



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDO DO PROCESSO FENTON NA REMOÇÃO DE
DIGOXINA E REDUÇÃO DA TOXICIDADE

FÁBIO AUGUSTO GUBIANI

Toledo – PR, 2019



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO DO PROCESSO FENTON NA REMOÇÃO DE
DIGOXINA E REDUÇÃO DA TOXICIDADE**

FÁBIO AUGUSTO GUBIANI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste/Campus Toledo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Química.

Orientador: Fernando Rodolfo Espinoza Quiñones

Co-orientadora: Aline Roberta de Pauli

Toledo – PR, 2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Gubiani, Fábio Augusto

ESTUDO DO PROCESSO FENTON NA REMOÇÃO DE DIGOXINA E
REDUÇÃO DA TOXICIDADE / Fábio Augusto Gubiani;
orientador(a), Fernando Rodolfo Espinoza Quiñones;
coorientador(a), Aline Roberta de Pauli, 2019.

87 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste
do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e
Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2019.

1. Digoxina. 2. Fenton. 3. Toxicidade. I. Quiñones,
Fernando Rodolfo Espinoza. II. Pauli, Aline Roberta de.
III. Título.

FÁBIO AUGUSTO GUBIANI

Estudo do processo Fenton na remoção de digoxina e redução da toxicidade

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química, linha de pesquisa Química Analítica e Ambiental (QAA), APROVADO pela seguinte banca examinadora:



Orientador – Prof. Dr. Fernando Rodolfo Espinoza Quiñones



Profa. Dra. Ana Paula de Oliveira



Prof. Dr. Douglas Cardoso Dragunski

Toledo, 25 de março de 2019.

Agradecimentos

A meus pais, Marcos e Maria, pelo incentivo, ajuda e compreensão nesta etapa de minha vida.

A minha irmã, Ana, e afilhada, Luiza, pelo apoio e alegria durante todas as horas.

A minha noiva, Fernanda, pelo carinho, compreensão e cumplicidade demonstrado nesses dois anos, a qual tivemos que nos privar de muitos momentos juntos para execução deste trabalho.

A meu orientador, Fernando, e co-orientadora, Aline, pela ajuda em elaborar e revisar este trabalho.

A colega de pós-graduação, Isabella, pela imensa ajuda na execução experimental deste trabalho, não medindo esforços no intercâmbio de seu conhecimento.

A Prati Donaduzzi, por ter financiado grande parte deste trabalho.

Aos colegas de trabalho, Nicete, Marcelo Karnal e Ronald Alex, por tornar possível a utilização de equipamentos para análises cromatográficas.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Meus agradecimentos.

Sumário

1 -	Introdução	14
1.1 -	Objetivos	16
2 -	Revisão Bibliográfica	17
2.1 -	Contaminação Ambiental	17
2.2 -	Contaminantes emergentes	17
2.3 -	Contaminação de ambientes aquáticos por resíduos de fármacos	19
2.4 -	Esteroides Cardiotônicos – Digoxina.....	24
2.5 -	Processos Oxidativos Avançados.....	27
2.6 -	Processo Fenton	31
2.7 -	Mecanismos de reações envolvidas no processo clássico de Fenton	33
2.8 -	Toxicidade	35
3 -	Procedimento Experimental	37
3.1 -	Reagentes	37
3.2 -	Fármaco	37
3.3 -	Equipamentos	38
3.4 -	Validação da metodologia analítica por CLAE	38
3.4.1-	Sistema Cromatográfico.....	39
3.4.2-	Parâmetros de Validação	39
3.4.2.1-	Adequação do Sistema (<i>System Suitability</i>)	39
3.4.2.2-	Linearidade	40
3.4.2.3-	Seletividade.....	41
3.4.2.4-	Limite de Quantificação	41
3.4.2.5-	Limite de Detecção.....	41
3.5 -	Ensaio experimentais de Fenton	42
3.5.1-	Estabilidade da digoxina a reações de hidrólise ácida, oxidação e fotodegradação	42
3.5.2-	Estudo da remoção de digoxina – Avaliação das condições de: pH e concentração dos reagentes H ₂ O ₂ e Fe ²⁺	44
3.5.2.1-	Estudo da influência da variável pH na remoção da digoxina em efluente simulado.....	45
3.5.2.2-	Estudo da influência da variável concentração dos reagentes H ₂ O ₂ e Fe ²⁺ na remoção da digoxina em efluente simulado.	47
3.6 -	Determinação de peróxido de hidrogênio residual	49

3.7 -	Determinação de Carbono Orgânico Total (COT)	50
3.8 -	Estudo de toxicidade	51
3.8.1-	Preparo de amostras do estudo de toxicidade de DGX.....	51
3.8.2-	Execução do estudo de toxicidade de DGX.....	53
4 -	Resultados e Discussões.....	54
4.1 -	Validação da metodologia analítica por CLAE	54
4.2 -	Ensaio experimental de Fenton	54
4.2.1-	Estabilidade da digoxina a reações de hidrólise ácida, oxidação e fotodegradação	54
4.2.2-	Estudo da influência da variável pH na remoção da digoxina em efluente simulado.....	56
4.3 -	Estudo da influência da variável concentração dos reagentes H ₂ O ₂ e Fe ²⁺ na remoção da digoxina em efluente simulado.....	59
4.3.1-	Variação da concentração de Fe ²⁺	59
4.3.2-	Variação da concentração de H ₂ O ₂	62
4.4 -	Determinação do peróxido de hidrogênio residual.....	65
4.5 -	Determinação do Carbono Orgânico Total (COT)	67
4.6 -	Estudo de toxicidade	68
5 -	Conclusão	70
6 -	Referências bibliográficas	71
	Apêndice 1.....	79
	Resultados de desenvolvimento Analítico por CLAE-UV	79
6.1.1-	Adequação do Sistema (System Suitability).....	79
6.1.2-	Linearidade	80
6.1.3-	Seletividade	83
6.1.4-	Limite de Detecção.....	84
6.1.5-	Limite de Quantificação	86

Lista de Tabelas

Tabela 1: Principais classes de CEs.....	18
Tabela 2: Ocorrência e concentração de fármacos detectados em diferentes países.	21
Tabela 3: Potencial de oxidação de alguns oxidantes comuns.....	28
Tabela 4: Constantes de reação (K em $L\ mol^{-1}\ s^{-1}$) para a oxidação de determinadas classes de compostos utilizando ozônio e radical hidroxila.	29
Tabela 5: Informações sobre a DGX.....	37
Tabela 6: Equipamentos e softwares utilizados.	38
Tabela 7: Parâmetros cromatográficos.	39
Tabela 8: Critérios de aceitação de adequação de sistema cromatográfico.	40
Tabela 9: Estudo de estabilidade de DGX. Condições de degradação a serem estudadas.	44
Tabela 10: Estudo da influência da variável pH na eficiência da degradação de DGX....	47
Tabela 11: Estudo da influência da variável concentração de H_2O_2 na eficiência da degradação de DGX.....	48
Tabela 12: Estudo da influência da variável concentração de Fe^{2+} na eficiência da degradação de DGX.....	48
Tabela 13: Resultados do estudo de estabilidade da DGX aos reagentes: Fe^{2+} , H_2O_2 e irradiação UV (320 nm) por 24h. Condição de estudo.....	55
Tabela 14: Resultados da taxa de remoção de DGX em função da variação do pH. Condições de estudo: $[DGX] = 10\ mg\ L^{-1}$; $[H_2O_2] = 9990\ mg\ L^{-1}$; $[Fe^{2+}] = 30\ mg\ L^{-1}$, pH = variando de 2 a 4.....	58
Tabela 15: Resultados da taxa de remoção de DGX (%) em função da variação da concentração de Fe^{2+} . Condições de estudo: $[DGX] = 10\ mg\ L^{-1}$; $[H_2O_2] = 9990\ mg\ L^{-1}$; $[Fe^{2+}] =$ variando de 15 a 45 $mg\ L^{-1}$, pH = 3.	61
Tabela 16: Resultados da taxa de remoção de DGX (%) em função da variação da concentração de H_2O_2 por reações de Fenton. Condições de estudo: $[DGX] = 10\ mg\ L^{-1}$, $[H_2O_2] =$ variando de 6660 $mg\ L^{-1}$ a 13320 $mg\ L^{-1}$, $[Fe^{2+}] = 30\ mg\ L^{-1}$, pH 3.....	64
Tabela 17: Razão da mortalidade, valores médios de concentração letal (CL50) e intervalo de confiança (IC) de 95% do bioindicador AS exposto a diluições de 20 a 100% das amostras do resíduo sintético de DGX in natura e tratado pelo processo Fenton utilizando as condições experimentais de: $[DGX] = 10\ mg\ L^{-1}$, $[H_2O_2] = 9990\ mg\ L^{-1}$, $[Fe^{2+}] = 30\ mg\ L^{-1}$, pH 3, Tempo de degradação = 40 minutos.	68

Lista de Figuras

- Figura 1:** Classificação e estruturas químicas de esteroides cardiotônicos..... 25
- Figura 2:** Estruturas moleculares da digoxina e de seus produtos de degradação majoritários por hidrólise ácida..... 26
- Figura 3:** Visão ampla e classificação de diferentes POAs. Os processos considerados estabelecidos em escala total (branco), investigados em laboratório e em escala piloto (cinza) e testados em escala de laboratório (em verde)..... 30
- Figura 4:** Diagrama de distribuição de espécies de ferro em função do pH. 32
- Figura 5:** Fluxograma para avaliação da linearidade..... 40
- Figura 6:** Esquema experimental do teste de estabilidade de DGX a condições de: (I) Solução DGX controle; (II) Solução DGX contendo Fe^{2+} ; (III) Solução DGX contendo H_2O_2 ; (IV) Solução DGX exposta a radiação ultravioleta. E analisadas por CLAE após 24 horas. 43
- Figura 7:** Esquema experimental para análise da influência da variável pH na degradação de DGX por reações de Fenton..... 46
- Figura 8:** Esquema experimental para análise da influência das variáveis concentração de H_2O_2 e Fe^{2+} na degradação de DGX por processo Fenton. 49
- Figura 9:** Esquema experimental para análise de peróxido de hidrogênio residual da degradação de DGX por reações de Fenton..... 50
- Figura 10:** Produtos de degradação da DGX ocasionados por hidrólise catalisada por ácido. 56
- Figura 11:** Sobreposição dos cromatogramas e espectros de absorção na região do UV (200 – 400 nm) do estudo de variação de pH para a degradação de DGX por processo Fenton. Condições de estudo: (A, a) $[\text{DGX}] = 10 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 9990 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{Fe}^{2+}] = 30 \text{ mg L}^{-1}$, pH 2; (B, b) $[\text{DGX}] = 10 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 9990 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{Fe}^{2+}] = 30 \text{ mg L}^{-1}$, pH 3; (C, c) $[\text{DGX}] = 10 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 9990 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{Fe}^{2+}] = 30 \text{ mg L}^{-1}$, pH 4..... 57
- Figura 12:** Gráfico dos resultados da remoção de DGX em função do tempo para as amostras submetidas ao estudo de variação de pH. A linha em azul refere-se ao estudo conduzido em pH 2, a linha em laranja refere-se ao estudo conduzido em pH 3 e a linha em cinza refere-se ao estudo conduzido em pH 4. 58
- Figura 13:** Sobreposição dos cromatogramas e espectros de absorção na região do UV (200 – 400 nm) do estudo de variação de Fe^{2+} para a degradação de DGX por processo Fenton. Condições de estudo: (A, a) $[\text{DGX}] = 10 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 9990 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{Fe}^{2+}] = 15 \text{ mg L}^{-1}$, pH 3; (B, b) $[\text{DGX}] = 10 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 9990 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{Fe}^{2+}] = 30 \text{ mg L}^{-1}$, pH 3; (C, c) $[\text{DGX}] = 10 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 9990 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{Fe}^{2+}] = 45 \text{ mg L}^{-1}$, pH 3..... 60
- Figura 14:** Gráfico dos resultados da remoção de DGX em função do tempo para as amostras submetidas ao estudo de variação de Fe^{2+} . A linha em azul refere-se ao estudo conduzido com concentração de 15 mg L^{-1} , a linha em laranja refere-se ao estudo conduzido

com concentração de 30 mg L⁻¹ e a linha em cinza refere-se ao estudo conduzido com concentração de 45 mg L⁻¹. 61

Figura 15: Sobreposição dos cromatogramas e espectros de absorção na região do UV (200 – 400 nm) do estudo de variação de H₂O₂ para a degradação de DGX por processo Fenton. Condições de estudo: (A, a) [DGX] = 10 mg L⁻¹, [H₂O₂] = 6660 mg L⁻¹, [Fe²⁺] = 30 mg L⁻¹, pH 3; (B, b) [DGX] = 10 mg L⁻¹, [H₂O₂] = 9990 mg L⁻¹, [Fe²⁺] = 30 mg L⁻¹, pH 3; (C, c) = [DGX] = 10 mg L⁻¹, [H₂O₂] = 13320 mg L⁻¹, [Fe²⁺] = 30 mg L⁻¹, pH 3. 63

Figura 16: Gráfico dos resultados da remoção de DGX em função do tempo para as amostras submetidas ao estudo de variação de H₂O₂. A linha em azul refere-se ao estudo conduzido com concentração de 6660 mg L⁻¹, a linha em laranja refere-se ao estudo conduzido com concentração de 9990 mg L⁻¹ e a linha em cinza refere-se ao estudo conduzido com concentração de 13320 mg L⁻¹. 64

Figura 17: Curva de calibração para determinação do peróxido de hidrogênio residual. . 65

Figura 18: Monitoramento da [H₂O₂] em função do tempo de reação, para o processo Fenton, nas condições experimentais: pH = 3; [DGX] = 10 mg L⁻¹; [H₂O₂] = 9990 mg L⁻¹; [Fe²⁺] = 30 mg L⁻¹. 66

Figura 19: Monitoramento da variação de COT em função do tempo de reação, para o processo Fenton, nas condições experimentais: [DGX] = 10 mg L⁻¹; [H₂O₂] = 9990 mg L⁻¹; [Fe²⁺] = 30 mg L⁻¹; pH = 3; tempo de reação = 120 minutos. 67

Lista de Abreviaturas

AS – Artemia salina

ANA - Agência nacional de águas

CE – Contaminantes emergentes

CE₅₀ – Concentração de efeito

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CL₅₀ – Concentração letal média

COT – Carbono orgânico Total

DGX – Digoxina

DL₅₀ – Dose letal mediana

EC – Esteroides cardiotônicos

ETE – Estação de tratamento de efluentes POA – Processos oxidativos avançados

GC – Glicosídeos cardiotônicos

IBGE - Instituto brasileiro de geografia e estatística

IFA – Insumo farmacêutico ativo

K_{ow} – Coeficiente de partição

ESTUDO DO PROCESSO FENTON NA REMOÇÃO DE DIGOXINA E REDUÇÃO DA TOXICIDADE

Fábio Augusto Gubiani

RESUMO

Neste trabalho foi investigada a aplicabilidade do processo Fenton para a descontaminação de efluente simulado contendo digoxina. Para isso, primeiramente foi desenvolvida e validada uma metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando detector de arranjo de diodos com absorção molecular em 220 nm. Tal metodologia demonstrou-se aplicável para a finalidade proposta, por demonstrar-se linear na faixa de 0,1 a 10 mg L⁻¹ e seletiva para a digoxina na presença de complexos de ferro, peróxido de hidrogênio e subprodutos da união destes reagentes. Com este método averiguou-se inicialmente a estabilidade do fármaco a condições de hidrólise ácida (pH 3) e oxidativa por reagente oxidante (H₂O₂) e íons metálicos (Fe²⁺). Devido a constatação da estabilidade as condições testadas, o processo Fenton foi utilizado para degradação do fármaco, devido a este apresentar características físico-químicas de bioacumulação em organismos vivos. Experimentos de avaliação das variáveis pH, [Fe²⁺] e [H₂O₂], foram realizados, chegando em condições adequadas de: pH = 3, [Fe²⁺] = 30 mg L⁻¹ e [H₂O₂] = 9990 mg L⁻¹ com tempo de degradação completa do fármaco em 8 minutos. Estudos utilizando análise de carbono orgânico total evidenciaram mineralização de cerca de 60% do fármaco após 120 minutos de reação. Análise de peróxido de hidrogênio residual demonstrou consumo de 70% do reagente inserido, após 120 minutos de reação. E por fim, testes de toxicidade demonstraram redução da toxicidade devido ao aumento da CL₅₀ para o resíduo simulado e após tratamento por processo Fenton, respectivamente.

ESTUDO DO PROCESSO FENTON NA REMOÇÃO DE DIGOXINA E REDUÇÃO DA TOXICIDADE

Fábio Augusto Gubiani

ABSTRACT

In this work the applicability of the Fenton process for the decontamination of synthetic effluent containing digoxin was investigated. For this, an analytical methodology was first developed and validated by high performance liquid chromatography using a diode arrangement detector with molecular absorption at 220 nm. This methodology proved to be applicable for the proposed purpose, since it was linear in the range of 0.1 to 10 mg L⁻¹ and selective for digoxin in the presence of iron complexes, hydrogen peroxide and by-products of the union of these reagents. With this method, the stability of the drug was determined initially under conditions of acid (pH 3) and oxidative hydrolysis by oxidizing reagent (H₂O₂) and metal ions (Fe²⁺). Due to the stability of the tested conditions, the Fenton process was used for degradation of the drug, due to the fact that it presents physicochemical characteristics of bioaccumulation in living organisms. Experiments for the evaluation of the pH, [Fe²⁺] and [H₂O₂] variables were carried out under the conditions of: pH = 3, [Fe²⁺] = 30 mg L⁻¹ and [H₂O₂] = 9990 mg L⁻¹ degradation in 8 minutes. Studies using total organic carbon analysis showed mineralization of about 60% of the drug after 120 minutes of reaction. Residual hydrogen peroxide analysis showed 70% consumption of the inserted reagent after 120 minutes of reaction. And finally, toxicity tests demonstrated a reduction in toxicity due to the increase in LC₅₀ for the simulated residue and after treatment by Fenton process, respectively.

1 - Introdução

O desenvolvimento econômico e industrial verificado nas últimas décadas contribuiu consideravelmente para a melhora da qualidade de vida da população. No entanto, reflexos significativos também foram observados no meio ambiente, a qual sofreu com o aumento de despejo de resíduos orgânicos e inorgânicos (sólidos, líquidos e gasosos).

Entre as diferentes categorias de poluentes orgânicos que apresentaram aumento de despejo, os produtos farmacêuticos são uma destas classes, ocasionando preocupação na sociedade por tratar-se de produtos com estruturas químicas complexas, apresentando características de bioacumulação e pseudo-persistência em ambientes aquáticos. A introdução de IFAs em tal ecossistema é muito diversificada, estando como contribuinte principal a própria população, através do descarte inadequado de produtos farmacêuticos além da excreção renal e fecal em esgoto bruto. Complexos fabris e hospitais também contribuem significativamente para esta problemática, devido ao descarte inadequado ou acidental de IFAs no meio ambiente. Distúrbios fisiológicos ocasionados pela interação destes poluentes com organismos vivos, são amplamente estudados, no entanto, devido a imensa quantidade de substâncias químicas sintéticas presentes no mercado, tal trabalho é demasiadamente complexo e longo.

Dentre as mais diversas classes de medicamentos despejados no meio ambiente, (analgésicos, anti-inflamatórios, antibióticos entre outras) os esteroides cardiotônicos também estão presentes e merecem atenção, devido a sua elevada toxicidade em pequenas concentrações e amplo perfil de atividade biológica, sendo a digoxina (DGX) um bom exemplo desta classe de substâncias. Isolada da *dedaleira* e conhecida como um potente inibidor da bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$, a DGX é utilizada mundialmente no tratamento de várias doenças cardíacas, incluindo insuficiência cardíaca congestiva acompanhada de fibrilação atrial. No entanto, devido a elevada toxicidade (LD_{50} de $5,5 \text{ mg Kg}^{-1}$ em camundongos), baixíssimo índice terapêutico (dose terapêutica é apenas 50 a 60% inferior à dose tóxica) e alta potência, este medicamento vem sendo substituído, quando possível, devido aos inúmeros casos de intoxicação.

Por se tratar de concentrações ínfimas presentes em matrizes complexas, instrumentação analítica sensível e seletiva é fundamental para a identificação e quantificação destes micropoluentes. Com tais atributos é possível fazer o acompanhamento de CEs a longo prazo, com a finalidade de verificar a necessidade de

inclusão de limites ambientais para determinadas moléculas, e estudos de efeitos crônicos e agudos em espécies do ecossistema aquático.

Com a tentativa de suprir a ineficiência de tratamentos convencionais, os processos oxidativos avançados (POAs) são tecnologias alternativas que baseiam-se em processos de geração de radicais livres, tais como: hidroperoxila ($\text{HO}_2\bullet$), superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$) e, principalmente hidroxila ($\text{HO}\bullet$), as quais são espécies altamente oxidantes e não seletivas. Tais radicais são capazes de alterar profundamente as estruturas químicas dos contaminantes orgânicos e inorgânicos bem como a inativação de micro-organismos, podendo levar a completa mineralização destes. Entre os vários procedimentos existentes, o processo Fenton é uma alternativa promissora, pois apresenta simplicidade operacional, baixo custo, reagentes seguros e biodegradáveis além de serem economicamente viáveis, para a degradação de CEs.

O processo Fenton (clássico) pode ser definido como a geração catalítica de radicais livres, a partir da combinação de peróxido de hidrogênio e íons Fe^{2+} , onde o íon metálico atua como um catalisador homogêneo em solução aquosa. É importante ressaltar a grande dependência do ajuste de pH para garantia da eficiência máxima deste processo, sendo que para isso, valores ácidos de pH são obrigatórios, uma vez que complexos insolúveis de Fe são observados em pH superior 4, tais como hidróxido de ferro ($\text{Fe}(\text{OH})_{3(s)}$). Muito conhecimento é estabelecido sobre a aplicabilidade de métodos de oxidação avançada para tratamento de efluentes complexos, no entanto, ainda são verificadas carências de informações para moléculas específicas, visto ao elevado número de IFAs comercializadas mundialmente.

A toxicidade é um parâmetro de grande importância e amplamente difundido para avaliação de condições ambientais, a qual tem como finalidade avaliar o grau de mortalidade de um determinado grupo de animais teste em que condições específicas. Para tal avaliação inúmeros testes toxicológicos são reportados na literatura, podendo ser feita a utilização de organismos vivos como indicadores de mortalidade aguda e crônica, em que geralmente é expressa em concentração letal (CL_{50}). *Artemia salina* (AS) é um microcrustáceo de ordem Anostraca (sem carapaça) que vive em lagos de água salgada de todo o mundo, este microcrustáceo é muito utilizado para bioensaios de testes de toxicidade devido a inúmeras fatores, tais como: (I) bom conhecimento de sua biologia e ecologia; (II) tamanho corporal pequeno; (III) alta adaptabilidade a várias condições de testes; (IV) rapidez (de 28 a 72 horas desde a eclosão dos ovos até o primeiro resultado).

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo estudar a aplicabilidade do processo Fenton para remoção do fármaco digoxina de efluente simulado e avaliar a redução da toxicidade. A fim de organizar a abordagem do assunto, este trabalho foi dividido em cinco capítulos. Sendo o primeiro deles o da Introdução. O Capítulo 2 trata-se de uma revisão bibliográfica sobre diversos tópicos que envolvem o tema em questão como contaminação ambiental, contaminantes emergentes, glicosídeos cardiotônicos, processo Fenton, entre outros, que foram empregados no estudo. No capítulo 3 são mostradas as metodologias empregadas para desenvolvimento e validação do método analítico por CLAE, análise e tratamento do efluente simulado por processo Fenton, e a metodologia para a análise de toxicidade do efluente antes e após tratamento por processo Fenton. No capítulo 4 são mostrados os resultados obtidos neste estudo. E por fim, no capítulo 5 são apresentadas as conclusões obtidas sobre o estudo.

1.1 - Objetivos

Este trabalho tem por objetivo principal o estudo do processo Fenton para remoção de digoxina presente em efluente simulado. Para isso serão avaliadas as variáveis: pH e concentrações dos reagentes Fe^{2+} e H_2O_2 com a finalidade de avaliar a cinética de degradação da digoxina. Para fins quantitativos, este estudo terá como objetivo específico, desenvolver e validar um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) que seja: sensível, seletivo, linear e preciso na faixa de concentração de 0,1 a 10 mg L^{-1} para a digoxina. Além disso, será avaliada a taxa de mineralização e consumo de peróxido de hidrogênio residual do efluente simulado, utilizando condições pré-definidas, sendo estas consideradas as mais adequadas para a degradação do micropoluinte em questão. E por fim, fazer um estudo de toxicidade utilizando o microcrustáceo *Artemia Salina* como bioindicador para predição da concentração letal média (CL_{50}) do poluente estudado, tanto do efluente simulado (sem tratamento) quanto de efluente tratado por processo Fenton.

2 - Revisão Bibliográfica

2.1 - Contaminação Ambiental

Segundo a Agência Nacional de Águas (ANA) estima-se que 97,5% da água existente no mundo é salgada, não sendo adequada para o consumo direto nem para irrigação. Dos 2,5% de água doce, a maior parte (69%) é de difícil acesso, pois está concentrada nas geleiras, 30% são águas subterrâneas (armazenadas em aquíferos) e 1% encontra-se nos rios. Logo, o uso desse bem precisa ser refletido para que não prejudique nenhum ecossistema que o utiliza. [1]

As investigações sobre a qualidade da água geralmente se concentram em nutrientes, poluentes microbianos, metais pesados e poluentes prioritários. No entanto, pesquisas recentes revelam a presença de uma infinidade de contaminantes orgânicos que afetam significativamente a qualidade da água. Esses contaminantes são originários de diversas fontes e tipicamente estão presentes em concentrações que variam de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$. Este grupo de contaminantes, denominados contaminantes emergentes (CEs), são compostos químicos que estão comumente presentes na água, mas só recentemente são reconhecidos como poluentes significativos. [2]

Tendo em vista esta problemática, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, (IBGE), no ano de 1980, verificou que dos 62 mil estabelecimentos industriais existentes no país, quase a metade, ou seja, 25,7 mil apresentavam alto potencial poluidor da água. Já em 2018 em levantamento feito pelo Instituto Trata Brasil, 35 milhões de brasileiros ainda não possuem acesso a água potável, mais de 100 milhões não possuem coleta de esgoto e somente 45% dos esgotos gerados no país tem algum tipo de tratamento. [3-4]

Diante dessa conjuntura, temas como reúso, minimização e tratamento de resíduos vêm ganhando cada vez mais importância, devido ao complexo cenário de poluição a qual a sociedade está envolvida. [5]

2.2 - Contaminantes emergentes

Os CEs são substâncias naturais ou de ocorrência sintética, que comumente não são integrados a controles de monitoramento de rotina, devido ao pouco conhecimento dos efeitos toxicológicos destas substâncias.

Pal et al. (2014), subdividiram estes contaminantes em 17 subclasses. Na TAB. 1 são apresentadas as principais classes de CEs.

Tabela 1: Principais classes de CEs.

Categorias	Exemplos
Plastificantes	Bisfenol A
Compostos Perfluorados	FFOS
Pesticidas	Fipronil
Surfactantes	Monoetoxilado de 4-nonilfenol
Antibióticos	Sulfametoxazol
Farmacêuticos	Paracetamol
Hormônios	Estrona (E1)
Meio de contraste para raios X iodado (ICM)	Iopromida
Adoçantes artificiais	Sucralose
Fragrâncias	Galaxida
Filtros solares	4-metilbenzilideno cânfora
Conservantes antimicrobianos	Benzilparabeno
Produtos de uso pessoal	N,N-dimetil-meta-toluamida
Agentes de branqueamento fluorescentes	4,4'-bis(2-sulfostyryl)-biphenyl
Toxinas de algas	Microcistina
Retardadores de chamas	Éteres de difenila polibromados
Compostos de sabor e odor	Geosmina

Fonte: [6]

Visto o grande número de CEs, e suas baixas concentrações no meio ambiente, sofisticada instrumentação analítica é requerida para a identificação e quantificação dessas substâncias no meio ambiente. Com isso, atualmente as principais ferramentas analíticas disponíveis para o monitoramento destes tipos de compostos são: cromatografia (gás ou líquida) acoplada à espectrometria de massas (MS), devido à grande seletividade e sensibilidade destas técnicas mesmo em matrizes muito complexas, tais como águas residuais e de esgoto bruto, solos e sedimentos. No entanto, devido ao alto custo de aquisição dos equipamentos e de análise, técnicas alternativas também são opções para

este fim, sendo alguns exemplos: eletroforese capilar, técnicas imunanalíticas e ensaios microbiológicos, sendo estas técnicas consideradas menos sensíveis e seletivas do que os métodos cromatográficos. [2]

No Brasil, não há registros de programas oficiais voltados para a problemática dos CEs, como já existentes em alguns países da Europa, tais como o renomado Programa de Investigação Química presente no Reino Unido. Tal carência de pesquisa expõe o país a riscos de saúde pública, pois pouco se conhece sobre os reais danos destes micropoluentes na saúde humana. [7]

Resíduos farmacêuticos, tem despertado o interesse da comunidade científica nas últimas décadas, devido a identificação cada dia mais facilitada destas substâncias em função da introdução de instrumentação analítica aprimorada. Estima-se que cerca de 3000 substâncias sejam usadas como IFAs, incluindo analgésicos, antibióticos, antidiabéticos, betabloqueadores, contraceptivos, reguladores lipídicos, antidepressivos, medicamentos para impotência, entre outros. Apenas um pequeno subconjunto desses CEs fora investigado em estudos ambientais. Além disso, esses poluentes podem afetar negativamente o ecossistema aquático e a saúde humana, devido à desregulação endócrina e à manutenção ou desenvolvimento de bactérias resistentes a antibióticos. [2,8]

2.3 - Contaminação de ambientes aquáticos por resíduos de fármacos

A contaminação de ambientes aquáticos por diversos poluentes orgânicos desperta grande preocupação, devido à importância da água para os seres vivos. Nos dias atuais, investigações da real situação da contaminação do meio ambiente e suas consequências a curto e longo prazo são avaliados.

Estudos demonstram que a problemática de contaminação ambiental por IFAs é complexa, pois muitas são as rotas de entrada no ecossistema, desde efluentes hospitalares, fabris, estações de tratamento de efluentes (ETEs) até mesmo aplicações veterinárias e utilização humana. Ressalta-se que a principal fonte de ocorrência de IFAs no ambiente fluvial é o uso humano através da descarga contínua de formas não metabolizadas ou metabólitos ativos excretados via urina ou fezes no esgoto bruto, ou descarte inadequado de medicamentos. Estudos feitos entre 2004 a 2009 em ETEs no estado de Nova York (Estados Unidos), relatam que efluentes advindos de fábricas farmacêuticas apresentavam concentrações de determinados IFAs de 30 a 500 vezes

superiores as ETEs que não recebiam efluentes destes complexos fabris, expondo que tal problemática de contaminação por CEs não se restringe a somente países asiáticos, tais como China e Índia detentores do fornecimento de metade da produção mundial de IFAs. [9-11]

Muitas publicações relatam a ocorrência de várias classes de medicamentos, em concentrações entre alguns ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$ em águas superficiais, subterrâneas e até mesmo em água potável em todo o mundo. Essas pesquisas indicam que as referidas substâncias induzem a efeitos adversos em organismos vivos, devido a interações com uma ampla gama de processos fisiológicos, incluindo a regulação reativa de espécies de oxigênio, a síntese de hormônios e a reprodução. [12-15]

Os possíveis destinos dos produtos farmacêuticos quando entram no ambiente aquático, são principalmente três: (a) o composto é mineralizado em dióxido de carbono e água, (b) o composto não se degrada rapidamente porque é lipofílico e é parcialmente retido no lodo de sedimentação e (c) o composto se metaboliza em uma molécula mais hidrofílica, passa pela estação de tratamento de águas residuárias e acaba nas águas receptoras (que são águas superficiais, principalmente de rios). [16]

Na TAB. 2 são apresentadas várias classes terapêuticas que foram detectadas em diferentes regiões do mundo, em concentrações que variam de ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 2: Ocorrência e concentração de fármacos detectados em diferentes países.

Fármaco	Classe terapêutica	Localização	Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) - Efluente	Fonte
Ciprofloxacina	Antibiótico	Índia	> 10 000	[17-18]
Cetirizina	Antialérgico		1000-10 000	
Losartan	Anti-hipertensivo		1000-10 000	
Citalopram	Antidepressivo		100–1000	
Enrofloxacina	Antibiótico		100–1000	
Metoprolol	Anti-hipertensivo		100–1000	
Norfloxacina	Antibiótico		100–1000	
Ofloxacina	Antibiótico		100–1000	
Enalapril	Anti-hipertensivo		10–100	
Ramipril	Anti-hipertensivo		10–100	
Ranitidina	Agente redutor de acidez gástrica		10–100	
Salbutamol	Broncodilatador		10–100	
Amlodipina	Anti-hipertensivo		1–10	
Atenolol	Anti-hipertensivo		1–10	
Atorvastatina	Agente hipolipemiante		1–10	
Dextropropoxifeno	Antálgico		1–10	
Eritromicina	Antibiótico		1–10	
Sertralina	Antidepressivo		1–10	
Terbutalina	Broncodilatador		1–10	
Trimetoprim	Antibiótico		1–10	
Zolpidem	Hipnótico	0,1–1		

“continua”

(Continuação)

Fármaco	Classe terapêutica	Localização	Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) - Efluente	Fonte
Ácido Acetilsalicílico	AINE		> 10 000 (2,3 mg L ⁻¹)	[19]
Ácido salicílico	AINE		> 10 000 (1,2 mg L ⁻¹)	
Oxitetraciclina	Antibiótico		> 10 000 (600 mg L ⁻¹)	[20]
Ácido oxálico	Hemostático		> 10 000 (9,1 mg L ⁻¹)	[21]
Oxitetraciclina	Antibiótico	China	> 10 000 (19,5 mg L ⁻¹)	
Estrona	Contraceptivos		<0,1	[22]
Estradiol	Contraceptivos		<0,1	
Estriol	Contraceptivos		<0,1	
Etinilestradiol	Contraceptivos		<0,1	
Cafeína	Psicoestimulantes		1–10	[8]
Carbamazepina	Antiepiléptico		10–100	
Acetaminofeno	AINE		0,1–1	
Ácido acetilsalicílico	AINE		10–100	
Diclofenaco	AINE	Coréia	1–10	
Naproxeno	AINE		10–100	
Lincomicina	Antibióticos		> 10 000	
Sulfametazina	Antibióticos		0,1–1	
Sulfametoxazol	Antibióticos		10–100	
Sulfatiazol	Antibióticos		1–10	
Trimetoprim	Antibiótico		1–10	

"continua"

(Continuação)

Fármaco	Classe terapêutica	Localização	Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) - Efluente	Fonte
Ciprofloxacina	Antibiótico	Coreia	1–10	[8]
Enrofloxacin	Antibiótico		1–10	
Clortetraciclina	Antibiótico		0,1–1	
Florfenicol	Antibiótico		1–10	
Eritromicina	Antibióticos		1–10	
Cefradina	Antibióticos		0,1–1	
Vancomicina	Antibióticos		10–100	
Butalbital	Relaxante muscular	EUA	10–100	[10]
Metaxalona	Relaxante muscular		10–100	
Metadona	Agente de retirada de opiáceos		10–100	
Oxicodona	Relaxante muscular		10–100	
Phendimetrazina	Anorexigênico		10–100	
Diazepam	Anti-psicótico		10–100	
Aciclovir	Antiviral		Alemanha	
Nevirapina	Antiviral	<0,1		
Oseltamivir	Antiviral	<0,1		
Carboxilato de oseltamivir	Antiviral	<0,1		
Zidovudina	Antiviral	<0,1		

Larsson et al. (2007), analisaram efluentes de Patancheru, Índia, e constataram concentração de ciprofloxacino (antibiótico de amplo espectro) de 31000 µg L⁻¹, valor que excede os níveis tóxicos para algumas bactérias em mais de 1000 vezes. Com isso, gerou-se grande preocupação com a problemática de resistência bacteriana a esta classe de IFAs. [17]

Brodin et al. (2013), verificaram a qualidade da água do rio Fyris (Suécia), e constataram indícios de bioacumulação do fármaco psicoterapêutico oxazepam em peixes da espécie *Perca Fluviatilis*, devido a concentração do IFA no tecido dos peixes ser superior do que da própria água do rio. Seu estudo subsequente também relatou que o mesmo IFA induziu mudanças comportamentais em peixes em concentrações ambientalmente relevantes. [24]

2.4 - Esteroides Cardiotônicos – Digoxina

Os esteroides cardiotônicos (EC) ou mais comumente conhecidos como glicosídeos cardiotônicos (GC) representam um grupo de compostos que compartilham a capacidade de se ligar à superfície extracelular da principal proteína de transporte iônico da célula, a bomba de sódio inserida na membrana (Na⁺ / K⁺ - ATPase). Quimicamente, tais substâncias são caracterizadas pela presença de um núcleo esteroide, uma porção de açúcar, outra de lactona. Cada fração apresenta uma finalidade específica, sendo a porção esteroidal em conformação responsável pela atividade destes compostos no organismo, a lactona presente na posição C17β, caracteriza o subgrupo dos glicosídeos (cardolídeos têm um anel de butirolactona insaturado de cinco membros, enquanto os bufadienolidos contêm um anel pirônico insaturado de seis membros) e açúcares presentes na posição C3β, que afetam o perfil farmacodinâmico e farmacocinético de cada glicosídeo, influenciando a potência terapêutica do composto. [25-26]

Na FIG. 1 são apresentadas as estruturas e classificação de esteroides cardiotônicos.

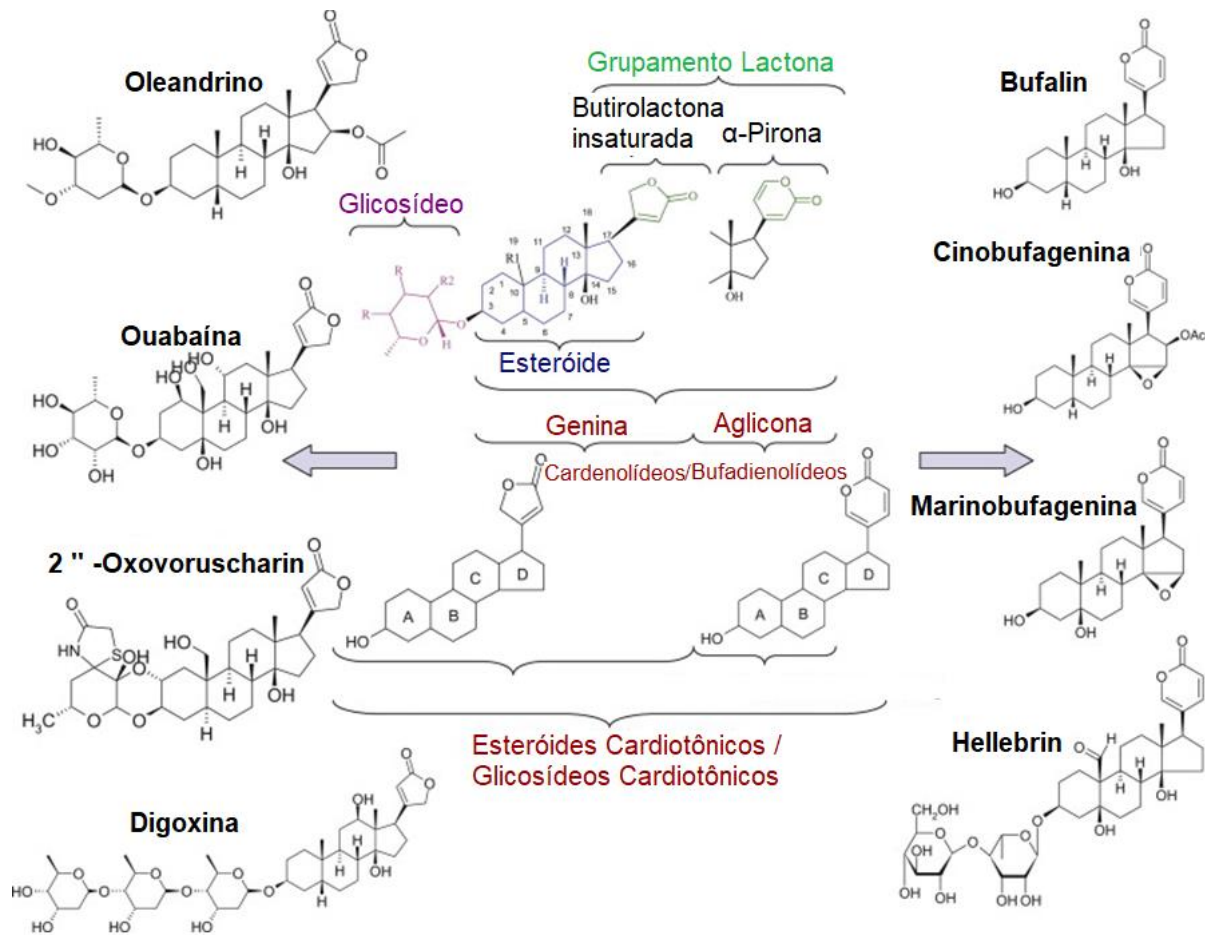


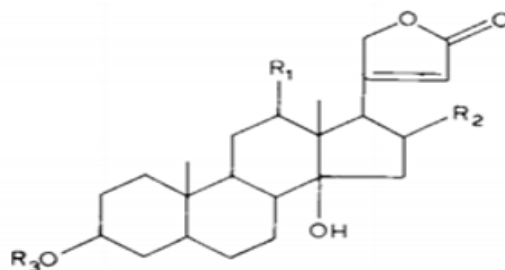
Figura 1: Classificação e estruturas químicas de esteroides cardiotônicos.

Fonte: adaptado de [25]

Tendo seus primeiros registros de utilização por civilizações egípcias para o tratamento de enfermidades, estas substâncias são utilizadas a milênios. No entanto, somente no ano de 1542, quando o médico e professor de botânica Leonard Fuchs compilou um herbário de todas as plantas conhecidas em sua época, delimitou-se o nome de *digitais* para tais substâncias, a qual é utilizado até os dias atuais como termo genérico para todos os EC. [25]

A digoxina (DGX) é uma molécula pertencente ao grupo de GC, classificada como um cardenolídeo que apresenta 3 unidades glicosídicas (digitoxose). Esta substância é de longe a GC mais comumente prescrita em todo o mundo. Após administrada por indivíduos saudáveis a DGX apresenta intervalo de eliminação de 40 horas, com taxas de eliminação na urina de 80% da molécula de forma inalterada. Metabólitos ativos e inativos também são verificados, sendo a di-hidrodigoxina a principal molécula encontrada. [27]

Alta estabilidade tanto na forma sólida, quanto dissolvida em solução aquosa a pH 7 é verificada para a DGX. No entanto, hidrólise catalisada por ácido é examinada quando submetida a pH inferior a 3, apresentando três produtos de degradação majoritários: digoxigenina, digoxigenina mono e digoxigenina bis-digitoxosídeo. Na FIG. 2 são apresentadas as estruturas moleculares da digoxina e seus produtos de degradação majoritários por hidrólise ácida. [28-29]



D = Digitoxose

Composto	R1	R2	R3
Digoxina	OH	H	D-D-D
digoxigenina	OH	H	H
digoxigenina mono-digitoxosídeo	OH	H	D
digoxigenina bis-digitoxosídeo	OH	H	D-D

Figura 2: Estruturas moleculares da digoxina e de seus produtos de degradação majoritários por hidrólise ácida.

Fonte: adaptado de [30].

Além de alta estabilidade em ambiente aquático, a DGX apresenta elevada toxicidade (DL_{50} de $5,5 \text{ mg Kg}^{-1}$) em baixos níveis de concentração, podendo até mesmo levar a óbito pacientes tratados por este medicamento, visto ao pequeno índice terapêutico que esta droga possui. A intoxicação por digitálicos podem causar arritmias e anormalidades gastrointestinais e / ou do sistema nervoso central. [31]

Efeitos de toxicidade crônica em vertebrados do tipo *cnidariana Hydra vulgaris* foram investigados por Pascoe et al. (2003), que constatou influência significativa na regeneração do hipóstomo, tentáculos e pés dos vertebrados estudados após 17 dias de exposição a concentrações de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de digoxina, diazepam e anlodipino, demonstrando os riscos de bioacumulação de tais classes de medicamentos em ambientes aquáticos. [32]

Devido à baixa solubilidade em água ($\leq 100 \text{ mg L}^{-1}$), elevado coeficiente de partição ($K_{ow} = 1,95$), estabilidade química a ambientes aquáticos e capacidade de permeação na membrana celular com acumulação em tecidos ósseos e musculares, a DGX apresenta potencial de bioacumulação em organismos aquáticos, podendo colocar em risco a diversidade aquática a longo prazo. [33]

2.5 - Processos Oxidativos Avançados

Os Processos de Oxidação Avançada constituem uma família de tecnologias similares, mas não idênticas, baseadas predominantemente na produção *in situ* de radicais hidroxila muito reativos e não seletivos. Outras espécies oxidantes comumente formadas nestes processos são: H_2O_2 , O_3 e ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Essas espécies são capazes de oxidar uma vasta gama de compostos orgânicos e inorgânicos, muitas vezes possibilitando a completa mineralização das substâncias a CO_2 e H_2O . [40-41]

Dentre os radicais e espécies reativas formadas nestes processos, destaca-se o radical hidroxil, devido a suas características promissoras, tais como: alta capacidade de oxidação e rápida cinética de degradação para compostos orgânicos com constante de 10^6 a $10^{11} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. [42]

Na TAB. 3 são apresentados os potenciais de oxidação para os reagentes mais comumente utilizados na oxidação de contaminantes em água, a qual pode ser observado o elevado potencial de oxidação de radicais hidroxila frente a oxidantes tradicionais, tais como peróxido de hidrogênio e cloro.

Tabela 3: Potencial de oxidação de alguns oxidantes comuns.

Espécie	Potenciais de Oxidação (V)
Flúor	3,03
Radical Hidroxila	2,80
Oxigênio Atômico	2,42
Ozônio	2,07
Peróxido de Hidrogênio	1,78
Permanganato	1,68
Dióxido de Cloro	1,57
Ácido Hipocloroso	1,49
Cloro	1,36
Bromo	1,09
Iodo	0,54

Fonte: Adaptado de [43].

Estudos demonstram que radicais hidroxila reagem tipicamente um milhão a um bilhão de vezes mais rápido que o ozônio e o peróxido de hidrogênio, resultando em custos de tratamento e tamanho de sistemas bastante reduzidos. Na TAB. 4 são apresentados as constantes de reação (K em $L \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) para a oxidação de determinadas classes de compostos utilizando ozônio (O_3) e radical hidroxila ($\bullet OH$), sendo que quanto maior o valor desta constante maior é a velocidade de oxidação do composto orgânico em questão. [44]

Tabela 4: Constantes de reação (K em L mol⁻¹ s⁻¹) para a oxidação de determinadas classes de compostos utilizando ozônio e radical hidroxila.

Composto	O ₃	·OH
Alcenos clorados	10 ⁻¹ a 10 ³	10 ⁹ a 10 ¹¹
Orgânicos contendo Nitrogênio	10 a 10 ²	10 ⁸ a 10 ¹⁰
Fenóis	10 ³	10 ⁹ a 10 ¹⁰
Aromáticos	1 a 10 ²	10 ⁸ a 10 ¹⁰
Cetonas	1	10 ⁹ a 10 ¹⁰
Álcoois	10 ⁻² a 1	10 ⁸ a 10 ⁹
Alcanos	10 ⁻²	10 ⁶ a 10 ⁹

Fonte: Adaptado de [44].

Uma vez gerados, os radicais hidroxila atacam agressivamente todos os compostos orgânicos. Dependendo da natureza das espécies orgânicas, três tipos de ataque inicial são possíveis: [43]

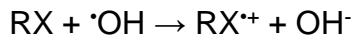
1. Abstração de átomo de hidrogênio: rota principal de oxidação, a qual ocorre geralmente com hidrocarbonetos alifáticos e promove a formação de radicais orgânicos (Eq. 1).



2. Adição eletrofílica: adição de ·OH a ligações π formando radicais orgânicos. Ocorre geralmente com hidrocarbonetos insaturados ou aromáticos (Eq. 2).



3. Transferência eletrônica: ocorre normalmente com hidrocarbonetos halogenados (Eq. 3).



(3)

As tecnologias de POAs envolvem métodos amplamente diversificados de ativação, bem como geração de oxidantes, e podem potencialmente utilizar vários mecanismos diferentes para a mineralização do contaminante. Uma visão geral de diferentes POAs já estabelecidos e emergentes é apresentado na (FIG. 3). [45]

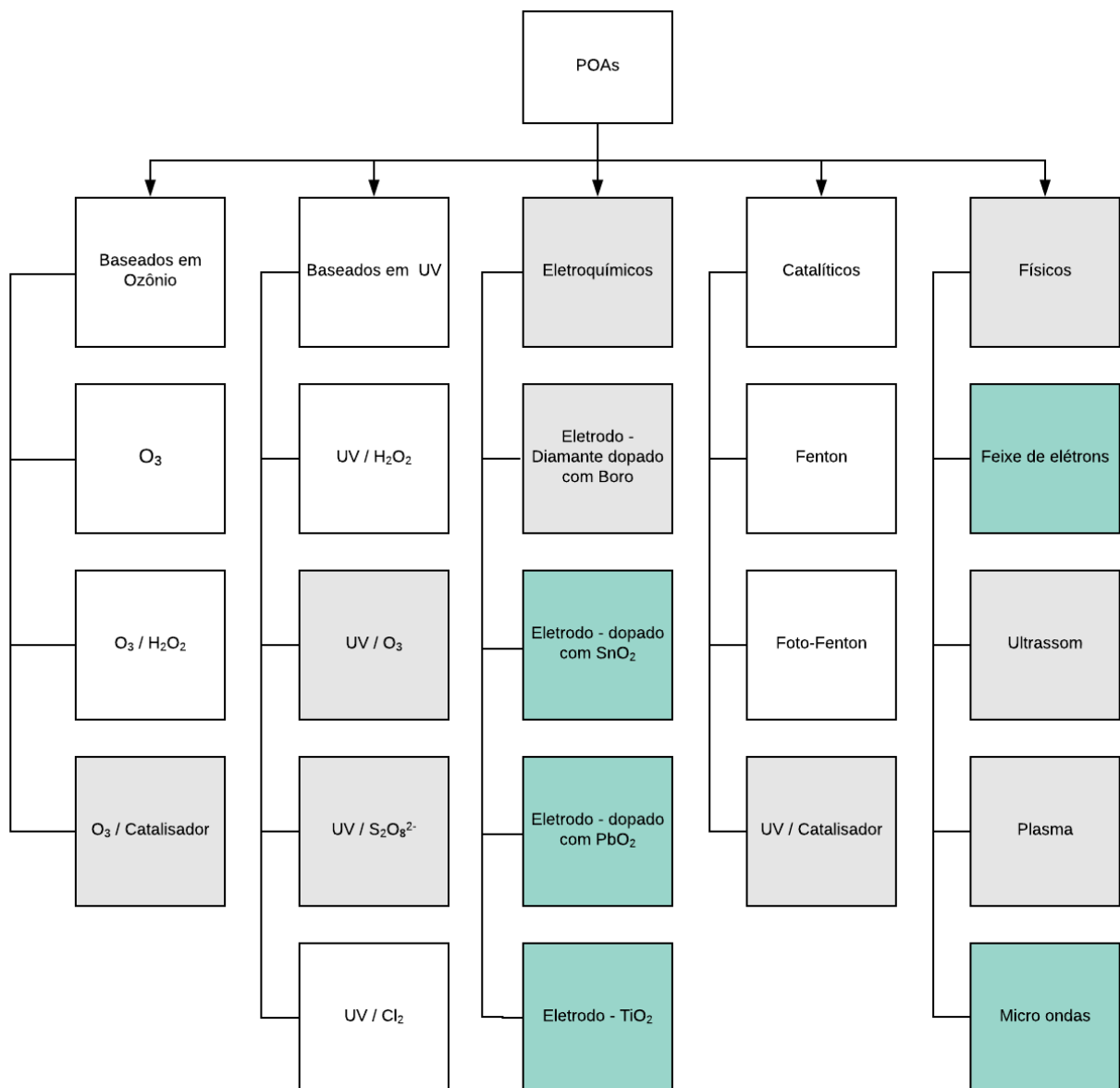


Figura 3: Visão ampla e classificação de diferentes POAs. Os processos considerados estabelecidos em escala total (branco), investigados em laboratório e em escala piloto (cinza) e testados em escala de laboratório (em verde).

Fonte: Adaptado de [45].

2.6 - Processo Fenton

Em 1894, H. J. H. Fenton, observou pela primeira vez as propriedades fortemente oxidativas de uma solução contendo peróxido de hidrogênio e íons Fe^{2+} . Utilizando este reagente muitas moléculas orgânicas poderiam ser facilmente oxidadas sem haver a necessidade de altas temperaturas, pressões elevadas ou equipamentos complexos. Entretanto, somente 40 anos mais tarde, em 1932, Haber e Weiss propuseram o mecanismo de geração de radical hidroxila que ocorre por meio da decomposição catalítica do peróxido de hidrogênio em meio ácido (Eq. 4). [46-47]



A reação de Fenton, definida hoje como a geração catalítica de radicais hidroxila a partir da reação em cadeia entre os íons Fe^{2+} e peróxido de hidrogênio em meio ácido, tem demonstrado ser bastante eficiente na oxidação de compostos orgânicos tóxicos e não biodegradáveis. Este processo tem demonstrado algumas vantagens significativas em relação aos demais, já que o ferro é um elemento amplamente disponível e de fácil remoção do meio de reação, visto que precipita com grande facilidade em pH acima de 7.

O peróxido de hidrogênio por sua vez é de fácil manuseio, barato e o excesso se decompõe em produtos ambientalmente seguros, como oxigênio molecular e água, conforme apresentado na (Eq. 5). [47-48]



Embora as reações de Fenton possuam a aplicabilidade de degradar uma ampla variedade de poluentes, otimizações do sistema de reação são fundamentais para o máximo potencial de degradação, muitas vezes sendo possível a mineralização completa dos contaminantes orgânicos a CO_2 e H_2O e ácidos inorgânicos quando houver a presença de heteroátomos. Tais otimizações consistem da análise de muitas variáveis, sendo duas destas classificadas de grande importância, que são:

i. Concentração de peróxido de hidrogênio e íons Fe^{2+}

Devido à alta complexidade dos efluentes reais, grandes desafios são encontrados na estimativa da concentração otimizada de peróxido de hidrogênio e $\text{Fe}(\text{II})$. Pignatello et al. (2007), recomendam que a proporção molar entre ambos os reagentes esteja entre 100 a 1000, no entanto, são extremamente diversificadas as proporções molares reportadas na literatura, não havendo um consenso sobre este tema.

ii. pH

A reação de Fenton apresenta muitas vantagens, no entanto uma desvantagem que diz respeito a operacionalidade e eficiência do processo é a necessidade de ajuste fino de pH próximo a 3. Nesta faixa de pH verifica-se a formação majoritária do aquo-complexo $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ que é responsável pela função catalítica de geração de radicais hidroxila. Na FIG. 4 é apresentado o diagrama de distribuição de espécies de ferro em função do pH. [52]

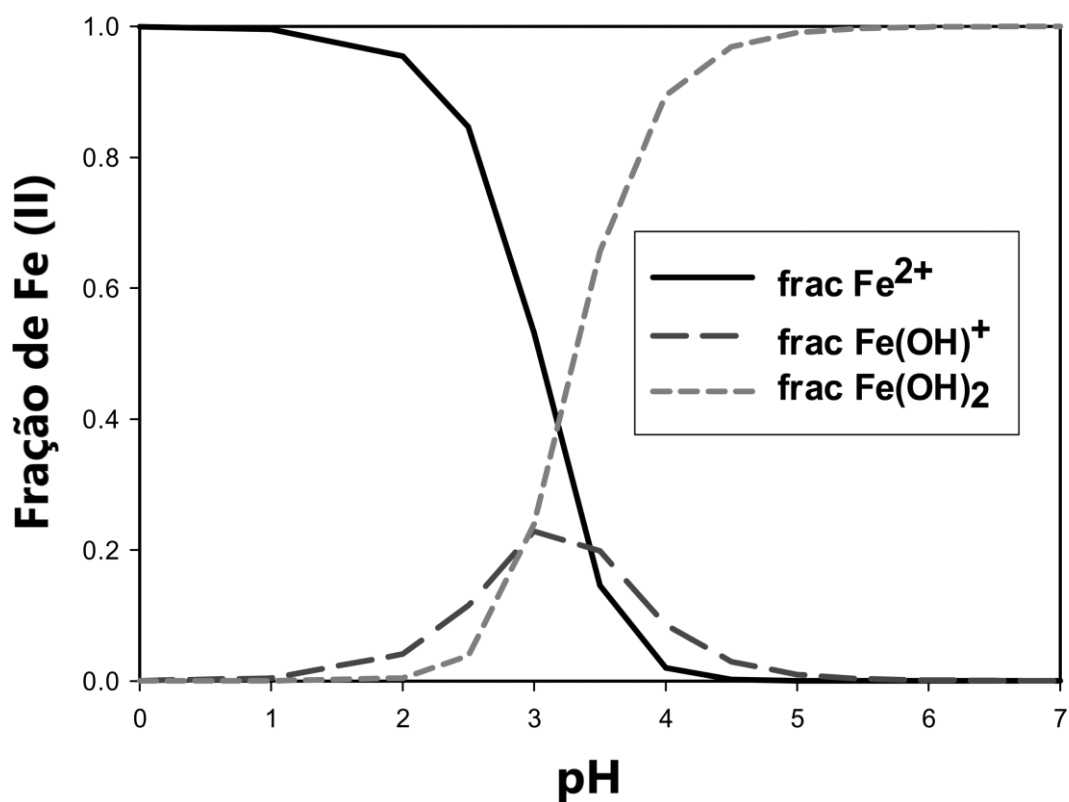


Figura 4: Diagrama de distribuição de espécies de ferro em função do pH.

Fonte: Adaptado de [53].

Já em soluções aquosas com pH superior a 4 ou inferiores a 2,5 espera-se queda abrupta da eficiência do processo, devido a formação majoritária de hidróxido férrico, (sendo este insolúvel em solução) e sequestro do radical hidroxil por íons H⁺, respectivamente. [52]

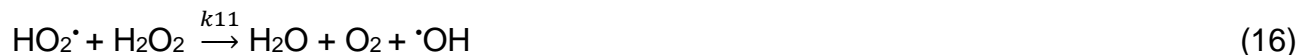
2.7 - Mecanismos de reações envolvidas no processo clássico de Fenton

Os mecanismos para degradação de contaminantes orgânicos via processo Fenton podem ser considerados complexos, devido ao grande número de radicais altamente reativos formados, curto tempo de permanência e inúmeros intermediários de reação. Nas equações 6 a 8 são apresentadas as possíveis recombinações em meio reacional para produção de espécies ativas contendo oxigênio que iniciam a oxidação:

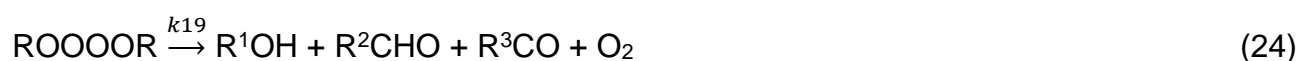
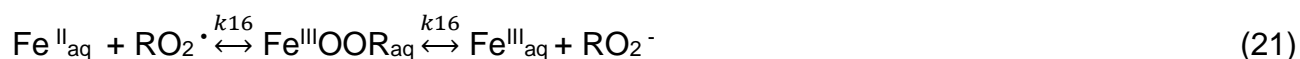
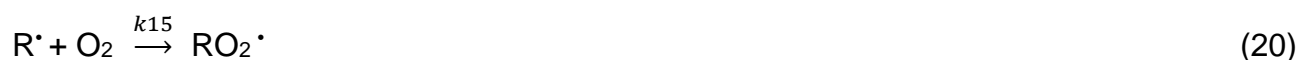


Já nas equações 9 a 17 são apresentadas as possíveis reações de transformação de espécies contendo oxigênio reativo em outras espécies de oxigênio:

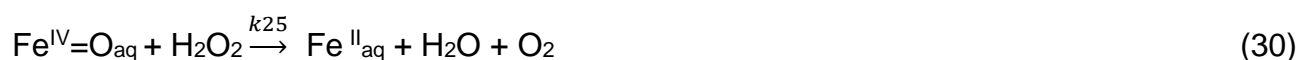
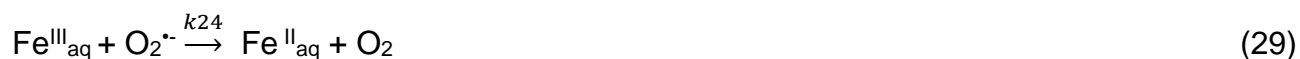




Nas equações 18 a 24 são apresentadas as possíveis reações de espécies de oxigênio com compostos orgânicos e suas futuras transformações:



E por fim, nas equações 25 a 34 são apresentadas as possíveis reações de terminação de intermediários reativo:





Deste modo, pode-se verificar que a utilização do processo Fenton como alternativa para a decomposição de poluentes orgânicos presentes em efluentes líquidos é uma alternativa adequada, uma vez que os mecanismos de reação já são compreendidos e reportados na literatura, além da simplicidade instrumental para a geração das espécies oxidantes deste processo. Contudo, devido ao imenso número de intermediário reativos formados, estudos de toxicidade são ferramentas adequadas para avaliação da qualidade do resíduo tratado, podendo desta maneira decidir a melhor estratégia sobre o descarte deste resíduo no meio ambiente.

2.8 - Toxicidade

A contaminação de ambientes terrestres e aquáticos por substâncias químicas é uma realidade muito estudada nos dias atuais. Tal problemática se inicia pelo consumo desenfreado de mais de 100.000 produtos químicos sintéticos disponíveis no mercado, prosseguindo com o descarte inadequado destes no meio ambiente. [84]

Com a finalidade de avaliar os efeitos danosos de tais substâncias químicas em organismos vivos, testes de toxicidade são praticados e utilizados como ferramentas valiosas para controle de poluição de resíduos específicos, podendo tais resultados servir como base científica para a implementação de normas para descarte no meio ambiente. [85]

Para o estudo de toxicidade aguda ou crônica, inúmeros métodos são disponíveis na literatura. No entanto, grande parte destes utilizam crustáceos, tais como da espécie *Artemia Salina* (AS), como bioindicador de toxicidade. A AS pode ser definida como um microcrustáceo da ordem *Anostraca* com tamanho e coloração variada, que dependem do tipo de alimento consumido pela espécie. A escolha deste organismo como bioindicador de toxicidade é justificada pela: (I) rapidez (isto é, 28 a 72 horas, desde a eclosão dos cistos até o primeiro ponto final); (II) custo-efetividade; (III) disponibilidade de náuplios nascidos de cistos comerciais duráveis (ovos); (IV) bom conhecimento de sua biologia e ecologia; (V)

fácil manipulação e manutenção em condições de laboratório; (VI) tamanho corporal pequeno permitindo acomodação em pequenos copos ou microplacas ; (VII) alta adaptabilidade a várias condições de teste. [84, 85]

Podendo ser avaliada como concentração letal (CL_{50}), testes de toxicidade aguda avaliam os efeitos tóxicos de efluentes específicos correlacionando a taxa de mortalidade do organismo teste e a concentração do contaminante estudado, sendo expresso o resultado em percentual, a qual quanto menor for este valor mais tóxico é considerado o efluente testado. [85]

Nesta perspectiva, a avaliação da toxicidade de resíduos contendo fármacos merecem ser tema de pesquisa, devido ao conhecimento já estabelecido sobre efeitos adversos ocasionados por tais moléculas em organismos vivos, podendo interagir com vários receptores de proteínas e DNA ocasionando lesões celulares e outras reações adversas. [86]

3 - Procedimento Experimental

Os experimentos de desenvolvimento e validação da metodologia analítica por CLAE e o estudo de degradação do efluente simulado contendo DGX via processo Fenton, foram realizados nos laboratórios de pesquisa e desenvolvimento da indústria farmacêutica Prati-Donaduzzi Cia Ltda. Já as análises de carbono orgânico total, quantificação de peróxido de hidrogênio residual e análises de toxicidade foram executadas nos laboratórios de pesquisa da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) campus Toledo.

3.1 - Reagentes

Os reagentes utilizados nesse trabalho de grau de pureza analítica (PA) foram: peróxido de hidrogênio 30% (m/m) (Anidrol); sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Anidrol); ácido sulfúrico (H_2SO_4) (Synth); metavanadato de amônio (NH_4VO_3) (Vetec); NaCl (Synth); $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Synth); Na_2SO_4 (Anidrol); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Synth); KCl (Synth). Já os reagentes grau cromatográfico (HPLC) foram: Acetonitrila (Merck) e água ultrapura (Millipore).

3.2 - Fármaco

O fármaco utilizado neste trabalho foi: Padrão de digoxina ($\text{C}_{41}\text{H}_{64}\text{O}_{14}$) (USP) e matéria prima de digoxina (Vital Laboratories Private), ambos concedidos pela indústria farmacêutica Prati-Donaduzzi Cia Ltda. Informações relevantes sobre este fármaco são apresentados na (TAB. 5).

Tabela 5: Informações sobre a DGX.

Nome	(nº Cas) ¹	Fórmula ¹	pK _a ¹	K _{ow} ²
Digoxina	(20830-75-5)	$\text{C}_{41}\text{H}_{64}\text{O}_{14}$	7,15	1,95

Fonte: 1. [55], 2. [56].

3.3 - Equipamentos

Os equipamentos e *softwares* utilizados neste trabalho estão listados na (TAB. 6).

Tabela 6: Equipamentos e *softwares* utilizados.

Equipamento / Software	Especificação	Fabricante
Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplado a detector de arranjo de diodos	LC-2030C 3D	Shimadzu
Empower ¹	3	Waters
Phmetro	827 pH Lab	Metrohm
Pipetador eletrônico	Multipette Xstream	Eppendorff
Ultrassom	E-300H	Elma
Purificador de água	Integral 5	Merck
Determinador de Carbono Orgânico Total	TOC-L	Shimadzu
Balança Analítica	XP205	Mettler Toledo
Espctrofotômetro UV-vis	UV-1800	Shimadzu
Excel	2016	Microsoft
Action Stat	2018	Portal Action

1 - *Software* utilizado para avaliação de dados cromatográficos.

3.4 - Validação da metodologia analítica por CLAE

Com a finalidade de garantir a confiabilidade dos dados obtidos no estudo de remoção da digoxina por processo Fenton, inicialmente validou-se a metodologia cromatográfica aplicada neste estudo. Para isso, avaliou-se os seguintes parâmetros de validação: seletividade, linearidade e limite de quantificação e detecção.

3.4.1- Sistema Cromatográfico

Na TAB. 7 são demonstrados os parâmetros cromatográficos aplicados no método proposto.

Tabela 7: Parâmetros cromatográficos.

Detector UV-vis	220 nm
Volume de injeção	100 µL
Temperatura de Forno	40° C
Coluna	Waters XBridge C18 x 100 mm x 4,6 mm x 3,5 µm
Fase móvel	H ₂ O ultrapura: Acetonitrila (73:27)
Tempo de análise	7,5 minutos
Fluxo	1,5 mL min ⁻¹
Tempo de retenção aproximado da DGX	5 minutos

3.4.2- Parâmetros de Validação

3.4.2.1- Adequação do Sistema (*System Suitability*)

De modo a verificar a adequabilidade do sistema cromatográfico, preparou-se uma solução padrão (substância química referência) de DGX com concentração de 10 mg L⁻¹, utilizando água ultrapura em pH 3,0, (ajustado com ácido clorídrico 0,1 M) como solvente.

Injetou-se esta solução em sextuplicata, a fim de verificar o atendimento de requisitos de adequação de sistema, listados na (TAB. 8).

Tabela 8: Critérios de aceitação de adequação de sistema cromatográfico.

Critério	Limite de aceitação
Desvio padrão Relativo de re-injeção	2% ^a
Número de pratos teóricos	2000 ^b
Fator de simetria	0,8 a 1,5 ^c

a. [57].

b. [75].

c. [57].

3.4.2.2- Linearidade

O estudo da linearidade foi realizado com a elaboração de três curvas analíticas, preparadas nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 2; 4; 6; 8 e 10 mg L⁻¹ utilizando água ultrapura em pH 3,0 como solvente. A faixa de trabalho estabelecida ficou de acordo com a sensibilidade do método e os resultados verificados conforme fluxograma apresentado na FIG. 5, seguindo recomendação do guia número 10, para tratamento estatístico de validação analítica disponibilizado pela Anvisa (2017). [56]

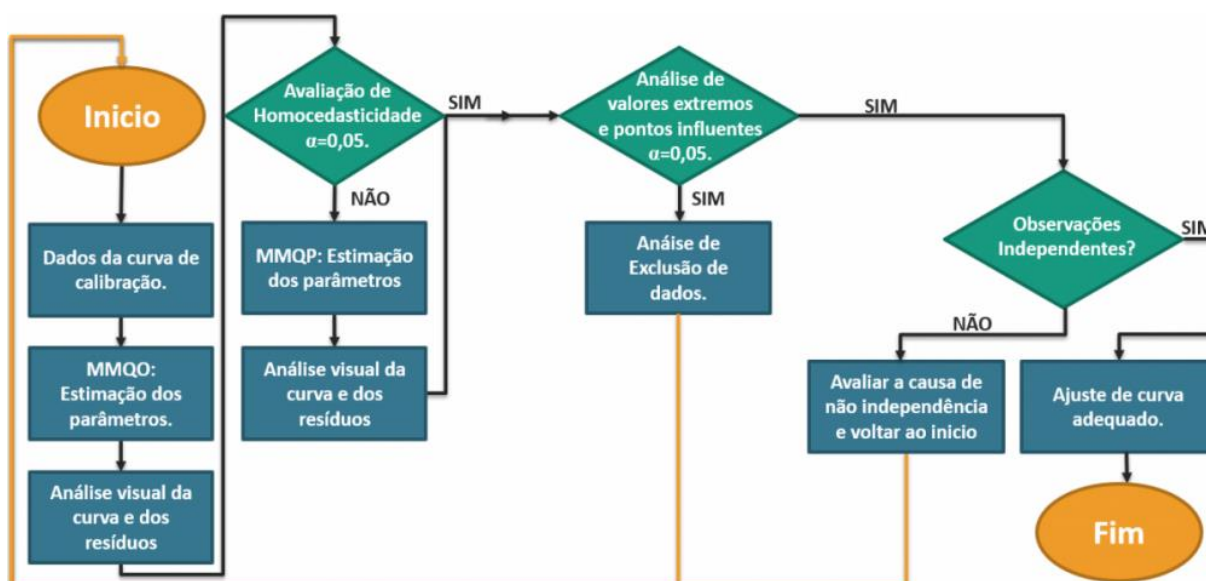


Figura 5: Fluxograma para avaliação da linearidade.

Fonte: [56]

3.4.2.3- Seletividade

A seletividade do método analítico foi verificada a partir da comparação dos cromatogramas da solução padrão de DGX e soluções contendo possíveis interferentes:

- Diluente (Branco 1): Água ultrapura ajustada para pH 3,0 com ácido clorídrico 0,1 M.
- Diluente + Fe²⁺ (Branco 2): Preparou-se uma solução contendo Fe²⁺ na concentração de 45 mg L⁻¹ solubilizado em água ultrapura em pH 3,0 (Diluente).
- Diluente + H₂O₂ (Branco 3): Preparou-se uma solução contendo peróxido de hidrogênio na concentração de 13320 mg L⁻¹ solubilizado em água ultrapura em pH 3,0 (Diluente).
- Diluente + Fe²⁺ + H₂O₂ (Branco 4): Preparou-se uma solução contendo peróxido de hidrogênio na concentração de 13320 mg L⁻¹ e Fe²⁺ na concentração de 45 mg L⁻¹ solubilizados em água ultrapura em pH 3,0 (Diluente).

Para este experimento avaliou-se o perfil cromatográfico da injeção padrão de DGX frente as injeções de soluções branco (1, 2, 3 e 4) contendo possíveis interferentes. Averiguou-se a eluição de picos provenientes das soluções branco, avaliando seus possíveis impactos para a quantificação da DGX.

3.4.2.4- Limite de Quantificação

O limite de quantificação foi averiguado a partir da análise do sinal analítico do ponto de menor concentração da curva de linearidade, 1% (0,1 mg L⁻¹), a qual este deveria apresentar valor da relação sinal/ruído (S/N) superior a 10. [57]

3.4.2.5- Limite de Detecção

O limite de detecção foi averiguado a partir da diluição do padrão de DGX a 0,1% (0,01 mg L⁻¹), e verificado se este ponto apresenta relação sinal ruído (S/N) superior a 2. [57]

3.5 - Ensaio experimentais de Fenton

Tais experimentos tiveram a finalidade de avaliar primeiramente a estabilidade da molécula de DGX a condições de: hidrólise ácida, oxidação por reagente oxidante (H_2O_2) bem como íons metálicos (Fe^{2+}) e fotodegradação a radiação ultravioleta (320 nm). O conhecimento de tais fatores é de fundamental importância para a justificativa de implementação de um processo secundário de tratamento do poluente estudado, uma vez que se o mesmo demonstrasse degradação espontânea as condições estudadas não haveria a necessidade da utilização do processo Fenton para degradação do mesmo. Na sequência, devido a constatação de estabilidade da molécula de DGX as condições aplicadas, iniciou-se o estudo da implementação do processo Fenton para remoção da DGX presente em efluente simulado. Neste estudo, avaliou-se diferentes condições de proporção dos reagentes Fe^{2+} e H_2O_2 além da variação de pH, sendo analisada a cinética de degradação da molécula de DGX.

3.5.1- Estabilidade da digoxina a reações de hidrólise ácida, oxidação e fotodegradação

Para a execução deste teste, primeiramente preparou-se 1 litro de solução estoque de DGX na concentração de 10 mg L^{-1} utilizando como solvente água ultrapura previamente acidificada para pH 3,0 com HCl 0,1 M.

Posteriormente, esta solução foi dividida em 4 porções de 200 mL, sendo:

- I. Solução DGX controle, a qual estava presente digoxina (10 mg mL^{-1}) e água acidificada a pH 3,0, mantida a temperatura ambiente, durante 24 horas.
- II. Solução DGX contendo Fe^{2+} , a qual estava presente digoxina (10 mg mL^{-1}), água acidificada a pH 3,0 e $45 \text{ mg mL}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$, mantido a temperatura ambiente, durante 24 horas.
- III. Solução DGX contendo H_2O_2 , a qual estava presente digoxina (10 mg mL^{-1}), água acidificada a pH 3,0 e $13320 \text{ mg mL}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$, mantido a temperatura ambiente, durante 24 horas.
- IV. Solução DGX exposta a radiação ultravioleta, a qual estava presente digoxina (10 mg mL^{-1}) e água acidificada a pH 3,0. No entanto, esta solução foi introduzida em uma câmara de fotoestabilidade com irradiação de luz ultravioleta a 320 nm, durante 24 horas.

Após preparadas as quatro soluções, as mesmas foram analisadas por CLAE após 24 horas de exposição aos degradantes previamente mencionados.

Na FIG. 6, é apresentado o esquema aplicado neste experimento, e na TAB. 9 são apresentadas as concentrações dos degradantes utilizados no estudo de estabilidade da digoxina em meio aquoso.

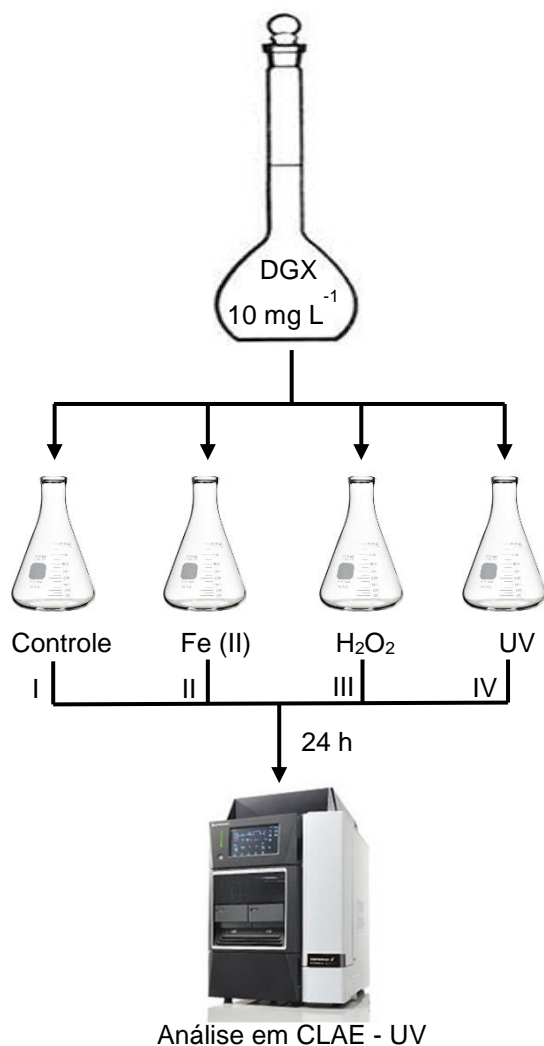


Figura 6: Esquema experimental do teste de estabilidade de DGX a condições de: (I) Solução DGX controle; (II) Solução DGX contendo Fe²⁺; (III) Solução DGX contendo H₂O₂; (IV) Solução DGX exposta a radiação ultravioleta. E analisadas por CLAE após 24 horas.

Tabela 9: Estudo de estabilidade de DGX. Condições de degradação a serem estudadas.

Amostra	Concentração de DGX (mg L ⁻¹)	Concentração / Condição	Tempo de exposição (horas)
Solução DGX controle	10	-	24
Solução DGX contendo Fe ²⁺	10	45 mg L ⁻¹	24
Solução DGX contendo H ₂ O ₂	10	13320 mg L ⁻¹	24
Solução DGX exposta a radiação ultravioleta	10	320 nm	24

É importante ressaltar que as concentrações dos reagentes (H₂O₂ e Fe²⁺) foram definidas de acordo com as condições de estudo máximas praticadas nos ensaios de remoção de DGX (item 3.5.2) por processo Fenton. Desta maneira, podendo avaliar a influência de cada reagente no processo de remoção, além da união destes para a formação de espécies radicalares.

3.5.2- Estudo da remoção de digoxina – Avaliação das condições de: pH e concentração dos reagentes H₂O₂ e Fe²⁺

Este teste teve como finalidade definir condições de pH e concentrações dos reagentes H₂O₂ e Fe²⁺ para degradação da DGX presente em efluente simulado, uma vez que os resultados averiguados no teste de estabilidade em meio aquoso demonstraram que o poluente estudado foi estável as condições testadas de: hidrólise catalisada por ácido, oxidação por reagente oxidante (H₂O₂) e íons metálicos (Fe²⁺) durante o período de 24 horas. Desta maneira sendo justificada a utilização de um sistema de oxidação avançada para o tratamento do efluente simulado.

3.5.2.1- Estudo da influência da variável pH na remoção da digoxina em efluente simulado.

Este experimento teve como objetivo avaliar a influência exclusiva da variável pH na remoção da DGX presente em efluente simulado. Para isso, os valores de pH foram variados entre 2 a 4, tendo como ponto central pH 3.

A escolha desta faixa de pH foi de acordo com conhecimento já estabelecido na literatura, a qual considera a faixa de pH mais adequada para a aplicabilidade do processo Fenton em valores próximos a 3. Neste valor de pH verifica-se a formação majoritária do aquo-complexo $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$, espécie responsável pela função catalítica de geração de radicais hidroxila. [45,52,60]

Já em valores de pH superior e inferior a 3, espera-se redução da eficiência do processo de degradação, ocasionada pela menor disponibilidade de radical hidroxil no meio reacional. [52,60]

Em pH superior a 3 a redução da eficiência do processo é justificada pela ocorrência da formação de espécies de ferro insolúveis ($\text{Fe}(\text{OH})_2^+$) e a dissociação de H_2O_2 em H_2O e oxigênio molecular. Já em valores de pH inferiores a 3, a redução da eficiência é devido a formação de íons oxônio (H_3O_2^+) decorrentes da reação de H_2O_2 com íons H^+ , e sequestro de radicais hidroxila por íons H^+ . [60-61]

Para a elaboração deste teste preparou-se inicialmente 1 L de solução de DGX 10 mg L^{-1} em água ultrapura. Transferiu-se 0,1 L desta solução para 3 diferentes Erlenmeyers (1, 2 e 3) de 0,2 L. Com o auxílio de um pHmetro aferiu-se o pH das soluções em 2, 3 e 4 com HCl 0,1 M. Retirou-se alíquotas de 150 μL de cada Erlenmeyer (1, 2 e 3) separadamente submetendo-as a análise por CLAE para avaliação do teor de DGX presente nas soluções antes do início do processo oxidativo avançado proposto. Estas amostras foram consideradas como amostras controles, para avaliação da variação de teor de digoxina em função do pH com o passar do tempo.

Após análise das amostras controle, adicionou-se aos Erlenmeyers 1, 2 e 3 quantidades de Fe^{2+} suficiente para confecção de soluções com concentração de 30 mg L^{-1} solubilizando o íon metálico por agitação magnética durante 5 minutos. Após solubilizado, adicionou-se aos mesmos Erlenmeyers quantidade de H_2O_2 suficiente para confecção de soluções com concentração de 9990 mg L^{-1} , sendo mantida agitação magnética durante todo o tempo de estudo, 40 minutos.

Retirou-se alíquotas de 150 μL a cada 7,5 minutos para análise em CLAE sendo avaliado a variação de teor de DGX com o passar do tempo. O tempo de 7,5 minutos foi definido em função do tempo necessário de análise da metodologia analítica desenvolvida, não sendo possível fazer verificações com tempos inferiores a este.

Na FIG. 7 é apresentado um esquema experimental aplicado no estudo da influência da variável pH na remoção de DGX.

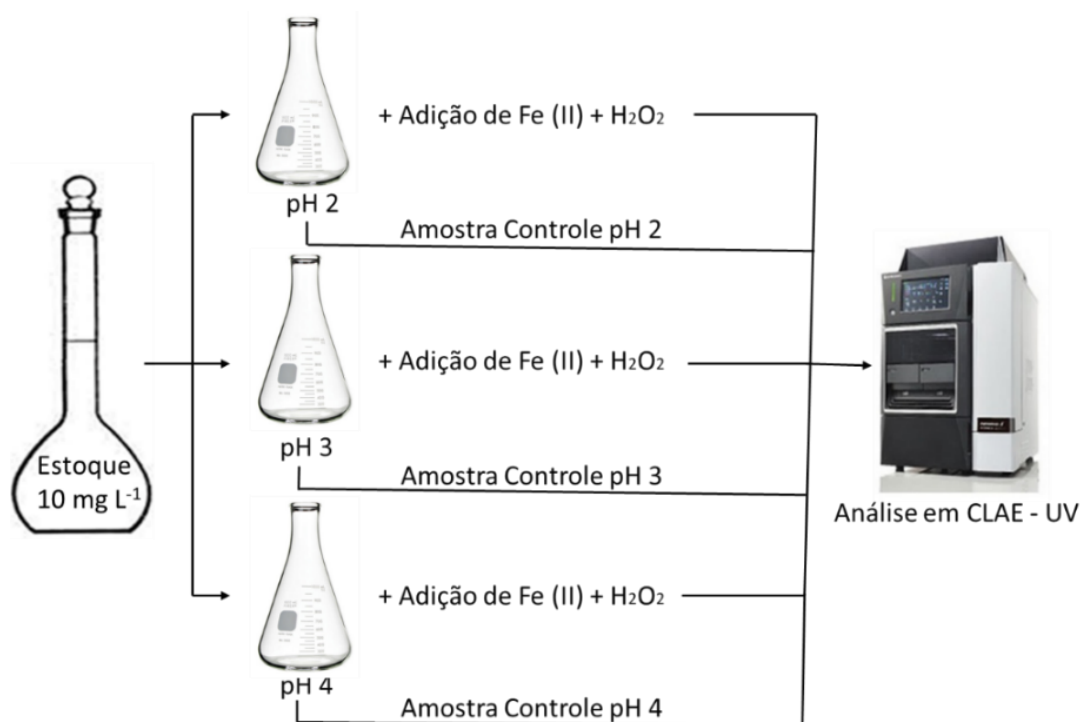


Figura 7: Esquema experimental para análise da influência da variável pH na degradação de DGX por reações de Fenton.

Na TAB. 10 estão apresentadas as concentrações de Fe^{2+} e H_2O_2 utilizadas na execução do experimento de variação de pH.

Tabela 10: Estudo da influência da variável pH na eficiência da degradação de DGX.

Erlenmeyer	pH	Concentração de DGX (mg L ⁻¹)	Concentração de Fe ²⁺ (mg L ⁻¹)	Concentração de H ₂ O ₂ (mg L ⁻¹)
1	2	10	30	9990
2	3	10	30	9990
3	4	10	30	9990

3.5.2.2- Estudo da influência da variável concentração dos reagentes H₂O₂ e Fe²⁺ na remoção da digoxina em efluente simulado.

Este experimento teve como finalidade avaliar a influência específica das concentrações dos reagentes: H₂O₂ e Fe²⁺ na remoção da digoxina presente em efluente simulado. Para isso, a escolha das concentrações de H₂O₂ e Fe²⁺ aplicados neste estudo foram baseados em observações feitas por Pignatello *et al.* (2007), a qual sugere uma correlação entre 100 a 1000 entre as concentrações de H₂O₂ e Fe²⁺ para tratamento de água. Neste contexto, a escolha adequada da dose de peróxido reflete na eficiência da degradação, enquanto a concentração de Fe²⁺ é importante para a cinética da reação. [53,63]

Além disso, a escolha da concentração de Fe²⁺ levaram em consideração dados contidos na resolução número 430, de 13 de maio de 2011, do conselho nacional do meio ambiente (CONAMA), em que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes ao meio ambiente, onde é delimitado a concentração máxima de descarte de ferro dissolvido em 15 mg L⁻¹, desta maneira evitando a utilização de quantidades muito superiores a esta, tendo em visto a necessidade da inserção de tratamento secundário para a remoção do da concentração de ferro dissolvido excedente a normativa.

Para a execução deste teste, primeiramente preparou-se 1 litro de solução estoque de DGX na concentração de 10 mg L⁻¹ utilizando como solvente água ultrapura previamente acidificada para pH 3,0 com HCl 0,1 M. Retirou-se uma alíquota de 150 µL desta solução submetendo-a a análise por CLAE para avaliação do teor de DGX presente na solução antes do processo oxidativo avançado proposto (solução controle).

Transferiu-se então 0,1 L da solução estoque de DGX (10 mg L⁻¹) para 6 Erlenmeyers distintos de 0,2 L (1, 2, 3, 4, 5, e 6). Na sequência adicionou-se quantidades de Fe²⁺

suficientes para confecção de soluções com concentrações conforme dispostas nas TAB. 11 e 12, solubilizando o íon metálico por agitação magnética durante 5 minutos. Após completa solubilização, adicionou-se aos mesmos Erlenmeyers quantidades de H₂O₂ suficiente para confecção de soluções com concentração conforme dispostas nas TAB. 11 e 12, sendo mantida a agitação magnética durante todo o tempo de estudo, 40 minutos.

Retirou-se alíquotas de 150 µL a cada 7,5 minutos para análise em CLAE sendo avaliado a variação de teor de DGX com o passar do tempo.

Nas TAB. 11 e 12 estão apresentadas as concentrações de Fe²⁺ e H₂O₂ utilizadas na execução dos experimentos de variação a concentração de H₂O₂ e Fe²⁺ respectivamente.

Tabela 11: Estudo da influência da variável concentração de H₂O₂ na eficiência da degradação de DGX.

Erlenmeyer	Concentração de DGX (mg L ⁻¹)	pH	Concentração de Fe ²⁺ (mg L ⁻¹)	Concentração de H ₂ O ₂ (mg L ⁻¹)
1	10	3	30	6660
2	10	3	30	9990
3	10	3	30	13320

Tabela 12: Estudo da influência da variável concentração de Fe²⁺ na eficiência da degradação de DGX.

Erlenmeyer	Concentração de DGX (mg L ⁻¹)	pH	Concentração de Fe ²⁺ (mg L ⁻¹)	Concentração de H ₂ O ₂ (mg L ⁻¹)
4	10	3	15	9990
5	10	3	30	9990
6	10	3	45	9990

Na FIG. 9 é apresentado um esquema experimental aplicado no estudo da influência da concentração de H₂O₂ e Fe²⁺ na remoção de DGX no efluente simulado.

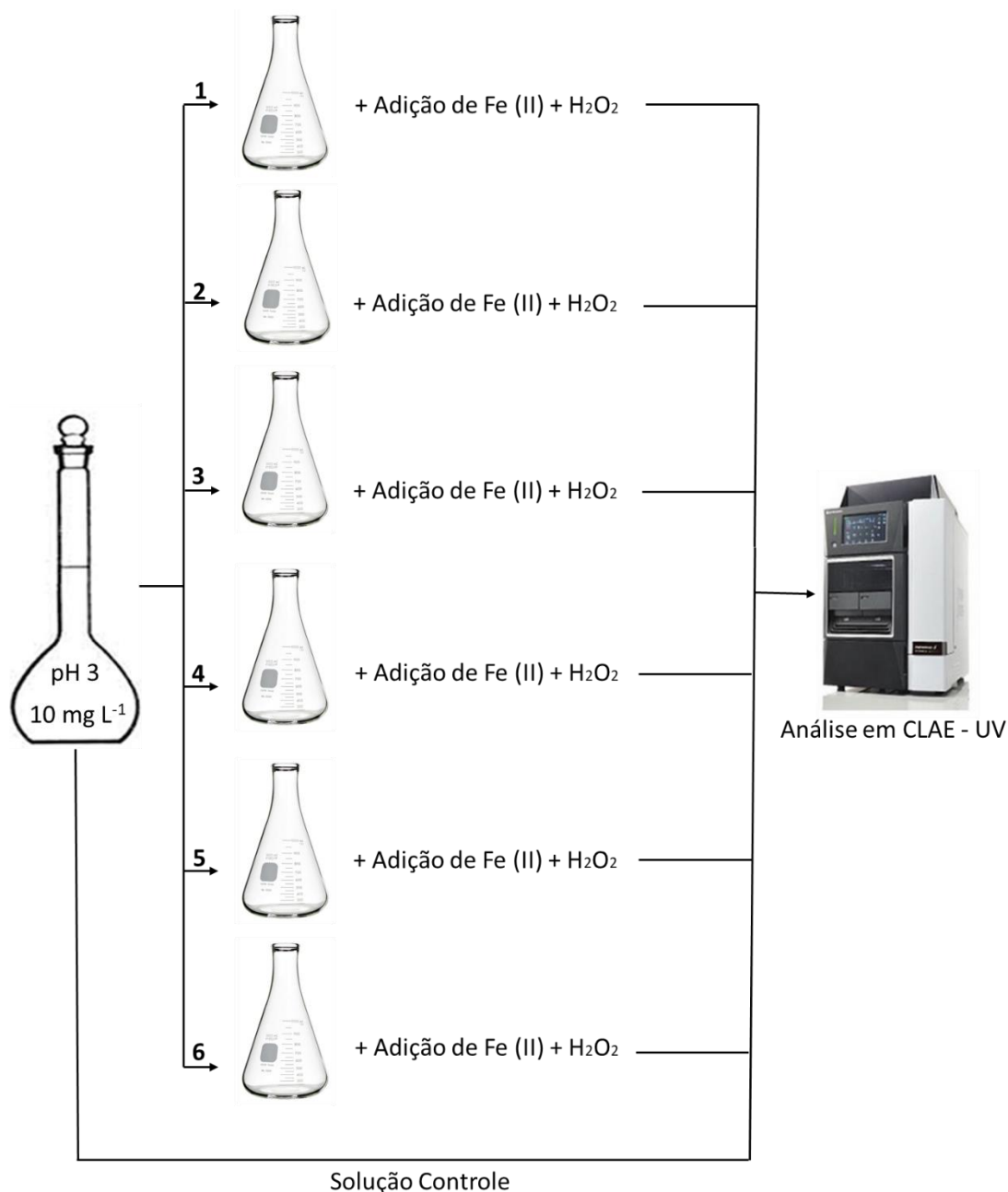


Figura 8: Esquema experimental para análise da influência das variáveis concentração de H₂O₂ e Fe²⁺ na degradação de DGX por processo Fenton.

3.6 - Determinação de peróxido de hidrogênio residual

Os níveis de peróxido de hidrogênio residual foram avaliados pelo método espectrofotométrico, baseado na formação do cátion peroxovanádio após reação com metavanadato (NH₄VO₃) em meio ácido, conforme (Eq. 35). (58)



Uma alíquota de 1 mL da amostra (efluente simulado em degradação) foi adicionada em um erlenmeyer e diluída com 39 mL de água ultrapura. Após diluição, pipetou-se 1 mL da amostra diluída para uma cubeta de vidro contendo 2 mL de metavanadato em meio ácido. Após repouso de 2 min foi realizada a leitura da absorbância a 450 nm em espectro de UV-vis.

Na FIG. 9 é apresentado um esquema da análise de peróxido de hidrogênio residual utilizando metodologia espectroscópica (UV-Vis).

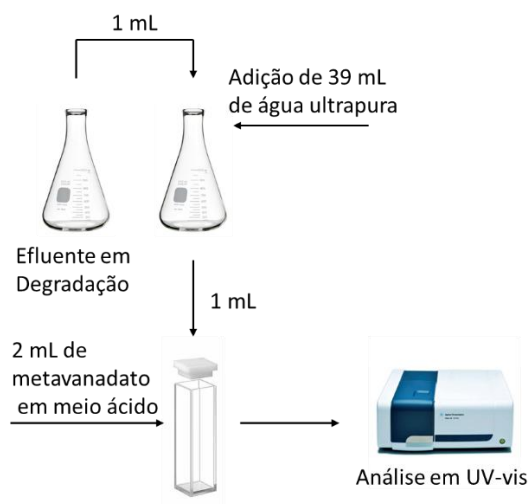


Figura 9: Esquema experimental para análise de peróxido de hidrogênio residual da degradação de DGX por reações de Fenton.

A concentração de H_2O_2 residual presente na amostra foi obtida pela interpolação dos dados obtidos na curva de calibração realizada com a solução padrão de H_2O_2 , preparadas com concentrações de 0 a 300 mg L^{-1} .

3.7 - Determinação de Carbono Orgânico Total (COT)

As análises de carbono orgânico total foram realizadas em um analisador de carbono orgânico total Shimadzu TOC-L, com limite de detecção de $4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ fundamentado em

oxidação catalítica a elevadas temperaturas e determinação de CO₂ por espectroscopia de infravermelho.

Para análise, necessitou unicamente da filtração da solução amostra que se encontrava em degradação, utilizando membrana hidrofílica PVDF com tamanho de poro de 0,45 µm. A introdução das amostras no equipamento foi a partir de um amostrador automático modelo OCT-L. As respostas de COT presente em cada amostra foi gerada pelo próprio *software* e expressa em mg L⁻¹.

3.8 - Estudo de toxicidade

Com a finalidade de avaliar a toxicidade da DGX presente em efluente simulado (antes a após tratamento por processo Fenton), efetuou-se experimentos de toxicidade utilizando como bioindicador o microcrustáceo da espécie *Artemia Salina* (AS). Borba *et al.* (2019) destacaram que o uso de AS como bioindicador de toxicidade compõe um bioensaio de: baixo custo, grande sensibilidade a substâncias tóxicas e resposta rápida onde é possível estimar os níveis reais de toxicidade diretamente.

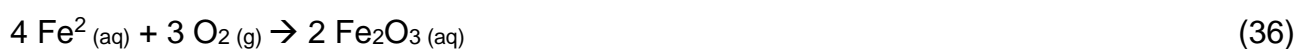
Os testes de toxicidade foram contemplados para as seguintes amostras:

1. **Resíduo simulado sem tratamento:** Em que continha DGX (10 mg L⁻¹) solubilizada em água ultrapura acidificada para pH 3,0 com HCl 0,1 M.
2. **Resíduo simulado tratado com processo Fenton:** Em que continha DGX, íons ferro e peróxido de hidrogênio residual provenientes da reação do processo Fenton. Condições operacionais: [DGX] = 10 mg L⁻¹; [Fe²⁺] = 30 mg L⁻¹, [H₂O₂] = 9990 mg L⁻¹, pH = 3,0; Tempo de reação = 40 minutos.
3. **Solução controle Fenton:** Contendo íons ferro e peróxido de hidrogênio residual provenientes da reação do processo Fenton. Condições operacionais: [DGX] = 0 mg L⁻¹; [Fe²⁺] = 30 mg L⁻¹, [H₂O₂] = 9990 mg L⁻¹, pH = 3,0; Tempo de reação = 40 minutos.

Tendo a finalidade de avaliar a toxicidade exclusiva da DGX presente no meio reacional, e não de substâncias presentes no processo Fenton, tais como: íons ferrosos, peróxido de hidrogênio residual e espécies oxidativas (radicais), houve a necessidade de fazer um preparo de amostras adequado para remoção de tais interferentes.

3.8.1- Preparo de amostras do estudo de toxicidade de DGX

- I) **Resíduo simulado sem tratamento** = Aferiu-se o pH da solução para 9,0 (mesmo pH da solução de Meyer).
- II) **Resíduo simulado tratado com processo Fenton** = Após o tempo de degradação (40 minutos), iniciou-se o processo de remoção dos íons ferro presente em solução, para isso as seguintes etapas foram executadas:
- a) Ajuste do pH da solução em 9,0 (mesmo pH da solução de Meyer), ocorrendo precipitação dos íons ferrosos (Fe^{2+}) solúveis em água em hidróxido de ferro, espécie insolúvel em pH alcalino, conforme observações de Khatri *et al.* (2017) demonstradas nas (Eq. 36, 37).



- b) Centrifugação da solução (5000 rpm por 20 minutos), para separação de fases (sólida e líquida).
- c) Filtração do sobrenadante em membrana hidrofílica PVDF com 0,22 μm .

Na sequência, iniciou-se o procedimento de remoção do peróxido de hidrogênio residual. Tendo em vista a grande instabilidade química do peróxido de hidrogênio, devido a ligação peroxi entre os átomos de oxigênio (-O-O-) que é essencialmente instável e ativa, aplicou-se etapas de favorecimento da decomposição deste reagente da seguinte maneira:

- a) Transferiu-se exatamente 50 mL da solução recém filtrada para béquer de 100 mL.
- b) Aplicou-se agitação magnética com aquecimento de 80 °C até não ser mais observado desprendimento de bolhas (em torno de 45 minutos) resultantes da formação de oxigênio molecular proveniente da conversão do peróxido de hidrogênio residual, conforme (Eq. 38) [89-93]:



A temperatura de 80 °C foi definida aleatoriamente neste experimento, tendo a função de acelerar a decomposição do peróxido de hidrogênio, conforme observações já feita por Takaji *et al.* (1985), a qual estudou a decomposição térmica do peróxido de

hidrogênio em solução aquosa, concluindo que a mesma se dá por uma reação cinética de primeira ordem.

- c) Resfriamento da solução a temperatura ambiente, e verificação do volume remanescente. Adicionou-se água ultrapura para correção do volume para 50 mL. Esta etapa foi devido a possível evaporação de água presente em solução, evitando desta maneira a concentrando a DGX presente na solução amostra.
- III) **Solução controle Fenton** = aplicou-se exatamente o mesmo procedimento descrito para “Resíduo simulado tratado com processo Fenton”.

3.8.2- Execução do estudo de toxicidade de DGX

Seguindo a metodologia descrita por Meyer et al. (1982), iniciou-se o experimento eclodindo os cistos de AS. Para isso, preparou-se uma solução nutritiva (Solução de Meyer) que continha: $23,0 \pm 0,1$ g de NaCl, $11,0 \pm 0,1$ g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $4,0 \pm 0,1$ g de Na_2SO_4 , $1,3 \pm 0,1$ g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ e $0,7 \pm 0,1$ g de KCl por litro de solução. O pH da solução foi ajustado para 9,0, adicionando uma solução concentrada de Na_2CO_3 . Após este preparo, adicionou-se a um béquer de vidro: 2 litros de Solução de Meyer e cerca de 20 gramas de cistos de AS. Armazenou-se esta solução em local isento de contaminação sob a irradiação de lâmpada incandescente e temperatura ambiente durante o período de 48 horas. Após a eclosão dos cistos em náuplios, iniciou-se o bioteste realizando diluições sucessivas (em triplicata) do efluente estudado (Resíduo sintético sem tratamento, Resíduo sintético tratado com processo Fenton e Solução controle Fenton) a um volume final de 5 mL em tubos de ensaio de 10 mL. Para as diluições utilizou-se a própria Solução de Meyer como solução diluente, deixando o efluente estudado nas concentrações de: 100%, 80%, 60%, 40% e 20%, onde a concentração (v/v) do efluente simulado variou de 100% a 20%, obtendo desta maneira uma redução particionada da toxicidade. A cada tubo de ensaio adicionou-se 10 náuplios vivos, os quais foram posteriormente mantidos sob a presença de luz ambiente em local isento de contaminantes pelo período de 24 horas. Após este tempo, registrou-se o número de náuplios mortos em cada tubo de ensaio, desta maneira sendo estimada a concentração letal média (CL_{50}) das soluções analisadas, utilizando o software *Trimmed Spearman-Kärber Method*, versão 1.5. [87, 88]

4 - Resultados e Discussões

4.1 - Validação da metodologia analítica por CLAE

A validação de um procedimento analítico é o processo que evidencia de maneira documental, a partir de dados científicos e experimentais, que o método proposto realiza aquilo o que é indicado a fazer. [57]

Devido a equivalência das faixas de absorção na região do ultravioleta da DGX e peróxido de hidrogênio (220 nm), averiguou-se a necessidade do desenvolvimento de uma metodologia analítica por CLAE que fosse seletiva o suficiente para separar e quantificar a DGX ao decorrer da reação de Fenton.

Tal metodologia, foi desenvolvida de acordo com guias nacionais e internacionais, tais como ICH, USP, ANVISA e demonstrou-se linear a uma faixa de concentração de 0,1 a 10 mg L⁻¹, seletiva para a finalidade proposta por não apresentar co-eluição de picos decorrentes de reagentes (Fe²⁺ e H₂O₂) ou subprodutos da interação destes, apresentando limite de quantificação de 0,1 mg L⁻¹, e limite de identificação de 0,01 mg L⁻¹.

Demais detalhes pertinentes ao desenvolvimento analítico podem ser verificados no Apêndice 1.

4.2 - Ensaios experimentais de Fenton

4.2.1- Estabilidade da digoxina a reações de hidrólise ácida, oxidação e fotodegradação

Na TAB. 13 são apresentados os resultados da degradação da DGX do estudo de estabilidade aos reagentes: Fe²⁺, H₂O₂ e radiação UV (320 nm), durante o período de 24 horas.

Tabela 13: Resultados do estudo de estabilidade da DGX aos reagentes: Fe²⁺, H₂O₂ e irradiação UV (320 nm) por 24h.

Amostra	Concentração de DGX (mg L ⁻¹)	Concentração / Condição	Tempo de exposição (horas)	Degradação (%)
Solução DGX controle	10	-	24	3,7
Solução DGX contendo Fe ²⁺	10	45 mg L ⁻¹	24	6,9
Solução DGX contendo H ₂ O ₂	10	13320 mg L ⁻¹	24	9,1
Solução DGX exposta a radiação ultravioleta	10	320 nm	24	4,9

Conforme verificado na TAB. 13 a DGX apresentou-se estável as condições de degradação a que foi submetida, pois exibiu decaimento de teor inferior a 10% em todos os testes executados, demonstrando a necessidade de tratamentos secundários para degradação desta molécula.

Ressalta-se que o efluente simulado utilizado nos experimentos foi mantido em pH 3, condição de pH que pode ocasionar produtos de degradação via hidrólise catalisada por ácido. Três produtos de degradação da digoxina podem ser formados majoritariamente nestas condições, que são: digoxigenina-bisdigitoxosídeo, digoxigenina-monotoxosídeo e digoxigenina. Na FIG. 10 são apresentados os principais produtos de degradação via reação de hidrólise ácida da DGX.

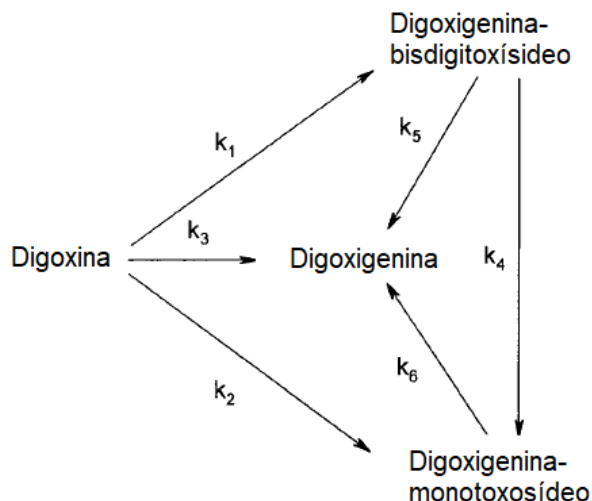


Figura 10: Produtos de degradação da DGX ocasionados por hidrólise catalisada por ácido.

Fonte: Adaptado de [59].

Em condições reais de rios e lagos, em que o pH da água se apresenta entre 6 a 8 espera-se que a DGX permaneça inalterada no ambiente. Vasić *et al.* (2006), investigaram a estabilidade da DGX em condições de pH 7 e de degradação fotoquímica, e os resultados deste trabalho demonstraram que em pH neutro a DGX se demonstrou extremamente estável. Já quando exposta a radiação UV sob a emissão total de lâmpada Xe (200 a 320 nm), verificou-se completa degradação em 40 minutos de exposição, formando foto produtos de isomerização e dimerização, decorrente da clivagem do anel lactona. No entanto, quando submetida a fotodegradação em comprimentos de onda superiores a 320 nm quase nenhuma degradação por foto exposição foi observada. [29]

4.2.2- Estudo da influência da variável pH na remoção da digoxina em efluente simulado.

Na FIG. 11 são apresentados os cromatogramas resultantes da influência da variação do pH no processo de decomposição da DGX por processo Fenton.

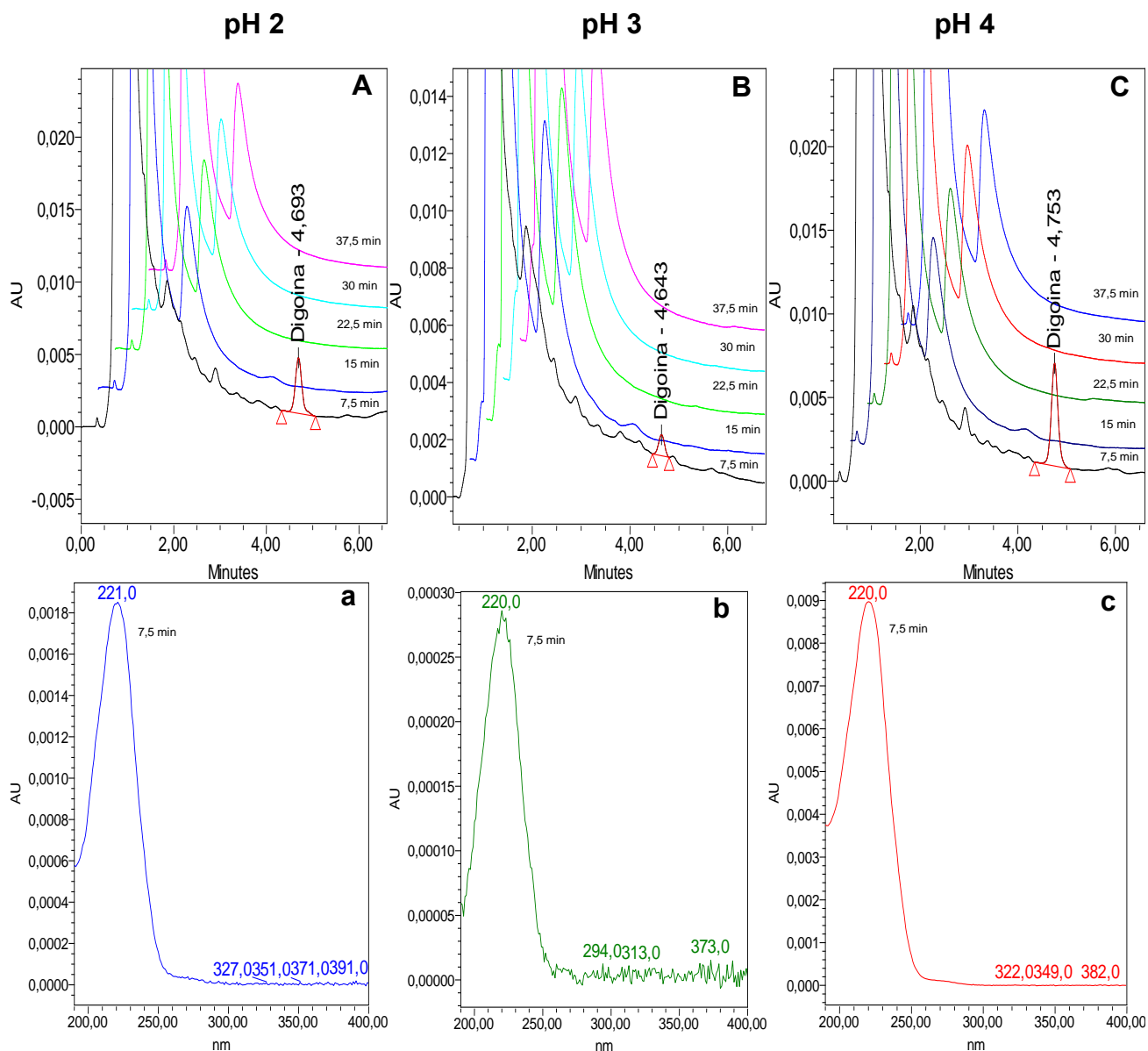


Figura 11: Sobreposição dos cromatogramas e espectros de absorção na região do UV (200 – 400 nm) do estudo de variação de pH para a degradação de DGX por processo Fenton. Condições de estudo: (A, a) $[DGX] = 10 \text{ mg L}^{-1}$, $[H_2O_2] = 9990 \text{ mg L}^{-1}$, $[Fe^{2+}] = 30 \text{ mg L}^{-1}$, pH 2; (B, b) $[DGX] = 10 \text{ mg L}^{-1}$, $[H_2O_2] = 9990 \text{ mg L}^{-1}$, $[Fe^{2+}] = 30 \text{ mg L}^{-1}$, pH 3; (C, c) $[DGX] = 10 \text{ mg L}^{-1}$, $[H_2O_2] = 9990 \text{ mg L}^{-1}$, $[Fe^{2+}] = 30 \text{ mg L}^{-1}$, pH 4.

Na TAB. 14 são apresentados os resultados experimentais de taxa de remoção da DGX em função do pH.

Tabela 14: Resultados da taxa de remoção (%) de DGX em função da variação do pH. Condições de estudo: [DGX] = 10 mg L⁻¹; [H₂O₂] = 9990 mg L⁻¹; [Fe²⁺] = 30 mg L⁻¹, pH = variando de 2 a 4.

Tempo (minutos)	pH 2 (% de remoção)	pH 3 (%de remoção)	pH 4 (%de remoção)
0	0	0	0
7,5	77 ± 6	91 ± 4	89 ± 3
15	99 ± 1	100 ± 0	100 ± 0
22,5	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
30	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
37,5	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0

Observação. Tempo 0 refere-se a amostra controle respectiva a cada valor de pH.

Na FIG. 14 é apresentado o gráfico que correlaciona a taxa de remoção de DGX verificado no estudo de variação de pH por processo Fenton.

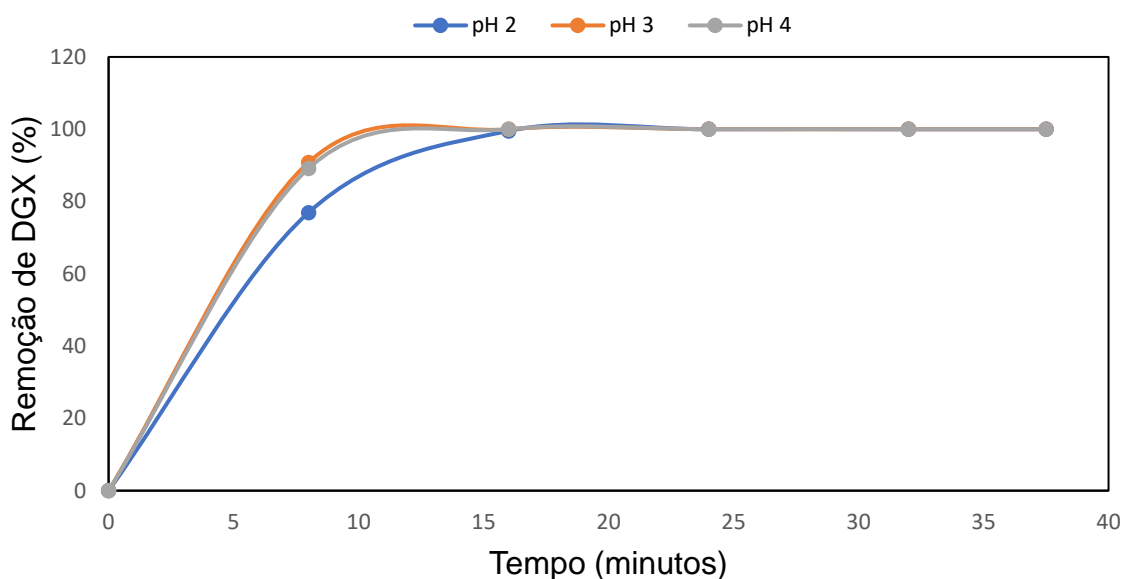


Figura 12: Gráfico dos resultados da remoção de DGX em função do tempo para as amostras submetidas ao estudo de variação de pH. A linha em azul refere-se ao estudo conduzido em pH 2, a linha em laranja refere-se ao estudo conduzido em pH 3 e a linha em cinza refere-se ao estudo conduzido em pH 4.

A partir da análise dos resultados, verifica-se que a DGX apresentou degradação de 77 ± 6 , 91 ± 4 e $89 \pm 3\%$ nos primeiros 7,5 minutos de reação para as condições de pH 2, 3 e 4 respectivamente. Após 15 minutos somente em condição de pH 2 detectou-se quantidade de DGX superior ao limite de detecção, de 0,1%. Nota-se que em todos os valores de pH analisados neste estudo a DGX apresentou degradação completa após 22,5 minutos. No entanto, os melhores resultados foram observados em pH 3, devido a maior taxa de remoção do contaminante em um menor período de tempo em comparação aos demais valores analisados.

Tais resultados vão de acordo com observações conduzidos por Gupta *et al.* (2018), em que investigaram a influência do pH na taxa de remoção de cloridrato de ciprofloxacino em efluente simulado, e concluíram que a condição de pH que propiciou melhor eficiência tanto para a degradação quanto para a mineralização do contaminante foi em pH 3.

Elmolla *et al.* (2009), investigaram a influência das variáveis: pH e concentração de reagentes H_2O_2 e Fe^{2+} para a otimização do processo de Fenton para tratamento dos antibióticos amoxicilina, ampicilina e cloxacilina em solução aquosa. Seus resultados demonstraram dependência significativa (a um nível de significância de 5%) da variável pH para a degradação destes micropoluentes, sendo considerado o pH ótimo para o tratamento do efluente simulado em pH 3. [62]

4.3 - Estudo da influência da variável concentração dos reagentes H_2O_2 e Fe^{2+} na remoção da digoxina em efluente simulado.

4.3.1- Variação da concentração de Fe^{2+}

Na FIG. 13 são apresentados os cromatogramas resultantes da influência da variação da concentração de Fe^{2+} no processo de decomposição da DGX por reações de Fenton.

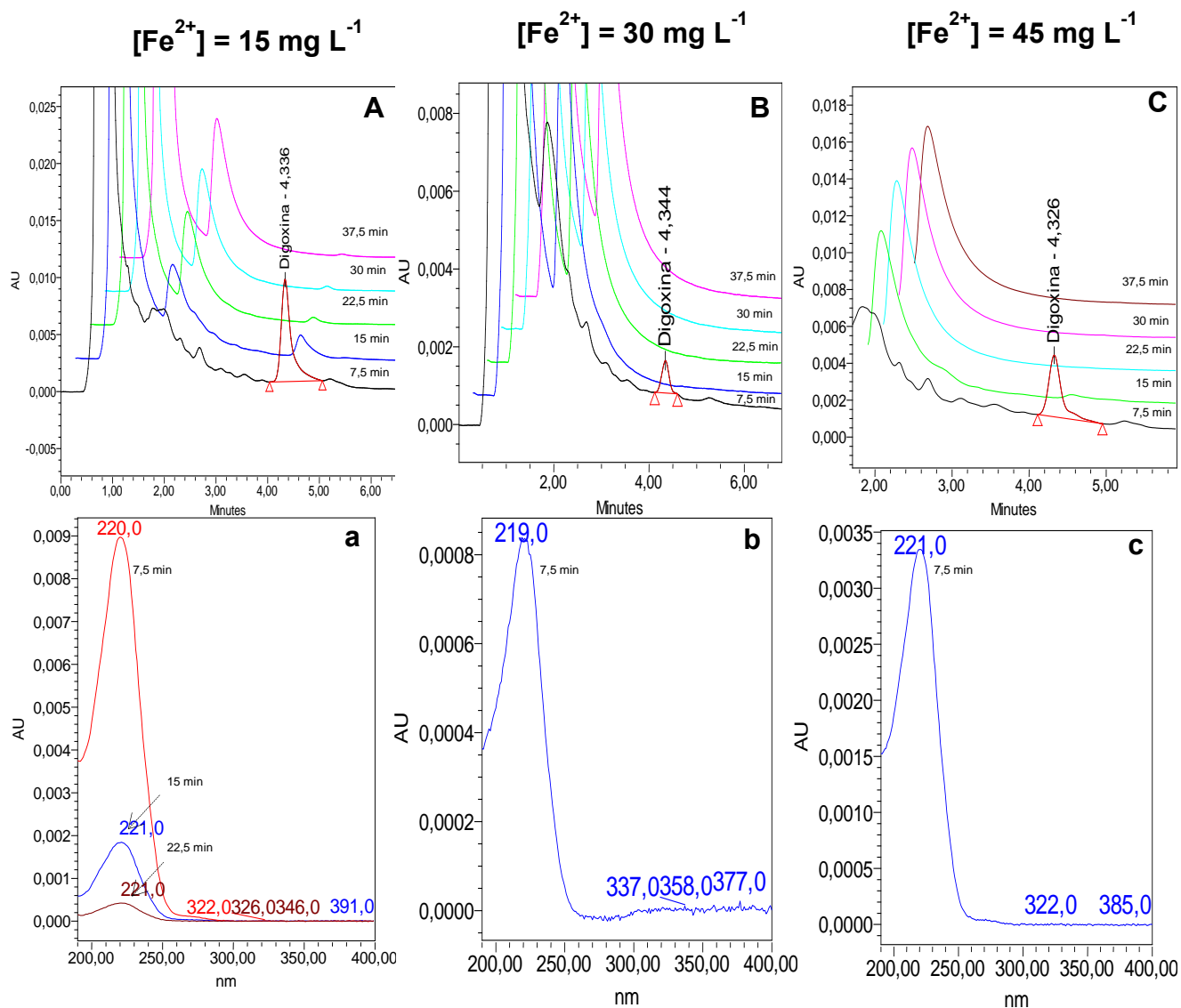


Figura 13: Sobreposição dos cromatogramas e espectros de absorção na região do UV (200 – 400 nm) do estudo de variação de Fe^{2+} para a degradação de DGX por processo Fenton. Condições de estudo: (A, a) $[\text{DGX}] = 10 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 9990 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{Fe}^{2+}] = 15 \text{ mg L}^{-1}$, pH 3; (B, b) $[\text{DGX}] = 10 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 9990 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{Fe}^{2+}] = 30 \text{ mg L}^{-1}$, pH 3; (C, c) $[\text{DGX}] = 10 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 9990 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{Fe}^{2+}] = 45 \text{ mg L}^{-1}$, pH 3.

Na TAB. 15 são apresentados os resultados experimentais de taxa de remoção de DGX em função da concentração de Fe^{2+} .

Tabela 15: Resultados da taxa de remoção de DGX (%) em função da variação da concentração de Fe^{2+} . Condições de estudo: $[\text{DGX}] = 10 \text{ mg L}^{-1}$; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 9990 \text{ mg L}^{-1}$; $[\text{Fe}^{2+}] =$ variando de 15 a 45 mg L^{-1} , $\text{pH} = 3$.

Tempo (minutos)	15 mg L^{-1} (%)	30 mg L^{-1} (%)	45 mg L^{-1} (%)
0	0	0	0
7,5	76 \pm 3	90 \pm 2	90 \pm 2
15	95 \pm 3	99 \pm 1	99 \pm 1
22,5	99 \pm 1	100 \pm 0	100 \pm 0
30	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0
37,5	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0

Observação. Tempo 0 refere-se a amostra controle, não submetida a degradação.

Na FIG. 14 é apresentado o gráfico que correlaciona a taxa de remoção de DGX verificado no estudo de variação da concentração de Fe^{2+} por processo Fenton.

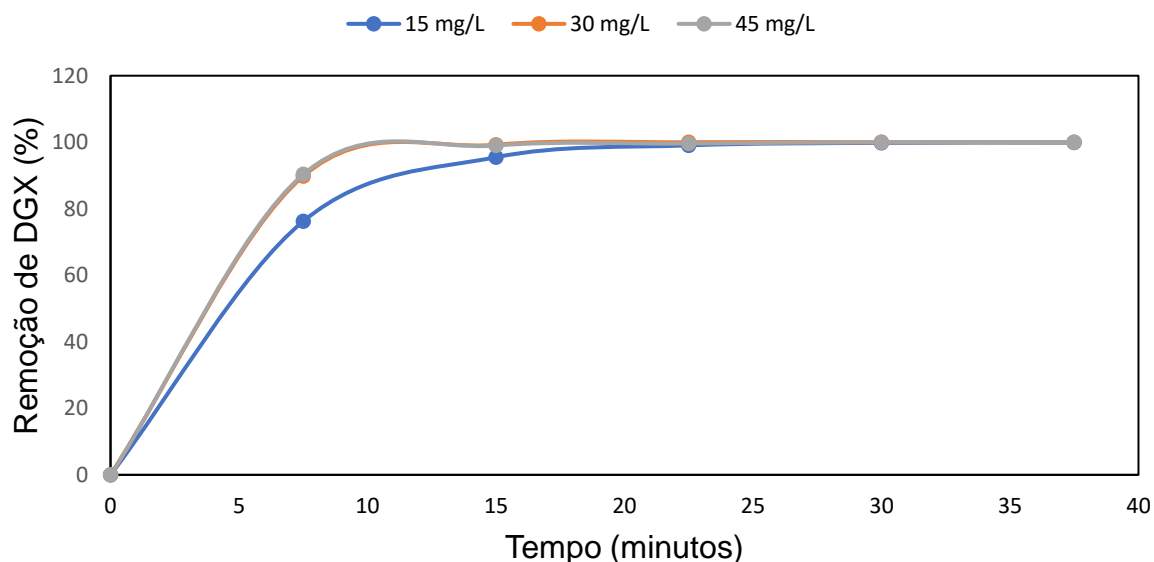


Figura 14: Gráfico dos resultados da remoção de DGX em função do tempo para as amostras submetidas ao estudo de variação de Fe^{2+} . A linha em azul refere-se ao estudo conduzido com concentração de 15 mg L^{-1} , a linha em laranja refere-se ao estudo conduzido com concentração de 30 mg L^{-1} e a linha em cinza refere-se ao estudo conduzido com concentração de 45 mg L^{-1} .

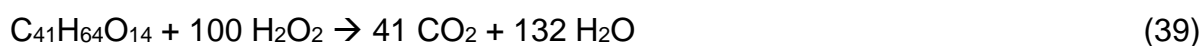
A partir da verificação dos resultados, observou-se degradação de 76 ± 3 , 90 ± 2 e $90 \pm 2\%$ nos primeiros 7,5 minutos de reação da DGX para as concentrações de 15, 30 e 45 mg L^{-1} de Fe^{2+} , respectivamente. Além disso, ressalta-se a condição que apresentou melhor eficiência foi em 30 mg L^{-1} , devido a completa remoção do contaminante em 22,5 minutos, fato não observado nos demais experimentos.

Estratégias adicionais para remoção de ferro dissolvido no efluente tratado são fundamentais para o posterior despejo no meio ambiente, uma vez que o elemento ferro pode provocar inúmeros problemas ao ecossistema aquático. Khatri *et al.* (2017), averiguou procedimentos para a remoção de ferro da água, e propôs 11 diferentes técnicas para esta finalidade. Uma das estratégias mencionadas consiste da oxidação do metal por agente oxidante, seguida de precipitação e posterior filtração. Quimicamente ocorre a oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} devido a interação com o agente oxidante, elava-se o pH da solução próximo a 7, ocasionando a formação do precipitado hidróxido de ferro, substância de coloração avermelhada, sendo então facilmente separado por filtração. [64]

4.3.2- Variação da concentração de H_2O_2

A concentração de H_2O_2 é um fator extremamente importante para o processo de degradação, pois tanto a falta como o excesso desse reagente podem diminuir a eficiência do tratamento. Para isso, verificou-se a quantidade de oxidante estequiometricamente necessária para completa mineralização da DGX.

Na Eq. 39 apresenta-se a reação química balanceada de mineralização da DGX na presença de peróxido de hidrogênio.



Visto que 0,0128 mmol de DGX foi utilizada experimentalmente, percebeu-se a necessitando de 1,28 mmol de H_2O_2 para completa mineralização do contaminante. Com isso, optou-se na utilização de excesso de H_2O_2 (20 a 40 mmol), devido a observações já realizadas na literatura, tais como Chamarro *et al.* (2001), em que concluiu-se que uma eliminação total do carbono orgânico presente no efluente requer grande quantidade de oxidante ou grandes tempos de residência. Além disso, verificou-se grande resistência da

molécula de DGX a oxidação quando exposta no período de 24 horas a 40 mmol de peróxido de hidrogênio, sendo degradada quantidade inferior a 10% da molécula de DGX. [63]

Na FIG. 15 são apresentados os cromatogramas resultantes da influência da variação da concentração de H_2O_2 no processo de decomposição da DGX por reações de Fenton.

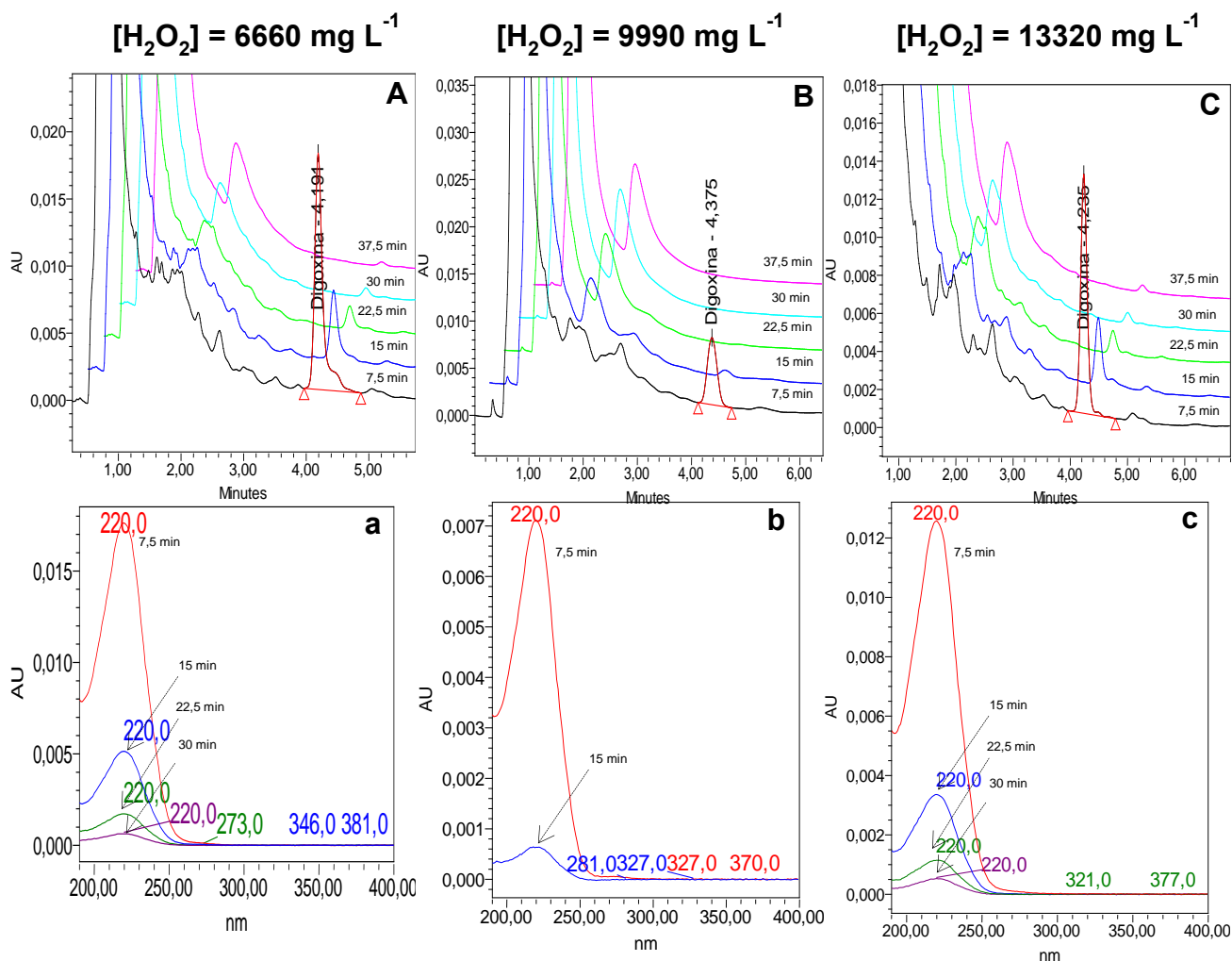


Figura 15: Sobreposição dos cromatogramas e espectros de absorção na região do UV (200 – 400 nm) do estudo de variação de H_2O_2 para a degradação de DGX por processo Fenton. Condições de estudo: (A, a) $[DGX] = 10 \text{ mg L}^{-1}$, $[H_2O_2] = 6660 \text{ mg L}^{-1}$, $[Fe^{2+}] = 30 \text{ mg L}^{-1}$, pH 3; (B, b) $[DGX] = 10 \text{ mg L}^{-1}$, $[H_2O_2] = 9990 \text{ mg L}^{-1}$, $[Fe^{2+}] = 30 \text{ mg L}^{-1}$, pH 3; (C, c) $[DGX] = 10 \text{ mg L}^{-1}$, $[H_2O_2] = 13320 \text{ mg L}^{-1}$, $[Fe^{2+}] = 30 \text{ mg L}^{-1}$, pH 3.

Na TAB. 16 são apresentados os resultados experimentais de taxa de remoção de DGX em função da concentração H_2O_2 .

Tabela 16: Resultados da taxa de remoção de DGX (%) em função da variação da concentração de H₂O₂ por reações de Fenton. Condições de estudo: [DGX] = 10 mg L⁻¹, [H₂O₂] = variando de 6660 mg L⁻¹ a 13320 mg L⁻¹, [Fe²⁺] = 30 mg L⁻¹, pH 3.

Tempo (minutos)	6660 mg L ⁻¹ (%)	9990 mg L ⁻¹ (%)	13320 mg L ⁻¹ (%)
0	0	0	0
7,5	69 ± 5	82 ± 4	80 ± 5
15	90 ± 3	98 ± 1	95 ± 4
22,5	96 ± 3	100 ± 0	98 ± 1
30	99 ± 1	100 ± 0	99 ± 0
37,5	99 ± 0	100 ± 0	99 ± 0

Observação. Tempo 0 refere-se a amostra controle, não submetida a degradação.

Na FIG. 18 é apresentado o gráfico que correlaciona a taxa de remoção de DGX verificado no estudo de variação da concentração de H₂O₂ por processo Fenton.

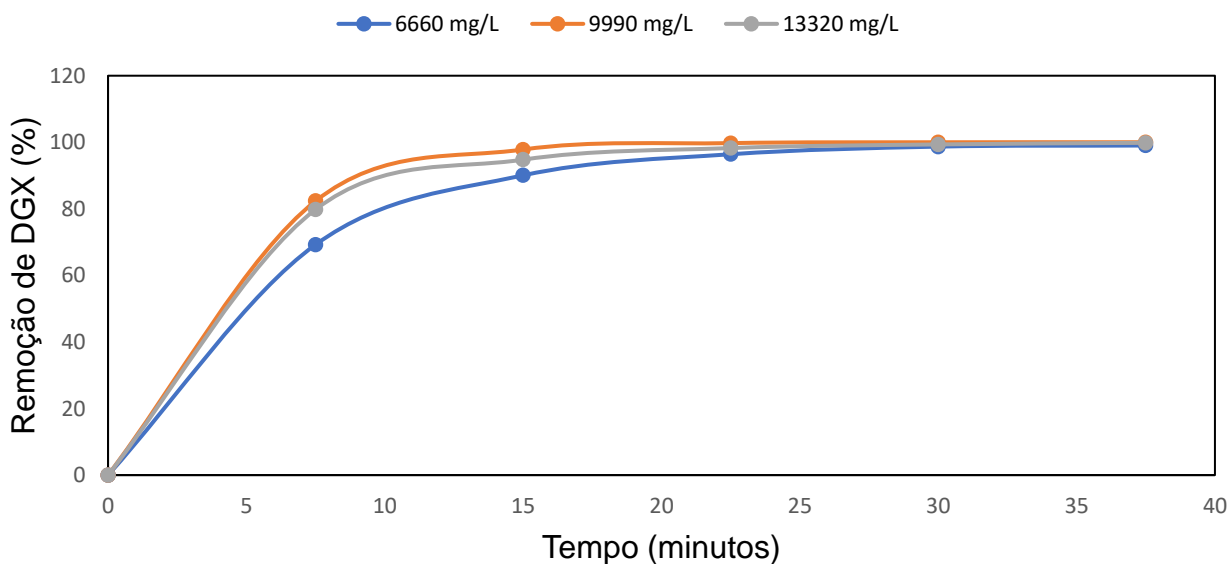


Figura 16: Gráfico dos resultados da remoção de DGX em função do tempo para as amostras submetidas ao estudo de variação de H₂O₂. A linha em azul refere-se ao estudo conduzido com concentração de 6660 mg L⁻¹, a linha em laranja refere-se ao estudo conduzido com concentração de 9990 mg L⁻¹ e a linha em cinza refere-se ao estudo conduzido com concentração de 13320 mg L⁻¹.

A partir da verificação dos resultados, observou-se degradação da DGX de 69 ± 5 , 82 ± 4 e $80 \pm 5\%$ nos primeiros 7,5 minutos de reação, para as concentrações de 6660, 9990 e 13320 mg L⁻¹ de H₂O₂, respectivamente. Além disso, ressalta-se a condição que apresentou melhor eficiência foi em 9990 mg L⁻¹, devido a completa remoção do contaminante em 22,5 minutos, fato não observado nos demais experimentos.

4.4 - Determinação do peróxido de hidrogênio residual

O monitoramento do peróxido de hidrogênio residual é de grande importância para as reações de degradação de contaminantes orgânicos, visto que uma vez consumido, a reação de degradação torna-se mais lenta ou não prossegue. Para isso, monitorou-se o peróxido de hidrogênio residual espectrofotometricamente pela geração do íon peroxovanádio.

Inicialmente verificou-se a linearidade da metodologia empregada, a partir da confecção de uma curva de calibração.

Na FIG. 17 é apresentada a curva de calibração utilizada nas interpolações de absorbância e concentração de peróxido de hidrogênio residual.

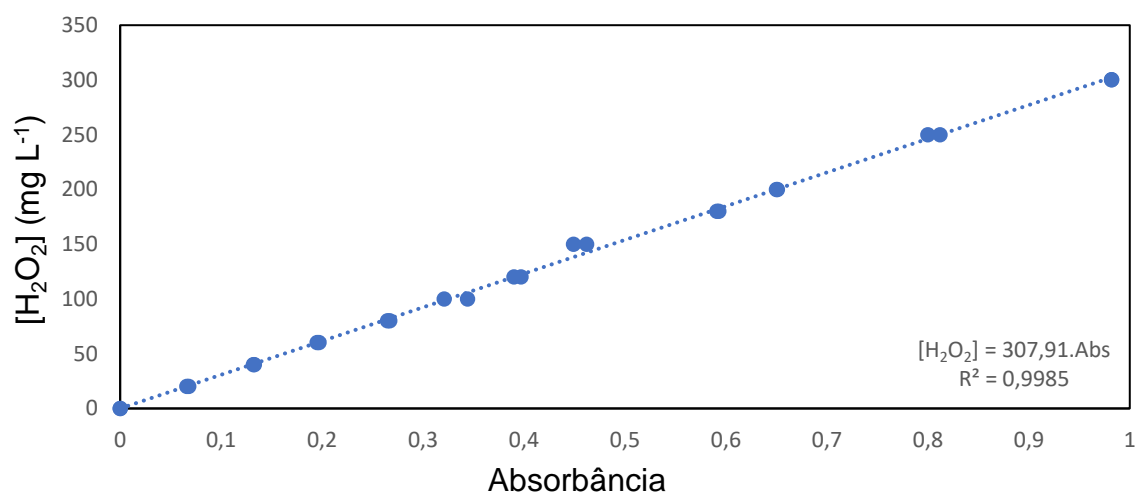


Figura 17: Curva de calibração para determinação do peróxido de hidrogênio residual.

O monitoramento de peróxido de hidrogênio residual foi verificado a partir de amostras submetidas as seguintes condições: pH = 3,0, $[Fe^{2+}] = 30 \text{ mg L}^{-1}$ e $[H_2O_2] = 9990 \text{ mg L}^{-1}$, durante 120 minutos de reação.

Na FIG. 18 é apresentado o gráfico de variação da concentração de peróxido de hidrogênio em função do tempo.

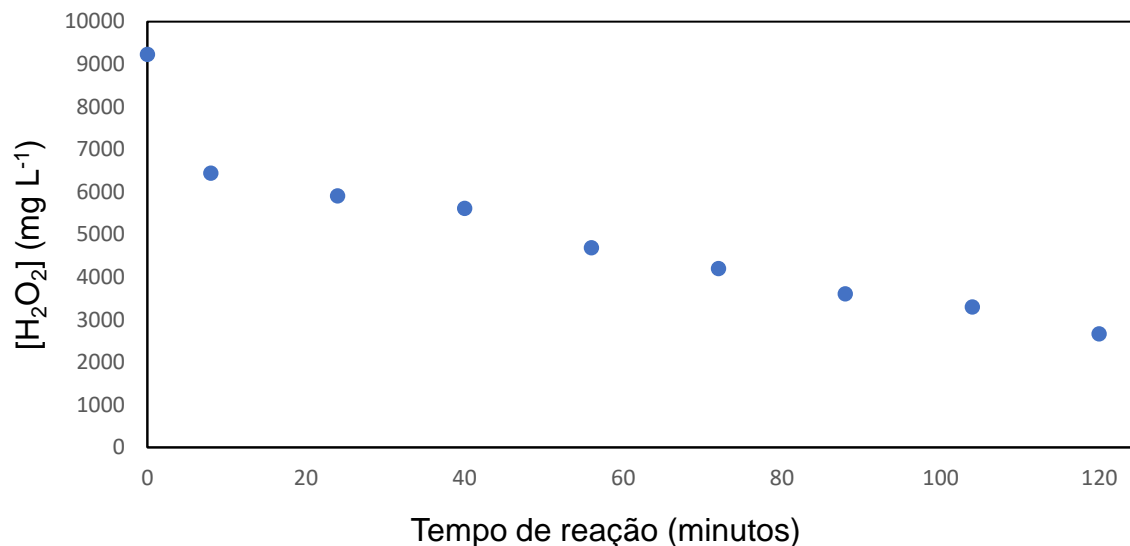


Figura 18: Monitoramento da $[H_2O_2]$ em função do tempo de reação, para o processo Fenton, nas condições experimentais: pH = 3; $[DGX] = 10 \text{ mg L}^{-1}$; $[H_2O_2] = 9990 \text{ mg L}^{-1}$; $[Fe^{2+}] = 30 \text{ mg L}^{-1}$.

Observou-se que após 120 minutos de reação, a concentração de H_2O_2 decaiu cerca de 70%, apresentando tendência de queda além do tempo de análise.

Tais observações sugerem a necessidade de adição de peróxido de hidrogênio em excesso, além da quantidade estequiométrica, uma vez que parte deste reagente é convertido em radicais hidroxila responsável pela degradação do contaminante, e outra parte é decomposta em $O_2 + H_2O$, pois é verificado experimentalmente a formação de bolhas no sistema reacional.

4.5 - Determinação do Carbono Orgânico Total (COT)

A verificação da mineralização da DGX foi averiguada baseando-se na análise de COT, após exposição do contaminante ao processo Fenton nas seguintes condições experimentais: pH = 3; [DGX] = 10 mg L⁻¹; [H₂O₂] = 9990 mg L⁻¹; [Fe²⁺] = 30 mg L⁻¹; tempo de reação = 120 minutos.

Na FIG. 19 são apresentados os resultados de COT na avaliação da mineralização de DGX submetida a tratamento por processo Fenton.

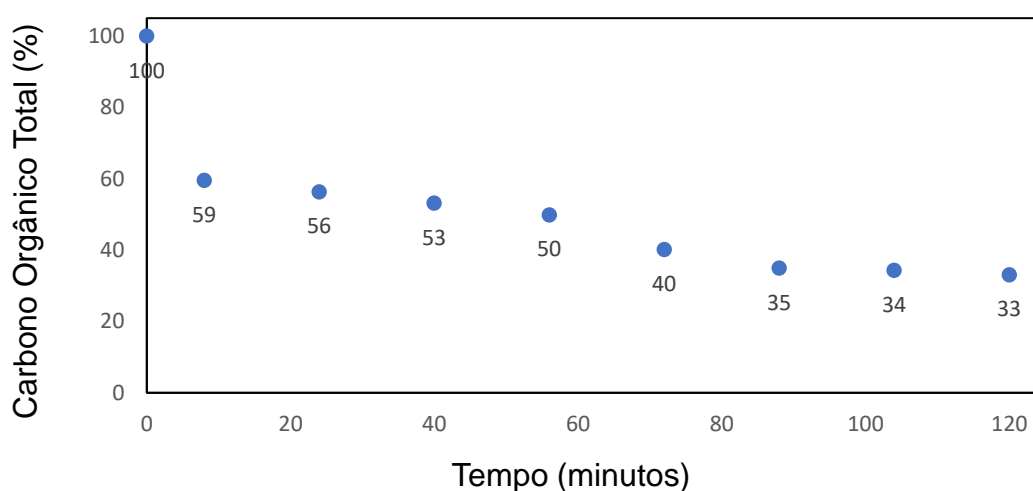


Figura 19: Monitoramento da variação de COT em função do tempo de reação, para o processo Fenton, nas condições experimentais: [DGX] = 10 mg L⁻¹; [H₂O₂] = 9990 mg L⁻¹; [Fe²⁺] = 30 mg L⁻¹; pH = 3; tempo de reação = 120 minutos.

É possível observar mineralização de 41 % do efluente simulado nos primeiros 8 minutos e 67% após 120 minutos de reação. Tais resultados vão de acordo as observações feitas na análise de degradação da DGX por CLAE-UV, em que averiguou-se grande queda de teor de DGX nos primeiros minutos de reação.

Devido a grande similaridade evidenciada dos perfis encontrados entre os gráficos de análise de COT e peróxido de hidrogenio residual, sugere-se que o consumo do reagente oxidante durante o curso da reação possa ter contribuído para o decaimento da eficiencia de mineraliação em função do tempo observada na (FIG. 19).

Conclusões de incompleta mineralização de compostos farmacêuticos, após tratamento de Fenton também foram observadas por Gupta *et al.* (2018), a qual reportou a mineralização de apenas 55% de cloridrato de ciprofloxacino utilizando condições operacionais estudadas e otimizadas.

4.6 - Estudo de toxicidade

Na TAB. 17 são apresentados os resultados de CL₅₀ das soluções:

1. Solução controle Fenton;
2. Resíduo simulado sem tratamento;
3. Resíduo simulado tratado com processo Fenton.

Tabela 17: Razão da mortalidade, valores médios de concentração letal (CL₅₀) e intervalo de confiança (IC) de 95% do bioindicador AS exposto a diluições de 20 a 100% das amostras do resíduo simulado de DGX in natura e tratado pelo processo Fenton utilizando as condições experimentais de: [DGX] = 10 mg L⁻¹, [H₂O₂] = 9990 mg L⁻¹, [Fe²⁺] = 30 mg L⁻¹, pH 3, Tempo de degradação = 40 minutos.

Amostra	Mortalidade					CL ₅₀ (%)	IC (95%)
	20%	40%	60%	80%	100%		
1	0/10	0/10	0/10	1/10	3/10	N/A	N/A
	0/10	0/10	0/10	1/10	2/10	N/A	N/A
	0/10	0/10	0/10	1/10	3/10	N/A	N/A
2	0/10	10/10	10/10	10/10	10/10	32	26 - 39
	0/10	8/10	10/10	10/10	10/10	28	N/A
	1/10	7/10	10/10	10/10	10/10	31	28 - 36
3	0/10	2/10	3/10	4/10	6/10	89	70 - 114
	2/10	2/10	2/10	4/10	5/10	100	N/A
	0/10	1/10	1/10	4/10	5/10	100	N/A

1. Solução controle Fenton; 2. Resíduo simulado sem tratamento; 3. Resíduo simulado tratado por processo Fenton; N/A. Não se Aplica.

A partir da análise dos resultados de toxicidade contidos na TAB. 17 foi possível concluir que a solução controle Fenton não interferiu na predição da CL_{50} das soluções contendo DGX (tratada e não tratada por processo Fenton), devido a mesma não apresentar mortalidade significativa dos organismos teste, inclusive, não sendo possível aferir uma CL_{50} para tal solução, uma vez que em nenhuma das diluições (20 a 100%) verificou-se mortalidade superior a 50% da população avaliada. Além disso, foi possível observar que o processo Fenton demonstrou-se adequado para a finalidade que se propõe (redução da toxicidade do efluente contendo DGX), uma vez que foi verificado aumento expressivo da CL_{50} para o resíduo sem tratamento e tratado por processo Fenton, respectivamente. Correlacionando os dados de COT e CL_{50} (para um tempo de reação de 40 minutos), foi possível concluir que mesmo não havendo mineralização completa do efluente, (a qual observou-se mineralização de 47%, conforme FIG. 19), os produtos de degradação formados demonstraram-se menos tóxicos que o efluente não tratado.

5 - Conclusão

A metodologia analítica desenvolvida para acompanhamento do processo Fenton se demonstrou seletiva para a finalidade proposta, pois quando comparado o perfil cromatográfico da solução padrão de DGX frente as soluções Branco não se observaram eluição de picos no mesmo tempo de retenção da DGX. O método apresentou resposta linear para a quantificação de DGX no intervalo de 0,1 a 10 mg L⁻¹ e a baixo deste valor apresentou-se capaz de identificar o fármaco até 0,01 mg L⁻¹. O fármaco estudado (DGX) apresentou resistência a hidrólise acida (pH 3), oxidação por peróxido de hidrogênio e íons metálicos no período de 24 horas, devido a constatação de decaimento de área inferior a 10%. O Processo Fenton mostrou-se eficiente na degradação do fármaco estudado, pois promoveu a oxidação completa do mesmo em aproximadamente 8 minutos de tratamento. O decaimento de absorção na região do ultravioleta durante o tratamento do efluente se justifica pela decomposição do cromóforo lactona α , β -insaturada presente na DGX, sendo este o único cromóforo possível na molécula que poderia absorver luz acima de 200 nm. A análise de COT demonstrou remoção de matéria orgânica de mais de 60% após 120 minutos na melhor condição estudada. Além disso, verificou-se o consumo de mais de 70% do peróxido de hidrogênio adicionado experimentalmente, evidenciando a necessidade de adição em excesso deste reagente para a mineralização do contaminante. Nos estudos de toxicidade utilizando AS como bioindicador, foi possível verificar que a aplicação do processo Fenton como ferramenta de descontaminação de resíduos contendo DGX é uma opção viável, uma vez que foi possível verificar queda expressiva da toxicidade do resíduo tratado por processo Fenton.

6 - Referências bibliográficas

1. Agência nacional de águas. Água no mundo. Disponível em: <<http://www3.ana.gov.br/portal/ana/panorama-das-aguas/agua-no-mundo#>>. Acesso em : 05/07/2018 de julho de 2018.
2. Oscar M, Rodriguez-Narvaez, Juan MP, Ashantha G, Erick RB. Treatment technologies for emerging contaminants in water: a review. *Chemical engineering journal*. 2017; 323:361-380.
3. Embrapa, Maara. Atlas do meio ambiente do Brasil. 2ª edição. Brasília : Terra Viva, 1996.
4. Oliveira G, Scazufca P, Pires RC. Ranking do saneamento instituto trata Brasil 2018. São Paulo. 2018.
5. Melo SAS, trovó AG, Bautitz IR, Nogueira RFP. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. *Química nova*. 2009; 32:188-197.
6. Pal A, He Y, Jekel M, Reinhard M, Gin KY. Emerging contaminants of public health significance as water quality. 2014; 71:46-62.
7. Combera S, Gardner M, Sörme P, Leverett D, Ellor B. Active pharmaceutical ingredients entering the aquatic environment from wastewater treatment works: a cause for concern?. *Science of the total environment*. 2018; 613-614:538-547.
8. Sim W, Lee J, Lee E, Shin S, Hwang S, Oh J. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. *Chemosphere*. 2011; 82:179-186.
9. Kummerer K. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - a review. *Chemosphere* . 2001; 45:957-969.
10. Phillips PJ, Smith SG, Kolpin DW, Zaugg SD, Buxton HT, Furlong ET, Esposito K, Stinson B. Pharmaceutical formulation facilities as sources of opioids and other pharmaceuticals to wastewater treatment plant effluents. *Environmental science & technology*. 2010; 44:4910-4916.
11. Cardoso O, Porcher J, Sanchez W. Factory-discharged pharmaceuticals could be a relevant source of aquatic environment contamination: review of evidence and need for knowledge. *Chemosphere*. 2014; 115:20-30.

12. Heberer T. Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *Journal of hydrology*. 2002; 266:175-189.
13. Mimeault C, Woodhouse AJ, Miao XS, Metcalfe CD, Moon TW, Trudeau. The human lipid regulator, gemfibrozil bioconcentrates and reduces testosterone in the goldfish, *carassius auratus*. *Aquatic toxicology*. 2005; 73:44-54.
14. Paganoa G, Biase A, Deeva IB, Degan P, Doronind YK, Iaccarino M, Oral R, Trieff NM, Warnau M, Korkina LG. The role of oxidative stress in developmental and reproductive toxicity of tamoxifen. *Life sciences*. 2001; 68:1735-1749.
15. Nash JP, Kime DE, Vem LTMV, Wester PW, Brion F, Maack G, Stahlschmidt-allner P, Tyler CR. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environmental health perspectives*. 2004; 112:1725-1733.
16. Klavarioti M, Mantzavinos D, Kassinos D. Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environment international*. 2009; 35: 402-417.
17. Larsson DGJ, Pedro C, Paxeus N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of hazardous material*. 2007; 148:751-755.
18. Fick J, Soderstrom H, Lindberg RH, Phan C, Tysklind M, Larsson DGJ. Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Pharmaceuticals and personal care products in the environment*. 2009; 28:2522-2527.
19. Bisarya SC, Patil DM. Determination of salicylic acid and phenol (ppm level) in effluent from aspirin plant. *Research and Industry*. 1993; 38:170-172.
20. Qiting J, Xiheng Z. Combination process of anaerobic digestion and ozonation technology for treating wastewater from antibiotics production. *Water Treatment*. 1988; 3:285-291.
21. Lin AY, Yu T, Lin C. Pharmaceutical contamination in residential, industrial, and agricultural waste streams: risk to aqueous environments in taiwan. *Chemosphere*. 2008; 74:131-141.
22. Cui CW, Ren HY. Determination of steroid estrogens in wastewater treatment plant of a contraceptives producing factory. *Environmental monitoring and Assessment*. 2006; 121:409-419.

23. Prasse C, Schlüsener MP, Schulz R, Ternes TA. Antiviral drugs in wastewater and surface waters: a new pharmaceutical class of environmental relevance?. *Environmental science & technology*. 2010; 44:1728–1735.
24. Brodin T, Fick J, Jonsson M, Klaminder J. Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. *Science*. 2013; 339:814-815.
25. Mijatovic T, Quaquebeke EV, Delest B, Debeir O, Darro F, Kiss R. Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. *Biochimica et biophysica acta*. 2007; 1776:32-57.
26. Prassas I, Diamandis EP. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nature reviews drug discovery*. 2008; 7:926-935.
27. Aronson JK. Clinical pharmacokinetics of digoxin 1980. *Clinical pharmacokinetics*, 1980. *Clinical Pharmacokinetics*. 1980; 5:137-149.
28. Foss PRB, Benezra SA. Digoxin. *Analytical profiles of drug substances*. 1981; 9:207-243.
29. Vasic V, Cernigoj U, Krinulovic K, Joksic G, Franko M. Evaluation of photochemical degradation of digoxin by Na,K-ATPase assay. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2006; 40:404-409.
30. Desta B, Kwong E, Mcerlane KM. Separation of digoxin, digitoxin and their potential metabolites, impurities or degradation products by high performance liquid chromatography. *Journal of chromatography*. 1982; 240:137-143.
31. Farghaly HSM, Ashry IEM, Hareedy MS. High doses of digoxin increase the myocardial nuclear factor-kB and Cav1.2 channels in healthy mice. A possible mechanism of digitalis toxicity. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 2018; 105:533-539.
32. Pascoe D, Karntanut W, Muller CT. Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *hydra vulgaris*. *Chemosphere*. 2003; 51:521-528.
33. Jjemba PK. Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2006; 63:113-130.
34. Schweitzer L, Noblet J. Water Contamination and Pollution. *Green Chemistry*. 2018; 3.6:261-267.
35. Zhou H, Xiang N, Xie J, Diao X. Ecotoxicology: the history and present direction. *Encyclopedia of Ecology*. 2018; 2:1-9.

36. Chan-Keb CA, Agraz-Hernández CM, Perez-Balan RA, Gómez-solano MI, Maldonado-Montiel TDNJ, Ake-Canche B, Gutiérrez-Alcántara EJ. Acute toxicity of water and aqueous extract of soils from champotón river in lactuca sativa l. *Toxicology Reports*. 2018; 5:593-597.
37. Bhuvaneshwari M, Thiagarajan V, Nemade P, Chandrasekaran N, Mukherjee A. Toxicity and trophic transfer of P25 TiO₂ NPs from dunaliella salina to artemia salina:effect of dietary and waterborne exposure. *Environmental research journal*. 2018; 160:39-46.
38. Madhav MR, David SEM, Kumar RSS, Swathy JS, Bhuvaneshwari M, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Toxicity and accumulation of copper oxide (CuO) nanoparticles in different life stages of artemia salina. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2017; 52:227-238.
39. Baena-Nogueras RM, González-Mazo E, Lara-Martín PA. Degradation kinetics of pharmaceuticals and personal care products in surface waters: photolysis vs biodegradation. *Science of the total environment*. 2017; 590-591:643-654.
40. Dewil R, Mantzavinos D, Poulios I, Rodrigo MA. New perspectives for advanced oxidation processes. *Journal of environmental management*. 2017; 195:93-99.
41. Kanakaraju D, Glass BD, Oelgemöller M. Advanced oxidation process-mediated removal of pharmaceuticals from water: a review. *Journal of environmental management*. 2018; 219:189-207.
42. Malato S, Blanco J, Vidal A, Richter C. S. Photocatalysis with solar energy at a pilot-plant scale: an overview. *Applied catalysis b: environmental*. 2001; 37:1-15.
43. Legrini O, Oliveros E, Braun AM. Photochemical processes for water treatment. *american chemical society*. 1993; 93:671-698.
44. Solarchem Environmental Systems. *The uv/oxidation handbook*. Los Angeles. Markram 1994.
45. Miklos DB, Remy C, Jekel M, Linden KG, Drewes JE, Hübner U. Evaluation of advanced oxidation processes for water and wastewater treatment – a critical review. *Water research*. 2018; 139:118-131.
46. Haber F, Weiss J. Uber die katalyse des hydroperoxydes. *Naturwissenschaften*. 1932; 20:948-950.
47. Fenton HJH, Jones HO. Oxidation of organic acids in presence of iron. *Jornal of the Chemical Society, Transactions*. 1900; 69-77.

48. Zazo JA, Pliego G, Blasco S, Casas JA, Rodriguez JJ. Intensification of the fenton process by increasing the temperature. *American chemical society*. 2011; 50:866-870.
49. Yongrui P, Zheng Z, Bao M, Li Y, Zhou Y, Sang G. Treatment of partially hydrolyzed polyacrylamide wastewater by combined fenton oxidation and anaerobic biological processes. *Chemical engineering journal*. 2015; 273:1-6.
50. Gupta A, Gar A. Degradation of ciprofloxacin using fenton's oxidation: effect of operating parameters, identification of oxidized by-products and toxicity assessment. *Chemosphere*. 2018; 193:1181-1188.
51. Mattos IL, Shiraishi KA, Braz AD, Fernandes JR. Peróxido de hidrogênio: importância e determinação. *Química nova*. 2003; 26:373-380.
52. Clarizia L, Russo D, Somma ID, Marotta R, Andreozzi R. Homogeneous photo-fenton processes at near neutral ph: a review. *Applied catalysis b: environmental*. 2017; 209:358-371.
53. Pignatello JJ, Oliveros E, Mackay A. Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the fenton reaction and related chemistry. *Environmental science and technology*. 2007; 36:1-84.
54. Vorontsov AV. Advancing fenton and photo-fenton water treatment through the catalyst design design. *Journal of hazardous materials*. 2018; Versão online:1-10.
55. USP. United States Pharmacopeia. 40 ed. Rockville: The United States Pharmacopoeial convention, 2017; 3766.
56. Anvisa. Guia para tratamento estatístico da validação analítica: Guia 10. Brasil. 2017; 1.
57. USP. United States Pharmacopeia. <1225> Validation of compendial procedures. 2011; 778 - 782.
58. Nogueira RFP, Oliveira MC, Paterlini WC. Simple and fast spectrophotometric determination of H₂O₂ in photo-fenton reactions using metavanadate. 2005; 66:86-91.
59. Jedlicka A, Grafnetterová T, Miller V. Hplc method with UV detection for evaluation of digoxin tablet dissolution in acidic medium after solid-phase extraction. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2003; 33:109-115.
60. Kwon BG, Lee DS, Kang N, Yoon J. Characteristics of p-chlorophenol oxidation by fenton's reagent. *Water Research*. 1999; 9:2110-2118.

61. Nogueira RFP, Trovó AG, Silva MRA, Villa RD. Fundamentos e aplicações ambientais dos processos fenton e foto-fenton. *Química nova*. 2007; 30:400-408.
62. Elmolla E, Chaudhuri M. Optimization of fenton process for treatment of amoxicillin, ampicillin and cloxacillin antibiotics in aqueous solution. *Journal of hazardous materials*. 2009; 170:666-672.
63. Chamarro E, Marco A, Esplugas S. Use of fenton reagent to improve organic chemical biodegradability. *Water Research*. 2001; 35:1047-1051.
64. Khatri N, Tyagi S, Rawtani D. Recent strategies for the removal of iron from water: a review. *Journal of water process engineering*. 2017; 19:291-304.
65. Baken KA, Sjerps RMA, Schriks M, Wezel APV. Toxicological risk assessment and prioritization of drinking water relevant contaminants of emerging concern. *Environment international*. 2018; 118:293-303.
66. US-EPA. Aquatic life criteria for contaminants of emerging concern part I, General challenges and recommendations Prepared. 2008; 1-46.
67. Holm JV, Ruge K, Bjerg PI, Christensen TH. Occurrence and distribution of pharmaceutical organic compounds in the groundwater downgradient of a landfill (grindsted, denmark). *Environmental science & technology*. 1995; 29:1415-1420.
68. Brion F, Nilsen BM, Eidem JK, Goksøyr A, Porcher JM. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*danio rerio*). *Environmental toxicology and chemistry*. 2002; 28:1699-1708.
69. Hoerger CC, Dorr B, Schlienger C, Straub JO. Environmental risk assessment for the galenicalformulation of solid medicinal products at roche basle, Switzerland. *Ntegrated environmental assessment and management*. 2008; 5:331-337.
70. Montagnera CC, Vidala C, Acayaba RD. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. *Química nova*. 2017; 40:1094-1110.
71. Cheng Z, Yang B, Chen Q, Shen Z, Yuan T. Quantitative relationships between molecular parameters and reaction rate of organic chemicals in fenton process in temperature range of 15.8 °C – 60 °C. *Chemical engineering journal*. 2018; 350:534-540.
72. Puckowski A, Mioduszevska K, Lukaszewicz P, Borecka M, Caban M, Maszkowska J, Stepnowski P. Bioaccumulation and analytics of pharmaceutical residues in the

environment: a review. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2016; 127:232-255.

73. Zazo JA, Pliego G, Blasco S, Casas JA, Rodriguez JJ. Intensification of the fenton process by increasing the temperature. *American chemical society*. 2011; 50:866-870.

74. Arslan-alaton I, Tureli G, Olmez-Hanci T. Treatment of azo dye production wastewaters using photo-fenton-like advanced. *Journal of photochemistry and photobiology A: chemistry*. 2002; 202:142-153.

75. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICFS, Melo LCF. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química nova*. 2004; 27:771-780.

76. Sanderson H, Thomsen M. S. Comparative analysis of pharmaceuticals versus industrial chemicals acute aquatic toxicity classification according to the united nations classification system for chemicals. Assessment of the (q)sar predictability of pharmaceuticals acute aquatic toxicit. *Toxicology letters*. 2009; 187:84-93.

77. Tracqui A, Kintz P, Ludes B, Mangin P. High-performance liquid chromatography–ionspray mass spectrometry for the specific determination of digoxin and some related cardiac glycosides in human plasma. *Journal of chromatography B*. 1996; 692:101-109.

78. Reisch J, Zappel J, Rao ARR. Photostability studies of ouabain, a-acetyldigoxin and digoxin in solid state. *Pharmaceutica acta helvetiae*. 1994; 69:47-50.

79. Cheng JWM, Rybak I. Use of digoxin for heart failure and atrial fibrillation in elderly patients. *The american journal of geriatric pharmacotherapy*. 2010; 8:419-427.

80. Baertschi SW, Alsante KM, Reed RA. *Pharmaceutical stress testing - drugs and the pharmaceutical sciences*. Taylor & Francis. 2011.

81. Sternson LA, Shaffer RD. Kinetics of digoxin stability in aqueous solution. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1978; 67:327-330.

82. Sivula L, Vehniäinen E, Karjalainen AK, Kukkonen JVK. Toxicity of biomining effluents to daphnia magna: acute toxicity and transcriptomic biomarkers. *Chemosphere*. 2018; 210:304-311.

83. US-EPA. Proposed guidelines for ecological risk assessment. Washington: risk assessment forum. 1996.

84. Wang S, Yan LC, Zheng SS, Li TT, Fan LY, Huang T, Li C, Zhao YH. Toxicity of some prevalent organic chemicals to tadpoles and comparison with toxicity to fish based on mode of toxic action. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019; 167:138-145.
85. Libralato G, Prato E, Migliore L, Cicero AM, Manfra L. A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. *Ecological Indicators*. 2016; 69:35-49.
86. Taniguchi CM, Armstrong SR, Green LC, Golan DE, Jr AHT. Toxicidade dos Fármacos. 2016; 5:58-68.
87. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen IB, Nichols, DE, Mclaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med*. 1982; 45:35-34.
88. Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV. Trimmed spearman-karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol*. 1977; 11:714-719.
89. Takagi U, Ishigure K. Thermal Decomposition of Hydrogen Peroxide and Its Effect on Reactor Water Monitoring of Boiling Water Reactors. *NUCLEAR SCIENCE AND ENGINEERING*. 1985; 89:177-18.
90. Corpening JH, Heister SD, Anderson WE. Thermal Decomposition of Hydrogen Peroxide, Part 2: Modeling Studies. *JOURNAL OF PROPULSION AND POWER*. 2006; 22:996-1005.
91. Wu LK, Chen KY, Cheng SY, Lee BS, Shu CM. THERMAL DECOMPOSITION OF HYDROGEN PEROXIDE IN THE PRESENCE OF SULFURIC ACID. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2008; 93:115-120.
92. Pędziwiatr P, Mikołajczyk F, Zawadzki D, Mikołajczyk K, Bedka A. DECOMPOSITION OF HYDROGEN PERODIXE - KINETICS AND REVIEW OF CHOSEN CATALYSTS. *Acta Innovations*. 2018; 26:45-52.
93. Bauhn L, Hansson N, Ekberg C, Fors P, Spahiu K. The fate of hydroxyl radicals produced during H₂O₂ decomposition on a SIMFUEL surface in the presence of dissolved hydrogen. *Journal of Nuclear Materials*. 2018; 507:38-43.

Resultados de desenvolvimento Analítico por CLAE-UV

Adequação do Sistema (System Suitability)

Os testes de adequação de sistema representam uma parte fundamental do método analítico e são usados para garantir o desempenho adequado do sistema cromatográfico.

Eficiência, fator de retenção, resolução, retenção relativa e fator de simetria são os parâmetros normalmente empregados na avaliação do desempenho da coluna. Órgão reguladores, tais como: ANVISA, FDA entre outros, exigem a execução e comprovação desta etapa, afim de garantir condições mínimas de análise, em que resultem em dados confiáveis e reprodutíveis. Farmacopeias internacionais tais como: *United States Pharmacopeia* (USP) e *European Pharmacopoeia* (EP), possuem diretrizes próprias para a validação da adequação de sistemas cromatográficos de metodologias contidas em suas respectivas monografias.

A adequação do sistema cromatográfico foi avaliada a partir da análise da repetibilidade de injeções (sextuplicata) de uma substância química de referência (SQR) pesada, diluída e analisada em equipamentos calibrados e utilização de reagentes de pureza compatível com a exigida na análise (grau HPLC).

Na FIG. 1 e é demonstrado a sobreposição dos cromatogramas da adequação do sistema cromatográfico.

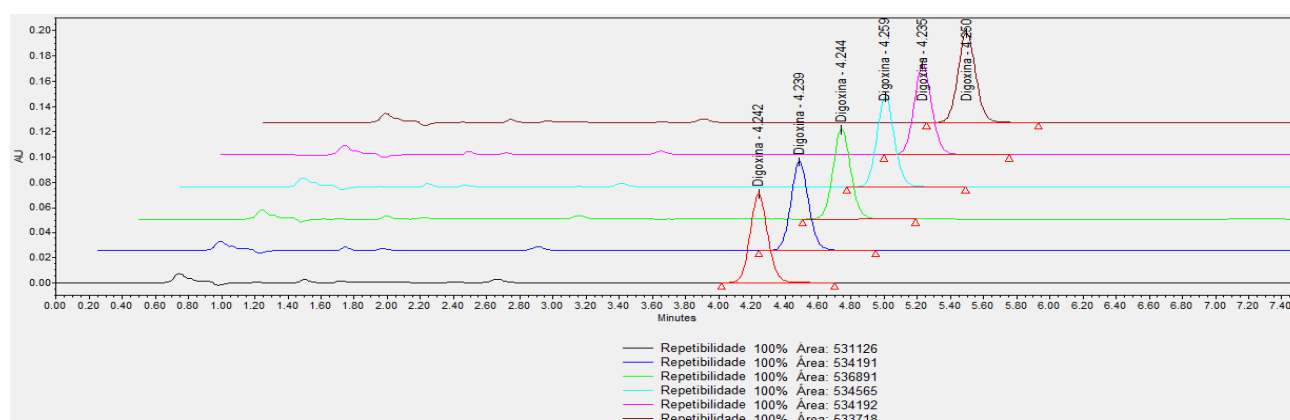


Figura 1: Verificação da adequação do sistema cromatográfico a partir da repetibilidade de injeções do padrão de DGX.

Na TAB. 1 é apresentado os dados de verificação de adequação do sistema, referentes as injeções apresentadas na (FIG. 10).

Tabela 1: Dados cromatográficos da solução padrão de DGX, para avaliação de adequação do sistema.

DPR (%)	0,35 %
Fator de simetria	1,07 ± 0,2
Número de pratos teóricos	7405 ± 113

A partir da análise da de tais dados, pode-se concluir que o sistema cromatográfico atendeu aos requisitos de *System Suitability*, podendo assim fazer a análise das amostras.

Linearidade

A linearidade de um procedimento analítico pode ser definida como a capacidade de induzir resultados de teste que são diretamente, ou por uma transformação matemática, proporcional à concentração do analito em amostras dentro de um determinado intervalo. [57]

A avaliação da linearidade foi efetuada mediante a obtenção da curva analítica com oito níveis de concentração e com três réplicas em cada nível, compreendendo um intervalo de 1% a 100% da concentração nominal de DGX (10 mg L^{-1}), abrangendo o intervalo de concentração de 0,1 a 10 mg L^{-1} .

Na FIG. 2 é apresentado a sobreposição dos cromatogramas das 3 curvas de linearidade averiguadas e interpoladas.

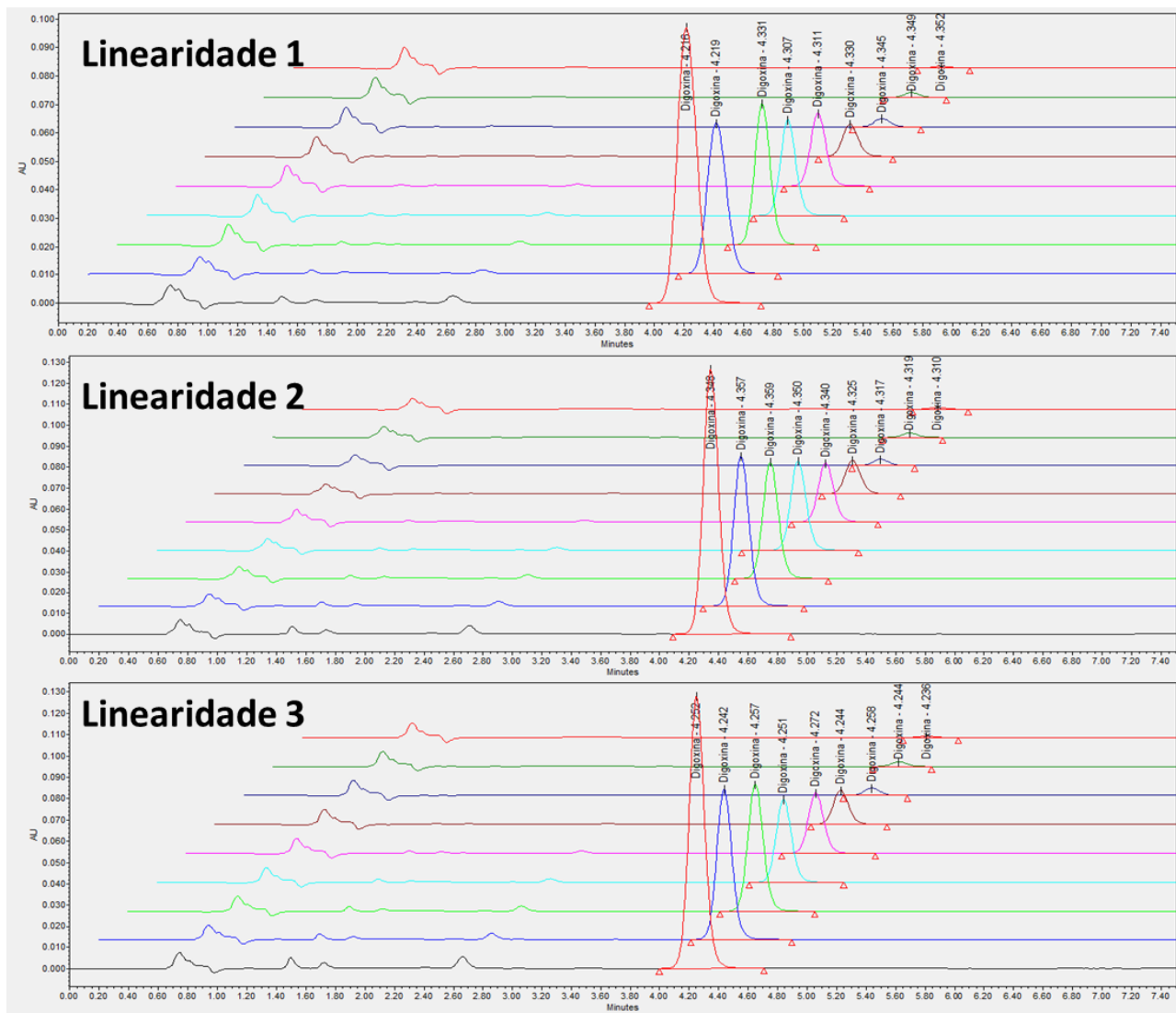


Figura 2: Sobreposição cromatogramas de linearidade.

Observa-se que pequenas variações do tempo de retenção da DGX ocorreram durante a análise de linearidade, sendo tais variações inferiores a 15 segundos. Isto demonstra robustez do método frente as condições laboratoriais, tais como temperatura e estabilidade do equipamento.

Na FIG. 3 é apresentado o gráfico de linearidade com a respectiva equação da reta.

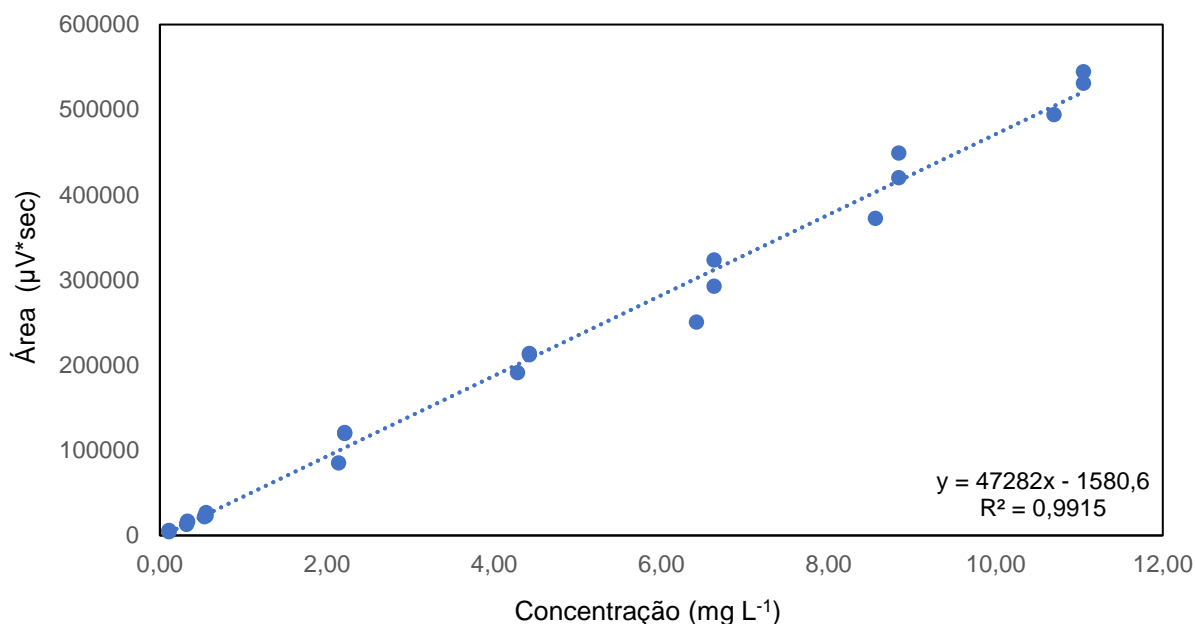


Figura 3: Curva analítica de linearidade.

Para a avaliação estatística aplicou-se o modelo de regressão ponderada, utilizando o método dos mínimos quadrados ponderados, com fator de ponderação $w = 1/x$, devido a rejeição da hipótese de homocedasticidade das variâncias.

Na TAB. 2 é apresentado os resultados da análise de variância (ANOVA) da regressão ponderada.

Tabela 2: Resultados do teste de ANOVA para regressão ponderada.

	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Concentração	1	195451259732,196	195451259732,196	3476,3168	0
Resíduos	22	1236920568,9455	56223662,2248		

Como P-valor (0) do teste F da ANOVA é menor que 0,05 não se rejeita a significância do modelo linear ao nível 5%, indicando uma relação significativa entre as variáveis concentração e área.

Na TAB. 3 é apresentado as estimativas dos coeficientes de regressão.

Tabela 3: Coeficiente de regressão.

	Estimativa	Desvio Padrão	Estat.t	P-valor
Intercepto	-240,3442	1192,5578	-0,2015	0,8421
Concentração	46964,4982	796,5444	58,9603	0

É possível examinar a significância dos coeficientes linear (intercepto) e angular (concentração). Verifica-se que o P-valor (0,8421) para o intercepto do teste t é maior que 0,05, com isso, rejeita-se a significância do intercepto ao nível 5%. Por outro lado, como o P-valor (0) para a concentração do teste t é menor que 0,05, não se rejeita a significância da concentração ao nível 5%, podendo considerar estatisticamente diferente de zero.

Na TAB. 4 são apresentados os resultados dos testes estatísticos da regressão linear obtida a partir da curva analítica.

Tabela 4: Resultados da estatística de regressão.

Desvio Padrão dos Resíduos	Graus de Liberdade	R²	Coefficiente de Correlação
7498,2439	22	0,9937	0,9969

O coeficiente de correlação de Pearson mede o grau de proporcionalidade entre a variável explicativa e a variável resposta. Como o coeficiente de correlação (0,9969) é maior que 0.99, conclui-se que existe uma relação linear adequada.

Tendo em vista, o atendimento dos requisitos estatísticos de regressão linear, qualifica-se que o método proposto apresenta capacidade de mensurar de maneira linear DGX na faixa de 1 a 100% da concentração nominal da amostra (10 mg L⁻¹).

Seletividade

A seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como componentes da matriz. [57]

A seletividade do método foi verificada a partir da comparação dos cromatogramas da solução padrão de digoxina e soluções branco. Na FIG. 4 é apresentada a sobreposição dos cromatogramas das soluções branco (1, 2, 3 e 4) e solução padrão de DGX.

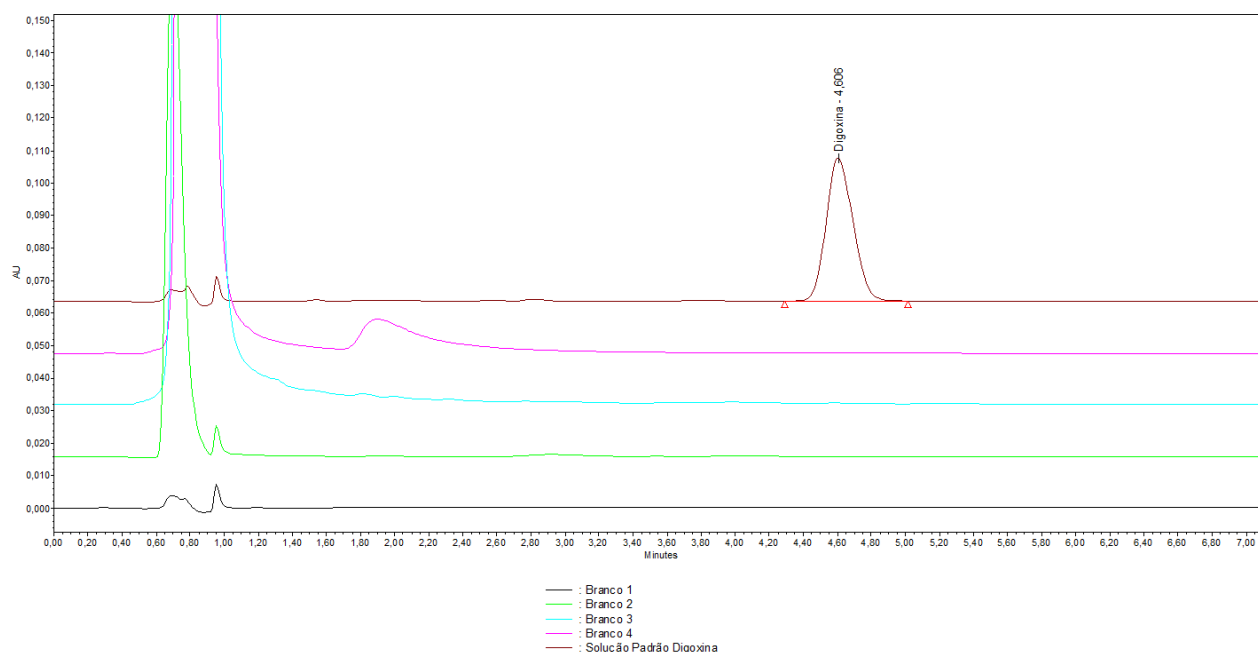


Figura 4: Sobreposição cromatogramas das soluções branco 1, 2, 3, 4 e padrão de DGX.

Feita a comparação dos cromatogramas das soluções branco (1, 2, 3 e 4) e padrão de DGX, evidencia-se que nenhum composto presente na matriz (solução diluente e degradantes utilizados no processo Fenton, tais como Fe^{2+} e peróxido de hidrogênio) ocasionaram alterações significativas na linha de base durante a faixa de tempo de retenção da DGX. Podendo assim concluir que a metodologia é seletiva para o fim que se destina.

Limite de Detecção

Define-se como limite de detecção a menor quantidade de analito contida em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. Assim, os testes de limite de detecção apenas confirmam que a quantidade de analito está acima ou abaixo de um determinado nível. [57]

A metodologia utilizada para a definição deste parâmetro foi a relação sinal/ruído (S/N), tendo como critério de aceitação valor superior a 2 entre o sinal analítico de DGX frente ao ruído aleatório presente na análise.

A partir de diluições sucessivas da solução padrão utilizada na análise de adequação de sistema, verificou-se que o limite de detecção encontrado é 0,01% da concentração nominal da amostra (10 mg L^{-1}), equivalente a 10 ppb.

Na FIG. 5 é apresentado o cromatograma e espectro de absorção na faixa do UV obtido para o padrão de digoxina diluído até a concentração de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$.

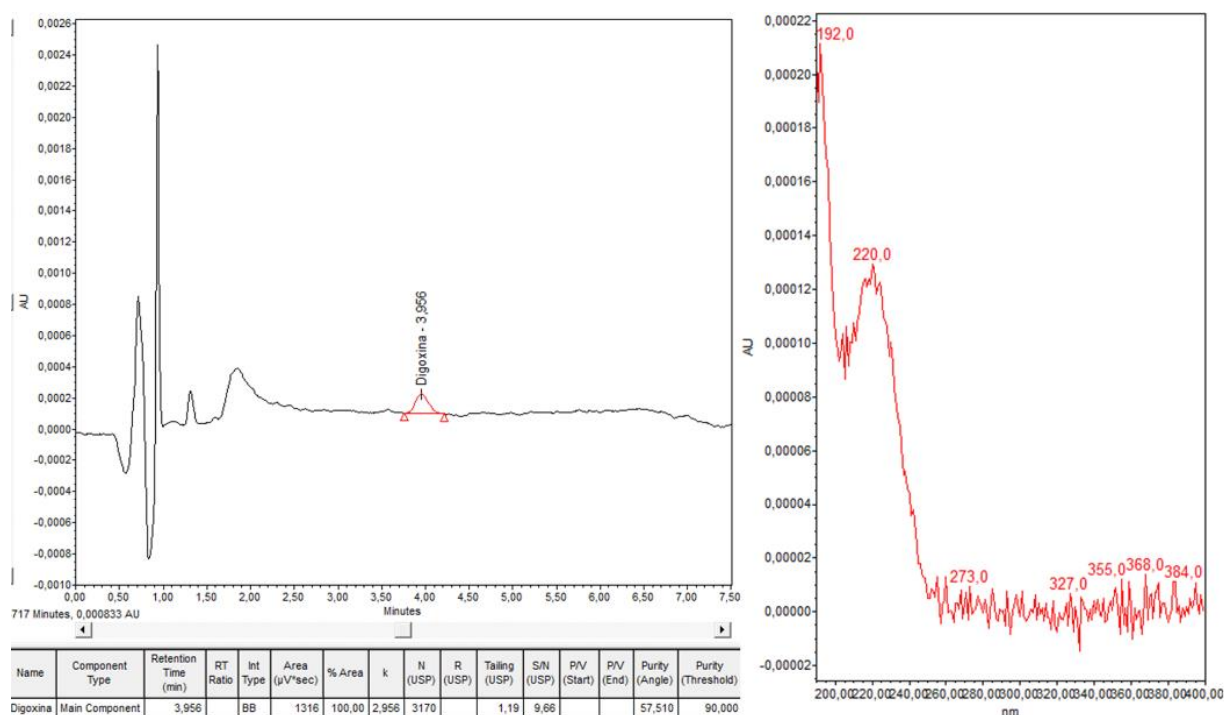


Figura 5: Cromatograma e espectro de absorção da solução padrão de DGX diluída na concentração de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$, no limite de identificação.

Verifica-se que a relação S/N apresentada na solução padrão de DGX diluída a $0,01 \text{ mg L}^{-1}$, foi de 9,66, superior ao critério de aceitação de 2.

Limite de Quantificação

O limite de quantificação é uma característica de ensaios quantitativos para baixos níveis de compostos em matrizes de amostra. É a menor quantidade de analito que pode ser determinada de maneira adequada sob as condições experimentais estabelecidas.

Na FIG. 6 é apresentado o cromatograma da solução padrão de digoxina diluída ao nível de 0,1 mg L⁻¹, 1% da concentração nominal da amostra.

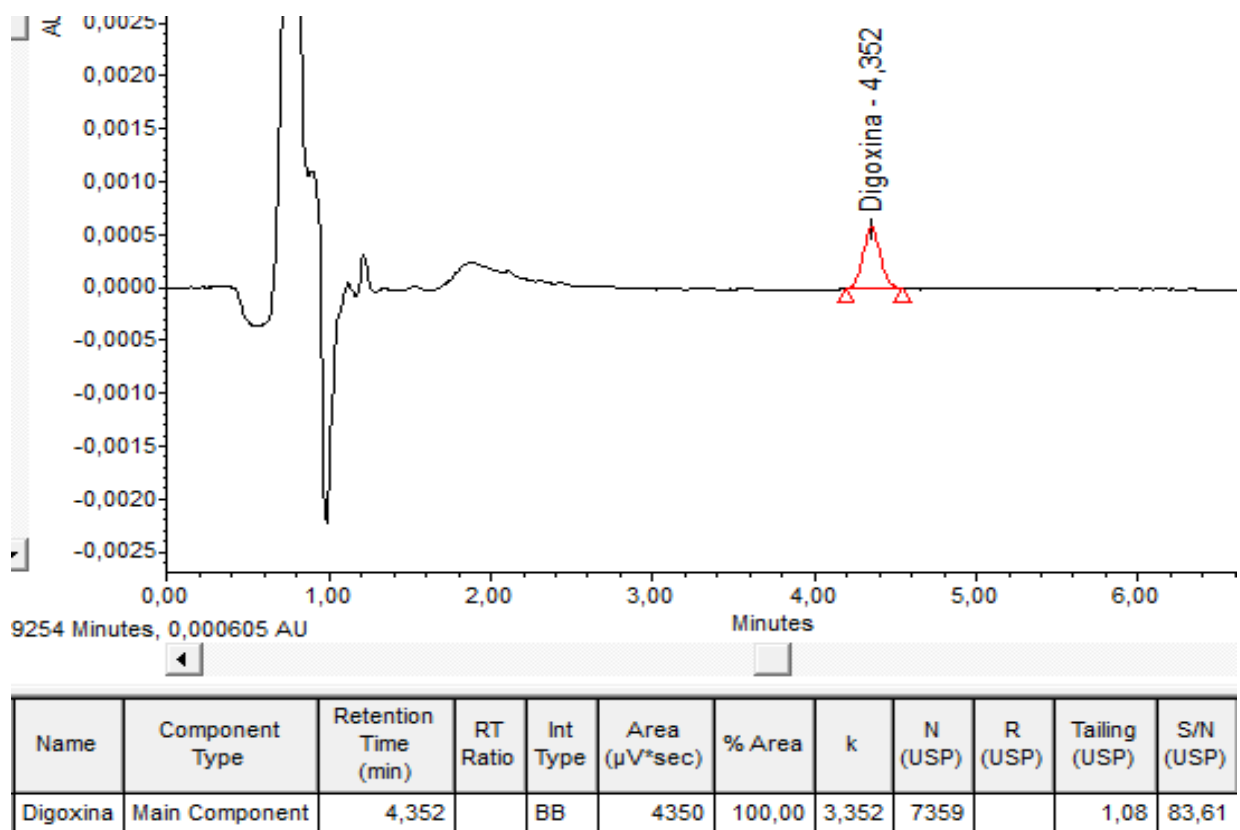


Figura 6: Cromatograma da solução padrão de digoxina diluída na concentração de 0,1 mg L⁻¹, no limite de quantificação do método analítico proposto.

A partir da análise da FIG. 6, verifica-se que a relação S/N para a solução padrão de DGX diluída a 1% da concentração nominal da amostra foi de 83,61, resultado superior ao critério de aceitabilidade de 10, podendo assim concluir que o método em questão apresenta requisitos mínimos de quantificação.

Na FIG. 7 é demonstrado a sobreposição dos cromatogramas das soluções padrão de DGX diluída nos limites de identificação e quantificação.

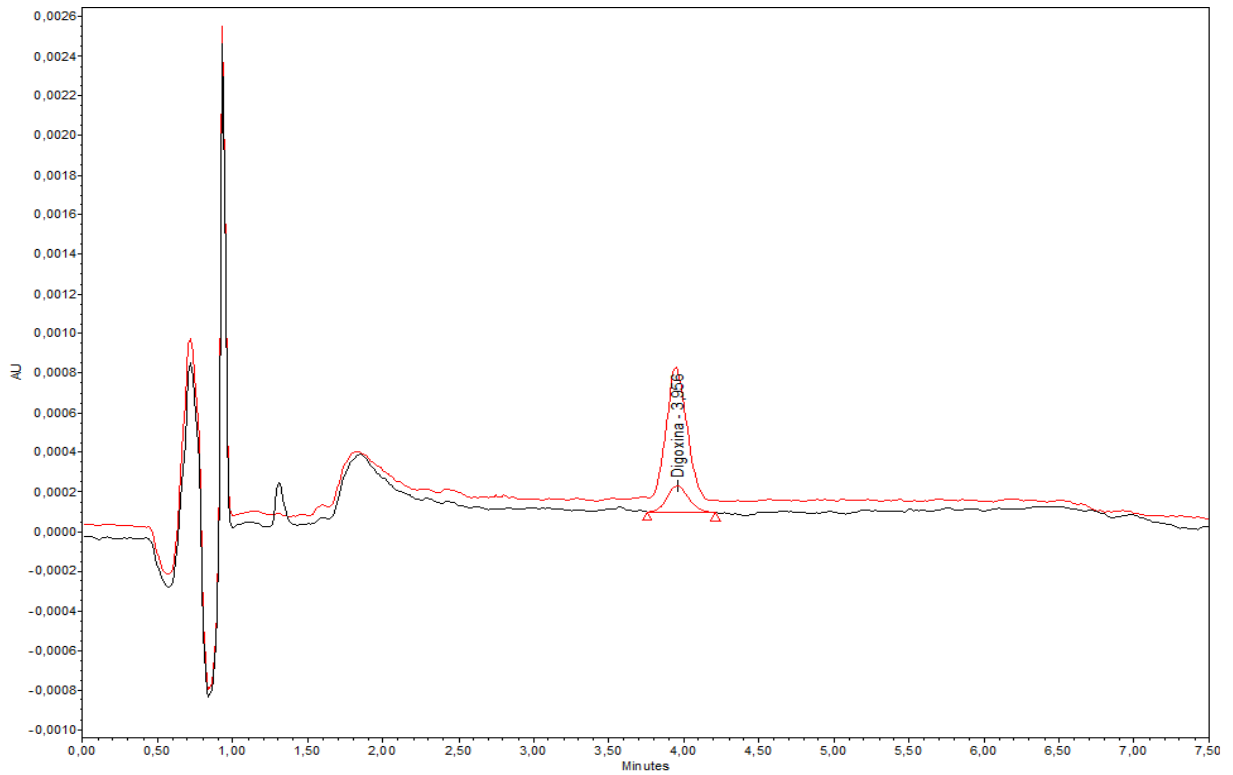


Figura 7: Sobreposição dos cromatogramas referentes as soluções de padrão de DGX diluída nos limites de quantificação (vermelho) e identificação (preto) da metodologia analítica.