existem relatos da presença de IBP e seus metabólitos em efluentes de estações de tratamento de água e esgoto e em mananciais de abastecimento de água. Um levantamento realizado entre os anos de 2006 a 2010 confirmou a presença de IBP em concentrações que variam na ordem de 65 a 7100 ng L⁻¹ em efluentes de estações de tratamento de água e esgoto, e de 0 a 360 ng L⁻¹ para águas superficiais de rios [63]. A menor concentração reportada para águas de rios se deve a uma combinação de fatores, como fotólise, biotransformação, sorção, volatilização e dispersão do fármaco IBP no ambiente [64].

Estudos demonstram que o IBP é parcialmente removido nas estações de tratamento; em alguns casos atinge 70% de remoção, principalmente por oxidação biológica [65]. No entanto, suas principais formas de metabólitos carboxi e/ou hidróxi

IBP, persistem após o tratamento biológico como subprodutos tóxicos que podem afetar o ambiente aquático [62, 66].

2.8.2 *Bezafibrato*

Bezafibrato (BZF, ácido p-[4-(clorobenzoil-amino-etil)-fenoxi]-b-etilpropioico) (Figura 2.7b) é uma droga pertencente ao grupo dos fibratos, uma importante classe de fármacos amplamente utilizados no tratamento de hiperlipidemia (elevação dos níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides) [67]. Na última década, BZF foi incluído na lista dos medicamentos mais utilizados no mundo [68].

A maioria dos fármacos pertencentes à classe dos fibratos são ingeridos, e excretados na sua forma intacta [69]. O BZF possui um caráter ácido (pK_a 3,6) e, em pH neutro, possui carga negativa, ocorrendo, portanto, principalmente na fase dissolvida dos efluentes. Um levantamento realizado entre os anos de 2006 a 2010 confirmou a presença de BZF em concentrações que variam na ordem de 0 a 340 $ng L^{-1}$ em efluentes de estações de tratamento de água e esgoto, e de 16 a 363 $ng L^{-1}$ para águas superficiais de rios [63]. Esse fato é proveniente de sua ampla utilização e persistência nos ambientes aquáticos, uma vez que na fase dissolvida dos efluentes, os processos de biodegradação não são eficientes para sua remoção [70].

Embora estudos apontem que a concentração encontrada no ambiente para o bezafibrato não induz efeitos agudos ou crônicos em organismos não-alvo, a sua nocividade não pode ser descartada devido ao possível sinergismo, efeitos aditivos, bioacumulação e biomagnificação [70]. Recentemente foi demonstrado que os compostos de regulação lipídica são potenciais disruptores endócrinos em peixes [71].

2.8.3 *Sulfametoxazol*

Sulfametoxazol (SMX, Figura 2.7c), é também um dos produtos farmacêuticos mais prescritos [72]. É um antibiótico sintético da classe das sulfonamidas, frequentemente utilizado na medicina humana para o tratamento de bronquite e infecções do trato urinário, e também na medicina veterinária, para prevenir e tratar infecções e para promover o crescimento em animais [73]. Depois de administrada, essa substância é metabolizada, e cerca de 15 % da dose ingerida é eliminada na forma original [73].

Um levantamento realizado entre os anos de 2006 a 2010 confirmou a presença de SMX em concentrações que variam na ordem de 5 a 2800 $ng L^{-1}$ em efluentes de

estações de tratamento de água e esgoto, e de 0,5 a 2000 ng L⁻¹ para águas superficiais de rios [63]. Esse fato está ligado à atividade antibacteriana desse composto o qual se mostra, portanto, resistente aos métodos convencionais de tratamentos biológicos [74]. Embora alguns trabalhos citem a biodegradação de antibióticos da classe das sulfonamidas no esgoto, essa taxa de biodegradação é normalmente baixa e o processo é muito lento, não assegurando assim a sua eliminação completa através dos tratamentos convencionais [74].

2.8.4 Diclofenaco Sódico

Diclofenaco sódico (DCF, Figura 2.7d), quimicamente denominado {2-[(2',6'-diclofenil) amino]fenil} acetato sódico, é um fármaco antiinflamatório não-esteróide (AINE) largamente utilizado como analgésico, antiartrítico e antirreumático. É um dos compostos frequentemente encontrados na água e, portanto, um dos mais investigados em termos de ocorrência e destino no ambiente aquático [75-79]. Após administração oral, o DCF é eliminado em um curto período de tempo. Aproximadamente 65 % da dose administrada são excretados na urina; desses, cerca de 15% são excretados de forma inalterada e o restante é eliminado na forma de metabólitos [76]

Estudos relatam a baixa eficiência de remoção por processos de biodegradação nas estações de tratamento de esgoto (na faixa de 20-40%) [76,80]. Embora alguns estudos evidenciem a remoção de DCF em águas de superfície, em grande parte devido à fotólise [75, 75, 78], considera-se um poluente pseudo-persistente, uma vez que as cargas elevadas deste fármaco no ambiente aquático conduzem a uma concentração praticamente constante.

Um levantamento realizado entre os anos de 2006 a 2010 confirmou a presença de DCF em concentrações que variam na ordem de 0,55 a 3300 ng L⁻¹ em efluentes de estações de tratamento de água e esgoto, e de 1,1 a 82 ng L⁻¹ para águas superficiais de rios [63].

Assim como outros AINEs encontrados em ambientes aquáticos, o DCF apresenta um alto nível de ameaça. Existem relatos da morte de aves por insuficiência renal após ingerir cadáveres de animais contaminados com DCF [81,82]. Já são conhecidos seus efeitos nocivos sobre determinada espécie de peixe, podendo induzir toxicidade celular, genotoxicidade e efeitos estrogênicos, em níveis de concentração de 1 µg L⁻¹ [83]. Além disso, tem sido observado o sinergismo entre o DCF e outros compostos farmacêuticos ativos tais como o ibuprofeno, naproxeno e o ácido

acetilsalicílico, resultando na ocorrência de efeitos tóxicos, mesmo em concentrações mais baixas [84].

2.8.5 *17 α -Ethinilestradiol*

O *17 α -etinilestradiol* (EE2, Figura 2.7e), apresenta nível de estrogenicidade cerca de trinta vezes maior que o hormônio natural estradiol (E2) [85], sendo o principal estrogênio sintético aplicado em medicamentos de reposição hormonal e como contraceptivos orais. Ambos E2 e EE2 atingem o ambiente aquático pela excreção humana e animal; porém, no ambiente, EE2 é normalmente mais resistente à biodegradação quando comparado ao E2 [86-88] e, dessa forma, não é tão eficazmente removido pelos tratamentos biológicos convencionais.

Estudos recentes tem mostrado que o não tratamento de efluentes industriais e domésticos contendo esse tipo de hormônio, juntamente com sua aplicação na criação de gado bovino, tem sido responsável pela detecção destes compostos em águas superficiais e subterrâneas, na ordem de concentração de ng L^{-1} . A presença deste hormônio pode ocasionar a feminização de peixes, diminuição da quantidade de esperma em humanos, e aumento da incidência de câncer de mama e testículo [89].

2.8.6 *Bisfenol A*

Bisfenol A (BPA), quimicamente denominado (2,2-bis (4-hidroxifenil)-propano) (Figura 2.7f), é um importante intermediário químico utilizado na fabricação de resinas epóxi e plásticos policarbonatos [90]. Existe grande preocupação em relação à contaminação desse produto no ambiente, pois já é comprovado que ele pode exercer desregulação endócrina imitando e antagonizando os efeitos dos hormônios naturais e sintéticos, podendo causar efeitos adversos aos organismos [91,92]. Existem fortes evidências que BPA pode causar efeitos graves nos sistemas genéticos e funções cerebrais dos seres humanos, especialmente em fetos, bebês e crianças [93-95]. O uso de BPA na fabricação de mamadeiras infantis já foi proibido pela União Européia, Canadá e Brasil; porém, BPA ainda é muito utilizado como revestimento para produtos metálicos e em linhas de abastecimento de água. Vários trabalhos tem reportado a ocorrência de BPA em efluentes de estações de tratamento de esgoto, o que pode representar sérios riscos à saúde humana [96-98].

A remoção de BPA em estações de tratamento de esgoto atinge eficiências acima de 70 % [99], no entanto, a degradação por processos aeróbios requer um tempo

maior de retenção do afluente, dias ou até mesmo semanas [91,100], inviabilizando a sua aplicação em escala real.

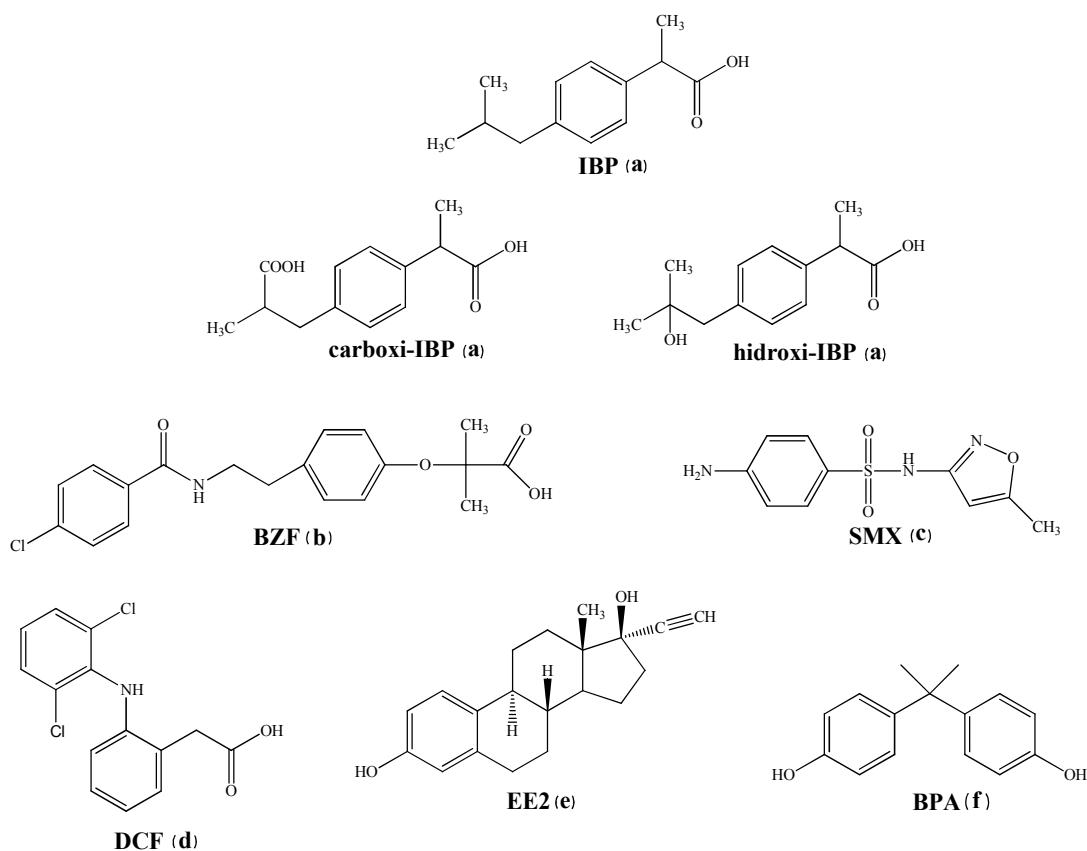


Figura 2.7- Estruturas químicas para os compostos: IBP e seus metabólitos de excreção (a), BZF (b), SMX (c), DCF (d), EE2 (e) e BPA (f).

2.9 Referências Bibliográfica

- [1] Hignite, C.; Azarnoff, D. L. Drugs and drugs metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. **Life Science**. 20 (1977) 337-341.
- [2] Garrison, A. W.; Pope, J. D.; Allen, F. R. CG/MS analysis of organic compounds in domestic wastewater. In: Keith, C. H. (Ed.). **Identification and analysis of organic pollutants in water**. Ann Arbor: Ann Arbor Science Publishers, 1976, cap. 30, 517-556.
- [3] Santos, L. H. M. L. M.; Araújo, A. N.; Fachini, A.; Pena, A.; Deleure-Matos, C.; Montenegro, M. C. B. S. M. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**. 175 (2010) 45-95.

- [4] Halling-Sorensen, B.; Nielsen, S.N.; Lanzky, P. F.; Ingerslev, F.; Lutzhoft, H. C. H.; Jorgensen, S. E. Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment – A Review. **Chemosphere**. 36 (1998) 357-394.
- [5] Fatta-Kassinos, D.; Meric, S.; Nikolaou, A. Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of Knowledge and future research. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 399 (2011) 251-275.
- [6] Cleuvers, M. Aquatic Ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. **Toxicology Letters**. 142 (2003) 185-194.
- [7] Shwaiger, J.; Ferling, H.; Mallow, U.; Wintermayr, H.; Negele, R. D. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenaco. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. **Aquatic Toxicology**. 68 (2004) 141-150.
- [8] Triebskorn, R.; Casper, H.; Heyd, A.; Eikemper, R.; Kohler, H. R.; Schwaiger, J. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenaco. Part II: Cytological effects in liver, Kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**. 68 (2004) 151-166.
- [9] Flippin, J. L.; Huggett, D.; Foran, C. M. Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. **Aquatic Toxicology**. 81 (2007) 73-78.
- [10] Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M. Pharmacology, fourth Ed.; Churchill Living-stone, Edinburgh, 1999.
- [11] Quinn, B.; Gagné, F.; Blaise, C. An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarians, *Hydra attenuate*. **Science Total Environmental**. 389 (2008) 306-314.
- [12] Joner, O. A. H.; Voulvoulis, N.; Lester, J. N. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. **Water Research**. 36 (2002) 5013-5022.
- [13] Halling-Sorensen, B. Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming. **Chemosphere**. 40 (2000) 731-739.
- [14] Lanzky, P. F.; Halling-Sorensen, B. The toxic effect of the antibiotic metronidazole on aquatic organisms. **Chemosphere**. 35 (1997) 2553-3561.
- [15] Isidori, M.; Lavorgna, M.; Nardelli, A.; Pascarella, L.; Parrella, A. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. **Science Total Environmental**. 346 (2005) 87-98.

- [16] Crane, M.; Watts, C.; Boucard, T. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. **Science Total Environmental**. 374 (2006) 23-41.
- [17] Larsson, D. G. J.; Adolfsson-Erici, M.; Parkkonen, J.; Pettersson, M.; Berg, A. H.; Olsson, P.-E.; Forlin, L. Ethinylestradiol – an undesired fish contraceptive? **Aquatic Toxicology**. 45 (1999) 91-97
- [18] Parrott, J. L.; Blunt, B. R. Life-cycle exposure of fathead minnow (*Pimephalespromelas*) to an ethinylestradiol concentration below 1 ng/L reduces egg fertilization success and desmasculinizes males. **Environmental Toxicology**. 20 (2005) 131-141.
- [19] Ternes, T.; Jos, A.; Siegrist, H. Scrutinizing pharmaceutical and personal care products in wastewater treatment. **Environmental Science Technology**. 38 (2004) 393-399.
- [20] Urase, T.; Kikuta, T. Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge process. **Water Research**. 39 (2005) 1289-1300.
- [21] Deblonde, T.; Cossu-Leguille, C.; Hartemann, P. Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. 214 (2011) 442-448.
- [22] Kudo, T.; Nakamura, Y.; Ruike, A. Development of rectangular column structured titanium oxide photocatalysts anchored on silica sheets by a wet process. **Research on Chemical Intermediates**. 29 (2003) 631-639.
- [23] Haung, C. P.; Dong, C.; Tang, Z. Advanced chemical oxidation: Its present role and potential future in hazardous waste treatment. **Waste Manage**. 13 (1993) 361-377.
- [24] Davis, A. P.; Huang, C. P. Removal of phenols from water by a photocatalytic oxidation process. **Water Science Technology**. 21 (1989) 455-464.
- [25] Suri, R. P. S.; Liu, J.; Hand, D. W.; Crittenden, J. C.; Perram, D. L.; Mullins, M. E. Heterogeneous photocatalytic oxidation of hazardous organic contaminants in water. **Water Environmental Resource**. 65 (1993) 665-673.
- [26] Sobotka, J. The efficiency of water treatment and disinfection by means of ultraviolet radiation. **Water Science Technology**. 27 (1993) 343-346.
- [27] Esplugas, S.; Gimenez, J.; Contreras, S.; Pascual, E.; Rodriguez, M. Comparison of different advanced oxidation processes for phenol degradation. **Water Research**. 36 (2002) 1034-1042.

- [28] Jiao, S.; Zheng, S.; Yin, D.; Wang, L.; Chen, L. Aqueous photolysis of tetracycline and toxicity of photocatalytic products to luminescent bacteria. **Chemosphere**. 73 (2008) 377-382.
- [29] Trovó, A. G.; Nogueira, R. F. P.; Aguera, A.; Sirtori, C.; Fernández-Alba, A. R. Photodegradation of sulfamethoxazole in various aqueous media: persistence, toxicity and photoproducts assessment. **Chemosphere**. 77 (2009) 1292-1298.
- [30] Giokas, D. L.; Vlessidis, A. G. Application of a novel chemometric approach to the determination of aqueous photolysis rates of organic compounds in natural waters. **Talanta**. 71 (2007) 288-295.
- [31] Kummerer, K. Antibiotics in the aquatic environment – a review – Part I. **Chemosphere**. 75 (2009) 417-434.
- [32] Andreozzi, R.; Raffaele, M.; Nicklas, P. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. **Chemosphere**. 50 (2003) 1319-1330.
- [33] Gaya, U. I.; Abdullah, A. H. Heterogeneous photocatalytic degradation of organic contaminants over titanium dioxide: A review of fundamentals, progress and problems. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**. 9 (2008) 1-12.
- [34] Vogna, D.; Marotta, R.; Napolitano, A.; D'Isschia, M. Advanced oxidation chemistry of paracetamol. UV/H₂O₂-induced hydroxylation/degradation pathways and (15)N-aided inventory of nitrogenous breakdown products. **Journal of Organic Chemistry**. 67 (2002) 6143-6151.
- [35] Vogna, D.; Marotta, R.; Andreozzi, R.; Napolitano, A.; D'Ischia, M. **Chemosphere**. 54 (2004) 497-505.
- [36] Aguera, A.; Pérez Estrada, L. A.; Ferrer, I.; Thurman, E. M.; Malato, S.; Fernández-Alba, A. R. Application of time-of-flight mass spectrometry to the analysis of phototransformation products of diclofenac in water under natural sunlight. **Journal of Mass Spectrometry**. 40 (2005) 908-915.
- [37] Petrovic, M.; Barcelo, D. LC-MS for identifying photodegradation products of pharmaceuticals in the environment. **Trends Analytical Chemistry**. 26 (2007) 486-493.
- [38] Kosjek, T.; Heath, E.; Petrovic, M.; Barcelo, D. Mass spectrometry for identifying pharmaceutical biotransformation products in the environment. **Trends Analytical Chemistry**. 26 (2007) 1076-1085.

- [39] Song, W.; Cooper, W. J.; Mezyk, S. P.; Greaves, J.; Peake, B. M. Free Radical Destruction β -Blockers in Aqueous Solution. **Environmental Science and Technology**. 42 (2008) 1256-1261.
- [40] McDowell, D. C.; Huber, M. M.; Wagner, M.; U. von Gunten; Ternes, T. A. Ozonation of carbamazepine in drinking water: Identification and Kinetic study of major oxidation products. **Environmental Science and Technology**. 39 (2005) 8014-8022.
- [41] Lambropoulou, D. A.; Hernando, M. D.; Konstantinou, I. K.; Thurman, E. M.; Ferrer, I.; Albanis, T. A.; Fernández-Alba, A. R. Identification of photocatalytic degradation products of bezafibrate in TiO₂ aqueous suspensions by liquid and gas chromatography. **Journal of Chromatography A**. 1183 (2008) 38-48.
- [42] Pérez-Estrada, L. A.; Malato, S.; Gernjak, W.; Aguera, A.; Thurman, E. M. Ferrer, I.; Fernández-Alba, A. R. Photo-fenton degradation of diclofenac: identification of main intermediates and degradation pathway. **Environmental Science and Technology**. 39 (2005) 8300-8306
- [43] Doll, T. E.; Frimmel, F. H. Removal of selected persistent organic pollutants by heterogeneous photocatalysis in water. **Catalysis Today**. 101 (2005) 195-202.
- [44] Hu, J.; Cheng, S.; Aizawa, T.; Terao, Y.; Kunikane, S. Products of aqueous chlorination of 17 β -estradiol and their estrogenic activities. **Environmental Science and Technology**. 37 (2003) 5665-5670.
- [45] Doll, T. E.; Frimmel, F. H. kinetic study of photocatalytic degradation of carbamazepine, clofibrac acid, iomeprol and iopromide assisted by different TiO₂ materials – determination of intermediates and reaction pathways. **Water Research**. 38 (2004) 955-964.
- [46] Dantas, R. F.; Canterino, M.; Marotta, R.; Sans, C.; Esplugas, S.; Andreozzi, R. Bezafibrate removal by means of ozonation: Primary intermediates, Kinetics, and toxicity assessment. **Water Research**. 41 (2007) 2525-2532.
- [47] Dodd, M. C.; Huang, C. H. Transformation of the antibacterial agent sulfamethoxazole in reactions with chlorine: Kinetics, mechanism, and pathways. **Environmental Science and Technology**. 38 (2004) 5607-5615.
- [48] S. Perez, P. Eichhorn, D. Barcelo, *Anal. Chem.* 79 (2007) 8239.
- [49] Lam, M. W.; Young, C. J.; Mabury, S. A. Aqueous photochemical reaction kinetics and transformation of fluoxetine. **Environmental Science and Technology**. 39 (2005) 513-522.

- [50] Lovdahl, M. J.; Priebe, S. R. Characterization of clinafloxacin photodegradation products by LC-MS/MS and NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 23 (2000) 521-534.
- [51] Eichhorn, P.; Aga, D.S. Identification of a photooxygenation product of chlortetracycline in hog lagoons using LC/ESI-*ion trap*-MS and LC/ESI-time-of-flight-MS. *Analytical Chemistry*. 76 (2004) 6002-6011
- [52] Chiron, S.; Minero, C.; Vione, D. **Environmental Science and Technology**. 40 (2006) 5997.
- [53] Gomez, M. J.; Sirtori, C.; Mezcuca, M.; Fernández-Alba, A. R.; Agüera, A. Photodegradation study of three dipyrone metabolites in various water systems: identification and toxicity of their photodegradation products. **Water Research**. 42 (2008) 2698-2706.
- [54] Sakkas, V. A.; Calza, P.; Medana, C.; Villioti, A. E.; Baiocchi, C.; Pelizzetti, E.; Albanis, T. Heterogeneous photocatalytic degradation of pharmaceutical agent salbutamol in aqueous titanium dioxide suspensions. **Applied Catalysis B: Environmental**. 77 (2007) 135-144
- [55] Calza, P.; Medana, C.; Pazzi, M.; Baiocchi, C.; Pelizzetti, E. **Applied Catalysis B: Environmental**. 53 (2004) 63-69.
- [56] Silva, J.; Erdtman, B.; Henriques, J. A. P. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre, Ed. Alcance, 2003.
- [57] Sauer, T. P.; Casaril, L.; Oberziner, A. L. B.; José, H. J.; Moreira, R. R. P. M. Advanced oxidation process applied to tannery wastewater containing direct Black 38 – Elimination and degradation Kinetics. **Journal of Hazardous Materials**. 31 (2005) 274-279.
- [58] Bizukoje, E. L.; Miscch, K.; Justsz, A. M.; Kalda, J. Acute toxicity and genotoxicity of Five selected anionic and aniononic surfactants. **Chemosphere**. 58 (2005) 1249-1253.
- [59] Guerra, R. Ecotoxicological and chemical evaluation of phenolic compounds in industrial effluents. **Chemosphere**. 44 (2001) 1737-1747.
- [60] Nunes, B. S.; Carvalho, F. D.; Guilhermino, L. M.; Van Stappen, G. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental Pollution**. 144 (2006) 453-462.
- [61] Skoumal, M.; Rodrigues, R. M.; Cabot, P. L.; Centellas, F.; Garrido, J. A.; Arias, C.; Brillas, E. Electro-Fenton, UVA photoelectro-Fenton and solar photoelectro-Fenton

degradation of the drug ibuprofen in acid aqueous médium using platinum and boron-doped diamond anodes. **Electrochimica Acta**. 54 (2009) 2077-2085.

[62] Weigel, S.; Berger, U.; Jensen, E.; Kallenbom, R.; Thoresen, H.; Huhnerfuss, H. Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Thomso/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. **Chemosphere**. 56 (2004) 583-592.

[63] Pal, A.; Gin, K. Y-H.; Lin, A. Y-C.; Reinhard, M. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. **Science of the Total Environment**. 408 (2010) 6062-6069.

[64] Gurr, C. J.; Reinhard, M. Harnessing. Natural Attenuation of pharmaceuticals and hormones in Rivers. **Environmental Science Technology**. 40 (2006) 2872-2876.

[65] Carballa, M.; Omil, F.; Alder, A. C.; Lema, J. M. Comparison between the conventional anaerobic digestion of sewage sludge and its combination with a chemical or thermal pre-treatment concerning the removal of pharmaceuticals and person care products. **Water Science Technology**. 53 (2006) 109-117.

[66] Richards, S. M.; Cole, S. E. A toxicity and hazard assessment of fourteen pharmaceuticals to *Xenopus laevis* larvae. **Ecotoxicology**. 15 (2006) 647-656.

[67] Dantas, R. F.; Canterino, M.; Marotta, R.; Sans, C.; Esplugas, S.; Andreozzi, R. Bezafibrate removal by means of ozonation: Primary intermediates, Kinetics, and toxicity assessment. **Water Research**. 41 (2007) 2525-2532.

[68] Cermola, M.; Della Greca, M.; Iesce, M. R.; Previtiera, L.; Rubino, M.; Temussi, F.; Brigante, M. Phototransformation of fibrate drugs in aqueous media. **Environmental Chemistry Letters**. 3 (2005) 43-47.

[69] Isidori, M.; Nardelli, A.; Pascarella, L.; Rubino, M.; Parrella, A. Toxic and genotoxic impact of fibrates and their photoproducts on non-target organisms. **Environment International**. 33 (2007) 635-641.

[70] Stumpf M.; Ternes, T. A.; Wilken, R. D.; Rodrigues, S. V.; Baumann, W. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Science Total Environmental**. 225 (1999) 135-41.

[71] Velasco-Santamaría, Y. M.; Korsgaard, B.; Madsen, S. S.; Bjeregaard, P. Bezefibrate, a lipid-lowering pharmaceutical, as a potencial endocrine disruptor in male zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**. 105 (2011) 107-118.

[72] Xekoukoulotakis, N. P.; Drosou, C.; Brebou, C.; Chatzisyneon, E.; Hapeshi, Evroula, H.; Fatta-Kassinou, D.; Mantzavinos, D. Kinetics of UV-A/TiO₂ photocatalytic

degradation and mineralization of the antibiotic sulfamethoxazole in aqueous matrices. **Catalysis Today**. 16 (2011) 163-168.

[73] Wang, A.; Li, Y-Y.; Estrada, A. L. Mineralization of antibiotic sulfamethoxazole by photoelectron-Fenton treatment using activated carbon fiber cathode und under UVA irradiation. **Applied Catalysis B: Environmental**. 102 (2011) 378-386.

[74] Nasuhoglu, D.; Yargeau, V.; Berk, D. Photo-removal of sulfamethoxazole (SMX) by photolytic and photocatalytic processes in a batch reactor under UV-C radiation ($\lambda_{\text{m\acute{a}x}}= 254 \text{ nm}$). **Journal of Hazardous Materials**. 186 (2011) 67-75.

[75] Tixier, C.; Singer, H. P.; Oellers, S.; Mueller, S. R. Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. **Environmental Science & Technology**. 37 (2003) 1061-1068.

[76] Zhang, Y.; GeiBen, S.-U.; Gal, C. Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. **Chemosphere**. 73 (2008) 1151-1161.

[77] Vieno, N. M.; Tuhkanen, T.; Kronberg, L. Seasonal variation in the occurrence of pharmaceuticals in effluents from a sewage treatment plant and in the recipient water. **Environmental Science & Technology**. 39 (2005) 8220-8226.

[78] Packer, J. L.; Werner, J. J.; Latch, D.E.; McNeill, K.; Arnold, W. A. Photochemical fate of pharmaceuticals in the environment: naproxen, diclofenac, clofibric acid, and ibuprofen. **Aquatic Science**. 65 (2003) 342-351.

[79] Ferrari, B.; Mons, R.; Vollat, B.; Fraysse, B.; Paxeus, N.; Lo Giudice, R.; Pollio, A.; Garric, J. Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? **Environmental Toxicology and Chemistry**. 23 (2004) 1344-1354.

[80] Kimura, K.; Hara, H.; Watanabe, Y. Elimination of selected acidic pharmaceuticals from municipal wastewater by na activated sludge system and membrane bioreactors. **Environmental Science & Technology**. 41 (2007) 3708-3714.

[81] Taggart, M. A.; Cuthbert, R.; Das, D.; Sachikumar, C.; Pain, D. J.; Green, R. E.; Feltrer, Y.; Shultz, S.; Cunningham, A. A.; Meharg, A. A. Diclofenac diposition in Indian cow and goat with reference to Gyps vulture population declines. **Environmental Pollution**. 147 (2007) 60-65.

[82] 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 as the cause of vulture population decline in Pakistan. **Nature**. 427 (2004) 630-633.
- [83] Hong, H. N.; Kim, H. N.; Park, K. S.; Lee, S. K.; Gu, M. B. Analysis of the effects diclofenac has on Japanese medaka (*Oryziaslatipes*) using real-time PCR. **Chemosphere**. 67 (2007) 2115-2121.
- [84] Cleuvers, M. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 59 (2004) 309-315.
- [85] Thorpe, K. L.; Cummings, R. I.; Hutchinson, T. H.; Scholze, M.; Brighty, G.; Sumpter, J. P.; Tyler, C. R. Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. **Environmental Science & Technology**. 37 (2003) 1142–1149.
- [86] Colucci, M. S.; Bork, H.; Topp, E. Persistence of estrogenic hormones in agricultural soils: I. 17 β -estradiol and estrone. **Journal of Environmental Quality**. 30 (2001) 2070–2076.
- [87] Colucci, M. S.; Topp, E. Persistence of estrogenic hormones in agricultural soils: II. 17 α -ethinylestradiol. **Journal of Environmental Quality**. 30 (2001) 2077–2080.
- [88] Jürgens, M. D.; Holtaus, K. I. E.; Johnson, C.; Smith, J. L.; Hetheridge, M. Williams, R. J. The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English rivers. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 3 (2002) 480–488.
- [89] Woodruff, T.; Wise, A.; O'Brien, K. Are oral contraceptives a significant contributor to the estrogenicity of drinking water? **Environmental Science & Technology**. 45 (2011) 51-60
- [90] Staples, C. A.; Dome, P. B.; Klecka, G. M.; Oblock, S. T.; Harris, L. R. A review of the environmental fate, effects, and exposures of Bisphenol A. **Chemosphere**. 36 (1998) 2149–2173
- [91] Esplugas, S.; Bila, D. M.; Krause, L. G. T.; Dezotti, M. Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. **Journal Hazard Materials**. 149 (2007) 631-642.
- [92] Chin, Y.-P.; Miller, P. L.; Zeng, L.; Cawley, K.; Weavers, L. K. Photosensitized degradation of Bisphenol A by dissolved organic matter. **Environmental Science Technology**. 38 (2004) 5888-5894.
- [93] Kang, J. H.; Kondo, F.; Katayama, Y. Human exposure to bisphenol A. **Toxicology**. 226 (2006) 79-89.

- [94] Wolstenholme, E. F.; Rissman, E. F.; Connelly, J. J. The role of bisphenol A in shaping the brain, epigenome and behavior. **Hormone and Behavior**. 59 (2011) 296-305.
- [95] Braun, J. M.; Hauser, R. Bisphenol A and children's health. **Current Opinion in Pediatrics**. 23 (2011) 233-239
- [96] Lee, H.B.; Peart, T.E. Determination of bisphenol A in sewage effluent and sludge by solid-phase and supercritical fluid extraction and gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of AOAC International**. 83 (2000) 290–297.
- [97] Welshons, W.V.; Nagel, S.C.; VomSaal, F. S. Large effects from small exposures. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. **Endocrinology**. 147 (2006) S56–S69
- [98] Calafat, A. M.; Ye, X.; Wong, L. Y.; Reidy, J. A.; Needham, L. L. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003–2004, **Environmental Health Perspective**. 116 (2008) 39–44.
- [99] Zhao, J.; Li, Y.; Zhang, C.; Zeng, Q.; Zhou, Q. Sorption and degradation of bisphenol A by aerobic activated sludge. **Journal of Hazardous Materials**. 155 (2008) 305-311.
- [100] Hu, J. Y.; Chen, X.; Tao, G.; Kekred, K. Fate of endocrine disrupting compounds in membrane bioreactor systems. **Environmental Science Technology**. 41 (2007) 4097-4102.

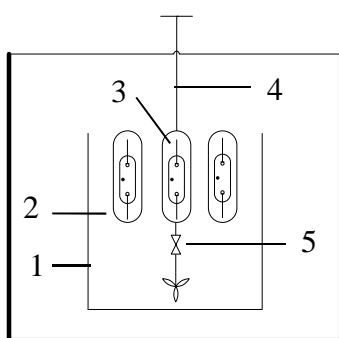
**CAPÍTULO 3: PROCEDIMENTOS DE
DEGRADAÇÃO E TÉCNICAS ANALÍTICAS**

3.1 Testes de Degradação

3.1.1 Montagem do sistema de degradação

Os testes fotocatalíticos foram conduzidos em um equipamento do tipo *jar-test* (Nova Ética, modelo 218/LDB06) (Figura 3.1). Foram realizados diferentes tipos de experimentos a fim de avaliar a degradação dos fármacos em estudo: fotocatalise (presença de TiO_2 e radiação UV), fotólise (ausência de TiO_2 e presença de radiação UV), hidrólise (ausência de TiO_2 e radiação UV) e adsorção (presença de TiO_2 e ausência de radiação UV). Os últimos dois experimentos foram denominados controles. Nos experimentos de fotocatalise e fotólise foram testados dois diferentes tipos de radiação, UV-C e UV-A. Os experimentos com radiação do tipo UV-C foram realizados utilizando uma lâmpada fluorescente germicida (PL-S, Philips, potência nominal de 9 W) que emite luz no comprimento de onda em torno de 254 nm. Os experimentos com radiação do tipo UV-A foram realizados utilizando uma lâmpada fluorescente negra (LY9-H, Ecolume, Potência nominal de 9 W) que emite luz no comprimento de onda em torno de 360 nm, simulando a radiação solar (aproximadamente 3% da radiação solar que atinge a superfície terrestre tem emissão próxima a este comprimento de onda).

Cada um dos experimentos, fotocatalítico e fotolítico, foi realizado utilizando três lâmpadas (UV-A/ UV-C) de 9 W de potência cada, gerando uma potência total de 27 W. As lâmpadas foram colocadas em paralelo no centro das cubas e permaneceram imersas nas soluções dos fármacos estudados, como ilustrado no diagrama esquemático abaixo (Figura 3.1).



(a)



(b)

Figura 3.1- Sistema *jar-test* utilizado para os ensaios de degradação. (a) Desenho esquemático de uma das cubas do *jar-test* contendo as partes: (1) cuba de vidro; (2) tubo

de quartzo; (3) lâmpada fluorescente; (4) agitador mecânico e (5) amostrador. (b) Fotografia do sistema *jar-test*.

3.1.2 Experimentos de degradação

Os padrões de BPA, BZF, EE2, DCF, IBP e SMX, utilizados para o preparo das soluções de degradação foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. Os solventes para as determinações analíticas e demais procedimentos experimentais foram metanol (grau HPLC, J. T. Baker) e água ultrapura mili-Q (obtida num sistema Millipore, Milford, MA, USA). Nos experimentos de fotocatalise heterogênea foi utilizado dióxido de titânio (TiO₂) (Anatase, 99,9 % puro, Sigma Aldrich).

Para os experimentos de degradação preparou-se, em balões volumétricos de 2000 mL, soluções de aproximadamente 5 mg L⁻¹ de cada um dos analitos. Embora essas concentrações sejam bem superiores àquelas normalmente encontradas no ambiente, esses níveis mais altos foram escolhidos para permitir a realização das análises sem que houvesse a necessidade de qualquer tipo de preparo das amostras, facilitando assim as análises e interpretações dos resultados. Todas as soluções foram preparadas em água ultrapura (Mili-Q), e a variação de pH foi entre 6,2 e 6,5. As soluções foram, então, transferidas para as cubas de vidro do *jar-test* (com capacidade de 2000 mL) e ficaram sob agitação por cerca de 30 minutos, antes de iniciar os testes de degradação. Todos os testes foram realizados a temperatura ambiente, com uma pequena faixa de variação (25 ± 2°C).

Nos experimentos de fotocatalise e adsorção, foram adicionados 240 mg de TiO₂ perfazendo uma dosagem de aproximadamente 120 mg L⁻¹ de catalisador na solução a ser tratada fotocataliticamente. Os experimentos de fotólise e hidrólise foram conduzidos sem a adição do catalisador. Além disso, os experimentos de hidrólise foram conduzidos na ausência da fonte de emissão de radiação. As cubas onde foram realizados os experimentos de degradação foram revestidas externamente com material refletivo para garantir que a radiação aplicada não se dissipasse para o meio.

Durante os testes de degradação, o sistema *jar-test* esteve em operação com uma rotação de 250 rpm, correspondendo a um gradiente de velocidade de 400 s⁻¹. Os testes foram realizados em batelada durante um período de 2 horas, e as alíquotas da solução foram coletadas em intervalos de 0, 5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos.

As alíquotas coletadas referentes aos experimentos de fotocatalise heterogênea e adsorção foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 min (Centrífuga Centribio mod. 80-

20), para a remoção do catalisador TiO₂. Decorrido esse tempo, o sobrenadante foi recuperado e armazenado, juntamente com as amostras coletadas para os testes de fotólise e hidrólise, a uma temperatura inferior a 4°C e protegidos de luz até o momento das análises.

3.2 Determinações Analíticas

Os procedimentos analíticos adotados para a verificação da eficiência de remoção e degradação, caracterização de subprodutos e avaliação da toxicidade foram realizados conforme os procedimentos descritos a seguir:

3.2.1 Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas

A determinação e a análise semi-quantitativa dos contaminantes orgânicos e seus intermediários ao longo do processo de degradação foram realizadas por meio de um sistema de cromatografia líquida de alto desempenho acoplado a um espectrômetro de massas híbrido contendo analisadores do tipo *ion trap* e *TOF* em sequência (HPLC-MS-IT-TOF). O cromatógrafo a líquido consiste de um sistema Prominence, equipado com bombas binárias, modelo LC-20AD (ShimadzuCorp., Quioto, Japão) e um amostrador automático modelo SIL 20AC (ShimadzuCorp.). O espectrômetro de massas (Shimadzu IT-TOF) utilizado neste estudo é equipado com fonte de ionização *electrospray* (modo negativo: -3,5 kV; modo positivo: +4,5 kV). O aparelho possui dois analisadores de massas em série: um “*ion trap* (IT)” seguido de um “TOF – *time of flight*”, que confere alta sensibilidade e resolução na obtenção de espectros.

Os métodos de análise empregados no equipamento HPLC-MS-IT-TOF estão descritos abaixo:

Método 1: A fonte de *electrospray* foi operada no modo positivo e negativo simultaneamente, com fluxo de gás de nebulização (N₂) constante a 1,5 L min⁻¹. A interface e o CDL (*curved desolvation line*) foram operadas a uma temperatura constante de 200°C. A faixa de relação massa/carga (*m/z*) analisada foi de 50-500. As amostras foram introduzidas diretamente na fonte ESI através do amostrador automático do HPLC. Foi injetado um total de 5,0 µL de amostra. Neste instrumento, os experimentos MS/MS são feitos através da seleção do íon de interesse no *ion trap*. O íon de interesse é dissociado após colidir com argônio (*collision induced dissociation* – CID). Os íons produzidos neste processo são analisados no analisador de massas TOF.

Método 2: As mesmas condições descritas no método 1 foram utilizadas para o espectrômetro de massas, contudo as amostras foram introduzidas utilizando o sistema cromatográfico. Para a separação cromatográfica utilizou-se uma coluna C18 ACE (100 mm x 2,1 mm x 3 um de diâmetro de partícula). A fase móvel escolhida foi metanol (fase B) e água (fase A). O volume de amostra injetado foi 5,0 μL e o fluxo da fase móvel igual a 0,2 mL min^{-1} . A corrida cromatográfica foi realizada no modo gradiente onde as razões entre os solventes (água/metanol) foram modificadas da seguinte forma: a proporção de metanol em água variou de 30 a 50% em 4 minutos. Em seguida, aumentou-se para 100% de metanol em 3 minutos e estabilizou-se por mais 3 minutos. Finalmente, reduziu-se e estabilizou-se para 30% de metanol em 4 minutos, totalizando 14 minutos de análise cromatográfica.

3.2.2 Carbono Orgânico Total

A análise de carbono orgânico total (COT) baseia-se na determinação de CO_2 produzido pela degradação, por processo oxidativo, da matéria orgânica presente na amostra. As análises para obtenção da concentração de carbono total foram conduzidas no instrumento TOC-VPCH (Shimadzu, Kyoto, Japão). As alíquotas coletadas nos tempos de 0 e 120 minutos de degradação foram injetadas diretamente, sem qualquer diluição.

O programa utilizado forneceu os resultados de Carbono Orgânico Total (COT) através da diferença entre o Carbono Total (CT) e o Carbono Inorgânico (CI) (método indireto).

3.2.3 Testes de Ecotoxicidade – *Artemia salina*

Os testes de ecotoxicidade utilizando *Artemia salina* foram realizados seguindo o protocolo descrito por McLaughlin e colaboradores [1]. Uma solução aquosa de sal marinho (38 g L^{-1}) foi preparada, filtrada e adicionada a um recipiente plástico de aproximadamente 15 cm de diâmetro. Foram adicionados ovos de *Artemia salina* na metade desse recipiente contendo a solução salina. O lado onde foram adicionados os ovos foi mantido ao abrigo da luz, enquanto que a outra metade do recipiente foi continuamente iluminada por uma lâmpada incandescente de 100 W. Após a eclosão dos ovos, os organismos de *Artemia salina* migraram para o lado iluminado, de modo que uma pequena parte desta solução com os indivíduos adultos poderia então ser recolhida e transferida para a realização dos testes.

Os ensaios de toxicidade foram realizados em tubos de ensaio. Em cada um dos tubos foram adicionados 4,0 mL das alíquotas coletadas durante os experimentos de degradação (0, 5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos) e 10 larvas de *Artemia salina*, ajustando-se o volume final para 5,0 mL com a solução salina utilizada no cultivo. Foi realizado, também, testes de controle positivo, onde cada tubo de ensaio continha 4,0 mL de água mili-Q e 1,0 mL da solução de cultivo juntamente com 10 larvas de *Artemia salina*. As larvas foram incubadas na presença de luz, por 24 horas. Após este período contou-se o número de larvas vivas em cada teste. Todos os experimentos de toxicidade foram realizados em triplicata.

3.3 Referências Bibliográficas

[1] MacLaughlin, J. L.; Saizarbitoria, T. C. E.; Anderson, J. E. Revista de La Sociedad Venezolana de Química. 18 (1995) 13-17.

**CAPÍTULO 4: ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO DE
FÁRMACOS E DISRUPTORES ENDÓCRINOS**

4.1 Avaliação da Eficiência de Remoção e Mineralização.

A eficiência de remoção dos analitos alvos (IBP, BZF, SMX, DCF, EE2 e BPA) foi avaliada através das análises por LCMS (Método 2). Para as alíquotas recolhidas durante os processos de degradação (0, 5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos) e submetidas a esta análise, foram calculadas as áreas referentes aos picos cromatográficos para cada composto. Todas as análises foram realizadas no modo negativo de ionização, conforme os cromatogramas de íons extraídos referentes às moléculas deprotonadas, apresentados na Figura 4.1.

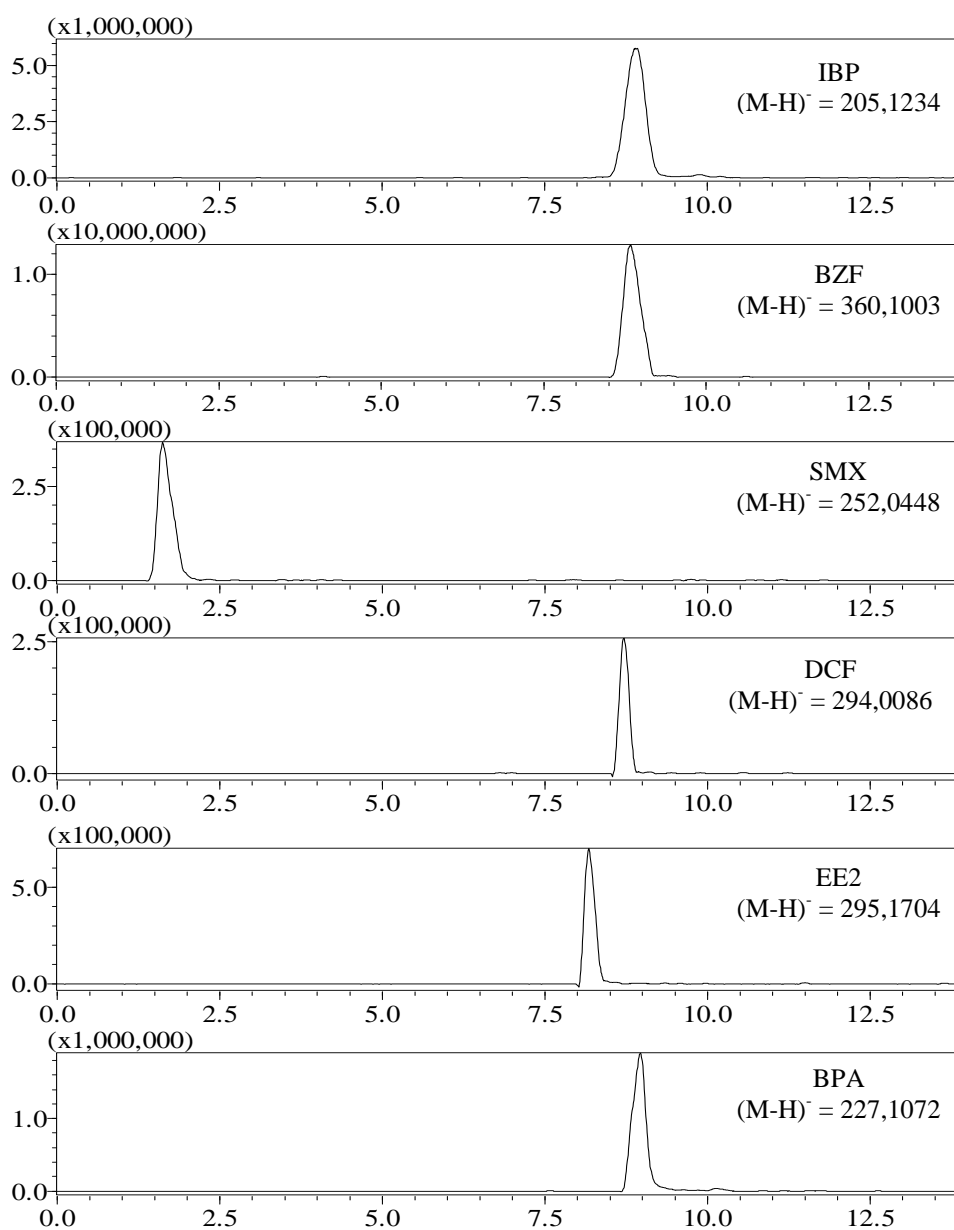


Figura 4.1- Cromatogramas de íons extraídos (IBP, BZF, DCF, SMX, EE2 e BPA), obtidos por HPLC-MS-IT-TOF no modo negativo de ionização por electrospray.

A Tabela 4.1 apresenta as porcentagens de remoção para cada um dos analitos submetidos aos experimentos de degradação: fotocatalise (UV-C/TiO₂ e UV-A/TiO₂), fotólise (UV-C e UV-A) e hidrólise. Os cálculos da porcentagem de remoção foram realizados a partir das áreas obtidas para os picos cromatográficos correspondentes a cada analito. A área correspondente ao tempo de 0 minutos de reação, para cada experimento de degradação, foi considerada 100%, e as áreas dos picos cromatográficos, calculadas para os outros tempos de reação, foram normalizadas em relação a esta área inicial (tempo de 0 minutos).

Os resultados obtidos para os experimentos de hidrólise indicam a estabilidade dos compostos em solução aquosa, pois não foi observada taxa de remoção ao final de 120 minutos. Além disso, os experimentos de adsorção (dados não apresentados) indicaram que a quantidade dos analitos adsorvidos na superfície do TiO₂ também foi desprezível ao final de 120 minutos.

Tabela 4.1- Porcentagem de remoção em cada sistema de degradação após 120 minutos para os analitos IBP, BZF, DCF, SMX, EE2 e BPA.

Analitos	Hidrólise	UV-C		UV-A	
		Fotocatálise	Fotólise	Fotocatálise	Fotólise
IBP	0%	100%	98,9%	92,6%	12,5%
BZF	0%	94,9%	93,9%	90,6%	0%
DCF	0%	100%	100%	77,5%	0%
SMX	0%	100%	100%	66,3%	0%
EE2	0%	23,4%	46,5%	0%	0%
BPA	0%	97,7%	70,2%	76,6%	0%

Para a maioria dos poluentes, os testes de degradação utilizando a fonte de radiação UV-C demonstraram eficiências de remoção que variaram entre 94,6% a 100% e 70,2% a 100% para fotocatalise heterogênea e fotólise, respectivamente. Já o fármaco EE2 apresentou-se mais recalcitrante a estes processos de degradação, pois as taxas de remoção foram mais baixas em comparação aos demais compostos (entre 23,4% e 46,5% para fotocatalise heterogênea e fotólise, respectivamente).

Nota-se que, no geral, as taxas de remoção apresentadas pelo processo de fotólise direta (UV-C) foram tão altas quantos às apresentadas pelo processo de fotocatalise (UV-C/TiO₂), geralmente mais reativo. A explicação para estas altas taxas

de remoção se deve possivelmente à sobreposição parcial do espectro emissão da lâmpada UV-C (100-280 nm com comprimento de onda máximo em 254 nm), sobre a região do espectro de absorção dos analitos alvo (Figura 4.2), propiciando assim a remoção por fotólise direta [1].

Para os testes de degradação utilizando a fonte de radiação UV-A, os resultados apresentados para o processo de fotocatalise heterogênea (UV-A/TiO₂) demonstraram eficiências próximas às observadas nos experimentos utilizando radiação UV-C (fotólise e fotocatalise). As taxas de remoção foram superiores a 66%, com exceção também para o EE2 onde não foi observada nenhuma taxa de remoção. Já para os testes fotolíticos, com radiação UV-A, os resultados são totalmente opostos aos resultados observados com a utilização de radiação UV-C. Apenas o fármaco IBP apresentou uma pequena taxa de remoção, na ordem de 12,5%. Esta baixa eficiência apresentada pelos testes fotolíticos (UV-A) pode ser explicada pela menor absorção dos compostos na região espectral de emissão da lâmpada UV-A (315-400 nm, com $\lambda_{\text{máx}} = 360\text{nm}$) (Figura 4.2). Estes resultados indicam que a remoção por UV-A/TiO₂ foi causada pelas reações com radicais hidroxilas ($\bullet\text{OH}$), gerados a partir do catalisador TiO₂. Um mínimo de 3,2 eV ($\lambda < 388\text{nm}$) é necessário para excitar os elétrons de valência para a banda de condução do TiO₂, e dessa forma permitir a formação de radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) através da interação com as moléculas de água [2].

Os resultados apresentados corroboram com dados encontrados na literatura, onde normalmente sistemas de degradação por fotocatalise heterogêneas com a utilização de catalisadores a base de TiO₂ apresentam altas taxas de remoção de contaminantes, devido a maior eficiência na geração de radicais hidroxila [2]. Outros trabalhos tem destacado tanto a utilização da radiação UV-C em processos fotolíticos [3-5] quanto à utilização da radiação UV-A (simulando a radiação solar) em fotocatalise heterogênea [6-8], como processos alternativos de tratamento, uma vez que estes vêm apresentando resultados satisfatórios na remoção de compostos orgânicos em meio aquoso.

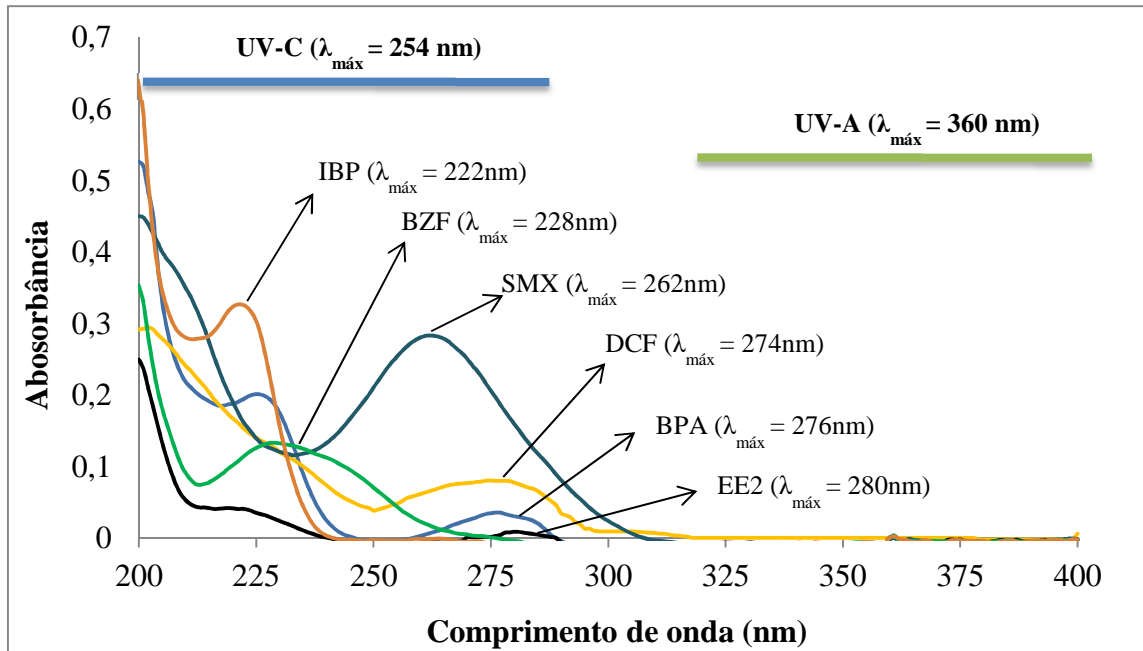


Figura 4.2- Espectros de absorção das soluções aquosas na concentração $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de IBP, BZF, SMX, DCF, BPA e EE2.

Para a avaliação da velocidade de remoção dos compostos nos diferentes sistemas estudados (UV-C/ TiO_2 , UV-C, UV-A/ TiO_2 e UV-A), considerou-se que a remoção segue uma cinética de pseudo-primeira ordem. Sendo assim, foi possível calcular a constante cinética da reação e o tempo de meia-vida (tempo requerido para reduzir em 50% a concentração inicial do contaminante), segundo as equações 11 a 14.

$$\ln \frac{[\text{analito}]}{[\text{analito}_0]} = -k t \quad (11)$$

Quando,

$$[\text{analito}] = 0,5[\text{analito}_0] \quad (12)$$

$$\ln \frac{[0,5\text{analito}_0]}{[\text{analito}_0]} = -k t_{1/2} \quad (13)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (14)$$

Os resultados encontrados estão apresentados nas Tabelas 4.2 e 4.3, para os experimentos utilizando radiação UV-C e UV-A, respectivamente.

Tabela 4.2- Coeficiente de correlação (R^2), constante cinética (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para os experimentos utilizando radiação UV-C.

Analitos	UV-C/TiO ₂			UV-C		
	R^2	k (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)	R^2	k (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)
IBP	0,9918	0,054	12,8	0,9876	0,037	18,7
BZF	0,9939	0,025	28,2	0,9912	0,022	31,1
DCF	0,9778	0,488	2,0	0,9973	0,975	0,7
SMX	0,9934	0,406	1,7	0,9422	1,21	0,6
EE2	0,9911	0,002	288,8	0,9903	0,005	133,3
BPA	0,9943	0,032	21,7	0,9811	0,010	69,3

Tabela 4.3- Coeficiente de correlação (R^2), constante cinética (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para os experimentos utilizando radiação UV-A.

Analitos	UV-A/TiO ₂			UV-A		
	R^2	k (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)	R^2	k (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)
IBP	0,9944	0,022	33,0	0,9437	0,001	693,0
BZF	0,9984	0,021	33,3	-	-	-
DCF	0,9894	0,033	20,8	-	-	-
SMX	0,9907	0,009	80,6	-	-	-
EE2	-	-	-	-	-	-
BPA	0,9951	0,012	63,0	-	-	-

Estes resultados demonstram que apesar do sistema fotocatalítico com radiação UV-A (UV-A/TiO₂) apresentar eficiências de remoção próximas aos dos sistemas fotolíticos e fotocatalíticos com radiação UV-C (UV-C/TiO₂ e UV-C), os tempos de meia vida ($t_{1/2}$) para os sistemas com radiação UV-C são menores, ou seja, a velocidade de remoção é maior. Por UV-C ser uma radiação mais energética comparada à radiação UV-A, esta maior velocidade de remoção é favorecida tanto na remoção por fotocatalise heterogênea, devido a maior eficiência na geração de radicais hidroxila a partir do catalisador TiO₂, quanto pela remoção por fotólise direta.

Para os analitos DCF, SMX e EE2, de acordo com os tempos de meia vida ($t_{1/2}$), o sistema UV-C apresentou uma maior velocidade de remoção quando comparado ao sistema UV-C/TiO₂. Na literatura alguns trabalhos já apresentaram resultados semelhantes para remoção de SMX [3,4] e DCF [9]. A explicação de Nasuhoglu *et al*

[3] para maior taxa de remoção da SMX pelo processo fotolítico (UV-C), é devido à sobreposição quase que completa do espectro de absorção da SMX ($\lambda_{\text{máx}} = 262\text{nm}$) com o espectro de emissão das lâmpadas com radiação UV-C ($\lambda_{\text{máx}} = 262\text{nm}$). Para o DCF e EE2, também nota-se uma maior sobreposição do espectro de absorção ($\lambda_{\text{máx}} = 274$ e 280 nm, respectivamente), o que poderia explicar essa maior taxa de remoção apresentada. Porém, o mesmo não foi observado para BPA ($\lambda_{\text{máx}} = 276$ nm), sendo que este composto apresenta espectros de absorção com comprimentos de onda máximos próximos ao DCF. Dessa forma, não somente o espectro de absorção, mas também outras propriedades químicas das moléculas podem ser fundamentais nesses processos de remoção.

Apesar das altas taxas de remoção apresentadas para quase todos os compostos (UV-C/TiO₂, UV-C e UV-A/TiO₂), com exceção do EE2, a Tabela 4.4 mostra que ocorre apenas a mineralização parcial dos analitos alvo, de acordo com os resultados de COT.

Tabela 4.4- Taxa de mineralização após 120 minutos de experimento de degradação.

Analitos	UV-C		UV-A	
	Fotocatálise	Fotólise	Fotocatálise	Fotólise
IBP	37,7%	10,2%	0%	0%
BZF	54,6%	16,2%	0%	-
DCF	52,2%	9,4%	0%	-
SMX	51,2%	24,8%	0%	-
EE2	0%	0%	-	-
BPA	27,9%	0%	0%	-

Novamente, apesar dos sistemas por fotólise direta apresentarem eficiências de remoção equivalentes aos processos fotocatalíticos com a utilização de radiação UV-C e cinéticas de remoção maiores para alguns dos compostos (DCF, SMX e EE2), as maiores taxas de mineralização são observadas para o sistema fotocatalítico (UV-C/TiO₂). A maior taxa de mineralização observada nos processos por UV-C/TiO₂ foi para o fármaco BZF (54,6%), enquanto que para o sistema UV-C a maior taxa de mineralização apresentada foi para o fármaco SMX (24,8%). Para o fármaco EE2 não foi observada nenhuma taxa de mineralização em ambos os processos (UV-C/TiO₂ e UV-C).

Já para os sistemas de degradação com a utilização de radiação UV-A (fotocatálise e fotólise), apesar de observadas taxas de remoção significativas para os processos fotocatalíticos (Tabela 4.1), não foi observado nenhuma taxa de mineralização para nenhum dos compostos estudados.

Estes resultados indicam que, grande parte da remoção dos compostos se dá pela conversão dos analitos alvo em subprodutos, os quais são persistentes mesmo após 120 minutos expostos aos experimentos de degradação.

4.2 Avaliação da formação de subprodutos e o seu grau de toxicidade

4.2.1 Ibuprofeno

4.2.1.1 Identificação dos subprodutos: proposta de uma rota de degradação.

Como observado na seção 4.1, apesar das taxas de remoção para o IBP serem próximas a 100%, com um tempo de meia vida relativamente baixo (na faixa de 12 a 35 minutos para os sistemas UV-C/TiO₂, UV-C e UV-A/TiO₂), as porcentagens de mineralização atingem no máximo 38% (UV-C/TiO₂).

Para a detecção e identificação dos possíveis subprodutos de degradação do IBP, as alíquotas coletadas durante os experimentos (0, 5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos) foram analisadas por inserção direta via ionização por *electrospray* e detecção por espectrometria de massas de alta resolução (ESI-HRMS), conforme metodologia descrita na seção 3.2.1 (Método 1). Através destas análises foram obtidos os respectivos espectros de massas referentes a cada alíquota coletada, tanto no modo positivo como no modo negativo de ionização. Por exemplo, os espectros de massas obtidos para alíquotas coletadas no sistema UV-C/TiO₂, no modo negativo de ionização são apresentadas na Figura 4.3.

Observa-se que da mesma forma com que a intensidade relativa do íon referente ao fármaco IBP [(M-H)⁻ = 205] decresce, novos íons que não foram detectáveis na solução inicial de IBP (0 minutos) vão surgindo no decorrer dos experimentos de degradação. Um estudo detalhado destes espectros de massas permitiu a identificação de 11 subprodutos (**1-11**) decorrentes da fotodegradação de IBP, todos no modo negativo de ionização. Não foi possível a identificação de nenhum subproduto através dos espectros de massas adquiridos no modo positivo de ionização.

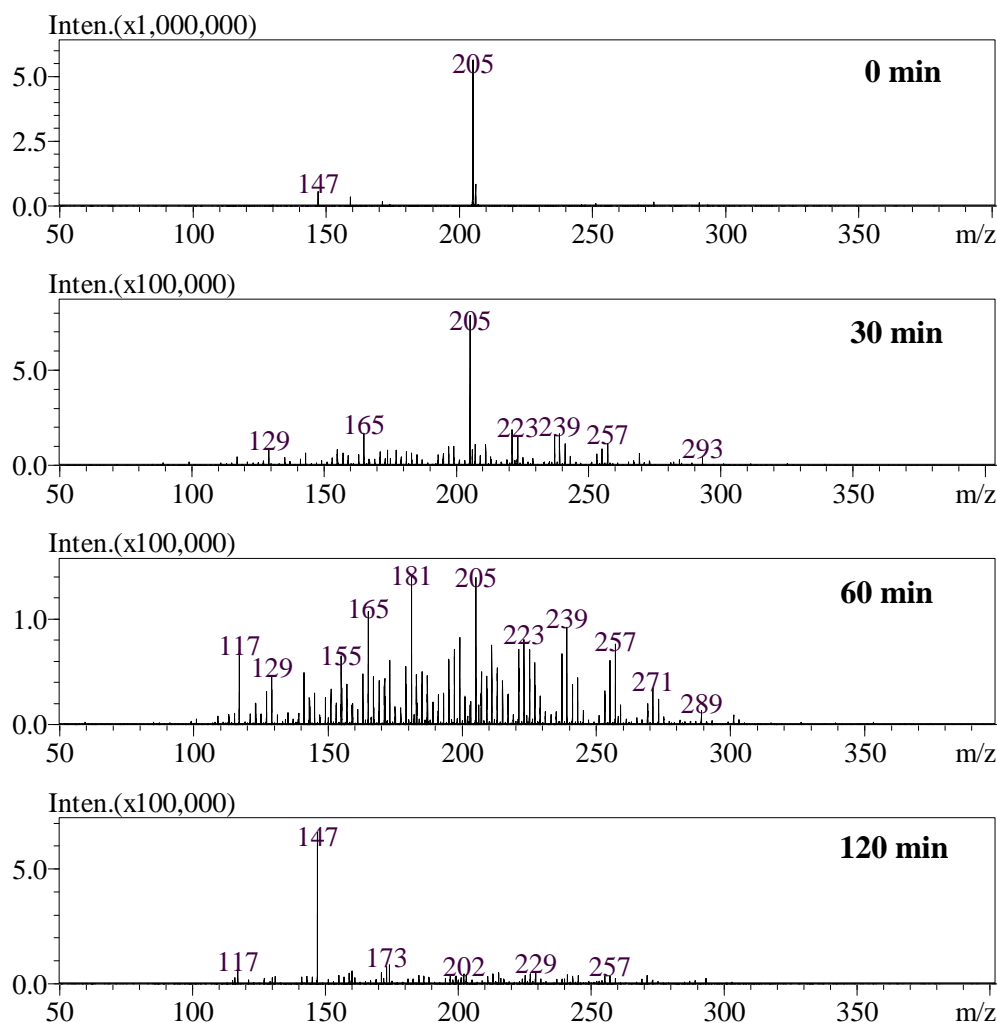


Figura 4.3- Espectros ESI-MS no modo negativo de ionização das alíquotas de degradação de IBP recolhidas a partir do sistema UV-C/TiO₂, nos tempos de 0, 30, 60 e 120 minutos de reação.

Os dados de ESI-HRMS permitiram a proposta de fórmulas moleculares para todos os subprodutos (**1-11**), com um erro máximo de 8 ppm entre as massas experimentais e teóricas para as espécies deprotonadas, conforme descritos na Tabela 4.5. Tal diferença está dentro do valor aceitável de erro descrito para o equipamento IT-TOF (20 ppm), o que possibilita, a identificação das fórmulas moleculares de tais subprodutos. Todos estes subprodutos foram detectados, pelo menos, em uma das alíquotas do processo fotocatalítico (UV-C/TiO₂ e UV-A/TiO₂) ou fotolítico (UV-C).

Tabela 4.5- Fórmula molecular de IBP e seus subprodutos de degradação (calculados através dos dados de ESI-HRMS).

Composto	Fórmula Molecular	Massa Molecular (M) ¹	(M-H) ⁻ Teórica	(M-H) ⁻ Experimental	Erro (ppm)	DBE ²
IBP	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206,1307	205,1234	205,1235	0,47	5
1	C ₁₃ H ₁₈ O ₃	222,1256	221,1183	221,1188	2,17	5
2	C ₁₃ H ₁₈ O ₄	238,1205	237,1132	237,1138	2,38	5
3	C ₁₃ H ₁₈ O ₅	254,1154	253,1076	253,1082	3,16	5
4	C ₁₂ H ₁₈ O ₅	242,1154	241,1081	241,1088	2,70	4
5	C ₁₂ H ₁₈ O ₆	258,1103	257,1031	257,1033	0,92	4
6	C ₁₂ H ₁₈ O	178,1358	177,1285	177,1295	5,64	4
7	C ₉ H ₁₀ O ₃	166,0630	165,0557	165,0570	7,72	5
8	C ₉ H ₈ O ₃	164,0473	163,0401	163,0388	7,73	6
9	C ₉ H ₁₀ O	134,0732	133,0653	133,0651	-1,50	5
10	C ₆ H ₁₀ O ₃	130,0630	129,0557	129,0563	4,64	2
11	C ₅ H ₁₀ O ₃	118,0630	117,0557	117,0556	1,00	1

¹massa molecular calculada pelo software LCMS-Solutions

²Double Bond Equivalence (equivalência de duplas ligações)

Outro parâmetro importante apresentado na Tabela 4.5 é o *Double Bond Equivalence* (DBE). Através deste parâmetro é possível estimar o número de insaturações presente em uma estrutura química, auxiliando na caracterização estrutural proposta para cada subproduto em questão. A fórmula estrutural de todos os subprodutos (**1-11**) identificados está apresentada na Tabela 4.6.

Dentre os subprodutos detectados (**1-11**), diversas estruturas isoméricas podem ser propostas. A estrutura correta (ou estruturas), no entanto, não puderam ser definidas inequivocamente com base nas informações fornecidas por ESI-HRMS. Além disso, o perfil de fragmentação (não apresentado) de cada uma das espécies iônicas (formas deprotonadas de **1-11**) não foi útil, pois o modo MS/MS apresentou a predominância de íons-produto resultante da perda de moléculas de água. Vale ressaltar ainda que não necessariamente apenas uma estrutura possa estar presente como subproduto de degradação, mas sim uma mistura de isômeros, uma vez que a degradação via radicais hidroxila é pouco seletiva.

Tabela 4.6- Estruturas químicas propostas para os subprodutos de degradação do IBP.

Subprodutos	Estrutura Química	Subprodutos	Estrutura Química
1		6	
2		7	
3		8	
4		9	
5		10	
		11	

Depois de identificados e caracterizados os subprodutos propostos na Tabela 4.5, foi possível o monitoramento da evolução de cada subproduto (**1-11**) durante os processos de degradação, através dos cromatogramas obtidos nas análises por HPLC-HRMS (Método 2). Por exemplo, a Figura 4.4 apresenta um cromatograma no modo *Full Scan* e um cromatograma de íons extraídos (*extraction-ion chromatograms* - EIC) (m/z 205,1234, 221,1183 e 133,0651 para IBP e os subprodutos **1** e **9**, respectivamente) para uma alíquota coletada no tempo de 60 minutos de degradação no sistema UV-A/TiO₂.

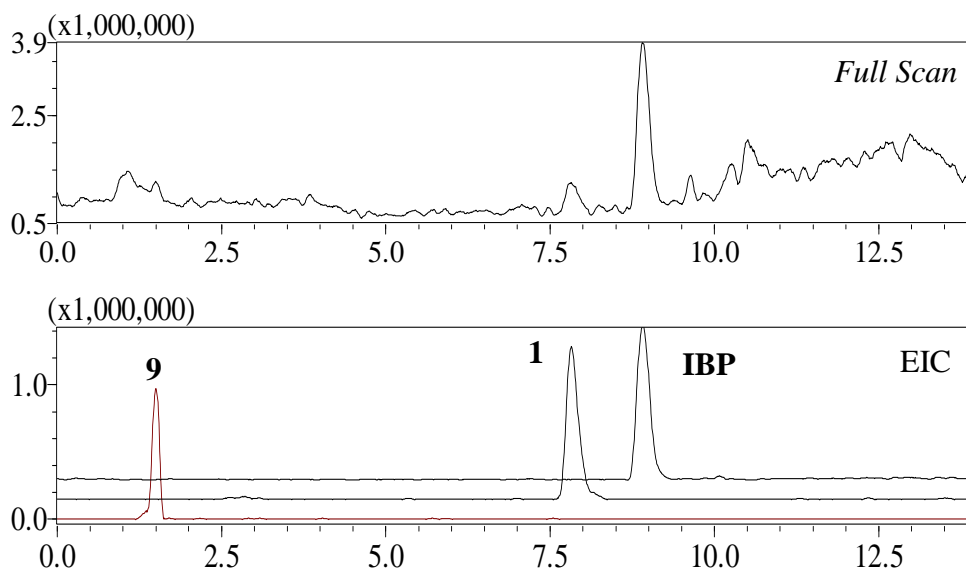


Figura 4.4- Cromatograma em *Full Scan* e EIC (m/z 205,1234, 221,1183 e 133,0651 para IBP, e os subprodutos **1** e **9**, respectivamente) para uma alíquota coletada no tempo de 60 minutos de degradação no sistema UV-A/TiO₂.

Da mesma forma como apresentado neste exemplo (Figura 4.4), cromatogramas de íons extraídos (para todos os subprodutos: **1-11**) foram obtidos para cada uma das alíquotas coletadas a partir dos quatro sistemas de degradação investigados.

Esses dados cromatográficos (áreas dos picos) foram analisados, e dessa forma foi possível a construção de gráficos da área relativa de cada subproduto (**1-11**) em função do tempo de reação. Para facilitar a visualização, somente cinco subprodutos (**1, 6, 8, 10** e **11**) foram selecionados para a construção destes gráficos (Figura 4.5).

Nota-se que, para o sistema fotocatalítico UV-C/TiO₂, somente os subprodutos **10** e **11** persistiram em solução após 120 minutos de exposição (Figura 4.5a). A notável capacidade do sistema UV-C/TiO₂ em gerar radicais hidroxila possivelmente causou a degradação dos outros subprodutos (**1-9**), evitando assim sua acumulação e detecção. Nos experimentos de fotólise direta com radiação UV-C (Figura 4.5b), no entanto, vários subprodutos (**1, 6, 7, 8, 10** e **11**) foram persistentes em solução após o mesmo tempo de degradação. Estes resultados corroboram com os resultados das análises de COT (Tabela 4.4), onde taxas de mineralização mais altas foram alcançadas para o sistema fotocatalítico UV-C/TiO₂, ou seja, há uma menor persistência de subprodutos ao final de 120 minutos de reação. Para os experimentos que envolvem o sistema UV-A/TiO₂ (Figura 4.5c), apenas os subprodutos **7, 8** e **3** não foram persistentes ao final de 120 minutos de reação. Por outro lado, para fotólise com radiação UV-A, somente a

formação do subproduto **1** foi observada após os 120 minutos (Figura 4.5d). Este resultado sugere que a remoção de IBP por radiação UV-A é dada somente pela sua conversão no subproduto **1** e que a energia emitida pela radiação UV-A não é suficiente para promover excitação do subproduto **1**, levando-o à conversão dos outros subprodutos (**2-11**), como observado para os outros sistemas (UV-C/TiO₂, UV-A/TiO₂ e UV- C).

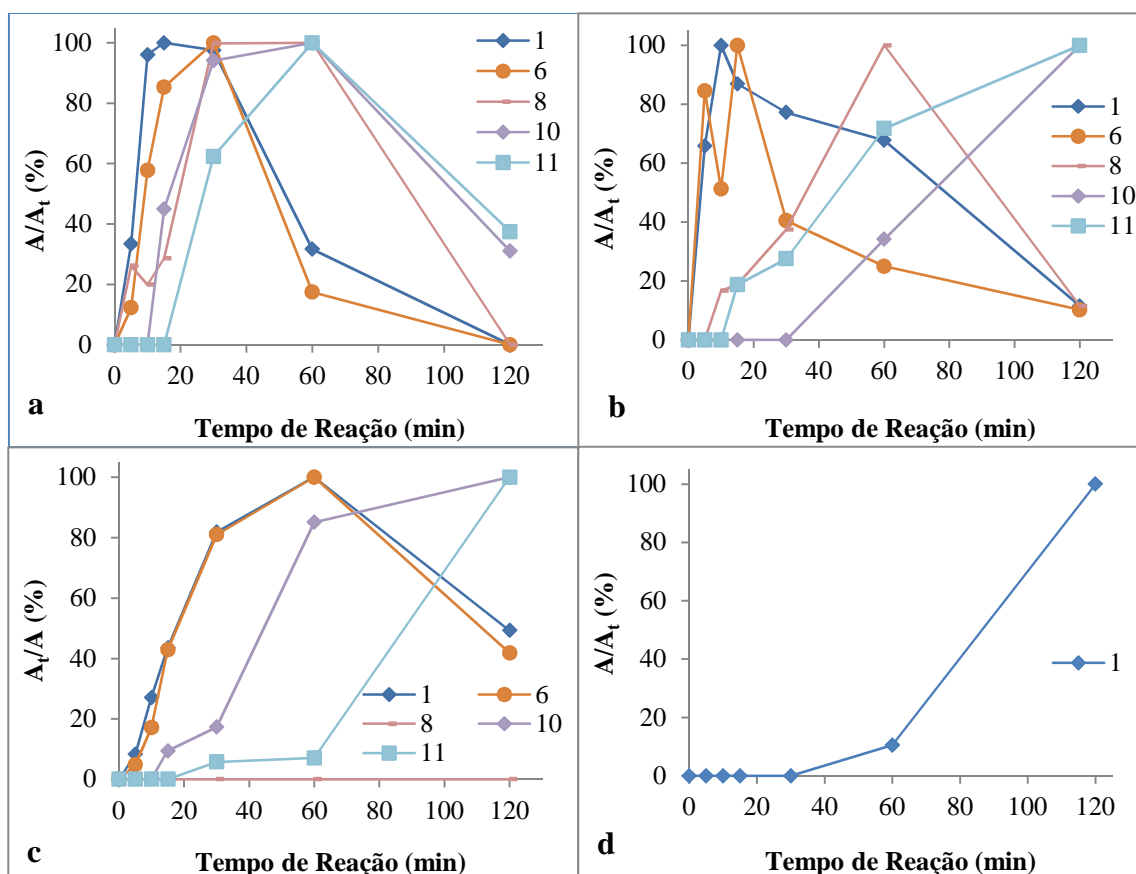


Figura 4.5- Gráfico da porcentagem relativa de área (A_t/A) para os subprodutos de IBP (**1, 6, 8, 10 e 11**) em função do tempo de degradação para os sistemas: (a) UV-C/TiO₂, (b) UV-C. (c) UV-A/TiO₂ e (d) UV-A. A_t e A referem-se as áreas dos picos cromatográficos, onde, A representa a maior área e A_t as áreas nos demais tempos de reação para cada subproduto.

Com base nestes resultados, e sabendo-se da reatividade dos radicais hidroxila frente a moléculas orgânicas em meio aquoso, propôs-se uma rota geral para a fotodegradação de IBP (Figura 4.6) por fotocatalise heterogênea (UV-C/TiO₂ e UV-A/TiO₂) e fotólise (UV-C), uma vez que, a maioria dos subprodutos foram identificados em ambos os procedimentos. Inicialmente, foi proposto que alguns subprodutos são

formados devido à sucessivas reações de hidroxilação sofridas pela molécula de IBP ($C_{13}H_{18}O_2$). Este é o caso do subproduto **1** ($C_{13}H_{18}O_3$) (representado por duas formas isoméricas: α -hidroxicarboxi-IBP e α -hidroxi-isopropil-IBP), **2** ($C_{13}H_{18}O_4$) e **3** ($C_{13}H_{18}O_5$). O subproduto **5** ($C_{12}H_{18}O_6$) também pode ser formado a partir de reações de hidroxilação do subproduto **4** ($C_{12}H_{18}O_5$). Para os demais subprodutos, foi sugerido que a formação pode ocorrer através de outros caminhos alternativos. Por exemplo, os subprodutos **4** ($C_{12}H_{18}O_5$) e **6** ($C_{12}H_{18}O$), são formados possivelmente pela descarboxilação dos subprodutos **3** e **1**, respectivamente. Em sequência, o subproduto **6** ($C_{12}H_{18}O$) pode sofrer uma reação de hidroxilação acarretando na perda do grupo 2-propanol gerando o subproduto **9** ($C_9H_{10}O$) que, por sua vez, após sofrer duas hidroxilações consecutivas, pode dar origem ao subproduto **7** ($C_9H_{10}O_3$). O subproduto **8** ($C_9H_8O_3$) pode ser gerado através da oxidação da função álcool do subproduto **7**. Os subprodutos acíclicos **10** ($C_6H_{10}O_3$) e **11** ($C_5H_{10}O_3$) podem ser gerados através de sucessivas reações de hidroxilação dos subprodutos **8** e **5**, levando à abertura de seus anéis aromáticos. Por fim, estes intermediários (**10** e **11**) podem ser mineralizados. Vale mencionar que alguns desses intermediários (**1**, **2**, **6**, **8** e **9**) já foram previamente relatados por alguns grupos de pesquisa utilizando diferentes procedimentos de degradação [9, 10-16].

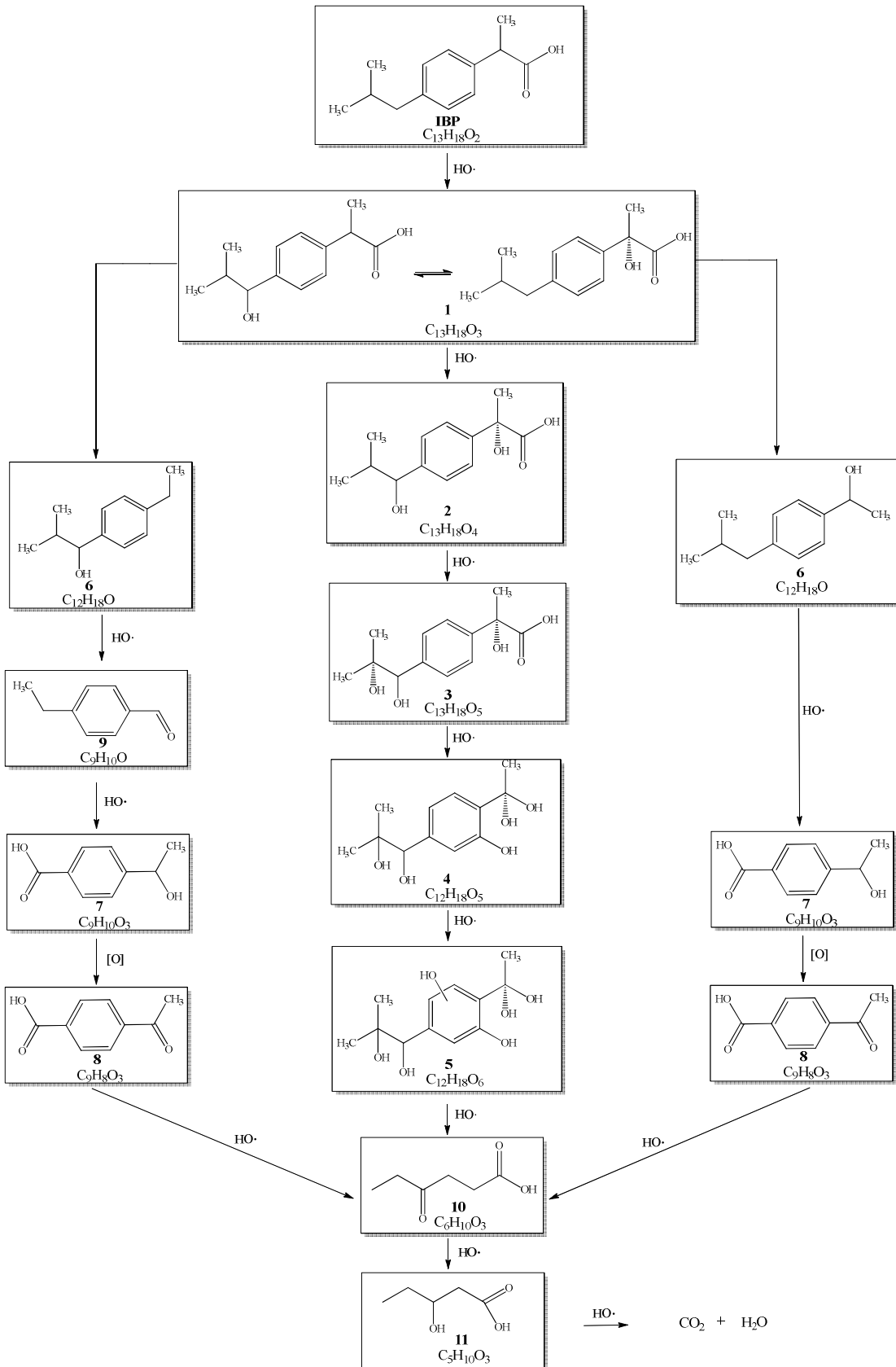


Figura 4.6- Rota de degradação proposta para IBP por fotocatalise heterogênea (UV-C/TiO₂ e UV-A/TiO₂) e fotólise (UV-C).

4.2.1.2 Testes de Ecotoxicidade com *Artemia salina* para IBP.

Embora alguns estudos tenham descrito a degradação de IBP, pouco se sabe sobre a possível geração de subprodutos e seu grau de toxicidade. Como pode ser observado na Figura 4.5, após completa remoção de IBP muitos compostos ainda permanecem em solução, o que pode levar a um impacto potencial sobre o ambiente e, possivelmente, à saúde humana. Para avaliar a toxicidade do IBP e seus subprodutos de degradação foram realizados testes de toxicidade utilizando os microrganismos *Artemia salina*. Estes testes foram realizados com todas as alíquotas recolhidas durante as reações de degradação (0, 5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos) e a taxa de mortalidade foi determinada para cada caso. Um teste controle com solução salina também foi realizado (ver Secção Experimental para mais detalhes), e não foi observada nenhuma taxa de mortalidade após o tempo final de exposição. Ao final dos testes, assim como observada para a solução IBP, as alíquotas recolhidas após um tempo de exposição de 120 min (para os quatro sistemas de degradação: UV-C/TiO₂, UV-A/TiO₂, UV-C, UV-A) exibiram uma toxicidade muito baixa frente ao microrganismo *Artemia salina* (taxas de mortalidade máxima próxima a 10%), conforme demonstrado pela Figura 4.7. Este estudo demonstra, portanto, que tanto os sistemas fotocatalíticos como os sistemas fotolíticos não geram subprodutos com potencial de toxicidade maior que do IBP frente aos organismos *Artemia salina*.

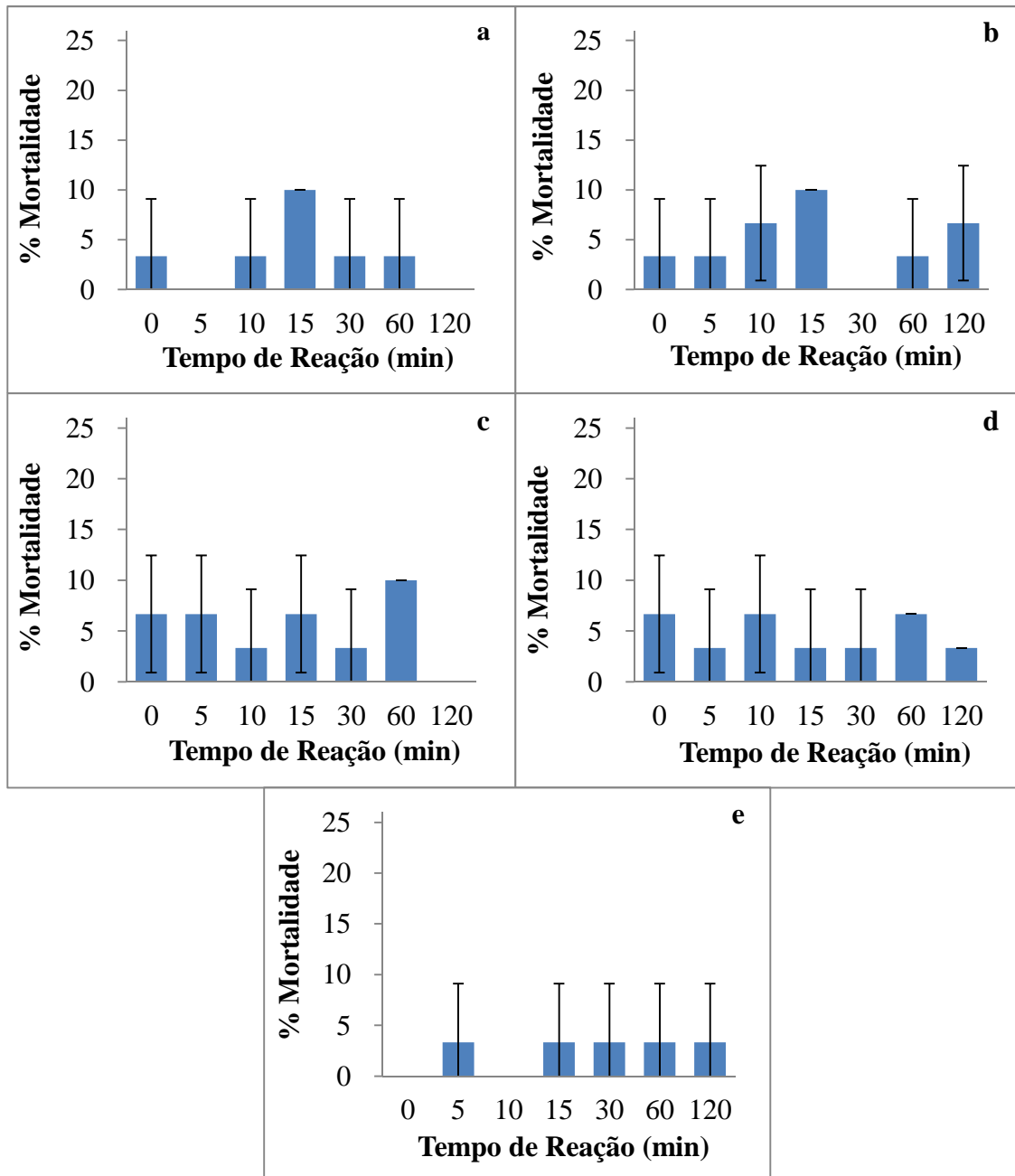


Figura 4.7- Porcentagem de mortalidade para os testes de ecotoxicidade de IBP com *Artemia salina* para os sistemas: (a) UV-C/TiO₂, (b) UV-C, (c) UV-A/TiO₂, (d) UV-A e (e) hidrólise.

4.2.2 Bezafibrato

4.2.2.1 Identificação dos subprodutos: proposta de uma rota de degradação.

Como observado na seção 4.1, apesar dos sistemas de degradação apresentarem altas taxas de remoção (94,9%, 93,8% e 90,6% para os sistemas UV-C/TiO₂, UV-C, e UV-A/TiO₂, respectivamente), com tempos de meia vida relativamente baixos (por volta de 30 minutos), apenas os sistemas UV-C/TiO₂ e UV-C foram capazes de degradar totalmente uma porcentagem da concentração inicial de BZF (taxa de mineralização de 54,6% e 16,2%, respectivamente).

Para a detecção e identificação dos possíveis subprodutos formados, as alíquotas coletadas durante os processos de degradação (0, 5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos) foram analisadas por inserção direta via ionização por *electrospray* e detecção por espectrometria de massas de alta resolução (ESI-HRMS), conforme metodologia descrita na seção 3.2.1 (Método 1). Através destas análises foram obtidos os respectivos espectros de massas referentes a cada alíquota coletada, tanto no modo positivo como no modo negativo de ionização. Por exemplo, os espectros de massas obtidos para alíquotas coletadas no sistema UV-C/TiO₂ no modo negativo de ionização são apresentadas na Figura 4.8.

Observa-se que da mesma forma com que a intensidade relativa do íon referente ao fármaco BZF [(M-H)⁻ = 360] decresce, novos íons que não foram detectáveis na solução inicial de BZF (0 minutos) vão surgindo no decorrer dos experimentos de degradação. Um estudo detalhado destes espectros de massas permitiu a identificação de 11 subprodutos (**1-11**) decorrentes da fotodegradação de BZF, todos no modo negativo de ionização. Não foi possível a identificação de nenhum subproduto através dos espectros de massas adquiridos no modo positivo de ionização.

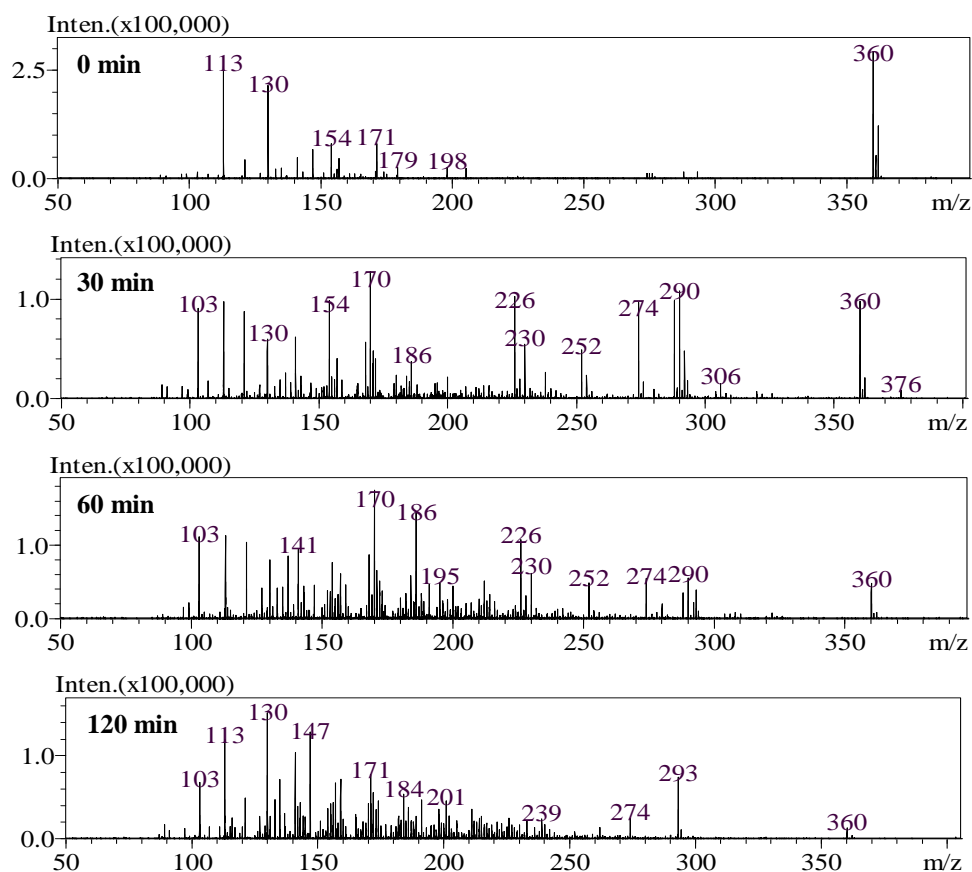


Figura 4.8- Espectros ESI-MS no modo negativo obtidos das alíquotas da degradação de BZF por UV-C/TiO₂, nos tempos de 0, 30, 60 e 120 minutos de reação.

Os dados de ESI-HRMS permitiram a proposta de fórmulas moleculares para todos os subprodutos (**1-11**) com um erro máximo de 9 ppm entre as massas experimentais e teóricas das espécies deprotonadas, conforme descrito na Tabela 4.7. Todos estes subprodutos foram detectados, pelo menos, em uma das alíquotas do processo fotocatalítico (UV-C/TiO₂ e UV-A/TiO₂) ou fotolítico (UV-C).

Tabela 4.7- Fórmula molecular do BZF e seus subprodutos de degradação (calculados através dos dados de ESI-HRMS).

Composto	Fórmula Molecular	Massa Molecular (M) ¹	(M-H) ⁻ Teórica	(M-H) ⁻ Experimental	Erro (ppm)	DBE ²
BZF	C ₁₉ H ₂₀ NO ₄ Cl	361,1081	360,1003	360,1003	0,00	10
1	C ₁₉ H ₂₀ NO ₅ Cl	377,1030	376,0952	372,0946	1,60	10
2	C ₁₅ H ₁₄ NO ₂ Cl	275,0713	274,0635	274,0631	-1,46	9
3	C ₁₅ H ₁₄ NO ₃ Cl	291,0662	290,0584	290,0588	1,38	9
4	C ₁₅ H ₁₅ NO ₃	257,1052	256,0974	256,0980	2,34	9
5	C ₁₅ H ₁₅ NO ₄	273,1001	272,0923	272,0929	2,21	9
6	C ₁₂ H ₁₂ NO ₃ Cl	253,0506	252,0431	252,0427	1,59	7
7	C ₁₅ H ₁₅ NO ₅	289,0950	288,0872	288,0873	0,35	9
8	C ₁₀ H ₁₀ NO ₃ Cl	227,0349	226,0271	226,0275	1,77	6
9	C ₉ H ₁₀ NO ₄ Cl	231,0298	230,0220	230,0231	4,78	5
10	C ₇ H ₆ NO ₂ Cl	171,0087	170,0009	170,0008	-0,59	5
11	C ₄ H ₈ O ₃	104,0473	103,0395	103,0386	-8,73	1

¹massa molecular calculada pelo software LCMS-Solutions

²Double Bond Equivalence (equivalência de duplas ligações)

Através do auxílio do parâmetro DBE foi possível à caracterização estrutural proposta para cada um dos intermediários. A fórmula estrutural de quase todos os subprodutos identificados (**1-10**) está apresentada na Tabela 4.8. O subproduto **11** pode apresentar vários isômeros, desta forma, optou-se por não propor uma única fórmula estrutural. Além disso, para a confirmação das estruturas químicas propostas para cada subproduto, levou-se também em consideração a contribuição isotópica característica para o átomo de cloro (³⁵Cl / ³⁷Cl) presente ou não nos subprodutos propostos, conforme exemplo apresentado na Figura 4.9 (espectro de massas referente aos subprodutos **3** e **4**).

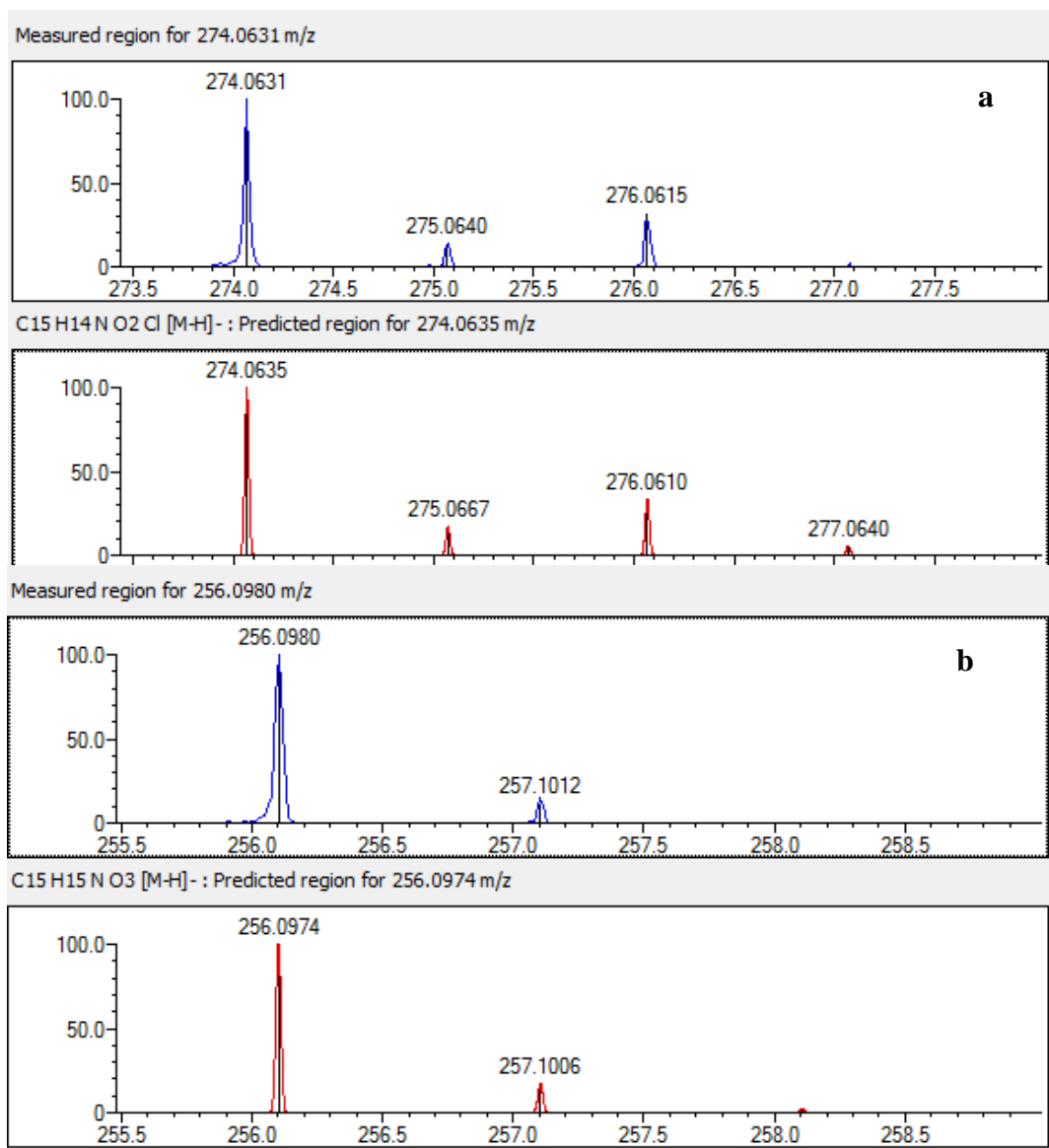


Figura 4.9- Espectros de massas medidos (azul) e teóricos (vermelho), para os subprodutos **3** (a) e **4** (b).

Os espectros de massas em azul representam os dados obtidos através da análise de uma alíquota recolhida nos experimentos de degradação, enquanto que os espectros de massas em vermelho representam os dados comparativos do software Formula Predictor (Shimadzu Corp.). Nota-se que os espectros de massas medido (azul) e teórico (vermelho), são semelhantes tanto para o subproduto **3** quanto para o subproduto **4**. No espectro de massas do subproduto **3** é nítida a contribuição isotópica de aproximadamente 1/3 em virtude da presença de um átomo de ³⁷Cl para o íon de m/z 276,0615 em relação ao íon de m/z 274,0631. Já para o subproduto **4**, não é possível

observar a mesma relação isotópica, uma vez que não existem átomos de cloro presentes em sua estrutura química.

Tabela 4.8- Estruturas químicas propostas para os subprodutos de degradação do BZF.

Subprodutos	Estrutura Química	Subprodutos	Estrutura Química
1		6	
2		7	
3		8	
4		9	
5		10	
		11	C ₄ H ₈ O ₃

Depois que os subprodutos foram identificados e caracterizados (Tabela 4.8), foi possível o monitoramento da evolução de cada subproduto (**1-11**) durante os processos de degradação, através dos cromatogramas obtidos nas análises por HPLC-HRMS (Método 2). Por exemplo, a Figura 4.10 apresenta um cromatograma no modo *Full Scan* e um cromatograma de íons extraídos (EIC) (m/z 360,1003, 256,0980 e 230,0231, para BZF e os subprodutos **4** e **9**, respectivamente) para uma alíquota coletada no tempo de 120 minutos para o sistema UV-C.

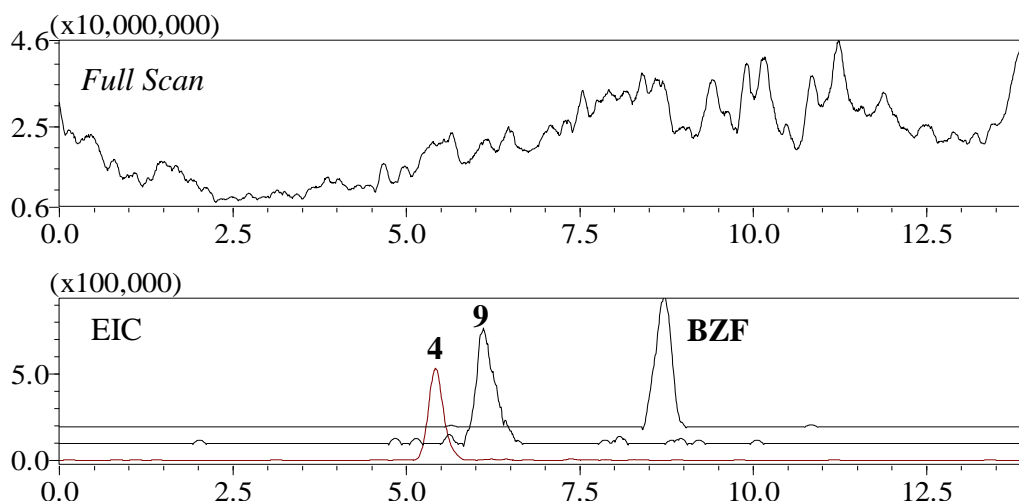


Figura 4.10- Cromatograma em *Full Scan* e EIC (m/z 360,1003, 256,0980 e 230,0231, para BZF e os subprodutos **4** e **9**, respectivamente) para uma alíquota coletada no tempo de 120 minutos para o sistema UV-C.

Da mesma forma como apresentado neste exemplo (Figura 4.10), foram obtidos cromatogramas de íons extraídos para todos os subprodutos (**1-11**) a partir de cada uma das alíquotas coletadas nos sistemas de degradação.

Esses dados cromatográficos (áreas dos picos cromatográficos) foram analisados e, dessa forma, foi possível a construção de gráficos da área relativa para cada subproduto (**1-11**) em função do tempo de reação. Para facilitar a visualização, somente seis subprodutos (**2, 5, 7, 8, 10** e **11**) foram selecionados para a construção destes gráficos (Figura 4.11).

Para o sistema UV-C/TiO₂ (Figura 4.10a), os subprodutos **3, 8, 10** e **11** permaneceram em solução após os 120 minutos de exposição; porém, apenas o subproduto **11** aparece em concentração mais alta, os demais foram quase que completamente degradados. No entanto, um comportamento distinto foi observado para o sistema UV-C (Figura 4.11b), depois de um tempo de exposição idêntico (120 minutos): com exceção do subproduto **1**, todos os outros permaneceram em solução e, além disso, os subprodutos **4, 8, 10** e **11** alcançaram as suas áreas relativas máximas. Para o sistema UV-A/TiO₂ (Figura 4.11c), apenas 5 subprodutos foram perceptíveis (**2, 3, 7, 8** e **11**) e permaneceram até o final de 120 minutos de degradação. Estes resultados corroboram com os resultados das análises de COT (Tabela 4.4), pois, apesar deste sistema apresentar alta taxa de remoção (90,6%), não foi observado nenhuma taxa de mineralização. No sistema fotolítico UV-A não foi observada a formação de nenhum

subproduto, consistente com os resultados apresentados na Tabela 4.1, onde não foi possível observar nenhuma taxa de remoção.

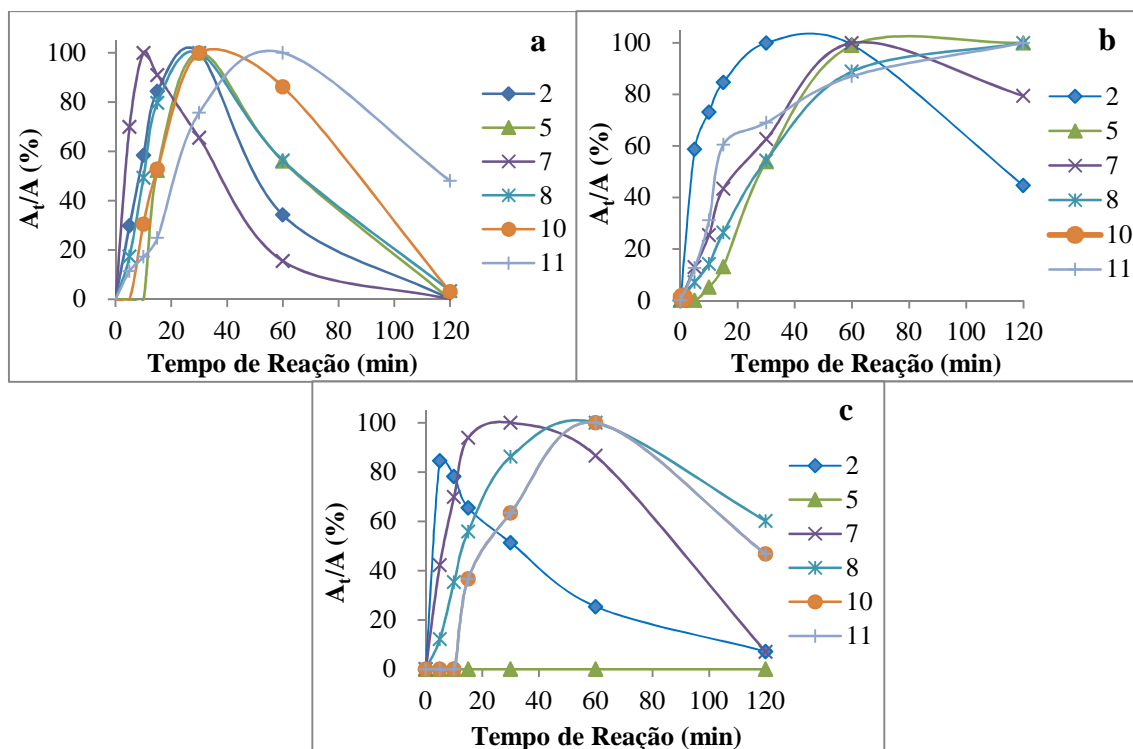


Figura 4.11- Gráfico da porcentagem relativa de área (A_i/A) para os subprodutos de de BZF (**2**, **5**, **7**, **8**, **10** e **11**) em função do tempo de degradação para os sistemas: (a) UV-C/TiO₂, (b) UV-C e (c) UV-A/TiO₂. A_i e A refere-se as áreas dos picos cromatográficos, onde, A representa a maior área e A_i as áreas nos demais tempos de reação para cada subproduto.

Através dos subprodutos caracterizados e apresentados na Tabela 4.8, propôs-se uma rota geral para a fotodegradação de BZF (Figura 4.12) por fotocatalise heterogênea (UV-C/TiO₂ e UV-A/TiO₂) e fotólise (UV-C), uma vez que, a maioria dos subprodutos foram identificados em ambos os procedimentos. Inicialmente, deduz-se que a molécula de BZF (C₁₉H₂₀NO₄Cl) pode sofrer reações de hidroxilação no anel aromático formando subprodutos mono-hidroxilados. Existem duas possibilidades: a primeira seria uma hidroxilação no anel 4-cloro-benzoil e a segunda uma hidroxilação no anel do radical fenóxi, formando os subprodutos **1a** e **1b** (C₁₉H₂₀NO₅Cl), respectivamente. A partir destes dois compostos (**1a** e **1b**), possivelmente poderá ocorrer a perda do ácido metil propiônico, dando origem aos subprodutos **2** (C₁₅H₁₄NO₂Cl) e **4** (C₁₅H₁₅NO₃), respectivamente. Em seguida, reações de hidroxilação nos anéis aromáticos dos compostos **2** e **4** poderão dar origem aos subprodutos **3** (C₁₅H₁₄NO₃Cl) e **5**

($C_{15}H_{15}NO_4$), respectivamente. Tais produtos, conseqüentemente, darão origem ao subproduto **7** ($C_{15}H_{15}NO_5$). O subproduto **6** ($C_{12}H_{12}NO_3Cl$) pode ser formado através de sucessivos ataques de radicais hidroxila levando à abertura do anel aromático. Em seqüência, a cadeia lateral acíclica do composto **6** poderá sofrer oxidação pelo ataque de radicais hidroxila, dando origem aos subprodutos **8** ($C_{10}H_{10}NO_3Cl$), **9** ($C_9H_{10}NO_4Cl$) e **10** ($C_7H_6NO_2Cl$). Por último, os subprodutos **7** e **10**, após sucessivas reações de hidroxilação, poderão sofrer a abertura dos seus anéis aromáticos originando o subproduto **11** ($C_4H_8O_3$) que, nas condições oxidativas a que está submetido, pode ser mineralizado.

Vale ressaltar, que a posição correta dos grupos hidroxila, principalmente na estrutura química de alguns subprodutos (**1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **7**, e **10**), não pode ser conclusivamente estabelecida através dos dados de HRMS, e as informações fornecidas pelos perfis de fragmentação (não apresentadas) também não foram úteis, uma vez que pode-se observar somente a perda de moléculas de água. Por uma questão de simplicidade, apenas um dentre os vários isômeros possivelmente formados nestas condições é representado na Figura 4.12.

Alguns destes intermediários (ou um dos seus isômeros posicionais) já foram previamente relatados. Por exemplo, Lambropoulo e colaboradores [17] estudaram a degradação fotocatalítica com a utilização do catalisador TiO_2 e relataram a formação dos subprodutos **1**, **2** e **8**. Dantas e colaboradores [18] investigaram a oxidação de BZF em solução aquosa utilizando ozônio e relataram a formação do subproduto **8**.

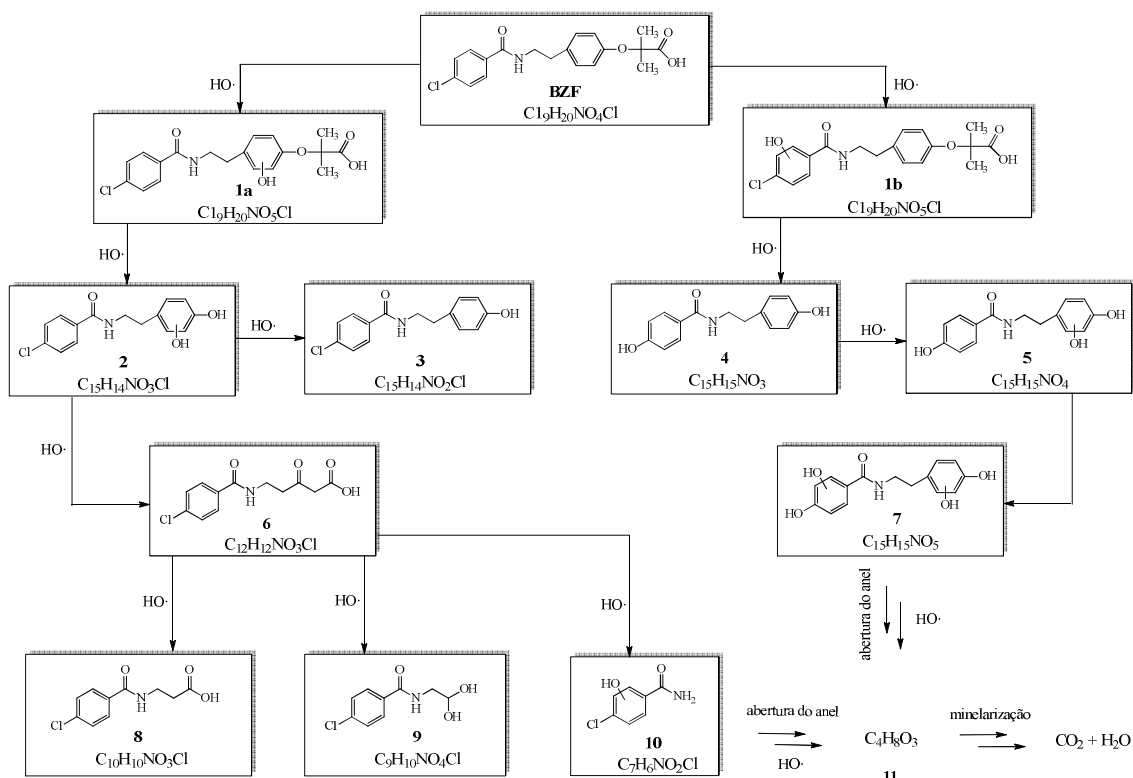


Figura 4.12- Rota de degradação proposta para BZF por fotocatalise heterogênea (UV-C/TiO₂ e UV-A/TiO₂) e fotólise (UV-C).

4.2.2.2 Testes de Ecotoxicidade com *Artemia salina* para BZF.

Os testes de toxicidade foram realizados com o objetivo de avaliar e prever os efeitos tóxicos no ambiente aquático dos compostos que foram gerados a partir da degradação oxidativa do BZF. Assim, realizaram-se os testes em todas as alíquotas coletadas durante os ensaios de degradação (0, 5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos) e avaliou-se a taxa de mortalidade do organismo indicador. Foi realizado também um teste controle somente com a solução salina de eclosão, e não foi observada nenhuma taxa de mortalidade.

Como já discutido anteriormente, para o teste de hidrólise do BZF não foi observado nenhum tipo de degradação e, diante disso, também não foi observada nenhuma taxa de mortalidade após 120 minutos de experimento.

Para os testes envolvendo radiação do tipo UV-C, após o término de 120 minutos de degradação observou-se um aumento de toxicidade (cerca de 80% de mortalidade) para as amostras submetidas ao processo de fotocatalise heterogênea (UV-C/TiO₂). Já nos testes envolvendo fotólise não foi possível observar diferença entre a toxicidade das soluções final e inicial, conforme demonstrado nas Figuras 4.13a e

4.13b, respectivamente. Estes resultados indicam que apesar de haver maior taxa de mineralização no processo de fotocatalise heterogênea (UV-C/TiO₂) em relação aos processos de fotólise (UV-C), os intermediários persistentes ao final de 120 minutos de exposição mostram ser mais tóxicos que o próprio BZF.

Para os testes envolvendo radiação do tipo UV-A, após o término de 120 minutos de degradação também se observou uma alta toxicidade (cerca de 60% de mortalidade) para as amostras submetidas ao processo de fotocatalise heterogênea (UV-A/TiO₂). Já nos testes envolvendo fotólise, não é possível tirar qualquer conclusão com relação a avaliação da toxicidade, pois os resultados obtidos para as soluções coletadas no início e no final dos procedimentos são estatisticamente iguais, conforme demonstrado nas Figuras 4.13c e 4.13d, respectivamente.

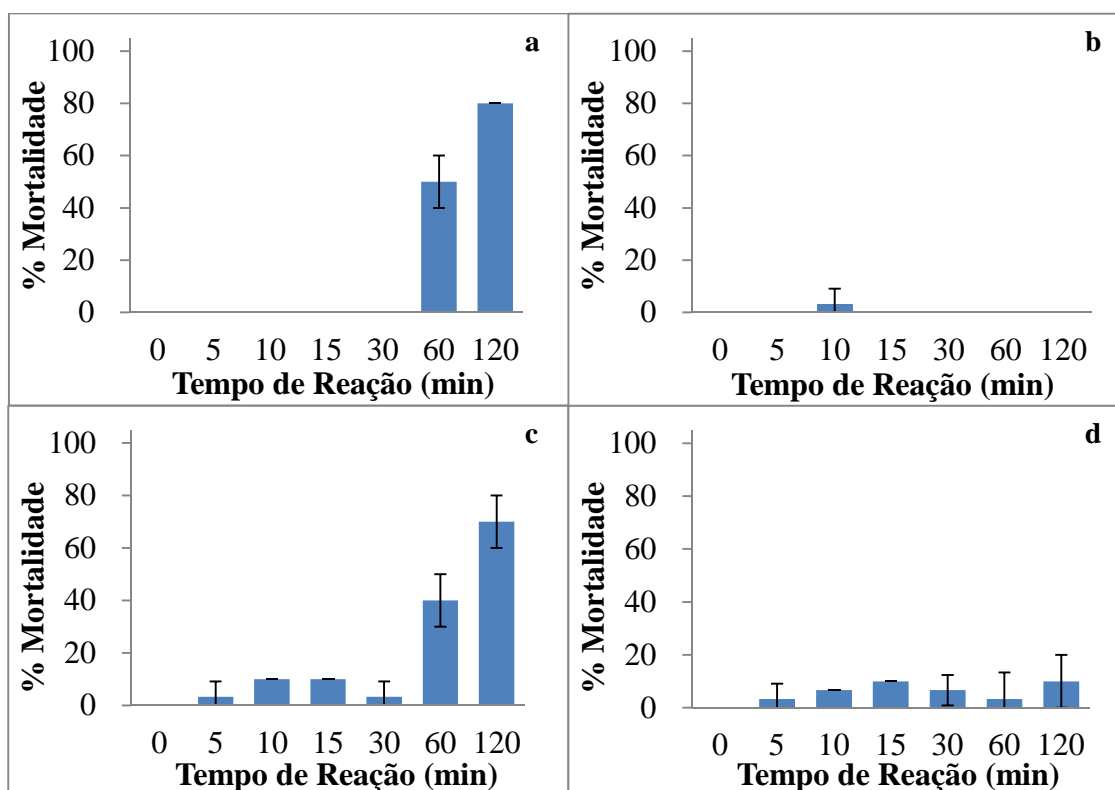


Figura 4.13- Porcentagem de mortalidade para os testes de ecotoxicidade de BZF com *Artemia salina* para os sistemas: (a) UV-C/TiO₂, (b) UV-C, (c) UV-A/TiO₂ e (d) UV-A.

4.2.3 Diclofenaco

4.2.3.1 Identificação dos subprodutos: proposta de uma rota de degradação.

Como observado na seção 4.1, os sistemas de degradação apresentaram altas taxas de remoção (100%, 100% e 77,5%) de DCF para os sistemas UV-C/TiO₂, UV-C e UV-A/TiO₂, respectivamente. Para os sistemas UV-C/TiO₂ e UV-C notou-se que a

remoção de DCF ocorre de forma rápida ($t_{1/2} < 2$ minutos). Porém, mesmo com essa alta velocidade de remoção, a degradação completa de DCF ocorre apenas para os sistemas com utilização da radiação UV-C e com taxas de mineralização de apenas 32,2% e 9,4% (sistemas UV-C/TiO₂ e UV-C, respectivamente).

Para a detecção e identificação dos possíveis subprodutos formados, as alíquotas coletadas durante os processos de degradação (0, 5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos) foram analisadas por inserção direta via ionização por *electrospray* e detecção por espectrometria de massas de alta resolução (ESI-HRMS), conforme metodologia descrita na seção 3.2.1 (Método 1). Através destas análises foi possível a obtenção dos espectros de massas referentes a cada alíquota coletada, tanto no modo positivo como no modo negativo de ionização. Por exemplo, os espectros de massas obtidos a partir das alíquotas recolhidas no sistema UV-C/TiO₂, no modo negativo de ionização, são apresentadas na Figura 4.14.

Observa-se que da mesma forma com que a intensidade relativa do íon referente ao fármaco DCF [(M-H)⁻ = 294] decresce, novos íons que não foram detectáveis na solução inicial de DCF vão surgindo ao longo do processo de degradação. Um estudo detalhado destes espectros de massas permitiu a identificação de 7 subprodutos (**1-7**) decorrentes da fotodegradação de DCF, todos no modo negativo de ionização. Não foi possível a identificação de nenhum subproduto através dos espectros de massas adquiridos no modo positivo de ionização.

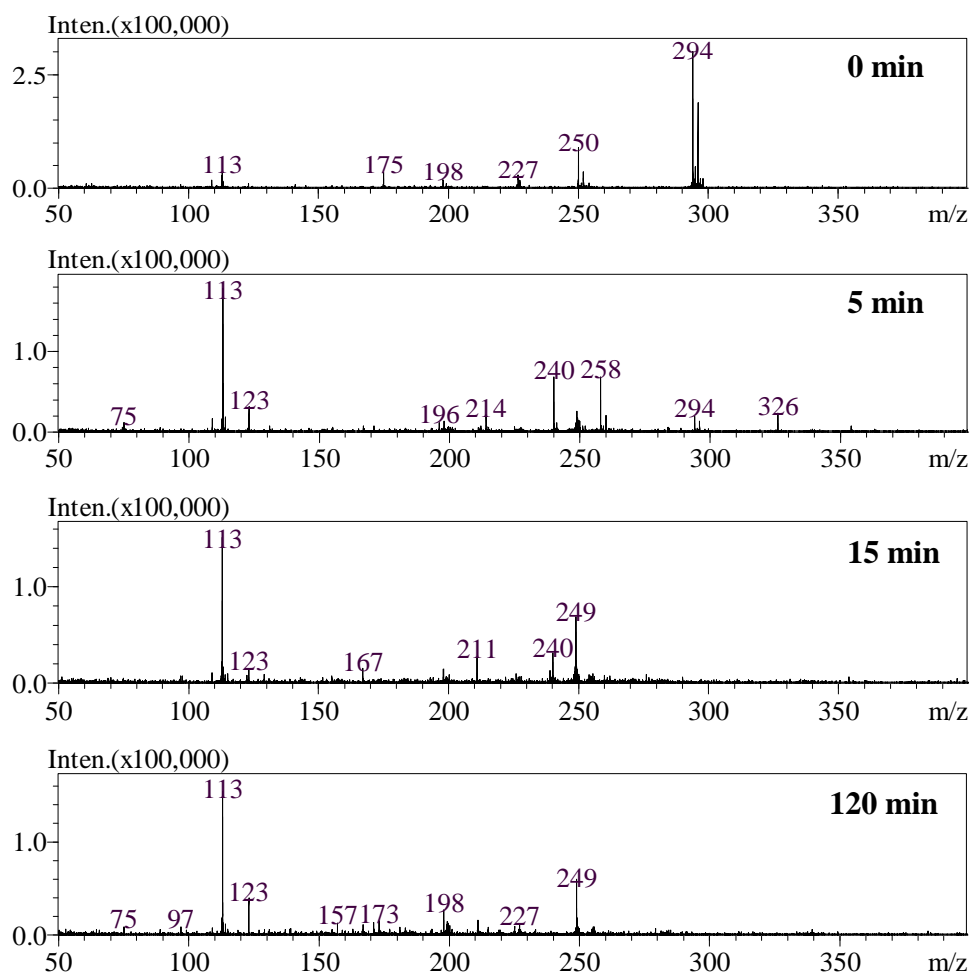


Figura 4.14- Espectros ESI-MS no modo negativo de ionização obtidos das alíquotas da degradação de DCF por UV-C/TiO₂, nos tempos de 0, 5, 15 e 120 minutos de reação.

Os dados de ESI-HRMS permitiram a proposta de fórmulas moleculares para todos os subprodutos (1-7) com um erro máximo de 10 ppm entre as massas experimentais e teóricas das espécies deprotonadas, conforme descrito na Tabela 4.9. Todos estes subprodutos foram detectados, pelo menos, em uma das alíquotas do processo fotocatalítico (UV-C/TiO₂ e UV-A/TiO₂) ou fotolítico (UV-C).

Tabela 4.9- Fórmula molecular do DCF e seus subprodutos de degradação (calculados através dos dados de ESI-HRMS).

Composto	Fórmula Molecular	Massa Molecular (M) ¹	(M-H) ⁻ Teórica	(M-H) ⁻ Experimental	Erro (ppm)	DBE ²
DCF	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	295,0167	294,0089	294,0084	-1,70	9
1	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₃	311,0116	310,0038	310,0052	4,52	9
2	C ₁₄ H ₁₀ ClNO ₂	259,0400	258,0322	258,0319	-1,16	10
3	C ₁₄ H ₁₁ NO ₃	241,0739	240,0661	240,0671	4,17	10
4	C ₁₄ H ₉ NO ₄	255,0532	254,0453	254,0448	-1,97	11
5	C ₁₂ H ₉ NO ₃	215,0582	214,0504	214,0483	-9,81	9
6	C ₁₄ H ₁₃ NO ₁₀	355,0539	354,0461	354,0440	-5,93	9
7	C ₁₃ H ₁₃ NO ₉	327,0590	326,0512	326,0491	-6,44	8

¹massa molecular calculada pelo software LCMS-Solutions

²Double Bond Equivalence (equivalência de duplas ligações)

Através do auxílio do parâmetro DBE, foi possível a caracterização estrutural proposta para cada um dos intermediários. A fórmula estrutural de todos os subprodutos identificados (**1-7**) está apresentada na Tabela 4.10.

Tabela 4.10- Estruturas químicas propostas para os subprodutos de degradação do DCF.

Subprodutos	Estrutura Química	Subprodutos	Estrutura Química
1a		4	
1b		5	
2		6	
3		7	

Depois de identificados e caracterizados os subprodutos (**1-7**, Tabela 4.10), foi possível o monitoramento da evolução de cada um deles durante os processos de degradação, através dos cromatogramas obtidos nas análises por HPLC-HRMS (Método 2). Por exemplo, a Figura 4.15 apresenta um cromatograma no modo *Full Scan* e um cromatograma de íons extraídos (EIC) (m/z 294,0086, 258,0322 e 240,0661, para DCF e os subprodutos **2** e **3**, respectivamente) para uma alíquota coletada no tempo de 30 minutos para o sistema UV-C.

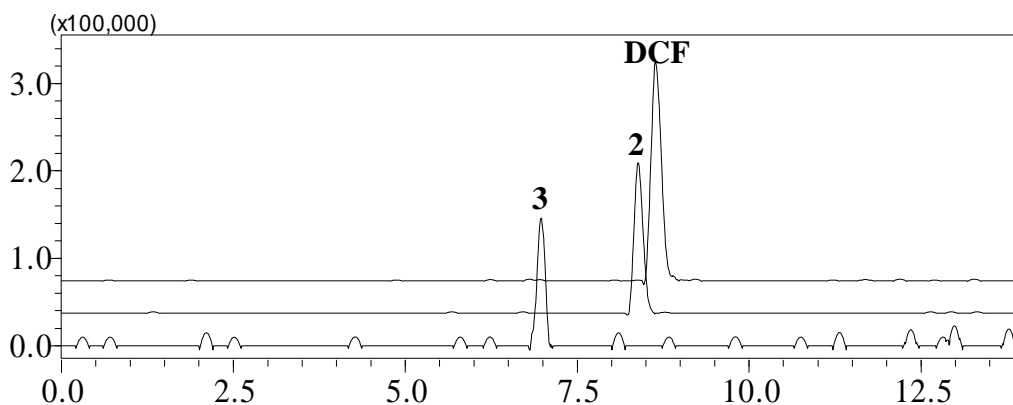


Figura 4.15- Cromatograma em *Full Scan* e EIC (m/z 294,0086, 258,0322 e 240,0661, para DCF e os subprodutos **2** e **3**, respectivamente) para uma alíquota coletada no tempo de 30 minutos para o sistema UV-C.

Da mesma forma como apresentado neste exemplo (Figura 4.15), foram obtidos cromatogramas de íons extraídos para todos os subprodutos (**1-7**) a partir de cada uma das alíquotas coletadas nos sistemas de degradação.

Esses dados cromatográficos (áreas dos picos) foram analisados e, dessa forma, foi possível a construção de gráficos da área relativa para cada subproduto (**1-7**) em função do tempo de reação (Figura 4.16).

Para o sistema UV-C/TiO₂ (Figura 4.16a) nota-se que todos os subprodutos foram degradados após 30 minutos de reação, ou aparecem em concentrações abaixo do limite de detecção do método. O mesmo comportamento foi observado para o sistema UV-C (Figura 4.16b), com exceção do subproduto **4** que permaneceu no sistema, mesmo após os 120 minutos de degradação. Por outro lado, para o sistema UV-A/TiO₂ (Figura 4.16c), observou-se somente a formação do subproduto **1** após 120 minutos de degradação, sugerindo que a remoção de DCF por este sistema (UV-A/TiO₂) pode ser exclusivamente pela sua conversão neste subproduto. Já para o sistema fotolítico UV-A não foi observada a formação de nenhum subproduto, consistente com os resultados apresentados na Tabela 4.1, onde não foi observada nenhuma taxa de remoção. Apesar dos resultados de COT apresentarem taxas parciais de mineralização para o DCF, com o máximo de 52,2 % para o sistema UV-C/TiO₂, não foi possível observar subprodutos persistentes após 120 minutos de degradação. Estes resultados indicam que possivelmente outros subprodutos possam estar sendo gerados, os quais, devido suas propriedades intrínsecas ou mesmo suas baixas concentrações, não puderam ser detectados.

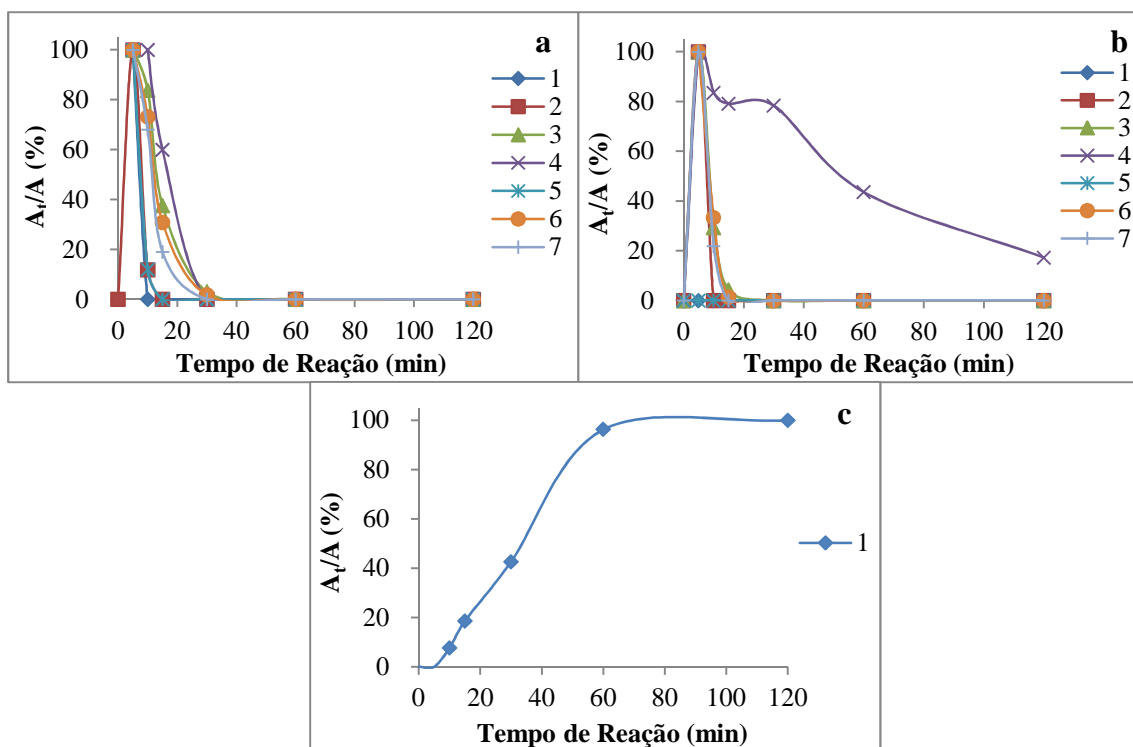


Figura 4.16- Gráfico da porcentagem relativa de área (A_t/A) para os subprodutos de de DCF (**1-7**) em função do tempo de degradação para os sistemas: (a) UV-C/TiO₂, (b) UV-C e (c) UV-A/TiO₂. A_t e A refere-se as áreas dos picos cromatográficos, onde, A representa a maior área e A_t as áreas nos demais tempos de reação para cada subproduto.

Através dos subprodutos caracterizados e apresentados na Tabela 4.10, propõe-se uma rota geral para a fotodegradação de DCF (Figura 4.17) por fotocatalise heterogênea (UV-C/TiO₂ e UV-A/TiO₂) e fotólise (UV-C), uma vez que, a maioria dos subprodutos foram identificados em ambos os procedimentos. Inicialmente, deduz-se que a molécula de DCF (C₁₄H₁₁Cl₂NO₂) pode sofrer ataques de radical hidroxila em diferentes posições nos dois anéis aromáticos presentes na sua estrutura, formando subprodutos mono-hidroxilados, como os subprodutos **1a**, **1b** (C₁₄H₁₁Cl₂NO₃). A formação destes produtos hidroxilados foi detectada em outros processos oxidativos avançados, como fotólise, sonólise e a ozonização [19-22]. Outra rota alternativa de degradação é sugerida através da fotociclização do DCF através da perda de cloro e hidrogênio, dando origem ao subproduto **2** (C₁₄H₁₀ClNO₂). Alguns estudos de fotólise e fotocatalise, também confirmaram esse tipo de reação através de estudos de degradação de DCF [23,24].

Através dos subprodutos **1** e **2** segue-se a formação do subproduto **3** ($C_{14}H_{11}NO_3$), seja pela fotociclização com a perda de hidrogênio e cloro através do subproduto **1**, ou devido à reação de hidroxilação sofrida pelo subproduto **2** [23,24]. Em seguida, reações de hidroxilação no composto **3** poderão dar origem aos subprodutos **4** ($C_{14}H_9NO_4$) e **5** ($C_{12}H_9NO_3$), os quais, através de ataques sucessivos de radicais hidroxila, originarão compostos mais hidroxilados, levando a abertura do anel aromático e formando os subprodutos **6** ($C_{14}H_{13}NO_{10}$) e **7** ($C_{13}H_{13}NO_9$). Por último, os subprodutos **5**, **6** e **7**, após sofrer sucessivas reações de hidroxilação, terão abertura dos seus anéis aromáticos, que, nas condições oxidativas a que estão submetidos, poderão ser mineralizados.

Vale ressaltar que a posição correta dos grupos hidroxila nos subprodutos propostos não pôde ser conclusivamente estabelecida através dos dados de HRMS e as informações fornecidas pelos perfis de fragmentação (não apresentadas) também não foram úteis, uma vez que observou-se somente a perda de moléculas de água. Por uma questão de simplicidade, apenas um dentre os vários isômeros possivelmente formados nestas condições são representados na Figura 4.17.

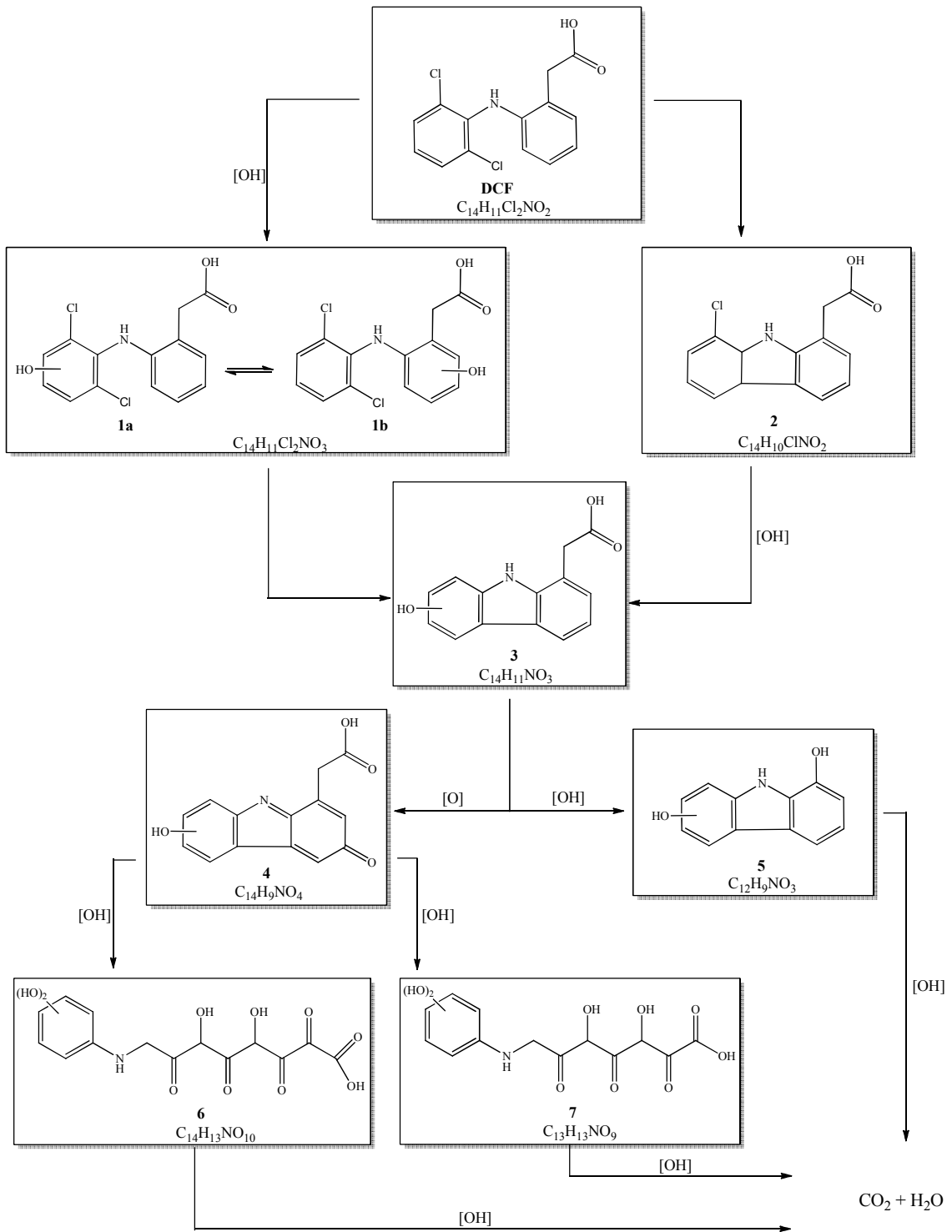


Figura 4.17- Rota de degradação proposta para DCF por fotocatalise heterogênea (UV-C/ TiO_2 e UV-A/ TiO_2) e fotólise (UV-C).

4.2.3.2 Testes de Ecotoxicidade com *Artemia salina* para DCF.

Os testes de toxicidade foram realizados com o objetivo de avaliar e prever os efeitos tóxicos no ambiente aquático dos compostos que foram gerados a partir da degradação oxidativa do DCF. Assim, realizaram-se os testes em todas as alíquotas coletadas durante os ensaios de degradação (0, 5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos) e avaliou-se a taxa de mortalidade do organismo indicador. Foi realizado também um teste controle somente com a solução salina de eclosão e não foi observada nenhuma taxa de mortalidade.

Nos experimentos de hidrólise do DCF não houve alteração na taxa de mortalidade, comparando a solução inicial no tempo de reação de 0 minutos com a solução final no tempo de 120 minutos (Figura 4.18e), o que é condizente com os dados de degradação, pois, não foi possível observar nenhuma taxa de remoção para o DCF.

Para os testes envolvendo radiação do tipo UV-C, após o término de 120 minutos de degradação observou-se um aumento de toxicidade (cerca de 20% de mortalidade) para as amostras submetidas ao processo de fotocatalise heterogênea (Figura 4.18a). Nos testes envolvendo fotólise (Figura 4.18b) observou-se um aumento menor no grau de toxicidade, cerca de 30%, no tempo de 15 minutos de reação, porém, após os 120 minutos de reação, o grau de toxicidade apresentou ser estatisticamente igual a toxicidade observada na solução inicial. Esses dados indicam que, apesar dos experimentos de fotocatalise heterogênea (UV-C/TiO₂), apresentarem as maiores eficiência de remoção e mineralização, os subprodutos persistentes após os 120 minutos de experimento utilizando apresentam-se pouco mais tóxicos que o próprio DCF frente aos microorganismos *Artemia salina*.

Já para os testes envolvendo radiação do tipo UV-A, os resultados foram um pouco diferentes: tanto nos testes envolvendo a fotocatalise heterogênea, como a fotólise, não observou-se nenhum aumento de toxicidade entre as soluções final e inicial, conforme demonstrado nas Figuras 4.18c e 4.18d, respectivamente.

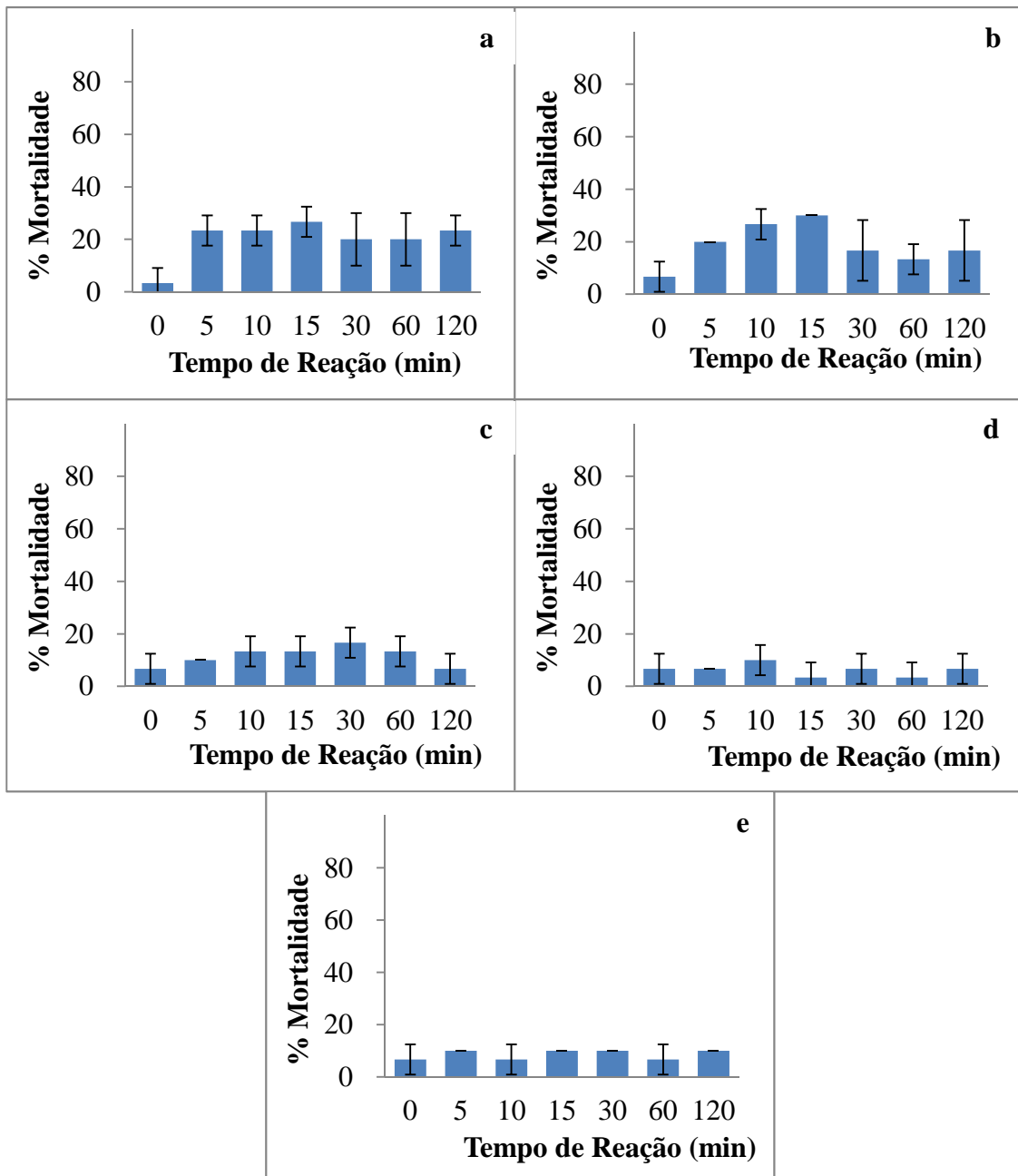


Figura 4.18- Porcentagem de mortalidade para os testes de ecotoxicidade do DCF com *Artemia salina* para os sistemas: (a) UV-C/TiO₂, (b) UV-C, (c) UV-A/TiO₂, (d) UV-A e (e) hidrólise.

4.2.4 Sulfametoxazol

4.2.4.1 Identificação dos subprodutos: proposta de uma rota de degradação.

Como observado na seção 4.1, os sistemas de degradação apresentaram altas taxas de remoção: 100%, 100% e 66,3% para os sistemas UV-C/TiO₂, UV-C, e UV-A/TiO₂, respectivamente. Apesar dos sistemas UV-C/TiO₂ e UV-C apresentarem alta velocidade de remoção da SMX ($t_{1/2} < 2$ minutos), a taxa de mineralização é incompleta (51% e 25%, respectivamente), mesmo após os 120 minutos submetidos aos procedimentos de degradação.

Para a detecção e identificação dos possíveis subprodutos formados, as alíquotas coletadas durante os processos de degradação (0, 5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos) foram analisadas por inserção direta via ionização por *electrospray* e detecção por espectrometria de massas de alta resolução (ESI-HRMS), conforme metodologia descrita na seção 3.2.1 (Método 1). Através destas análises foram obtidos os respectivos espectros de massas referentes a cada alíquota coletada, tanto no modo positivo como no modo negativo de ionização. Por exemplo, os espectros de massas obtidos a partir de alíquotas recolhidas do sistema UV-C/TiO₂, no modo negativo de ionização, são apresentadas na Figura 4.19.

Observa-se que da mesma forma com que a intensidade relativa do íon referente ao fármaco SMX [(M-H)⁻ = 252] decresce, novos íons que não foram detectáveis na solução inicial de SMX (0 minutos) vão surgindo ao decorrer do processo de degradação. Um estudo detalhado destes espectros de massas permitiu a identificação de 9 subprodutos (**1-9**) decorrentes da fotodegradação de SMX, todos no modo negativo de ionização. Não foi possível a identificação de nenhum subproduto através dos espectros de massas adquiridos no modo positivo de ionização.

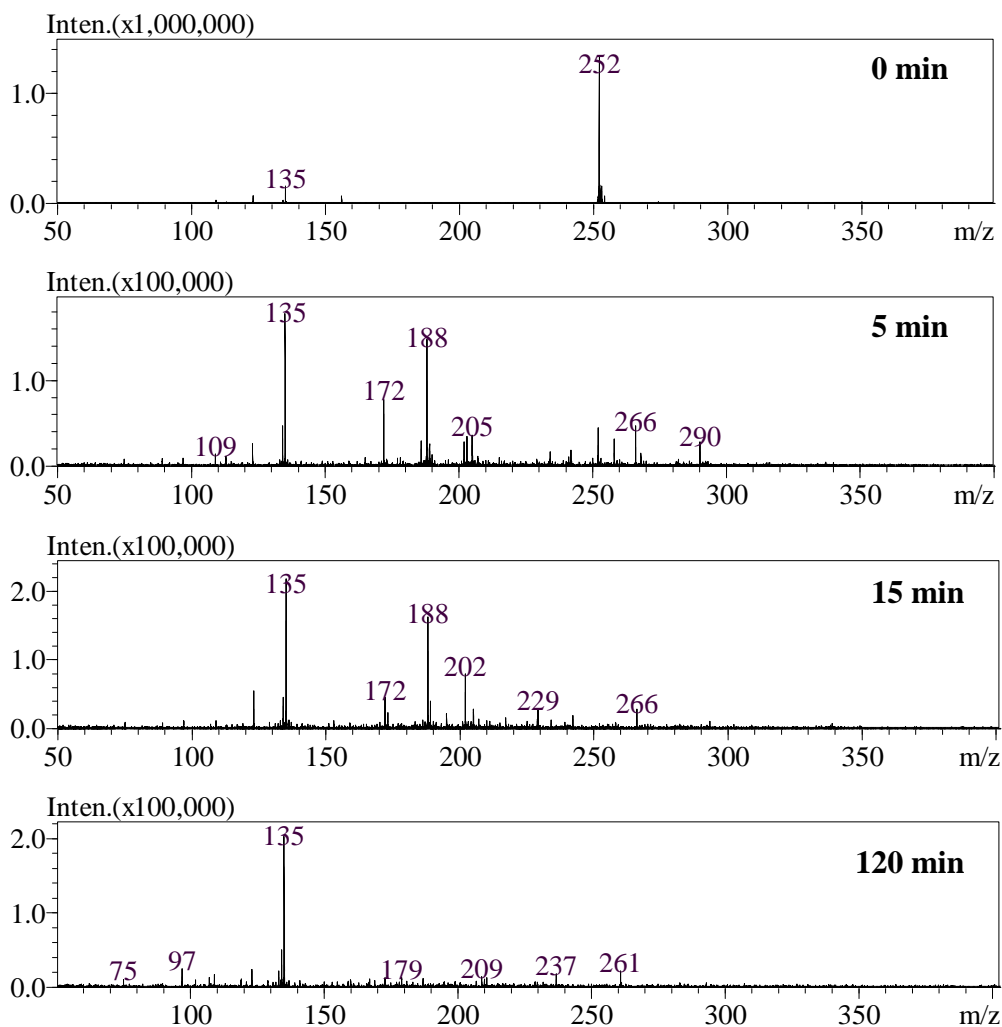


Figura 4.19- Espectros ESI-MS no modo negativo de ionização obtidos das alíquotas da degradação do SMX por $\text{TiO}_2/\text{UV-C}$, nos tempos de 0, 5, 15 e 120 minutos de reação.

Os dados de ESI-HRMS permitiram a proposta de fórmulas moleculares para todos os subprodutos (**1-9**) com um erro máximo menor que 8 ppm entre as massas experimentais e teóricas das espécies deprotonadas, conforme descritos na Tabela 4.11. Todos estes subprodutos foram detectados, pelo menos, em uma das alíquotas do processo fotocatalítico (UV-C/ TiO_2 e UV-A/ TiO_2) ou fotolítico (UV-C).

Tabela 4.11- Fórmula molecular do SMX e seus subprodutos de degradação (calculados através dos dados de ESI-HRMS).

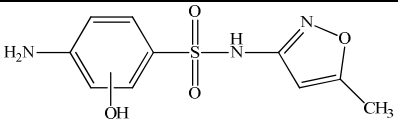
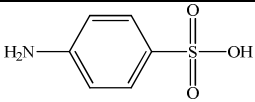
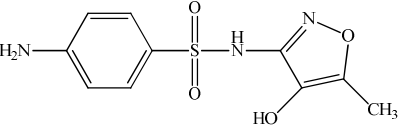
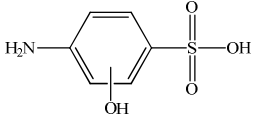
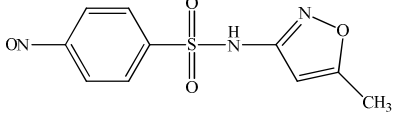
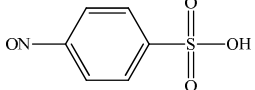
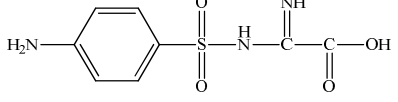
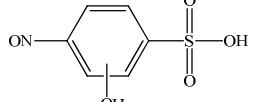
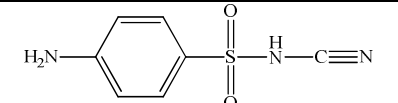
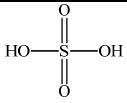
Composto	Fórmula Molecular	Massa Molecular (M) ¹	(M-H) ⁻ Teórica	(M-H) ⁻ Experimental	Erro (ppm)	DBE ²
SMX	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	253,0521	252,0443	252,0446	1,19	7,0
1	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₄ S	269,0470	268,0392	268,0401	3,36	7,0
2	C ₁₀ H ₉ N ₃ O ₄ S	267,0314	266,0236	266,0242	2,26	8,0
3	C ₈ H ₉ N ₃ O ₄ S	243,0314	242,0236	242,0225	-4,55	6,0
4	C ₇ H ₇ N ₃ O ₂ S	197,0259	196,0181	196,0175	-3,06	6,0
5	C ₆ H ₇ NO ₃ S	173,0147	172,0068	172,0077	5,23	4,0
6	C ₆ H ₇ NO ₄ S	189,0096	188,0018	188,0022	2,13	4,0
7	C ₆ H ₅ NO ₄ S	186,9939	185,9861	185,9854	-3,76	5,0
8	C ₆ H ₅ NO ₅ S	202,9888	201,9810	201,9816	2,97	5,0
9	H ₂ SO ₄	97,9474	96,9596	96,9603	7,22	0,0

¹massa molecular calculada pelo software LCMS-Solutions

²Double Bond Equivalence (equivalência de duplas ligações)

Através do auxílio do parâmetro DBE foi possível a caracterização estrutural proposta para cada um dos intermediários. As fórmulas estruturais de todos os subprodutos (**1-9**) identificados estão apresentadas na Tabela 4.12.

Tabela 4 12- Estruturas químicas propostas para os subprodutos de degradação SMX.

Subprodutos	Estrutura Química	Subprodutos	Estrutura Química
1a		5	
1b		6	
2		7	
3		8	
4		9	

Depois que os subprodutos foram identificados e caracterizados (Tabela 4.11), foi possível o monitoramento da evolução de cada um deles durante os processos de degradação por análises por HPLC-HRMS (Método 2). Por exemplo, a Figura 4.20 apresenta um cromatograma em *Full Scan* e um cromatograma de íons extraídos (m/z 252,0448, 266,0236 e 172,0068 para SMX e os subprodutos **2** e **5**, respectivamente) gerados a partir da análise de uma alíquota coletada no tempo de 5 minutos para o sistema UV-C.

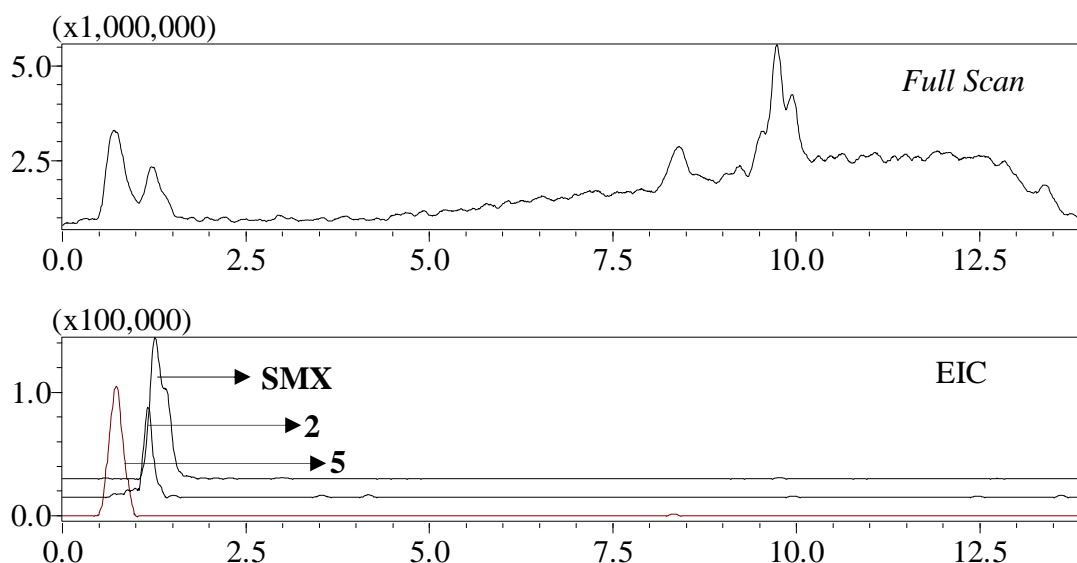


Figura 4.20- Cromatograma em *Full Scan* e EIC (m/z 252,0448, 266,0236 e 172,0068 para SMX e os subprodutos **2** e **5**, respectivamente) para uma alíquota coletada no tempo de 5 minutos para o sistema UV-C.

Da mesma forma como apresentado neste exemplo (Figura 4.20), cromatogramas de íons extraídos (para os subprodutos **1-9**) foram obtidos para cada uma das alíquotas coletadas a partir dos quatro sistemas de degradação investigados. Esses dados cromatográficos (áreas dos picos cromatográficos) foram analisados e, dessa forma, foi possível a construção de gráficos da área relativa de cada subproduto (**1-9**) em função do tempo de reação (Figura 4.21).

Para o sistema UV-C/TiO₂ (Figura 4.21a) quase todos os subprodutos identificados (**1-9**) atingiram sua concentração máxima relativa até 10 minutos de experimento e praticamente todos foram degradados até 60 minutos; apenas os subprodutos **7** e **9** foram persistentes após os 120 minutos de degradação. Já para o sistema UV-C (Figura 4.21b), nota-se um comportamento totalmente distinto: apenas os subprodutos **1**, **2** e **3** foram completamente degradados até 60 minutos de experimento,

enquanto que todos os outros subprodutos (4-9) permaneceram em solução após 120 minutos. Nos sistemas onde se utilizou a radiação UV-A, apenas no processo envolvendo a fotocatalise heterogênea (UV-A/TiO₂, Figura 4.21c) foi possível observar a formação de subprodutos de degradação. No sistema fotolítico UV-A, não foi observado a formação de nenhum subproduto, consistente com os resultados de degradação descritos na Tabela 4.1. Pôde-se notar no sistema UV-A/TiO₂, que alguns dos subprodutos identificados (3 e 6) atingiram sua concentração máxima no tempo de 30 minutos, enquanto que outros subprodutos (1, 2, 4 e 5) identificados atingiram sua concentração máxima no final dos experimentos (120 minutos). Com relação aos outros subprodutos (7, 8 e 9), os mesmos não puderam ser detectados. Esses resultados são coerentes com os apresentados na seção 4.1, e indicam, que apesar dos sistemas menos energéticos (radiação UV-A) apresentarem altas taxas de remoção, a cinética de degradação dos subprodutos que são gerados no decorrer do experimento é mais lenta.

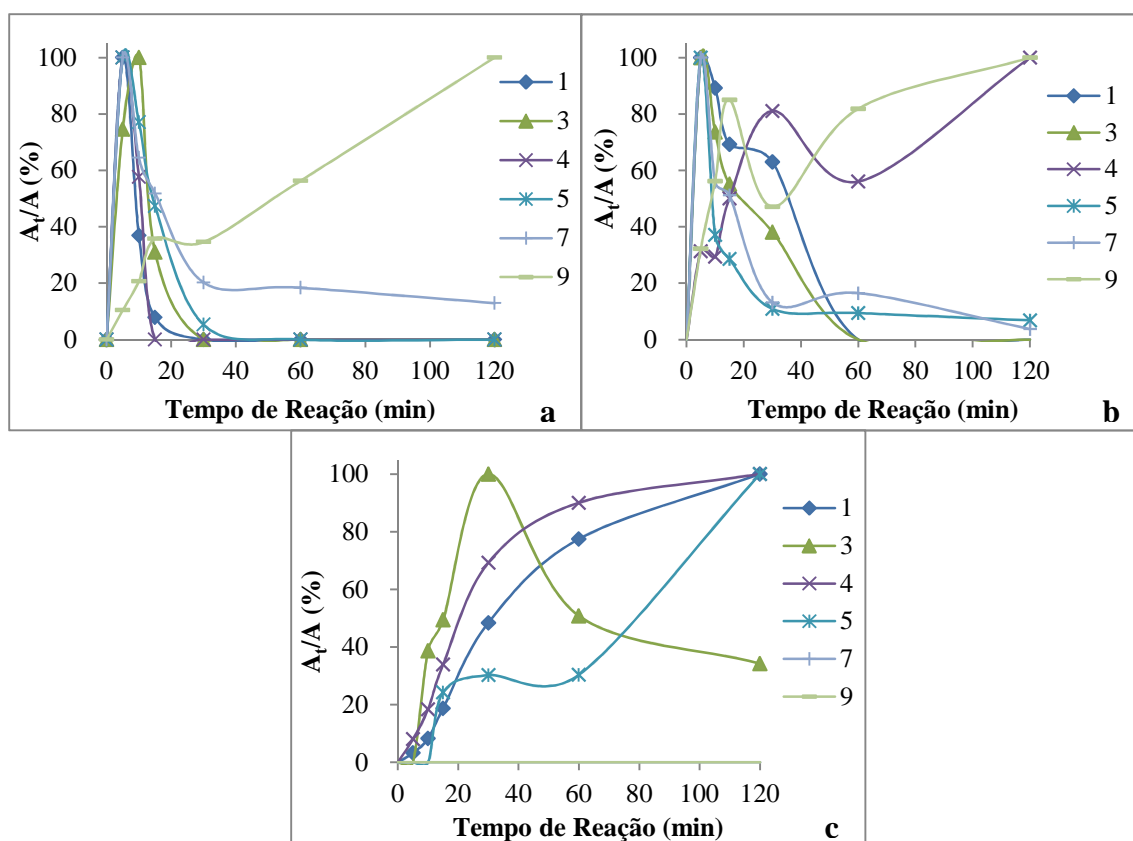


Figura 4.21- Gráfico da porcentagem relativa de área (A_t/A) para os subprodutos de SMX (1, 3, 4, 5, 7 e 9) em função do tempo de degradação para os sistemas: (a) UV-C/TiO₂, (b) UV-C e (c) UV-A/TiO₂. A_t e A refere-se as áreas dos picos cromatográficos, onde, A representa a maior área e A_t as áreas nos demais tempos de reação para cada subproduto.

Através dos subprodutos caracterizados e apresentados na Tabela 4.12, propõe-se uma rota geral para a fotodegradação de SMX (Figura 4.22) por fotocatalise heterogênea (UV-C/TiO₂ e UV-A/TiO₂) e fotólise (UV-C), uma vez que, a maioria dos subprodutos foram identificados em ambos os procedimentos. Inicialmente, é proposto que a molécula de SMX (C₁₀H₁₁N₃O₃S) pode sofrer reações de hidroxilação tanto no anel aromático como também no anel isoxazol, formando os subprodutos mono-hidroxilados **1a** e **1b** (C₁₀H₁₁N₃O₄S), respectivamente. O subproduto **2** (quinona, C₁₀H₉N₃O₄S) pode ser formado pela oxidação do subproduto **1b**, enquanto que a formação dos subprodutos **3** (C₈H₉N₃O₄S) e **4** (C₇H₇N₃O₂S) pode ocorrer a partir de ataques de radicais hidroxilas no anel isoxazol (**2**) e abertura do mesmo. Em sequência, o subproduto **5** (C₆H₇NO₃S) pode ser formado por ataque de radicais hidroxila na ligação nitrogênio-enxofre (S-N) dos subprodutos **3** e **4**. A formação do produto de degradação **6** (C₆H₇NO₄S) pode se dar por meio de duas rotas distintas: através da hidroxilação do anel aromático do subproduto **5** ou por ataque de radicais hidroxila na ligação nitrogênio-enxofre (S-N) do subproduto **1a**. Na sequência, o subproduto **6** pode sofrer oxidação dando origem aos subprodutos **7** (C₆H₅NO₄S) e **8** (C₆H₅NO₅S). Os sucessivos ataques de radicais hidroxilas nos anéis aromáticos do subproduto **8** poderá gerar o subproduto **9** (ácido sulfúrico, H₂SO₄) e outras pequenas moléculas, como dióxido de carbono e água (mineralização).

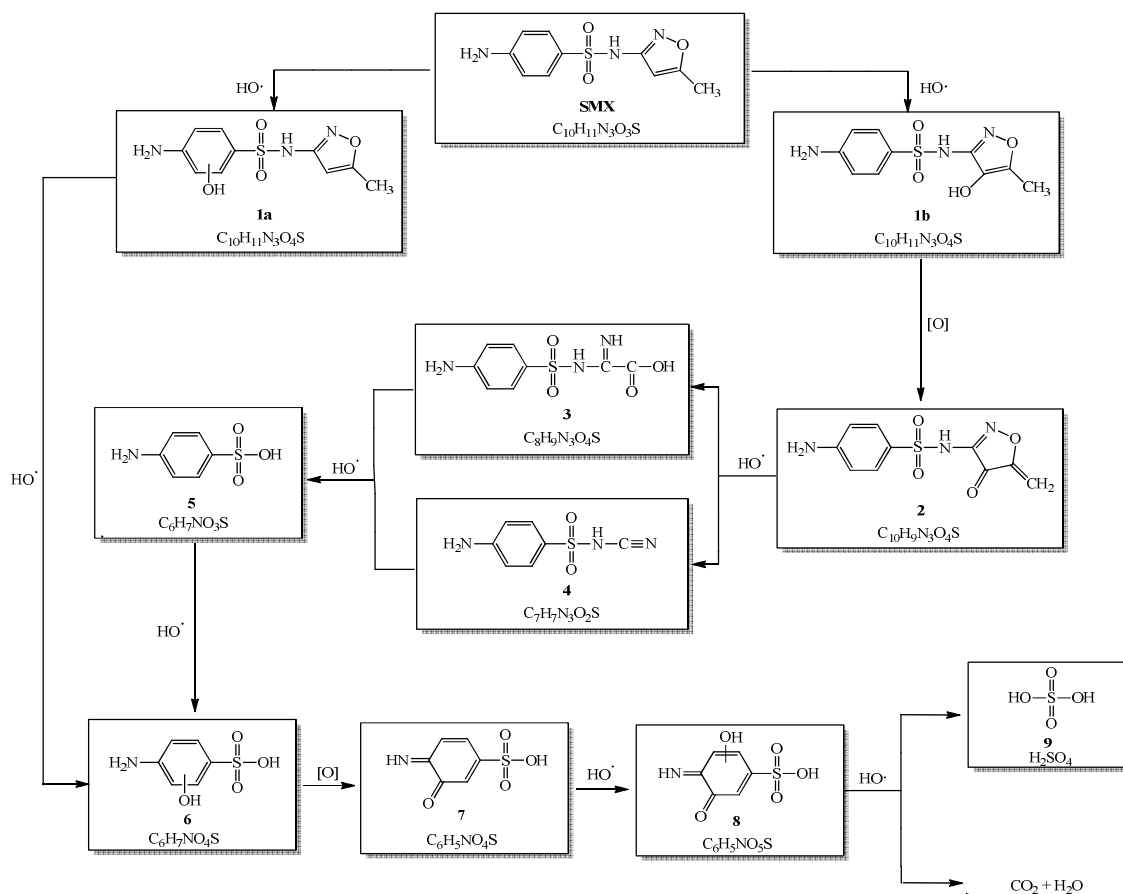


Figura 4.22- Rota de degradação proposta para SMX por fotocatalise heterogênea (UV-C/TiO₂ e UV-A/TiO₂) e fotólise (UV-C).

Alguns destes intermediários (ou um dos seus isômeros posicionais) já foram previamente relatados. Por exemplo, o subproduto **1** (monohidroilação do SMX) já foi observado tanto em estudos de degradação envolvendo processos fotocatalíticos [25-27] como também em processos de degradação utilizando foto-Fenton [28, 29]. Além disso, Trovó e colaboradores [27] também relataram a formação do subproduto **5** através de fotólise.

4.2.4.2 Testes de Ecotoxicidade com *Artemia salina* para SMX.

Os testes de toxicidade foram realizados com o objetivo de avaliar e prever os efeitos tóxicos, no ambiente aquático, dos compostos resultantes da degradação oxidativa do SMX. Assim, realizaram-se os testes em todas as alíquotas coletadas durante os ensaios de degradação (0, 5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos) e avaliou-se a taxa de mortalidade do organismo indicador. Foi realizado também um teste controle

somente com a solução salina de eclosão e não foi observada nenhuma taxa de mortalidade.

A partir dos testes de toxicidade do experimento de hidrólise, foi possível observar que a solução de SMX apresenta um baixo grau de toxicidade (< 5% de mortalidade) frente ao microrganismo *Artemia salina* (Figura 4.23e). Essa toxicidade manteve-se constante para todas as alíquotas coletadas, condizente com os dados de degradação, onde não foi constatada nenhuma porcentagem de remoção de SMX.

Para os testes envolvendo radiação do tipo UV-C, após 120 minutos de degradação, não observou-se aumento de toxicidade para as amostras submetidas ao processo de fotocatalise heterogênea (Figura 4.23a). Já nos testes envolvendo fotólise (Figura 4.23a), houve um leve aumento de toxicidade, chegando próximo a 20% de mortalidade ao final dos 120 minutos.

Para os testes envolvendo fotocatalise heterogênea com radiação UV-A, após o término de 120 minutos de degradação, também se observou um aumento na toxicidade (cerca de 30% de mortalidade) para as amostras submetidas ao processo de fotocatalise heterogênea (Figura 4.23c). Estes resultados indicam que os intermediários persistentes ao final de 120 minutos de exposição para os procedimentos de fotólise com radiação UV-C e fotocatalise com radiação UV-A, são mais tóxicos que o próprio SMX. Estes resultados sugerem, que, quanto menor a taxa de mineralização ($UV-A/TiO_2 < UV-C < UV-C/TiO_2$), ou seja, maior a quantidade de subprodutos persistentes ao final dos procedimentos de degradação, maior é o grau de toxicidade.

Já nos testes envolvendo fotólise direta com radiação UV-A (Figura 4.23d) não foi observado nenhum aumento na taxa de toxicidade, condizente com a remoção inexistente de SMX nestas condições.

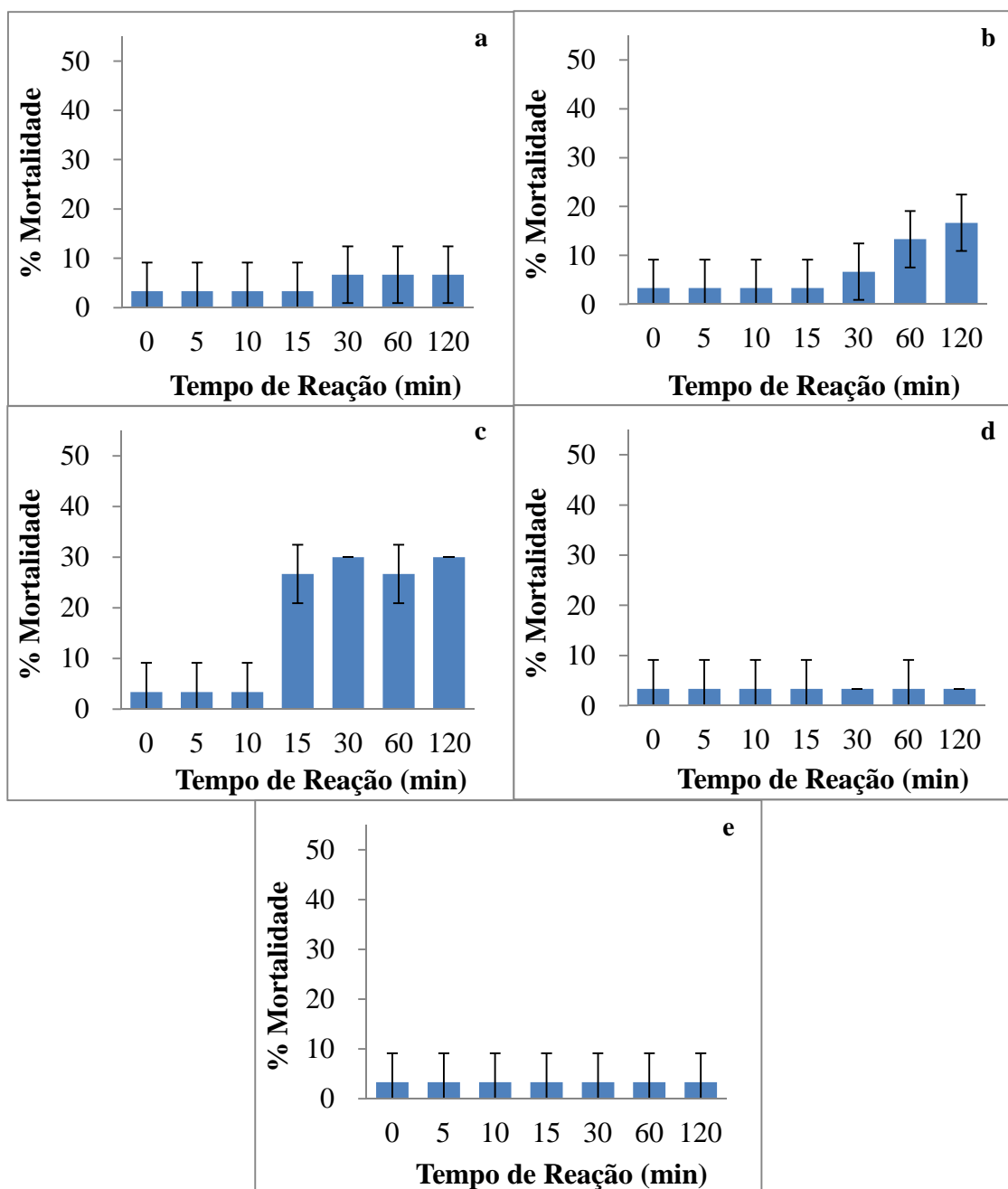


Figura 4.23- Porcentagem de mortalidade para os testes de ecotoxicidade de SMX com *Artemia salina* para os sistemas: (a) UV-C/TiO₂, (b) UV-C, (c) UV-A/TiO₂, (d) UV-A e (e) hidrólise.

4.2.5 Bisfenol A

4.2.5.1 Identificação dos subprodutos: proposta de uma rota de degradação.

Como observado na seção 4.1, apesar dos sistemas de degradação apresentarem altas taxas de remoção para o BPA (70,2%, 76,6% e 97,7% para os sistemas UV-C, UV-A/TiO₂ e UV-C/TiO₂, respectivamente), este último sistema degradou o BPA com

um tempo de meia vida menor que 22 minutos, sendo o único capaz de causar a mineralização deste substrato (taxa de 28%).

Para a detecção e identificação dos possíveis subprodutos formados, as alíquotas coletadas durante os processos de degradação (0, 5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos) foram analisadas por inserção direta via ionização por *electrospray* e detecção por espectrometria de massas de alta resolução (ESI-HRMS), conforme metodologia descrita na seção 3.2.1 (Método 1). Através dessas análises foram obtidos os respectivos espectros de massas referentes a cada alíquota coletada, tanto no modo positivo como no modo negativo de ionização. Por exemplo, os espectros de massas obtidos a partir de alíquotas recolhidas do sistema UV-C/TiO₂ no modo negativo de ionização são apresentados na Figura 4.24.

Observa-se que da mesma forma com que a intensidade relativa do íon referente ao fármaco BPA [(M-H)⁻ = 227] decresce, novos íons que não foram detectáveis na solução inicial de BPA (coletada antes do início dos experimentos) vão surgindo no transcorrer da reação. Um estudo detalhado destes espectros de massas permitiu a identificação de 7 subprodutos (**1-7**) decorrentes da fotodegradação de BPA, todos no modo negativo de ionização. Não foi possível a identificação de nenhum subproduto através dos espectros de massas adquiridos no modo positivo de ionização.

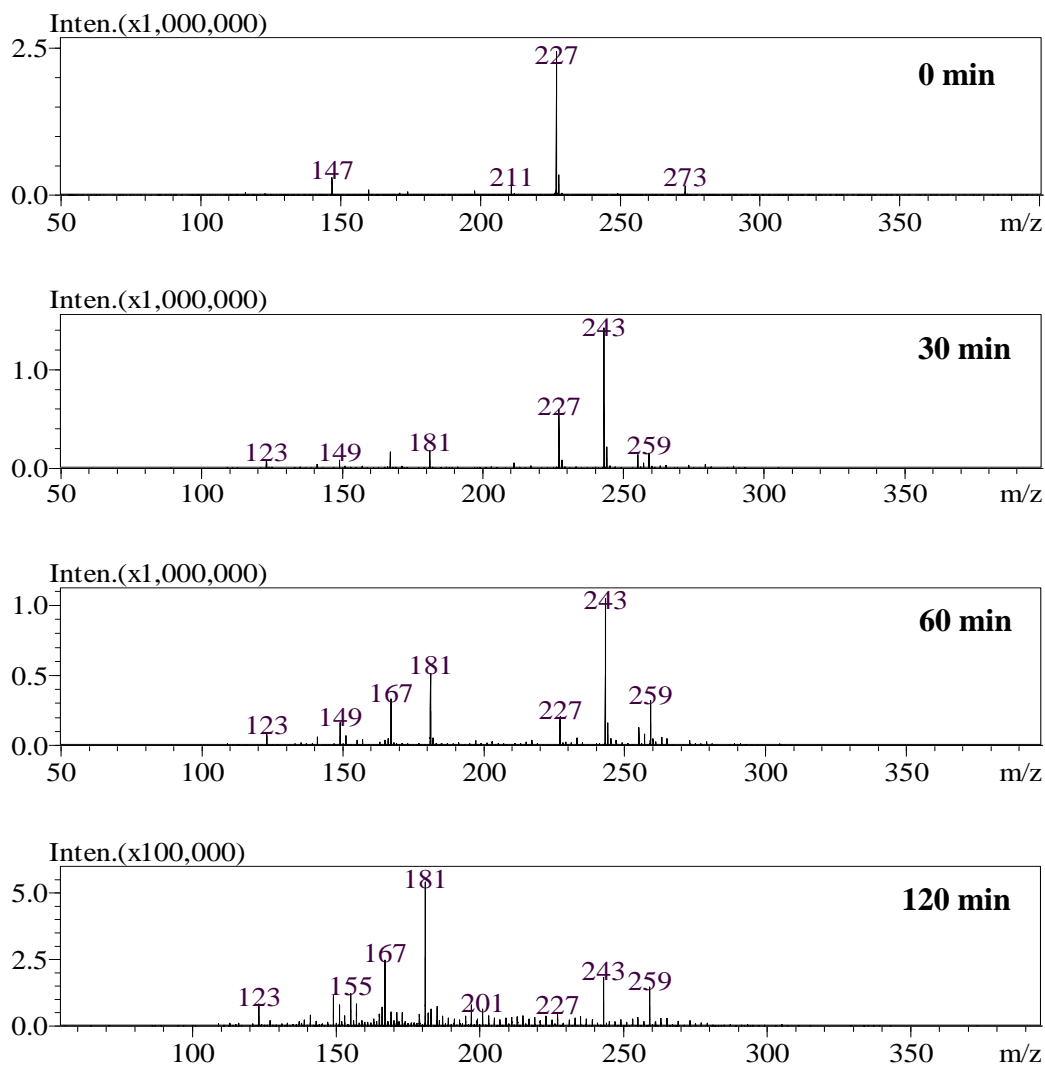


Figura 4.24- Espectros ESI-MS no modo negativo obtidos das alíquotas da degradação de BPA por $\text{TiO}_2/\text{UV-C}$, nos tempos de 0, 30, 60 e 120 minutos de reação.

Os dados de ESI-HRMS permitiram a proposta de fórmulas moleculares para todos os subprodutos (**1-7**) com um erro máximo de 4 ppm entre as massas experimentais e teóricas para as espécies deprotonadas, conforme descrito na Tabela 4.13. Todos estes subprodutos foram detectados, pelo menos, em uma das alíquotas do processo fotocatalítico ($\text{UV-C}/\text{TiO}_2$ e $\text{UV-A}/\text{TiO}_2$) ou fotolítico (UV-C).

Tabela 4.13- Fórmula molecular do BPA e seus produtos de degradação (calculados através dos dados de ESI-HRMS).

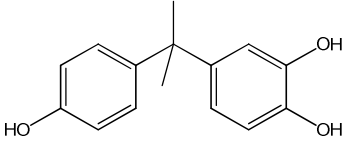
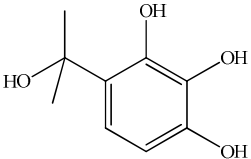
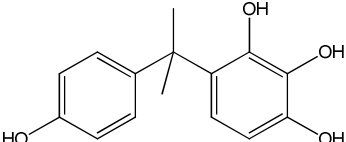
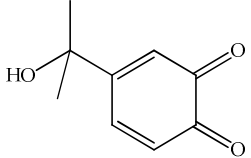
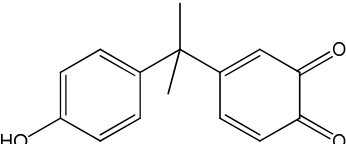
Composto	Fórmula Molecular	Massa Molecular (M) ¹	(M-H) ⁻ Teórica	(M-H) ⁻ Experimental	Erro (ppm)	DBE ²
BPA	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	228,1150	227,1072	227,1071	-0,44	8
1	C ₁₅ H ₁₆ O ₃	244,1099	243,1021	243,1022	-0,41	8
2	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	260,1049	259,0970	259,0963	-2,7	8
3	C ₁₅ H ₁₄ O ₃	242,0943	241,0865	241,0869	1,66	9
4	C ₉ H ₁₀ O ₄	182,0579	181,0501	181,0509	3,87	5
5	C ₉ H ₁₂ O ₃	168,0786	167,0708	167,0714	3,59	4
6	C ₇ H ₈ O ₄	156,0423	155,0344	155,0347	1,94	4
7	C ₆ H ₆ O ₄	142,0266	141,0188	141,0183	-3,55	4

¹massa molecular calculada pelo software LCMS-Solutions

²Double Bond Equivalence (equivalência de duplas ligações)

Através do auxílio do parâmetro DBE, foi possível a caracterização estrutural proposta para cada um dos intermediários. A fórmula estrutural de quase todos os subprodutos identificados (**1-5**) está apresentada na Tabela 4.14. Os subprodutos **6** e **7**, podem apresentar vários isômeros, desta forma, optou-se por não propor uma única fórmula estrutural representativa.

Tabela 4.14- Estruturas químicas propostas para os subprodutos de degradação do BPA.

Subprodutos	Estrutura Química	Subprodutos	Estrutura Química
1		4	
2		5	
3		6	$C_7H_8O_4$
		7	$C_6H_6O_4$

Em seguida realizou-se o monitoramento da evolução de cada subproduto formado durante os processos de degradação por HPLC-HRMS. Por exemplo, a Figura 4.25 apresenta um cromatograma em *Full Scan* e um cromatograma de íons extraídos (EIC) (m/z 227,1072, 243,1021 e 259,0970 para BPA e os subprodutos **1** e **2**, respectivamente) gerados a partir da análise de uma alíquota coletada no tempo de 60 minutos para o sistema UV-C/TiO₂.

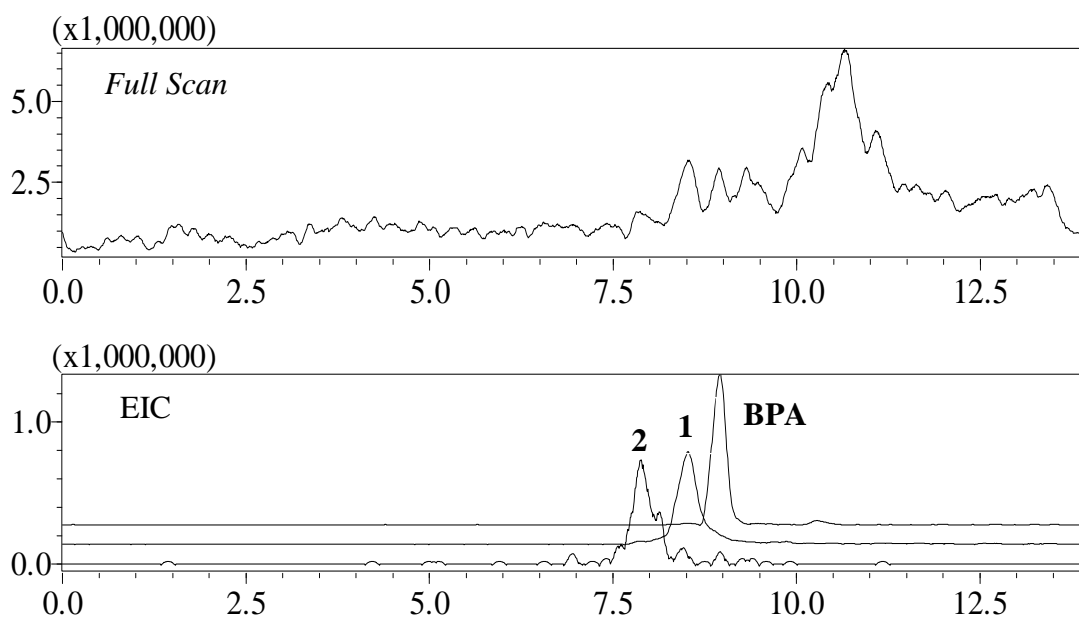


Figura 4.25- Cromatograma em *Full Scan* e EIC (m/z 227,1072, 243,1021 e 259,0970 para BPA e os subprodutos **1** e **2**, respectivamente) para uma alíquota coletada no tempo de 60 minutos para o sistema UV-C/TiO₂.

Da mesma forma como apresentado neste exemplo (Figura 4.25), cromatogramas de íons extraídos (para os subprodutos **1-7**) foram obtidos para cada uma das alíquotas coletadas a partir dos sistemas de degradação investigados. Esses dados cromatográficos (áreas dos picos) foram analisados sendo possível a construção de gráficos da área relativa de cada subproduto (**1-7**) em função do tempo de reação (Figura 4.26).

Para o sistema UV-C/TiO₂ (Figura 4.26a) todos os subprodutos (**1-7**) permaneceram em solução após os 120 minutos de exposição (nota-se que os subprodutos **5** e **6** atingiram a sua concentração máxima neste momento). No entanto, um comportamento distinto foi observado para o sistema UV-C (Figura 4.26b): depois de um tempo de exposição idêntico (120 minutos), os subprodutos **1**, **3**, **5**, **6** e **7** alcançaram as suas concentrações relativas máximas e os subprodutos **2** e **4** não puderam ser detectados. Depois de 120 minutos de tratamento pelo sistema UV-A/TiO₂ (Figura 4.26c), o subproduto **7** era o único não perceptível, enquanto que os subprodutos, **2**, **5** e **6** foram observados em suas concentrações máximas relativas. Finalmente, o comportamento do sistema fotolítico UV-A foi completamente diferente em comparação com os anteriores, mas consistentes com os resultados de degradação

(Tabela 4.1): sua aplicação sobre a solução de BPA não produziu nenhum subproduto de degradação.

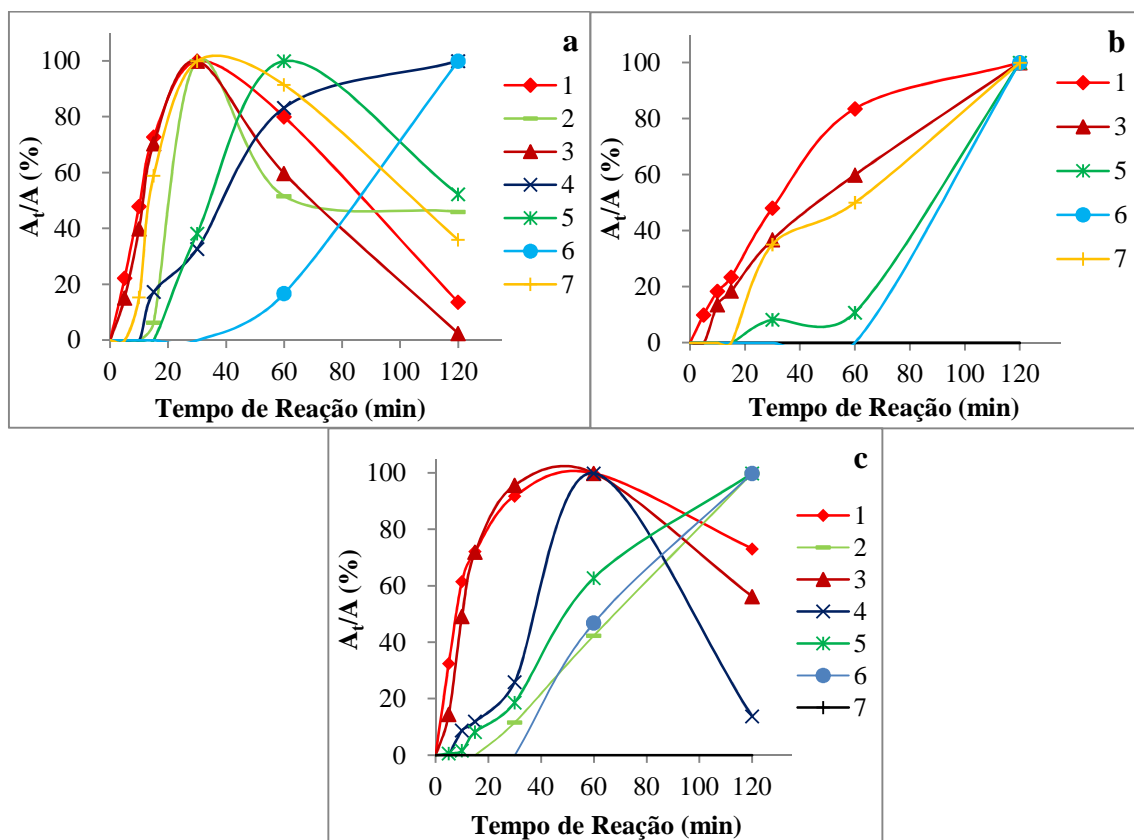


Figura 4.26- Gráfico da porcentagem relativa de área (A_t/A) para os subprodutos de BPA (1-7) em função do tempo de degradação para os sistemas: (a) UV-C/TiO₂, (b) UV-C e (c) UV-A/TiO₂. A_t e A refere-se às áreas dos picos cromatográficos, onde, A representa a maior área e A_t as áreas nos demais tempos de reação para cada subproduto.

Com base nestes resultados, e sabendo-se da reatividade dos radicais hidroxila frente a moléculas orgânicas em meio aquoso, propôs-se uma rota geral para a fotodegradação de BPA (Figura 4.27) por fotocatalise heterogênea (UV-C/TiO₂ e UV-A/TiO₂) e fotólise (UV-C), uma vez que, a maioria dos subprodutos foram identificados em ambos os procedimentos. Assim, foi proposto que BPA é submetido a sucessivas reações de hidroxilação gerando, inicialmente, os subprodutos hidroxilados **1** (C₁₅H₁₆O₃) e **2** (C₁₅H₁₆O₄). Estes subprodutos contêm um ou mais átomos de oxigênio que o BPA (C₁₅H₁₆O₂), porém apresentam o mesmo valor de DBE (Tabela 4.13). A posição correta dos grupos hidroxila nas estruturas químicas dos subprodutos **1** e **2** não puderam ser conclusivamente estabelecidas através dos dados de HRMS. A informação fornecida pelos perfis de fragmentação (não apresentados) também não foram úteis,

uma vez que pôde-se observar somente a perda de moléculas de água. Por uma questão de simplicidade, apenas um dentre os vários isômeros possíveis (subproduto **1**: hidroxilação em C5; subproduto **2**: duas hidroxilações em C5 e C6) formados nestas condições são representados na Figura 4.27.

Nota-se que os tempos de retenção de BPA e dos subprodutos **1** e **2**, estão na seguinte ordem: BPA > **1** > **2** (Figura 4.26). Esta ordem de retenção é consistente, pois o subproduto de degradação mais polar (**2**) deve eluir mais rápido em uma coluna cromatográfica não-polar (C18) em relação aos outros compostos. Da mesma forma, o tempo de retenção do subproduto **1** é menor que o do BPA. Outros subprodutos foram gerados diretamente a partir de **1**. O subproduto **3** (quinona, C₁₅H₁₄O₃) é formado pela oxidação do subproduto **1**, ao passo que a formação de **4** (C₉H₁₂O₃) pode ter sido ocorrido pelo ataque de um radical hidroxila em C2 do subproduto **1**, seguido da perda de um grupo fenólico. Em sequência, o intermediário quinônico **5** (C₉H₁₀O₄) pode ser formado por meio de duas maneiras distintas: por um ataque de radicais hidroxila em C2 do subproduto **3** ou através da oxidação dos dois grupos OH do subproduto **4**. Para os produtos de degradação **6** (C₇H₈O₄) e **7** (C₆H₆O₄), que são provavelmente compostos acíclicos e para os quais estruturas químicas não foram propostas, podem ser gerados por sucessivas hidroxilações do subproduto **5**, seguido pela abertura do anel aromático. Finalmente, os subprodutos **6** e **7** podem ser mineralizados sob estas condições oxidantes para formar dióxido de carbono e água.

Alguns destes intermediários (ou um dos seus isômeros posicionais) já foram previamente relatados. Por exemplo, Torres e colaboradores [30] estudaram degradação por cavitação ultra-sônica e relataram a formação de intermediários **1** e **2**. Deborde e colaboradores [31] investigaram a oxidação de BPA em solução aquosa utilizando ozônio e relataram a formação de compostos **1**, **2** e **3**. Poerschmann e colaboradores [32], também descreveram a produção do intermediário **1** durante a degradação oxidativa de BPA.

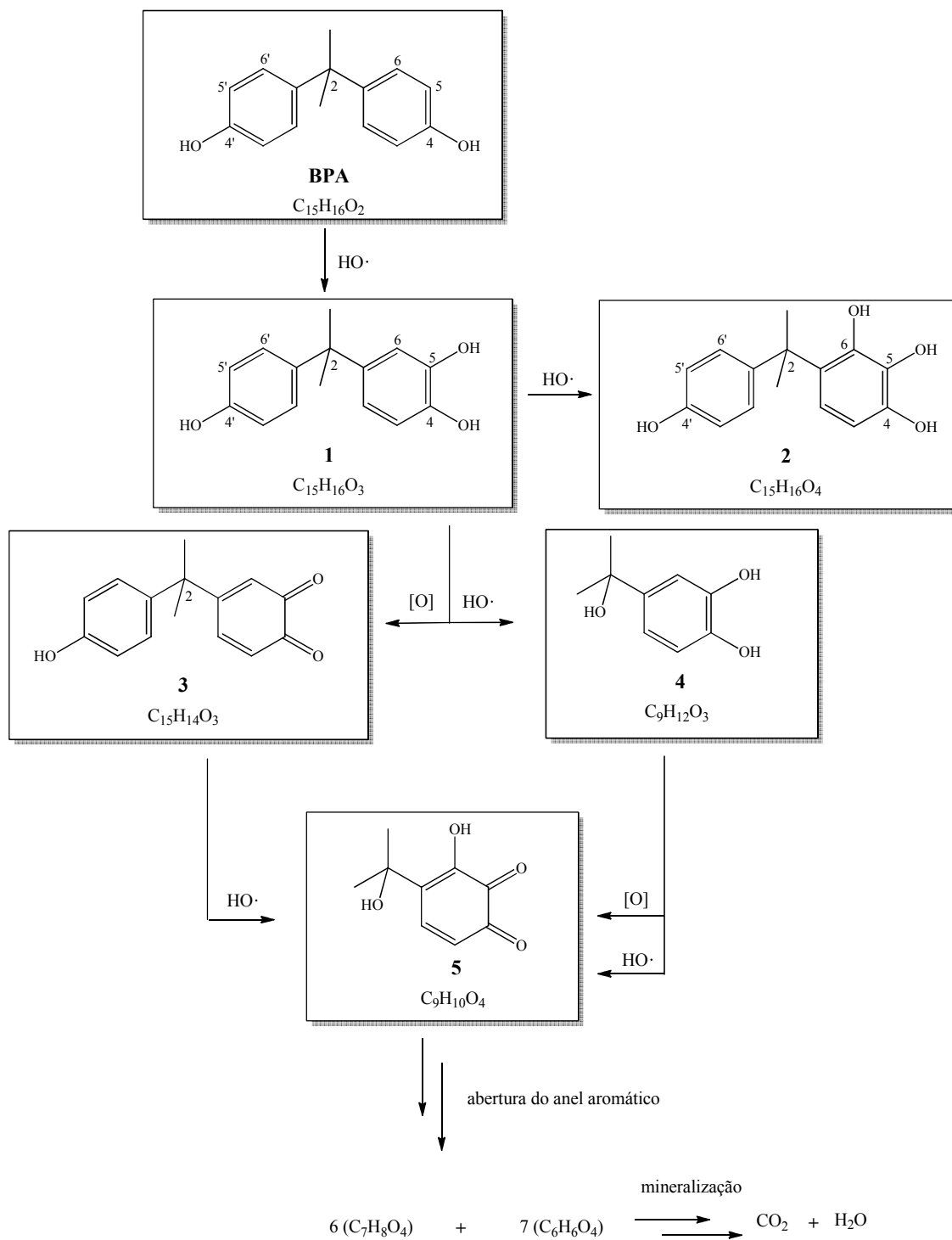


Figura 4.27- Rota de degradação proposta para BPA por fotocatalise heterogênea (UV-C/TiO₂ e UV-A/TiO₂) e fotólise (UV-C).

4.2.5.2 Testes de Ecotoxicidade com *Artemia salina* para BPA.

Os testes de toxicidade foram realizados com o objetivo de avaliar e prever os efeitos tóxicos, no ambiente aquático, dos compostos resultantes da degradação oxidativa do BPA. Assim, realizaram-se os testes em todas as alíquotas coletadas durante os ensaios de degradação (0,5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos) e avaliou-se a taxa de mortalidade do organismo indicador. Foi realizado também um teste controle somente com a solução salina de eclosão sendo que nenhuma taxa de mortalidade foi determinada.

Nos testes de toxicidade para o experimento de hidrólise, foi possível observar que a solução de BPA apresenta um alto grau de toxicidade, aproximadamente 50% de mortalidade frente ao microrganismo *Artemia salina* (Figura 4.28e). Essa toxicidade manteve-se constante para todas as alíquotas coletadas durante o experimento. Como não foi observada nenhuma taxa de remoção a partir deste experimento, deduz-se que esse efeito tóxico é devido unicamente à solução de BPA.

Para os testes envolvendo radiação do tipo UV-C, após o término de 120 minutos, observou-se um aumento na toxicidade (cerca de 80% de mortalidade) para as amostras submetidas ao processo de fotocatalise heterogênea (UV-C/TiO₂). Já nos testes envolvendo fotólise houve uma pequena diminuição entre as toxicidades das soluções final e inicial, conforme demonstrado nas Figuras 4.28a e 4.28b, respectivamente. Estes resultados indicam que apesar de haver maior taxa de mineralização no processo de fotocatalise heterogênea (UV-C/TiO₂) em relação aos processos de fotólise (UV-C), os intermediários persistentes ao final de 120 minutos de exposição apresentam ser mais tóxicos que o próprio BPA.

Para os testes envolvendo radiação UV-A, as taxas de mortalidade das alíquotas coletadas após 120 minutos foram praticamente as mesmas comparadas à solução inicial, tanto no processo de fotocatalise heterogênea (UV-A/TiO₂) como para o processo de fotólise (UV-A), conforme demonstrado nas Figuras 4.28c e 4.28d, respectivamente.

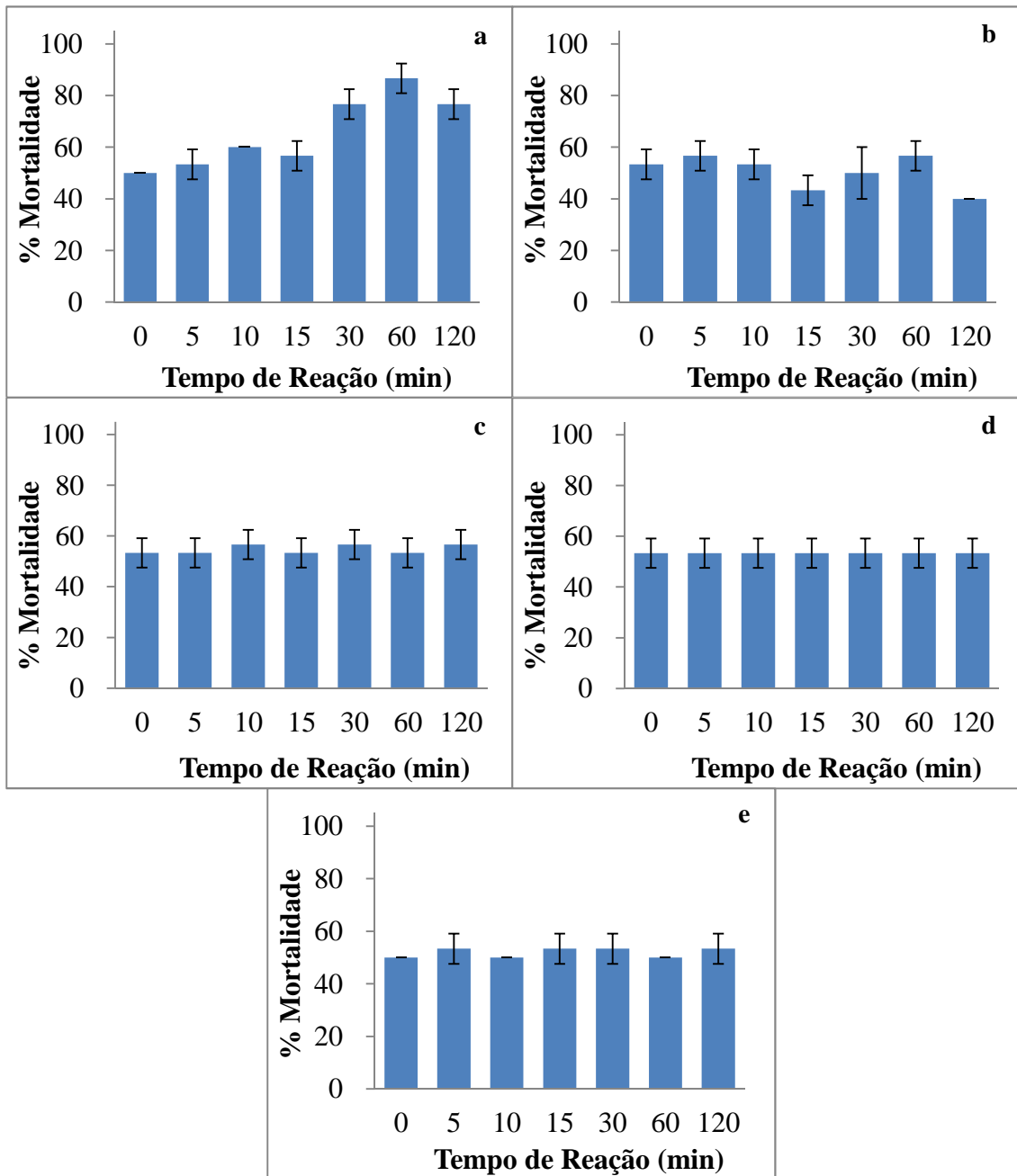


Figura 4.28- Porcentagem de mortalidade para os testes de ecotoxicidade de BPA com *Artemia salina* para os sistemas: (a) UV-C/TiO₂, (b) UV-C, (c) UV-A/TiO₂, (d) UV-A e (e) hidrólise.

4.2.6 *17 α -Ethinilestradiol*

4.2.6.1 *Identificação dos subprodutos: proposta de uma rota de degradação.*

Como observado na seção 4.1, os experimentos de degradação realizados com EE2 apresentaram baixas taxas de remoção, da ordem de 23,4 % e 46,5 % para os sistemas UV-C/TiO₂ e UV-C, respectivamente. Os tempos de meia vida foram relativamente altos, 133 e 289 minutos, respectivamente. Além do mais, em nenhum dos testes foi possível observar qualquer taxa de mineralização, levando a acreditar que as porcentagens de remoção apresentadas para os sistemas UV-C/TiO₂ e UV-C são provenientes apenas da transformação de EE2 em subprodutos.

Para a detecção e identificação dos possíveis subprodutos formados, as alíquotas coletadas durante os processos de degradação (0, 5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos) foram analisadas por inserção direta via ionização por *electrospray* com detecção por espectrometria de massas de alta resolução (ESI-HRMS), conforme metodologia descrita na seção 3.2.1 (Método 1). Através dessas análises foram obtidos os respectivos espectros de massas referentes a cada alíquota coletada, tanto no modo positivo como no modo negativo de ionização. Por exemplo, os espectros de massas obtidos a partir de alíquotas recolhidas do sistema UV-C/TiO₂ no modo negativo de ionização são apresentados na Figura 4.29.

Mesmo não havendo altas taxas de degradação, observa-se que da mesma forma com que a intensidade relativa do íon referente ao fármaco EE2 [(M-H)⁻ = 295] decresce, alguns novos íons que não foram detectáveis na solução inicial de EE2 (coletada antes do início dos experimentos) vão surgindo no decorrer do tempo de degradação. Através de um estudo detalhado destes espectros de massas foi possível a identificação de 7 subprodutos (**1-7**) decorrentes da fotodegradação de EE2, todos no modo negativo de ionização. Não foi possível a identificação de nenhum subproduto através dos espectros de massas adquiridos no modo positivo de ionização.

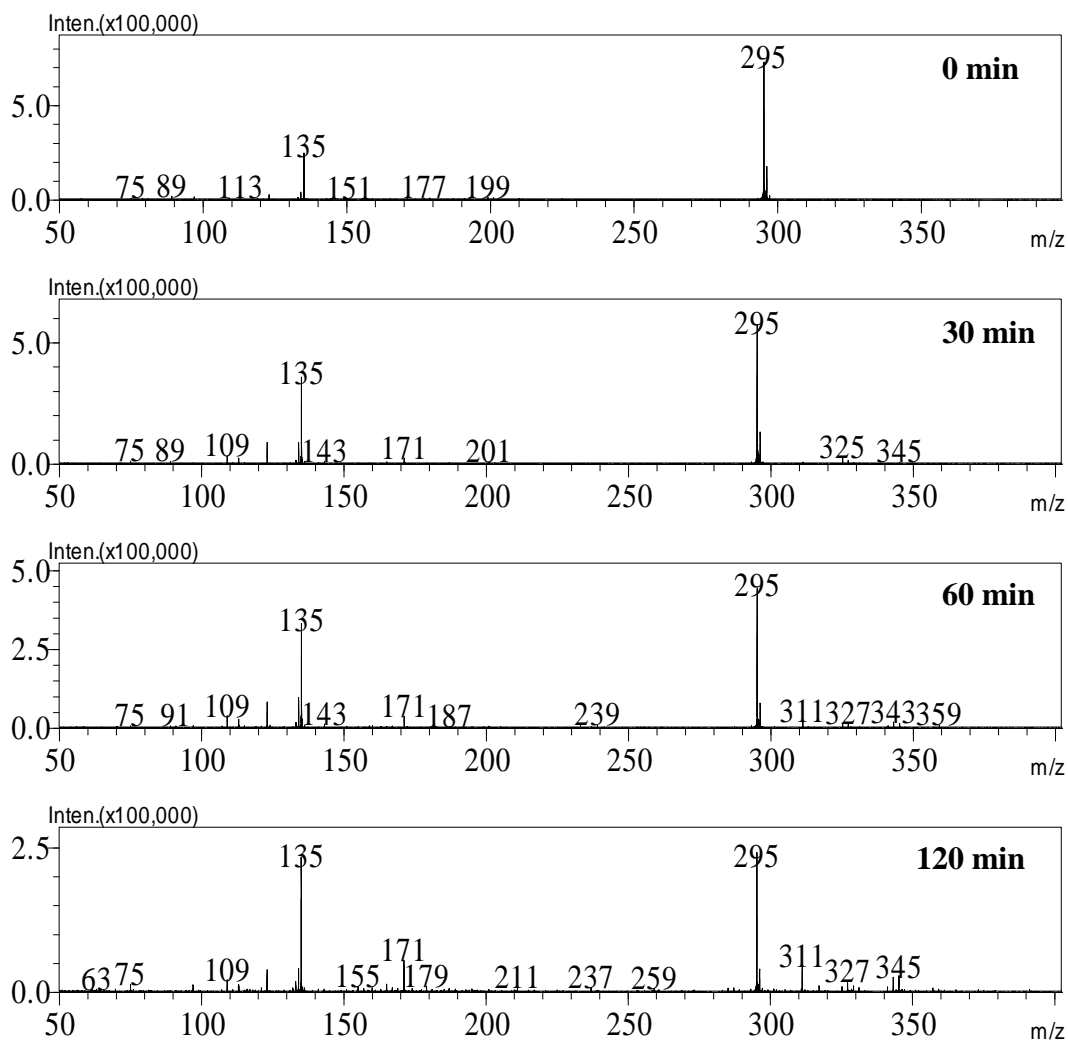


Figura 4.29- Espectros ESI-MS no modo negativo obtidos das alíquotas da degradação de EE2 por TiO₂/UV-C, nos tempos de 0, 30, 60 e 120 minutos de reação.

Os dados de ESI-HRMS permitiram a proposta de fórmulas moleculares para todos os subprodutos (**1-7**) com um erro máximo menor que 8 ppm entre as massas experimentais e teóricas das espécies deprotonadas, conforme descrito na Tabela 4.15. Todos estes subprodutos foram detectados, pelo menos, em uma das alíquotas do processo fotocatalítico (UV-C/TiO₂) ou fotolítico (UV-C).

Tabela 4.15- Fórmula molecular do EE2 e seus subprodutos de degradação (calculados através dos dados de ESI-HRMS).

Composto	Fórmula Molecular	Massa Molecular (M) ¹	(M-H) ⁻ Teórica	(M-H) ⁻ Experimental	Erro (ppm)	DBE ²
EE2	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	296,1776	295,1704	295,1698	-2,03	9
1	C ₂₀ H ₂₄ O ₃	312,1725	311,1653	311,1671	5,78	9
2	C ₂₀ H ₂₂ O ₃	310,1569	309,1496	309,1479	-5,50	10
3	C ₂₀ H ₂₄ O ₄	328,1675	327,1602	327,1584	-5,50	9
4	C ₂₀ H ₂₄ O ₅	344,1624	343,1551	343,1564	3,79	9
5	C ₂₀ H ₂₂ O ₄	326,1518	325,1445	325,1421	-7,38	10
6	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	346,1780	345,1707	345,1697	-2,90	8
7	C ₁₆ H ₂₀ O ₃	260,1412	259,1340	259,1359	-7,33	7

¹massa molecular calculada pelo software LCMS-Solutions

²Double Bond Equivalence (equivalência de duplas ligações)

Através do auxílio do parâmetro DBE, foi possível a caracterização estrutural proposta para cada um dos intermediários. A fórmula estrutural de todos os subprodutos identificados (1-7) está apresentada na Tabela 4.16.

Tabela 4.16- Estruturas químicas propostas para os subprodutos de degradação do EE2.

Subprodutos	Estrutura Química	Subprodutos	Estrutura Química
1		5	
2		6	
3		7	
4			

Depois de identificados e caracterizados os subprodutos propostos na Tabela 4.16, através das análises por HPLC-HRMS (Método 2), foi possível o monitoramento da evolução de cada um durante os processos de degradação. Por exemplo, a Figura 4.30 apresenta um cromatograma em *Full Scan* e um cromatograma de íons extraídos (EIC) (m/z 295,1704, 311,1653 e 345,1707 para EE2 e os subprodutos 1 e 6, respectivamente) gerados a partir da análise de uma alíquota coletada no tempo de 60 minutos para o sistema UV-C/TiO₂.

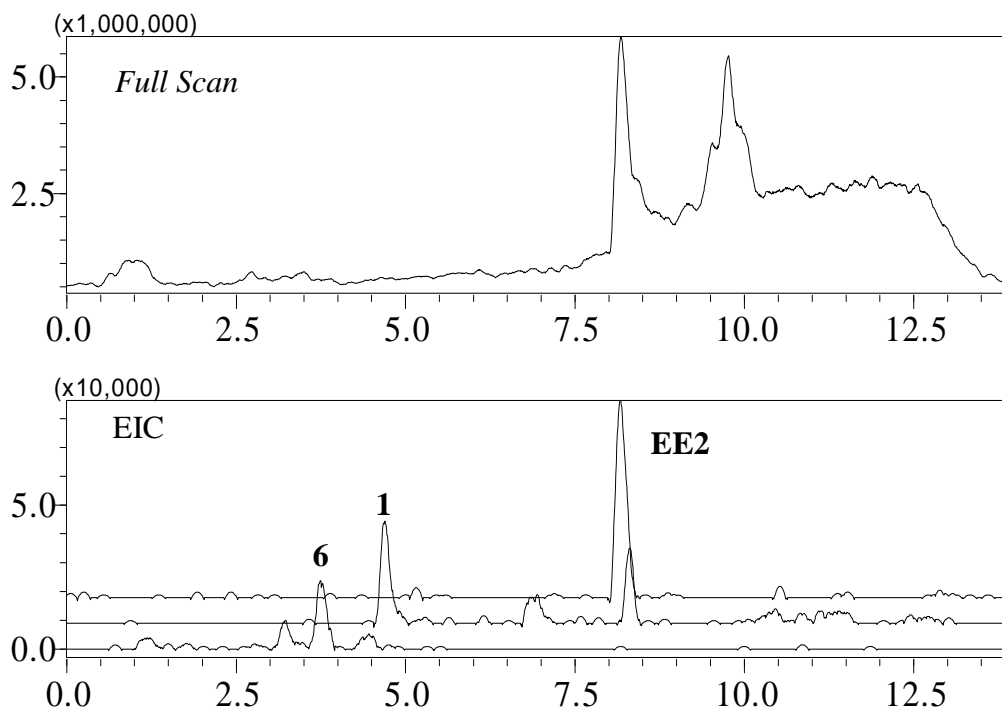


Figura 4.30- Cromatograma em *Full Scan* e EIC (m/z 295,1704, 311,1653 e 345,1707 para EE2 e os subprodutos **1** e **6**, respectivamente) para uma alíquota coletada no tempo de 60 minutos para o sistema UV-C.

Da mesma forma, como apresentado neste exemplo (Figura 4.30), cromatogramas de íons extraídos (para os subprodutos **1-7**) foram obtidos para cada uma das alíquotas coletadas a partir dos quatro sistemas de degradação investigados. Esses dados cromatográficos (áreas dos picos cromatográficos) foram analisados, sendo, dessa forma, possível a construção de gráficos da área relativa de cada subproduto (**1-7**) em função do tempo de reação (Figura 4.31).

Estes gráficos revelaram que os sistemas UV-C/TiO₂ (Figura 4.31a) e UV-C (Figura 4.31b) tiveram comportamento semelhante. Por exemplo, para o sistema UV-C/TiO₂ os subprodutos **1**, **2**, **4**, **5** e **6** permaneceram em solução após 120 minutos de exposição, sendo que **2** e **6** atingiram a concentração máxima neste momento. Já para o sistema UV-C, dos subprodutos detectados (**1**, **2**, **3**, **5**, **6** e **7**), os subprodutos **2** e **7** foram os que atingiram a sua concentração máxima depois de 120 minutos de tratamento. A persistência dos subprodutos após os 120 minutos corroboram os resultados de COT, onde não foi observada nenhuma porcentagem de mineralização para o EE2 em ambos os processos.

Para os sistemas fotocatalíticos e fotolíticos utilizando à radiação UV-A (resultados não apresentados), não foi possível a identificação de nenhum subproduto de degradação, consistentes com a ausência de remoção.

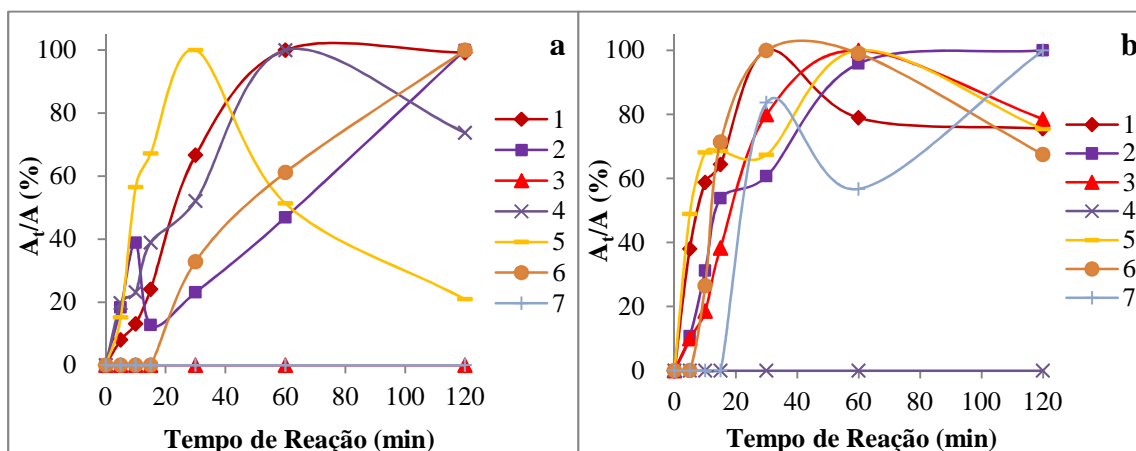


Figura 4.31- Gráfico da porcentagem relativa de área (A_t/A) para os subprodutos de EE2 (1-7) em função do tempo de degradação para os sistemas: (a) UV-C/TiO₂ e (b) UV-C. A_t e A refere-se as áreas dos picos cromatográficos, onde, A representa a maior área e A_t as áreas nos demais tempos de reação para cada subproduto.

Através dos subprodutos caracterizados e apresentados na Tabela 4.15, propõe-se uma rota geral para a fotodegradação de EE2 (Figura 4.32) por fotocatalise heterogênea (UV-C/TiO₂) e fotólise (UV-C), uma vez que, a maioria dos subprodutos foram identificados em ambos os procedimentos. Inicialmente, foi proposto que alguns subprodutos podem ser formados por sucessivas reações de hidroxilação sofridas pela molécula de EE2 (C₂₀H₂₄O₂), como é o caso dos subprodutos **1** (C₂₀H₂₄O₃), **3** (C₂₀H₂₄O₄) e **4** (C₂₀H₂₄O₅). Uma rota alternativa para a degradação do subproduto **1** pode ser através da oxidação de um grupo hidroxila presente no anel aromático gerando o subproduto **2** (C₂₀H₂₂O₃). A formação do subproduto **5** (C₂₀H₂₂O₄) pode se dar por meio de duas rotas distintas: através da hidroxilação do anel aromático do subproduto **2** seguida da oxidação de um grupo hidroxila, ou através da oxidação de dois grupos hidroxila presentes no anel aromático do subproduto **3**. Na sequência, o subproduto **6** (C₂₀H₂₆O₅) pode ser gerado através de reações de hidroxilação do anel aromático presente na estrutura do subproduto **2**, acarretando na abertura do anel aromático. Por fim, a formação do subproduto **7** (C₁₆H₂₀O₃) pode-se dar através de sucessivas reações de hidroxilação dos subprodutos **5** e **6**. Nota-se que pelos subprodutos identificados nestes experimentos, as reações de hidroxilação ocorreram apenas no anel aromático

presente na estrutura química, o que pode comprovar o caráter recalcitrante apresentado pelo EE2 frente aos procedimentos de degradação aplicados.

A posição correta dos grupos hidroxila não pôde ser conclusivamente estabelecida através dos dados de HRMS, e as informações fornecidas pelos perfis de fragmentação (não apresentadas) também não foram úteis, uma vez que pôde-se observar somente a perda de moléculas de água. Por uma questão de simplicidade, apenas um dentre os isômeros possivelmente formados nestas condições são representados na Figura 4.32.

Vale mencionar que, dos poucos estudos para avaliação de subprodutos oriundos da degradação de EE2, os subprodutos **1**, **2** e **5** foram identificados por alguns grupos de pesquisa utilizando POAs como procedimentos de degradação. [33-35].

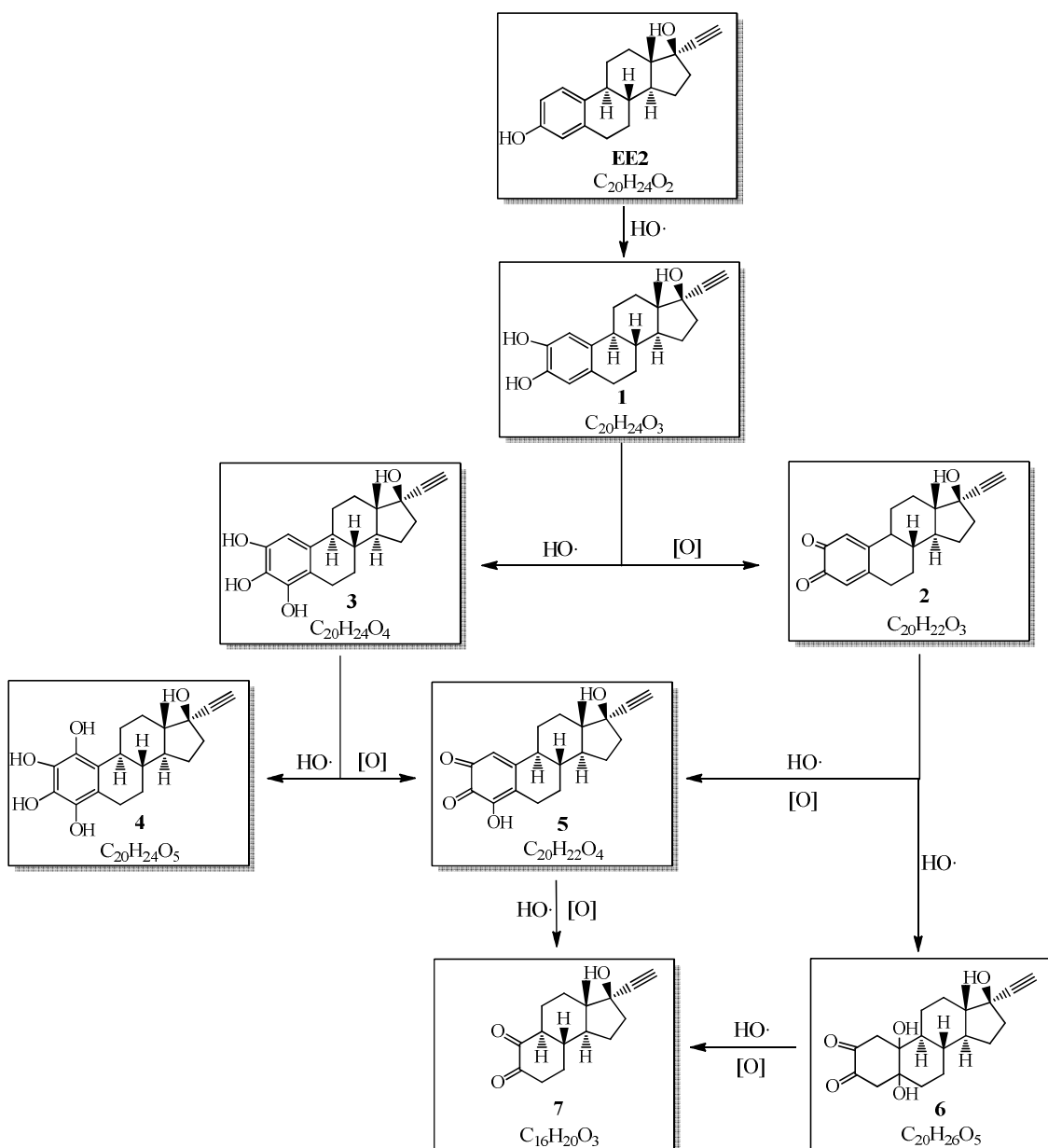


Figura 4.32- Rota de degradação proposta para EE2 por fotocatalise heterogênea (UV-C/TiO₂ e UV-A/TiO₂) e fotólise (UV-C).

4.2.6.2 Testes de Ecotoxicidade com *Artemia salina* para EE2.

Os testes de toxicidade foram realizados com o objetivo de avaliar e prever os efeitos tóxicos, no ambiente aquático, dos compostos resultantes da degradação oxidativa do EE2. Assim, realizaram-se os testes em todas as alíquotas coletadas durante os ensaios de degradação (0, 5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos) e avaliou-se a taxa de mortalidade do organismo indicador. Foi realizado também um teste controle somente com a solução salina de eclosão, e não foi observada nenhuma taxa de mortalidade.

Nos testes de toxicidade para o experimento de hidrólise, foi possível observar que a solução de EE2 apresenta um alto grau de toxicidade, aproximadamente 65% de mortalidade frente ao microorganismo *Artemia salina* (Figura 4.33e). Os mesmos resultados foram observados para os testes com as alíquotas coletadas nos sistemas UV-A/TiO₂ e UV-A (Figuras 4.33c e 4.33d, respectivamente). Essa toxicidade manteve-se constante para todas as alíquotas e como não foi observada nenhuma taxa de remoção a partir deste experimento, deduz-se que esse efeito tóxico é devido unicamente à solução de EE2.

Para os testes envolvendo radiação do tipo UV-C após 120 minutos de tratamento, observou-se uma diminuição na toxicidade (cerca de 30% de mortalidade) para as amostras submetidas tanto ao processo de fotocatalise heterogênea (UV-C/TiO₂) como para o procedimento de fotólise direta (UV-C), conforme demonstrado nas Figuras 4.33a e 4.33b, respectivamente. Estes resultados indicam que os subprodutos gerados a partir da degradação são menos tóxicos que o EE2, sendo que essa diminuição de toxicidade pode ser provavelmente relacionada às reações que levaram a abertura do anel aromático da molécula de EE2.

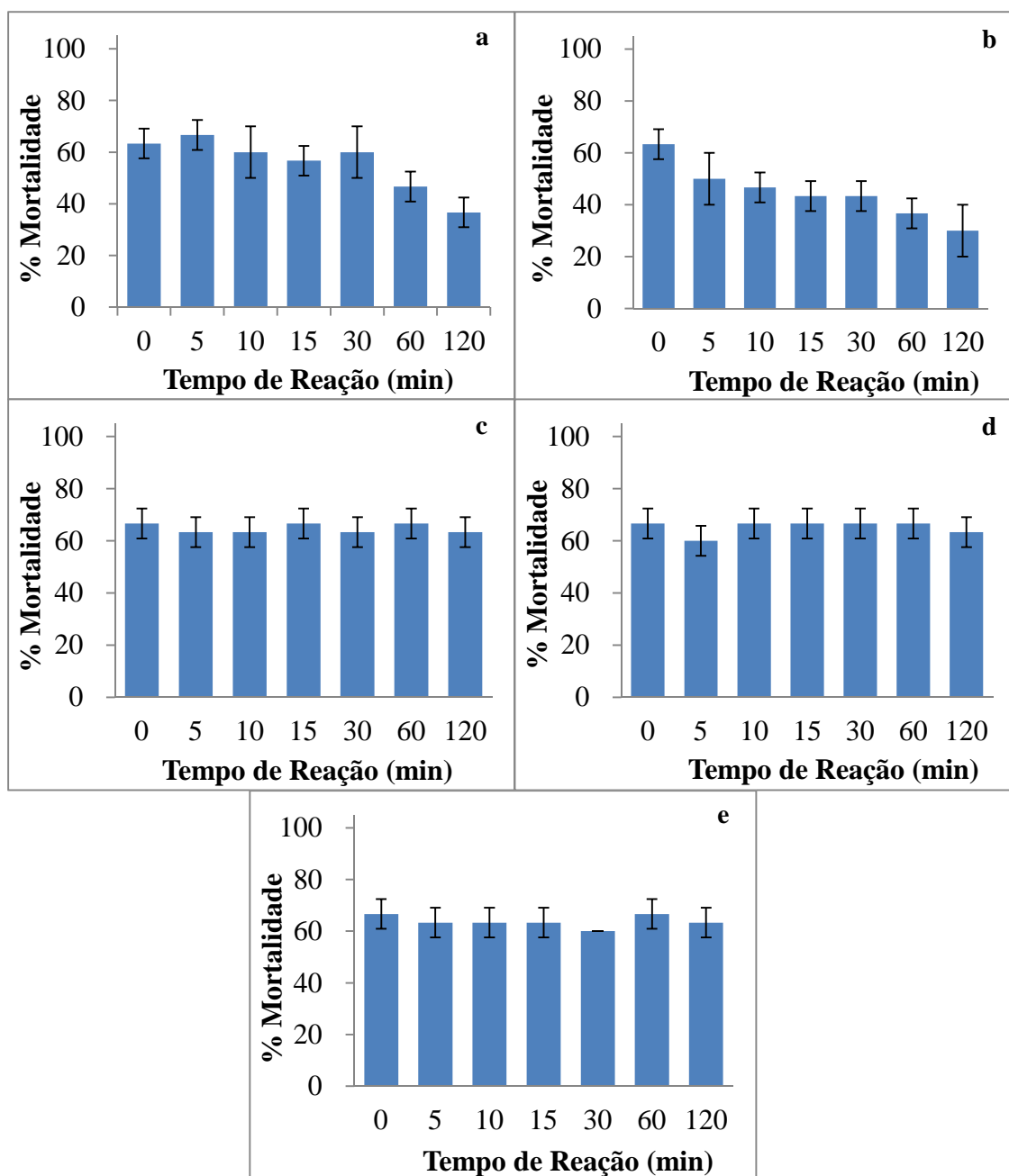


Figura 4.33- Porcentagem de mortalidade para os testes de ecotoxicidade de EE2 com *Artemia salina* para os sistemas: (a) UV-C/TiO₂, (b) UV-C, (c) UV-A/TiO₂, (d) UV-A e (e) hidrólise.

4.3 Referências Bibliográficas

[1] Peuravuori, J.; Pihlaja, K. Phototransformations of selected pharmaceuticals under low-energy UVA-Vis and powerful UVB-UVA irradiations in aqueous solutions – the role of natural dissolved organic chromophoric material. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 394 (2009) 1621-1636.

- [2] Gaya, U. I.; Abdullah, A. H. Heterogeneous photocatalytic degradation of organic contaminants over titanium dioxide: A review of fundamentals, progress and problems. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**. 9 (2008) 1-12.
- [3] Nasuhoglu, D.; Yargeau, V.; Berk, D. Photo-removal of sulfamethoxazole (SMX) by photolytic and photocatalytic processes in a batch reactor under UV-C radiation ($\lambda_{\text{máx}} = 254 \text{ nm}$). **Journal of Hazardous Materials**. 186 (2011) 67-75.
- [4] Ryan, C. C.; Tan, D. T.; Arnold, W. A. Direct and indirect photolysis of sulfamethoxazole and trimethoprim in wastewater treatment plant effluent. **Water Research**. 45 (2011) 1280-1286.
- [5] Rivas, J.; Gimeno, O.; Borralho, T.; Sagasti, J. UV-C and UV-C/peroxide elimination of selected pharmaceuticals in secondary effluents. **Desalination**. 279 (2011) 115-120.
- [6] Achilleos, A.; Hapeshi, E.; Xekoukoulotakis, N. P.; Mantzavinos, D.; Fatta-Kassinos, D. Factors affecting diclofenac decomposition in water by UV-A/TiO₂ photocatalysis. **Chemical Engineering Journal**. 161 (2010) 53-59.
- [7] Dimitrakopoulo, D.; Rethemiotaki, I.; Frontistis, Z.; Xekoukoulotakis, N. P.; Venieri, D.; Mantzavinos, D. Degradation, mineralization and antibiotic inactivation of amoxicillin by UV-A/TiO₂ photocatalysis. **Journal of Environmental Management**. 98 (2012) 168-174.
- [8] Xekoukoulotakis, N. P.; Xinidis, N.; Chroni, M.; Mantzavinos, D.; Venieri, D.; Hapeshi, E.; Fatta-Kassinos, D. UV-A/TiO₂ photocatalytic decomposition of erythromycin in water: Factors affecting mineralization and antibiotic activity. **Catalysis Today**. 151 (2010) 29-33.
- [9] Méndez-Arriaga, F.; Esplugas, S.; Giménez, J. Photocatalytic degradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs with TiO₂ and simulated solar irradiation. **Water Research**. 42 (2008) 585-594.
- [10] Skoumal, M.; Rodrigues, R. M.; Cabot, P. L.; Centellas, F.; Garrido, J. A.; Arias, C.; Brillas, E. Electro-Fenton, UVA photoelectro-Fenton and solar photoelectro-Fenton degradation of the drug ibuprofen in acid aqueous medium using platinum and boron-doped diamond anodes. **Electrochimica Acta**, 54 (2009) 2077-2085.
- [11] Méndez-Arriaga, F.; Esplugas, S.; Giménez, J. Degradation of the emerging contaminant ibuprofen in water by photo-Fenton. **Water Research**, 44 (2010) 589-595.

- [12] Marco-Urrea, E.; Pérez-Trujillo, M.; Vicent, T.; Caminal, G. Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. **Chemosphere**, 74 (2009) 765–772.
- [13] Madhavan, J.; Grieser, F.; Ashokkumar, M. Combined advanced oxidation processes for the synergistic degradation of ibuprofen in aqueous environments. **Journal Hazard Materials**, 178 (2010) 202–208.
- [14] Zheng, B. G.; Zheng, Z.; Zhang, J. B.; Luo, X. Z.; Wang, J.Q.; Liu, Q.; Wang, L. H. Degradation of the emerging contaminant ibuprofen in aqueous by gamma irradiation. **Desalination**, 276 (2011) 379-385.
- [15] Caviglioli, G.; Valeria, P.; Brunella, P.; Sergio, C.; Attilia, A.; Gaetano, B. Identification of degradation products of Ibuprofen arising from oxidative and thermal treatments. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 30 (2002) 499-509.
- [16] Szabó, R. K.; Megyeri, Cs.; Illés, E.; Gajda-Schrantz, K.; Mazellier, P.; Dombi, A. Phototransformation of ibuprofen and ketoprofen in aqueous solutions. **Chemosphere**, 84 (2011) 1658-1663.
- [17] Lambropoulou, D. A.; Henando, M. D.; Konstantinou, I. K.; Thurman, E. M.; Ferrer, I.; Albanis, T. A.; Fernández-Alba, A. R. Identification of photocatalytic degradation products of bezafibrate in TiO₂ aqueous suspensions by liquid and gas chromatography. **Journal of Chromatography A**. 1183 (2008) 38-48.
- [18] Dantas, R. F.; Canterino, M.; Marotta, R.; Sans, C.; Esplugas, S.; Andreozzi, R. Bezafibrate removal by means of ozonation: Primary intermediates, Kinetics, and toxicity assessment. **Water Research**. 41 (2007) 2525-2532.
- [19] Yu, H.; Nie, E.; Xu, J.; Yan, S.; Cooper, W. J.; Song, W. Degradation of Diclofenac by Advanced Oxidation and Reduction Processes: Kinetic Studies, Degradation Pathway and Toxicity Assessments. **Water Research**. 47 (2013) 1909-1918.
- [20] Homlok, R.; Takács, E.; Wojnárovits, L. Elimination of diclofenac from water using irradiation technology. **Chemosphere**. 85 (2011) 603-608.
- [21] Coelho, A. D.; Sans, C.; Aguera, A.; Gómez, M. J. Esplugas, S.; Dezotti, M. Effects of ozone pre-treatment on diclofenac: Intermediates, biodegradability and toxicity assessment. **Science of the Total Environment**. 407 (2009) 3572-3578.
- [22] Hartmann, J.; Bartels, P.; Mau, U.; Witter, M.; Tumpling, W. V.; Hofmann, J.; Nietzsche, E. **Chemosphere**. 70 (2008) 453-461.

- [23] Lekkerkerker-Teunissen, K.; Benotti, M. J.; Snyder, S. A.; Dijk, H. C. V. Transformation of atrazine, carbamazepine, diclofenac and sulfamethoxazole by low and medium pressure UV and UV/H₂O₂ treatment. **Separation and Purification Technology**. 96 (2012) 33-43.
- [24] Martínez, C.; Canle, M.; Fernández, M. I.; Santaballa, J. A.; Faria, J. **Applied Catalysis B: Environmental**. 107 (2011) 110-118.
- [25] Hu, L.; Flanders, P. M.; Miller, P. L.; Strathmann, T. J. Oxidation of sulfamethoxazole and related antimicrobial agents TiO₂ photocatalysis. **Water Research**. 41 (2007) 2612-2626.
- [26] Abellán, M. N.; Bayarri, B.; Giménez, J.; Costa, J. Photocatalytic degradation of sulfamethoxazole in aqueous suspension of TiO₂. **Applied Catalysis B: Environmental** 74 (2007) 233-241.
- [27] Trovó, A. G.; Nogueira, R. F. P.; Aguera, A.; Sirtori, C.; Fernández-Alba, A. R. Photodegradation of sulfamethoxazole in various aqueous media: Persistence, toxicity and photoproducts assessment. **Chemosphere**. 77 (2009) 1292-1298.
- [28] Trovó, A. G.; Nogueira, R. F. P.; Aguera, A.; Fernandez-Alba, A. R.; Sirtori, C.; Malato, S. Degradation of sulfamethoxazole by solar photo-Fenton. Chemical and toxicological evaluation. **Water Research**. 43 (2009) 3922-2931.
- [29] Wang, A.; Li, Y-Y.; Estrada, A. L. Mineralization of antibiotic sulfamethoxazole by photoelectron-Fenton treatment using activated carbon fiber cathode und under UVA irradiation. **Applied Catalysis B: Environmental**. 102 (2011) 378-386.
- [30] Torres, R. A.; Abdelmalek, F.; Combet, E.; Petrier, C.; Pulgarin, C. A comparative study of ultrasonic cavitation and Fenton's reagent for Bisphenol A degradation in deionised and natural waters. **Journal Hazardous Materials**. 146 (2007) 546-551.
- [31] Deborde, M.; Rabouan, S.; Mazellier, P.; Duguet, J-P.; Legube, B. Oxidation of bisphenol A by ozone in aqueous solution. **Water Research**. 42 (2008) 4299-4308.
- [32] Poerschmann, J.; Trommler, U.; Górecki, T. Aromatic intermediate formation during oxidative degradation of Bisphenol A by homogeneous sub-stoichiometric Fentos reaction. **Chemosphere**. 79 (2010) 975-986.
- [33] Maniero, M. G.; Bila, D. M.; Dezotti, M. Degradation and estrogenic activity removal of 17β-estradiol and 17α-ethinylestradiol by ozonation and O₃/H₂O₂. **Science of the Total Environment**. 407 (2008) 105-115.

[34] Mazellier, P.; Méité, L.; De Laat, J. Photodegradation of the steroid hormones 17 β -estradiol (E2) and 17 α -ethinylestradiol (EE2) in dilute aqueous solution. **Chemosphere**. 73 (2008) 1216-1223.

[35] Vieira, K. M.; Nascentes, C. C.; Augusti, R. Ozonation of Ethinylestradiol in Aqueous-Methanolic Solution: Direct Monitoring by *Electrospray* Ionization Mass Spectrometry. **Journal Brazilian Chemical Society**. 21 (2010) 787-794.

CAPÍTULO 5: CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos, tanto para os experimentos por fotocatalise heterogênea como por fotólise direta utilizando radiação UV-C, confirmaram a alta eficiência destes processos na remoção de compostos orgânicos em meio aquoso. As taxas de remoção variaram entre 70% e 100%, para todos os compostos estudados, com exceção do EE2, onde a taxa máxima de remoção foi próxima a 50%. Para os sistemas de degradação onde se utilizou a radiação UV-A, os experimentos de fotocatalise também apresentaram altas taxas de remoção, variando na faixa de 66% a 93%, exceto para EE2. Já os experimentos de fotólise direta utilizando UV-A apresentaram uma pequena taxa de remoção apenas para o IBP, cerca de 12,5%.

O fato de alguns contaminantes apresentarem melhores taxas de eficiência na remoção por fotólise está diretamente ligado às características de absorvidade molecular de cada composto. Foi observado que quanto maior a sobreposição do espectro de absorção das moléculas com o espectro de emissão da fonte de radiação (UV-A ou UV-C), maiores são as eficiências de remoção. A única exceção foi para o composto EE2, que se apresentou mais recalcitrante aos processos de degradação utilizados.

Embora a fotólise direta, com a utilização de radiação UV-C, tenha apresentado as maiores eficiências de remoção, as maiores taxas de mineralização foram obtidas por fotocatalise heterogênea com utilização de radiação UV-C, possivelmente devido a maior eficiência na geração de radicais hidroxila. Mesmo nos sistemas com alto potencial oxidante, as taxas de mineralização foram inferiores a 55%, obtida na degradação de BZF. Estes resultados indicaram que apesar destes sistemas serem reportados como de alta eficiência, a remoção dos compostos orgânicos em água ocorrem principalmente através da conversão dos compostos alvos em subprodutos, persistentes após os tratamentos avaliados.

A espectrometria de massas de alta resolução acoplada à cromatografia líquida (HPLC-HRMS) demonstrou ser uma importante ferramenta analítica para avaliação da efetividade dos procedimentos utilizados na degradação de compostos orgânicos. A técnica HPLC-HRMS, além de identificar diversos subprodutos de degradação para todos os compostos estudados, permitiu monitorar esses subprodutos durante o tempo de execução dos procedimentos de degradação. Esses resultados foram fundamentais para avaliar os procedimentos de degradação utilizados, uma vez que apenas os resultados de remoção são insuficientes para garantir a segurança e efetividade de tais procedimentos.

Os testes de ecotoxicidade com *Artemia salina* demonstraram que apesar dos sistemas por fotocatalise heterogênea (UV-C/TiO₂) terem apresentado as maiores taxas de mineralização, os subprodutos persistentes ao final de 120 minutos para os contaminantes DCF, BZF e BPA, apresentaram ser mais tóxicos que seus precursores. Para o BZF foi observado um aumento de 80% de toxicidade. Já para os sistemas fotocatalíticos utilizando radiação UV-A, os contaminantes BZF e SMX, apresentaram subprodutos com um maior grau de toxicidade em relação aos seus precursores. Para os experimentos envolvendo a fotólise (UV-C), observou-se que, apenas para SMX, houve um leve aumento de toxicidade, próximo a 20%. Já para os contaminantes BPA e EE2, os testes de toxicidade demonstraram que os subprodutos persistentes, apresentam um menor grau de toxicidade após 120 minutos de experimento.

Apesar de estes testes serem apenas sugestivos, para uma avaliação dos efeitos de toxicidade, notou-se, que para alguns contaminantes, as soluções coletadas nos finais dos procedimentos apresentaram-se mais tóxicas que as soluções iniciais. Já para outros contaminantes, apesar de alguns procedimentos de degradação terem apresentado baixas taxas de mineralização, os subprodutos gerados e persistentes ao final dos processos de degradação, apresentaram-se menos tóxicos que seus precursores. Em alguns casos, observou-se também, que, apesar da persistência de diversos subprodutos ao final dos procedimentos propostos, não houve alteração no grau de toxicidade apresentado pela solução coletada no final dos procedimentos propostos.

Os resultados apresentados neste trabalho contribuíram para melhorar significativamente a avaliação de procedimentos de degradação que são com frequência propostos para remoção de compostos orgânicos em meio aquoso. Foi demonstrado, que, a simples constatação da remoção da molécula alvo, através dos diversos procedimentos de degradação, que são constantemente propostos como métodos promissores na remoção de compostos orgânicos em meio aquoso, é insuficiente para a garantia de segurança e efetividade em suas aplicações. Portanto, esta abordagem mais ampla, deverá ser sempre utilizada, ao se propor tratamentos alternativos para remoção de compostos orgânicos em meio aquoso.

ANEXOS: ARTIGOS PUBLICADOS

Photolysis and photocatalysis of ibuprofen in aqueous medium: characterization of by-products via liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry and assessment of their toxicities against *Artemia Salina*

Júlio César Cardoso da Silva,^a Janaina Aparecida Reis Teodoro,^a Robson José de Cássia Franco Afonso,^b Sérgio Francisco Aquino^b and Rodinei Augusti^{a*}

The degradation of the pharmaceutical compound ibuprofen (IBP) in aqueous solution induced by direct photolysis (UV-A and UV-C radiation) and photocatalysis (TiO₂/UV-A and TiO₂/UV-C systems) was evaluated. Initially, we observed that whereas photocatalysis (both systems) and direct photolysis with UV-C radiation were able to cause an almost complete removal of IBP, the mineralization rates achieved for all the photodegradation processes were much smaller (the highest value being obtained for the TiO₂/UV-C system: 37.7%), even after an exposure time as long as 120 min. Chemical structures for the by-products formed under these oxidative conditions (11 of them were detected) were proposed based on the data from liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS) analyses. Taking into account these results, an unprecedented route for the photodegradation of IBP could thus be proposed. Moreover, a fortunate result was achieved herein: tests against *Artemia salina* showed that the degradation products had no higher ecotoxicities than IBP, which possibly indicates that the photocatalytic (TiO₂/UV-A and TiO₂/UV-C systems) and photolytic (UV-C radiation) processes can be conveniently employed to deplete IBP in aqueous media. Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: photodegradation; ibuprofen; high-resolution mass spectrometry; liquid chromatography; characterization of by-products

Introduction

The presence of various pharmaceutical pollutants in the environment has received much attention because of their unknown impact on flora and fauna present in aquatic systems.^[1,2] These compounds have been detected in natural aquatic environments at trace concentrations (from ng L⁻¹ to µg L⁻¹).^[3-7] The major sources of these pollutants arise from emissions of production sites, direct disposal of over plus drugs in households and hospitals, excretion of urine or feces after drug administration to humans/animals and water treatment in fish farms.^[8]

To improve the efficiency of removal of pharmaceutical compounds in aqueous media, novel and powerful technologies have been developed, especially the so-called advanced oxidation processes (AOPs). Moreover, there has been a growing interest in the detection and identification of degradation products resulting from the application of AOPs.^[9,10] Among the AOPs, the following processes are noteworthy: photolysis,^[11-16] photocatalysis,^[17] electrochemistry and photoelectrochemistry.^[18,19] However, many challenging issues still remain, which are mainly related to the fact that products arising from the degradation of pollutants may present higher toxicity than their predecessors. This possibility

has been properly assessed by studies with brine shrimp (*Artemia salina*), an organism that is particularly sensitive to the degree of toxicity of organic compounds in solution.^[20-24]

The compound 2-[3-(2-methylpropyl)phenyl] propanoic acid, commercially available as ibuprofen (IBP), is one of the most consumed pharmaceuticals worldwide.^[25] It is a nonsteroidal agent, analgesic, antipyretic and anti-inflammatory, used for the treatment of fever and to relieve pain in general.^[25] Once administered, only 15% is eliminated as the original form, while 26% is excreted as hydroxy-IBP and 43% as carboxy-IBP (Fig. 1).^[26]

There are reports on the presence of IBP and its metabolites in effluents from sewage treatment plants and surface waters. A

* Correspondence to: Rodinei Augusti, Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil. E-mail: augusti.rodinei@gmail.com

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil

^b Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, 35400-000, Brazil

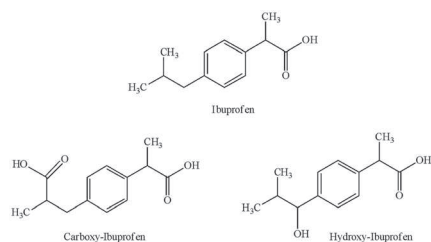


Figure 1. Chemical structures of ibuprofen (IBP), hydroxy-ibuprofen and carboxy-ibuprofen.

survey conducted between 2006 and 2010 confirmed the presence of IBP in concentrations ranging from 65 to 7100 ng L⁻¹ in sewage treatment plants and raw sewage effluents and up to 360 ng L⁻¹ in freshwater.^[27] The lower concentration of IBP reported in surface waters is probably due to a combination of factors such as photolysis, biotransformation, sorption, volatilization and dispersion in the environment.^[28]

Studies have demonstrated that IBP is partially removed in treatment stations; in some cases, a removal rate of 70% can be obtained, especially when using biological oxidation.^[29] However, the main metabolites (carboxy-IBP and/or hydroxy-IBP) persist after the biological treatment as toxic by-products that may affect the aquatic environment.^[26–30] Even reaching moderate levels of removal (70%), IBP is not easily depleted by conventional biological processes; as a consequence, an inconveniently long withholding time (usually days) is required to attain higher degradation rates. Therefore, a series of new technologies have been applied in order to more effectively reduce the presence of IBP in the environment, such as photodegradation, solar photodegradation,^[30–34] biological treatment^[35–43] and other AOPs.^[44–47]

Although some studies involving the removal of IBP from aqueous solution have been reported, detailed information regarding the overall degradation process remains scarce. The present study aims, therefore, to investigate the degradation of IBP in a watery medium induced by two distinct methods: direct photolysis (by employing UV-A and UV-C irradiation) and photocatalysis (by using the TiO₂/UV-A and TiO₂/UV-C systems). The detection and identification of recalcitrant by-products, possibly formed under these oxidative conditions, via liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS) are the main focus of the present paper. Additionally, the level of ecotoxicity of such compounds is appraised in tests against *A. salina*.

Experimental section

Chemicals

Ibuprofen (C₁₃H₁₈O₂, nominal mass 206.1307), whose chemical structure is shown in Fig. 1, was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Solvents for analytical determinations were methanol (chromatographic grade, JT Baker) and ultrapure water. Ultrapure water, from a Millipore Milli-Q system (Milford, MA, USA), was employed to prepare all solutions. Commercial TiO₂ (99% anatase), acquired from Sigma-Aldrich company (St. Louis, MO, USA), was used as a catalyst in the photocatalytic experiments.

Degradation experiments

The experiments were conducted in a jar-test apparatus (model 218/LDB06, Nova Ética, Jundiaí, São Paulo, Brazil). Three distinct

types of assays were performed: photocatalysis (using TiO₂ and UV radiation simultaneously), photolysis (with UV radiation solely) and hydrolysis (with no TiO₂ and UV radiation). In the photocatalysis and photolysis experiments, two different types of UV radiation, UV-C and UV-A, were tested. UV-C and UV-A radiations were provided by the following lamps, respectively: germicidal (power: 9 W, emission wavelength range: 200–280 nm, model: PL-S, manufacturer: Philips) and dark light (power: 9 W, emission wavelength range: 315–400 nm, model: LY9-H, manufacturer: Ecolume). Each photocatalytic or photolytic experiment was performed using three UV lamps (UV-A or UV-C) simultaneously with a total nominal power of 27 W. The three UV lamps were placed together into a cylindrical quartz tube, which was immersed in the aqueous solution of IBP. A volume of 2.0 L of this solution, prepared at an abnormally high concentration of 5 mg L⁻¹, was transferred to the rectangular container of the jar-test vessel (2.5 L volumetric capacity). The concentration of the IBP solution (5 mg L⁻¹), although much higher than those typically found in environmental samples, was chosen to make the subsequent chromatographic analysis easy, with no need of extraction and pre-concentration steps. The solution, kept protected from external light, was stirred for about 30 min before the beginning of the degradation tests. Control experiments (results not shown) indicated that the amount of IBP adsorbed by the TiO₂ material in the dark for 120 min was negligible. All tests were conducted within a narrow range of temperature (24–25 °C), which certainly has negligible effects on the course of the photodegradation processes.^[48]

In the photocatalysis experiments, 240 mg of TiO₂ (comprising a dosage of about 120 mg L⁻¹) was used. The reaction flasks (jar-test containers) were externally coated with a refractory material applied to ensure that ambient radiation would not dissipate into the medium. During the degradation experiments, the jar-test instrument was operated with a rotational speed of 250 rpm, corresponding to a gradient velocity of 400 s⁻¹. The tests were conducted in batch mode for a period of 2 h, during which aliquots were collected at intervals of 0, 5, 10, 15, 30, 60 and 120 min.

The aliquots collected during the photocatalysis experiments were centrifuged at 4000 rpm for 10 min (centrifugal model 80–20, Centribio, São Paulo, Brazil) to remove any suspended material (TiO₂). The supernatant was then recovered and stored protected from light at a temperature lower than 4 °C. The aliquots collected from the photolysis and hydrolysis tests were also maintained under identical conditions until the moment of the total organic carbon (TOC) and chromatographic analyses. Because of their high polarity, the degradation products are certainly more soluble in water than IBP (the structures proposed for all by-products will be displayed later in this paper). Hence, the occurrence of precipitation of any by-product during the centrifugation step is quite unlikely.

Total organic carbon analyses

Total organic carbon (TOC) analyses were carried out on a TOC analyzer (Shimadzu, model TOC-VCPH, Kyoto, Japan). The TOC content of each collected aliquot was obtained by the indirect method that corresponds to the difference between the total carbon and inorganic carbon values.

Ecotoxicity tests against *Artemia Salina*

The ecotoxicity tests with brine shrimp (*A. salina*) were carried out following a previous protocol.^[49] By following this procedure, an aqueous solution of sea salt (at 38 g L⁻¹) was prepared, filtered

and added to a small (15 cm diameter) round plastic container. Subsequently, many *A. salina* eggs were added in only one-half of this container, which was kept protected from light for 24 h, whereas the opposite half was continuously irradiated by a 100 W lamp. After the eggs hatched, the *A. salina* organisms migrated to the lit side. A small portion of this solution with the adult individuals was then collected and transferred to a cylindrical glass vial (3 cm diameter) and the volume completed to 1.0 mL by adding the aforementioned salt solution. Afterwards, 4.0 mL of a given aliquot, collected from the degradation experiments, was put into the vial (at the end the total volume in each vial was 5.0 mL). The vial was then left to stand under light for a period of up to 24 h. After this time, the percentage of the immobilized organisms was determined. The assays with each aliquot were conducted in triplicate to estimate the accurate toxicity of each by-product.

Liquid chromatography coupled to mass spectrometry

The analyses were performed on a liquid chromatographer (LC) coupled to a hybrid mass spectrometer (MS) system. The liquid chromatographer (Prominence LC-20 AD; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) was equipped with a binary pump and an autosampler (SIL 20 AC; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). The mass spectrometer (IT-TOF; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) provides high sensitivity and accuracy with a resolving power over 10,000 at mass-to-charge (m/z) 1000. The mass spectrometer was equipped with an electrospray ionization (ESI) source operating in both the negative (-3.5 kV) and positive modes ($+4.5$ kV) modes. Direct infusion analyses were conducted by simultaneously operating the electrospray source in the positive and negative modes and adjusting the nebulizer gas (N_2) to a flow rate of 1.5 L min^{-1} . The interface and curved line desolvation were operated at a constant temperature of 200 °C. An m/z range of 50 – 500 was recorded. The samples were directly introduced into the ESI source by injecting 5 μ L of sample via the LC autosampler. For the LC-HRMS analyses, the mass spectrometer was set to operate under the conditions specified earlier. The chromatographic conditions were as follows: an ACE C18 column (2.1×100 mm \times 3 mm particle diameter) was used, whereas water (A) and methanol (B) (at assorted proportions) were employed as the mobile phases at a flow rate of 0.2 mL min^{-1} . The gradient program started with 30% B, rising to 50% B in 4 min, then to 100% B in 3 min, which was then held for 3 min. At the end of the chromatographic run, the column was re-equilibrated to the initial conditions and stabilized for 4 min, which led to a total run time of 14 min. The injection volume was 5 μ L.

Results and discussion

Kinetics of ibuprofen degradation

All aliquots were analyzed by direct infusion ESI-HRMS in both the positive and negative modes (see Experimental Section for more details). However, because by-products were detected exclusively in the negative mode of acquisition, only this set of data will be presented and discussed herein. Hence, Fig. 2 shows the continuous decrease in the concentration of IBP as a function of reaction time observed for the photocatalysis, photolysis and hydrolysis tests. The results from the hydrolysis experiments (conducted in the absence of TiO_2 and UV radiation) indicated that IBP is quite stable in aqueous solution.

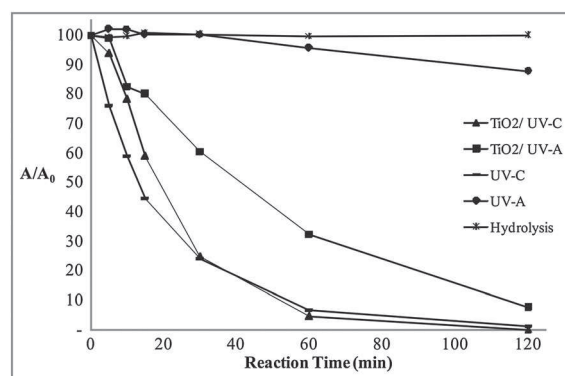


Figure 2. Relative concentration of ibuprofen achieved for different systems: photolysis (UV-A and UV-C), photocatalysis ($TiO_2/UV-A$ and $TiO_2/UV-C$) and hydrolysis. The concentrations of IBP were determined via extracted-ion chromatograms for deprotonated ibuprofen (m/z 205.1235). An initial IBP concentration of 100 was arbitrarily assigned in each assay.

The heterogeneous photocatalytic and direct photolytic systems operating under UV-C irradiation promoted the removal of IBP with high efficiencies, at rates reaching 100% and 98.9%, respectively, after 120 min of exposure. The reason for the high degradation rates achieved upon application of the photolytic system is probably due to the overlapping of the emission spectrum of the UV-C lamp (100–280 nm with a maximum emission at 254 nm) with the absorption spectrum of IBP (absorption up to 240 nm with a λ_{max} at 222 nm).^[50] This effect can also be attributed to the *in situ* generation of OH^\bullet radicals directly from the homolysis of water molecules by the 185 nm irradiation.^[51] Although the use of TiO_2 seems not to make a remarkable difference regarding the removal of IBP, its beneficial effects will be discussed following this paper.

The $TiO_2/UV-A$ and $TiO_2/UV-C$ photocatalytic systems showed similar capacities in promoting the depletion of IBP (the first one was able to degrade 92.6% of the original IBP after a treatment time of 120 min). Conversely, the direct photolysis with UV-A radiation exhibited a much lower efficiency (roughly 12.5%) than the analogous assay with UV-C (98.9%). This result indicates that the catalyst (TiO_2) is of prime importance to achieve higher degradation yields when UV-A radiation (that mimics solar radiation and is generated by means of a dark lamp; see Experimental Section for more details) is employed. The low removal efficiency achieved by the application of direct UV-A photolysis can be easily explained considering that neither IBP can absorb in the emission region of the UV-A lamp (315–400 nm with λ_{max} = 360 nm) nor OH^\bullet radicals can be generated upon the homolysis of H_2O molecules by the UV-A irradiation. This set of findings therefore indicates that the depletion of IBP induced by the $TiO_2/UV-A$ system is mostly caused by hydroxyl radicals (OH^\bullet), quite reactive species that are generated *in situ* by the interaction of H_2O molecules with the positive holes (h^+) at the valence band of excited TiO_2 catalyst.

Table 1 shows the rate constants (k) and half-life times ($t_{1/2}$) calculated for the degradation of IBP induced by the photocatalytic ($TiO_2/UV-A$ and $TiO_2/UV-C$) and photolytic (UV-A and UV-C) systems. The experimental data, i.e. the relative concentration of IBP as a function of time, achieved for each one of the four systems, were properly adjusted by a first-order kinetic model. Hence, in all the first-order kinetic plots, i.e. $\ln(C_t/C_0)$ (C_0 and C_t refer to the concentrations of IBP at the beginning and at a given reaction time, respectively) versus time, correlation coefficients (R^2) ranging from 0.943 to 0.994 (for the UV-A and $TiO_2/UV-A$

Table 1. Kinetic parameters obtained for the degradation of ibuprofen in aqueous solution induced by four distinct systems: TiO₂/UV-C, UV-C, TiO₂/UV-A and UV-A

Degradation system	R ²	k (min ⁻¹)	t _{1/2} (min)
TiO ₂ /UV-C	0.991	0.054	12.83
UV-C	0.987	0.037	18.73
TiO ₂ /UV-A	0.994	0.021	33.00
UV-A	0.943	0.001	693.00

A first-order model was used to adjust the experimental data.

systems, respectively) were achieved. An accurate analysis of Table 1 reveals that although the TiO₂/UV-C and UV-C processes yielded similar degradation rates after an identical treatment time (120 min, see previous discussion), the photocatalytic systems are more efficient to deplete IBP than the analogous photolytic processes, given that $t_{1/2}$ (TiO₂/UV-A) < $t_{1/2}$ (UV-A) and that $t_{1/2}$ (TiO₂/UV-C) < $t_{1/2}$ (UV-C). As previously stated, the superior performance of the photocatalytic systems can be related to the ability of the TiO₂ material (upon exposure to UV radiation) to generate a substantial amount of hydroxyl radicals, which promote a prompt and nonspecific attack towards target molecules present in the reaction medium.

Furthermore, it is important to state that in all experiments (photolytic and photocatalytic), the maximum variation between the pHs of the initial and final solutions was about 0.25 units. The solution pH is a complex factor that can affect photocatalytic reactions in many ways. For instance, factors such as the ionization state of TiO₂ surface, the influence of electron holes on OH[•] generation and the reduction of surface area by the agglomeration of TiO₂ particles are affected by the solution pH.^[52] This small difference between the pHs of the initial and final solutions could not cause therefore remarkable changes in the reaction kinetics.

Mineralization

Although impressive IBP degradation rates (over 90%) were achieved by the employment of the TiO₂/UV-C, TiO₂/UV-A and UV-C systems (Fig. 2), the TOC data revealed that IBP was not mineralized to a similar extent, even after a treatment time as long as 120 min. For instance, the highest mineralization rate was only 37.7% achieved upon the application of the TiO₂/UV-C system. Moreover, the mineralization rates derived from direct photolysis (UV-C and mainly UV-A) were negligible. These findings indicate that whereas most of the original IBP was not mineralized, recalcitrant by-products were generated under these conditions. The fact that the direct photolysis processes are unable to reduce the TOC content in solution strongly indicates that such refractory by-products absorb neither UV-A nor UV-C radiation. It is also evident that the highest rates of mineralization obtained by the photocatalytic systems (TiO₂/UV-C and TiO₂/UV-A) can be attributed again to their superior ability to promote the *in situ* generation of hydroxyl radicals upon exposure of the TiO₂ catalyst to UV radiation.

Identification of by-products: proposal of a degradation route

The aliquots collected during the photocatalysis and photolysis experiments were firstly analyzed via direct infusion HRMS

in the negative ion mode. Some examples of the mass spectra recorded are depicted in Fig. 3. Note the continuous decrease in the relative abundance of the ion ascribed to be the deprotonated form of IBP (m/z 205.1235). This finding thus indicates the continuous consumption of IBP by the photolytic and photocatalytic systems. A meticulous search in these mass spectra revealed the presence of 11 ions clearly distinguishable from the 'background'. Based on the HRMS data, molecular formulae for these ions, which were ascribed to be the deprotonated forms of degradation products possibly formed under these conditions, are displayed in Table 2. A maximum error of 8 ppm between the experimental and theoretical accurate masses of IBP and its by-products was observed. All these intermediates were detected at least in one of the aliquots of the photocatalytic (TiO₂/UV-C and TiO₂/UV-A) or photolytic (UV-C and UV-A) processes. Extracted-ion chromatograms (Fig. 4) were obtained for each one of these 11 ions to confirm the formation of by-products in solution. Under the chromatographic conditions employed, some by-products co-eluted (**1** and **6** as well as **7** and **8**), whereas other ones (**8**, **9** and **11**) eluted at very close retention times (Fig. 4). In spite of these chromatography limitations, the HRMS data allowed the proposition of chemical structures for each one of these by-products.

Based on these results as well as on the well-known reactivity of hydroxyl radical towards organic molecules in aqueous medium, a route for the photodegradation of IBP could thus be proposed, as outlined in Fig. 5. Hence, hydroxylated derivatives were identified by the increase of one or more oxygen atoms in the molecular formulae of IBP or some of its intermediates, with no alterations in the double bond equivalence. Among the by-products detected (**1–11**) several isomeric structures can be postulated. The correct structure (or structures), however, could not be firmly established herein based on the information provided by HRMS. Moreover, the fragmentation profile (not shown) of each ionic species (deprotonated forms of **1–11**) was useless to accomplish this task as in the MS/MS product ions arising from loss of water were dominant. For a matter of simplicity, however, only one among the several isomers possibly formed under these conditions are represented in Fig. 5. Some intermediates were proposed to be formed by successive hydroxylation starting from IBP (C₁₃H₁₈O₂). That is the case of **1** (C₁₃H₁₈O₃), (represented as two isomeric forms: α -hydroxy-carboxy-IBP and α -hydroxy-isopropyl-IBP), **2** (C₁₃H₁₈O₄) and **3** (C₁₃H₁₈O₅). Another by-product (**5**, C₁₂H₁₈O₆) was proposed herein to arise from hydroxylation of **4** (C₁₂H₁₈O₅). In addition, other by-products were suggested to be generated via alternative pathways. For instance, intermediates **4** (C₁₂H₁₈O₅) and **6** (C₁₂H₁₈O) were possibly formed by decarboxylation of **3** (C₁₃H₁₈O₅) and **1** (C₁₃H₁₈O₃), respectively. In sequence, by-product **6** (C₁₂H₁₈O) could undergo hydroxylation and loss of 2-propanol to yield intermediate **9** (C₉H₁₀O). By-product **7** (C₉H₁₀O₃) could be formed by two consecutive hydroxylations of **9** (C₉H₁₀O). It is also suggested that the subsequent oxidation of the alcohol function of **9** (C₉H₁₀O) could furnish intermediate **8** (C₉H₈O₃). Lastly, the acyclic intermediates **10** (C₆H₁₀O₃) and **11** (C₅H₁₀O₃) could be generated by successive hydroxylation of intermediates **8** and **5** that could ultimately lead to the opening of their aromatic rings. These intermediates (**10** and **11**) could be easily mineralized under these oxidative conditions. It is important to mention that some of these intermediates (**1**, **2**, **6**, **8** and **9**) have been previously reported by several research groups.^[25,32,36,38,45,51,53,54]

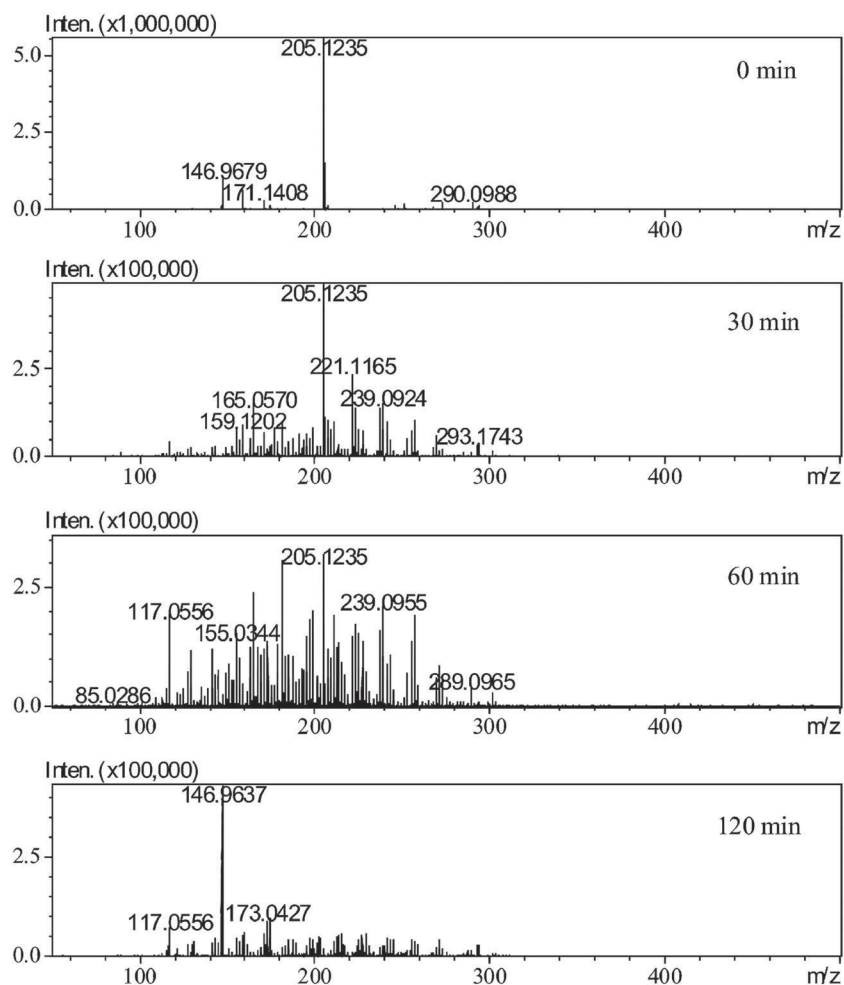


Figure 3. High resolution mass spectrometry (HRMS) recorded for aliquots collected from the TiO₂/UV-C system after the following reaction times: 0, 30, 60 and 120 min. The molecular formulae for some of the intermediates observed in these mass spectra are shown in Table 2. Note that relative abundance of the ion of *m/z* 235.1235 (deprotonated IBP) decreases as a function of reaction time.

Table 2. High-resolution mass spectrometry data and the molecular formulae calculated for the by-products generated during the photodegradation of ibuprofen in water

Compound	Molecular formula	Molecular mass (M) ^a	[M – H] [–] (theoretical)	[M – H] [–] (experimental)	Error (ppm)	Double bond equivalence
IBP	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206.1307	205.1234	205.1235	0.47	5
1	C ₁₃ H ₁₈ O ₃	222.1256	221.1183	221.1165	–5.88	5
2	C ₁₃ H ₁₈ O ₄	238.1205	237.1132	237.1138	2.38	5
3	C ₁₃ H ₁₈ O ₅	254.1154	253.1076	253.1082	3.16	5
4	C ₁₂ H ₁₈ O ₅	242.1154	241.1081	241.1088	2.70	4
5	C ₁₂ H ₁₈ O ₆	258.1103	257.1031	257.1033	0.92	4
6	C ₁₂ H ₁₈ O	178.1358	177.1285	177.1295	5.64	4
7	C ₉ H ₁₀ O ₃	166.0630	165.0557	165.0570	7.72	5
8	C ₉ H ₈ O ₃	164.0473	163.0401	163.0388	7.73	6
9	C ₉ H ₁₀ O	134.0732	133.0653	133.0651	–1.50	5
10	C ₆ H ₁₀ O ₃	130.0630	129.0557	129.0563	4.64	2
11	C ₅ H ₁₀ O ₃	118.0630	117.0557	117.0556	1.00	1

^aAccurate mass calculated by the LCMS solutions software.

The evolution of each intermediate (1–11) formed during the photodegradation processes could then be monitored by LC-HRMS. The results from the extracted-ion chromatograms

(Fig. 4) were handled to build plots of the relative concentration of each by-product (a value of 100 was attributed to the highest concentration) *versus* reaction time for all the four

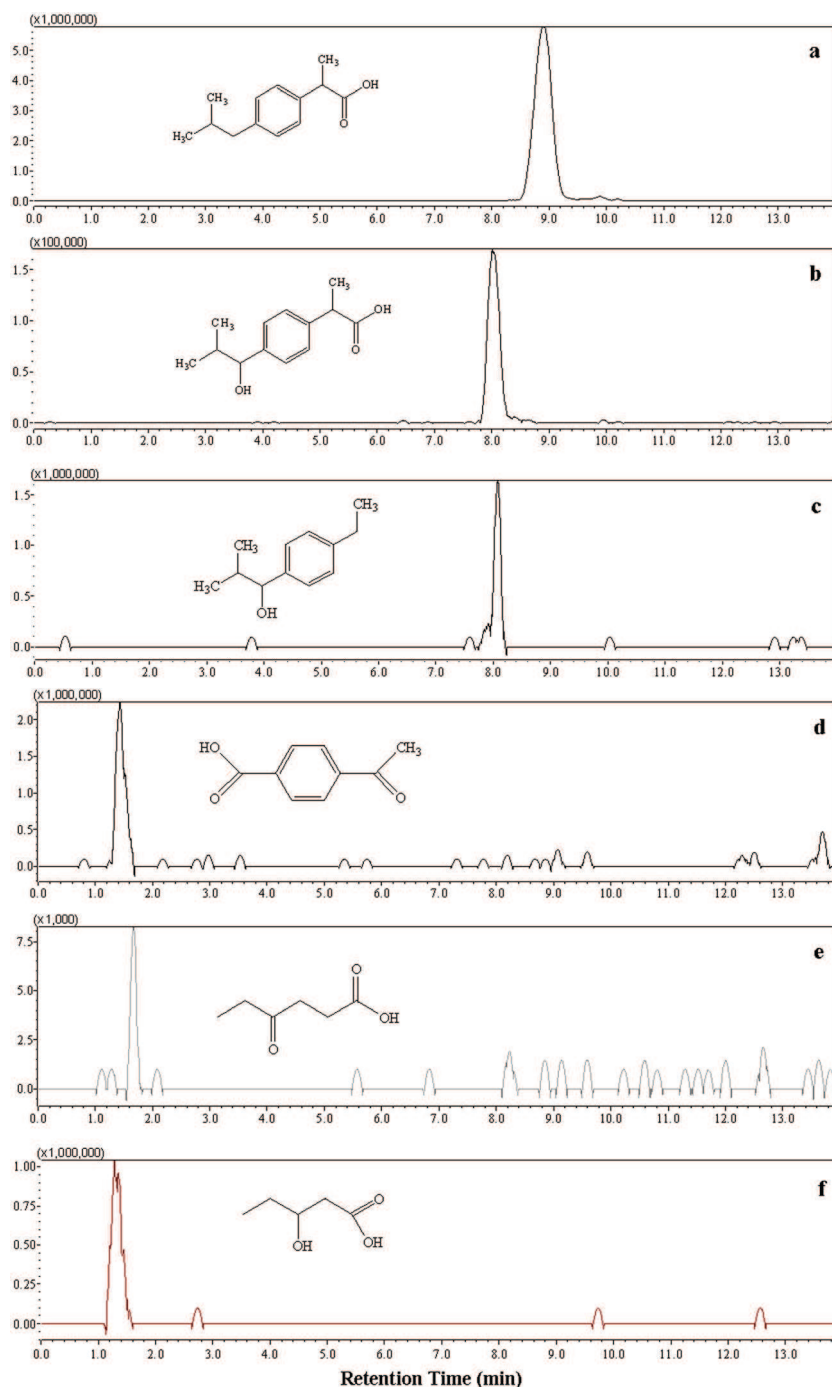


Figure 4. Extracted-ion chromatograms for the following ions [deprotonated forms of ibuprofen (IBP) and degradation products]: (a) m/z 205.1235 (IBP), (b) m/z 221.1165 (**1**), (c) m/z 177.1295 (**6**), (d) m/z 163.0388 (**8**), (e) m/z 129.0563 (**10**) and (f) m/z 117.0556 (**11**). The analyses refer to an aliquot collected after submitting an aqueous solution of IBP to the $\text{TiO}_2/\text{UV-C}$ system for 60 min.

degradation processes evaluated (Fig. 6). Hence, for the $\text{TiO}_2/\text{UV-C}$ photocatalytic system practically only intermediates **10** and **11** remained in solution after 120 min of exposure (Fig. 6(a)). The remarkable ability of the $\text{TiO}_2/\text{UV-C}$ system to generate hydroxyl radicals possibly caused the prompt depletion of the other intermediates (**1–9**), thus preventing their accumulation and detection. For the UV-C direct photolysis (Fig. 6(b)), however, several intermediates (**1**, **6**, **7**, **8**, **10** and **11**) were persistent in solution after identical treatment time. These findings seem to confirm the results from TOC analyses,

which revealed that higher mineralization rates were achieved by the $\text{TiO}_2/\text{UV-C}$ photocatalytic system. For the tests involving the $\text{TiO}_2/\text{UV-A}$ system (Fig. 6(c)), only intermediates **7**, **8** and **3** were not persistent. Conversely, after 120 min of treatment by UV-A photolysis, intermediate **1** was by far predominant (Fig. 6(d)). This result suggests that UV-A radiation is not energetic enough to excite **1** and thus to cause its conversion into the subsequent intermediates (**2–11**), as observed for the other systems ($\text{TiO}_2/\text{UV-C}$, $\text{TiO}_2/\text{UV-A}$ and UV-C) evaluated herein.

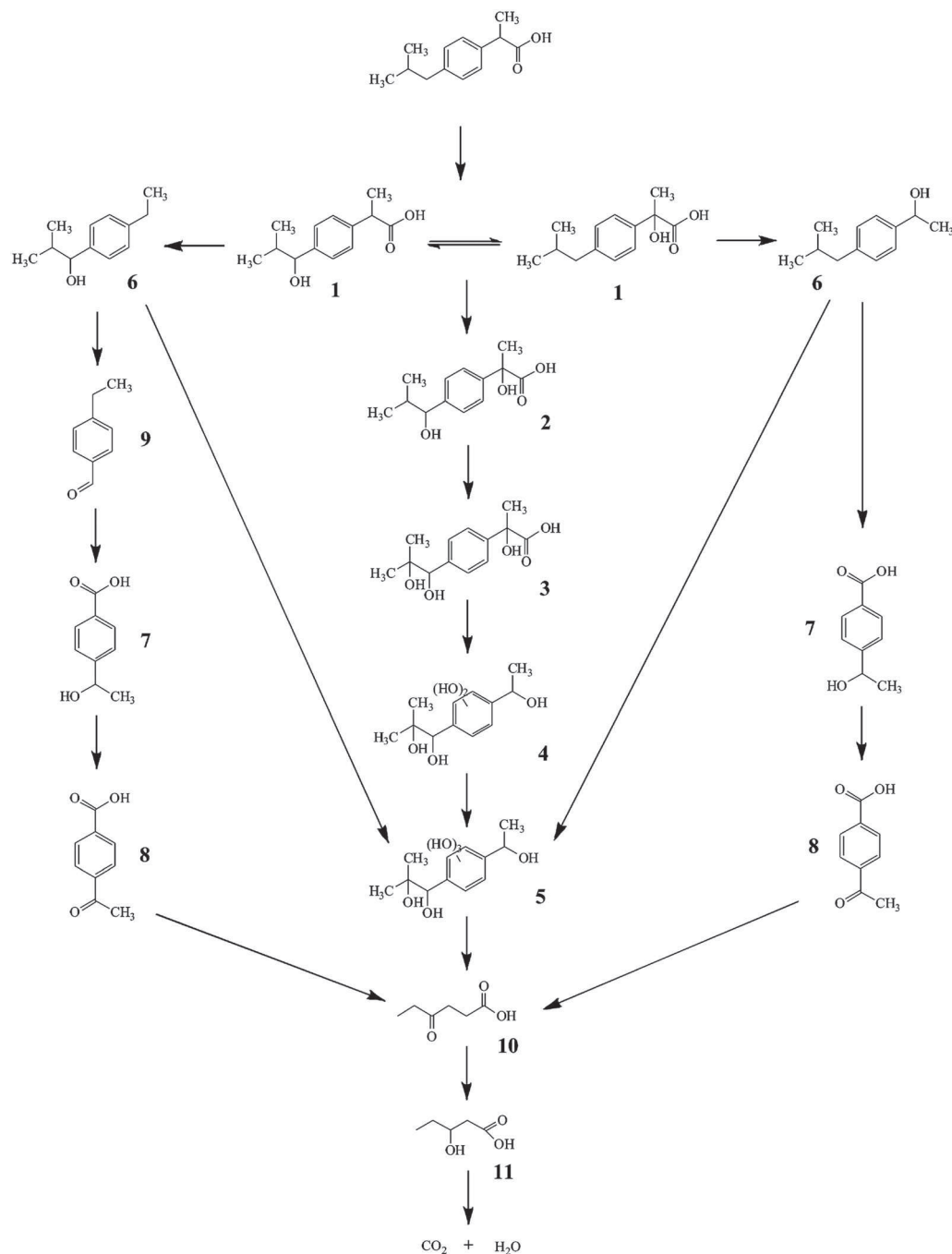


Figure 5. Proposed route for the photodegradation of ibuprofen in water as induced by the photolytic (UV-A and UV-C) and photocatalytic (TiO₂/UV-A and TiO₂/UV-C) systems. Isomeric structures can also be proposed for the degradation products. However, to facilitate visualization, only the structures 1–11 are displayed herein.

Toxicity assessment

Although several reports have described the degradation of IBP, little is known about the possible by-products generated and their degree of toxicity. As can be observed in Fig. 6, after the complete disappearance of IBP, many compounds still remain in solution, which may have a potential impact on the environment and possibly on human health. To evaluate the toxicity of IBP and its transformation products, toxicity tests against *A. salina* were conducted. These tests were performed with all aliquots taken during the degradation reactions (0, 5, 10, 15, 30, 60 and 120 min), and the mortality

rates determined in each case. A control test with saline solution was also conducted (see Experimental Section for further details).

At the end of these tests, a fortunate result emerged: just as observed for the IBP solution, the aliquots collected after an exposure time of 120 min (taken from the reaction vessels of the four degradation systems: TiO₂/UV-C, TiO₂/UV-A, UV-C, UV-A) exhibited a very low toxicity against *A. salina* (mortality rates of about 5%). This finding ensures that both the photocatalytic and photolytic systems can therefore be conveniently used to degrade IBP as toxic by-products are probably not formed under these conditions.

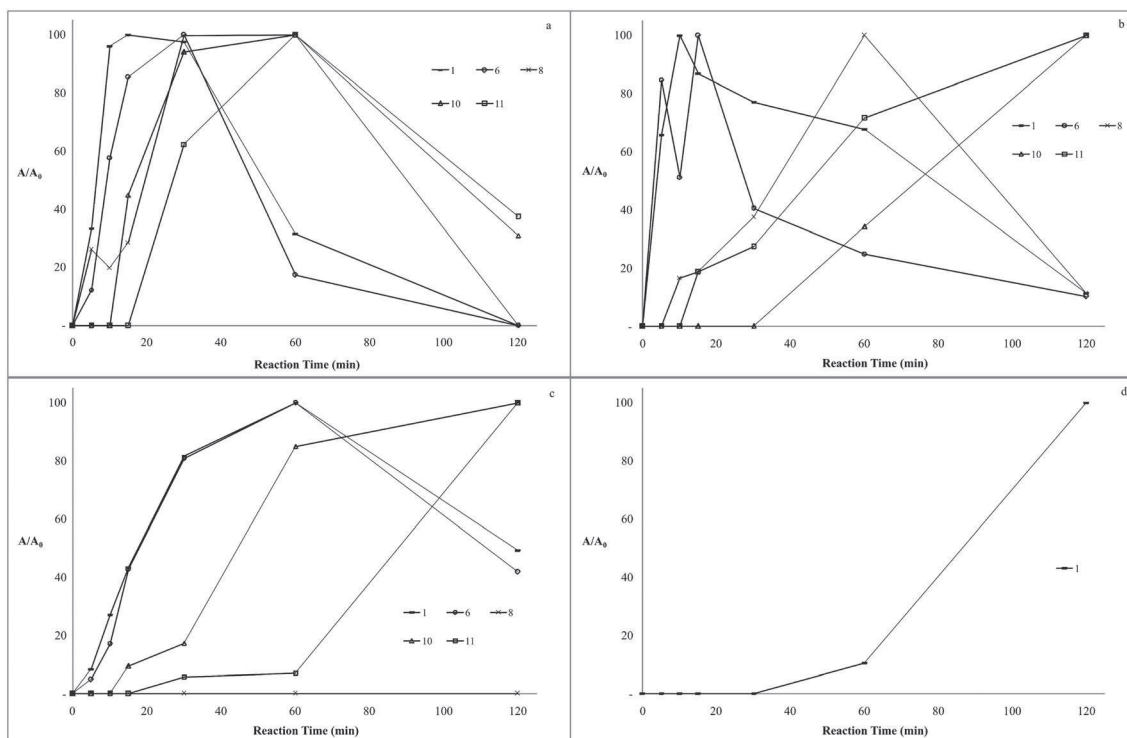


Figure 6. Plots of the relative concentrations of by-products (**1, 6, 8, 10, 11**) as a function of reaction time for the following systems: (a) $\text{TiO}_2/\text{UV-C}$, (b) $\text{TiO}_2/\text{UV-A}$, (c) $\text{TiO}_2/\text{UV-A}$ and (d) UV-A. A value of 100 was attributed to the maximum concentration of each by-product. To facilitate visualization, only 5 among the 11 by-products detected are plotted.

Conclusions

The degradation of IBP, one of the most consumed pharmaceuticals worldwide, in aqueous medium by typical photocatalytic ($\text{TiO}_2/\text{UV-C}$ and $\text{TiO}_2/\text{UV-A}$) and photolytic (UV-A and UV-C) systems was investigated herein. It was verified that all the systems (excepting UV-A) were able to cause an almost complete degradation of IBP after a reaction time of 120 min. However, it was also demonstrated that among the systems evaluated, the $\text{TiO}_2/\text{UV-C}$ photocatalytic process was the most efficient in promoting both the degradation and mineralization of the substrate. Results from high-resolution MS analyses allowed the detection and characterization of 11 by-products, many of them persistent even after an exposure of as long as 120 min. These intermediates were proposed to be formed via a prompt attack of hydroxyl radicals, reactive species produced *in situ* under the conditions of both the photocatalytic and photolytic processes, on the original substrate as well as on the subsequent by-products. Based on these results, an unprecedented route for the photodegradation of IBP in aqueous medium could be proposed. This route comprised mainly the successive oxidation of the original IBP until its final conversion into CO_2 and H_2O (mineralization). Tests against *A. salina* revealed that the 120-min aliquots collected from the four systems contained compounds with no higher toxicities than IBP. This fortunate result therefore ensures that any of these systems (excluding UV-A) can be used to deplete IBP in water bodies.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Minas Gerais State Science Foundation (FAPEMIG) and the Brazilian National Research Council (CNPq) for the financial support and the granting of research fellowships. The authors would also like thank Dr Rochel M. Lago (DQ-UFMG) for his consent to use the TOC equipment.

References

- [1] B. Halling-Sorensen, S. N. Nielsen, P. F. Lanzky, F. Ingerslev, H. C. H. Lutzhoft, S. E. Jorgensen. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. *Chemosphere* **1998**, *36*, 357.
- [2] T. A. Ternes, N. Herrmann, M. Bonerz, T. Knacker, H. Siegrist, A. Joss. A rapid method to measure the solid-water distribution coefficient (K-d) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge. *Water Res.* **2004**, *38*, 4075.
- [3] J. P. Bound, N. Voulvoulis. Predicted and measured concentrations for selected pharmaceuticals in UK rivers: implications for risk assessment. *Water Res.* **2006**, *40*, 2885.
- [4] O. V. Enick, M. M. Moore. Assessing the assessments: pharmaceuticals in the environment. *Environ. Impact Assess. Rev.* **2007**, *27*, 707.
- [5] D. Fatta-Kassinos, S. Meric, A. Nikolaou. Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 251.
- [6] J. Siemens, G. Huschek, C. Siebe, M. Kaupenjohann. Concentrations and mobility of human pharmaceuticals in the world's largest wastewater irrigation system, Mexico City-Mezquital Valley. *Water Res.* **2008**, *42*, 2124.
- [7] C. Boix, M. Ibanez, J. V. Sancho, W. M. A. Niessen, F. Hernandez. Investigating the presence of omeprazole in waters by liquid chromatography coupled to low and high resolution mass spectrometry: degradation experiments. *J. Mass Spectrom.* **2013**, *48*, 1091.
- [8] S. K. Khetan, T. J. Collins. Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to green chemistry. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2319.
- [9] S. Bouchonnet, S. Bourcier, Y. Souissi, C. Genty, M. Sablier, P. Roche, V. Boireau, V. Ingrand. GC-MSn and LC-MS/MS couplings for the identification of degradation products resulting from the ozonation treatment of acetochlor. *J. Mass Spectrom.* **2012**, *47*, 439.
- [10] I. Dalmazio, L. S. Santos, R. P. Lopes, M. N. Eberlin, R. Augusti. Advanced oxidation of caffeine in water: on-line and real-time monitoring by electrospray ionization mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 5982.
- [11] I. Kim, N. Yamashita, H. Tanaka. Performance of UV and $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$ processes for the removal of pharmaceuticals detected in secondary

- effluent of a sewage treatment plant in Japan. *J. Hazard. Mater.* **2009**, *166*, 1134.
- [12] F. L. Rosario-Ortiz, E. C. Wert, S. A. Snyder. Evaluation of UV/H₂O₂ treatment for the oxidation of pharmaceuticals in wastewater. *Water Res.* **2010**, *44*, 1440.
- [13] C. C. Ryan, D. T. Tan, W. A. Arnold. Direct and indirect photolysis of sulfamethoxazole and trimethoprim in wastewater treatment plant effluent. *Water Res.* **2011**, *45*, 1280.
- [14] F. Yuan, C. Hu, X. X. Hu, D. B. Wei, Y. Chen, J. H. Qu. Photodegradation and toxicity changes of antibiotics in UV and UV/H₂O₂ process. *J. Hazard. Mater.* **2011**, *185*, 1256.
- [15] E. Zuccato, S. Castiglioni, R. Bagnati, M. Melis, R. Fanelli. Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* **2010**, *179*, 1042.
- [16] M. Bottaro, P. Frascarolo, F. Gosetti, E. Mazzucco, V. Gianotti, S. Polati, E. Pollici, L. Piacentini, G. Pavese, M. C. Gennaro. Hydrolytic and photoinduced degradation of tribenuron methyl studied by HPLC-DAD-MS/MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *19*, 1221.
- [17] A. Y. C. Tong, R. Braund, D. S. Warren, B. M. Peake. TiO₂-assisted photodegradation of pharmaceuticals – a review. *Cent. Eur. J. Chem.* **2012**, *10*, 989.
- [18] M. Klavarioti, D. Mantzavinos, D. Kassinos. Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environ. Int.* **2009**, *35*, 402.
- [19] M. Panizza, G. Cerisola. Direct and mediated anodic oxidation of organic pollutants. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 6541.
- [20] R. Guerra. Ecotoxicological and chemical evaluation of phenolic compounds in industrial effluents. *Chemosphere* **2001**, *44*, 1737.
- [21] E. Liwarska-Bizukojc, K. Miłsch, A. Malachowska-Jutz, J. Kalka. Acute toxicity and genotoxicity of five selected anionic and nonionic surfactants. *Chemosphere* **2005**, *58*, 1249.
- [22] V. Naddeo, V. Belgiorno, D. Kassinos, D. Mantzavinos, S. Meric. Ultrasonic degradation, mineralization and detoxification of diclofenac in water: optimization of operating parameters. *Ultrason. Sonochem.* **2010**, *17*, 179.
- [23] L. Rizzo, S. Meric, M. Guida, D. Kassinos, V. Belgiorno. Heterogeneous photocatalytic degradation kinetics and detoxification of an urban wastewater treatment plant effluent contaminated with pharmaceuticals. *Water Res.* **2009**, *43*, 4070.
- [24] T. P. Sauer, L. Casaril, A. L. B. Oberziner, H. J. Jose, R. D. P. M. Moreira. Advanced oxidation processes applied to tannery wastewater containing Direct Black 38 – elimination and degradation kinetics. *J. Hazard. Mater.* **2006**, *135*, 274.
- [25] M. Skoumal, R. M. Rodriguez, P. L. Cabot, F. Centellas, J. A. Garrido, C. Arias, E. Brillas. Electro-Fenton, UVA photoelectro-Fenton and solar photoelectro-Fenton degradation of the drug ibuprofen in acid aqueous medium using platinum and boron-doped diamond anodes. *Electrochim. Acta* **2009**, *54*, 2077.
- [26] S. Weigel, U. Berger, E. Jensen, R. Kallenborn, H. Thoresen, H. Huhnerfuss. Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. *Chemosphere* **2004**, *56*, 583.
- [27] A. Pal, K. Y. H. Gin, A. Y. C. Lin, M. Reinhard. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Sci. Total Environ.* **2010**, *408*, 6062.
- [28] C. J. Gurr, M. Reinhard. Harnessing natural attenuation of pharmaceuticals and hormones in rivers. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 2872.
- [29] M. Carballa, F. Omil, A. C. Alder, J. M. Lema. Comparison between the conventional anaerobic digestion of sewage sludge and its combination with a chemical or thermal pre-treatment concerning the removal of pharmaceuticals and personal care products. *Water Sci. Technol.* **2006**, *53*, 109.
- [30] S. M. Richards, S. E. Cole. A toxicity and hazard assessment of fourteen pharmaceuticals to *Xenopus laevis* larvae. *Ecotoxicology* **2006**, *15*, 647.
- [31] R. Andreozzi, R. Marotta, N. Paxeus. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* **2003**, *50*, 1319.
- [32] F. Mendez-Arriaga, S. Esplugas, J. Gimenez. Degradation of the emerging contaminant ibuprofen in water by photo-Fenton. *Water Res.* **2010**, *44*, 589.
- [33] R. Molinari, F. Pirillo, V. Lodo, L. Palmisano. Heterogeneous photocatalytic degradation of pharmaceuticals in water by using polycrystalline TiO₂ and a nanofiltration membrane reactor. *Catal. Today* **2006**, *118*, 205.
- [34] J. L. Packer, J. J. Werner, D. E. Latch, K. McNeill, W. A. Arnold. Photochemical fate of pharmaceuticals in the environment: naproxen, diclofenac, clofibrac acid, and ibuprofen. *Aquat. Sci.* **2003**, *65*, 342.
- [35] T. Kosjek, E. Heath, B. Kompore. Removal of pharmaceutical residues in a pilot wastewater treatment plant. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 1379.
- [36] E. Marco-Urrea, M. Perez-Trujillo, T. Vicent, G. Caminal. Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere* **2009**, *74*, 765.
- [37] V. Matamoros, A. Caselles-Osorio, J. Garcia, J. M. Bayona. Behaviour of pharmaceutical products and biodegradation intermediates in horizontal subsurface flow constructed wetland. A microcosm experiment. *Sci. Total Environ.* **2008**, *394*, 171.
- [38] F. Mendez-Arriaga, S. Esplugas, J. Gimenez. Photocatalytic degradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs with TiO₂ and simulated solar irradiation. *Water Res.* **2008**, *42*, 585.
- [39] J. B. Quintana, S. Weiss, T. Reemtsma. Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water Res.* **2005**, *39*, 2654.
- [40] R. Reif, S. Suarez, F. Omil, J. M. Lema. Fate of pharmaceuticals and cosmetic ingredients during the operation of a MBR treating sewage. *Desalination* **2008**, *221*, 511.
- [41] M. Winkler, J. R. Lawrence, T. R. Neu. Selective degradation of ibuprofen and clofibrac acid in two model river biofilm systems. *Water Res.* **2001**, *35*, 3197.
- [42] J. T. Yu, E. J. Bouwer, M. Coelhan. Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent. *Agr. Water Manage.* **2006**, *86*, 72.
- [43] C. Zwiener, F. H. Frimmel. Short-term tests with a pilot sewage plant and biofilm reactors for the biological degradation of the pharmaceutical compounds clofibrac acid, ibuprofen, and diclofenac. *Sci. Total Environ.* **2003**, *309*, 201.
- [44] K. Kimura, H. Hara, Y. Watanabe. Removal of pharmaceutical compounds by submerged membrane bioreactors (MBRs). *Desalination* **2005**, *178*, 135.
- [45] J. Madhavan, F. Grieser, M. Ashokkumar. Combined advanced oxidation processes for the synergistic degradation of ibuprofen in aqueous environments. *J. Hazard. Mater.* **2010**, *178*, 202.
- [46] V. K. Sharma, S. K. Mishra. Ferrate(VI) oxidation of ibuprofen: a kinetic study. *Environ. Chem. Lett.* **2006**, *3*, 182.
- [47] C. Zwiener, F. H. Frimmel. Oxidative treatment of pharmaceuticals in water. *Water Res.* **2000**, *34*, 1881.
- [48] M. A. Fox, M. T. Dulay. Heterogeneous photocatalysis. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 341.
- [49] B. N. Meyer, N. R. Ferrigni, J. E. Putnam, L. B. Jacobsen, D. E. Nichols, J. L. McLaughlin. Brine shrimp – a convenient general bioassay for active-plant constituents. *Planta Med.* **1982**, *45*, 31.
- [50] J. Peuravuori, K. Pihlaja. Phototransformations of selected pharmaceuticals under low-energy UVA-vis and powerful UVB-UVA irradiations in aqueous solutions – the role of natural dissolved organic chromophoric material. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 1621.
- [51] R. K. Szabo, C. Megyeri, E. Illes, K. Gajda-Schrantz, P. Mazellier, A. Dombi. Phototransformation of ibuprofen and ketoprofen in aqueous solutions. *Chemosphere* **2011**, *84*, 1658.
- [52] A. Piscopo, D. Robert, J. V. Weber. Influence of pH and chloride anion on the photocatalytic degradation of organic compounds – part I. Effect on the benzamide and para-hydroxybenzoic acid in TiO₂ aqueous solution. *Appl. Catal. B-Environ.* **2001**, *35*, 117.
- [53] G. Caviglioli, P. Valeria, P. Brunella, C. Sergio, A. Attilia, B. Gaetano. Identification of degradation products of ibuprofen arising from oxidative and thermal treatments. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *30*, 499.
- [54] B. G. Zheng, Z. Zheng, J. B. Zhang, X. Z. Luo, J. Q. Wang, Q. Liu, L. H. Wang. Degradation of the emerging contaminant ibuprofen in aqueous solution by gamma irradiation. *Desalination* **2011**, *276*, 379.

Rapid Commun. Mass Spectrom. 2014, 28, 987–994
(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/rcm.6863

Photodegradation of bisphenol A in aqueous medium: Monitoring and identification of by-products by liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry

Júlio César Cardoso da Silva¹, Janaina Aparecida Reis Teodoro¹,
Robson José de Cássia Franco Afonso², Sérgio F. Aquino² and Rodinei Augusti^{1*}

¹Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 31270-901, Brazil

²Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto-MG, 35400-000, Brazil

RATIONALE: Environmental bisphenol A (BPA) contamination is currently a matter of concern. This compound can disrupt the endocrine system by mimicking natural hormones and cause adverse effects on different organisms. In addition, it has been suggested that BPA can impair brain development, especially in fetuses and children. To efficiently remove BPA from contaminated water and wastewaters, several emerging technologies have been developed. Most are based on photodegradation. However, by-products resulting from the application of such methods have not been properly characterized.

METHODS: The photodegradation of BPA was conducted using two different methods: photocatalysis (TiO₂/UV-A and TiO₂/UV-C systems) and direct photolysis (UV-A and UV-C radiation). The degradation process was continuously monitored to identify and observe the by-products formed under these conditions. Direct infusion electrospray ionization coupled to high-resolution mass spectrometry in negative ion mode [ESI(-)-HRMS] and liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (HPLC/HRMS) were employed to monitor these by-products.

RESULTS: The results revealed that the TiO₂/UV-C system was the most efficient in causing both BPA depletion and mineralization of the organic matter in solution. Moreover, accurate mass data allowed for the assignment of molecular formulae for seven by-products, many of them unprecedented, formed under these conditions. Thus, a route for the photodegradation of BPA in aqueous medium could be proposed based on these results. Finally, additional tests revealed that the by-products showed a higher toxicity against *Artemia salina* than the primary precursor.

CONCLUSIONS: All of these findings indicate that the identification of by-products arising from oxidative treatments is of primary importance because such compounds can be more hazardous than their precursors. Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

In the past few years, the formation of organic by-products either in natural waters or in wastewater treatment plants has attracted increasing interest due to their potential toxicity.^[1,2] Particularly, there is mounting evidence that the chlorination of raw and treated domestic and industrial effluents and natural water contaminated with pharmaceuticals and endocrine disrupters can lead to the formation of by-products that are more toxic than their precursors.^[3]

Bisphenol A (BPA) (Fig. 1) is a monomer used in the production of epoxy resins and polycarbonate in the plastics industry.^[4] Contamination of the environment by BPA has been a matter of great concern because this compound can disrupt the endocrine system by mimicking natural hormones that may have adverse effects on different organisms.^[5–7] In addition, there is strong evidence that BPA can impair brain

development, especially in fetuses and children.^[8–10] As a result, the use of BPA in the manufacture of baby bottles has been banned by the European Union, Canada and Brazil.^[11,12] BPA in a polymeric epoxy resin form is also widely used as a coating for metal products, including water supply lines and beverage cans, which explain its routine detection in treated water and raw sewage.^[13–17]

The removal of BPA in sewage treatment plants can reach efficiencies higher than 70%.^[18] However, inconvenient long half-lives ($t_{1/2}$) of days or even weeks for BPA have been reported depending on the environmental conditions in which this compound is released.^[19,20] In addition, up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors promote the depletion of BPA but usually with low degradation rates.^[21] Supplementary post-treatment processes coupled to such biological approaches have been employed to enhance efficiency. In this context, a number of emerging technologies, such as photodegradation, solar photodegradation,^[22] and other advanced oxidative processes,^[23–25] have been applied to efficiently remove organic pollutants (including BPA) from contaminated water and wastewaters.

* Correspondence to: R. Augusti, Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 31270-901, Brazil.
E-mail: augusti.rodinei@gmail.com

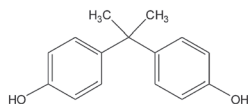


Figure 1. Chemical structure of bisphenol A (BPA).

Although some investigations involving the removal of BPA from aqueous solution have been reported,^[26–32] few studies that characterize degradation by-products have been conducted to date. Herein the degradation of BPA in an aqueous solution is evaluated using two different systems: direct photolysis (UV-A and UV-C irradiation) and photocatalysis (TiO₂/UV-A and TiO₂/UV-C systems). Both processes, especially photocatalysis with TiO₂, have been frequently employed to degrade a number of contaminants in aqueous medium,^[33,34] whereas UV-A light can be conveniently used to mimic solar radiation.^[35] High-resolution mass spectrometry (HRMS), used alone or coupled with liquid chromatography (LC), is employed to identify the recalcitrant by-products formed under these oxidative conditions. The evaluation of the toxicities of the 'degraded' aliquots in assays against *Artemia salina* is also appraised in the present paper. The advantages of using *Artemia salina* in ecotoxicological tests are that the organism has a wide geographic distribution, relatively simple laboratory culture and maintenance, high resistance to manipulation, short life cycle, high fecundity and a remarkable sensitivity towards xenobiotics.^[36]

EXPERIMENTAL

Chemicals

BPA (systematic name: 4,4'-dihydroxy-2,2-diphenylpropane; elementary composition: C₁₅H₁₆O₂; nominal mass: 228.1150 Da) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Solvents for chromatographic analyses were methanol (HPLC grade, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA) and ultrapure water. Ultrapure water, from a Milli-Q system (Millipore, Milford, MA, USA), was employed to prepare all solutions. Commercial TiO₂ (99% anatase), acquired from Sigma-Aldrich, was used as the semiconductor in the photocatalytic experiments.

Degradation experiments

The experiments were carried out in a jar-test apparatus (model 218/LDB06, Nova Ética, Jundiaí, São Paulo, Brazil) equipped with six rectangular glass containers, each with a volume of 2.5 L. Three distinct types of assays were performed: photocatalysis (using TiO₂ and UV radiation simultaneously), photolysis (with UV radiation only) and hydrolysis (with neither TiO₂ nor UV radiation). In the photocatalysis and photolysis experiments two different types of UV radiation were tested: UV-C and UV-A. The following lamps were used to provide UV-C and UV-A radiations, respectively: germicidal (power: 9 W, emission wavelength range: 200–280 nm, model: PL-S, manufacturer: Philips, The Netherlands) and black light (power: 9 W, emission wavelength range: 315–400 nm, model: LY9-H, manufacturer: Ecolume, Brazil). The photocatalytic or photolytic experiments were conducted using three UV lamps (UV-A or UV-C), which were placed together inside

a cylindrical quartz tube. The set was immersed in the rectangular glass containers filled with an aqueous solution of BPA at 5 mg.L⁻¹. Therefore, a total nominal power of 27 W was applied to each photocatalytic or photolytic experiment. The concentration of the BPA solution (5 mg.L⁻¹), although much higher than those typically found in environmental samples, was chosen to make the subsequent chromatographic analysis easy, eliminating the need for extraction and pre-concentration steps. The solution was protected from external light and was stirred for approximately 30 min before the start of the degradation tests. All tests were performed at room temperature (24–25 °C) with continuous stirring (250 rpm or 400 s⁻¹).

In the photocatalytic experiments, 240 mg of TiO₂ (final concentration of approximately 120 mg.L⁻¹) was used. The jar-test vessels were externally coated with aluminum foil, an opaque material, to ensure that ambient light would not dissipate into the reaction medium. The tests were carried out in batches over 2 h, during which 20 mL aliquots were collected at intervals of 0, 5, 10, 15, 30, 60, and 120 min.

The aliquots collected during the photocatalytic experiments were centrifuged at 4000 rpm for 10 min (centrifuge model 80-20, Centribio, São Paulo, Brazil) to remove any suspended TiO₂ catalyst. After this procedure, the supernatant was recovered, protected from light and stored at a temperature less than 4 °C. The aliquots collected from the photolysis and hydrolysis tests were also maintained under identical conditions until their use in total organic carbon (TOC) and chromatographic analyses.

TOC analyses

Total organic carbon (TOC) analyses were performed using a TOC analyzer (model TOC-VCPH, Shimadzu, Kyoto, Japan). The instrument was calibrated using standard solutions of hydrogen potassium phthalate. The TOC content of each collected aliquot was obtained indirectly by taking the difference of the total carbon (TC) and inorganic carbon (IC) values. The mineralization rates were determined by measuring the TOC content of the aliquots taken at reaction times of 0 and 120 min. Because the systems TiO₂/UV-A, UV-C, and UV-A yielded negligible mineralization rates (as will be shown below), a plot of relative organic carbon content as a function of reaction time was not included herein.

Ecotoxicity tests against *Artemia salina*

The ecotoxicity tests using brine shrimp (*Artemia salina*) were carried out following the protocol described by Mclaughlin and coworkers.^[37] In brief, an aqueous solution of sea salt (38 g.L⁻¹) was prepared, filtered and added to a 15-cm diameter plastic container. Subsequently, many *Artemia salina* eggs were added to only half of this container, which was kept protected from light for 24 h, whereas the other half was continuously illuminated by a 100 W incandescent lamp. After the eggs hatched, the *Artemia salina* organisms migrated to the lit side so that a small portion of this solution with adult individuals was collected and transferred to a cylindrical glass vial with a 3-cm diameter. The final volume was adjusted to 1.0 mL by adding the above-mentioned sea salt solution. Next, 4.0 mL of the original BPA solution (at 5 mg.L⁻¹) or a reaction aliquot collected from the degradation experiments at

timepoints of 5, 10, 15, 30, 60, and 120 min were added to the vial for a total volume of 5.0 mL. The vial was then incubated under light for 24 h. After incubation, the percentage of immobilized organisms was determined. The assays with each aliquot were carried out in triplicate to estimate the toxicity of BPA photodegradation by-products.

Analyses by direct infusion mass spectrometry and LC/MS

Direct infusion analyses were conducted on a mass spectrometer (IT-TOF, Shimadzu, Tokyo, Japan) equipped with an electrospray ionization (ESI) source with high-resolution and mass accuracy (<5 ppm) capabilities operating in negative ion mode under the following conditions: ESI (electrospray) voltage of -3.5 kV; nebulizer gas flow rate (N_2) of $1.5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; curved desorption line (CDL) interface temperature of $200 \text{ }^\circ\text{C}$; drying gas pressure of 100 kPa; and octopole ion accumulation time of 100 ms. The collected aliquots (5 μL) were directly introduced into the ESI source via the HPLC autosampler (SIL 20AC; Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) at a flow rate of $200 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ with HPLC-grade methanol (Merck, Germany). A mass-to-charge (m/z) range of 50–500 was recorded for each aliquot analyzed. The HPLC/HRMS analyses were performed on a high-performance liquid chromatograph (Prominence LC-20AD; Shimadzu Corp.) coupled with the aforementioned hybrid mass spectrometry device. The liquid chromatography system was also equipped with a binary pump and the aforementioned autosampler. In these analyses, the mass spectrometer was set to operate under the conditions as specified above. An ACE C18 column ($2.1 \times 100 \text{ mm}$ dimensions with a $3\text{-}\mu\text{m}$ particle diameter) was used. Chromatography employed mobile phases of water (A) and methanol (B) at a flow rate of $0.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The gradient program started at 30% B, increased to 50% B in 4 min, and then to 100% B over 3 min, which was then maintained for 3 min. At the end of the chromatographic run, the column was re-equilibrated to the initial conditions for 4 min. A total time of 14 min was therefore employed for each chromatographic run. A sample volume of 5 μL was used for each HPLC/HRMS analysis. Extracted-ion chromatograms were generated for the characteristic ions of BPA and its by-products (see further discussion below).

RESULTS AND DISCUSSION

Kinetics of BPA degradation

Figure 2 displays plots of BPA concentration as a function of time during the photocatalysis ($\text{TiO}_2/\text{UV-C}$ and $\text{TiO}_2/\text{UV-A}$), photolysis (UV-C and UV-A) and hydrolysis (with no TiO_2 and UV radiation) experiments. These plots were constructed using the chromatographic peak areas measured from the extracted-ion chromatograms (deprotonated BPA, m/z 227.1071) for each collected aliquot. Note that the results of the hydrolysis experiments indicated that BPA is quite stable in aqueous solution. Moreover, an analogous control experiment indicated that the amount of BPA adsorbed by TiO_2 in the absence of UV radiation was negligible after 120 min.

The heterogeneous photocatalytic and direct photolytic systems with UV-C irradiation caused the removal of 98% and 70% of the BPA, respectively, after 120 min. The high

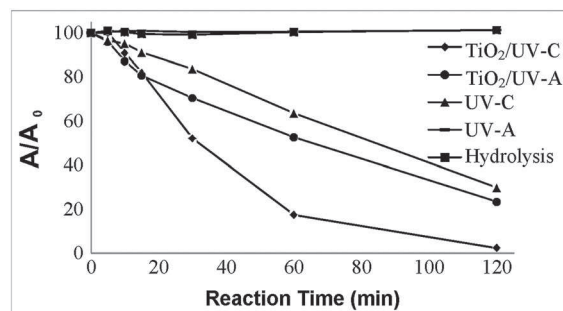


Figure 2. Plots of the relative concentration of bisphenol A (BPA) in aqueous medium as a function of reaction time. The concentration of BPA was determined by HPLC/HRMS directly from aliquots collected at assorted times for the following processes: photolysis (UV-A and UV-C), photocatalysis ($\text{TiO}_2/\text{UV-A}$ and $\text{TiO}_2/\text{UV-C}$) and hydrolysis (one determination for each aliquot). A and A_0 refer to the chromatographic peak areas at reaction times t and 0, respectively.

degradation rates achieved by the UV-C photolytic system is most likely due to the partial overlap of wavelengths emitted by the UV-C lamp (100–280 nm with a maximum emission at 254 nm) and wavelengths absorbed by BPA (absorption up to 290 nm with a λ_{max} at 276 nm). A similar rationale explains why BPA removal was almost 0% when UV-A radiation (emission region at 315–400 nm with a λ_{max} of 360 nm) was applied. The results shown in Fig. 2 also indicate that the TiO_2 catalyst is of prime importance to achieve BPA degradation, especially when UV-A radiation, a mimic of solar radiation, is employed (the degradation rate of BPA by the $\text{TiO}_2/\text{UV-A}$ system reached 77% after 120 min). These findings indicate that BPA removal by the photocatalytic systems was caused by the *in situ* formation of hydroxyl radicals ($\text{OH}\cdot$) via the interaction of water molecules with the positive holes (h^+) at the valence band of the excited TiO_2 catalyst. Hydroxyl radicals are highly reactive with a high reductive potential that promptly promote a nonspecific attack on organic molecules, which leads to their oxidation and subsequent mineralization. These results are in accordance with data from the literature,^[38] which attest that a minimum of 3.2 eV ($\lambda < 385 \text{ nm}$) is needed to excite electrons from the valence to the conduction band of TiO_2 .

Table 1 shows the rate constants (k) and half-lives ($t_{1/2}$) calculated for BPA degradation promoted by the photocatalytic ($\text{TiO}_2/\text{UV-C}$ and $\text{TiO}_2/\text{UV-A}$) and photolytic (UV-C and UV-A) systems. The experimental data, namely, the relative concentrations of BPA as a function of time, were described

Table 1. Kinetic parameters obtained for the degradation of bisphenol A in aqueous solution induced by the photocatalytic ($\text{TiO}_2/\text{UV-C}$ and $\text{TiO}_2/\text{UV-A}$) as well as the photolytic (UV-C and UV-A) systems. A first-order model was used to describe the experimental data for each degradation system

Degradation system	R^2	k (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)
$\text{TiO}_2/\text{UV-C}$	0.994	0.032	21.66
UV-C	0.987	0.010	69.30
$\text{TiO}_2/\text{UV-A}$	0.981	0.010	63.00
UV-A	–	–	–

adequately by a first-order kinetic model. In all the first-order kinetic plots of $\ln(C_t/C_0)$ (C_0 and C_t refer to the relative concentrations of BPA at the beginning and at a given reaction time, respectively) versus time, the correlation coefficients (R^2) ranged from 0.981 to 0.994 for the UV-C and TiO₂/UV-A systems, respectively. The data displayed in Table 1 confirm therefore that the photocatalytic systems more efficiently degrade BPA than the analogous photolytic processes, given that $t_{1/2}$ (TiO₂/UV-A) \ll $t_{1/2}$ (UV-A) and $t_{1/2}$ (TiO₂/UV-C) $<$ $t_{1/2}$ (UV-C).

Mineralization

Although higher BPA removal efficiencies (over 70% after 120 min) were achieved by employing the TiO₂/UV-C, TiO₂/UV-A and UV-C systems (Fig. 2), the TOC data revealed that BPA was not mineralized to a similar extent, even after a treatment time as long as 120 min. For instance, the highest mineralization rate (28%) was achieved by the application of the TiO₂/UV-C system. The other systems evaluated herein, namely, TiO₂/UV-A, UV-C and UV-A, yielded negligible

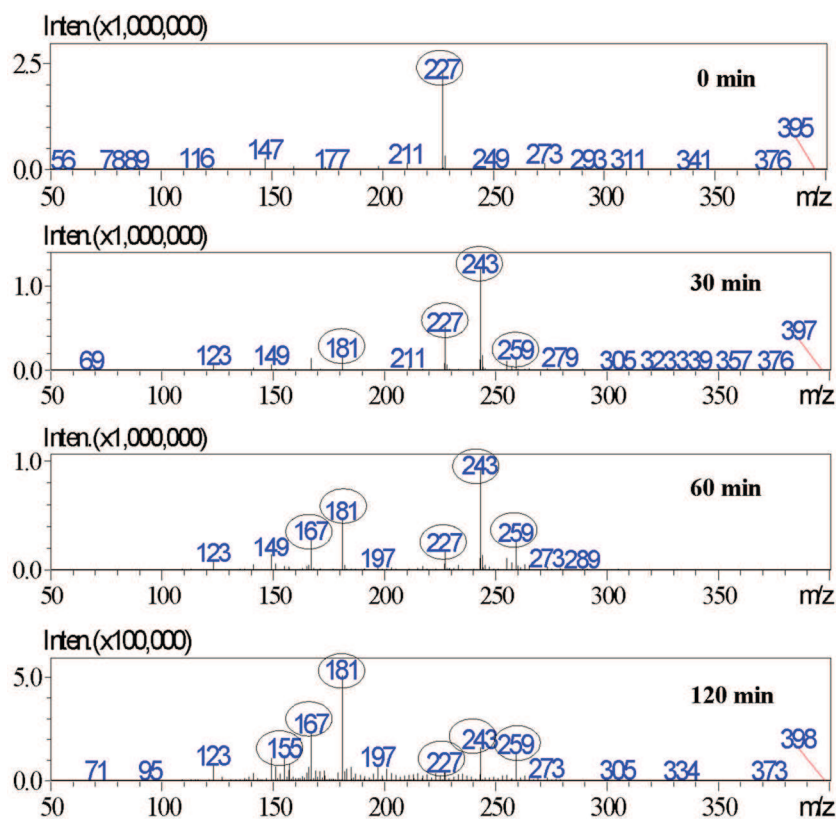


Figure 3. ESI(-)-HRMS spectra of the aliquots collected at assorted times from the reaction vessel containing an aqueous solution of BPA exposed to the TiO₂/UV-C system: (a) 0 min; (b) 30 min; (c) 60 min; and (d) 120 min. Emerging ions are indicated in the mass spectra of the reaction aliquots.

Table 2. Retention times (t_R) and molecular formulae (calculated from HRMS data) of BPA and its main photodegradation by-products

Compound	Molecular formula	Molecular mass (M) ^a	[M-H] ⁻ Theoretical	[M-H] ⁻ Experimental	Error (ppm)	DBE ^b	t_R (min)
BPA	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	228.1150	227.1072	227.1071	-0.44	8	8.95
1	C ₁₅ H ₁₆ O ₃	244.1099	243.1021	243.1022	-0.41	8	8.50
2	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	260.1049	259.0970	259.0963	-2.70	8	7.85
3	C ₁₅ H ₁₄ O ₃	242.0943	241.0865	241.0869	1.66	9	7.80
4	C ₉ H ₁₂ O ₃	168.0786	167.0708	167.0714	3.59	4	3.40
5	C ₉ H ₁₀ O ₄	182.0579	181.0501	181.0509	3.87	5	1.50
6	C ₇ H ₈ O ₄	156.0423	155.0344	155.0347	1.94	4	1.45
7	C ₆ H ₆ O ₄	142.0266	141.0188	141.0183	-1.34	4	1.35

^aAccurate mass calculated by LCMS-Solutions software.

^bDouble-bond equivalence.

mineralization rates. Therefore, these results indicate that most of the original BPA was converted into recalcitrant by-products.

Identification of by-products: proposal of a degradation route

The aliquots collected during the degradation experiments were analyzed first by direct infusion HRMS. For instance, the mass spectra determined from the aliquots collected from

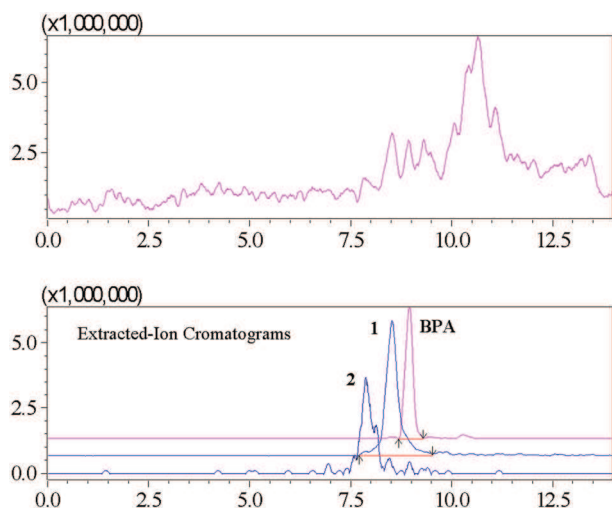


Figure 4. Full scan and extracted-ion chromatograms (m/z 227.1072, 243.1021 and 259.0970 for BPA, by-product 1 and by-product 2, respectively) recorded from an aliquot collected from the $\text{TiO}_2/\text{UV-C}$ reaction system after an exposure time of 60 min.

the $\text{TiO}_2/\text{UV-C}$ system are displayed in Fig. 3. The observation of additional ions that were exclusively detected in the mass spectra of the reaction aliquots is most likely related to the formation of by-products over the course of the reaction. A meticulous inspection of these mass spectra allowed for the identification of seven by-products (1–7) arising from the photodegradation of BPA. The HRMS data allowed for the proposal of molecular formulae for all of these by-products with a maximum error of 4 ppm between the experimental and theoretical accurate masses of their deprotonated forms (Table 2).

The formation of each by-product (1–7) created during photodegradation could then be monitored by HPLC/HRMS. For instance, Fig. 4 shows the full scan and three representative extracted-ion chromatograms (m/z 227.1072, 243.1021 and 259.0970 for BPA, by-product 1 and by-product 2, respectively) from the reaction aliquot that was collected after exposing the BPA solution for 60 min to the $\text{TiO}_2/\text{UV-C}$ system. Full scan and extracted-ion chromatograms (for by-products 1–7) were acquired for all aliquots collected from the four degradation systems investigated. These chromatographic data (peak areas) were analyzed to build plots of the relative concentration of each by-product (1–7) versus reaction time (Fig. 5). Additional experimental replicates using three independent reaction vessels treated in the same manner as the $\text{TiO}_2/\text{UV-C}$ system revealed that the chromatographic peak areas for all compounds (BPA and by-products) exhibited negligible variation among the aliquots collected at identical reaction times. In fact, the average relative standard deviation of approximately 5% for these measurements was much smaller than the changes in the relative concentrations of BPA and by-products. Because of this, error bars were not included in the plots displayed in Figs. 2 and 4. For the $\text{TiO}_2/\text{UV-C}$ system (Fig. 5(a)) all of the by-products (1–7) remained

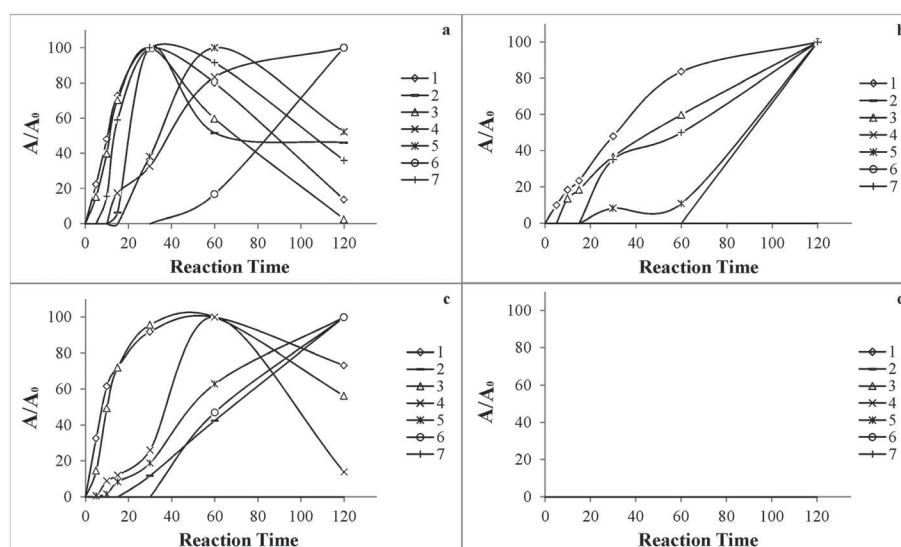


Figure 5. Plots of the relative concentrations of the degradation products of BPA (1–7) versus time for the following systems: (a) $\text{TiO}_2/\text{UV-C}$; (b) UV-C; (c) $\text{TiO}_2/\text{UV-A}$; and (d) UV-A. The concentrations of the by-products were determined by HPLC/HRMS directly from the aliquots collected at assorted times (one determination for each aliquot). A and A_0 refer to the chromatographic peak areas at reaction times t and 0, respectively. A value of 100 was attributed to the maximum relative concentration of each by-product.

in solution after 120 min of exposure (note that by-products 5 and 6 reached their maximum relative concentration at this time). However, a distinct behavior was observed for the UV-C system (Fig. 5(b)): after an identical exposure time (120 min) by-products 1, 2, 3, 4 and 7 reached their maximum relative concentrations, whereas compounds 5 and 6 could not be detected. After 120 min of treatment by the TiO₂/UV-A system (Fig. 5(c)), by-product 7 was the only one not noticeable, whereas compounds 2, 4 and 6 were observed at their maximum relative concentrations. Finally, the behavior of the UV-A photolytic system was completely different in comparison with the other processes but consistent with the results previously described (Fig. 2): its application on the BPA solution yielded no degradation products (Fig. 5(d)).

Based on these results as well as on the well-known reactivity of hydroxyl radicals towards organic molecules in aqueous medium, a route for the photodegradation of BPA could therefore be proposed, as outlined in Fig. 6. Hence, it was proposed that BPA undergoes successive

hydroxylations to yield the hydroxylated compounds 1 (C₁₅H₁₆O₃) and 2 (C₁₅H₁₆O₄). By-products 1 and 2 were identified because they contain one or more additional oxygen atoms in relation to BPA (C₁₅H₁₆O₂) but have the same DBE (double-bond equivalence) (Table 2). The correct position of the extra hydroxyl groups in the chemical structures of by-products 1 and 2 could not be conclusively established exclusively from the information provided by HRMS. The information provided by the fragmentation profiles (not shown) of both species (deprotonated forms of 1 and 2) were also useless in accomplishing this task as the unique fragments that could be observed arose from the loss of water molecules. For the sake of simplicity, however, only one among the several possible isomers (by-product 1: hydroxylation at C5; by-product 2: two hydroxylations at C5 and C6) formed under these conditions is represented in Fig. 6. Note that the retention times of BPA and by-products 1 and 2 are in the following order: BPA > 1 > 2 (Table 2 and Fig. 4). This retention

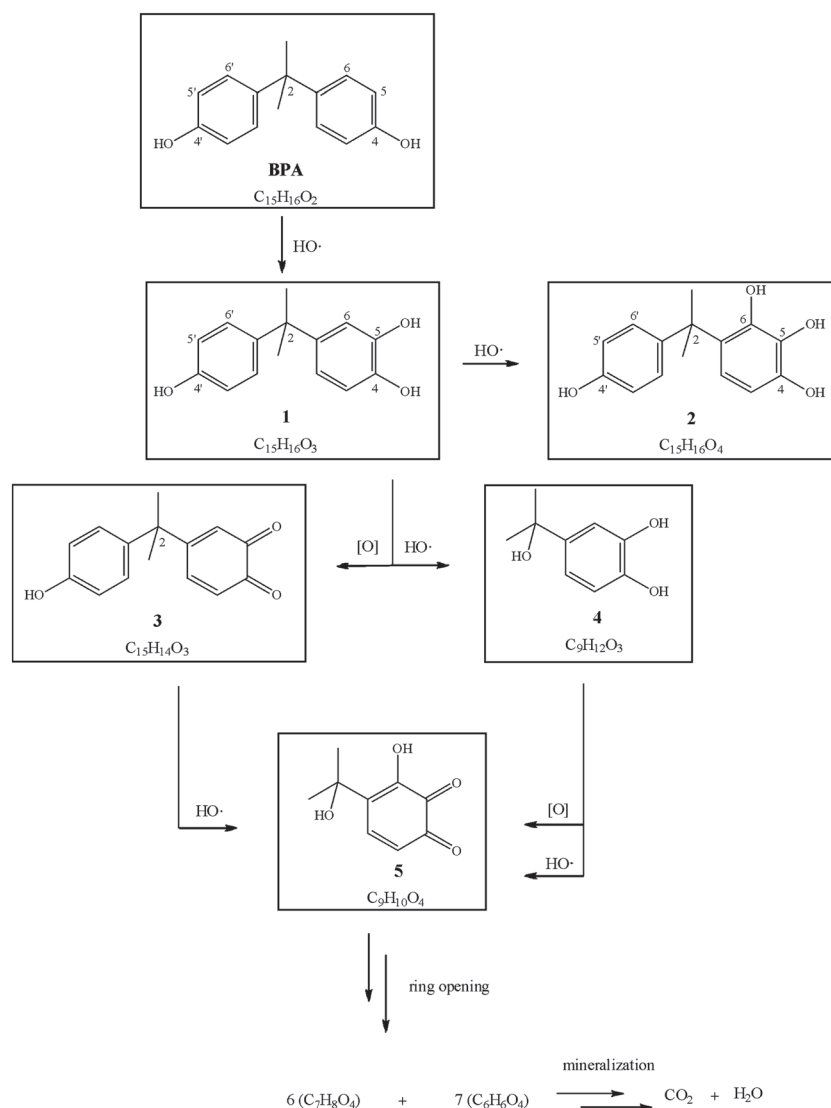


Figure 6. Proposed route for the degradation of bisphenol A (BPA) in water as induced by the photodegradation systems.

order is reasonable because the most polar degradation product (2) should elute faster from the non-polar (C18) chromatographic column in relation to the other compounds. Similarly, the retention time of 1 is less than that of BPA.

Other by-products were directly generated from 1. Hence, quinone 3 (C₁₅H₁₄O₃) was proposed to form by the oxidation of 1 (C₁₅H₁₆O₃), whereas the formation of 4 (C₉H₁₂O₃) may have been proceeded by the attack of a hydroxyl radical at C2 of 1 followed by the release of a phenolic moiety. In sequence, quinonic intermediate 5 (C₉H₁₀O₄) was formed via two distinct channels: by a hydroxyl radical attack at C2 of 3 or via the oxidation of the two OH groups of 4. On the other hand, degradation products 6 (C₇H₈O₄) and 7 (C₆H₆O₄), which are most likely acyclic compounds but for which no structures were proposed herein, could be generated by successive hydroxylations of intermediate 5 followed by ring opening. Finally, intermediates 6 and 7 could be easily mineralized under these oxidative conditions to form carbon dioxide and water.

Some of these intermediates (or one of their positional isomers) have been previously reported. For instance, Torres and coworkers^[39] studied ultrasonic cavitation degradation of BPA and reported the formation of intermediates 1 and 2. Deborde and coworkers^[40] investigated BPA oxidation by ozone in aqueous solution and reported the formation of compounds 1, 2 and 3. Poerschmann and coworkers^[41] also described the generation of intermediate 1 during the oxidative degradation of BPA.

Toxicity assessment

Although several reports have described the degradation of BPA, little is known about the toxicity of its by-products. As can be observed in Fig. 5, many compounds remain in solution after 120 min of treatment by the photodegradation systems. To evaluate the toxicity of BPA and its transformation products, tests with *Artemia salina* were performed. These simple ecotoxicity tests were performed with all the aliquots collected (0, 5, 10, 15, 30, 60, and 120 min) from all the experiments (TiO₂/UV-C, TiO₂/UV-A, UV-C, UV-A) to verify whether the toxicity of such 'degraded' aliquots could be higher than that of the original BPA solution. The mortality rates of *Artemia salina* were determined in each case. A control test with saline solution was also employed as explained in the Experimental section.

The initial aliquot (0 min) showed that the BPA solution exhibited a high degree of toxicity against *Artemia salina* (mortality rates of approximately 50%). The results showed that toxicity increased (mortality rates of approximately 80%) for the 'degraded' aliquot collected after 120 min exposed to the TiO₂/UV-C system. For the other systems (TiO₂/UV-A, UV-C, UV-A), however, the mortality rates were nearly the same as that of the initial BPA solution. These results therefore indicate that, although a higher mineralization rate was achieved by the application of the TiO₂/UV-C system, the degradation products accumulated in this solution after an exposure time of 120 min seemed to possess higher toxicity against *Artemia salina* than that measured for BPA. The hypothesis that the difference in the mortality rates could be caused by a pH difference between the original and final samples was rejected because the ΔpH was insignificant.

CONCLUSIONS

The degradation of BPA in aqueous medium by typical photocatalytic (TiO₂/UV-C and TiO₂/UV-A) and photolytic (UV-A and UV-C) systems was investigated. The use of direct infusion HRMS and HPLC/HRMS furnished valuable information that allowed for the identification and characterization of seven by-products, many of them unprecedented, arising from the successive oxidation steps of BPA induced by *in situ* generated hydroxyl radicals. Based on these results, a novel route for the photodegradation of BPA was proposed. Tests against *Artemia salina* revealed that the 'degraded' aliquot collected from the TiO₂/UV-C system (after 120 min) exhibited higher toxicity than that of the original BPA solution. This result therefore indicates that the application of processes to degrade organic contaminants in water bodies must be cautiously implemented. Finally, the presented results may shed light on the fate of BPA released in natural water systems.

Acknowledgements

The authors thank the Minas Gerais State Science Foundation (FAPEMIG) and the Brazilian National Research Council (CNPq) for their financial support and the granting of research fellowships. The authors are also indebted to Dr. M. Rochel Lago (DQ-UFMG) for his cooperation in allowing us to use the TOC equipment.

REFERENCES

- [1] K. Fent, A. A. Weston, D. Caminada. *Aquat. Toxicol.* **2006**, *76*, 122.
- [2] M. Isidori, A. Nardelli, L. Pascarella, M. Rubino, A. Parrella. *Environ. Int.* **2007**, *33*, 635.
- [3] N. H. El Najjar, M. Deborde, R. Journel, N. K. V. Leitner. *Water Res.* **2013**, *47*, 121.
- [4] C. A. Staples, P. B. Dorn, G. M. Klecka, S. T. O'Block, L. R. Harris. *Chemosphere* **1998**, *36*, 2149.
- [5] A. Hatef, S. M. H. Alavi, A. Abdulfatah, P. Fontaine, M. Rodina, O. Linhart. *Ecotoxicol. Environ. Safte.* **2012**, *76*, 56.
- [6] C. B. Herath, W. Z. Jin, G. Watanabe, K. Arai, A. K. Suzuki, K. Taya. *Endocrine* **2004**, *25*, 163.
- [7] J. O. Honkanen, I. J. Holopainen, J. V. K. Kukkonen. *Chemosphere* **2004**, *55*, 187.
- [8] J. M. Braun, R. Hauser. *Curr. Opin. Pediatr.* **2011**, *23*, 233.
- [9] J. H. Kang, F. Kondo, Y. Katayama. *Toxicology* **2006**, *226*, 79.
- [10] J. T. Wolstenholme, E. F. Rissman, J. J. Connelly. *Horm. Behav.* **2011**, *59*, 296.
- [11] A. L. Brody. *Food Technol.* **2013**, *67*, 75.
- [12] E. J. Hoekstra, C. Simoneau. *Crit. Rev. Food Sci.* **2013**, *53*, 386.
- [13] A. M. Calafat, X. Y. Ye, L. Y. Wong, J. A. Reidy, L. L. Needham. *Environ. Health Persp.* **2008**, *116*, 39.
- [14] H. B. Lee, T. E. Peart. *J. AOAC Int.* **2000**, *83*, 290.
- [15] W. V. Welshons, S. C. Nagel, F. S. vom Saal. *Endocrinology* **2006**, *147*, S56.
- [16] A. Motoyama, A. Suzuki, O. Shirota, R. Namba. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, *13*, 2204.
- [17] J. Y. Wang, W. C. Schnute. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 2605.
- [18] J. M. Zhao, Y. M. Li, C. J. Zhang, Q. L. Zeng, Q. Zhou. *J. Hazard. Mater.* **2008**, *155*, 305.
- [19] Y. P. Chin, P. L. Miller, L. K. Zeng, K. Cawley, L. K. Weavers. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*, 5888.

- [20] J. Y. Hu, X. Chen, G. Tao, K. Kekred. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 4097.
- [21] F. B. Queiroz, E. M. F. Brandt, S. F. Aquino, C. A. L. Chernicharo, R. J. C. F. Afonso. *Water Sci. Technol.* **2012**, *66*, 2562.
- [22] Z. Peng, F. Wu, N. S. Deng. *Environ. Pollut.* **2006**, *144*, 840.
- [23] M. Inoue, Y. Masuda, F. Okada, A. Sakurai, I. Takahashi, M. Sakakibara. *Water Res.* **2008**, *42*, 1379.
- [24] B. Ning, N. Graham, Y. P. Zhang, M. Nakonechny, M. G. El-Din. *Ozone Sci. Eng.* **2007**, *29*, 153.
- [25] R. A. Torres, F. Abdelmalek, E. Combet, C. Petrier, C. Pulgarin. *J. Hazard. Mater.* **2007**, *146*, 546.
- [26] X. X. Jiang, Y. L. Wu, P. Wang, H. J. Li, W. B. Dong. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2013**, *20*, 4947.
- [27] C. Z. Jia, Y. X. Wang, C. X. Zhang, Q. Y. Qin, S. Q. Kong, S. K. Yao. *Environ. Eng. Sci.* **2012**, *29*, 630.
- [28] G. Xu, H. Ren, M. H. Wu, N. Liu, Q. Yuan, L. Tang, L. Wang. *Nucl. Sci. Technol.* **2011**, *22*, 277.
- [29] A. Colombo, G. Cappelletti, S. Ardizzzone, I. Biraghi, C. L. Bianchi, D. Meroni, C. Pirola, F. Spadavecchia. *Environ. Chem. Lett.* **2012**, *10*, 55.
- [30] J. S. Park, N. Her, Y. Yoon. *Desalin. Water Treat.* **2011**, *30*, 300.
- [31] K. J. Zhang, N. Y. Gao, Y. Deng, T. F. Lin, Y. Ma, L. Li, M. H. Sui. *J. Environ. Sci. China* **2011**, *23*, 31.
- [32] X. J. Yang, P. F. Tian, C. X. Zhang, Y. Q. Deng, J. Xu, J. L. Gong, Y. F. Han. *Appl. Catal. B Environ.* **2013**, *134*, 145.
- [33] S. Ahmed, M. G. Rasul, R. Brown, M. A. Hashib. *J. Environ. Manage.* **2011**, *92*, 311.
- [34] Z. A. Alothman, M. R. Khan, S. M. Wabaidur, M. R. Siddiqui. *Sensor Lett.* **2012**, *10*, 698.
- [35] L. R. de Paula, A. L. A. Parussulo, K. Araki, H. E. Toma. *J. Pharm. Sci.* **2012**, *101*, 726.
- [36] B. S. Nunes, F. D. Carvalho, L. M. Guilhermino, G. Van Stappen. *Environ. Pollut.* **2006**, *144*, 453.
- [37] B. N. Meyer, N. R. Ferrigni, J. E. Putnam, L. B. Jacobsen, D. E. Nichols, J. L. Mclaughlin. *Planta Med.* **1982**, *45*, 31.
- [38] O. Carp, C. L. Huisman, A. Reller. *Prog. Solid State Chem.* **2004**, *32*, 33.
- [39] R. A. Torres, C. Petrier, E. Combet, M. Carrier, C. Pulgarin. *Ultrason. Sonochem.* **2008**, *15*, 605.
- [40] M. Deborde, S. Rabouan, P. Mazellier, J. P. Duguet, B. Legube. *Water Res.* **2008**, *42*, 4299.
- [41] J. Poerschmann, U. Trommler, T. Gorecki. *Chemosphere* **2010**, *79*, 975.