



Universidade de Aveiro

Departamento de Química

Ano 2013

**Nuno Miguel
Carriga Mota**

**Fotodegradação do metoprolol com
geradores de oxigénio singlete**



Universidade de Aveiro

Ano 2013

Departamento de Química

**Nuno Miguel
Carriça Mota**

Fotodegradação do metoprolol com geradores de oxigénio singlete

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química Analítica e Qualidade, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Eduarda Bastos Henriques dos Santos, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, da Professora Doutora Maria da Graça Neves, Professora Associada com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Professor Doutor Mário Simões, Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

O júri

Presidente

Prof. Doutor Artur Manuel Soares da Silva

Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Marta Otero Cabaçero

Investigadora do Departamento de Química e Física Aplicada da Universidade de León (Espanha)

Prof. Doutora Maria Eduarda Bastos Henriques dos Santos

Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

À Professora Doutora Maria Eduarda B. H. Santos pela orientação, disponibilidade, apoio, confiança paciência e empenho demonstrado ao longo de todo o trabalho. Agradeço também pelos conhecimentos adquiridos durante a realização do trabalho.

Aos Professores Doutora Maria Graça Neves e Doutor Mário Simões pela orientação, apoio e ajuda que me permitiram concluir o trabalho.

À Dr. Olga M. S. Filipe pelo apoio, ajuda e disponibilidade constante ao longo de todo o trabalho. Agradeço também pelos conhecimentos transmitidos durante a realização do trabalho.

A todos os meus colegas de laboratório pela convivência, amizade, apoio e ajuda laboratorial ao longo de todo o tempo que passei no laboratório.

Aos meus amigos pela amizade, apoio e carinho demonstrados ao longo de todo o meu percurso acadêmico.

A toda a minha família, em especial os meus pais e à minha irmã por toda a amizade, apoio, incentivo, amor e confiança que depositaram em mim para a conclusão de mais um objetivo da minha vida.

Palavras-chave

Metoprolol, fotodegradação, ácidos fúlvicos, porfirina, H₂TPFPP, água, HPLC

Resumo

Neste trabalho vai-se abordar a remoção do metoprolol das águas através de fotodegradação. O metoprolol pertence à classe dos bloqueadores beta que são usados em doenças cardiovasculares, como a hipertensão. O metoprolol pertence aos chamados contaminantes emergentes, para os quais ainda não existe legislação reguladora e ainda se conhece pouco sobre os seus efeitos tóxicos na saúde humana e no meio ambiente.

A fotodegradação é uma das principais vias de degradação abiótica de contaminantes no meio aquático e pode ser largamente influenciada pelas substâncias húmicas. Atualmente já existem alguns estudos sobre a remoção do metoprolol das águas através da fotodegradação, os quais permitiram concluir que o metoprolol praticamente não sofre degradação directa por ação da luz solar, mas é fotodegradado na presença de substâncias húmicas. As substâncias húmicas, quando sujeitas a radiação dão origem a várias espécies como o estado tripleto das substâncias húmicas ou as espécies reativas de oxigénio (o radical hidroxilo, o ião superóxido, o peróxido de hidrogénio ou o oxigénio singlete). As espécies formadas vão reagir com o metoprolol, levando à sua degradação. Num estudo anterior, em que foram testados os ácidos fúlvicos que são usados no presente trabalho, chegou-se à conclusão que era o oxigénio singlete a espécie responsável pela fotodegradação do metoprolol. Uma vez que o oxigénio singlete também é originado pela porfirina usada neste trabalho, determinou-se a aplicabilidade da mesma na fotodegradação do metoprolol para o tratamento de efluentes.

Num primeiro passo, determinaram-se as velocidades de reação do metoprolol tanto na presença de ácidos fúlvicos como na presença da porfirina e concluiu-se que a velocidade de reação na presença da porfirina é bastante maior do que na presença dos ácidos fúlvicos. Ao analisar os cromatogramas para determinar as velocidades de reação notaram-se pequenos picos correspondentes a produtos da fotodegradação do metoprolol. Sendo assim, decidiu-se aumentar a concentração do metoprolol na presença de ácidos fúlvicos para uma mais fácil análise da evolução dos picos e depois para análise por HPLC MS/MS com vista a identificar os produtos formados.

Keywords metoprolol, photodegradation, fulvic acid, porphyrin, H₂TPFPP, water, HPLC

Abstract

In this work the removal of metoprolol from waters will be to address through photodegradation. Metoprolol belongs to the class of beta-blockers that are used in cardiovascular diseases such as hypertension. Metoprolol belongs to the so-called emerging contaminants, for which there is still no regulatory legislation and yet little is known about their toxicity for human health effects in the environment.

The photodegradation is a main pathway of abiotic degradation of contaminants in the aquatic environment and can be largely influenced by humic substances. Nowadays, there are a few studies of the removal on metoprolol waters by photodegradation, which concluded that metoprolol practically do not suffers degradation by direct action of sunlight, but is decomposed in the presence of humic substances. Humic substances, when subjected to radiation, give rise to various species such as triplet state of humic substances or reactive oxygen species (hydroxyl radical, superoxide ion, hydrogen peroxide and singlet oxygen). The species formed will react with metoprolol, leading to its degradation. A previous study, where fulvic acids used in this work were studied, came to the conclusion that the singlet oxygen species was responsible for photodegradation of metoprolol. Since singlet oxygen is also promoted by the porphyrin used in this study, we determined the applicability thereof in the photodegradation of metoprolol for the treatment of effluents.

In a first step, the reaction rates of metoprolol were determined both in the presence of fulvic acids and in the presence of porphyrin. It was concluded that the reaction rate in the presence of the porphyrin is much higher than in the presence of fulvic acids. By analyzing the chromatograms, to determine the reaction rates small peaks corresponding to the photodegradation of metoprolol were noted. Therefore, it was decided to increase the concentration of metoprolol in the presence of fulvic acids for easier analysis of the evolution of the peaks and for later analysis by HPLC MS / MS in order to identify the products formed.

Índice

Índice de figuras	III
Índice de tabelas	V
Glossário de símbolos e abreviaturas	VII
1. Introdução	- 1 -
1.1 Contaminantes emergentes.....	- 3 -
1.2 β -bloqueadores	- 7 -
1.3 Metoprolol.....	- 10 -
1.4 Fotodegradação	- 11 -
1.4.1 Fotodegradação no meio aquático por ação da luz solar	- 11 -
1.4.2 Efeito fotossensibilizador das substâncias húmicas	- 12 -
1.4.3 Técnicas usadas para a fotodegradação do metoprolol como processo de tratamento de águas contaminadas	- 17 -
1.5 Porfirinas	- 21 -
1.5.1 Introdução geral às porfirinas	- 21 -
1.5.2 As porfirinas como fotossensibilizadores.....	- 23 -
1.6 Objetivos do trabalho	- 26 -
2. Procedimento experimental.....	- 27 -
2.1 Lavagem do material de vidro.....	- 29 -
2.2 Reagentes	- 29 -
2.3 Equipamentos	- 29 -
2.4 Preparação das soluções	- 31 -
2.4.1 Preparação das soluções para o estudo da fotodegradação do metoprolol na presença de ácidos fúlvicos naturais	- 31 -
2.4.2 Preparação das soluções para o estudo da fotodegradação do metoprolol na presença de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina.....	- 32 -
2.5 Irradiação das soluções.....	- 32 -
2.6 Identificação dos produtos resultantes da fotodegradação do metoprolol na presença de ácidos fúlvicos.....	- 32 -
2.7 Determinação do metoprolol por HPLC-UV	- 33 -
2.8 Determinação das constantes de velocidade da fotodegradação	- 34 -
3. Resultados e discussão	- 37 -
3.1 Estudo do efeito dos ácidos fúlvicos sobre a fotodegradação do metoprolol.....	- 39 -
3.1.1 Cinética de fotodegradação do metoprolol (50 mg/L) na presença de ácidos fúlvicos (10 mg/L)	- 39 -

3.1.2	Evolução dos produtos resultantes da fotodegradação do metoprolol na presença de ácidos fúlvicos	- 40 -
3.1.3	Identificação dos produtos resultantes da fotodegradação do metoprolol na presença de ácidos fúlvicos por HPLC MS/MS	- 46 -
3.2	Estudo do efeito da 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina sobre a fotodegradação do metoprolol.....	- 63 -
3.2.1	Cinética de fotodegradação do metoprolol (50 mg/L) na presença de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina (10 mg/L)	- 63 -
3.2.2	Produtos resultantes da fotodegradação do metoprolol na presença da 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina por HPLC	- 65 -
3.2.3	Estudo do comportamento da 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil) porfirina na presença/ausência de metoprolol	- 68 -
4.	Conclusão e perspectivas futuras.....	- 75 -
5.	Bibliografia	- 79 -

~

Índice de figuras

Figura 1 - Esquema da origem dos poluentes nas águas (Santos et al., 2010)	- 4 -
Figura 2 – Estrutura básica de um β -bloqueador.....	- 8 -
Figura 3 - Esquema de degradação do metoprolol no organismo humano (Boralli et al., 2009)... - 11 -	
Figura 4 – Características das substâncias húmicas	- 13 -
Figura 5 – Esquema de degradação do metoprolol pelo ozono proposto por Benner e Ternes (2009).....	- 19 -
Figura 6 – Estrutura básica de uma porfirina	- 21 -
Figura 7 - Numeração do macrociclo de uma porfirina, segundo Fischer	- 22 -
Figura 8 – Estrutura e numeração de uma porfirina segundo a IUPAC	- 22 -
Figura 9 – Espectro de absorção típico de uma porfirina.....	- 23 -
Figura 10 – (A) Cromatograma para o padrão de 50 mg/L de metoprolol. (B) Reta de calibração do metoprolol	- 33 -
Figura 11 - Cinética da fotodegradação de uma solução de metoprolol 50 mg/L na presença de AF 10 mg/L. A curva a tracejado representa a equação 52 (cinética de pseudo-1ª ordem) ajustada aos dados experimentais.....	- 39 -
Figura 12 – (A) Cromatograma da solução de metoprolol 250 mg/L e de ácidos fúlvicos 10 mg/L irradiada durante 24 horas e lida no HPLC 1; (B) Ampliação do cromatograma no intervalo de tempo 3,25-6,5 min.	- 41 -
Figura 13 - (A) Cromatograma do metoprolol 250 mg/L com ácidos fúlvicos 10 mg/L com 3 hora de irradiação; (B) Ampliação do cromatograma no intervalo de tempo 4-20 min.....	- 42 -
Figura 14– (A) Cromatograma do metoprolol 250 mg/L com ácidos fúlvicos 10 mg/L com 24 horas de irradiação; (B) Ampliação do cromatograma no intervalo de tempo 3-20 min.	- 43 -
Figura 15 - Cromatograma de uma solução de metoprolol 250 mg/L com ácidos fúlvicos 10 mg/L após 24 horas de irradiação e respetiva atribuição dos picos	- 44 -
Figura 16 - Evolução dos picos da fotodegradação do metoprolol na presença de AF. (●) ensaio 1, (●) ensaio 2.....	- 45 -
Figura 17 – Espectro MS ² para a solução de 500 mg/L de metoprolol ($[M+H]^+$ m/z 268).....	- 46 -
Figura 18 - Perfil de fragmentação proposto para o metoprolol	- 48 -
Figura 19 – Cromatograma do HPLC 2 da solução de metoprolol 250 mg/L e AF 10 mg/L irradiada durante 24 h antes de liofilizar (A) e depois de liofilizada (B). As escalas dos cromatogramas são diferentes.	- 49 -

Figura 20 – (A) Cromatograma do HPLC MS/MS para a solução de metoprolol 250 mg/L na presença de 10 mg/L de AF irradiada 24 horas ; (B) Ampliação do cromatograma no intervalo de tempo 0-25 min.	- 50 -
Figura 21 - (A) Cromatograma do HPLC MS/MS para a solução de metoprolol 250 mg/L na presença de 10 mg/L de AF irradiada 24 horas (A) e 6 horas (B); Ampliação do cromatograma no intervalo de tempo 0-26 min para as 24 horas de irradiação (A') e para as 6 horas de irradiação (B').	52
Figura 22 - Cromatograma do HPLC MS/MS de uma solução de metoprolol 250 mg/L com ácidos fúlvicos 10 mg/L após 6 horas de irradiação e respetiva atribuição dos picos.	- 53 -
Figura 23 – Esquema de transformação do metoprolol nos produtos de m/z 226 e m/z 254 proposto por Liu et al. (2009).....	- 54 -
Figura 24 - Perfil de fragmentação proposto para o ião $[M+H]^+$ m/z 254 (composto II)	57
Figura 25 - Perfil de fragmentação proposto para o ião $[M+H]^+$ m/z 226 (composto VII)	58
Figura 26 - Perfil de fragmentação proposto para o $[M+H]^+$ m/z 238 (composto IV)	60
Figura 28 – Estruturas propostas por Šojić et al., 2012 para os fragmentos com m/z 238 (A) e m/z 282 (B).....	- 62 -
Figura 29 – Cinética da fotodegradação de uma solução de metoprolol 50 mg/L na presença de H ₂ TPFPP 10 mg/L. Valores médios de vários ensaios efectuados. A verde são os ensaios no escuro. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de pelo menos 3 ensaios. A curva a tracejado representa a equação 52 (cinética de pseudo-1ª ordem) ajustada aos dados experimentais	- 64 -
Figura 30 – (A) Cromatograma da solução de metoprolol 50 mg/L e H ₂ TPFPP 10 mg/L irradiada durante 3 horas e analisada no HPLC 1; (B) Cromatograma da solução de metoprolol 250 mg/L e AF 10 mg/L irradiada durante 24 horas e analisada no HPLC 1 (C) Ampliação do cromatograma A no intervalo de tempo 2,5-6,5 min (D) Ampliação do cromatograma B no intervalo de tempo 3,25-6,5 min	- 65 -
Figura 31 – Espectro UV-Vis para uma solução de metoprolol 50 mg/L na presença de H ₂ TPFPP ao longo do tempo depois de irradiada	- 69 -
Figura 32 – Espectro UV-Vis para metoprolol 50 mg/L na presença de H ₂ TPFPP 10 mg/L no escuro	- 70 -
Figura 33 – Espectro UV-Vis da porfirina H ₂ TPFPP no escuro	- 71 -
Figura 34 - Cromatograma de uma solução de metoprolol 50 mg/L e H ₂ TPFPP 10 mg/L guardada 3 horas no escuro	- 72 -
Figura 35 - Espectro UV-Vis da porfirina H ₂ TPFPP na ausência de metoprolol quando irradiada.....	- 72 -

Índice de tabelas

Tabela 1 - Exemplos de fármacos encontrados em diferentes países e a sua concentração (Santos et al., 2010).....	5 -
Tabela 2 - Consumo de β -bloqueadores em diferentes países e anos.....	8 -
Tabela 3 - Quantidades de β -bloqueadores encontradas em ETAR e em águas superficiais....	9 -
Tabela 4 – Informação sobre as características do metoprolol.....	10 -
Tabela 5 – Contribuição (%) da hidrólise, fotólise direta e reações com $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$, e $^3\text{AF}^*$ para a degradação total dos β -bloqueadores em soluções contendo 20 mg/L de AF de referência após 48 horas de irradiação (Wang et al. 2012).....	15 -
Tabela 6 – Perfil de fragmentação do metoprolol, $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 268*.	47 -
Tabela 7 – Atribuição dos picos ao respetivo tempo de retenção e à sua massa.....	54 -
Tabela 8 - Perfil de fragmentação do ião $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 254 e m/z 226.....	56 -
Tabela 9 - Perfil de fragmentação do ião $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 238 e m/z 282.....	59 -
Tabela 10 – Espectros dos produtos da fotodegradação do metoprolol na presença de AF e da H_2TPFP	67 -

Glossário de símbolos e abreviaturas

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
$^1\text{SH}^*$	Estado singleto das substâncias húmicas
$^3\text{SH}^*$	Estado tripleto das substâncias húmicas
AODM	Ácido desmetilmetoprolóico
C_0	Concentração inicial (mg/L)
CID-MS ⁿ	Collision-induced dissociation
D_{lipw}	Distribuição lipossoma-água
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOM	<i>Dissolved organic matter</i> – matéria orgânica dissolvida
EF	<i>Eletro Fenton</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i> - ionização de electrospray
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
H2TPFPP	5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina
HPLC	<i>High Performance/Pressure Liquide Chromatography</i> - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência'
IHSS	<i>International Humic Substances Society</i> – Sociedade Internacional das Substâncias Húmicas
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> - União Internacional de Química Pura e Aplicada
k	Constante de velocidade da reação (h^{-1})
k_{ow}	Coefficiente de partição octanol-água
LC	<i>Liquid Chromatography</i> – Cromatografia Líquida
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
m	Desvio da reta
MS	Espectroscopia de massa
ODM	O-desmetilmetoprolol
OHM	α -hidroximetoprolol
pKa	Constante de acidez
PDA	<i>photodiode array</i> -
r	Coefficiente de correlação
RMN ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> ” – espécies reativas de oxigênio

SH	Substâncias húmicas
SPEF	<i>solar photoeletro Fenton</i> – Fotoeletro fenton solar
$S_{y/x}$	Desvio padrão residual
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta/vível

1. Introdução

1.1 Contaminantes emergentes

Atualmente existem aproximadamente 4000 produtos farmacêuticos no mercado, o que contribui para um elevado consumo destes produtos (Rosi-Marshall and Royer, 2012) e, conseqüentemente, o seu aparecimento no ambiente, nomeadamente em águas e em outras matrizes. Os produtos farmacêuticos fazem parte do grupo de substâncias geralmente designadas por contaminantes emergentes. Para além dos produtos farmacêuticos, também fazem parte deste grupo de contaminantes, os produtos de higiene pessoal. Assim, os contaminantes emergentes são compostos químicos encontrados no meio ambiente para os quais ainda não existe legislação reguladora e cujos efeitos na saúde humana e no ambiente são ainda pouco conhecidos (Deblonde et al., 2011). Segundo Narvaez V. and Jimenez C. (2012) foi na década de 70 que começaram a surgir preocupações com estes poluentes no meio ambiente; o primeiro estudo foi realizado pelo autor Keith, o qual estudou a ocorrência dos produtos farmacêuticos nas águas residuais e os seus efeitos na fauna e flora. A partir da década de 90, o avanço de novas metodologias/técnicas como a cromatografia vieram permitir detetar quantidades muito pequenas desses contaminantes nas águas e fazer estudos sobre os seus efeitos no meio ambiente (Oosterhuis et al., 2013, Homem and Santos, 2011, Santos et al., 2010).

Os produtos farmacêuticos que aparecem nas águas são provenientes dos medicamentos de uso humano e de uso veterinário. A Figura 1 apresenta um esquema das principais vias de contaminação dos poluentes nos solos e em águas. (Sarafraz-Yazdi et al., 2012, Santos et al., 2010). Os medicamentos depois de ingeridos chegam à ETAR (estação de tratamento de águas residuais) através das fezes e da urina humana (principais fontes), tanto de efluentes domésticos como de efluentes dos hospitais. No entanto, os produtos farmacêuticos também podem dar origem a outros produtos, como os metabolitos secundários, formados através da sua degradação no organismo humano ou então, estes metabolitos secundários podem ser originados por reações com outros compostos presentes nas águas. Quando os medicamentos passam de validade ou estão impróprios para consumo são colocados no lixo, indo assim parar aos aterros sanitários, ou despejados diretamente na água (sanitas, lavatórios), indo para a ETAR. Os medicamentos aplicados na pele, como as pomadas ou os cremes, chegam às águas através da lavagem da pele. Por outro lado, muitas vezes são usados agentes de

1 apresenta um resumo de alguns produtos farmacêuticos encontrados nas águas de vários países e níveis de concentração.

Tabela 1 - Exemplos de fármacos encontrados em diferentes países e a sua concentração (Santos et al., 2010)

Classe	Fármaco	Fonte	País	LD (ng L ⁻¹)	Concentração encontrada (ng L ⁻¹)
Anti-inflamatórios	Diclofenac	Efluente de ETAR	Espanha	100	200-3600
		Efluente de hospital	Espanha	30	60-1900
	Ibuprofeno	Água subterrânea	E.U.A.	18	3110
	Paracetamol	Efluente de ETAR	Reino Unido	50	<50
Antibióticos	Ciprofloxacina	Água do rio Mondego	Portugal	25	79.6-119.2
	Enrofloxacina	Influente de ETAR	Portugal	50 (LQ)	121.8-447.1
		Água do rio Mondego	Portugal	25	67.0-102.5
Hormonas	17 α -Estradiol	Água subterrânea	França	0.03	0.8-3.5
	Estriol	Água superficial	E.U.A.	5	19
β -bloqueadores	Atenolol	Influente de ETAR	Finlândia	11.8	510-800
		Água potável	E.U.A.	0.25	0.47
		Efluente de hospital	Espanha	28	100-122
	Metoprolol	Efluente de ETAR	Finlândia	-----	910-1070
		Efluente de ETAR	Suécia	-----	190
	Propranolol	Efluente de ETAR	Suécia	-----	30
		Efluente de hospital	Espanha	8	200-6500
		Efluente de ETAR	Reino Unido	-----	130-180

Os produtos farmacêuticos são usados para o tratamento de doenças e, por causa dos seus efeitos farmacocinéticos, quando vão para as águas ainda vão exercer o seu efeito farmacológico nessa matriz tornando-se assim contaminantes. Como são

substâncias biologicamente ativas vão interagir com os seres vivos presentes nas águas podendo acumular-se nos seres vivos (vertebrados e invertebrados), na água, nos sedimentos e nas algas (Rosi-Marshall and Royer, 2012). A acumulação dos produtos farmacêuticos vai estar dependente do tipo de fluxo de água, ou seja, se for um fluxo lento têm tendência a acumular-se nas margens, plantas aquáticas ou a ficar em águas estagnadas; por outro lado, se for um fluxo rápido isso já não acontece (Riml et al., 2013). Na literatura existem vários estudos sobre a interação entre os produtos farmacêuticos e os seres vivos existentes na água e sobre a sua acumulação nas matrizes (Parrilla Vázquez et al., 2013, Rosi-Marshall and Royer, 2012, Santos et al., 2010). Um exemplo de um desses estudos foi o dos autores Madureira et al. (2011) realizado nas águas do rio Douro, em que foi estudada a influência de cinco fármacos, onde estava incluído o propranolol, um β -bloqueador, no crescimento das gónadas (ovários e testículos) dos peixes. Os autores chegaram à conclusão que, na presença dos fármacos, os peixes apresentavam gónadas mais pequenas quando comparadas com os controlos e que os peixes fêmeas são mais sensíveis aos fármacos do que os machos. Além disso, existem ainda outros estudos que provaram que houve diminuição da viabilidade dos ovos e redução da mobilidade e da velocidade do esperma dos peixes (Madureira et al., 2011). Nas ETAR's, os processos de remoção de alguns destes poluentes devem-se à sua interação com as partículas sólidas presentes nas lamas, como a argila, os coagulantes ou o carbono ativado, porque facilitam a sua deposição no fundo da ETAR, ou então à interação com microrganismos, porque facilitam a sua degradação (Carballa et al., 2004). Os problemas que podem surgir durante a remoção de alguns destes produtos farmacêuticos nas ETAR's devem-se a vários fatores, como os processos de remoção utilizados pelas ETAR's, a idade das lamas usadas, o tempo que a água está nessas lamas, às condições ambientais (temperatura, luz solar, entre outras), à natureza dos produtos farmacêuticos e às características físico-químicas desses compostos, como a sua solubilidade, volatibilidade, adsorção, absorção, polaridade, biodegradabilidade e estabilidade, o que torna a sua remoção muito difícil. Além disso, nenhuma ETAR's que não estão preparadas para esta classe de contaminantes, uma vez que foram construídas para remover compostos contendo carbono biodegradável, azoto e fósforo (Verlicchi et al., 2012, Lin et al., 2009). Os métodos mais eficazes que estão em desenvolvimento para a remoção destes compostos é através da oxidação por ozonólise e por processos oxidativos avançados (foto-catálise heterogénea e processo de Fenton) (Sirés et al., 2010).

1.2 β -bloqueadores

Os β -bloqueadores são um grupo de produtos farmacêuticos usado para tratar a hipertensão e doenças arteriais coronárias (*angina pectoris*) (Sarafraz-Yazdi et al., 2012, Huggett et al., 2003). Estes compostos ligam-se aos recetores β presentes no coração ou nos pulmões, não causando a sua ativação ou estimulação, sendo, por isso, designados de antagonistas. De entre o grupo dos β -bloqueadores destacam-se: o propanolol, o nadolol, o metoprolol e o atenolol. O propanolol e o nadolol são antagonistas não específicos, isto é, tanto se ligam aos recetores β_1 como aos recetores β_2 . O metoprolol e o atenolol são antagonistas específicos para os recetores β_1 presentes no coração; ao ligarem-se a estes recetores vão provocar uma diminuição da frequência cardíaca e da força contráctil (Huggett et al., 2003). O metoprolol e o propanolol estão associados a um efeito secundário que consiste numa maior incidência no sistema nervoso secundário por causa de serem mais lipofílicos, o que pode resultar em pesadelos, insónias, letargia, confusão e depressão. Os β -bloqueadores mais hidrofílicos são mais facilmente excretados pelo sistema renal e não vão ter estes efeitos secundários (Poirier and Lacourcière, 2012). A comissão médica do Comité Olímpico Internacional proibiu os β -bloqueadores para uma concentração de 500 mg/L na urina porque influencia alguns desportos como o tiro ao alvo, bilhar porque vão provocar a redução da arritmia cardíaca e os tremores musculares (Sarafraz-Yazdi et al., 2012).

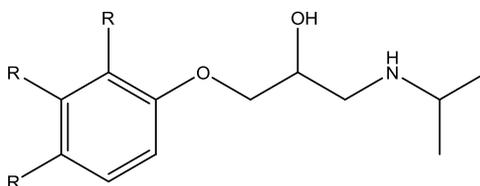
Atualmente o grupo dos β -bloqueadores são dos medicamentos mais consumidos. Segundo Scheurer et al., (2010), na Alemanha são consumidas 100 toneladas de metoprolol por ano e, no Canadá, foram consumidas cerca de 12 toneladas só no ano de 2007. Segundo o “*IMS Health data*”, nos E.U.A. o metoprolol foi o décimo primeiro medicamento mais consumido no ano de 2010, numa lista de 200 medicamentos, e foi o mais consumido da classe dos β -bloqueadores (informação disponível em <http://www.imshealth.com>, último acesso em Dezembro, 05 de 2013). Na Europa, o metoprolol e o atenolol representam 80% do consumo de β -bloqueadores (Alder et al., 2010). Na Tabela 2 estão sumariados alguns dados da literatura referentes a vários países e cruzados com o respetivo ano.

Tabela 2 - Consumo de β -bloqueadores em diferentes países e anos.

País	Ano	β -bloqueadores				Referência
		Acetonolol (kg/ano)	Atenolol (kg/ano)	Metoprolol (kg/ano)	Propranolol (kg/ano)	
Alemanha	1995	-	-	50000	3000	(Ternes, 1998)
	2001	-	-	92970	-	(Fent et al., 2006)
	2005	-	7100	98800	3400	(Scheurer et al., 2010)
Canadá	2007	-	6700	11800	2500	(Scheurer et al., 2010)
Finlândia	2004	941	863	5339	-	(Vieno et al., 2006)
Holanda ^a	2007	70603				(van der Aa et al., 2011)
Inglaterra	2000	-	28980	-	-	(Fent et al., 2006)
Itália	2001	-	22070	-	-	(Fent et al., 2006)
	2010	-	18084	-	-	(Al Aukidy et al., 2012)
Suíça	2004	-	3200	3200	800	(Fent et al., 2006) (Maurer et al., 2007)

^aNo caso da Holanda, os dados correspondem a um conjunto de vários medicamentos, nomeadamente o atenolol, o chiorothiazide, a furosemida, o irbesartan, o metoprolol, o sotalol, o valsartan, o bezafibrate, o clofibrac acid, e o gemfibrozil.

Os β -bloqueadores apresentam uma estrutura geral bastante similar (Figura 2); as diferenças entre os vários β -bloqueadores vão ser nos substituintes no anel, o que lhes vai conferir diferentes farmacocinéticas (Alder et al., 2010). Além disso, são bases fracas que apresentam valores de K_a (constante de acidez) acima de 9; no meio ambiente estão protonados e carregados positivamente e apresentam um valor de pH aproximadamente 7 (Maurer et al., 2007).

**Figura 2** – Estrutura básica de um β -bloqueador

Segundo Maurer et al. (2007), o coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) não é a melhor maneira de descrever as propriedades físico-químicas destes compostos. A relação de distribuição lipossomas-água (D_{lipw}), segundo esses mesmos autores, indica

que o propranolol é o mais lipofílico porque apresenta um valor D_{lipw} mais elevado do que o atenolol e o sotalol, ou seja, o propranolol tem uma maior tendência a acumular no meio aquático. O atenolol e o sotalol como têm um valor de D_{lipw} mais baixo, logo não revelam fases lipofílicas e assim sendo não têm tendência a acumular-se nas matrizes aquáticas.

As pequenas alterações na estrutura dos β -bloqueadores, mencionadas anteriormente, levam a que eles sejam metabolizados no nosso organismo de forma diferente. Só cerca de 50% do atenolol consumido de forma oral é que é absorvido, ou seja, o restante é excretado do nosso organismo através da urina ou das fezes. O metoprolol e o propranolol são quase completamente absorvidos, ou seja, só cerca de 3-10% e 1-4% do composto original é que são excretados como metabolitos originados pela sua degradação, respetivamente, indo assim parar às ETAR. Na Tabela 3 são apresentados valores de concentrações dos β -bloqueadores mais consumidos encontrados, tanto em afluentes e efluentes de ETAR, como em águas superficiais (Alder et al., 2010, Maurer et al., 2007).

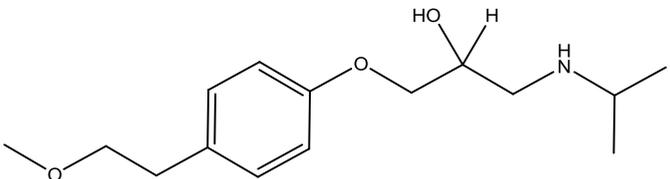
Tabela 3 - Quantidades de β -bloqueadores encontradas em ETAR e em águas superficiais.

β -bloqueador	País	Afluente (ng/L)	Efluente (ng/L)	Água superficial (ng/L)	Referência
Atenolol	Alemanha	540	>300	---	(Wick et al., 2009)
	Suécia	30	<160	---	(Maurer et al., 2007)
	Finlândia	---	---	12-25	(Alder et al., 2010)
	Polónia	---	---	3-22	(Alder et al., 2010)
Metoprolol	Alemanha	810	>640	---	(Wick et al., 2009)
	Suécia	160	<190	---	(Maurer et al., 2007)
	Finlândia	---	---	35-116	(Alder et al., 2010)
	Polónia	---	---	31-155	(Alder et al., 2010)
Propranolol	Suécia	50	>30	---	(Maurer et al., 2007)
	E.U.A.	67	<34	---	(Maurer et al., 2007)
	Alemanha	4	=4	---	(Wick et al., 2009)

1.3 Metoprolol

Como já foi referido anteriormente, o metoprolol é um medicamento da classe dos β -bloqueadores e é um dos mais consumidos na Europa e no mundo (Parrilla Vázquez et al., 2013). Por causa desse consumo, o metoprolol é cada vez mais detetado nas águas, devido à sua ineficiente remoção nas ETARs convencionais (tratamentos primário e secundário). Na Tabela 4 apresentam-se algumas informações genéricas sobre o metoprolol (Alder et al., 2010).

Tabela 4 – Informação sobre as características do metoprolol

Nome IUPAC	(±)-1-(Isopropilamino)-3-[4-(2-metoxietil)fenoxi]propan-2-ol
Estrutura	
Número de registo CAS	37350-58-6
Fórmula molecular	C ₁₅ H ₂₅ NO ₃
Massa molecular	267,36 g mol ⁻¹
Constante de ionização pKa	9,2 ± 0.4
Log Kow	1,79 ± 0.4
Solubilidade em água a 25°C	1.69 x 10 ⁴ mg/L
Coefficiente de adsorção no lodo (K_d)	1 ± 23 L Kg ⁻¹
Constante de degradação nas ETAR	0,58 ± 0,05 L d ⁻¹ g ⁻¹

No mercado, o metoprolol aparece sob a forma de sais de L-(+)-tartarato de (±)-1-(isopropilamino)-3-[4-(2-metoxietil)fenoxi]propan-2-ol, sendo o seu nome comercial Lopressor. Pode ser administrado na forma de comprimidos (informação disponível em <http://www.rxlist.com/script/main/hp.asp>, último acesso em Dezembro, 05 de 2013), ou como medicamento injetável (informação disponível em <http://www.infarmed.pt/>, último acesso em Dezembro, 05 de 2013). O metoprolol pode-se apresentar como uma mistura racémica dos dois enantiómeros, (R) e (S)-metoprolol, em que a sua forma (S) é a única com efeitos farmacológicos, porque apresenta maior afinidade para os recetores β (cerca

de 500 vezes) do que a forma (*R*) (Zhou, 2009). Quando metabolizado no fígado pelo citocromo P450, o metoprolol pode dar origem a vários metabolitos, nomeadamente o α -hidroximetoprolol (OHM), o O-desmetilmetoprolol (ODM), o ácido desmetilmetoprolóico (AODM) e o N-desalquil-metoprolol. Estas reações estão esquematizadas na Figura 3 (Boralli et al., 2009, Jin et al., 2008).

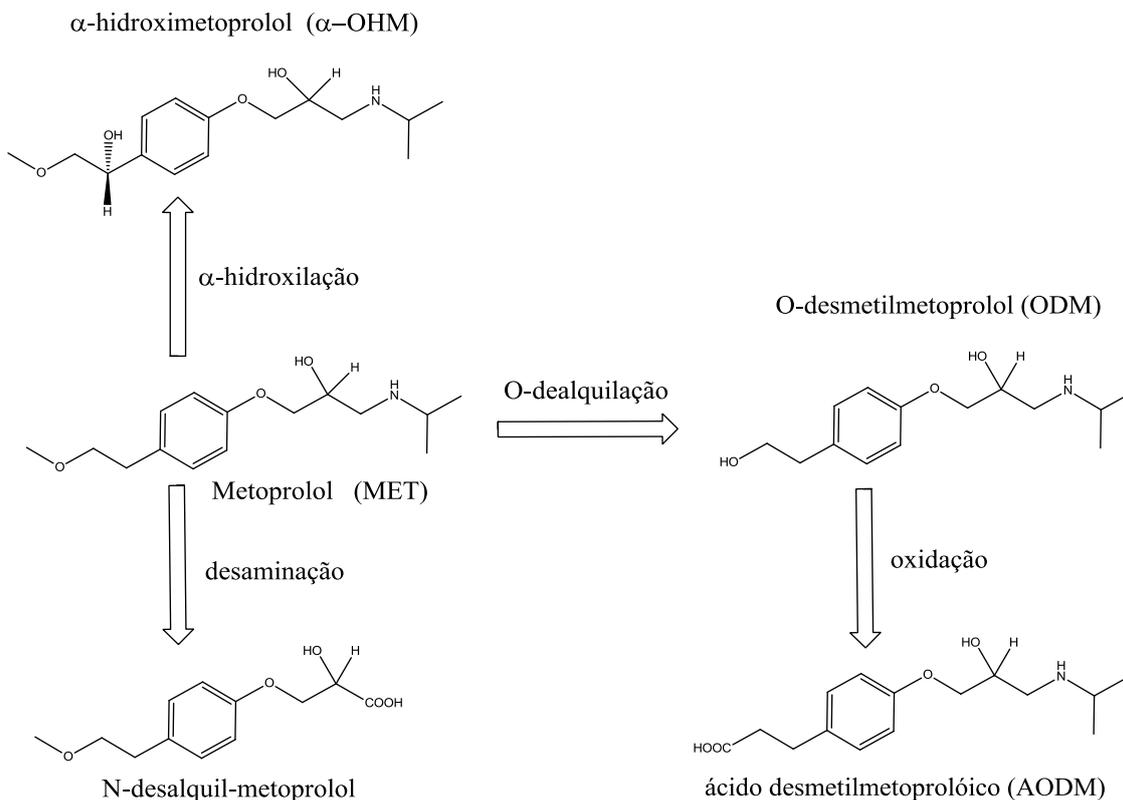


Figura 3 - Esquema de degradação do metoprolol no organismo humano (Boralli et al., 2009)

1.4 Fotodegradação

1.4.1 Fotodegradação no meio aquático por ação da luz solar

No meio aquático, os β -bloqueadores podem ser degradados por duas vias: a via biótica e a via abiótica (hidrólise, fotólise) (Piram et al., 2008). Quando sujeitos à luz solar, os β -bloqueadores podem ser fotodegradados por duas vias distintas, a fotodegradação direta e a fotodegradação indireta. A fotodegradação vai estar dependente de vários fatores físico-químicos para que as reações ocorram, como a temperatura, a composição da água e do solo, a intensidade da luz solar, a salinidade e o

pH (Fatta-Kassinos et al., 2011). A fotodegradação direta ocorre quando o espectro de absorção do β -bloqueador se sobrepõe ao espectro da luz solar e aí o β -bloqueador vai absorver a radiação, fica excitado e sofre uma reação que vai transformar esse β -bloqueador num ou mais novos produtos. O grupo que absorve essa radiação nos β -bloqueadores denomina-se de cromóforo, ou seja, vão haver grupos funcionais capazes de absorver radiação UV (Ergaieg and Seux, 2009). A fotodegradação indireta consiste em reações do β -bloqueador com espécies reativas, como por exemplo o radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) ou o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (Wang et al., 2012, Liu et al., 2009) em que estas espécies são originadas por fotossensibilizadores naturais como o ião nitrato ou as substâncias húmicas (SH) depois de estas absorverem radiação solar (Andreozzi et al., 2003).

1.4.2 Efeito fotossensibilizador das substâncias húmicas

As SH são a fração maioritária da matéria orgânica dissolvida (DOM - do inglês “*dissolved organic matter*”) e são compostos orgânicos heterogêneos de cor castanha produzidos por degradação microbiana de restos de plantas, principalmente. As SH são constituídas sobretudo por fragmentos estruturais de lenhina proveniente das plantas, mas também podem ter fragmentos estruturais de polissacáridos, melanina, cutina, proteínas, lípidos, ou ácidos nucleicos, na sua constituição, entre outros. As SH representam a maior parte do carbono orgânico estável, em que cerca de 60-70% são parte do carbono orgânico presente nos solos e 60-90% do carbono orgânico dissolvido nas águas naturais, cuja concentração varia entre 0,3 e 30 mg/ L⁻¹ (Richard et al., 2011, Zhan et al., 2006, Havers et al., 1998). A cor castanha dos solos deve-se à presença das SH, as quais são muito importantes porque vão afetar as propriedades físico-químicas e a fertilidade do solo. Na água, as SH podem afetar a alcalinidade e o pH desta. Em ambos os ambientes, as SH afetam a biodisponibilidade de elementos químicos e o transporte e degradação de xenobióticos. As SH podem-se dividir nos ácidos húmicos (AH), nos ácidos fúlvicos (AF) e nas huminas, consoante a sua solubilidade. Os AH só são insolúveis em soluções com pH baixo, os AF são solúveis em toda a gama de pH enquanto as huminas são insolúveis em qualquer gama de pH (Richard et al., 2011). Para mais fácil análise, a classificação e algumas características destas substâncias estão descritas na Figura 4.

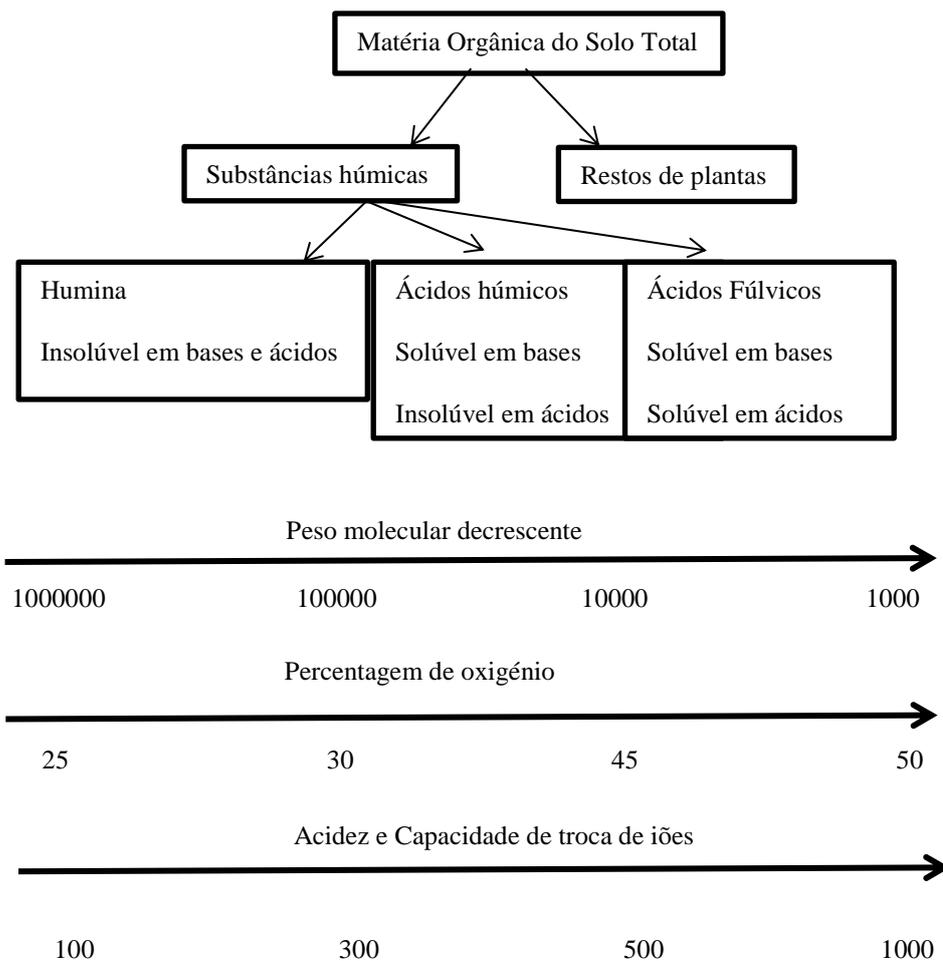
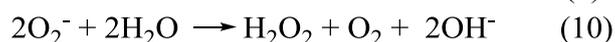
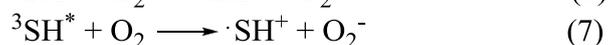
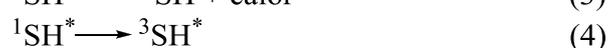
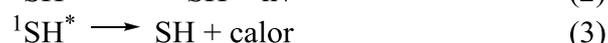


Figura 4 – Características das substâncias húmicas

As substâncias húmicas, quando excitadas pela radiação solar podem dar origem às seguintes espécies: ao estado tripleto delas ($^3SH^*$), ao 1O_2 , ao $\bullet OH$, ao ião superóxido (O_2^-) e ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Além disso, também podem ser libertados pequenos fragmentos originados durante a fotodegradação e provenientes das SH, nomeadamente aldeídos, aminoácidos ou pequenas cadeias de ácidos gordos. Estes compostos podem depois servir de nutrientes para bactérias heterotróficas. Uma característica dos AF é que estes correspondem à fração de menor peso molecular e também contêm mais grupos funcionais com oxigênio (Chen et al., 2012b, Zhan et al., 2006, Paul et al., 2004, Hedges and Oades, 1997) (informação disponível em <http://www.humicsubstances.org>; último acesso em Dezembro, 05 de 2013 IHSS-do inglês *International Humic Substances Society*).

As SH transitam para o estado singlete excitado quando absorvem radiação solar (reação 1), ou seja, transitam para um nível de maior energia. Nesta forma podem depois decair com emissão de radiação (fluorescência - reação 2) ou sem emissão de

radiação (conversão interna e relaxação vibracional - reação 3). As SH no estado singlete excitado ($^1\text{SH}^*$) podem também transitar, por cruzamento intersistema, para estado tripleto excitado (reação 4). O $^3\text{SH}^*$ pode reagir diretamente com os compostos orgânicos (poluentes) por transferência de energia, vindo estes a ficar num estado excitado que depois pode levar à sua degradação (reação 5); o $^3\text{SH}^*$ pode também transferir energia para o O_2 dissolvido dando origem ao estado singlete do O_2 (reação 6) ou formar o ião superóxido (reação 7). Esse estado tripleto pode também dar origem a um eletrão hidratado (reação 9). A formação do radical hidroxilo pode dar-se pela reação 8. O peróxido de hidrogénio forma-se a partir da reação entre dois iões superóxido com duas moléculas de água (reação 10). Estas espécies formadas são denominadas espécies reativas de oxigénio “ROS” (do inglês – *reactive oxygen species*) (Chen et al., 2012a, Carlos et al., 2012, Zhan et al., 2006, Paul et al., 2004, Goldstone et al., 2002, Vaughan e Blough, 1998).



As espécies ROS, principalmente o $^1\text{O}_2$ e o $\cdot\text{OH}$ são altamente reativas com os poluentes existentes nas águas, o que torna este tipo de reações alvo de estudos para a degradação destes poluentes nas águas.

Gonçalves (2012) estudou a fotodegradação do metoprolol na presença e na ausência de AF naturais usando sequestradores das espécies $^1\text{O}_2$ e $\cdot\text{OH}$. A mesma autora chegou à conclusão que o $^1\text{O}_2$ era a principal espécie responsável pela degradação do metoprolol na presença dos AF do rio Vouga, apesar de o radical $\cdot\text{OH}$ também estar envolvido. Os sequestradores utilizados para as duas espécies ROS foram: a azida de sódio para o $^1\text{O}_2$ e o manitol para o $\cdot\text{OH}$. Estes dois compostos, a azida de sódio e o manitol, vão reagir com as respetivas espécies reativas de oxigénio; assim sendo, calculando a taxa de degradação na presença de sequestradores e comparando-a com a

taxa de degradação na sua ausência, pode ver-se qual a espécie reativa que tem maior importância na fotodegradação do metoprolol. Ao fazer isso, a autora chegou à conclusão que a taxa de degradação ao fim de 48 h de irradiação desce de 68% para 22% com o uso da azida de sódio e para 54% com o uso do manitol, concluindo que o $^1\text{O}_2$ era a espécie principal na degradação do metoprolol na presença de AF naturais.

O efeito fotossensibilizador dos AF na degradação do metoprolol sob ação da luz solar foi referido anteriormente por outros autores (Piram et al., 2008; Wang et al., 2012) que estudaram a fotodegradação do metoprolol em água pura e em água de efluente de ETAR e concluíram que, na água pura, o metoprolol não sofria fotodegradação e que na água proveniente da ETAR sofria fotodegradação devido à presença de AF, sendo o tempo de meia vida do metoprolol de 20-48 horas. Wang et al. (2012) estudaram a degradação de vários β -bloqueadores em soluções aquosas e testaram a hidrólise, a fotólise direta e a fotodegradação indireta na presença de AF fornecidas pela IHSS, as quais são provenientes do rio Suwannee nos E.U.A. Os autores testaram o envolvimento de várias espécies, nomeadamente, $^1\text{O}_2$, $\cdot\text{OH}$ e $^3\text{SH}^*$ na fotodegradação do metoprolol na presença das SH. Os autores concluíram que as SH no estado tripleto são as que mais contribuem para a degradação dos β -bloqueadores como está indicado na Tabela 5, sendo a sua contribuição de 66,2% do total de degradação observada. Ao analisar o trabalho destes autores e com base no gráfico do $\ln C/C_0$ em função do tempo de irradiação, apresentado pelos autores, foi possível calcular um valor aproximado da constante de velocidade para a fotodegradação de metoprolol 20 mg/L na presença de AF 20 mg/L, sendo o valor obtido de cerca de $5,6 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ que é muito inferior ao obtido no presente trabalho ($2,61 \times 10^{-2} \pm 0,27 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$).

Tabela 5 – Contribuição (%) da hidrólise, fotólise direta e reações com $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$, e $^3\text{AF}^*$ para a degradação total dos β -bloqueadores em soluções contendo 20 mg/L de AF de referência após 48 horas de irradiação (Wang et al. 2012).

β -bloqueador	Contribuição para a degradação total (%)				
	Hidrólise	Fotólise direta	Fotólise na presença de SH		
			$\cdot\text{OH}$	$^1\text{O}_2$	$^3\text{SH}^*$
Atenolol	0,5	6,9	7,2	0,02	85,4
Metoprolol	1,1	6,1	26,6	0,04	66,2
Nadolol	1,6	8,9	38,9	0,02	50,6

Relativamente ao mecanismo de fotodegradação, Wang et al. (2012) propuseram uma via de degradação para o atenolol (estrutura bastante semelhante à do metoprolol) em que o primeiro passo ocorre por transferência de elétrons do grupo amino para a espécie $^3\text{AF}^*$. Este mecanismo é semelhante ao proposto por Chen et al. (2012a) para a fotodegradação do metoprolol na presença de AF. Segundo os autores Chen et al. (2012a) a espécie $^3\text{AF}^*$ é a responsável pela degradação do metoprolol. Os autores utilizaram AF extraídos a partir do carvão de uma mina e compararam a fotodegradação do metoprolol quando submetido a diferentes condições a nível da presença de sequestradores e de atmosfera em que é feito o estudo; prepararam cinco soluções, uma com ar atmosférico, outra com ar mais NaN_3 , outra com ar e 2-propanol, outra em atmosfera de N_2 e a última também com atmosfera de N_2 mais 2-propanol. Quando comparadas as constantes cinéticas de primeira ordem obtidas pelos autores, observou-se que as taxas de velocidade das reações das soluções em atmosfera de N_2 são superiores às que continham ar atmosférico, $3,22 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$ e $5,4 \times 10^{-2} \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$ respetivamente. Assim, os autores concluíram que o oxigênio presente no ar tem um efeito negativo na fotodegradação do metoprolol. Quando estes autores usaram os sequestradores do oxigênio singlete (NaN_3) e o do radical hidroxilo (2-propanol) para ver qual a espécie responsável pela fotodegradação do metoprolol, concluíram que nenhuma destas duas espécies era responsável pela fotodegradação do metoprolol e atribuíram esse papel ao estado tripleto dos ácidos fúlvicos, $^3\text{AF}^*$. É sabido que o oxigênio é sequestrador dos estados tripleto da maioria dos compostos orgânicos, o que explica o facto de a constante de velocidade da fotodegradação na presença de ar ser inferior à constante de velocidade em atmosfera de N_2 . O valor da constante de velocidade da reação obtida por Chen et al. (2012a) para a fotodegradação de metoprolol foi de $(5,4 \times 10^{-2} \pm 0,001 \text{ h}^{-1})$ é superior à obtida neste trabalho $(2,61 \times 10^{-2} \pm 0,27 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1})$.

Tanto o trabalho de Chen et al. (2012a) como o trabalho de Wang et al. (2012) estão em desacordo com o trabalho efetuado pela autora Gonçalves (2012), que concluiu que o $^1\text{O}_2$ era a espécie responsável pela degradação do metoprolol. A diferença poderá ser devida à origem das SH, isto é, nestes três trabalhos os AF utilizados são de origens diferentes, o que lhes vai conferir diferenças na constituição de cada um deles e o efeito das substâncias húmicas na fotodegradação de contaminantes depende da composição dessas substâncias (Guerard et al., 2009).

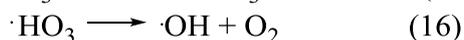
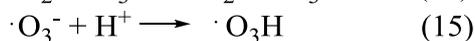
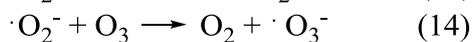
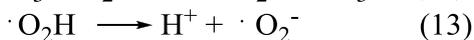
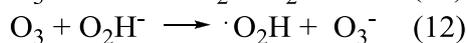
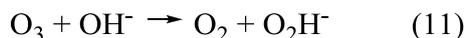
É de referir que, no caso do efeito das substâncias húmicas na fotodegradação do atenolol, já existe um estudo publicado por Zeng et al. (2012) em que o efeito fotossensibilizador das substâncias húmicas não foi atribuído ao estado tripleto destas substâncias, contrariamente ao que foi observado nos trabalhos de Wang et al (2012) e Chen et al (2012) anteriormente referidos. No trabalho de Zeng et al (2012) o efeito fotossensibilizador das substâncias húmicas foi atribuído maioritariamente ao radical $\bullet\text{OH}$.

1.4.3 Técnicas usadas para a fotodegradação do metoprolol como processo de tratamento de águas contaminadas

A fotodegradação do metoprolol é muito lenta à luz solar, apresentando um tempo de meia-vida de várias centenas de horas sob luz solar e isso ficou comprovado no estudo de Liu and Williams (2006) obtendo o tempo de meia-vida de 630 h para o metoprolol quando comparado com o tempo de meia-vida do propranolol que é cerca de 16 h. Para determinar este tempo de meia-vida, os β -bloqueadores estiveram sob radiação de uma lâmpada de xenon (295-800 nm). Nesse mesmo estudo, os autores compararam o tempo que é necessário para degradar o metoprolol num mês de verão e num mês de inverno para uma zona na Europa. Para o mês de verão são necessários 28 dias e para o mês de inverno são necessários 286 dias para degradar uma solução de 1 mg/L. Segundo alguns estudos, a maneira mais fácil de remover o metoprolol da água é por incidência de radiação. Por isso, é necessário desenvolver novos métodos para o poder remover das águas de forma eficaz. Essas novas técnicas de remoção do metoprolol das águas consistem em fazer incidir com radiação UV-C ou fazê-lo reagir com reagentes do tipo Fenton ou ainda com o ozono (Rivas et al., 2010).

A remoção do metoprolol por ação do ozono é denominada ozonólise ($\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$). O ozono é utilizado porque é um oxidante forte (potencial eletroquímico de redução de 2,07 V, sabendo que o do radical hidroxilo é de 2,8 V) e também porque é instável em água, por isso reage rapidamente. Uma desvantagem desta técnica é que a produção de ozono é muito dispendiosa. O ozono pode dar origem a radicais hidroxilo numa série de reações descritas a seguir, em que os radicais hidroxilo ou o ozono podem também atacar os β -bloqueadores. O ozono presente vai realizar ataques electrofílicos (seletivo/oxidação direta) na amina secundária ou no anel aromático e os radicais $\bullet\text{OH}$ (não seletivo/oxidação direta) também podem reagir com os β -bloqueadores. A valores

de pH baixo, o ozono vai sofrer ataques do ião hidroxilo e, numa série de reações, vai formar o radical hidroxilo (Šojić et al., 2012):



O ozono quando irradiado por radiação UV ($\lambda=254$ nm) vai ser fotodegradado dando origem ao $\cdot\text{OH}$ ou a H_2O_2 . O H_2O_2 pode depois sofrer fotólise originando radicais $\cdot\text{OH}$ ou dissociação em dois iões, o H^+ e o HO_2^- . O anião HO_2^- vai depois reagir com o O_3 conforme foi demonstrado nas reações anteriores (Šojić et al., 2012).



Segundo o estudo de Benner e Ternes (2009), o ataque do ozono à amina secundária e ao anel aromático é muito diferente. Para o ozono reagir com a amina secundária, esta tem de estar desprotonada ($\text{pK}_a = 9.7$ e $k_{\text{O}_3, \text{deprot}} = 8.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e o pH tem de ser constante. A pH 3, a amina já está protonada, logo o ataque vai ocorrer no anel aromático como está ilustrado no esquema da Figura 5 (hipótese proposta por estes autores). Com o aumento do pH, a concentração de amina desprotonada aumenta, logo os ataques a ela também aumentam.

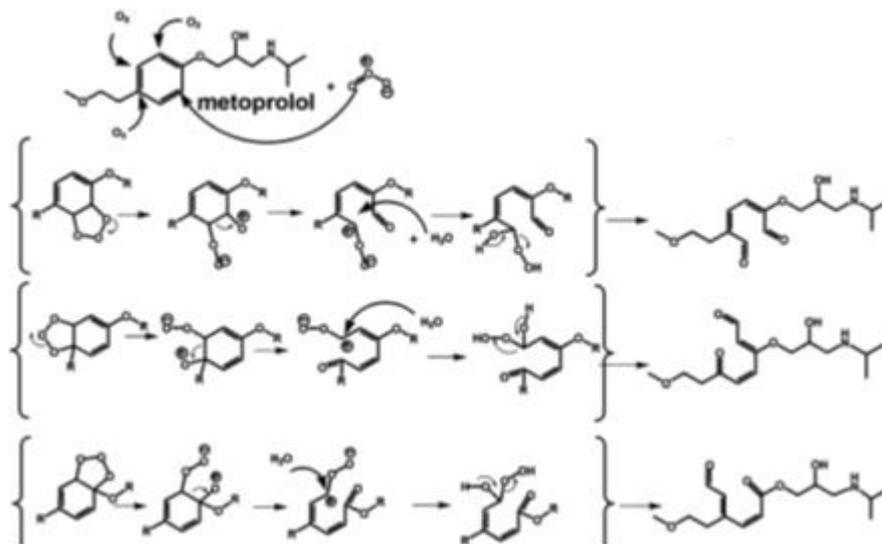
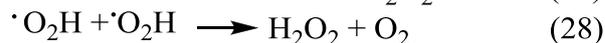
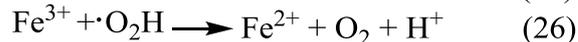
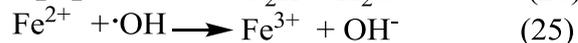
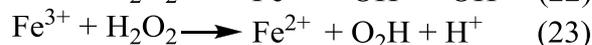
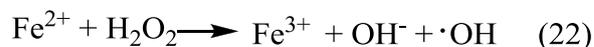


Figura 5 – Esquema de degradação do metoprolol pelo ozono proposto por Benner e Ternes (2009).

Uma outra técnica para eliminar o metoprolol ou outros poluentes da água é através da reação com reagentes de tipo Fenton. Este tipo de reações consiste no Fe (II) a reagir com o H₂O₂ para formar os radicais •OH. Esta técnica também é muito importante e já há alguns estudos usando os reagentes de tipo Fenton porque estes são baratos e fáceis de arranjar, além de não apresentarem toxicidade. O tratamento de águas com esta técnica engloba quatro passos: a oxidação dos poluentes em meio ácido, seguida da neutralização da solução para ajustar o pH, o próximo passo engloba a coagulação/floculação para depositar o Fe e, por fim, a separação sólido-líquido na ETAR para remover o Fe precipitado da água já tratada (Li et al., 2012, Deng, 2007). As reações de Fenton que levam à formação do radical •OH são as seguintes (Magario et al., 2012):



Neste processo o ferro é constantemente oxidado e reduzido. Estas reações são as mais básicas neste processo já que existem outras em que se podem formar outras espécies contendo o ião Fe²⁺ ou o ião Fe³⁺, como por exemplo o ião Fe²⁺ complexado com o H₂O₂. Para estas reações acontecerem tem de se ter em conta o pH. Os radicais

•OH podem atacar os compostos orgânicos por remoção de um átomo de hidrogênio de ligações CH, OH ou NH ou por adição a ligações duplas ou anéis aromáticos (Magario et al., 2012). Na literatura já existem alguns estudos usando este tipo de reações nomeadamente (Li et al., 2012, Isarain-Chávez et al., 2011, Sirés et al., 2010). As reações de tipo Fenton podem estar associadas a outros tipos de estudos, como as reações de Fenton fotoassistidas (SPEF – *solar photo eletro Fenton*), as reações eletro-Fenton (EF) ou as reações de Fenton usando catálise heterogênea. O estudo de Isarain-Chávez et al. (2011) engloba as técnicas de SPEF e EF, em que é usado uma espécie de painel solar em que num elétrodo o Fe^{3+} passa a Fe^{2+} e no outro elétrodo há a formação de H_2O_2 e, no final, há formação do •OH. No estudo, os autores conseguem provar que existe mineralização total do metoprolol usando estes processos.

O uso de radiação UV como técnica isolada não é suficiente para o tratamento de águas por causa do tempo de vida dos poluentes. No estudo de Abramović et al. (2011) mostraram que a fotodegradação direta do metoprolol e de outros poluentes sob ação de radiação UV ($\lambda=254$ nm) é muito lenta; por isso, deve estar acoplada a outras técnicas. Essas técnicas podem ser a ozonólise ou as reações de tipo Fenton descritas anteriormente (Kim et al., 2008). Um estudo promissor na fotodegradação de poluentes das águas é a associação da radiação UV com o dióxido de titânio (TiO_2), porque vai promover a eficiência do aparecimento de radicais •OH. O TiO_2 teve muito sucesso por causa das suas propriedades físico-químicas como semicondutor, é barato e possui várias formas cristalinas, as quais são fotoquimicamente estáveis e não são tóxicas e uma desvantagem é que só pode ser utilizado com radiação UV (Šćepanović et al., 2012, Tong et al., 2012). No estudo de Abramović et al. (2011), ao fim de 4 horas o metoprolol já estava mineralizado quando usaram um gel contendo TiO_2 . Šćepanović et al. (2012) usaram géis contendo TiO_2 sob radiação UV (usaram uma lâmpada que emitia radiação a estes $\lambda= 304, 314, 335$ e 366 nm) e para alguns deles, ao fim de 60 minutos, a mineralização do metoprolol já era de 90%.

1.5 Porfirinas

1.5.1 Introdução geral às porfirinas

As porfirinas são um grupo de compostos muito importante porque desempenham importantes funções biológicas como o transporte de oxigênio (hemoglobina) e a fotossíntese nas plantas (clorofila). Na estrutura básica de uma porfirina estão envolvidos vinte átomos de carbono e quatro átomos de azoto (Figura 6). O macrociclo pode ser considerado como resultante da combinação de quatro unidades de tipo pirrol ligadas entre si por quatro pontes metínicas.

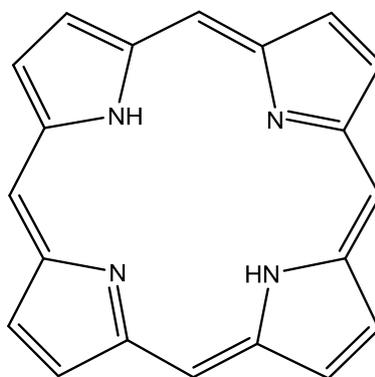


Figura 6 – Estrutura básica de uma porfirina

Os átomos de azoto da porfirina podem-se ligar a um íon metálico (exemplo: o íon ferro, dando origem ao grupo "heme" da hemoglobina, ou ao íon magnésio, dando origem à clorofila) (Harrach et al., 2011). A nomenclatura das porfirinas foi introduzida por Fischer, mas devido às suas limitações, em 1979 entrou em vigor a nomenclatura da IUPAC.

Na nomenclatura de Fischer, só os carbonos externos dos anéis do tipo pirrol é que são numerados e são designados de posições β -pirrónicas. As pontes metínicas são numeradas pelas letras gregas α (alfa), β (beta), γ (gama) e δ (delta). Os carbonos das pontes metínicas também podem ser referidos por posições *meso*. Esta nomenclatura está ilustrada na Figura 7.

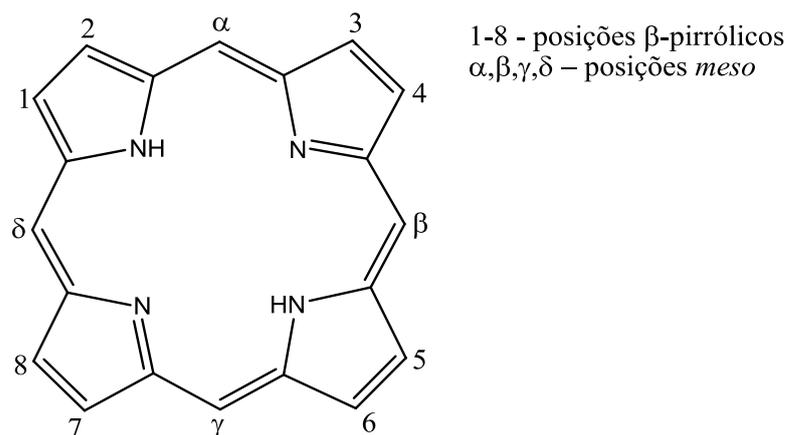


Figura 7 - Numeração do macrociclo de uma porfirina, segundo Fischer

A nomenclatura de Fischer foi substituída pela da IUPAC não só pela sua limitação em dar o nome a porfirinas mais complexas mas também pela necessidade em ver todas as posições numeradas e por causa do aparecimento de técnicas de análise por RMN- ^{13}C ou raios-X. Nesta nomenclatura todos os átomos estão numerados, nomeadamente os de azoto como está ilustrado na Figura 8.

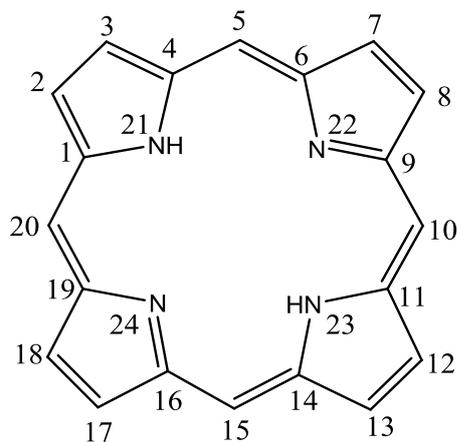


Figura 8 – Estrutura e numeração de uma porfirina segundo a IUPAC

Para uma porfirina que seja substituída, por exemplo, no carbono 5, por um grupo de quatro carbonos, estes vão ser denominados de 5^1 , 5^2 , 5^3 e 5^4 . Para simplificar ainda mais, a IUPAC também nomeou doze famílias de porfirinas e os seus substituintes para não haver trocas com os nomes. A maior parte das porfirinas pode formar complexos com iões metálicos, e estão assim protegendo o interior do núcleo de ataques por espécies eletrofílicas e a reatividade dos carbonos nas diferentes posições β -pirrónicas vai ser alterada (Harrach et al., 2011). As metaloporfirinas são muito importantes, como foi descrito anteriormente, porque são elas que realizam o transporte

de oxigênio (hemoglobina) e a fotossíntese nas plantas (clorofila) (Valicsek et al., 2011).

A escolha das porfirinas como alvo de estudo deve-se à sua capacidade de produção de oxigênio singlete em ambientes naturais. Assim sendo, são alvo de inúmeros estudos, principalmente em terapia fotodinâmica (terapia alternativa à quimioterapia onde são usados fotossensibilizadores para destruir células tumorais a partir do oxigênio singlete), uma vez que as porfirinas apresentam baixa citotoxicidade na ausência de luz (DeRosa and Crutchley, 2002). As porfirinas têm 22 elétrons π na sua estrutura, em que 18 desses elétrons conferem aromaticidade, e também têm a capacidade de absorver radiação a vários comprimentos de onda (Figura 9), nomeadamente entre os 400-450 nm (banda Soret) e na região dos 500-700 nm (bandas Q). As porfirinas podem possuir vários substituintes no macrociclo e um íon metálico no centro. Este pode ainda apresentar ligações nas posições axiais e alterar as propriedades físico químicas do núcleo porfirínico (Zhang et al., 2011, Wang et al., 2007).

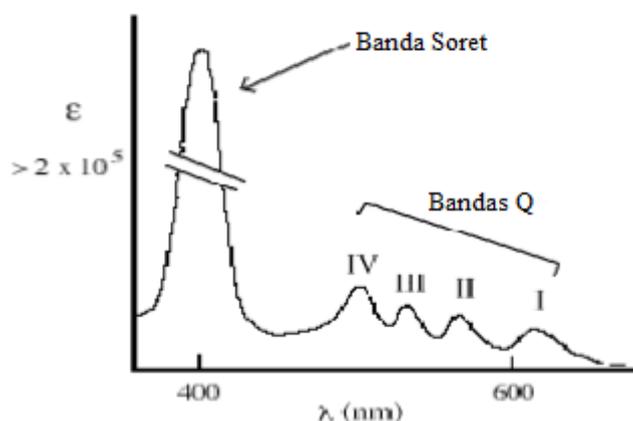


Figura 9 – Espectro de absorção típico de uma porfirina

1.5.2 As porfirinas como fotossensibilizadores

O estado tripleto das porfirinas tem um tempo de vida longo, o que permite um rendimento quântico elevado. As reações de fotodegradação em que são usadas porfirinas ocorrem através de dois mecanismos: mecanismo de Tipo I e mecanismo de de Tipo II. No entanto, previamente a qualquer mecanismo, a porfirina (Sens) absorve radiação e fica num estado excitado (reação 29). Após a porfirina estar no estado excitado é que podem ocorrer os dois tipos de mecanismo. No mecanismo de Tipo I, a

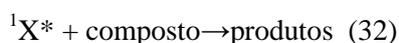
porfirina excitada vai reagir com o composto alvo e forma os produtos de degradação. No mecanismo de Tipo II, a porfirina excitada vai reagir com X (pode ser O₂ ou o TiO₂) que vai passar para o estado excitado que, por sua vez, vai reagir com o composto alvo que, por fim, vai ser degradado.



Mecanismo de Tipo I

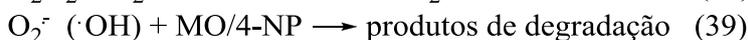
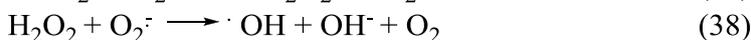
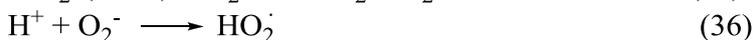
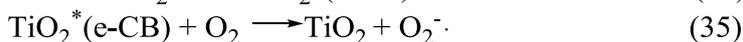


Mecanismo de Tipo II

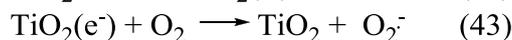
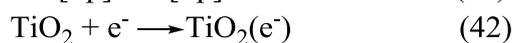
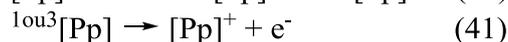


Ergaieg e Seux (2009) estudaram o uso de uma porfirina para destruir bactérias. A destruição das bactérias resume-se em três passos: num primeiro há a acumulação do fotossensibilizador na bactéria, o segundo passo consiste em incidir radiação no alvo para induzir a passagem do O₂ para o seu estado singlete, muito reativo e, por fim, o ¹O₂* vai reagir com determinados sítios na bactéria, levando-a à destruição. Este processo pode ocorrer de duas maneiras diferentes: o mecanismo de Tipo I e o de Tipo II descritos anteriormente. No de Tipo I, o fotossensibilizador reage com a biomolécula para produzir radicais livres. No de Tipo II, é produzido o ¹O₂* através do fotossensibilizador que depois vai destruir a bactéria.

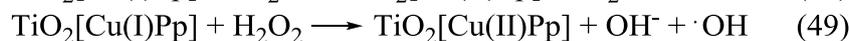
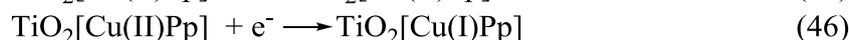
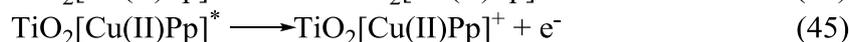
Zhang et al. (2011) usaram uma porfirina como fotossensibilizador em combinação com o TiO₂ para a degradação do 4-nitrofenol (4-NP) e do alaranjado de metilo (MO - *methyl orange*). Os autores testaram a fotodegradação de uma solução com estes compostos na presença de TiO₂ e concluíram que a fotodegradação era muito lenta. No entanto, verificaram que, na presença da porfirina *trans*-di-hidroxi[5,10,15,20-tetrafenilporfirina]estanho(IV) (SnP) a reação ficava mais rápida. Os autores conseguiram provar que os dois compostos são degradados pelo radical •OH e pelo ião •O₂⁻ e que, na presença de porfirina com o TiO₂, o tempo que é preciso para fotodegradar estes dois compostos diminuía substancialmente. Os autores consideraram as seguintes reações:



Num outro estudo (Wang et al. 2007), os autores sintetizaram duas porfirinas (cuja designação dada pelos autores foi Pp) diferentes e complexaram-nas com Cu(II). No final testaram a fotodegradação do 4-NP na presença de TiO₂ com as duas porfirinas. Os autores obtiveram dois conjuntos de reações de fotodegradação para as porfirinas, as reações na presença e na ausência de Cu(II). As reações na ausência de Cu(II) são as seguintes:



Nestas reações, quando a porfirina passa para o estado tripleto pode dar origem ao ¹O₂. As reações de fotodegradação onde está presente o ião Cu(II) são as seguintes:



Nestas reações, o Cu(II) é reduzido a Cu(I) pelos eletrões formados e, mais tarde, é oxidado pelas espécies ¹O₂, H₂O₂ e ³O₂. Neste tipo de reações o ião Cu(II) será capaz de produzir fluorescência. Neste trabalho, os autores descobriram que as porfirinas com o ião Cu(II) têm uma atividade fotocatalítica maior do que as porfirinas sem o ião Cu(II).

É de notar que os estudos com as porfirinas geram ¹O₂, além de outras espécies, e esse ¹O₂ vai ser a espécie responsável pela degradação dos poluentes. Então, no estudo

da fotodegradação do metoprolol na presença de porfirinas é importante conhecer qual a espécie responsável pela degradação e comparar com a literatura.

1.6 Objetivos do trabalho

Os objetivos estabelecidos para este trabalho foram estudar a fotodegradação do metoprolol na presença de AF naturais e de uma porfirina. Como já foi referido anteriormente, um estudo realizado com os AF usados neste trabalho revelou que era o $^1\text{O}_2$ a espécie responsável pela fotodegradação do metoprolol. Por isso, foi-se testar uma porfirina como fotossensibilizador, eventualmente utilizável para o tratamento de efluentes, já que a porfirina em estudo também gera essa espécie.

No trabalho de Gonçalves (2012) anteriormente realizado com os AF utilizados no presente trabalho já se tinham observado produtos resultantes da fotodegradação do metoprolol na presença de AF, por isso, um outro objetivo do presente trabalho é analisar esses produtos, por HPLC-MSⁿ e atribuir-lhes uma estrutura. Também se vão comparar os produtos formados na fotodegradação do metoprolol na presença de AF e na presença da porfirina.

2. Procedimento experimental

2.1 Lavagem do material de vidro

Durante a realização deste trabalho laboratorial, todo o material utilizado foi lavado com água e submerso numa solução de detergente líquido alcalino Derquim LM 01 (Panreac) a 2,5% durante cerca de 2 horas. De seguida foi passado por água destilada e colocado a secar num recipiente apropriado. Depois de seco, todo o material foi guardado num armário fechado para evitar contaminações.

2.2 Reagentes

Os principais reagentes utilizados neste trabalho laboratorial foram os seguintes: tartarato de metoprolol (pureza: $\geq 98\%$); da Sigma-Aldrich; acetonitrilo (qualidade para HPLC, pureza: $\geq 98\%$) da Lab-Scan analytical sciences; ácido fórmico (pureza: $\geq 98\%$); da Panreac; dimetilsulfóxido (pureza $\geq 99,5\%$) da Lab-Scan analytical sciences. Para o estudo da fotodegradação do metoprolol, foram usados ácidos fúlvicos extraídos do Rio Vouga e recolhidos na zona do Cabo Carvoeiro em 1991, de acordo com a metodologia descrita pelos autores (Santos e Duarte, 1998). A 5,10,15,20 tetraquis(pentafluorofenil)porfirina usada neste estudo foi sintetizada e cedida pelo grupo de Química Orgânica da Universidade de Aveiro.

2.3 Equipamentos

A análise do metoprolol foi efetuada utilizando um Cromatógrafo para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Jason HPLC, equipado com uma bomba PU-980, um detetor UV-Vis BarSpec a 222 nm, uma coluna C18 Phenomenex (150 x 4.60 mm, 5 μ m, 100 Å) e um injetor com um “loop” de 20 μ l da Rheodyne fornecido pela Supelco. A fase móvel escolhida foi água: acetonitrilo (90:10), contendo HCOOH 0,1 % e a velocidade de fluxo foi 0.7 mL/min. Neste trabalho, este HPLC é denominado de HPLC 1. Foi também utilizado outro Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu constituído por um desgaseficador DGU-20A5, uma bomba LC-20AD, um detetor UV-Vis SPD-20A a 222 nm, um forno CTO-10ASVP, uma coluna-PFP ACE® C18 (5 μ m) com dimensões 150 mm x 4.6 mm e um “loop” de 20 μ L. A temperatura foi mantida constante a 25°C. Neste trabalho, este HPLC é denominado de HPLC 2 e foi

usado no estudo da detecção dos produtos resultantes da fotodegradação do metoprolol. A fase móvel escolhida foi a mistura (90:10) de uma solução aquosa HCOOH 0,1 % com acetonitrilo e a velocidade de fluxo foi 0.7 mL/min. A mistura solução aquosa: acetonitrilo foi feita através das bombas do cromatógrafo e não preparada num único frasco como no HPLC 1, o que leva a que a percentagem final de HCOOH no eluente seja 0,09% e não 0,1% como no HPLC 1. A fase móvel foi previamente filtrada por filtros de membrana 0,2 µm (Schleicher & Schuell).

Para identificar os produtos resultantes da fotodegradação do metoprolol na presença de AF utilizou-se um HPLC constituído por um amostrador automático Accela (T = 16°C), com loop variável, uma bomba Accela 600 LC e um detetor Accela 80 Hz PDA (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EUA). A separação foi efetuada com uma coluna-PFP ACE® C18 (5 µm) com dimensões 150 mm x 4.6 mm e um “loop” de 20 µL acondicionada a 25 °C. Utilizou-se como fase móvel uma mistura de água: acetonitrilo (90:10), com 0.1% de ácido fórmico e um fluxo de 0,7 mL/min. O volume injetado foi de 23 µL com detecção a 222 nm, tendo sido registados os espectros UV no intervalo compreendido entre 200 e 600 nm. O HPLC foi acoplado a um espectrómetro de massa LCQ Fleet ion trap (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA), equipado com um sistema de ionização por electrospray (ESI) operando no modo positivo. O fluxo de azoto e do gás auxiliar foi de 40 e 5 (unidades arbitrárias), respetivamente. A voltagem do “spray” foi 5 kV e a temperatura e voltagem do capilar foram 300 °C e 28 V, respetivamente. As experiências de CID-MSⁿ foram efetuadas com a seleção de *m/z* dos iões pecutores na gama compreendida entre 100 e 1000. A amplitude de isolamento dos iões pecutores foi de 1.0 unidade de massa. O tempo de varrimento foi de 100 ms e a energia de colisão otimizada entre 15 e 40 (unidades arbitrárias), usando hélio como gás de colisão. A aquisição de dados foi efetuada recorrendo ao software Xcalibur (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA).

As irradiações foram efetuadas em tubos de quartzo (20 x 2 cm) e as soluções foram irradiadas utilizando um simulador de radiação solar Solarbox 1500 (Co.fo.me.gra, Italy) equipado com uma lâmpada de xenon de 1500W e uns filtros que impedem a transmissão da luz de comprimentos abaixo de 290 nm. Foi usado também um multímetro (Co.fo.me.gra, Italy) equipado com um sensor de temperatura e um sensor de UV 290–400 nm para monitorização da temperatura e da irradiância, respetivamente. Durante as experiências a irradiância foi mantida constante a 550 W/m² para toda a gama espectral (o que corresponde a 55 W/m² na zona 290-400 nm). Os

tubos de quartzo foram colocados sobre um suporte metálico de modo a permitir uma irradiação homogênea.

Os espectros de UV-Vis das várias soluções foram adquiridos num espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu em células de 1 cm.

2.4 Preparação das soluções

A solução mãe de metoprolol foi preparada pesando 50 mg de metoprolol; transferidas para um balão volumétrico de 100 mL e dissolvidas em água Milli-Q. A solução mãe de metoprolol tem uma concentração final de ~500 mg/L. Esta solução de metoprolol foi utilizada para, por diluição com água Milli-Q, preparar padrões de calibração com concentrações entre 10 e 50 mg/L, e para preparar as soluções de metoprolol a irradiar nos ensaios da fotodegradação com os ácidos fúlvicos e a porfirina. A solução mãe foi envolvida em papel de alumínio para evitar o efeito da luz e foi armazenada no frigorífico. Os padrões foram guardados no escuro para posterior análise por HPLC-UV.

A solução mãe de ácidos fúlvicos (AF) 250 mg/L foi preparada por dissolução de 5 mg de AF em água Milli-Q num balão volumétrico de 20 mL. A solução mãe foi utilizada nos ensaios de fotodegradação do metoprolol. A solução mãe foi envolvida em papel de alumínio para evitar o efeito da luz e armazenada no frigorífico.

A solução mãe da porfirina H₂TPFPP foi preparada pesando 5 mg de H₂TPFPP e transferindo-a para um balão volumétrico de 5 mL para se obter uma concentração final de 1000 mg/L. A porfirina foi dissolvida em DMSO. Depois de preparada, a solução foi envolvida em papel de alumínio e armazenada no frigorífico.

2.4.1 Preparação das soluções para o estudo da fotodegradação do metoprolol na presença de ácidos fúlvicos naturais

A partir da solução mãe de metoprolol 500 mg/L e de AF 250 mg/L foram preparadas as soluções para se estudar a fotodegradação do metoprolol na presença de AF. As soluções para esse estudo tinham uma concentração de metoprolol de 50 mg/L e uma concentração de ácidos fúlvicos de 10 mg/L Gonçalves (2012). Nos estudos de identificação dos produtos resultantes da fotodegradação do metoprolol em presença de AF utilizou-se uma solução de metoprolol de 250 mg/L com 10 mg/L de ácidos fúlvicos.

2.4.2 Preparação das soluções para o estudo da fotodegradação do metoprolol na presença de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina

A partir da solução mãe de metoprolol 500 mg/L e H₂TPFPP 1000 mg/L foram preparadas as soluções para se estudar a fotodegradação do metoprolol na presença da porfirina. As soluções para esse estudo tinham uma concentração de metoprolol de 50 mg/L e uma concentração de 10 mg/L de porfirina. Nos estudos de identificação dos produtos resultantes da fotodegradação do metoprolol na presença de porfirina utilizou-se uma solução de metoprolol de 250 mg/L com 10 mg/L de porfirina.

2.5 Irradiação das soluções

Após preparação das soluções para o estudo da fotodegradação do metoprolol, transferiram-se alíquotas de 20 mL dessas soluções para os tubos de quartzo, vedaram-se os tubos com parafilme e, de seguida, foram irradiadas durante diferentes períodos de tempo. O tempo de irradiação utilizado dependeu do tipo de estudo em questão; para o estudo do metoprolol na presença de AF o tempo de irradiação foi entre 0 e 72 horas; para a porfirina, o tempo de irradiação foi entre 0 e 24 horas. As experiências realizaram-se em triplicado, não simultâneas, e sob as mesmas condições. Simultaneamente foram efetuados ensaios de controlo no escuro, estando os tubos envolvidos em papel de alumínio para verificar a influência da ausência de radiação no metoprolol. Após a irradiação, as soluções foram analisadas por HPLC-UV.

2.6 Identificação dos produtos resultantes da fotodegradação do metoprolol na presença de ácidos fúlvicos

No estudo da identificação dos produtos de degradação do metoprolol na presença de AF (10 mg/L) utilizou-se uma solução de metoprolol 250 mg/L que foi irradiada durante 24 h. Após a irradiação, a solução foi pré-concentrada por liofilização seguida de análise no HPLC-PDA-MS/MS.

2.7 Determinação do metoprolol por HPLC-UV

A determinação analítica do metoprolol foi efetuada utilizando as condições previamente determinadas por Gonçalves (2012) e utilizando o HPLC 1. As retas de calibração foram obtidas com soluções padrão no intervalo de concentrações 10-50 mg/L preparadas por diluição, em água milli-Q, da solução metoprolol 500 mg/L; cada padrão foi injetado duas ou três vezes. A Figura 10A apresenta um cromatograma típico de uma solução de metoprolol. A partir da área do pico do metoprolol de cada solução padrão foi construída a reta de calibração (Figura 10B).

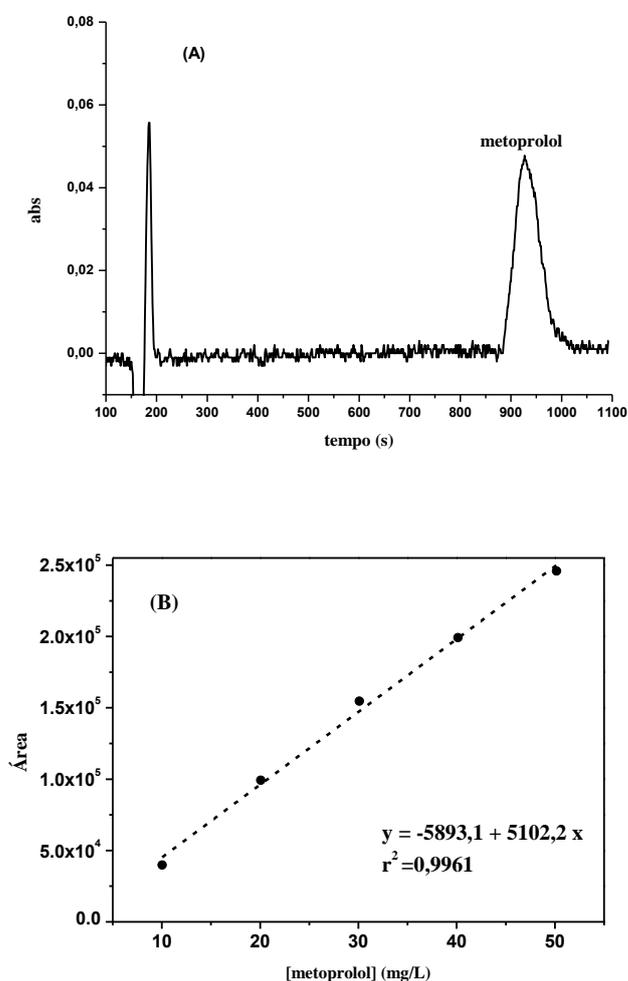


Figura 10 – (A) Cromatograma para o padrão de 50 mg/L de metoprolol. (B) Reta de calibração do metoprolol

No decorrer do trabalho aqui apresentado foram realizadas várias retas de calibração. Com a realização de várias retas foram obtidos diversos valores do coeficiente de correlação (r) e do limite de deteção (LD). Relativamente aos valores do coeficiente de correlação, apenas foram consideradas as retas de calibração com valores superiores a 0,99. Para determinar o limite de deteção usou-se a seguinte fórmula:

$$LD = \frac{3 \times S_{y/x}}{m} \quad (50)$$

onde m é o declive da reta de calibração e $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual (Miller e Miller, 2005),

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (51)$$

onde $y_i - \hat{y}_i$ corresponde aos resíduos dos valores de y e \hat{y}_i aos valores de y estimados a partir da reta de calibração; n é o número de pontos. O limite de deteção médio obtido, e o respetivo desvio padrão para 6 determinações foi de $3,62 \pm 0,97$ mg/L.

Antes de cada análise no HPLC 1 foram injetados dois padrões de metoprolol, preparados no próprio dia da análise, um de concentração 10 mg/L e o outro de 50 mg/L. Substituindo o valor da área do pico de metoprolol para cada solução padrão na equação de reta foi possível calcular a concentração de metoprolol e o erro associado. Considerou-se que, sempre que o erro obtido não ultrapassasse os 5%, a reta de calibração era válida para usar na análise do metoprolol nos estudos de fotodegradação. Caso contrário, era preciso construir uma nova reta de calibração. O desvio padrão de várias injeções da mesma amostra foi sempre menor que 5%.

2.8 Determinação das constantes de velocidade da fotodegradação

A concentração do metoprolol foi determinada por HPLC-UV como foi referido na secção 2.7, para os diferentes tempos de irradiação. Assumindo que a fotodegradação do metoprolol, tanto na presença de AF como na presença da H₂TPFPP, segue uma cinética de pseudo-1ª ordem, a equação 52 vai ser ajustada aos dados experimentais (Gonçalves, 2012),

$$C(t) = C_0 e^{-kt} \quad (52)$$

onde C_0 é a concentração inicial de metoprolol ao tempo zero (mg/L) e k é a constante de velocidade da reação (h^{-1}) determinada por regressão não-linear efetuada usando o programa GraphPadPrism5[®] (versão trial, <http://www.graphpad.com>; último acesso Outubro 14, 2013). Uma vez que os ensaios foram efetuados em dias diferentes, as soluções de metoprolol na presença de AF/H₂TPFPP que iam ser irradiadas tinham concentrações iniciais bastantes próximas de 50 mg/L mas ligeiramente diferentes umas das outras. Por esse motivo, as concentrações (C) das soluções sujeitas a diferentes tempos de irradiação foram normalizadas em relação à concentração inicial (C_0). Sendo assim, os gráficos apresentados sobre as cinéticas são da concentração normalizada (C/C_0) versus o tempo de irradiação. O valor da constante de velocidade apresentado para as experiências do metoprolol na presença de AF ou na presença da H₂TPFPP é o valor do conjunto de todos os ensaios realizados para a respectiva cinética. Para o cálculo do tempo de meia vida, usou-se a equação 53,

$$t_{\frac{1}{2}} = \ln(2)/k \quad (53)$$

onde k corresponde ao valor previamente determinado. As incertezas foram determinadas para o intervalo de confiança de 95% para ambas as experiências.

3. Resultados e discussão

3.1 Estudo do efeito dos ácidos fúlvicos sobre a fotodegradação do metoprolol

3.1.1 Cinética de fotodegradação do metoprolol (50 mg/L) na presença de ácidos fúlvicos (10 mg/L)

Como já foi referido anteriormente, o gráfico onde está representada a cinética da fotodegradação do metoprolol na presença de AF 10 mg/L corresponde à variação da concentração normalizada de metoprolol (C/C_0) em função do tempo de irradiação e está representado na Figura 11.

Neste trabalho, não se estudou o efeito da radiação no metoprolol na ausência de ácidos fúlvicos, uma vez que esse estudo já havia sido efetuado por Gonçalves (2012), tendo a autora verificado que o metoprolol não sofria fotodegradação durante 48 horas. Também no estudo de Piram et al. (2008), os autores demonstraram que o metoprolol não sofria fotodegradação direta por ação da radiação solar por causa de só absorver radiação abaixo dos 250 nm.

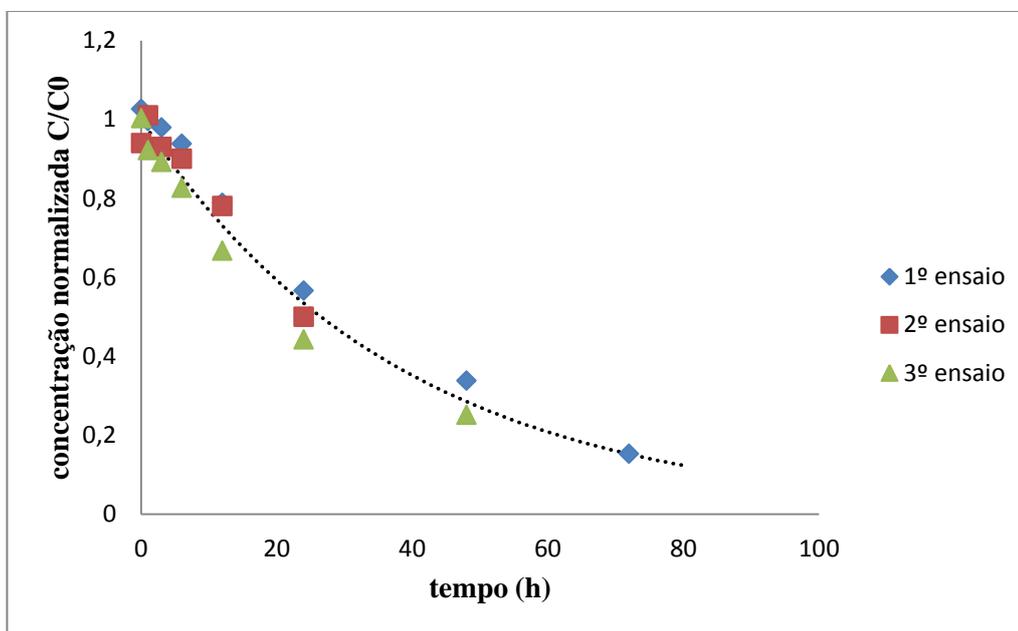


Figura 11 - Cinética da fotodegradação de uma solução de metoprolol 50 mg/L na presença de AF 10 mg/L. A curva a tracejado representa a equação 52 (cinética de pseudo-1ª ordem) ajustada aos dados experimentais

Ao analisar a Figura 11, verifica-se que após 72 horas de irradiação já praticamente não existe metoprolol, isto é, a taxa de degradação foi cerca de 84%. O valor médio da constante de velocidade para a fotodegradação do metoprolol 50 mg/L na presença de AF 10 mg/L foi de $2,61 \times 10^{-2} \pm 0,27 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ (95 % de confiança) e o tempo de meia vida médio foi $26,8 \pm 2,8 \text{ h}$ (95 % de confiança). Estes valores foram calculados usando as fórmulas apresentada na secção 2.8. No trabalho de Gonçalves (2012), a constante de velocidade média obtida para a fotodegradação do metoprolol na presença dos mesmos AF usando o mesmo sistema de radiação foi de $2,63 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$, ou seja, um valor muito concordante com o obtido no presente trabalho.

3.1.2 Evolução dos produtos resultantes da fotodegradação do metoprolol na presença de ácidos fúlvicos

Os cromatogramas HPLC-UV das soluções de metoprolol 50 mg/L irradiadas na presença de AF 10 mg/L revelaram a presença de novos picos para além do metoprolol, atribuídos a produtos resultantes da fotodegradação. Uma vez que, com a solução de metoprolol 50 mg/L, esses picos eram muito pouco intensos, foi necessário usar uma solução de metoprolol mais concentrada, isto é, 250 mg/L para uma melhor deteção dos novos picos. Assim, foram preparadas soluções de metoprolol 250 mg/l e AF 10 mg/L, irradiadas durante um determinado tempo e injetadas no HPLC 1. A Figura 12 apresenta o cromatograma obtido para um tempo de irradiação de 24 horas. Ao analisar o cromatograma verifica-se a existência de 4 novos picos resultantes da fotodegradação do metoprolol na presença de AF. Estes picos apresentavam um tempo de retenção bastante curto, o que conduzia por vezes a uma má resolução e dificuldade na integração dos picos para o cálculo das áreas, principalmente no caso do segundo e terceiro picos dos produtos de fotodegradação do metoprolol (Figura 12B). Na maioria das vezes esses dois picos apareciam sobrepostos, ou então havia dificuldade em diferenciá-los da linha de base o que dificultava a leitura da sua área para assim se proceder ao estudo da evolução dos picos com o tempo de irradiação.

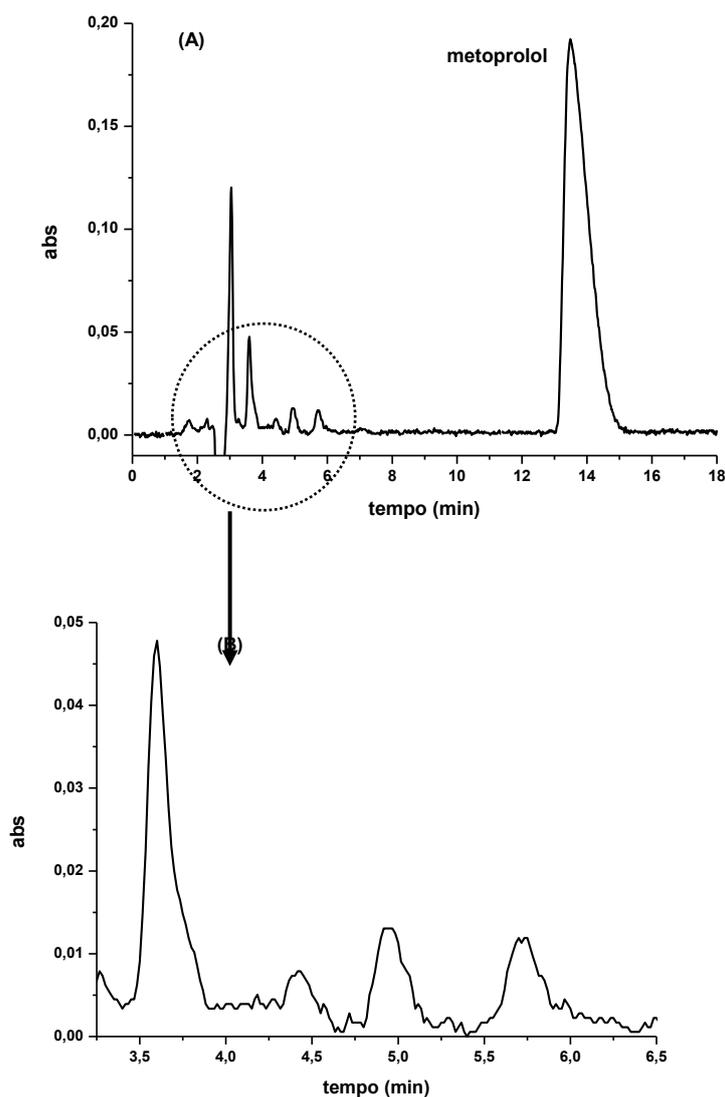


Figura 12 – (A) Cromatograma da solução de metoprolol 250 mg/L e de ácidos fúlvicos 10 mg/L irradiada durante 24 horas e lida no HPLC 1; (B) Ampliação do cromatograma no intervalo de tempo 3,25-6,5 min.

Para evitar este problema recorreu-se ao uso do cromatógrafo designado por HPLC 2. As soluções foram preparadas, irradiadas e injetadas no HPLC 2, tendo-se verificado que o cromatograma tinha um aspeto muito diferente do obtido no HPLC 1, em que o HPLC 2 apresentou uma melhor resolução e sensibilidade em relação ao HPLC 1, e ao analisar os cromatogramas verificou-se a existência de mais picos além dos 4 picos detetados anteriormente; além disso, também facilitou a análise dos cromatogramas para retirar a área dos picos para se estudar a sua evolução. Deste modo, optou-se por utilizar o HPLC 2 para estudar a evolução dos produtos de degradação do

metoprolol na presença de AF. É de salientar que, com apenas 3 horas de irradiação foi possível detetar alguns picos correspondentes a produtos da fotodegradação do metoprolol. A Figura 13 apresenta o cromatograma referente a 3 horas de irradiação.

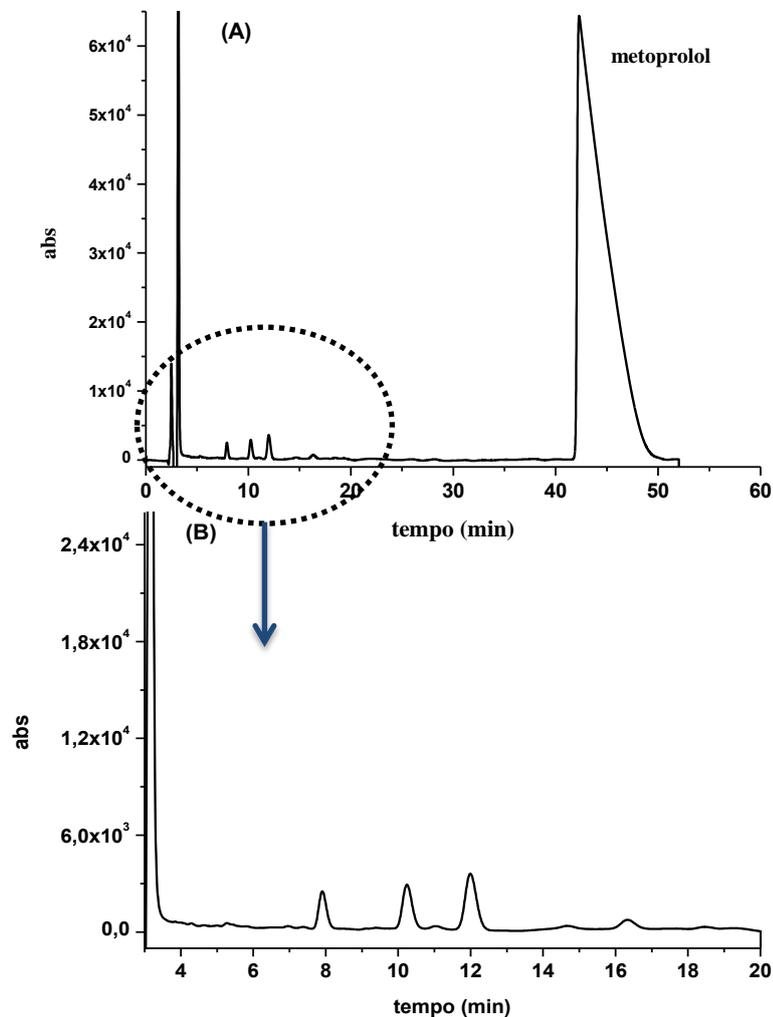


Figura 13 - (A) Cromatograma do metoprolol 250 mg/L com ácidos fúlvicos 10 mg/L com 3 hora de irradiação; (B) Ampliação do cromatograma no intervalo de tempo 4-20 min.

Após análise da Figura 13, verifica-se que os picos referentes aos produtos da fotodegradação do metoprolol têm um tempo de retenção entre os 3 minutos e os 20 minutos. Após 3 horas de irradiação é bastante notória a formação de 3 novos produtos, que são os mais importantes da fotodegradação do metoprolol na presença de AF. A Figura 14 apresenta o cromatograma da solução de metoprolol obtido após 24 horas de irradiação.

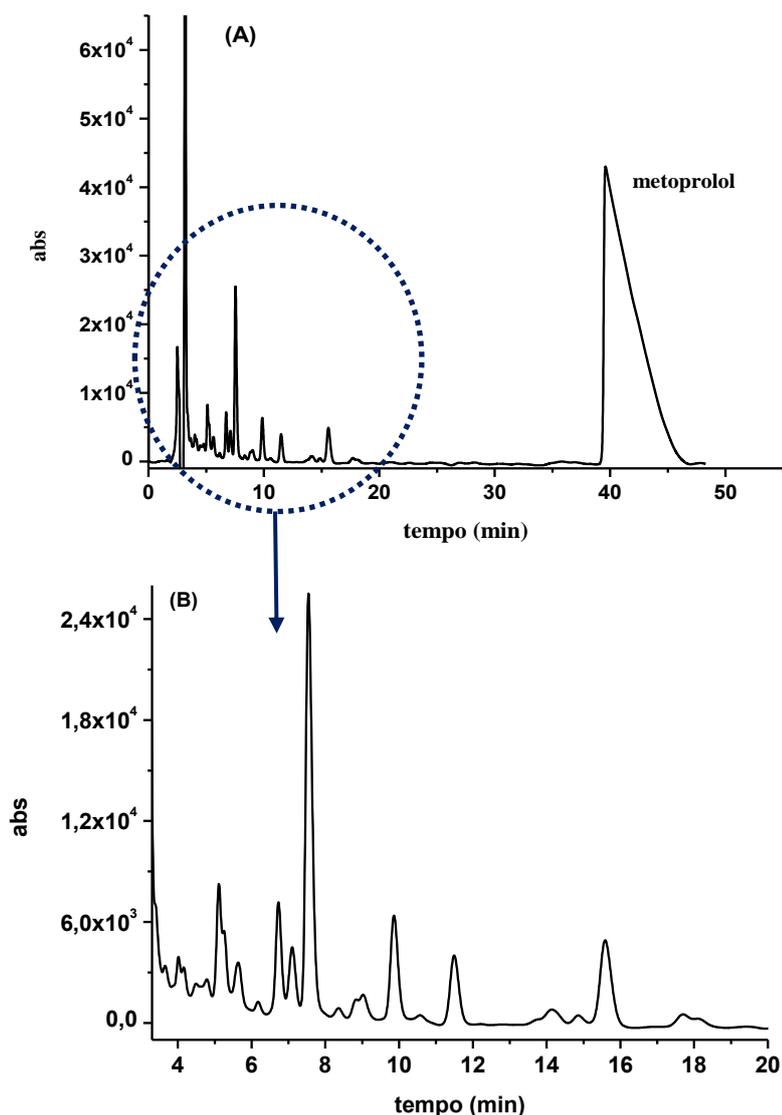


Figura 14– (A) Cromatograma do metoprolol 250 mg/L com ácidos fúlvicos 10 mg/L com 24 horas de irradiação; (B) Ampliação do cromatograma no intervalo de tempo 3-20 min.

Analisando a Figura 14 conseguem-se observar vários picos resultantes da fotodegradação do metoprolol para além dos 3 produtos observados no cromatograma da Figura 13. É notória a presença de um pico mais intenso que todos os outros. Com o objetivo de se estudar a evolução destes novos produtos resultantes da fotodegradação do metoprolol na presença de AF, foram preparadas soluções de metoprolol 250 mg/L com AF 10 mg/L e irradiadas durante 1, 3, 6, 12, 24 e 48 horas. Uma vez que é notória no cromatograma a presença de muitos picos e alguns mal resolvidos (Figura 14B), dificultando a leitura das respetivas áreas, para o estudo da evolução dos picos com o tempo de irradiação, selecionou-se apenas os picos mais intensos, ou seja, 7 picos, que

se encontram apresentados na Figura 15, e que foram nomeados pelas letras A, B, C, D, E, F e G.

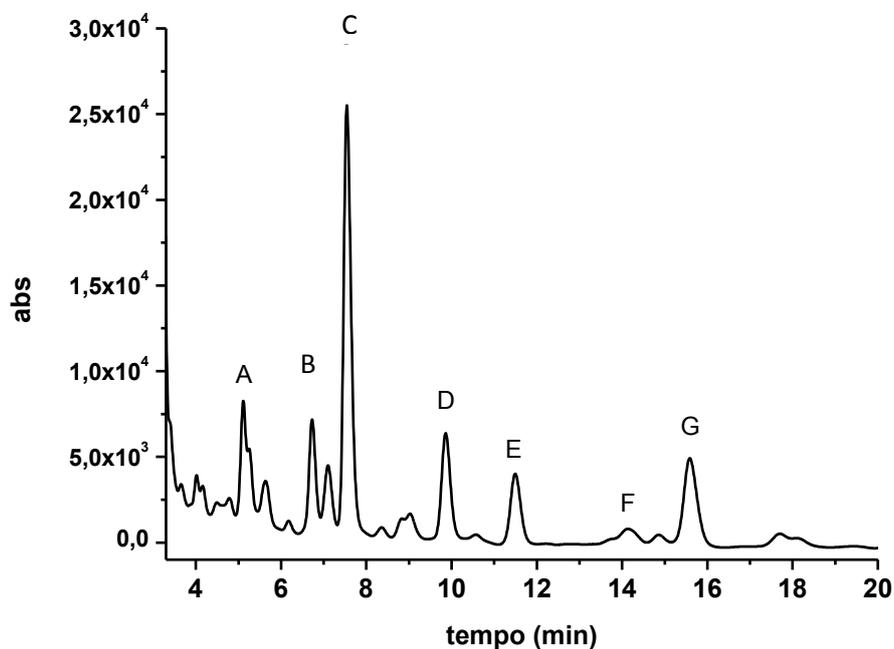


Figura 15 - Cromatograma de uma solução de metoprolol 250 mg/L com ácidos fúlvicos 10 mg/L após 24 horas de irradiação e respetiva atribuição dos picos

Após a análise dos cromatogramas para os vários tempos de irradiação, procedeu-se à construção de gráficos que exemplificam a evolução dos picos ao longo do tempo para dois ensaios (Figura 16).

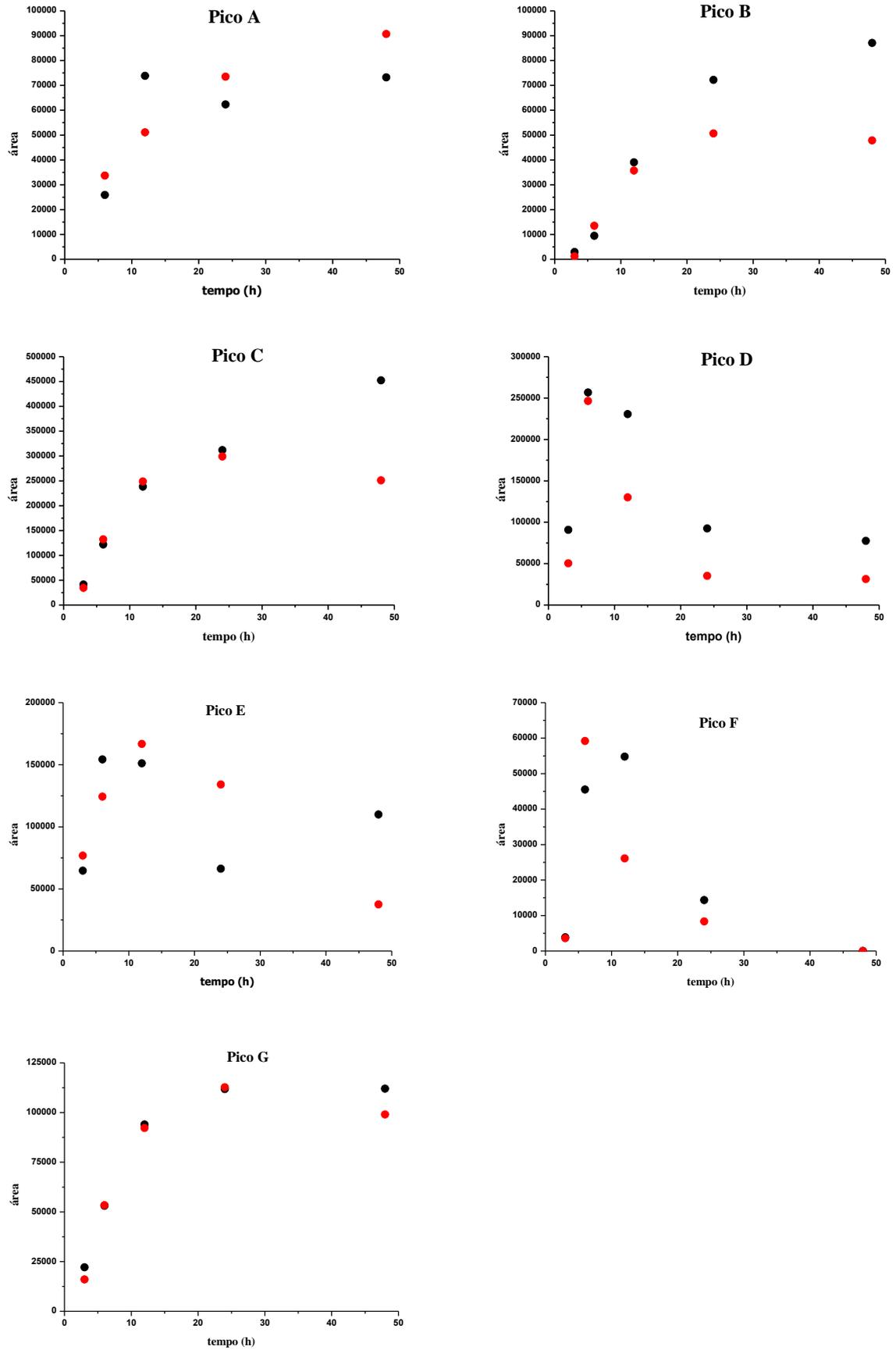


Figura 16 - Evolução dos picos da fotodegradação do metoprolol na presença de AF. (●) ensaio 1, (●) ensaio 2

Da análise da Figura 16, observa-se que os picos A, B, C e G estão sempre presentes e a sua área aumenta ao longo do tempo. Os picos D, E e F, formam-se inicialmente e passado um certo tempo de irradiação (6-12 horas) começam a desaparecer, ou seja, estes produtos de fotodegradação do metoprolol também devem ser fotodegradados, podendo também ser intermediários de outros produtos da fotodegradação do metoprolol.

3.1.3 Identificação dos produtos resultantes da fotodegradação do metoprolol na presença de ácidos fúlvicos por HPLC MS/MS

Num primeiro passo, antes de analisar qualquer solução irradiada, injetou-se no MS/MS a solução mãe de metoprolol. A solução de metoprolol apresentou o ião $[M+H]^+$ a um m/z 268, que foi sujeito a fragmentação por MS^n de modo a verificar o seu padrão de fragmentação. A Figura 17 apresenta o espectro MS^2 do metoprolol e a Tabela 6 apresenta um sumário do perfil de fragmentação do metoprolol.

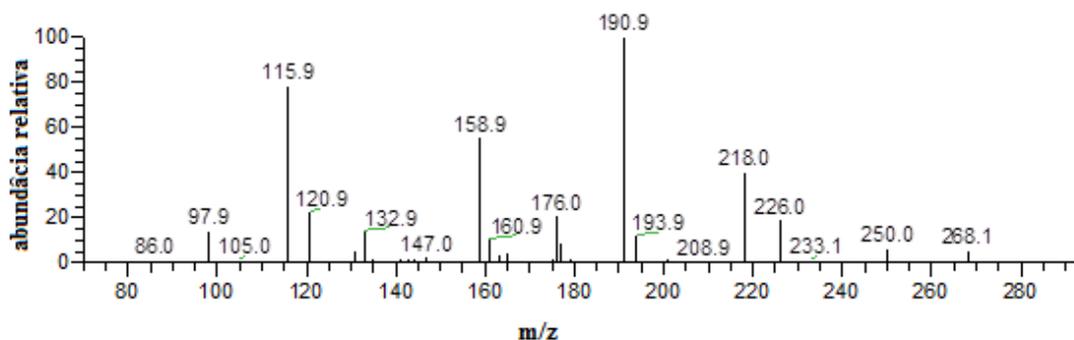


Figura 17 – Espectro MS^2 para a solução de 500 mg/L de metoprolol ($[M+H]^+$ m/z 268)

Tabela 6 – Perfil de fragmentação do metoprolol, $[M+H]^+$ m/z 268*.

$[M+H]^+$ m/z	MS^2 m/z	MS^3 m/z	MS^4 m/z	MS^5 m/z
268	250	218 191	176, 159 159	
	226	194 191 176 159 121 74	121 159 133	
	218	176 161 159 143 133 98	159 , 147, 133 131 105	131
	194	150 121 74	121	
	191	159	144, 141, 131 , 129, 91	91
	176	159 147 133 131	131 105	
	161	133	105	
	159	144 141 131 129 91	91	
	133	105		
	131	91		
	116	74 72 56		
	98	56		

* m/z a negrito foram sujeitos a análise por MS^n

A Figura 18 apresenta o perfil de fragmentação proposto para o metoprolol.

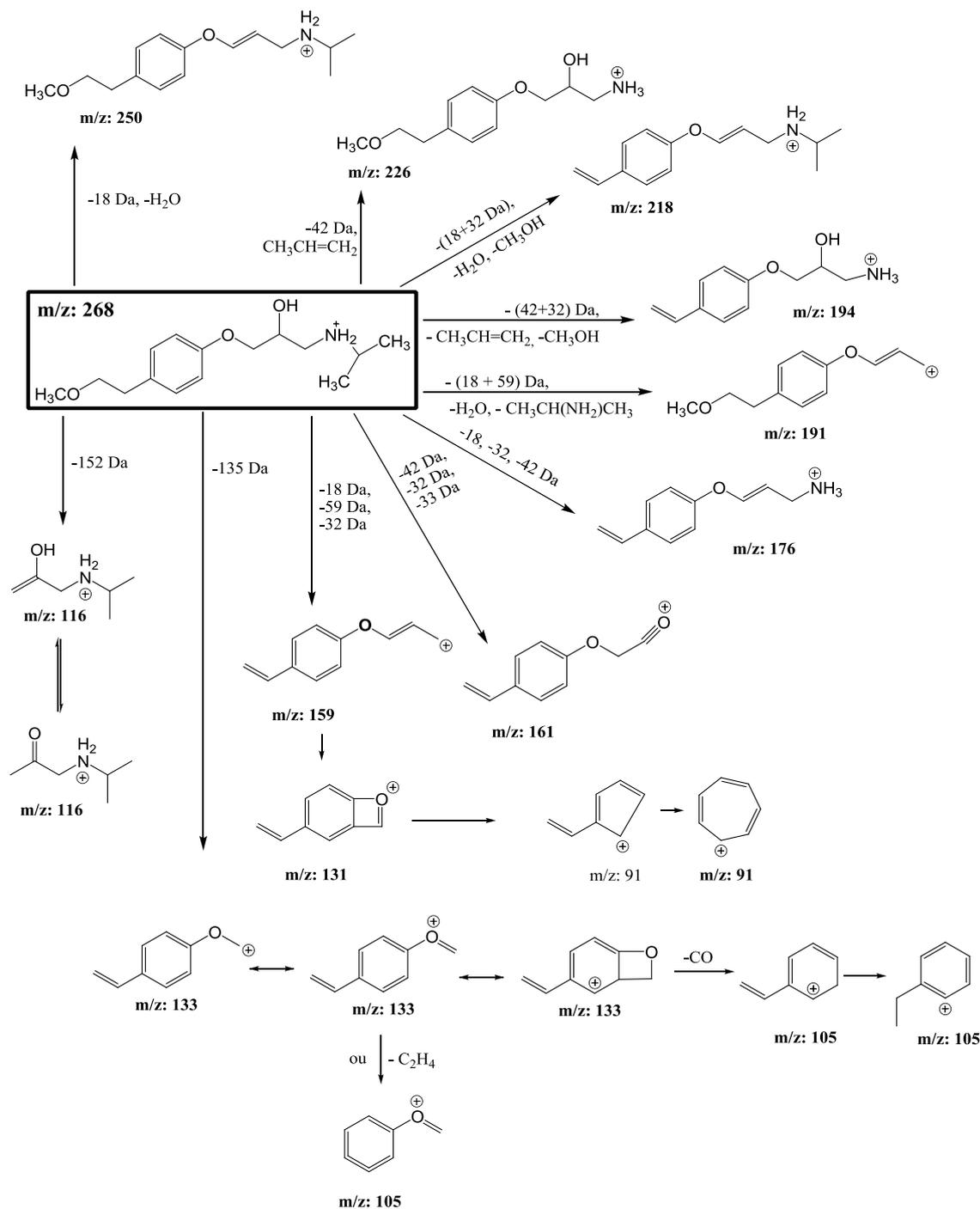


Figura 18 - Perfil de fragmentação proposto para o metoprolol

O perfil de fragmentação do $[M+H]^+$ m/z 268 proposto neste trabalho é semelhante ao observado por outros autores utilizando ESI-MS (Borkar et al., 2012, Benner e Ternes, 2009). As vias de fragmentação e os vários fragmentos identificados para o metoprolol poderão ser úteis na identificação dos produtos formados na fotodegradação do metoprolol na presença de AF.

Uma vez estabelecido o perfil de fragmentação do metoprolol prosseguiu-se para a identificação dos produtos resultantes da sua fotodegradação na presença de AF. Como já foi referido anteriormente, a solução de 250 mg/L de metoprolol na presença de 10 mg/L de AF foi irradiada durante 24 horas. Esta solução foi analisada no HPLC 2 para se obter um cromatograma onde fosse possível observar os produtos de degradação formados. Devido à indisponibilidade do HPLC MS/MS, a solução irradiada foi congelada durante aproximadamente 3 meses. Após o descongelamento desta, a solução foi pré-concentrada por liofilização. Para verificar se os picos se mantinham ou não, a solução liofilizada foi injetada novamente no HPLC 2 e comparada com a solução original antes da liofilização. Os cromatogramas referentes a esta solução antes e depois da liofilização estão apresentados na Figura 19.

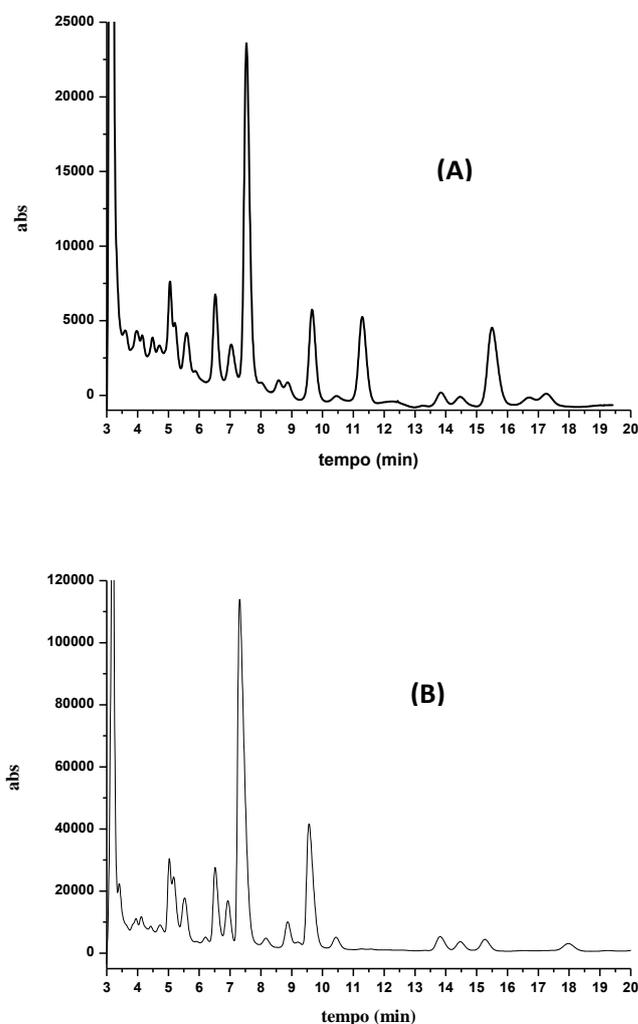


Figura 19 – Cromatograma do HPLC 2 da solução de metoprolol 250 mg/L e AF 10 mg/L irradiada durante 24 h antes de liofilizar (A) e depois de liofilizada (B). As escalas dos cromatogramas são diferentes.

As escalas dos eixos dos y nas Figura 19A e 19B são muito diferentes e observa-se que o cromatograma da solução liofilizada (Figura 19B) apresenta os picos com uma área maior por causa dos produtos estarem mais concentrados devido à liofilização. Também se pode concluir que a maioria dos picos mantêm-se presentes no cromatograma da solução liofilizada. No entanto, alguns picos apresentam uma intensidade relativa menor ou quase desapareceram, talvez devido à volatilização ou degradação dos compostos relativos a esses picos. A solução após liofilização foi injetada no HPLC MS/MS e o cromatograma obtido está representado na Figura 20.

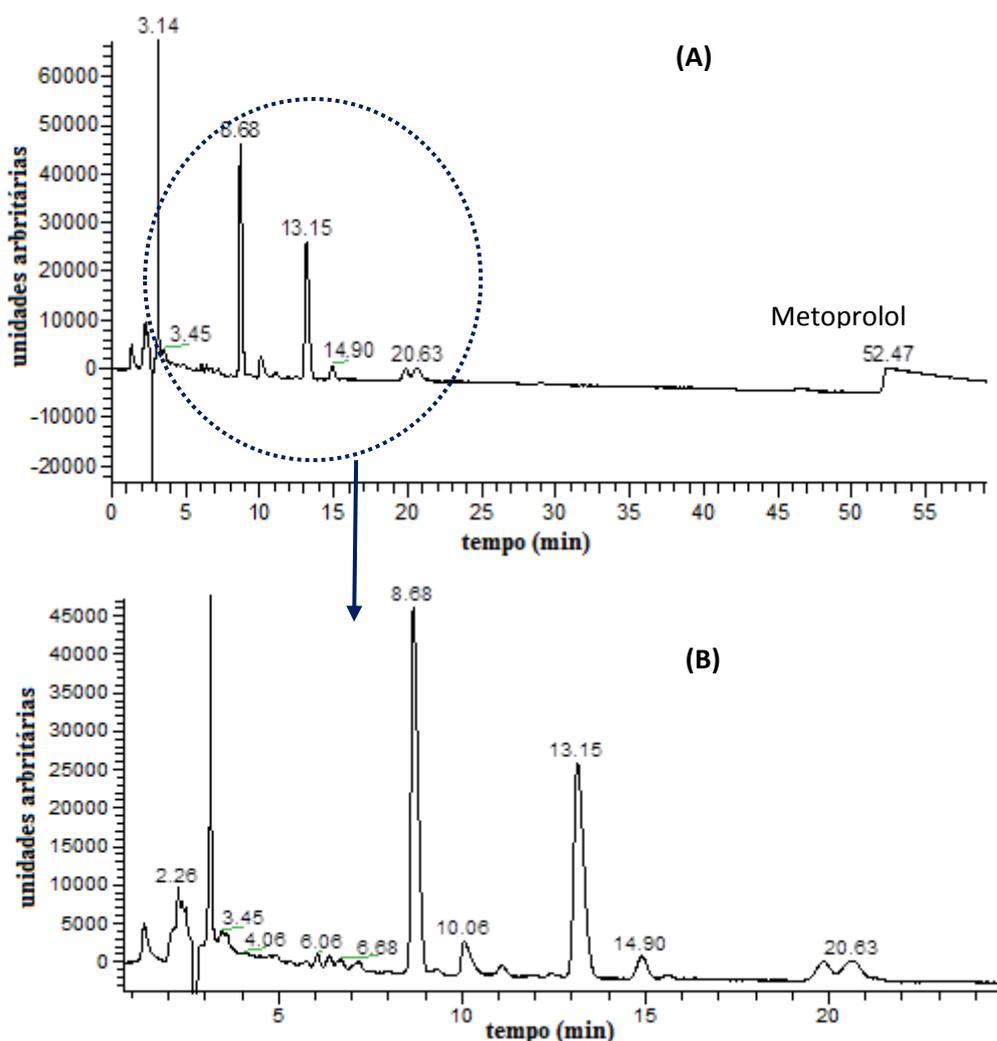


Figura 20 – (A) Cromatograma do HPLC MS/MS para a solução de metoprolol 250 mg/L na presença de 10 mg/L de AF irradiada 24 horas ; (B) Ampliação do cromatograma no intervalo de tempo 0-25 min.

Após comparação do cromatograma da Figura 20 com o cromatograma da Figura 19B, observa-se que os cromatogramas são diferentes e é difícil assim fazer a correspondência entre os cromatogramas obtidos no HPLC 2 e no HPLC MS/MS. Uma causa provável para tal facto é as colunas poderem ser ligeiramente diferentes apesar de ambas serem C18. Assim, prepararam-se 2 novas soluções de metoprolol 250 mg/L na presença de AF 10 mg/L que foram irradiadas durante 2 tempos diferentes, 6 horas e 24 horas. Estes dois tempos foram escolhidos a partir da análise da Figura 16 correspondente à evolução dos picos; enquanto os picos A, B, C e G apresentam máximos às 24 horas, os picos D, E e F apresentam máximos às 6 horas de irradiação e por isso estes seriam os tempos mais indicados para identificar os produtos de degradação. Após a irradiação das soluções, estas foram injetadas no HPLC MS/MS utilizando a mesma coluna C18 do HPLC 2 (que foi levada para o HPLC MS/MS) para se poder relacionar cada um dos picos analisados. Os dois cromatogramas obtidos encontram-se na Figura 21.

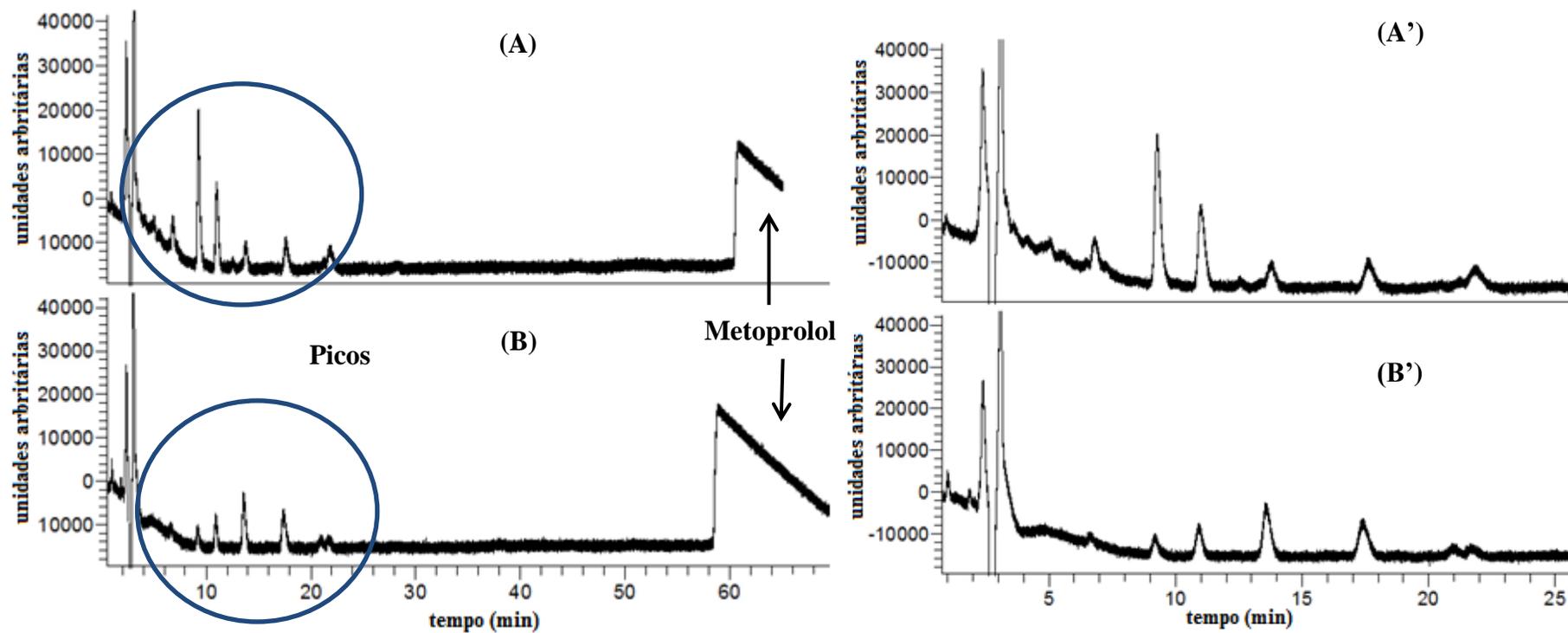


Figura 21 - (A) Cromatograma do HPLC MS/MS para a solução de metoprolol 250 mg/L na presença de 10 mg/L de AF irradiada 24 horas (A) e 6 horas (B); Ampliação do cromatograma no intervalo de tempo 0-26 min para as 24 horas de irradiação (A') e para as 6 horas de irradiação (B').

Após análise da Figura 21 e comparando com a Figura 15 (cromatograma do HPLC2 da solução de metoprolol 250 mg/L na presença de AF10 mg/L após 24 horas de irradiação) verifica-se que existe alguma discrepância nos cromatogramas, apesar da coluna usada nos dois aparelhos ser a mesma e as condições de análise serem praticamente as mesmas (fluxo de 0,7 mL/min e fase móvel de solução aquosa de HCOOH:acetonitrilo 90:10 com percentagem total de HCOOH de 0,09% no HPLC 2 e de 0,1 % no HPLC MS/MS). Por essa razão não foi possível fazer a correspondência direta entre os picos analisados no HPLC 2 e os picos obtidos no HPLC MS/MS. Por essa razão, apresentaremos a identificação dos compostos que deram origem aos picos do cromatograma HPLC-UV obtido no equipamento de HPLC-DAD MS/MS. Estes picos irão ser numerados do pico I ao pico VII (Figura 22) e para uma mais fácil análise encontram-se também identificados na Tabela 7.

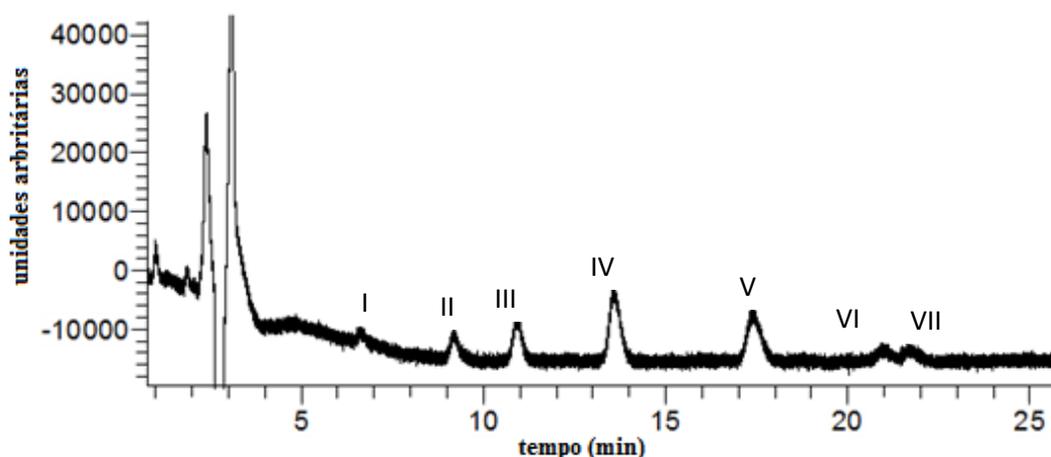
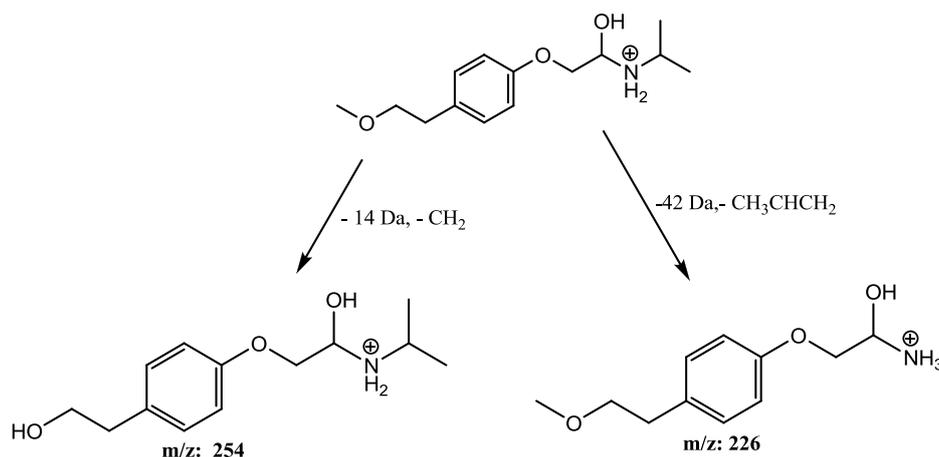


Figura 22 - Cromatograma do HPLC MS/MS de uma solução de metoprolol 250 mg/L com ácidos fúlvicos 10 mg/L após 6 horas de irradiação e respectiva atribuição dos picos.

Tabela 7 – Atribuição dos picos ao respectivo tempo de retenção e à sua massa

Pico	t'r (min)	[M+H] ⁺ m/z
I	6,6	282
II	9,2	254
III	11,0	284
IV	13,6	238
V	14,4	300
VI	21,0	252
VII	21,7	226

Como se pode verificar nos cromatogramas da Figura 22 e na tabela 7, foram observados sete picos correspondentes à fotodegradação do metoprolol na presença de AF. Até à data, na literatura, só há dois trabalhos em que foram identificados produtos da fotodegradação do metoprolol na presença de AF (Liu et al., 2009, Chen et al., 2012a). Liu et al. (2009) recolheram amostras de água de rio em meses diferentes e estudaram a fotodegradação do metoprolol nessas águas, tendo detetado produtos de degradação com m/z 226, 254, 284 e 300. Os autores apenas identificaram os produtos com m/z 226 e 254. Na Figura 23 apresentam-se as estruturas propostas pelos autores para estes dois produtos da fotodegradação.

**Figura 23** – Esquema de transformação do metoprolol nos produtos de m/z 226 e m/z 254 proposto por Liu et al. (2009)

Chen et al. (2012a) ao estudarem a fotodegradação do metoprolol em soluções aquosas na presença de AF extraídos do carvão de uma mina, referiram que o produto

principal resultante da degradação do metoprolol apresentava um m/z de 226 e identificaram este produto como sendo o mesmo que o proposto por Liu et al. (2009) (ver Figura 23).

No presente trabalho foram observados mais produtos resultantes da fotoderadação do metoprolol na presença de AF, para além dos produtos m/z 226 e m/z 254 mencionados anteriormente. Neste trabalho apenas se irá tentar identificar os produtos correspondentes aos iões $[M+H]^+$ m/z 226, 254, 238 e 282 (compostos **VII**, **II**, **IV** e **I**, respectivamente).

Os primeiros produtos a serem analisados correspondem aos iões $[M+H]^+$ m/z 254 (composto **II**) e 226 (composto **VII**). Uma vez que o ião $[M+H]^+$ m/z 254 também corresponde ao pico mais intenso no cromatograma da solução irradiada durante 6 horas (Figura 22), pode-se fazer uma analogia entre o cromatograma da Figura 15 na análise da evolução dos picos, e atribuir este composto **II**, provavelmente, ao pico **C**. Na Tabela 8 estão representados os perfis de fragmentação para aos iões $[M+H]^+$ m/z 254 (composto **II**) e (226 composto **VII**).

Tabela 8 - Perfil de fragmentação do ião $[M+H]^+$ m/z 254 e m/z 226

Composto	$[M+H]^+$ m/z	MS^2 m/z	MS^3 m/z
II	254	236	194 177 98
		212	194 177 133 105 74
		194	
		159	133 131 129
		177	159 133 105
		133	
		105	
		74	
		208	
		VIII	226
191			
176	159 133 121		
159			
133			
121	93 91		
93			
74			

Para os produtos de degradação **II** e **VIII** correspondentes aos iões $[M+H]^+$ m/z 254 e m/z 226, respetivamente, foram atribuídas as mesmas estruturas propostas por Liu et al. (2009) apresentadas na Figura 23. A Figura 24 e a Figura 25 apresentam os esquemas de fragmentação propostos para estes dois compostos.

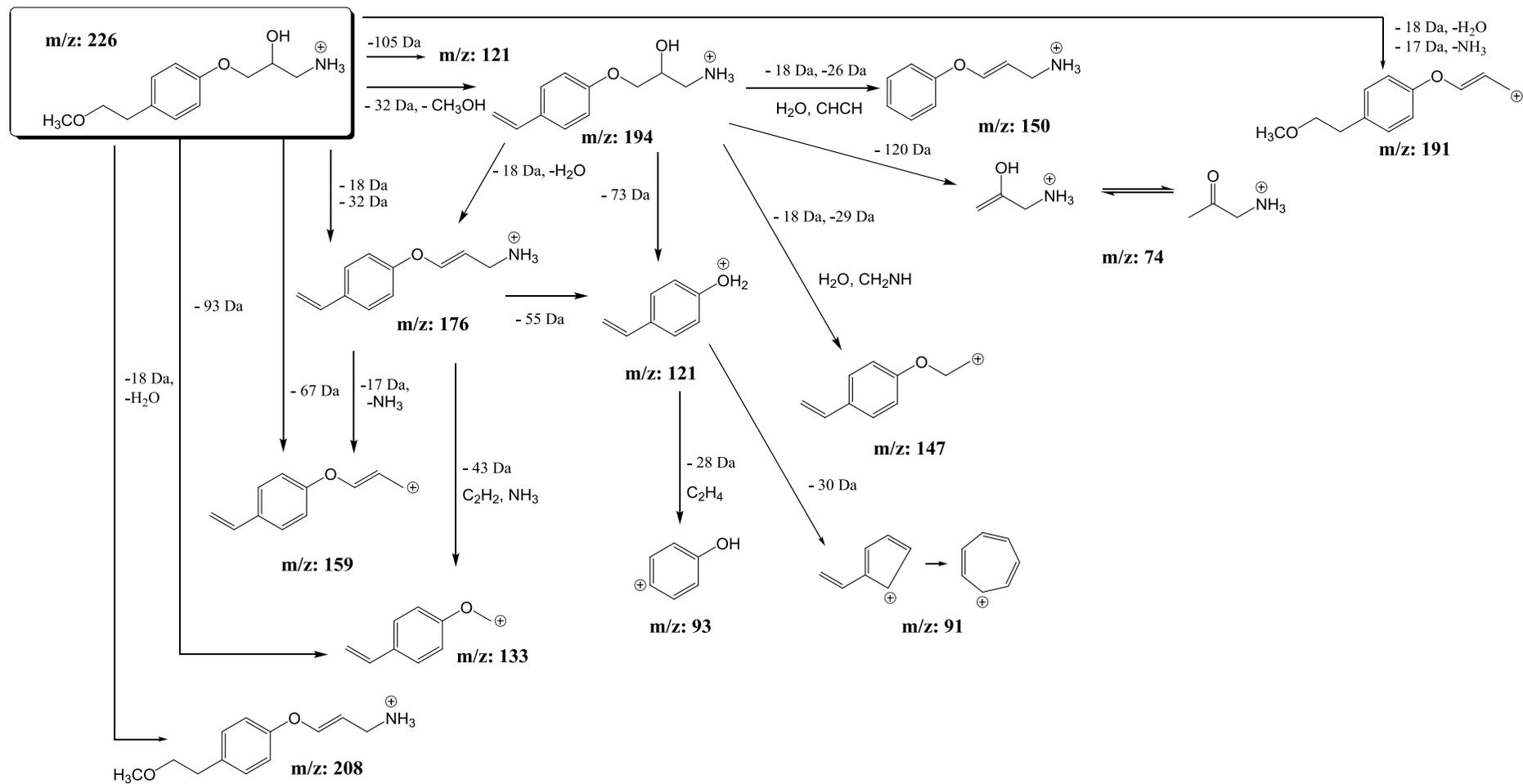


Figura 25 - Perfil de fragmentação proposto para o ião $[M+H]^+$ m/z 226 (composto VII)

Tal como referido anteriormente, no presente trabalho tentou-se ainda identificar os compostos **IV** e **I** correspondentes aos iões $[M+H]^+$ m/z 238 e m/z 282, respetivamente. A Tabela 9 apresenta os fragmentos desses produtos obtidos por HPLC-MSⁿ.

Tabela 9 - Perfil de fragmentação do ião $[M+H]^+$ m/z 238 e m/z 282

Composto	$[M+H]^+$ m/z	MS ² m/z	MS ³ m/z
IV	238	220	182
			178
			161
			133
			98
		196	178
			161
		178	133
			161
		161	105
149			
133	105		
	116		
105			
	98		
I	282	252	234
			210
			192
			175
			157
			133
			116
		98	
		240	
		205	175
159			
175	145		
	131		
145	157		
	147		
133	133		
	116		

As estruturas propostas para os compostos de degradação **IV** e **I** correspondentes aos iões $[M+H]^+$ m/z 238 e m/z 282, respetivamente, estão apresentadas nas Figura 26 e 27, juntamente com os respetivos esquemas de fragmentação.

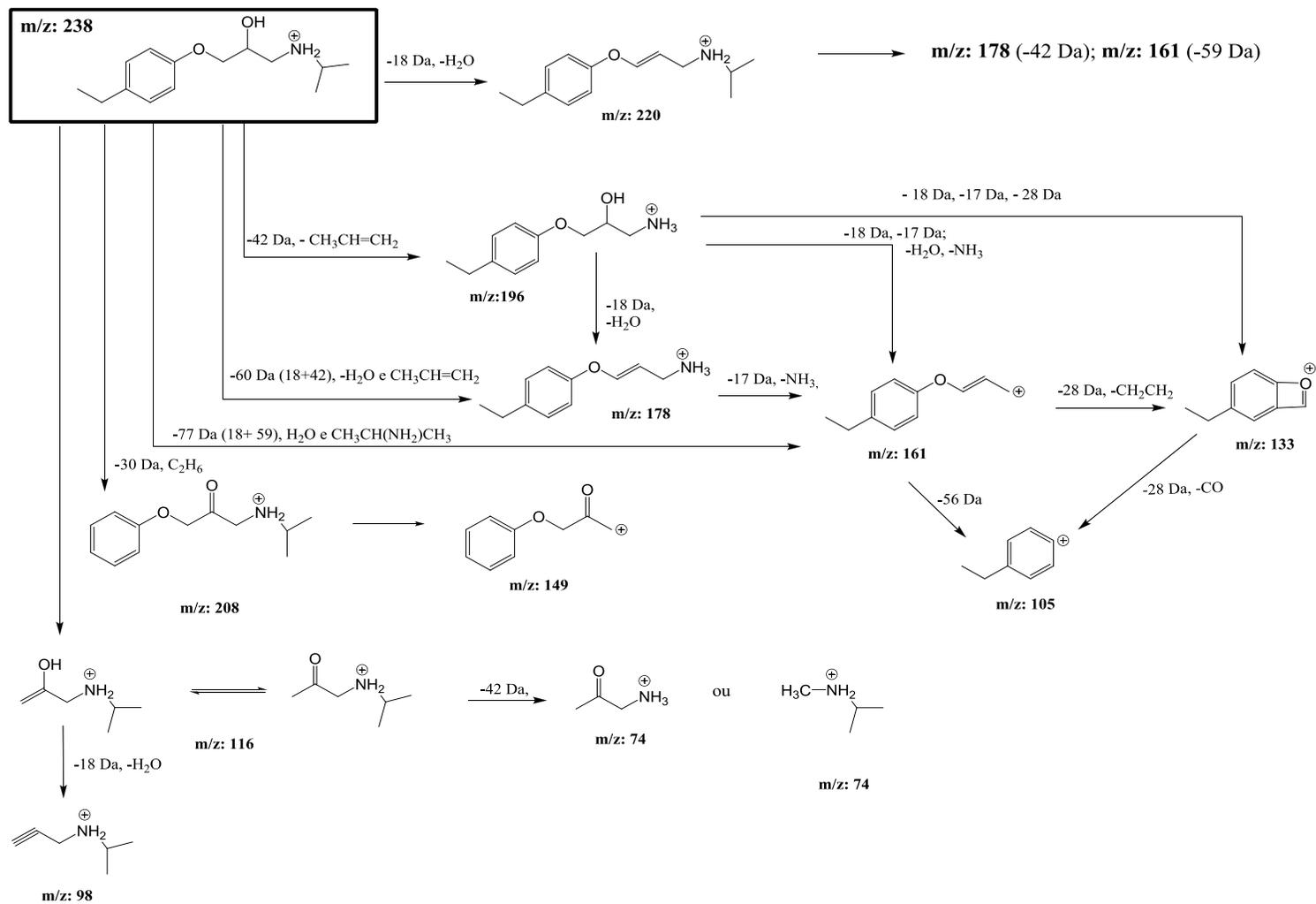


Figura 26 - Perfil de fragmentação proposto para o $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 238 (composto IV)

O composto correspondente ao m/z 238 (composto **IV**) já foi detetado e identificado por Borkar et al. (2012) como sendo um produto de degradação resultante da oxidação de metoprolol 1 g/L na presença de 15% H_2O_2 . Os autores estudaram a degradação durante 25 dias à temperatura ambiente por LC-QTOF-ESI-MS/MS e fizeram MS^n o que lhes permitiu obter o perfil de fragmentação para o composto. No entanto, os fragmentos obtidos e as vias de fragmentação são bastante diferentes do perfil de fragmentação e do esquema proposto neste trabalho. Šojić et al. (2012) detetaram também um composto com m/z 238, por LC-ESI-MS/MS, resultante da degradação de metoprolol 13,4 mg/L sob ação de radiação UV, na presença de O_3 e combinando radiação UV na presença de O_3 . No entanto, os autores apresentam uma estrutura diferente da proposta neste trabalho. Nesse trabalho os autores apenas fazem MS/MS e detetaram apenas os fragmentos m/z 196, 161, 149, 133 e 105. No entanto, os autores não atribuem estruturas a estes fragmentos nem apresentam vias de fragmentação e a estrutura proposta para o composto correspondente ao m/z 238 está representada na Figura 28A. Relativamente ao composto **I** correspondente ao m/z 282, este foi identificado também por Šojić et al. (2012) como sendo um produto da degradação de metoprolol 13,4 mg/L sob ação de radiação UV, na presença de O_3 e combinando radiação UV na presença de O_3 e está representado na Figura 28B. Como se referiu anteriormente, estes autores apenas fizeram MS/MS, detetaram os fragmentos m/z 205, 159, 145, 133 e 116 além de alguns outros, mas não lhes atribuíram quaisquer estruturas.

Nos trabalhos acima referidos (Borkar et al., 2012; Šojić et al., 2012), os compostos **II** e **VII**, também foram identificados como produtos de degradação do metoprolol nas condições acima referidas.

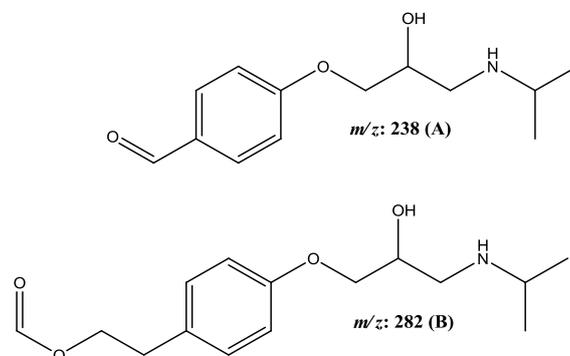


Figura 28 – Estruturas propostas por Šojić et al., 2012 para os fragmentos com m/z 238 (A) e m/z 282 (B)

3.2 Estudo do efeito da 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina sobre a fotodegradação do metoprolol

Como já foi referido anteriormente, as porfirinas conseguem produzir $^1\text{O}_2$ e, como se referiu no capítulo 3.1.1, o efeito fotossensibilizador dos ácidos fúlvicos do rio Vouga na fotodegradação do metoprolol ocorre essencialmente via produção de $^1\text{O}_2$. Por essa razão, no presente trabalho foi-se testar a 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina (H_2TPFPP) como fotossensibilizador para a fotodegradação do metoprolol, com vista a uma possível aplicação no tratamento de efluentes.

3.2.1 Cinética de fotodegradação do metoprolol (50 mg/L) na presença de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina (10 mg/L)

Num estudo preliminar, a cinética de fotodegradação do metoprolol na presença da H_2TPFPP foi estudada com tempos de irradiação entre as 0 e as 24 horas, tendo-se verificado que após 24 horas de irradiação a degradação do metoprolol era completa. Assim, procedeu-se ao estudo da cinética de fotodegradação utilizando tempos de irradiação mais curtos e no intervalo entre as 0 e as 12 horas. Simultaneamente foi efetuado um ensaio controlo (no escuro). A Figura 29 apresenta a variação da concentração normalizada (C/C_0) do metoprolol em função do tempo de irradiação na presença de H_2TPFPP 10 mg/L. A razão pela qual foi utilizada a concentração normalizada de metoprolol já se encontra referida anteriormente na secção 2.8.

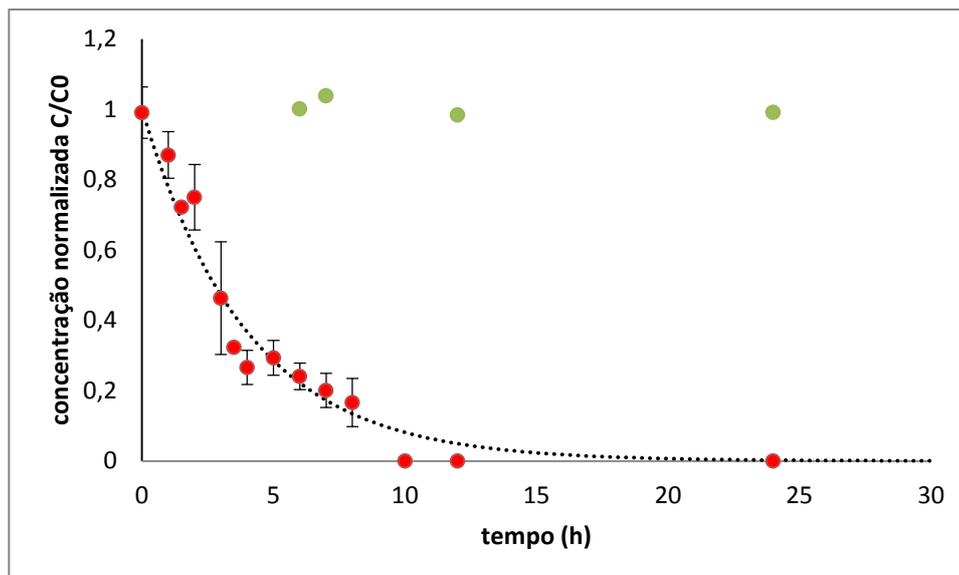


Figura 29 – Cinética da fotodegradação de uma solução de metoprolol 50 mg/L na presença de H₂TPFPP 10 mg/L. Valores médios de vários ensaios efectuados. A verde são os ensaios no escuro. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de pelo menos 3 ensaios. A curva a tracejado representa a equação 52 (cinética de pseudo-1^a ordem) ajustada aos dados experimentais

Ao analisar a Figura 29, verifica-se que, após 10 horas de irradiação, a concentração de metoprolol é inferior ao limite de detecção ($3,62 \pm 0,97$ mg/L; apresentado na secção 2.7), isto é, já não se consegue detetar no HPLC 1 o pico correspondente ao metoprolol. A partir da análise dos dados apresentados na Figura 29 calculou-se o valor médio da constante de velocidade para a fotodegradação do metoprolol na presença de H₂TPFPP que foi de $0,245 \pm 0,026$ h⁻¹ (95% de confiança) e o tempo de meia vida médio foi $2,83 \pm 0,31$ h (95% confiança) como foi descrito na secção 2.8. Comparando os valores da constante de velocidade e do tempo de meia vida obtidos na fotodegradação do metoprolol na presença de H₂TPFPP com os obtidos na presença de AF naturais (capítulo 3.1.1.) conclui-se que, para a mesma concentração de metoprolol (50 mg/L), na presença da H₂TPFPP o metoprolol é mais rapidamente fotodegradado do que na presença dos AF. Assim, o tempo de meia vida do metoprolol na presença de H₂TPFPP é cerca de 3 horas e na presença de AF é de cerca de 27 horas. Relativamente ao ensaio controlo (escuro) em que o tubo de quartzo que contém a mesma solução que foi irradiada, este está envolvido em papel de alumínio para evitar a radiação proveniente do Solarbox. Podemos assim concluir que não há qualquer degradação do metoprolol durante 24 horas, quando a solução está envolvida em papel de alumínio, uma vez que os desvios observado na concentração são aleatórios em relação ao valor inicial e são inferiores a 4%.

3.2.2 Produtos resultantes da fotodegradação do metoprolol na presença da 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina por HPLC

Os cromatogramas HPLC-UV das soluções de metoprolol 50 mg/L na presença de H₂TPFPP 10 mg/L apresentaram novos picos cromatográficos para além do metoprolol, que foram atribuídos a produtos resultantes da fotodegradação do metoprolol. A Figura 30A apresenta o cromatograma obtido para um tempo de irradiação de 3 horas. No cromatograma observa-se a presença de 4 novos picos resultantes da fotodegradação do metoprolol na presença de H₂TPFPP. Este estudo foi efetuado no HPLC 1.

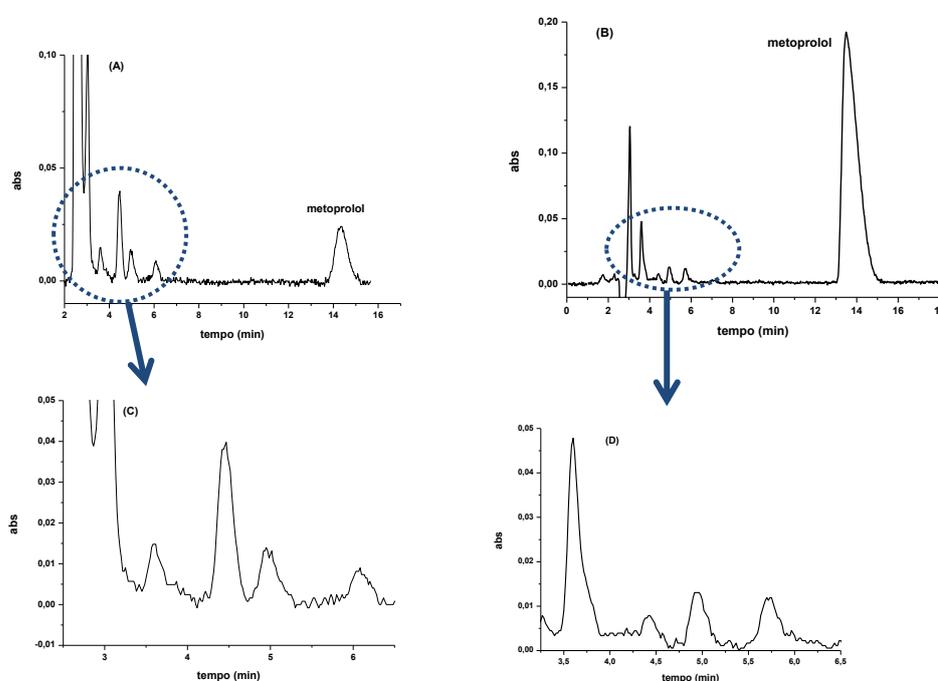
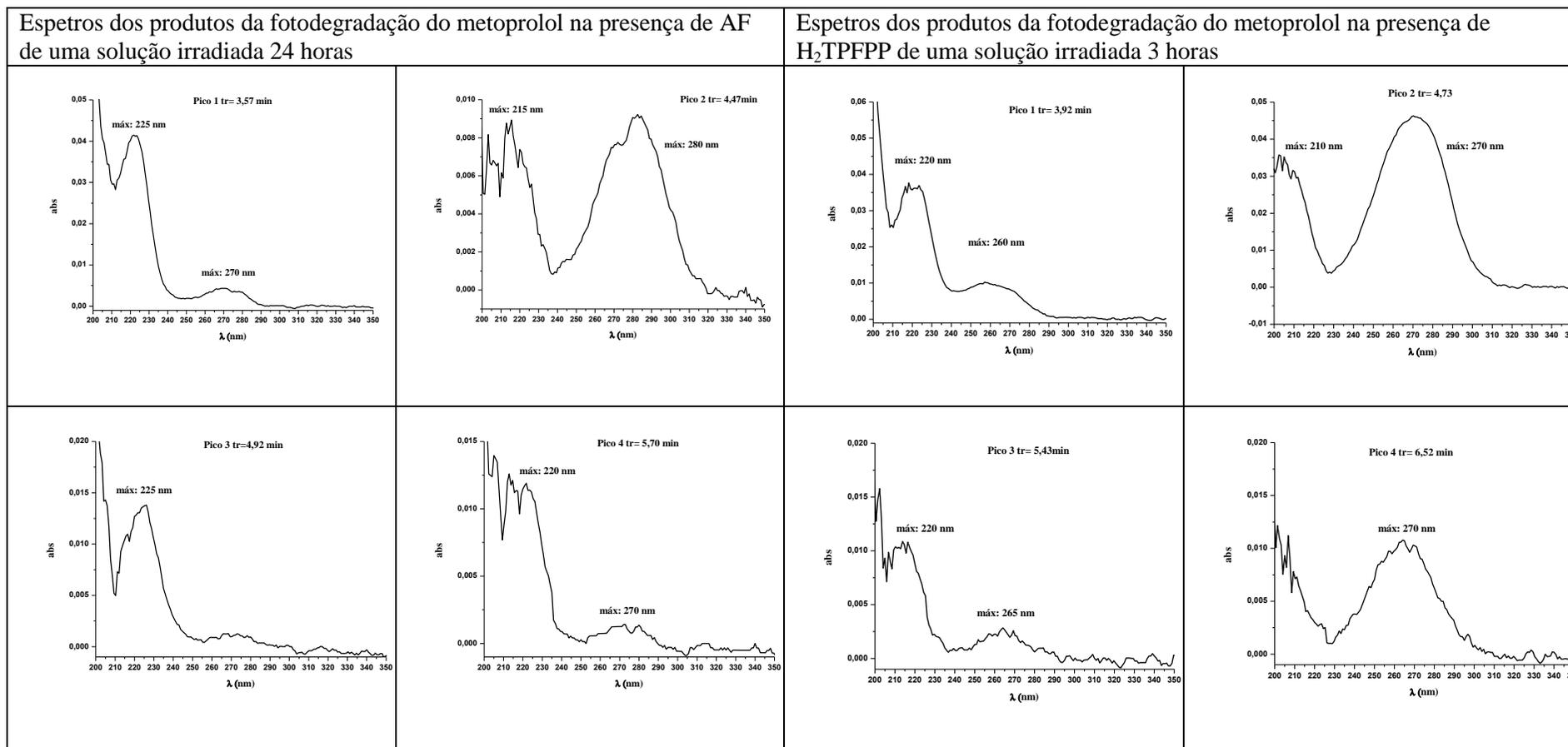


Figura 30 – (A) Cromatograma da solução de metoprolol 50 mg/L e H₂TPFPP 10 mg/L irradiada durante 3 horas e analisada no HPLC 1; (B) Cromatograma da solução de metoprolol 250 mg/L e AF 10 mg/L irradiada durante 24 horas e analisada no HPLC 1 (C) Ampliação do cromatograma A no intervalo de tempo 2,5-6,5 min (D) Ampliação do cromatograma B no intervalo de tempo 3,25-6,5 min

Se compararmos as Figura 30 A e C com as Figura 30 B e D referentes ao cromatograma da solução de metoprolol na presença de AF, apesar de concentrações de metoprolol diferentes (250 mg/L nas soluções com AF e 50 mg/L nas soluções com H₂TPFPP), verificamos que os cromatogramas apresentam quatro picos da fotodegradação do metoprolol com os mesmos tempos de retenção para os dois tipos de solução, ou seja, poderão estar a formar-se produtos idênticos. Dado que o HPLC 1 tem

um detetor com conjunto de díodos, é possível obter o espectro da solução correspondente a cada pico do cromatograma. Assim, para obter evidência adicional de que os produtos formados são os mesmos, na presença de AF e de H₂TPFPP, compararam-se os espectros correspondentes a cada pico dos cromatogramas. Essa comparação está apresentada na Tabela 10.

Tabela 10 – Espectros dos produtos da fotodegradação do metoprolol na presença de AF e da H₂TPFPP



Ao analisar a Tabela 10, os espectros obtidos dos produtos da fotodegradação do metoprolol na presença de AF são muito semelhantes aos obtidos na presença da H₂TPFPP. Os espectros do produto do pico 2 apresentam máximos mais intensos na presença de H₂TPFPP do que na presença de AF, logo estarão a absorver mais nesse comprimento de onda; este pico também corresponde ao pico com uma área maior no cromatograma da Figura 30A. O pico do produto 4, na presença de H₂TPFPP apresenta também um máximo aos 270 nm e na presença dos AF esse máximo é pouco intenso. Pode-se assim concluir que poderão estar a formar-se os mesmos produtos, quer na presença de AF, quer na presença de H₂TPFPP.

3.2.3 Estudo do comportamento da 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil) porfirina na presença/ausência de metoprolol

Quando os tubos de quartzo eram retirados do SolarBox, notou-se que, dependendo do tempo de irradiação a solução perdia a sua cor rosada, característica da porfirina. Por isso decidiu-se registar, além dos cromatogramas, os espetros UV-Vis das soluções irradiadas para verificar se haveria alguma alteração da porfirina na presença do metoprolol, nomeadamente, se esta se estaria a degradar.

A Figura 31 mostra os espetros UV-Vis das soluções de metoprolol 50 mg/L na presença de H₂TPFPP 10 mg/L após irradiação. No espectro inicial da solução observam-se as bandas típicas da porfirina a 520 nm e a 420 nm e uma pequena banda a 275 nm devida ao metoprolol (espectro do tempo de 0 horas).

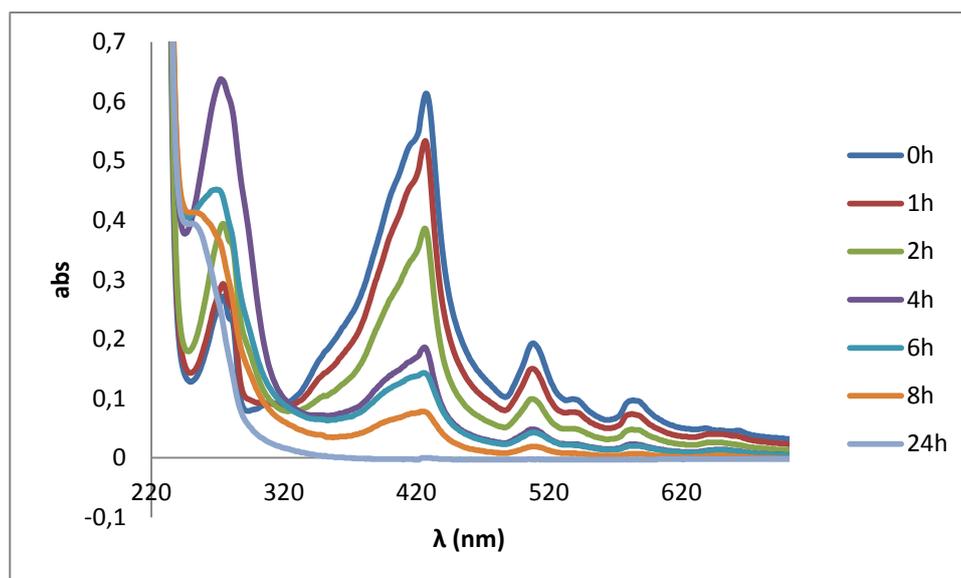


Figura 31 – Espectro UV-Vis para uma solução de metoprolol 50 mg/L na presença de H₂TPFPP ao longo do tempo depois de irradiada

Com a análise da Figura 31, observa-se que as bandas características da porfirina vão desaparecendo ao longo do tempo, o que poderá indicar que a porfirina está também a ser fotodegradada. Observa-se também que a banda do metoprolol (~274 nm) aumenta até às 4 h de irradiação, o que poderá indicar a formação de produtos da sua fotodegradação que poderão absorver radiação próximo do comprimento de onda do metoprolol, principalmente o produto 2 que tem uma banda de absorção grande a 280 nm. A banda de absorção próxima dos 420 nm pertencente à porfirina começa logo a desaparecer após a primeira hora de irradiação, o que indica que poderá estar a ser fotodegradada. Após 4 horas de irradiação, a banda próxima dos 274 nm começa também a desaparecer, o que significa que para além da degradação do metoprolol, os seus produtos de degradação também podem estar a ser fotodegradados, podem também estar a absorver a outro comprimento de onda ou a dar origem a produtos que absorvem a menor comprimento de onda. Com o tempo de 24 h de irradiação, o espectro não apresenta quaisquer bandas características da porfirina ou do metoprolol, apresentando uma banda por volta dos 300 nm. Estes resultados sugerem que a porfirina se degrada em solução aquosa sob a acção da luz solar simulada na SolarBox na presença de metoprolol.

Assim, decidiu-se estudar o comportamento da H₂TPFPP na presença e na ausência de metoprolol sem irradiação com o objetivo de verificar se o metoprolol tem

algum efeito no espectro da porfirina em solução, também se preparou uma solução de H₂TPFPP sozinha e foi sujeita a radiação para ver se ela se fotodegradava.

Com o objetivo de verificar se ocorriam alterações no espectro da porfirina na presença do metoprolol, foram preparadas soluções contendo metoprolol 50 mg/L e porfirina 10 mg/L, envolvidas em papel de alumínio e guardadas no escuro, e os seus espectros UV-Vis foram registados durante 24 horas. Simultaneamente foram registados os espectros UV-Vis da solução de porfirina preparada nas mesmas condições mas sem metoprolol. A Figura 32 apresenta os espectros UV-Vis registados para a solução de metoprolol 50 mg/L na presença de porfirina 10 mg/L sem irradiação.

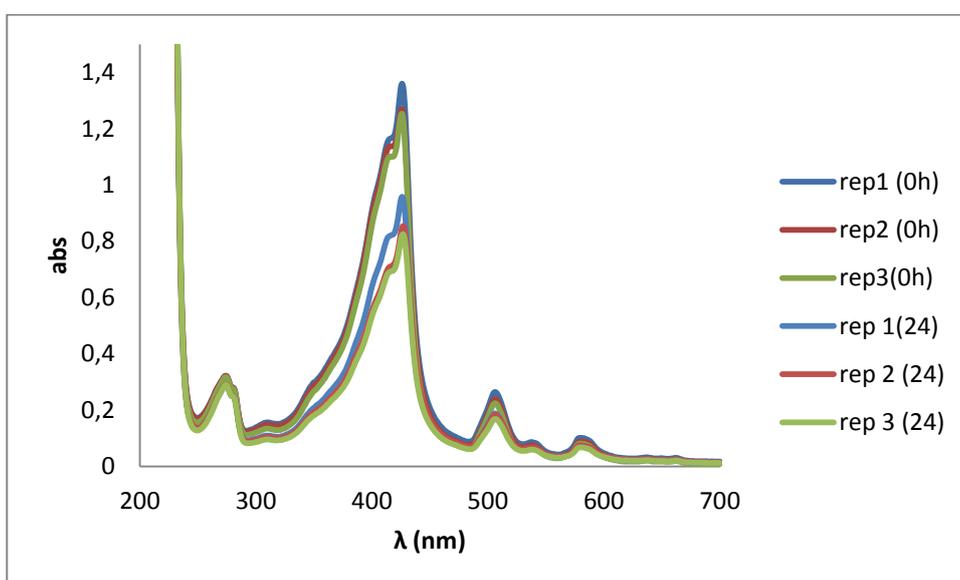


Figura 32 – Espectro UV-Vis para metoprolol 50 mg/L na presença de H₂TPFPP 10 mg/L no escuro

A Figura 33 apresenta os espectros UV-Vis registados para solução de porfirina de 10 mg/L sem irradiação no escuro.

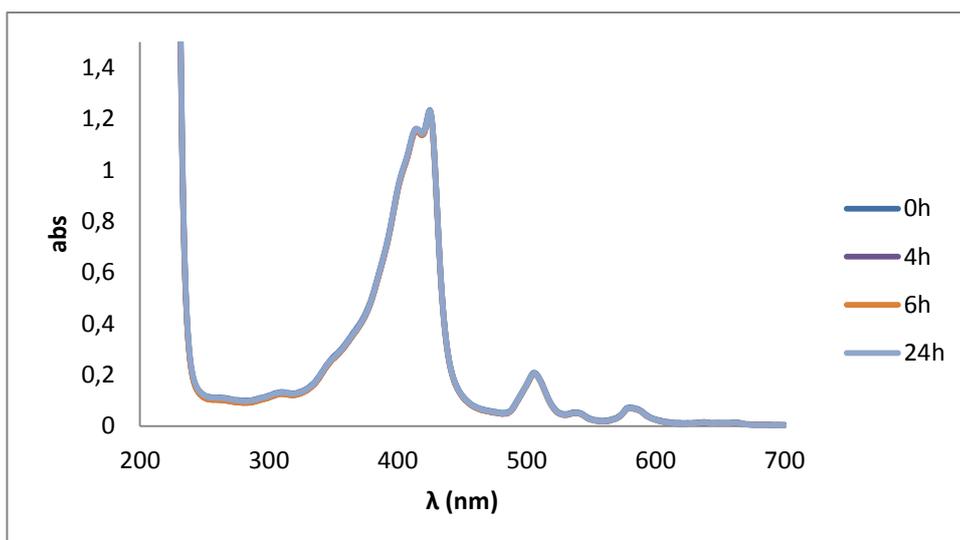


Figura 33 – Espectro UV-Vis da porfirina H₂TPFFPP no escuro

Na análise da Figura 32 observa-se que na presença do metoprolol o espectro da porfirina vai-se alterando ao longo do tempo, o que não acontece quando a porfirina está sozinha em solução aquosa em que o espectro (Figura 33) se mantém inalterado ao longo das 24 horas que esteve guardada no escuro, logo ela é estável quando está sozinha. Para o tempo de 24 horas, na Figura 32, a absorvância da porfirina na zona dos 423-500 nm diminui cerca de 30%, o que não acontece na zona dos 273 nm que corresponde à zona do metoprolol. Este facto poderá indicar a ocorrência de alguma interação entre a porfirina e o metoprolol que leva a uma diminuição da absorvância da porfirina, a porfirina poderá estar a formar agregados com o metoprolol. Para confirmar que não havia mesmo nenhuma degradação do metoprolol, a solução foi injetada no HPLC 1 dando origem ao cromatograma apresentado na Figura 34. Da análise da figura observa-se que na solução de metoprolol 50 mg/L e H₂TPFFPP 10 mg/L, guardada 3 horas no escuro e sem irradiação, não há qualquer indício da formação de produtos da degradação do metoprolol. Além disso, a área correspondente ao pico do metoprolol corresponde exatamente à concentração inicial de 50 mg/L.

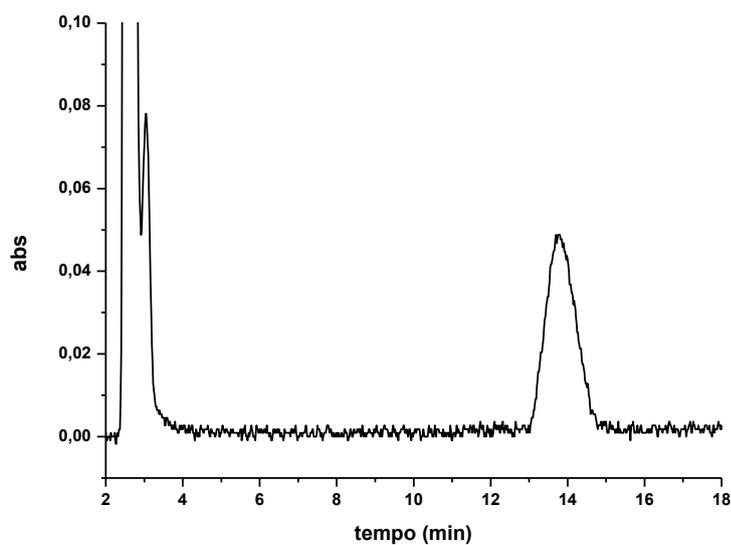


Figura 34 - Cromatograma de uma solução de metoprolol 50 mg/L e H₂TPFPP 10 mg/L guardada 3 horas no escuro

O estudo da solução de H₂TPFPP 10 mg/L ao longo do tempo quando irradiada deu origem ao conjunto de espectros que estão representados na Figura 35.

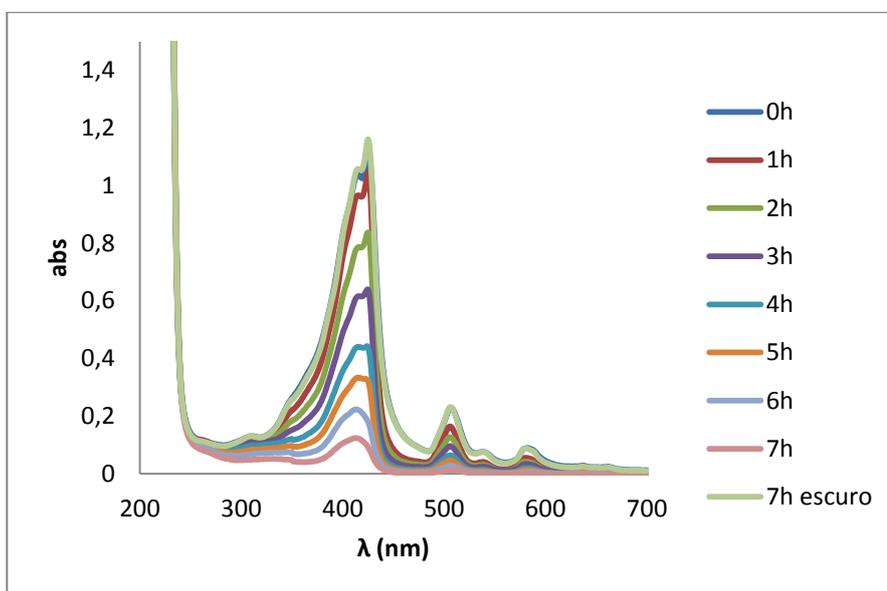


Figura 35 - Espectro UV-Vis da porfirina H₂TPFPP na ausência de metoprolol quando irradiada

Com a observação da Figura 35, conclui-se que existe uma alteração do espectro UV-Vis da H₂TPFPP ao longo do tempo, o que poderá indicar que existe degradação da porfirina. Ao final de 7 horas de irradiação, já praticamente não se observa porfirina no espectro UV-Vis, o que está de acordo com a Figura 31, onde também se observa o mesmo tipo de alteração do espectro UV-Vis da porfirina na presença de metoprolol quando a solução é irradiada. Convém também lembrar que, apesar de os espectros de UV-Vis evidenciarem a ocorrência de degradação da porfirina ao longo da irradiação, o seu efeito na fotodegradação do metoprolol é notório, como se demonstrou em 3.2.1.

Estudos futuros terão que ser realizados a fim de verificar que tipo de interação ocorre entre a porfirina e o metoprolol no escuro e para verificar se, sob a acção da luz, a porfirina dá origem a produtos da sua degradação que não estão a ser observados no HPLC.

4. Conclusão e perspectivas futuras

No que diz respeito à fotodegradação do metoprolol na presença de ácidos fúlvicos, verificou-se que, após 72 horas de irradiação, a taxa de degradação do metoprolol foi de 84%. A degradação do metoprolol na presença de AF segue uma cinética de pseudo-primeira ordem, tendo-se obtido um valor da constante de velocidade de $2,61 \times 10^{-2} \pm 0,27 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ e o tempo de meia vida de $26,8 \pm 2,8 \text{ h}$. Os valores obtidos neste trabalho confirmam os obtidos num trabalho anteriormente realizado (Gonçalves, 2012). Os cromatogramas das soluções irradiadas evidenciaram a presença de vários picos além do metoprolol, o que significa a formação de novos produtos resultantes da degradação do metoprolol. Assim, na presença de AF foi possível identificar vários produtos de degradação, tendo-se verificado que alguns dos produtos se mantinham durante 24 horas (tempo de irradiação máximo estudado) enquanto que outros produtos diminuía e, por isso, seriam produtos intermediários. Foi possível por HPLC-MS/MSⁿ identificar 4 produtos e estabelecer o seu perfil de fragmentação: iões $[M+H]^+$ m/z 226, 254, 238 e 282. Os iões m/z 226 e 254 já haviam sido identificados em estudos efetuados na presença de AF. Por sua vez os iões m/z 238 e 282, apesar de já terem sido identificados em estudos de degradação do metoprolol em outras condições, foram pela primeira vez identificados como produtos resultantes da degradação do metoprolol na presença de AF naturais.

No que diz respeito à fotodegradação do metoprolol na presença da H₂TPFPP, verificou-se que a concentração de metoprolol era inferior ao LD, logo a partir das 10 h de irradiação não se conseguiu detetar o pico correspondente ao metoprolol. Este valor é muito superior quando comparado com o valor obtido usando os ácidos fúlvicos. A degradação do metoprolol segue uma cinética de pseudo-primeira ordem, tendo-se obtido um valor $0,243 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$ para a constante de velocidade e um tempo meia vida de $2,94 \pm 0,51 \text{ h}$. Ao comparar os espectros dos produtos da fotodegradação do metoprolol na presença de AF e na presença de H₂TPFPP, eles são bastante semelhantes, havendo pequenas diferenças nas intensidades das bandas de absorção dos diferentes espectros.

Ao que tudo indica, a H₂TPFPP também deve de ser fotodegrada juntamente com o metoprolol; no entanto, a H₂TPFPP, na presença de metoprolol, sem irradiação, sofre alterações no espectro UV-Vis, logo esta deve interagir com o metoprolol.

Em perspectivas futuras, convém analisar os restantes produtos da fotodegradação do metoprolol na presença de ácidos fúlvicos, além de se proporem as vias de fragmentações para os produtos que faltam. No caso da porfirina, convém saber que tipo de interação existe entre ela e o metoprolol. Quanto aos produtos de

fotodegradação do metoprolol na presença da H₂TPFPP, convém também analisa-los e compara-los com os obtidos na presença dos AF para se saber se estão a originar produtos novos ou não.

5. Bibliografia

- ABRAMOVIĆ, B., KLER, S., ŠOJIĆ, D., LAUŠEVIĆ, M., RADOVIĆ, T. & VIONE, D. 2011. Photocatalytic degradation of metoprolol tartrate in suspensions of two TiO₂-based photocatalysts with different surface area. Identification of intermediates and proposal of degradation pathways. *Journal of Hazardous Materials*, 198, 123-132.
- AL AUKIDY, M., VERLICCHI, P., JELIC, A., PETROVIC, M. & BARCELÒ, D. 2012. Monitoring release of pharmaceutical compounds: Occurrence and environmental risk assessment of two WWTP effluents and their receiving bodies in the Po Valley, Italy. *Science of The Total Environment*, 438, 15-25.
- ALDER, A. C., SCHAFFNER, C., MAJEWSKY, M., KLASMEIER, J. & FENNER, K. 2010. Fate of β -blocker human pharmaceuticals in surface water: Comparison of measured and simulated concentrations in the Glatt Valley Watershed, Switzerland. *Water Research*, 44, 936-948.
- ANDREOZZI, R., RAFFAELE, M. & NICKLAS, P. 2003. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, 50, 1319-1330.
- BENNER, J. & TERNES, T. A. 2009. Ozonation of Metoprolol: Elucidation of Oxidation Pathways and Major Oxidation Products. *Environmental Science & Technology*, 43, 5472-5480.
- BORALLI, V. B., COELHO, E. B. & LANCHOTE, V. L. 2009. Influence of quinidine, cimetidine, and ketoconazole on the enantioselective pharmacokinetics and metabolism of metoprolol in rats. *Chirality*, 21, 886-893.
- BORKAR, R. M., RAJU, B., SRINIVAS, R., PATEL, P. & SHETTY, S. K. 2012. Identification and characterization of stressed degradation products of metoprolol using LC/Q-TOF-ESI-MS/MS and MSn experiments. *Biomedical Chromatography*, 26, 720-736.
- CARBALLA, M., OMIL, F., LEMA, J. M., LLOMPART, M. A., GARCÍA-JARES, C., RODRÍGUEZ, I., GÓMEZ, M. & TERNES, T. 2004. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Research*, 38, 2918-2926.
- CARLOS, L., MÁRTIRE, D. O., GONZALEZ, M. C., GOMIS, J., BERNABEU, A., AMAT, A. M. & ARQUES, A. 2012. Photochemical fate of a mixture of emerging pollutants in the presence of humic substances. *Water Research*, 46, 4732-4740.
- CHEN, Y., LI, H., WANG, Z., LI, H., TAO, T. & ZUO, Y. 2012a. Photodegradation of selected β -blockers in aqueous fulvic acid solutions: Kinetics, mechanism, and product analysis. *Water Research*, 46, 2965-2972.
- CHEN, Y., LI, H., WANG, Z., TAO, T., WEI, D. & HU, C. 2012b. Photolysis of Chlortetracycline in aqueous solution: Kinetics, toxicity and products. *Journal of Environmental Sciences*, 24, 254-260.
- DEBLONDE, T., COSSU-LEGUILLE, C. & HARTEMANN, P. 2011. Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214, 442-448.
- DENG, Y. 2007. Physical and oxidative removal of organics during Fenton treatment of mature municipal landfill leachate. *Journal of Hazardous Materials*, 146, 334-340.
- DEROSA, M. C. & CRUTCHLEY, R. J. 2002. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 233-234, 351-371.
- ERGAIEG, K. & SEUX, R. 2009. A comparative study of the photoinactivation of bacteria by meso-substituted cationic porphyrin, rose Bengal and methylene blue. *Desalination*, 246, 353-362.
- FATTA-KASSINOS, D., VASQUEZ, M. I. & KÜMMERER, K. 2011. Transformation products of pharmaceuticals in surface waters and wastewater formed during photolysis and advanced oxidation processes – Degradation, elucidation of byproducts and assessment of their biological potency. *Chemosphere*, 85, 693-709.
- FENT, K., WESTON, A. A. & CAMINADA, D. 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76, 122-159.
- GOLDSTONE, J. V., PULLIN, M. J., BERTILSSON, S. & VOELKER, B. M. 2002. Reactions of Hydroxyl Radical with Humic Substances: Bleaching, Mineralization, and Production of Bioavailable Carbon Substrates. *Environmental Science & Technology*, 36, 364-372.

- GONÇALVES, E. A. C. 2012. Efeito de ácidos fúlvicos e nitrato na fotodegradação do metoprolol. *Universidade de Aveiro*, 1-77.
- GUERARD, J., MILLER, P., TROUTS, T. & CHIN, Y.-P. 2009. The role of fulvic acid composition in the photosensitized degradation of aquatic contaminants. *Aquatic Sciences*, 71, 160-169.
- HARRACH, G., VALICSEK, Z. & HORVÁTH, O. 2011. Water-soluble silver(II) and gold(III) porphyrins: The effect of structural distortion on the photophysical and photochemical behavior. *Inorganic Chemistry Communications*, 14, 1756-1761.
- HAVERS, N., BURBA, P., LAMBERT, J. & KLOCKOW, D. 1998. Spectroscopic Characterization of Humic-Like Substances in Airborne Particulate Matter. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 29, 45-54.
- HEDGES, J. I. & OADES, J. M. 1997. Comparative organic geochemistries of soils and marine sediments. *Organic Geochemistry*, 27, 319-361.
- HOMEM, V. & SANTOS, L. 2011. Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices – A review. *Journal of Environmental Management*, 92, 2304-2347.
- HUGGETT, D. B., KHAN, I. A., FORAN, C. M. & SCHLENK, D. 2003. Determination of beta-adrenergic receptor blocking pharmaceuticals in united states wastewater effluent. *Environmental Pollution*, 121, 199-205.
- ISARAIN-CHÁVEZ, E., RODRÍGUEZ, R. M., CABOT, P. L., CENTELLAS, F., ARIAS, C., GARRIDO, J. A. & BRILLAS, E. 2011. Degradation of pharmaceutical beta-blockers by electrochemical advanced oxidation processes using a flow plant with a solar compound parabolic collector. *Water Research*, 45, 4119-4130.
- JIN, S. K., CHUNG, H. J., CHUNG, M. W., KIM, J. I., KANG, J. H., WOO, S. W., BANG, S., LEE, S. H., LEE, H. J. & ROH, J. 2008. Influence of CYP2D6*10 on the pharmacokinetics of metoprolol in healthy Korean volunteers. *Journal Of Clinical Pharmacy And Therapeutics*, 33, 567-573.
- KIM, I. H., TANAKA, H., IWASAKI, T., TAKUBO, T., MORIOKA, T. & KATO, Y. 2008. Classification of the degradability of 30 pharmaceuticals in water with ozone, UV and H₂O₂. *Water Science & Technology*, 57, 195-200.
- LI, W., NANABOINA, V., ZHOU, Q. & KORSHIN, G. V. 2012. Effects of Fenton treatment on the properties of effluent organic matter and their relationships with the degradation of pharmaceuticals and personal care products. *Water Research*, 46, 403-412.
- LIN, A. Y.-C., YU, T.-H. & LATEEF, S. K. 2009. Removal of pharmaceuticals in secondary wastewater treatment processes in Taiwan. *Journal of Hazardous Materials*, 167, 1163-1169.
- LIU, Q.-T., CUMMING, R. I. & SHARPE, A. D. 2009. Photo-induced environmental depletion processes of [small beta]-blockers in river waters. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 8, 768-777.
- LIU, Q.-T. & WILLIAMS, H. E. 2006. Kinetics and Degradation Products for Direct Photolysis of β -Blockers in Water. *Environmental Science & Technology*, 41, 803-810.
- MADUREIRA, T. V., ROCHA, M. J., CRUZEIRO, C., GALANTE, M. H., MONTEIRO, R. A. F. & ROCHA, E. 2011. The toxicity potential of pharmaceuticals found in the Douro River estuary (Portugal): Assessing impacts on gonadal maturation with a histopathological and stereological study of zebrafish ovary and testis after sub-acute exposures. *Aquatic Toxicology*, 105, 292-299.
- MAGARIO, I., GARCÍA EINSCHLAG, F. S., RUEDA, E. H., ZYGADLO, J. & FERREIRA, M. L. 2012. Mechanisms of radical generation in the removal of phenol derivatives and pigments using different Fe-based catalytic systems. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 352, 1-20.
- MAURER, M., ESCHER, B. I., RICHLE, P., SCHAFFNER, C. & ALDER, A. C. 2007. Elimination of β -blockers in sewage treatment plants. *Water Research*, 41, 1614-1622.
- NARVAEZ V., J. F. & JIMENEZ C., C. 2012. PHARMACEUTICAL PRODUCTS IN THE ENVIRONMENT: SOURCES, EFFECTS AND RISKS. *Vitae*, 19, 93-108.

- OOSTERHUIS, M., SACHER, F. & TER LAAK, T. L. 2013. Prediction of concentration levels of metformin and other high consumption pharmaceuticals in wastewater and regional surface water based on sales data. *Science of The Total Environment*, 442, 380-388.
- PARRILLA VÁZQUEZ, M. M., PARRILLA VÁZQUEZ, P., MARTÍNEZ GALERA, M., GIL GARCÍA, M. D. & UCLÉS, A. 2013. Ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled with liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry for simultaneous analysis of pharmaceuticals in wastewaters. *Journal of Chromatography A*, 1291, 19-26.
- PAUL, A., HACKBARTH, S., VOGT, R. D., RODER, B., BURNISON, B. K. & STEINBERG, C. E. W. 2004. Photogeneration of singlet oxygen by humic substances: comparison of humic substances of aquatic and terrestrial origin. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 3, 273-280.
- PIRAM, A., SALVADOR, A., VERNE, C., HERBRETEAU, B. & FAURE, R. 2008. Photolysis of β -blockers in environmental waters. *Chemosphere*, 73, 1265-1271.
- POIRIER, L. & LACOURCIÈRE, Y. 2012. The Evolving Role of β -Adrenergic Receptor Blockers in Managing Hypertension. *Canadian Journal of Cardiology*, 28, 334-340.
- RICHARD, C., COELHO, C., GUYOT, G., SHALOIKO, L., TRUBETSKOJ, O. & TRUBETSKAYA, O. 2011. Fluorescence properties of the 5 kDa molecular size fractions of a soil humic acid. *Geoderma*, 163, 24-29.
- RIML, J., WÖRMAN, A., KUNKEL, U. & RADKE, M. 2013. Evaluating the fate of six common pharmaceuticals using a reactive transport model: Insights from a stream tracer test. *Science of The Total Environment*, 458-460, 344-354.
- RIVAS, F. J., GIMENO, O., BORRALHO, T. & CARBAJO, M. 2010. UV-C radiation based methods for aqueous metoprolol elimination. *Journal of Hazardous Materials*, 179, 357-362.
- ROSI-MARSHALL, E. & ROYER, T. 2012. Pharmaceutical Compounds and Ecosystem Function: An Emerging Research Challenge for Aquatic Ecologists. *Ecosystems*, 15, 867-880.
- SANTOS, E. B. H. & DUARTE, A. C. 1998. The influence of pulp and paper mill effluents on the composition of the humic fraction of aquatic organic matter. *Water Research*, 32, 597-608.
- SANTOS, L. H. M. L. M., ARAÚJO, A. N., FACHINI, A., PENA, A., DELERUE-MATOS, C. & MONTENEGRO, M. C. B. S. M. 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 175, 45-95.
- SARAFRAZ-YAZDI, A., ABEDI, M. R. & ES'HAGHI, Z. 2012. Pre-concentration and determination of β -blockers using carbon nanotube-assisted pseudo-stirbar hollow fibers solid-/liquid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 36, 750-769.
- ŠĆEPANOVIĆ, M., ABRAMOVIĆ, B., GOLUBOVIĆ, A., KLER, S., GRUJIĆ-BROJČIN, M., DOHČEVIĆ-MITROVIĆ, Z., BABIĆ, B., MATOVIĆ, B. & POPOVIĆ, Z. 2012. Photocatalytic degradation of metoprolol in water suspension of TiO_2 nanopowders prepared using sol-gel route. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 61, 390-402.
- SCHEURER, M., RAMIL, M., METCALFE, C. D., GROH, S. & TERNES, T. A. 2010. The challenge of analyzing beta-blocker drugs in sludge and wastewater. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 845-856.
- SIRÉS, I., OTURAN, N. & OTURAN, M. A. 2010. Electrochemical degradation of β -blockers. Studies on single and multicomponent synthetic aqueous solutions. *Water Research*, 44, 3109-3120.
- ŠOJIĆ, D., DESPOTOVIĆ, V., ORČIĆ, D., SZABÓ, E., ARANY, E., ARMAKOVIĆ, S., ILLÉS, E., GAJDA-SCHRANTZ, K., DOMBI, A., ALAPI, T., SAJBEN-NAGY, E., PALÁGYI, A., VÁGVÖLGYI, C., MANCZINGER, L., BJELICA, L. & ABRAMOVIĆ, B. 2012. Degradation of thiamethoxam and metoprolol by UV, O₃ and

- UV/O₃ hybrid processes: Kinetics, degradation intermediates and toxicity. *Journal of Hydrology*, 472–473, 314-327.
- TERNES, T. A. 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*, 32, 3245-3260.
- TONG, A., BRAUND, R., WARREN, D. & PEAKE, B. 2012. TiO₂-assisted photodegradation of pharmaceuticals — a review. *Central European Journal of Chemistry*, 10, 989-1027.
- VALICSEK, Z., HORVÁTH, O. & PATONAY, K. 2011. Formation, photophysical and photochemical properties of water-soluble bismuth(III) porphyrins: The role of the charge and structure. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 226, 23-35.
- VAN DER AA, N., KOMMER, G. J., VAN MONTFOORT, J. E. & VERSTEEGH, J. F. M. 2011. Demographic projections of future pharmaceutical consumption in the Netherlands. *Water Science and Technology*, 63, 825-831.
- VAUGHAN, P. P. & BLOUGH, N. V. 1998. Photochemical Formation of Hydroxyl Radical by Constituents of Natural Waters. *Environmental Science & Technology*, 32, 2947-2953.
- VERLICCHI, P., AL AUKIDY, M. & ZAMBELLO, E. 2012. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review. *Science of The Total Environment*, 429, 123-155.
- VIENO, N. M., TUHKANEN, T. & KRONBERG, L. 2006. Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 1134, 101-111.
- WANG, C., LI, J., MELE, G., YANG, G.-M., ZHANG, F.-X., PALMISANO, L. & VASAPOLLO, G. 2007. Efficient degradation of 4-nitrophenol by using functionalized porphyrin-TiO₂ photocatalysts under visible irradiation. *Applied Catalysis B: Environmental*, 76, 218-226.
- WANG, L., XU, H., COOPER, W. J. & SONG, W. 2012. Photochemical fate of beta-blockers in NOM enriched waters. *Science of The Total Environment*, 426, 289-295.
- WICK, A., FINK, G., JOSS, A., SIEGRIST, H. & TERNES, T. A. 2009. Fate of beta blockers and psycho-active drugs in conventional wastewater treatment. *Water Research*, 43, 1060-1074.
- ZENG, C., JI, Y., ZHOU, L., ZHANG, Y. & YANG, X. 2012. The role of dissolved organic matters in the aquatic photodegradation of atenolol. *Journal of Hazardous Materials*, 239–240, 340-347.
- ZHAN, M., YANG, X., XIAN, Q. & KONG, L. 2006. Photosensitized degradation of bisphenol A involving reactive oxygen species in the presence of humic substances. *Chemosphere*, 63, 378-386.
- ZHANG, J., ZHANG, L., LI, X., KANG, S.-Z. & MU, J. 2011. Visible Light Photocatalytic Activity of Porphyrin Tin(IV) Sensitized TiO₂ Nanoparticles for the Degradation of 4-Nitrophenol and Methyl Orange. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 32, 943-947.
- ZHOU, S.-F. 2009. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I. *Clinical Pharmacokinetics*, 48, 689-723.