



Universidade de Aveiro Departamento de Química

Ano 2012

Elsa Andrade Cardoso **Efeito de ácidos fúlvicos e nitrato na fotode-**
Gonçalves **gradação do metoprolol**



Elsa Andrade Cardoso **Efeito de ácidos fúlvicos e nitrato na fotode-**
Gonçalves **gradação do metoprolol**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química Analítica e Qualidade, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Eduarda Bastos Henriques dos Santos, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Marta Otero Cabero, Investigadora do Departamento de Química e Física Aplicadas da Universidade de León (Espanha).

**Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos e tia
Minha pela amizade e incansável apoio, ainda que de longe,
fizeram-me superar o desafio desta longa caminhada.**

O júri

presidente

Prof. Doutor Artur Manuel Soares da Silva

Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Vítor Jorge Pais Vilar

Investigador Auxiliar do Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Prof. Doutora Maria Eduarda Bastos Henriques dos Santos

Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Marta Otero Cabero

Professora Auxiliar do Departamento de Química e Física Aplicadas da Universidade de León (Espanha)

agradecimentos

À Prof. Doutora Maria Eduarda B.H. Santos, pela orientação, apoio, disponibilidade, e ainda pelos conhecimentos transmitidos durante a realização deste trabalho. Agradeço ainda pelas infindáveis horas, pela paciência e compreensão dedicadas, sempre no sentido do meu crescimento pessoal, intelectual e profissional que foram sem dúvida importantes para a conclusão deste trabalho.

À Doutora Marta Otero Cabero, pela sua orientação, amizade, dedicação, e esclarecimentos, que sem dúvida contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À Dr. Teresa M. Caldeira, pela disponibilidade e amizade que sempre me mostrou durante a realização das experiências.

À Olga M. S. Filipe, pelo apoio constante na resolução dos problemas no HPLC, e sobretudo pelos conhecimentos transmitidos durante a realização das experiências.

A todos os meus colegas de laboratório, em especial a Bruna, o António, e a Joana pela convivência, amizade, e pelo incentivo e apoio nas horas mais difíceis.

Aos meus amigos, Alector, Tuy, Djudjé e Sandra, pela amizade, carinho e pelos bons momentos partilhados.

A toda a minha família, mas não menos importante, um especial agradecimento aos meus pais e tia Minha, pela amizade, amor, carinho e incentivo que mesmo estando longe, nunca deixaram de acreditar, e pela confiança que em mim depositaram. Agradeço a eles ainda pelo apoio financeiro, e por terem contribuído mais uma vez para a realização dos meus projetos.

A todos os que não foram citados aqui, mas que de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

palavras-chave Fotodegradação; beta-bloqueadores; metoprolol; ácidos fúlvicos; nitrato.

resumo

O metoprolol é um beta-bloqueador utilizado no tratamento de várias doenças como hipertensão, arritmias, angina do peito, glaucoma e outros distúrbios relacionados com o sistema cardiovascular. Devido ao seu elevado consumo e baixa biodegradabilidade em particular nas estações de tratamento de águas residuais, (ETARs) torna-se importante conhecer o seu comportamento no meio ambiente. Uma das principais vias de degradação de contaminantes em águas naturais é a fotodegradação pela luz solar, a qual pode ser fortemente influenciada pelas substâncias húmicas e os iões nitrato. Assim, o objetivo deste trabalho é o estudo da fotodegradação do metoprolol em água e na presença de sensibilizadores, nomeadamente ácidos fúlvicos, e iões nitrato. Para este estudo foram utilizados ácidos fúlvicos extraídos do Rio Vouga.

Após uma primeira etapa para a escolha das melhores condições de análise do metoprolol por HPLC-UV, foram efetuados estudos de fotodegradação do metoprolol em solução aquosa, usando um simulador de luz solar. A seguir, estudou-se o efeito da presença de ácidos fúlvicos e iões nitrato nas soluções. Verificou-se que a fotodegradação direta do metoprolol é praticamente nula ao fim de 48 horas de irradiação, no entanto as substâncias húmicas funcionam como fotossensibilizadores acelerando a degradação. Os resultados experimentais ajustaram-se satisfatoriamente a uma cinética de pseudo - primeira ordem.

Foi possível detetar por HPLC-UV a formação de três produtos de degradação do metoprolol.

A fim de identificar a via pela qual as substâncias húmicas promovem a degradação do metoprolol em soluções aquosas, foram utilizados sequestradores específicos de $^1\text{O}_2$ e radicais $\cdot\text{OH}$, verificando-se que a principal via de ação das substâncias húmicas envolve o $^1\text{O}_2$, formado na presença das mesmas, sob ação da luz solar. No entanto, os radicais $\cdot\text{OH}$ estão também envolvidos.

No que diz respeito à influência do nitrato, verificou-se que acelerava a fotodegradação do metoprolol, mas o seu efeito é muito menos acentuado do que o efeito das substâncias húmicas.

keywords

Photo-degradation; beta-blockers; metoprolol; fulvic acids; nitrate.

abstract

Metoprolol is a beta-blocker used for treatment of various diseases such as hypertension, arrhythmia, angina, glaucoma and other diseases related to cardiovascular system. Due to its high consumption and low biodegradability especially in sewage treatment plants (STPs), it is important to know its behavior in the environment. One of the main degradation pathways of contaminants in natural waters is the photo-degradation by sunlight. In natural waters, humic substances and ions (nitrate) may play an important role in the photo-degradation of contaminants. The objective of this work is the study of photo-degradation of metoprolol in water and in the presence of sensitizers including fulvic acid, and nitrate ions.

After a first step for choosing the best conditions of analysis of metoprolol by HPLC-UV, metoprolol photo-degradation studies were made in aqueous solution, using a sunlight simulator. Next, the effects of the presence of fulvic acids and nitrate ion in the solution were studied. For this purpose fulvic acids extracted from River Vouga were used.

It was found that the direct photo-degradation of metoprolol is practically zero after 48 hours of irradiation. However, humic substances act as photosensitizers accelerating the degradation. The experimental results were satisfactorily fitted to pseudo-first order kinetics. It was possible to detect by HPLC-UV the formation of three degradation products. In order to identify the route by which the humic substances promote the degradation of metoprolol in aqueous solutions specific scavengers of $^1\text{O}_2$ and $\cdot\text{OH}$ radicals were used and it was verified that the main pathway of action of the humic substances involves $^1\text{O}_2$, formed in their presence, under sunlight. However, $\cdot\text{OH}$ radicals are also involved.

In what concerns the effect of nitrate, it was observed that it promotes the photo-degradation of metoprolol, but its effect is much less notorious than the effect the humic substances.

Índice

Índice de Figuras	X
Glossário De Símbolos e Abreviaturas	XIII
1 Objetivos e Estrutura da Dissertação	1
2 Introdução.....	5
2.1 Enquadramento geral do tema	7
2.2 Beta-bloqueadores: Contaminantes Emergentes	8
2.2.1 Produção e consumo	9
2.2.2 Ocorrência dos beta-bloqueadores no meio ambiente	10
2.3 Metoprolol	15
2.4 Fotodegradação de beta-bloqueadores no meio ambiente	16
2.5 Efeito das substâncias húmicas e de iões presentes em águas naturais na fotodegradação de contaminantes	19
2.5.1 Ácidos Fúlvicos	19
2.5.2 O nitrato (NO_3^-).....	22
2.6 Uso de sequestradores de espécies reativas de oxigénio na elucidação de vias de fotodegradação indireta de contaminantes na presença de substâncias húmicas.	23
3 Material e métodos	25
3.1 Lavagem do material de laboratório.....	27
3.2 Reagentes.....	27
3.3 Equipamentos	28
3.4 Preparação das soluções padrão de metoprolol.....	28
3.5 Preparação das soluções para o estudo da fotodegradação de metoprolol	29
3.5.1 Soluções metoprolol em água.....	29
3.5.2 Preparação de soluções de metoprolol com ácidos fúlvicos	29
3.5.3 Preparação de soluções de metoprolol com nitrato.....	30
3.5.4 Preparação de soluções de metoprolol na presença de ácidos fúlvicos com sequestradores de radicais $\cdot\text{OH}$ e $^1\text{O}_2$	30
3.6 Irradiação das soluções	31
4 Resultados e Discussão.....	33
4.1 Optimização das condições de análise no HPLC	35
4.2 Quantificação do metoprolol por HPLC: Retas de calibração e limites de deteção....	38
4.3 Fotodegradação de soluções de metoprolol 50 mg/L em água.....	39

4.4	Efeito do nitrato na degradação do metoprolol em água.....	43
4.5	Efeito de ácidos fúlvicos na degradação do metoprolol em água	47
4.6	Deteção de produtos de degradação do metoprolol na presença de ácidos fúlvicos	51
4.7	Efeito dos sequestradores de radicais $\cdot\text{OH}$ e de $^1\text{O}_2$ na fotodegradação do metoprolol na presença de ácidos fúlvicos.....	55
4.8	Estudo do efeito da concentração na degradação do metoprolol na presença de ácidos fúlvicos	59
5	Conclusão	63
6	Referências bibliográficas.....	67

Índice de Figuras

Figura 1: Estrutura básica comum dos beta-bloqueadores.....	9
Figura 2: Cromatograma obtido da solução padrão de metoprolol 50 mg/L para as seguintes composições de fase móvel: acetonitrilo/solução tampão (20:80) V/V.	36
Figura 3: Cromatograma da solução padrão de metoprolol 50 mg/L para a fase móvel: acetonitrilo/ água (10:90) V/V, acidificado com 0,1% de HCOOH.....	37
Figura 4: Retas de calibração para a quantificação do metoprolol em solução aquosa para a fase móvel acetonitrilo: água, acidificado com HCOOH 0,1% (10:90) V/V.	38
Figura 5: Razão entre as concentrações das soluções de controlo (CT) e a concentração inicial (C_0) ao longo do tempo para os ensaios, 1, 2 e 3 respetivamente.....	40
Figura 6: Variação da concentração do metoprolol normalizada em relação a concentração inicial (C/C_0) ao longo do tempo de irradiação (h).....	41
Figura 7: Comparação da fotodegradação do metoprolol na ausência (SM 1ºensaio, SM 2ºensaio e SM 3ºensaio) e na presença do NO_3^- (SM+N 1ºensaio, SM+N 2ºensaio e SM+N 3ºensaio), ao longo do tempo de irradiação.	44
Figura 8: Resultados experimentais referentes a degradação do metoprolol ($C_0 \sim 50$ mg/L) na presença de NO_3^- (10 mg/L), ajustados aos modelos cinéticos de pseudo - primeira ordem para os respetivos ensaios (1, 2 e 3).	45
Figura 9: Comparação da degradação do metoprolol na ausência (SM 1ºensaio, SM 2ºensaio e SM 3ºensaio) e na presença dos ácidos fúlvicos (SM+AF 1ºensaio, SM+AF 2ºensaio e SM+AF 3ºensaio) ao longo do tempo de irradiação.	47
Figura 10: Resultados experimentais referentes a degradação do metoprolol ($C_0 \sim 50$ mg/L) na presença de ácidos fúlvicos (10 mg/L), ajustados aos modelos cinéticos de pseudo - primeira ordem para os respetivos ensaios (1, 2 e 3).....	48
Figura 11: Estruturas propostas para a degradação do metoprolol em água dos rios: m/z 226 e m/z 254 (adaptado por Liu <i>et al.</i> 2009).	50
Figura 12: Cromatograma da solução de metoprolol na presença dos fúlvicos com ao fim de 12 h de irradiação.	51
Figura 13: Espectro do produto correspondente ao pico 1 ($t_r = 3,65$ min) da solução metoprolol na presença de ácidos fúlvicos ao fim de 12 h de irradiação.	52
Figura 14: Espectro do produto correspondente ao pico 2 ($t_r = 3,95$ min) da solução metoprolol na presença de ácidos fúlvicos ao fim de 12 h de irradiação.	52

Figura 15: Espectro do produto correspondente ao pico 3 ($t_r = 4,70$ min) da solução metoprolol na presença de ácidos fúlvicos ao fim de 12 h de irradiação.	53
Figura 16: Cromatograma (expandido) da solução de metoprolol na presença dos fúlvicos ao fim de 12 h de irradiação.	53
Figura 17: Cromatograma com deteção a 222 nm da solução de ácidos fúlvicos ao fim de 48 h de irradiação.	54
Figura 18: Cromatograma com deteção a 222 nm da solução de metoprolol na ausência de ácidos fúlvicos ao fim de 12 h de irradiação.	55
Figura 19: Comparação da degradação do metoprolol com ácidos fúlvicos na ausência (SM+F) e na presença do manitol (SM+F+MAN).	56
Figura 20: Comparação da degradação do metoprolol com ácidos fúlvicos na ausência (SM+F) e na presença (SM+F e SM+F+NaN ₃) de NaN ₃	56
Figura 21: Comparação da degradação do metoprolol com ácidos fúlvicos 50 mg/L e 250 mg/L.	60
Figura 22: Cromatograma com deteção a 222 nm da solução de metoprolol ($C_0 \sim 250$ mg/L) na presença de ácidos fúlvicos ao fim de 24 h de irradiação.	61

Índice de Tabelas

Tabela 1: Consumo anual de beta-bloqueadores em vários países (kg/ano).	10
Tabela 2: Ocorrência de beta-bloqueadores em ETARs e em águas superficiais.....	12
Tabela 3: Propriedades físico-químicas do metoprolol.....	15
Tabela 4: Estudos de fotodegradação de beta - bloqueadores em águas.	18
Tabela 5: ANOVA a uma dimensão referente a média da concentração normalizada C/C_0 da solução de metoprolol em água.	41
Tabela 6: ANOVA a uma dimensão referente a média da concentração normalizada C/C_0 da solução de metoprolol na presença de nitrato.	44
Tabela 7: Coeficientes de correlação (R^2) e constantes cinéticas (K) da solução metoprolol na presença de NO_3^- para cada um dos ensaios.....	46
Tabela 8: Coeficiente de correlação (R^2) e constantes cinéticas (k) das soluções metoprolol na presença de ácidos fúlvicos para cada um dos ensaios.....	48

Glossário De Símbolos e Abreviaturas

® - Marca registada

AF - Ácidos Fúlvicos

C₁₈ – Octadecil

CEs – Contaminantes emergentes

ETARs - Estação de tratamento de águas residuais

HPLC-UV – *High Performance Liquid Chromatography*: Cromatografia líquida de alta eficiência com deteção UV

h ν - Energia de radiação incidente

IMS Health – Companhia de produtos farmacêuticos

K_{ow} – Coeficiente de partição octanol-água

LD – Limite de Deteção de todo o método

Man - Manitol

p_{Ka} – Constante de ionização

SH – Substâncias Húmicas

SM- Solução metoprolol

t_{1/2} – Tempo de meia-vida

t_r – Tempo de retenção

UV-Vis - Ultravioleta e Visível

V/V – volume/volume

λ – Comprimento de onda

1 Objetivos e Estrutura da Dissertação

A preocupação com a presença de beta-bloqueadores no meio ambiente é uma questão relativamente recente. Embora as concentrações referidas na literatura se encontrem na ordem dos $\mu\text{g} - \text{ng/L}$, alguns estudos referem que, mesmo a essas concentrações, estes fármacos podem causar efeitos tóxicos em diversos organismos. Uma vez que a entrada desses fármacos no ambiente é permanente, há uma crescente preocupação em os identificar no ambiente, e em conhecer melhor o seu comportamento e os seus efeitos no ambiente.

Sendo a fotodegradação pela luz solar uma das principais vias de degradação abiótica de contaminantes orgânicos no ambiente, a realização deste trabalho teve como principal objetivo avaliar a fotoestabilidade do metoprolol em águas, e averiguar se os ácidos fúlvicos e ião nitrato atuam como fotossensibilizadores na sua fotodegradação do metoprolol na ausência e na presença de ácidos fúlvicos e nitrato.

Todas as análises para o seguimento da fotodegradação do metoprolol sozinho e do metoprolol na presença de sensibilizadores foram efetuadas por HPLC/UV. Assim, a otimização da fase móvel para a quantificação do metoprolol em água foi um passo e objetivo preliminar importante deste trabalho.

Entre os objetivos secundários do presente trabalho estavam:

Investigar, se a concentração inicial do metoprolol em fase aquosa tem alguma influência na cinética de fotodegradação deste beta-bloqueador.

Verificar se o mecanismo da fotodegradação do metoprolol na presença de ácidos fúlvicos envolve os radicais $\cdot\text{OH}$ e/ou, oxigénio singlete ($^1\text{O}_2$), através da adição de substâncias sequestradoras específicas.

Esta dissertação está estruturada do seguinte modo:

No primeiro capítulo que consta duma introdução geral onde se fez o enquadramento do tema em estudo, a estrutura e os objetivos deste trabalho. No segundo capítulo estão sumariadas, os beta-bloqueadores: contaminantes emergentes, a sua produção e consumo, bem como a sua ocorrência no meio ambiente, de onde procedeu-se a escolha do beta-bloqueador a analisarmos. As principais propriedades físico-químicas do metoprolol também se encontram resumidas neste capítulo.

O terceiro capítulo é constituído pela metodologia experimental, onde estão descritos todos os materiais e métodos utilizados neste estudo.

Os resultados obtidos neste estudo, bem como as discussões dos mesmos encontram-se sumarizados no quarto capítulo.

As principais conclusões deste estudo, e as referências bibliográficas consultadas que serviram de base para a realização deste trabalho, encontram-se no quinto e sexto capítulo respetivamente.

2 Introdução

2.1 Enquadramento geral do tema

Atualmente o desenvolvimento tecnológico e o crescimento industrial são de grande importância pois têm proporcionado um aumento na qualidade de vida das populações, mas no entanto como consequência desse aumento de qualidade de vida, têm surgido alguns problemas ambientais. Uma das maiores consequências do avanço tecnológico tem sido o desenvolvimento de inúmeras substâncias de grande aplicação ao nível de indústria, agricultura e medicina. Recentemente, este assunto tornou-se de grande relevância ambiental uma vez que, devido ao uso indiscriminado destas substâncias durante várias décadas, algumas questões relacionadas com a sua persistência e os seus possíveis efeitos tóxicos no ambiente têm sido levantadas. Estas substâncias começaram a ser chamadas de contaminantes emergentes (CEs) (Fent *et al.*, 2006). Os CEs são todo o tipo de substâncias de origem natural ou sintética, que ao entrarem no meio ambiente constituem um potencial perigo para a saúde ecológica ou humana, sendo que para a maioria deles não existem regulamentações (Petrovic *et al.*, 2003).

A relevância destes CEs está relacionada com o desenvolvimento de metodologias e técnicas analíticas dos últimos anos, que têm possibilitado a deteção e a determinação da concentração dessas substâncias no ambiente, na ordem dos ng/L (Hernando *et al.*, 2006b). Portanto, cada vez mais se procura implementar novos métodos para identificar e/ou quantificar estes CEs, pois em muitos casos desconhecem-se as reais consequências da libertação destas substâncias no meio ambiente, sobretudo no que diz respeito à sua toxicidade. A presença de CEs está muitas vezes associada à toxicidade crónica, à desregulação endócrina sobretudo em organismos aquáticos, onde a exposição a estes contaminantes se procede em várias gerações (Halling-Sorensen *et al.*, 1998). Devido aos efeitos adversos provocados à saúde por estes compostos e seus metabolitos, sobretudo em organismos aquáticos, é importante estudar o comportamento destes CEs no meio ambiente (Fent *et al.*, 2006).

Entre os CEs, os fármacos constituem um dos grupos que tem merecido uma atenção especial, uma vez que são produzidos e consumidos para provocar uma resposta ao nível fisiológico e/ou bioquímico, pelo que a sua presença em águas naturais pode ter efeitos indesejáveis (Hernando *et al.*, 2006b). Após a administração, os fármacos podem ser excretados de forma natural através do organismo (qualquer organismo, humano ou ani-

mal, excreta cerca de 50 a 90% de cada fármaco na sua forma de substância ativa, isto é, inalterado), ou ainda sob a forma de metabolitos (Maurer *et al.*, 2007). Uma das principais fontes pontuais de descarga dos fármacos no meio ambiente é através dos efluentes das ETARs (Hernando *et al.*, 2004; Zuccato *et al.*, 2006; Vieno *et al.*, 2007). Uma das famílias de fármacos frequentemente encontrados nos recursos hídricos, devido à sua ampla prescrição mundial e também à sua incompleta biodegradabilidade e remoção nas estações de tratamento de águas residuais (ETARs) é a dos beta-bloqueadores ou chamados β - adrenérgicos (Larsson *et al.*, 2006). Estes compostos são drogas utilizadas no tratamento de várias doenças como hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva, arritmias, angina do peito, entre outros distúrbios relacionados com o sistema cardiovascular (Cleuvers *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007).

São vários os tipos de beta-bloqueadores mencionados na literatura que têm sido detetados no meio aquático, como por exemplo, atenolol, acebutolol, bisoprolol, entre outros (Ternes *et al.*, 1998; Bendz *et al.*, 2005; Vieno *et al.*, 2007). O metoprolol é um dos beta-bloqueadores mais importantes devido ao seu elevado consumo e baixa biodegradabilidade principalmente nas estações de tratamento de águas residuais (ETARs), (Ternes *et al.*, 1998; Andreozzi *et al.*, 2003; Hugget *et al.*, 2003), assim como em águas superficiais (Conkle *et al.*, 2008; Alder *et al.*, 2010; Daneshaver *et al.*, 2010). Uma vez que, tem sido demonstrado que o metoprolol não é completamente removido das ETARs (Bendz *et al.*, 2005; Vieno *et al.*, 2006; Maurer *et al.*, 2007), o estudo da sua fotodegradação é importante, porque permite-nos conhecer as reações químicas que ocorrem sob a ação solar, e que poderão eventualmente minimizar os efeitos negativos que este composto pode provocar no meio ambiente, ou pelo contrário aumentá-los, se os produtos de degradação forem mais tóxicos do que os compostos de origem.

2.2 Beta-bloqueadores: Contaminantes Emergentes

Os beta-bloqueadores subdividem-se em duas classes principais, os chamados seletivos e não seletivos, que se dividem de acordo com as suas propriedades farmacocinéticas, farmacodinâmicas e seletividade para bloquear o recetor cardíaco β_1 . Os antagonistas β_1 - não seletivos incluem o metipranolol, nadolol, oxprenolol, penbutolol, pindolol, propranolol, timolol e sotalol e os β_1 - seletivos, incluem o atenolol, acebutalol, betaxolol, bisoprolol, esmolol, metoprolol e nebulol. Por último estão os beta-bloqueadores mistos α_1/β_1

como o carvedilol e o labetalol (INFARMED). Uma característica comum na estrutura química dos beta-bloqueadores (figura 1) é a presença de pelo menos dois grupos funcionais, um grupo etanol e uma amina ligado a um anel aromático (a maioria dos compostos contém – CH (OH) - CH₂ - NH) na cadeia lateral a que se liga ao anel aromático (Lee *et al.*, 2007).

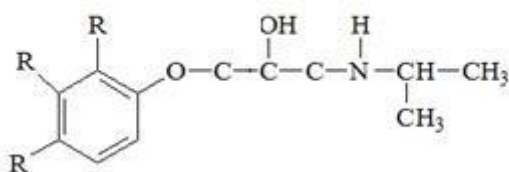


Figura 1: Estrutura básica comum dos beta-bloqueadores.

2.2.1 Produção e consumo

Quanto à produção de beta-bloqueadores ao nível mundial, os dados disponibilizados na literatura são referentes ao ano de 2002, na Alemanha, permitiram estimar uma produção de cerca de 100-250 toneladas de beta-bloqueadores por ano. O cálculo, baseia-se no número de doses prescritas, por cada 1000 habitantes num período de um ano (Mustchler *et al.*, 2001; Schwabe e Paffrath, 2004, citado por Cleuvers *et al.*, 2005).

Em relação ao consumo de beta-bloqueadores, os mais consumidos na Europa são o atenolol e o metoprolol, cujo consumo representa mais de 80% de todos os beta-bloqueadores. De acordo com os dados reportados na literatura, o Reino Unido, a Suíça e a Finlândia, são os principais consumidores de beta-bloqueadores de acordo com os dados de venda da IMS Health (Companhia de Produtos Farmacêuticos) referentes ao ano de 2001 (Alder *et al.*, 2010). Contudo, outros estudos indicam que na Alemanha, o propranolol é o beta-bloqueador mais consumido além de se encontrar na lista das três principais drogas utilizadas neste país (Schwabe e Paffrath, 2004, citado por Cleuvers *et al.*, 2005). Miège *et al.* (2006) relataram nos seus estudos, que os beta-bloqueadores mais prescritos na França em 1999, foram o acebutolol, propranolol e metoprolol (10-45 t/ano), enquanto outros beta-bloqueadores como o bisoprolol, oxprenolol, nadolol e betaxolol, estes foram prescri-

tos na ordem de 2 t/ano, de acordo com os dados obtidos da “Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de la Santé” (AFSSAPS). A prescrição dos beta-bloqueadores em França tem aumentado desde 1991 a 2001, na ordem dos 50% (Miége *et al.*, 2006). A tabela 1 mostra o consumo anual dos beta-bloqueadores em vários países.

Tabela 1: Consumo anual de beta-bloqueadores em vários países (kg/ano).

País	Ano	Beta-bloqueadores				
		Acebutolol	Atenolol	Metoprolol	Sotalol	Propranolol
Alemanha	1995	-	-	5000 ^a	-	3000 ^a
	1999	-	-	6766 ^b	-	-
	2000	-	-	7915 ^b	-	-
	2001	-	-	9297 ^b	-	-
Áustria	1997	-	-	2440 ^b	-	-
Inglaterra	2000	-	2898 ^b	11800 ^a	-	-
Itália	2001	-	2207 ^b	-	-	-
Suíça	2004	-	3200 ^b	3200 ^b	800 ^b	800 ^b
Finlândia	2004	940 ^c	865 ^c	5340 ^c	610 ^c	-
	2005	941 ^d	863 ^d	5339 ^d	612 ^d	-
França	1999	-	-	-	-	35000 ^e

Fonte: a - Beausse *et al.*, 2004; b - Fent *et al.*, 2006; Maurer *et al.*, 2007; Zuccato *et al.*, 2005; c - Vieno *et al.*, 2006; d - Vieno *et al.*, 2007 de acordo com Agência Nacional de Medicina; e - Miége *et al.*, 2006.

De acordo com esta tabela 1, o consumo anual de beta-bloqueadores varia consideravelmente de uns países para outros, sendo no geral o metoprolol o beta-bloqueador mais consumido. Outras referências, como por exemplo, da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam a Suíça como o principal consumidor de metoprolol entre 1997 e 2008 atingindo um máximo de 4500 kg/ano, de acordo com os dados de venda (citado por Alder *et al.*, 2010).

2.2.2 Ocorrência dos beta-bloqueadores no meio ambiente

Conforme já foi anteriormente referido, os beta-bloqueadores após a ingestão e subsequente excreção, chegam às ETARs, sob a sua forma original, ou metabolitos, através dos efluentes domésticos (Hugget *et al.*, 2003). Os beta-bloqueadores lipofílicos como o betaxolol, bisoprolol, metoprolol, propranolol e oxprenolol, sofrem metabolização na ordem dos 80% enquanto que o atenolol, nadolol e sotalol são excretados parcialmente

metabolizados (taxa de metabolização inferior a 20%) (Miége *et al.*, 2006). Portanto, devido à sua contínua entrada no meio ambiente, estes compostos são frequentemente encontrados em afluentes e efluentes das ETARs em concentrações na ordem dos $\mu\text{g/L}$. Após o tratamento das águas residuais nas ETARs, que normalmente incluem a remoção dos sólidos em suspensão, compostos orgânicos biodegradáveis, nutrientes e microrganismos patogénicos através de agentes químicos, físicos e biológicos, os efluentes são descarregados em águas superficiais. Em muitos casos, os efluentes podem infiltrar-se para a terra, sobretudo em areais onde não há água superficial disponível. Em águas superficiais, a concentração de beta-bloqueadores é mais baixa do que nos efluentes das ETARs, devido à diluição que ocorre ao misturar-se com outras águas (Vieno *et al.*, 2007).

Na tabela 2 apresentam-se os beta-bloqueadores mais comuns em amostras ambientais, assim como a sua localização, níveis de concentração e tipo de águas onde são encontrados. De um modo geral, conforme se pode ver na tabela 2, o metoprolol é um dos beta-bloqueadores que apresentam elevada ocorrência, em efluentes de ETARs, e também em águas superficiais.

Efeito de ácidos fúlvicos e nitrato na fotodegradação do metoprolol

Tabela 2: Ocorrência de beta-bloqueadores em ETARs e em águas superficiais.

Beta-bloqueadores	Localização/ País	Afluente (µg/L)	Efluente (µg/L)	Água superficial (ng/L)	Referências	Beta-bloqueadores	Localização/ País	Afluente (µg/L)	Efluente (µg/L)	Água superficial (ng/L)	Referências
Acebutolol	Europa*	-	0.13 ^a	-	Andreozzi <i>et al.</i> , 2003	Betaxolol	Alemanha	-	0.06 -	-	Ternes <i>et al.</i> , 1998
	Finlândia	0.07 ^b	0.18 ^b	1-8	Vieno <i>et al.</i> , 2006		0.006 ^c	0.19 ^c	-	Wick <i>et al.</i> , 2009	
		-	-	3-14	Vieno <i>et al.</i> , 2007 ^b		Europa	-	-	28	Boxall., 2004
	Canadá	0.38 ^c	0.31 ^c	-	Lee <i>et al.</i> , 2007						
	França	0.48	0.004	-	Piram <i>et al.</i> , 2008 ^b						
Suíça	-	0.002 ^d	0.5	Daneshvar <i>et al.</i> , 2010							
Bisoprolol	Alemanha	-	0.06 (0.37) ^c	-							
	Europa	-	-	2.9	Ternes <i>et al.</i> , 1998						
	USA	-	0.80 ^d	-	Boxall., 2004						
	Canadá	0.04 ^c	0.03 ^c	-	Miége <i>et al.</i> , 2006						
	França	0.07	0.001	-	Lee <i>et al.</i> , 2007						
Alemanha	0.21 ^c	0.21 ^c	-	Piram <i>et al.</i> , 2008b Wick <i>et al.</i> , 2009							
Atenolol	Itália	-	-	3-241	Calamari <i>et al.</i> , 2003	Atenolol	Finlândia	0.69	-	-	Conkle <i>et al.</i> , 2008
	Europa**	-	(0.19)0.73	-	Paxéus 2004		Finlândia	0.17	0.19	-	Piram <i>et al.</i> , 2008 ^b
	Suécia	0.03	^c	10-60	Bendz <i>et al.</i> , 2005		USA	0.54 ^c	0.02	-	Wick <i>et al.</i> , 2009
	Itália	-	0.16	-	Castiglioni <i>et al.</i> , 2005		Canadá	-	0.30 ^c	-	Daneshvar <i>et al.</i> , 2010
	Suécia	-	0.03-1.17	-	Zuccato <i>et al.</i> , 2005		França	-	0.27 ^d	38	
	Espanha	-	0.47 ^c	250	Gómez <i>et al.</i> , 2006		Suíça	-	-	50-670	Ginebreda <i>et al.</i> , 2010
		-	3.4 ^d	-	Gros <i>et al.</i> , 2006					6-200	López-Roldán <i>et al.</i> , 2010
	Espanha	(0.23)1.0 ^c	-	-	Petrovic <i>et al.</i> , 2006						
	Espanha/Croácia	1.15 ^a	(0.28) 1.20 ^a	-	Vieno <i>et al.</i> , 2006						
	Finlândia	-	0.74 ^a	12-25							
	Suíça	1.65 ^c	-	-	Lee <i>et al.</i> , 2007						
	Itália	2.23 ^d	0.99 ^c	-	Maurer <i>et al.</i> , 2007						
	Espanha	-	0.54 ^d	-	Radjenovic <i>et al.</i> , 2007						
	-	21.0 ^d	17-55	Vieno <i>et al.</i> , 2007 ^b							

Efeito de ácidos fúlvicos e nitrato na fotodegradação do metoprolol

Metoprolol	Alemanha	-	0.73- 2.20	-	Ternes <i>et al.</i> , 1998	Metoprolol	Canadá	-	-	-	Maurer <i>et al.</i> , 2007
		-	45 (2200) ¹	-			Suécia	-	0.24 ^d	-	Radjenovic <i>et al.</i> , 2007
	Europa*	-	0.08-0.39	-	Andreozzi <i>et al.</i> , 2003		Espanha	-	0.13 ^d	-	Conkle <i>et al.</i> , 2008
	USA	-	0.02	-	Hugget <i>et al.</i> , 2003		USA	0.11	3.32 ^f	-	
	Europa**	-	(1.20) ^c	-	Paxéus 2004		França	0.81 ^c	-	-	Piram <i>et al.</i> , 2008b
	Suécia	0.16	0.08	224 ¹	Wiegel <i>et al.</i> , 2004		China	-	0.07 ^d	-	Shao <i>et al.</i> , 2009
		-	-	30-70	Bendz <i>et al.</i> , 2005		Alemanha	-	0.001	-	Wick <i>et al.</i> , 2009
		-	-	-			Suíça	-	0.002 ^c	-	Daneshvar <i>et al.</i> , 2010
	USA	1.13 ^c	(0.39) ^c	-				-	0.64 ^c	-	Ginebreda <i>et al.</i> , 2010
	Finlândia	-	0.19	-	Miége <i>et al.</i> , 2006			-	0.28 ^d	47	López-Roldán <i>et al.</i> , 2010
		0.27 ^d	0.51 ^e	4-116	Vieno <i>et al.</i> , 2006		Espanha	-	-	10-180	
	-	-	-	Lee <i>et al.</i> , 2007		-	-	1-8041			
	0.20 ^d	1.00 ^c	39-107	Vieno <i>et al.</i> , 2007 ^b							
Propranolol	Alemanha	-	0.17	-	Ternes <i>et al.</i> , 1998	Propranolol	Espanha/Croácia	0.04 ^c	-	-	Petrovic <i>et al.</i> , 2006
	Europa*	-	(0.29) ^c	12(590) ^c				0.11 ^d	0.42 ^d	-	Lee <i>et al.</i> , 2007
	USA	-	-	-	Andreozzi <i>et al.</i> , 2003			0.09	(0.14)	-	Maurer <i>et al.</i> , 2007
	USA	-	0.01-0.09	-	Huggett <i>et al.</i> , 2003		Canadá	0.040 ^c	0.52 ^c	-	Piram <i>et al.</i> , 2008b
	Europa	0.05	0.04	10	Boxall., 2004		Suécia	-	0.03 ^c	110-1820	Wick <i>et al.</i> , 2009
	Suécia	-	-	-	Bendz <i>et al.</i> , 2005		França	-	0.08 ^d	-	Ginebreda <i>et al.</i> , 2010
		0.47 ^d	(1.90) ^c	<1-10			Alemanha	-	0.002	2-17	López-Roldán <i>et al.</i> , 2010
	Espanha	-	-	-	Gros <i>et al.</i> , 2006		Espanha	-	0.040 ^c	-	
	USA	-	0.03	-	Miége <i>et al.</i> , 2006						
		0.12-0.38 ^c	0.29 ^d	-							
Sotalol	Alemanha	-	-	560	Sacher <i>et al.</i> , 2001	Nadolol	Alemanha	0.08 ^c	0.025-	-	Ternes <i>et al.</i> , 1998
		0.34 ^d	0.25 ^d	-	Maurer <i>et al.</i> , 2007		USA	-	0.06 ^c	-	Huggett <i>et al.</i> , 2003
	Suécia	0.31 ^c	0.26 ^c	-	Lee <i>et al.</i> , 2007		Canadá	0.01	0.05(0.36)	-	Lee <i>et al.</i> , 2007
	Canadá	0.32	0.07	-	Piram <i>et al.</i> , 2008b		USA	-) ^c	-	Conkle <i>et al.</i> , 2008
	França	0.87 ^c	0.71 ^c	-	Wick <i>et al.</i> , 2009		França	-	0.07 ^c	-	Piram <i>et al.</i> , 2008b
	Alemanha	-	0.14 ^d	-	Conkle <i>et al.</i> , 2008				0.02 ^d	-	
	USA	-	0.24 ^c	-	Vieno <i>et al.</i> , 2006				0.0001	-	
	Finlândia	0.71 ^c	0.20 ^a	-	Gros <i>et al.</i> , 2006					-	
	Espanha	0.21 ^a	0.17 ^d	-	Daneshvar <i>et al.</i> , 2010					-	

Efeito de ácidos fúlvicos e nitrato na fotodegradação do metoprolol

Timolol	Europa	-	-	10	Boxall., 2004	Carazolol	Europa	-	-	110	Boxall., 2004
	Canadá	0.007 ^c	<0.006 ^c	-	Lee <i>et al.</i> , 2007	Celiprolol	Alemanha	0.10 ^c	0.12 ^c	-	Wick <i>et al.</i> , 2009
	França	0.03	0.06	-	Piram <i>et al.</i> , 2008b	Labetolol	Canadá	0.09 ^c	0.08 ^c	-	Lee <i>et al.</i> , 2007
						Oxprenolol	Europa*	-	0.02-0.05	-	Andreozzi <i>et al.</i> , 2003
						Pindolol	França	0.002	0.0004	-	Piram <i>et al.</i> , 2008b

Valores com “<” encontram-se abaixo do limite de quantificação (LQ) ou do limite de deteção (LD); ^a máximo, ^b mediana; ^d média; *dados obtidos de alguns países como a França, Itália, Grécia e Suíça; **dados obtidos da Espanha, Alemanha e Eslovénia; ***dados obtidos da França, Itália, suíça e Dinamarca; c (média) obtido das 3 ETARs; d (média) obtido em 34 amostras; e (média) obtido em 30 amostras; f (média expressa em gramas); 1= Valor máximo reportado; Sotalol foi detetado em 3 das 105 amostras de águas subterrâneas (Sacher *et al.*, 2001).

2.3 Metoprolol

Conforme já foi citado anteriormente, o metoprolol é um dos beta-bloqueadores mais consumidos na Europa, e apresenta uma elevada ocorrência tanto em efluentes de ETARs, como em águas superficiais. É usado no tratamento de doenças como a hipertensão, a angina de peito e outras perturbações do ritmo cardíaco, incluindo arritmias e enfarte do miocárdio (Alder *et al.*, 2010; Rivas *et al.*, 2010).

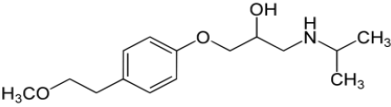
Relativamente à metabolização do metoprolol, este é extensamente metabolizado pelas enzimas do sistema citocromo P450 do fígado. Assim sendo, o metabolismo do metoprolol representa cerca de 85% da sua eliminação e envolve três vias metabólicas principais. De acordo com a literatura foram detetados, três metabólitos do metoprolol em amostras de afluentes e efluentes de ETARs (Hernando *et al.*, 2007). Os metabólitos formados são o O-desmetil metoprolol (ODM) e ácido O-desmetil metoprolóico (AODM), o α -hidroxi metoprolol (α -OHM) e o N-desaquil metoprolol (N-DAM) (Mistry *et al.*, 2001).

No que diz respeito ao seu destino e distribuição no meio ambiente, e também na previsão e no desenvolvimento de métodos de deteção analítica, é importante conhecer as propriedades físico-químicas. Existem diversas propriedades que se podem relacionar com a distribuição e o destino dos fármacos no ambiente aquático, como, por exemplo, a sua solubilidade em água, o seu coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), e as suas propriedades ácido – base, entre outras.

Na tabela 3, encontram-se sumariadas as principais propriedades físico-químicas do metoprolol.

Tabela 3: Propriedades físico-químicas do metoprolol

Propriedades	Referências
Nome IUPAC	{ 1- Isopropil amino - 3- [4 - (2- metoxi etilo) fenoxi]-2-propanol}

Estrutura			Alder <i>et al.</i> , 2010
Número de registo (CAS)	37350-58-6		
Fórmula molecular	C ₁₅ H ₂₅ NO ₃		
Classe terapêutica	Beta-bloqueador		
Peso molecular	267,36 g mol ⁻¹		
Constante de ionização, pK_a	9,7	Alder <i>et al.</i> , 2010	
Log K_{ow}	1,88		
Solubilidade em água a 25°C	1,69 x 10 ⁴ mg/L		

Assim de acordo com os dados apresentados na tabela 3, o metoprolol é um beta-bloqueador bastante solúvel em água, e com um valor de coeficiente de partição octanol/água baixo (Log K_{ow} = 1,88). Este composto é comercializado sob a forma de sais de tartarato de metoprolol composta por uma mistura racémica de dois isómeros [R-metoprolol /S-metoprolol: 50/50], ou ainda de sais de succinato (±)-1-amina isopropilico-3 [4- (2-metoxi etil) [fenoxi] -2-propanol] (Mistry *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2009).

2.4 Fotodegradação de beta-bloqueadores no meio ambiente

Conforme já foi referido anteriormente, os beta-bloqueadores têm sido encontrados, tanto em efluentes de ETARs como em águas superficiais (Ternes *et al.*, 1998; Bendz *et al.*, 2005). Por essa razão, é interessante estudar a fotodegradação dos beta-bloqueadores, a fim de conhecer as reações químicas que ocorrem sob a ação da luz solar a fim de prever o seu comportamento no ambiente.

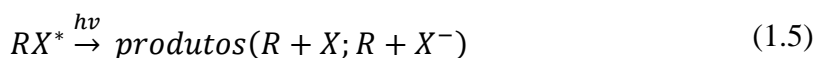
Os beta-bloqueadores podem ser degradados por várias vias, tanto bióticas como abióticas. Entre as abióticas encontra-se a fotodegradação, que é a degradação de uma molécula fotodegradável provocada pela absorção de fotões com os comprimentos de onda certos. Um cromóforo ou grupo cromóforo é parte ou conjunto de átomos de uma molécula responsável pela absorção de fotões. A fotodegradação de qualquer substância pode ocorrer por dois processos distintos, sendo eles a fotodegradação direta e

fotodegradação indireta. A fotodegradação direta, ou a chamada fotólise direta, é o processo no qual ocorre a absorção direta do fóton de luz pelo referido composto, originando uma molécula excitada que pode sofrer diversas alterações químicas, como por exemplo, a fragmentação, o rearranjo molecular, a dimerização, entre outros. Na fotodegradação indireta, a reação é iniciada pela absorção de fótons por uma outra espécie presente na solução (os fotocatalizadores ou fotossensibilizadores) que ao absorver estes fótons, fica excitada, transferindo essa energia para o contaminante provocando a sua excitação e, posteriormente a formação de fotoprodutos. Quando o cromóforo pertence a um fotocatalizador este processo é designado por fotocatalise, e normalmente o cromóforo é regenerado durante os processos de transferência de energia (Peuravuori *et al.*, 2009). Como veremos adiante ao referirmos o papel das substâncias húmicas, pode também acontecer que o fotossensibilizador depois de excitado transfira a sua energia para outra espécie, por exemplo o oxigénio dissolvido dando origem a espécies reativas que podem depois reagir com o contaminante.

FOTODEGRADAÇÃO DIRETA



FOTODEGRADAÇÃO INDIRETA



RX e S representam, por exemplo, um beta-bloqueador e um sensibilizador respetivamente; as espécies RX^* e S^* representam os respetivos estados eletrónicos excitados.

Os fotossensibilizadores naturais, no qual têm um papel determinante nas reações fotoquímicas de diversos tipos de contaminantes podem ou não influenciar a fotodegradação de beta-bloqueadores em águas (Piram *et al.*, 2008a). Entre eles estão os ácidos húmicos e fúlvicos, e os iões nitratos, nitritos e ferro.

A fotodegradação de diversos beta-bloqueadores, em soluções sintéticas efluentes, ou águas naturais, usando diferentes tipos de fontes de radiação e diferentes

condições de degradação (fotossensibilizadores e/ou catalizadores), tem sido estudada por diversos investigadores, conforme mostra a tabela 4 (Andreozzi *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2009; Rivas *et al.*, 2010).

Tabela 4: Estudos de fotodegradação de beta - bloqueadores em águas.

β-bloqueadores	Tipo de águas	Fossensibilizadores/ catalizadores	Referências
Acebutolol Betaxolol Metoprolol Oxprenolol Propranolol	Efluentes ETARs	Ácidos húmicos/ NO ₃ ⁻	Andreozzi <i>et al.</i> , 2003
Acebutolol Alprenolol Atenolol Bisoprolol Metoprolol Nadolol Propranolol Pindolol Sotalol Timolol	Águas naturais Efluentes ETARs		Piram <i>et al.</i> , 2008a
Atenolol	Águas naturais		Andrisano <i>et al.</i> , 1999
Metoprolol Propranolol	Águas naturais Águas superficiais		Liu <i>et al.</i> , 2007 Liu <i>et al.</i> , 2009
Atenolol	Águas naturais	TiO ₂	Yang <i>et al.</i> , 2010
Metoprolol	Águas naturais	UV	Benitez <i>et al.</i> , 2009
	Águas superficiais	UV/H ₂ O ₂	
	Águas naturais	UV UV/H ₂ O ₂	
		UV/ ₂ Na ₂ CO ₂ .3H ₂ O ₂ UV/HOOSO ₃ UV/TiO ₂ UV/H ₂ O ₂ /TiO ₂ Foto-Fenton	
Metoprolol Propranolol	Efluentes (rios)	UV	Romero <i>et al.</i> , 2010
Propranolol	Águas naturais	UV	Sortino <i>et al.</i> , 2002
	Águas naturais	UV	Uwai <i>et al.</i> , 2005
	Águas naturais	UV Ácidos húmicos Ácidos fúlvicos NO ₃ ⁻	Chen <i>et al.</i> , 2009
Labetolol	Águas naturais	UV	Andrisano <i>et al.</i> , 2001

Conforme se pode ver na tabela anterior, relativamente à fotodegradação do metoprolol em águas naturais, esses estudos são bastante escassos, referindo-se apenas aos estudos de Liu *et al.* (2007) e de Benitez *et al.* (2009). No primeiro caso, estes

autores só estudaram a fotodegradação em água pura, utilizando um simulador solar (290-800 nm), de onde concluíram que a fotodegradação do succinato de metoprolol em água era muito lenta, seguindo uma cinética de primeira ordem com um tempo de meia vida ($t_{1/2}$) estimado de aproximadamente 350 h.

Num outro estudo de degradação do succinato de metoprolol em água pura e em águas dos rios, Liu *et al.* (2009), verificaram que não havia diferenças significativas na cinética de degradação do succinato de metoprolol em água pura, enquanto que o mesmo efeito não foi observado, quando utilizaram água do rio, o que levou os autores a admitirem a presença de fotossensibilizadores nas águas naturais. Com estes autores não estudaram especificamente a influência de diferentes fotossensibilizadores na fotodegradação do metoprolol, no presente trabalho propõe-se o estudo do efeito das substâncias húmicas e de iões presentes em águas naturais, nomeadamente os ácidos fúlvicos e iões nitrato.

2.5 Efeito das substâncias húmicas e de iões presentes em águas naturais na fotodegradação de contaminantes

2.5.1 Ácidos Fúlvicos

As substâncias húmicas (SH) são constituídas por matéria orgânica dissolvida em diferentes e avançados estágios de decomposição. São compostas por uma mistura heterogénea e complexa de moléculas com elevado peso molecular, contendo grupos aromáticos, alifáticos, carboxílicos, fenólicos e quinónicos, como resultado da degradação biológica e enzimática de vegetais no solo (Buffle, 1990). Em águas naturais a concentração de substâncias húmicas varia de 0,3 -30 mg/C l⁻¹ (Zhan *et al.*, 2006). As suas propriedades fotossensibilizadoras dependem em grande parte da sua origem (Xia *et al.*, 2009).

Devido à heterogeneidade das SH, a sua análise e caracterização são extremamente complicadas, pelo que o seu fracionamento é a opção mais comumente utilizada para a sua definição. Assim, pela sua solubilidade, as SH podem ser diferenciadas em ácidos fúlvicos, ácidos húmicos e huminas. Os ácidos fúlvicos são a fração solúvel em água para todos os valores de pH, os ácidos húmicos, são a fração de matéria orgâ-

nica insolúvel em água em condições ácidas pH <1 ou pH <2, e por último a fração insolúvel em água para todos os valores de pH é as huminas (Buffle, 1990). Em águas naturais, as substâncias húmicas são os principais componentes responsáveis pela absorção da radiação UV, a qual provoca a excitação das suas moléculas. Após a absorção da luz por parte destas substâncias, estes podem desencadear a formação de outras espécies reativas (Lam *et al.*, 2005).

Como a maioria das moléculas no estado fundamental contêm um número par de eletrões, ocupando cada par uma orbital, conforme explica o princípio de exclusão de Pauli, os dois eletrões na mesma orbital apresentam *spins* opostos, dizendo-se emparelhados, pelo que estado eletrónico fundamental da maioria das moléculas orgânicas é um estado singleto (S_0). Quando a molécula é excitada, um dos eletrões move-se para uma orbital de energia mais alta, mas o seu *spin* continua emparelhado (estado excitado singleto- S_1 , S_2 , S_3). No estado tripleto (T_1), os *spins* dos eletrões deixam de estar emparelhados e passa a haver dois eletrões com spins paralelos (Skoog *et al.*, 1998).

Assim, as moléculas de ácidos fúlvicos quando absorvem a luz passam para o primeiro estado excitado singleto, AF^* (1.6). Após a excitação, essa molécula pode voltar ao estado fundamental através da combinação de vários mecanismos: 1) sem emissão da radiação: conversão interna, relaxação vibracional, cruzamento inter-sistema e conversão externa (1.7) 2) com emissão da radiação: fluorescência (1.8) (Skoog *et al.*, 1998).



em que o AF representa a componente reativa dos ácidos fúlvicos e o símbolo * molécula no estado eletrónico excitado.

Além disso, qualquer molécula excitada no estado singleto pode decair para o estado tripleto. Este processo é denominado por cruzamento inter-sistema (1.9).



As moléculas dos ácidos fúlvicos no estado tripleto excitado ($^3AF^*$) podem transferir a sua energia diretamente para outras espécies presentes em solução, nomeadamente as moléculas de um contaminante orgânico, ficando estas no estado excitado (RX^*) (1.10) e podendo logo, por sua vez, reagir com outra/s molécula/s, ou ainda quebrar as ligações destas levando a formação de moléculas mais pequenas (Boule *et al.*, 1999). Além disso, as moléculas de ácidos fúlvicos no estado tripleto excitado ($^3AF^*$) podem dar origem a espécies altamente reativas como o radical hidroxilo ($\cdot OH$), eletrões hidratados (e^-) ião peróxido (O_2^-) e ainda o oxigénio singlete (1O_2), conforme se mostra as equações seguintes (Aguer *et al.*, 1999; Goldstone *et al.*, 2002):



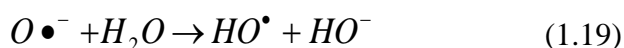
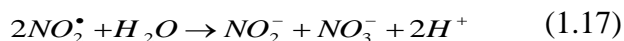
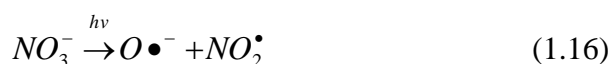
De um modo geral, a formação de espécies oxidantes fortes como o oxigénio singlete (1O_2), e os radicais hidroxilo ($\cdot OH$), bem como os estados tripletos excitados da matéria orgânica dissolvida $^3DOM^*$ (do termo em inglês, “*Dissolved organic matter*”), desempenham um papel importante na fotodegradação de contaminantes sobretudo em águas naturais. As vias de formação destas espécies altamente reativas, estão associados a diversos processos que ocorrem em águas naturais como por exemplo, da degradação de poluentes orgânicos através da fotólise direta, e ainda através da degradação da matéria orgânica natural NOM (do termo em inglês, “*Natural organic matter*”), pela fotólise indireta (Garg *et al.*, 2011).

Entre estas espécies cabe destacar, pela sua elevada reatividade, os radicais hidroxilo ($\cdot OH$) e o oxigénio singlete (1O_2), que aparecem como resultado das reações (1.10) e (1.14), respetivamente. Os radicais hidroxilo ($\cdot OH$) e o oxigénio singlete (1O_2) são considerados (ROS) (do termo em inglês “*Reactive Oxygen Species*” e podem

promover a degradação de poluentes em fase aquosa, assunto este que será discutido mais à frente.

2.5.2 O nitrato (NO_3^-)

O nitrato desempenha um papel importante na degradação de contaminantes em águas, podendo acelerar a sua fotodegradação. Encontrando-se nas águas superficiais em concentrações que variam de 0,2 a 25 mg/L, os iões nitrato, após absorção da radiação solar e consequente excitação, são responsáveis pela formação de radicais $\cdot\text{OH}$, que por sua vez atacam a maioria dos compostos orgânicos (Boule *et al.*, 1999; Espinoza *et al.*, 2007). As equações seguintes (1.15-1.19), mostram a via pela qual o ião nitrato pode dar origem a espécies $\cdot\text{OH}$, e consequentemente à degradação de contaminantes (Neamtu e Frimel 2006).



Em relação ao estudo da fotodegradação do metoprolol na presença do ião nitrato não há estudos referenciados na literatura. Contudo, estudos realizados com outros contaminantes, como por exemplo, o de Neamtu e Frimmel (2006), sobre a degradação de nonilfenol em águas na presença do ião NO_3^- , mostraram que a fotodegradação era acelerada na presença deste ião. O mesmo efeito foi verificado no estudo de Espinoza *et al.* (2007), que mostraram que o ião nitrato, acelerava a fotodegradação do bisphenol A em águas naturais.

Contudo, outros estudos como o de Li *et al.* (2011), sobre a fotólise de Enroflaxacina em água, mostraram que um aumento na concentração de NO_3^- levava à dimi-

nuição da taxa de degradação deste fármaco, o que mostra que o nitrato também pode inibir a fotodegradação de contaminantes. Esta inibição da fotodegradação, é devido ao facto do ião nitrato absorver na região UV.

2.6 Uso de sequestradores de espécies reativas de oxigénio na elucidação de vias de fotodegradação indireta de contaminantes na presença de substâncias húmicas.

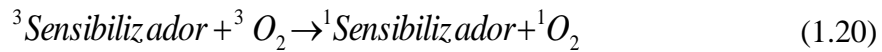
Conforme já foi referido anteriormente, as substâncias húmicas desempenham um papel importante na fotodegradação dos contaminantes em águas naturais. A fim elucidar o mecanismo pela qual as substâncias húmicas promovem a degradação de contaminantes em águas naturais, no subcapítulo seguinte, serão discutidos cada uma dessas vias de degradação, a formação do oxigénio singleto ($^1\text{O}_2$) e/ou dos radicais $\cdot\text{OH}$.

O oxigénio sob a forma de oxigénio singleto, o ($^1\text{O}_2$) é uma das espécies mais reativas do oxigénio, conforme já foi referido anteriormente. O ($^1\text{O}_2$) apresenta o estado de energia mais elevada de todas as espécies reativas, o que faz com que este se encontra envolvido em diversos processos químicos e bioquímicos (Bancirova, 2011).

Para elucidar o mecanismo pela qual, as substâncias húmicas promovem a degradação de contaminantes em águas, normalmente são adicionados sequestradores. Os sequestradores são substâncias que consomem o $^1\text{O}_2$ presente numa solução, diminuindo a velocidade de degradação se o $^1\text{O}_2$ for a via pela qual ocorreu a fotodegradação.

Diversos tipos de compostos são utilizados como sequestradores específicos para o “consumo” do $^1\text{O}_2$, presente numa solução, como por exemplo, a rosa bengala, azul-de-metileno, eosina, azida de sódio (NaN_3) entre outros (Czaplick *et al.*, 2005).

A equação seguinte ilustra a formação do $^1\text{O}_2$ através da transferência de energia de estados tripleto e de um sensibilizador (Li *et al.*, 2010):



A fim de verificar, se o mecanismo pela qual ocorre a fotodegradação do beta-bloqueador, propranolol em água envolve a formação do ${}^1\text{O}_2$, Sortino *et al.* (2002), realizaram-se experiências na presença de azida de sódio (NaN_3). Estes autores concluíram que fotodegradação do metoprolol, e conseqüente formação de foto produtos, envolve a formação do ${}^1\text{O}_2$.

O manitol é um eficiente supressor de radicais $\cdot\text{OH}$, e tal como a NaN_3 também pode desempenhar um papel importante na fotodegradação de contaminantes em águas. Quando o manitol está presente, a constante de velocidade de reação deverá diminuir se o mecanismo de degradação da reação for por via de radicais $\cdot\text{OH}$.

3 Material e métodos

3.1 Lavagem do material de laboratório

Todo o material de vidro utilizado durante a realização deste trabalho (balões volumétricos, pipetas volumétricas, copos, tubos de quartzo, entre outros) foi lavado com água e imerso numa solução de detergente concentrado (Derquim 2,5%) durante aproximadamente 2 horas. Em seguida, o material foi lavado com água destilada e colocado numa solução ácida de HNO_3 (0,3%) por um período de 12-24 horas; passado esse período, todo o material foi lavado novamente com água destilada. Após este procedimento, o material foi colocado num recipiente para secar, sendo depois guardado em lugar apropriado. Este procedimento de lavagem foi executado a fim de minimizar as fontes de contaminação que podem surgir durante o procedimento analítico.

3.2 Reagentes

Os principais reagentes utilizados neste trabalho foram os seguintes: Tartarato de Metoprolol (Pureza: $\geq 98\%$; Fórmula Molecular: $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}_6 \cdot \text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$; Massa Molecular: 684,41 g/mol) da Sigma Aldrich; Acetonitrilo (qualidade para HPLC, pureza: $\geq 98\%$) da Lab-Scan analytical sciences; Ácido Fórmico (Pureza: 98%; Fórmula Molecular: HCOOH ; Massa Molecular: 46,03 g/mol) da Panreac. Para o estudo do efeito dos fotossensibilizadores (ácidos fúlvicos e NO_3^-) na fotodegradação do metoprolol, foram usados ácidos fúlvicos extraídos do Rio Vouga e recolhidos na zona do Cabo Carvoeiro em 1991, baseada na absorção em resina XAD-8, de acordo com a metodologia descrito por Santos e Duarte (1998), nitrato de potássio (KNO_3).

Com o objetivo de identificar, a via pela qual as substâncias húmicas promovem a degradação do metoprolol em soluções aquosas, foram utilizados dois compostos, a azida de sódio e o D-Manitol, que são sequestradores específicos de $^1\text{O}_2$ e de radicais $\cdot\text{OH}$. Para isso, foram utilizados o D-Manitol (Fórmula Molecular: $(\text{C}_6\text{H}_{14}(\text{OH})_6)$; Massa Molecular: 182,17 g/mol) e a azida de sódio (Fórmula Molecular: NaN_3); Massa Molecular: 65,01 g/mol) ambos da Sigma Aldrich.

3.3 Equipamentos

A análise do metoprolol foi efetuada utilizando um aparelho Cromatógrafo Líquido de Elevada Eficiência Jasco HPLC, equipado com uma bomba PU-980, um detetor UV-Vis BarSpec a 222 nm, uma coluna C18 phenomenex (150 x 4.60 mm, 5 μ m, 110 A $^\circ$) e um *loop* de 20 μ L. Após um estudo prévio para a escolha da fase móvel, comparando os seguintes eluentes:

- Acetonitrilo: água numa proporção de 80:20 V/V e um caudal de 0,85 ml/min;
- Solução tampão KH_2PO_4 10 mM, pH 3,0 e acetonitrilo numa proporção de 80:20 V/V e um caudal de 0,5 ml/min;
- E por último a combinação de dois solventes água: acetonitrilo, acidificadas com HCOOH 0,1%, numa proporção 85:15 V/V e um caudal de 0,7 ml/min.

A fase móvel escolhida foi água: acetonitrilo 90:10, contendo HCOOH 0,1% V/V e a velocidade de fluxo foi 0,7 mL/min. A fase móvel foi previamente filtrada por filtros de membrana 0.2 μ m NL16 (Schleicher & Schuell).

As amostras foram irradiadas utilizando um simulador solar Solarbox 1500, equipado com uma lâmpada de Xénon, e uma irradiância constante de 550 W/m 2 .

3.4 Preparação das soluções padrão de metoprolol

Para a quantificação da concentração de metoprolol em água mediante cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC) foi preparada uma reta de calibração utilizando seis soluções padrão de metoprolol. Para a preparação das soluções padrão de metoprolol, em primeiro lugar, pesaram-se 10,0 mg de metoprolol, e transferiu-se o conteúdo para um balão volumétrico de 100 mL. Posteriormente aferiu-se o volume com água Milli-Q, obtendo-se uma solução padrão com uma concentração de 100 mg/L que foi posteriormente utilizada na preparação dos padrões (Romero *et al.*, 2010). A partir desta solução prepararam-se seis soluções padrão, com concentrações entre 10 e 60 mg/L por diluição em água Milli-Q. Também preparou-se uma solução - mãe de metoprolol 500 mg/L (pesou-se 125,0 mg do composto para uma balão volumétrico de 250 mL, sendo o volume posteriormente aferido com água Milli-Q).

Durante a preparação das soluções, toda a água ultra-pura usada como solvente foi obtida com um sistema Milli-Q (Millipore).

Todas as soluções foram revestidas com papel alumínio, de modo a evitar o efeito da luz.

3.5 Preparação das soluções para o estudo da fotodegradação de metoprolol

Para este estudo, todas as soluções de metoprolol, na presença ou não de fotosensibilizadores (ácidos fúlvicos e ião NO_3^-) foram preparadas em água ultra-pura (Milli-Q). Uma vez preparadas as soluções, os balões que as continham foram revestidos com papel alumínio, de modo a evitar o efeito da luz, até a sua utilização nas experiências de irradiação. Pevia realização das experiências de fotodegradação foi sempre verificado, mediante análises por cromatografia líquida, que se mantinha a concentração inicial de metoprolol em solução.

3.5.1 Soluções metoprolol em água

O estudo da fotodegradação do metoprolol em água foi efetuado utilizando uma solução de 50 mg/L. Esta solução foi preparada por diluição da solução mãe de 500 mg/L referida anteriormente. A escolha desta concentração para a irradiação, foi de acordo com o estudo efetuado por Romero *et al.* (2010), que compararam o efeito da oxidação avançada e a fotocatalise na remoção de propranolol e metoprolol da água, utilizando soluções destes fármacos com concentrações iniciais de 50 mg/L.

3.5.2 Preparação de soluções de metoprolol com ácidos fúlvicos

Para a preparação destas soluções, foi primeiro preparada uma solução - mãe de ácidos fúlvicos de 250 mg/L (pesou-se 12,5 mg de ácidos fúlvicos e transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL sendo o volume aferido com água Milli-Q). A seguir, utilizando a solução mãe de metoprolol de 500 mg/L (acima referida) e a solução -

mãe de ácidos fúlvicos (250 mg/L) por diluição foi preparada uma solução de metoprolol 50 mg/L na presença de ácidos fúlvicos 10 mg/L. A concentração de ácidos fúlvicos 10 mg/L foi escolhida de acordo com o estudo preliminar feito por Guilherme (2009) sobre efeito da presença dos iões cloreto (Cl^-) e nitrato (NO_3^-) na fotodegradação de ácido fúlvicos provenientes de uma fábrica de papel.

3.5.3 Preparação de soluções de metoprolol com nitrato

A preparação destas soluções foi realizada utilizando a solução mãe de metoprolol (500 mg/L) e uma solução - mãe de KNO_3 de 163,1 mg/L (pesou-se 16,31 mg do composto para uma balão volumétrico de 100 mL, sendo o volume posteriormente aferido com água Milli-Q). Por diluição destas soluções, foi preparada uma solução de metoprolol de 50 mg/L na presença de NO_3^- 16,31 mg/L. A concentração de KNO_3^- (16,31 mg/L) escolhida, que corresponde à mesma utilizada por Espinoza *et al.* (2007) para simular o ambiente aquático natural para o estudo do efeito de NO_3^- na fotodegradação do bisphenol A.

3.5.4 Preparação de soluções de metoprolol na presença de ácidos fúlvicos com sequestradores de radicais $\cdot\text{OH}$ e $^1\text{O}_2$.

Para esse estudo, foram preparadas inicialmente as soluções stock de dois sequestradores, o manitol ($\text{C}_6\text{H}_8(\text{OH})_6$) 1M e a azida de sódio (NaN_3) 25 mM, respetivamente. Para a solução stock de manitol, pesou-se aproximadamente 1,8217 mg do composto, e transferiu-se o conteúdo para um balão de 500 mL, sendo o volume posteriormente completo com água Milli-Q.

Para a solução stock de NaN_3 , pesou-se aproximadamente 0,8130 mg de composto sendo posteriormente transferida para um balão volumétrico de 500 mL, onde perfizeram-se o volume com água Milli-Q.

Para as soluções a irradiar, prepararam-se duas soluções de metoprolol 50 mg/L com ácidos fúlvicos 10 mg/L, em que numa das soluções adicionou-se $C_6H_8(OH)_6$ 20 mM e na outra NaN_3 0,5 mM respetivamente através da diluição das soluções stock acima referidas.

3.6 Irradiação das soluções

Após a preparação das soluções, procedeu-se ao estudo da sua fotodegradação. Para tal, transferiram-se 20 mL de solução de cada uma das soluções para tubos de quartzo, que foram tapados com parafilme. Posteriormente, os tubos foram colocados num suporte adequado e submetidos a irradiação, num simulador solar Solarbox, com uma irradiação constante de 550 W/m^2 .

Para estudar o efeito da irradiação ao longo do tempo, todas as soluções referidas anteriormente foram sujeitas a tempos de irradiação crescentes: 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 h respetivamente. Para cada experiência, realizaram-se três réplicas (ensaio 1, 2 e 3), não simultâneas sob as mesmas condições. Por outro lado, em paralelo com cada experiência foi realizado um controlo, o qual foi submetido exatamente às mesmas condições que a experiência, exceto pela ausência de irradiação, que foi evitada revestindo os tubos de quartzo correspondentes com folha de alumínio.

Após a irradiação, as soluções foram analisadas por cromatografia líquida de elevada eficiência, acoplada ao espectrómetro ultravioleta visível (HPLC/UV-Vis), conforme as condições descritas no capítulo seguinte.

4 Resultados e Discussão

4.1 Otimização das condições de análise no HPLC

As condições de análise por HPLC, sobretudo no que diz respeito ao eluente foram testadas inicialmente com base no procedimento utilizado por Romero *et al.* (2010) para a determinação de metoprolol durante a sua degradação fotocatalítica em água, usando TiO_2 como catalisador. Nesse estudo os autores utilizaram também uma coluna C_{18} e uma combinação de dois solventes, acetonitrilo e água, numa proporção de 80:20, mas não mostraram qualquer cromatograma obtido. Na tentativa de reproduzir as condições mencionadas por Romero *et al.* (2010) verificou-se que os cromatogramas obtidos apresentavam uma banda larga com uma enorme cauda e que sugeria a presença de dois picos mal resolvidos.

Para resolver o problema, foram experimentadas novas condições de eluição baseadas no estudo desenvolvido por Basci *et al.* (1998) sobre a otimização de diferentes tipos de fase móvel na separação de vários beta-bloqueadores por HPLC. Estes autores usaram uma fase móvel com pH ajustado a 3,0. Nesse estudo os autores utilizaram uma fase móvel constituída por 3 solventes: metanol, acetonitrilo e solução tampão KH_2PO_4 10 mM, pH 3,0 (15:15:70).

No entanto, no presente trabalho optou-se por testar uma fase móvel com o mesmo ajuste de pH mas constituída por um sistema binário de solventes, usando apenas acetonitrilo em vez de acetonitrilo e metanol, dado não se ter metanol de qualidade HPLC disponível. Testou-se uma proporção de solução tampão próxima da usada por Basci *et al.* (1998), tendo-se usado uma mistura de acetonitrilo: solução tampão 20:80. Em relação ao ajuste do pH da fase móvel não existe nenhum estudo sistemático, mas outros autores referidos no artigo de revisão de Ternes *et al.* (2001), preferiram o uso de um pH mais elevado 7,5, de forma a garantir que o metoprolol fica sem carga, isto é nem o grupo OH fica desprotonado nem o grupo amínico fica protonado. A existência de carga na molécula de metoprolol poderá reduzir o seu tempo de retenção, mas este depende também da percentagem de solução aquosa tampão na mistura eluente. Ao rever o procedimento experimental verificou-se que tinha havido um erro no procedimento de ajuste do pH, pelo que o pH do tampão era 4,7 e não 3,0. Dado que com a fase móvel referida anteriormente (acetonitrilo: tampão de pH 4,7 na proporção 20:80) se conseguiu obter um pico estreito e simétrico para o metoprolol, com tempo de

retenção de aproximadamente 13 minutos, como se pode ver na figura 2, onde se apresenta o cromatograma de uma solução padrão 10 mg/L de tartarato de metoprolol, adotaram-se então estas condições de eluição. Fez-se uma reta de calibração com padrões de concentrações entre 10,087 e 60,522 mg/L tendo-se obtido um coeficiente de correlação de 0,9999 e um limite de deteção (LD) de 1,85 mg/L.

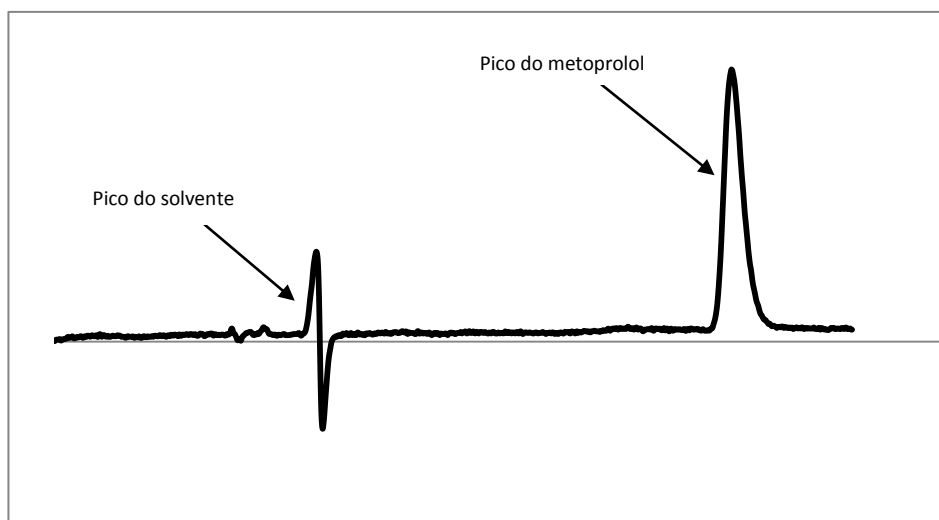


Figura 2: Cromatograma obtido da solução padrão de metoprolol 50 mg/L para as seguintes composições de fase móvel: acetonitrilo/solução tampão (20:80) V/V.

No entanto, após algumas experiências preliminares relativas à fotodegradação do metoprolol em água, começaram a surgir problemas no HPLC associados ao uso de sal na solução tampão. Mesmo com um elevado tempo de lavagem da coluna no final de cada dia de trabalho, a acumulação de sais foi ocorrendo, o que obrigou à limpeza do diafragma da bomba e da válvula de purga. Por esta razão, tentou-se alterar, mais uma vez, as condições de eluição substituindo a mistura acetonitrilo: tampão KH_2PO_4 10 mM por uma mistura acetonitrilo: água contendo ácido fórmico (HCOOH) 0,1% V/V, tendo por base o trabalho de Gómez *et al.* (2007) que usaram uma fase móvel constituída por acetonitrilo: água com pH ajustado com ácido fórmico 0,1% para separar vários produtos farmacêuticos incluindo o atenolol, numa coluna cromatográfica C_{18} . Note-se que o atenolol, embora tenha diferenças estruturais relativamente ao metoprolol, também contém o mesmo grupo etanol amina. A adição de HCOOH 0,1% faz com que o pH final da fase móvel seja aproximadamente 3,0, isto é, igual ao utilizado por Basci *et al.* (1998), mas sem necessidade de adicionar sais. Após testar várias proporções acetonitrilo: água com ácido fórmico 0,1%, optou-se por usar uma proporção

10:90, com a qual se obteve um pico cromatográfico estreito e aproximadamente simétrico para o metoprolol, com um tempo de retenção de cerca de 10 minutos conforme mostra na figura 3.

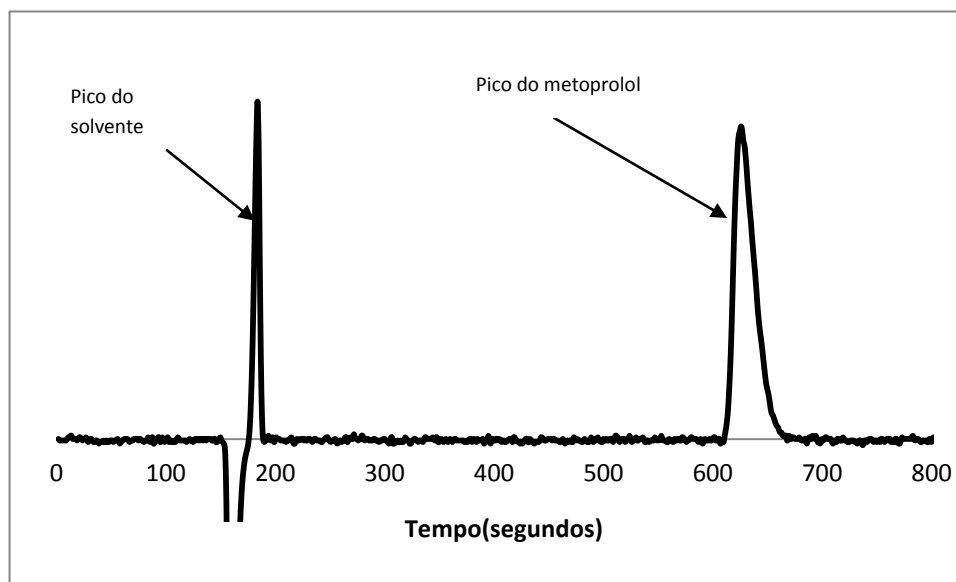


Figura 3: Cromatograma da solução padrão de metoprolol 50 mg/L para a fase móvel: acetonitrilo/ água (10:90) V/V, acidificado com 0,1% de HCOOH.

De modo a escolher as melhores condições de eluição, comparou-se a reta de calibração obtida usando esta fase móvel com a reta obtida usando a fase móvel acetonitrilo: solução tampão KH_2PO_4 10 mM, pH 4,7. Para a reta de calibração em que foi usada acetonitrilo: solução tampão KH_2PO_4 10 mM, pH 4,7, em que as concentrações dos padrões variaram entre 10,919 e 65,514 mg/L, foi obtido um coeficiente de correlação de 0,9993 e um LD de 3,93 mg/L. Em relação à reta de calibração em que foi usada acetonitrilo: água, com pH ajustado com ácido fórmico 0,1%, as concentrações dos padrões variaram entre 10,388 e 62,328 mg/L tendo-se obtido um coeficiente de correlação de 0,9994 e um LD de 2,04 mg/L.

Os resultados obtidos mostraram uma boa correlação nas duas condições de eluição estudadas.

Uma vez que a utilização de solvente acidificado com HCOOH (0,1% V/V) é um procedimento mais rápido e que oferece menos problemas, optou-se pela sua utilização em relação ao uso da solução tampão KH_2PO_4 .

4.2 Quantificação do metoprolol por HPLC: Retas de calibração e limites de deteção

Como já foi indicado, através da diluição da solução padrão de metoprolol de 100 mg/L em água Milli-Q, prepararam-se os padrões com as concentrações de 10; 20; 30; 40; 50 e 60 mg/L para construir as retas de calibração. Na figura 4, a título de exemplo apresenta-se uma dessas retas de calibração utilizada na quantificação do metoprolol em água, com a fase móvel acetonitrilo: água 10:90 V/V contendo 0,1% de ácido fórmico.

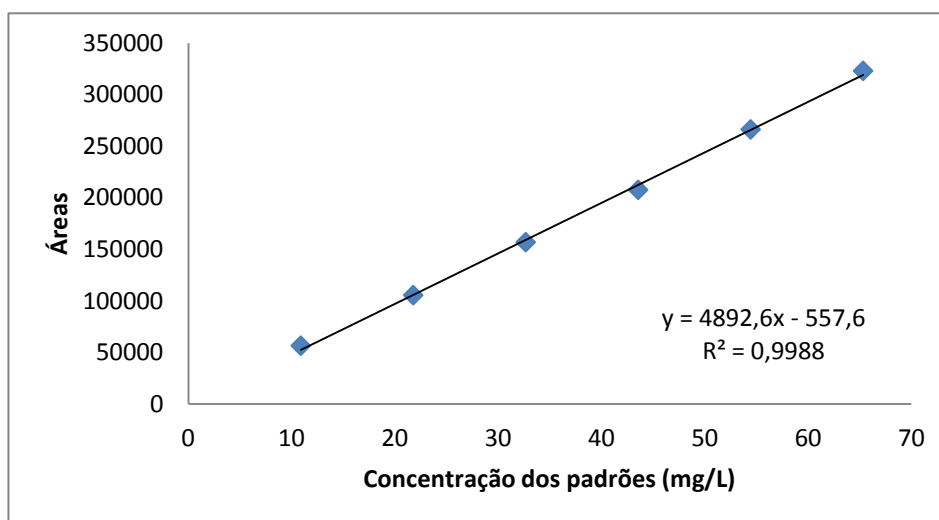


Figura 4: Reta de calibração para a quantificação do metoprolol em solução aquosa para a fase móvel acetonitrilo: água, acidificado com HCOOH 0,1% (10:90) V/V.

Uma vez que foram efetuadas retas de calibração sempre que necessário, foram obtidos diversos valores do coeficiente de correlação (r) e do limite de deteção (LD), associados às mesmas. Os coeficientes de correlação (r) determinados foram superiores a 0,9995. Os valores de LD calculados a partir da expressão (Miller & Miller):

$$LD = \frac{3 \times s_{y/x}}{m} \quad (1.21)$$

onde $s_{y/x}$ é o desvio padrão residual da reta de calibração e m é o declive da mesma.

A conversão para unidades de concentração foi feita dividindo o desvio padrão residual pelo declive da reta. O LD calculado variou entre 1,19 e 3,14 mg/L para uma gama de concentrações de padrões de 10-60 mg/L.

Para a análise da repetibilidade do sistema de HPLC/UV, efetuaram-se injeções consecutivas da mesma solução padrão mantendo as mesmas condições de operação e equipamento. Também se efetuaram injeções de solução padrão em diferentes dias, usando diferentes lotes de solventes (fase móvel preparada em diferentes condições) a fim de analisar a reprodutibilidade da análise.

Convém salientar-se que as retas de calibração não foram feitas todos os dias, tendo-se feito uma reta de calibração para cada semana de trabalho. No entanto, todos os dias foram injetados 2 padrões de controlo que eram preparados de fresco, e as respetivas concentrações foram determinadas a partir das áreas do pico do metoprolol nos respetivos cromatogramas da equação de reta em uso. Sempre que as concentrações assim calculadas para os dois padrões não diferiam mais de 5,0% em relação ao valor real da concentração das soluções preparadas, considerava-se que a reta de calibração continuava válida para as análises desse dia.

4.3 Fotodegradação de soluções de metoprolol 50 mg/L em água

Conforme já foi referido anteriormente, as soluções de metoprolol foram sujeitas a diferentes tempos de irradiação, sendo simultaneamente colocadas no sistema de irradiação as soluções de controlo (tubos com solução embrulhados em papel alumínio), de modo a confirmar que a degradação do composto é devida à irradiação no simulador solar SolarBox e não ocorrem no escuro. Todas as soluções foram analisadas no HPLC-UV em triplicado (3 injeções), verificando-se que as variações de concentrações determinadas nas 3 réplicas (3 injeções) foram inferiores a 5,0%. Todos os resultados apresentados em seguida referem-se à média das concentrações correspondentes a 3 injeções.

Como os ensaios (ensaio 1, 2 e 3) foram efetuados em dias diferentes, assim como as soluções a irradiar foram preparadas a partir de soluções-mãe diferentes, com concentrações aproximadamente 50 mg/L, mas que não foram exatamente iguais, as concentrações (C) das soluções sujeitas a diferentes tempos de irradiação, foram normalizadas em relação à concentração inicial (C_0).

Na figura 5 encontra-se representada a variação da concentração do metoprolol normalizada em relação à concentração inicial (C/C_0), nas soluções de controlo ao longo do tempo de irradiação dos ensaios. Da análise da figura, conclui-se que não se observam variações significativas na concentração das soluções de metoprolol revestidas com papel de alumínio e colocadas no sistema de irradiação, estando sujeitas às mesmas condições do que as soluções irradiadas, mas sem receber a radiação. Para todos os tempos de irradiação, a concentração de qualquer dos controlos não variou em relação à concentração inicial (C_0) mais de 5,0%. Logo quaisquer variações observadas nas soluções irradiadas são atribuíveis a reações provocadas pela luz solar simulada.

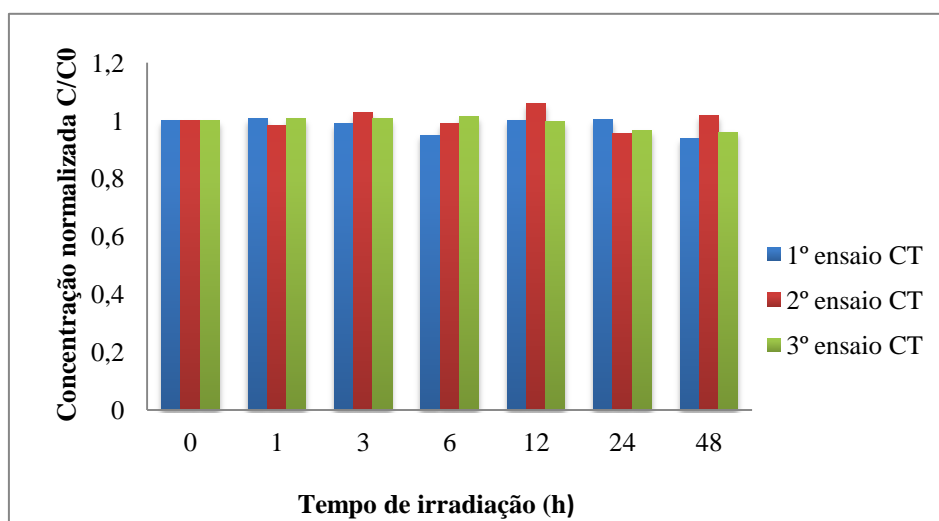


Figura 5: Razão entre as concentrações das soluções de controlo (CT) e a concentração inicial (C_0) ao longo do tempo para os ensaios, 1, 2 e 3 respetivamente.

Para as soluções sujeitas a radiação solar simulada, a variação da concentração de metoprolol normalizada em relação à concentração inicial (C/C_0), em função do tempo de irradiação (h) encontra-se representada na figura 6. A figura não evidencia

qualquer alteração na concentração do metoprolol ao longo de todo o período de irradiação.

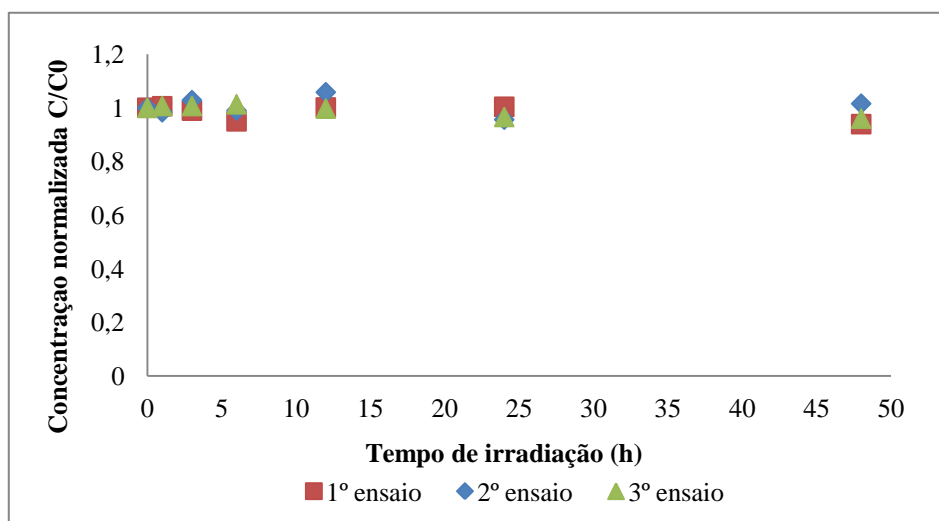


Figura 6: Variação da concentração do metoprolol normalizada em relação a concentração inicial (C/C_0) ao longo do tempo de irradiação (h).

A fim de confirmar que a degradação do metoprolol não ocorre, ou ocorre em extensão não detetável, no período de tempo considerado, fez-se uma comparação das médias dos valores de C/C_0 para diferentes tempos de irradiação através de uma análise de variância (ANOVA) a uma dimensão, cujos resultados estão apresentados na tabela 5. Os resultados obtidos permitem concluir que não há diferenças significativas entre os valores médios de C/C_0 para diferentes tempos de irradiação. Com um intervalo de confiança de 95% ($n = 7$) o $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$, portanto podemos concluir que não houve degradação da solução metoprolol até final das 48 horas de irradiação.

Tabela 5: ANOVA a uma dimensão referente a média da concentração normalizada C/C_0 da solução de metoprolol em água.

ANOVA						
<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	3,20E-03	6	5,20E-04	9,10E-01	5,16E-01	2,847
Dentro de grupos	8,00E-03	14	5,70E-04			
Total	1,12E-02	20				

De acordo com os resultados experimentais obtidos por Liu *et al.* (2009), nos seus estudos de fotodegradação de beta-bloqueadores em águas, o metoprolol apresentava uma degradação lenta em água desionizada, sob a ação solar e de que seguia uma cinética de pseudo - primeira ordem com uma constante de velocidade (K) de $4,6 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ e um tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de 159 h. A concentração das soluções de metoprolol para a irradiação foi de 1 e 100 $\mu\text{g/L}$. Para a irradiação das amostras, Liu *et al.* (2009) utilizaram um simulador solar equipado com uma lâmpada de Xénon (λ 295-800 nm) e o tempo máximo de irradiação foi de 7 dias.

A partir da constante cinética obtida pelos autores acima referidos, calculou-se a percentagem de degradação esperada para esta experiência, ou seja:

$$\% \text{ de degradação} = \left(1 - \frac{C}{C_0}\right) \times 100 \quad (1.22)$$

onde $\frac{C}{C_0}$ é calculada através da seguinte expressão:

$$\ln \frac{C}{C_0} = -k \times t \quad (1.23)$$

onde $k = 4,6 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ (de acordo com a experiência de Liu *et al.*, 2009);

Tendo em conta os resultados de Liu *et al.* (2009), a percentagem de degradação do metoprolol que seria de esperar até ao final de 48h de irradiação (duração máxima dos ensaios de irradiação no presente trabalho) seria de 22%. Assim, os resultados aqui obtidos nesta experiência não estão de acordo com os resultados obtidos por Liu *et al.* (2009), uma vez que não se observou degradação até ao final das 48 h de irradiação com o simulador solar. É de salientar que as condições experimentais usadas por Liu *et al.* (2009) foram diferentes das condições usadas neste presente trabalho. Uma vez que Liu *et al.* (2009) usaram uma irradiância inferior abrangendo sensivelmente a mesma zona espectral (295-800 nm) utilizada no presente trabalho por isso pressupõe-se que o facto de não termos observado fotodegradação direta não se deve à

diferença na irradiância utilizada, pois nesse caso seria de esperar uma percentagem de degradação superior no presente trabalho. O facto de no presente trabalho não se ter observado degradação contrariamente ao que seria de esperar com base nos resultados de Liu *et al.* (2009) poderá ser atribuído ao facto de estes autores terem usado concentrações iniciais do metoprolol bastante mais baixas, uma vez que a concentração inicial pode influenciar a cinética de degradação, assunto este que será discutido um pouco mais a frente.

No entanto, é de salientar que consideramos que os nossos resultados estão de acordo com o que seria de esperar, na nossa opinião, pois o metoprolol não absorve acima dos 290 nm (Piram *et al.*, 2008a) e não é portanto de esperar que sofra fotodegradação direta pela luz solar, o que, aliás, foi também observado por Piram *et al.* (2008a). É ainda de salientar que Liu *et al.* (2009) concluíram em seus estudos de fotodegradação de beta-bloqueadores em águas que a degradação do metoprolol em água de rio era de duas a quatro vezes mais rápida do que em água desionizada. Este fato foi associado pelos referidos autores à presença de fotossensibilizadores, não tendo, no entanto, feito quaisquer estudos com vista à identificação destes fotossensibilizadores e do seu efeito. Assim, no presente trabalho procurou-se estudar o efeito de alguns constituintes de águas naturais na fotodegradação do metoprolol, assunto que será desenvolvido nos subcapítulos seguintes.

4.4 Efeito do nitrato na degradação do metoprolol em água

Para estudar o efeito do nitrato (NO_3^-) na degradação do metoprolol em água foi utilizada uma concentração de 10 mg/L de NO_3^- e 50 mg/L de concentração inicial de metoprolol, conforme foi descrito na secção na 3.5.3.

Na figura 7, apresentam-se os valores da concentração normalizada das soluções do metoprolol (C/C_0) na ausência e na presença de NO_3^- respetivamente, em função do tempo de irradiação.

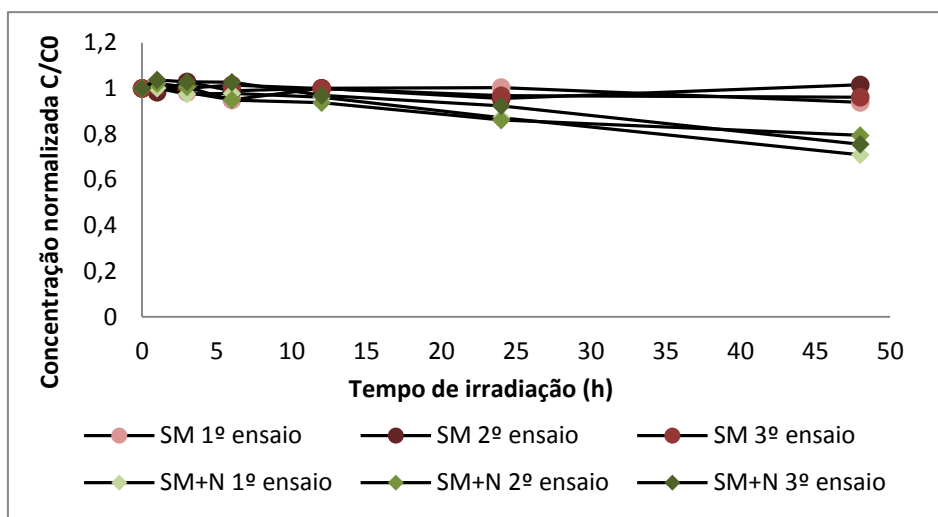


Figura 7: Comparação da fotodegradação do metoprolol na ausência (SM 1ºensaio, SM 2ºensaio e SM 3ºensaio) e na presença do NO₃⁻ (SM+N 1ºensaio, SM+N 2ºensaio e SM+N 3ºensaio), ao longo do tempo de irradiação.

Para confirmar que a degradação do metoprolol na presença de nitrato é significativa, fez-se uma comparação das médias dos valores de C/C₀ para diferentes tempos de irradiação através de uma análise de variância (ANOVA) a uma dimensão, cujos resultados estão apresentados na tabela 6. Os resultados obtidos permitem concluir que há diferenças significativas entre os valores médios de C/C₀ para diferentes tempos de irradiação. Com um intervalo de confiança de 95% (n = 7) o F_{calculado} > F_{crítico}, podemos portanto concluir que ocorreu a fotodegradação durante o tempo de irradiação estudado, e que as diferenças observadas no final da irradiação mostram um efeito sensibilizador do nitrato na fotodegradação do metoprolol.

Tabela 6: ANOVA a uma dimensão referente a média da concentração normalizada C/C₀ da solução de metoprolol na presença de nitrato.

ANOVA						
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	1,62E-01	6	2,71E-02	32,501	1,93E-07	2,847
Dentro de grupos	1,17E-02	14	8,30E-04			
Total	1,74E-01	20				

Na presença de NO_3^- foi observado um ligeiro decréscimo da concentração do metoprolol em relação aos tempos finais de irradiação (a partir das 24h). Na tentativa de verificar se a fotodegradação na presença de nitrato (SM+N 1ºensaio, SM+N 2ºensaio e SM+N 3ºensaio) ao longo do tempo, seguia uma cinética de pseudo - primeira ordem, representou-se $\ln C/C_0$ em função do tempo de irradiação para as soluções de metoprolol ($C_0 \sim 50 \text{ mg/L}$) na presença de NO_3^- (10 mg/L), conforme se pode ver na figura 8.

Na figura 8 apresentam-se os valores de $\ln C/C_0$ em função do tempo de irradiação para as soluções de metoprolol ($C_0 \sim 50 \text{ mg/L}$) na presença de NO_3^- (10 mg/L).

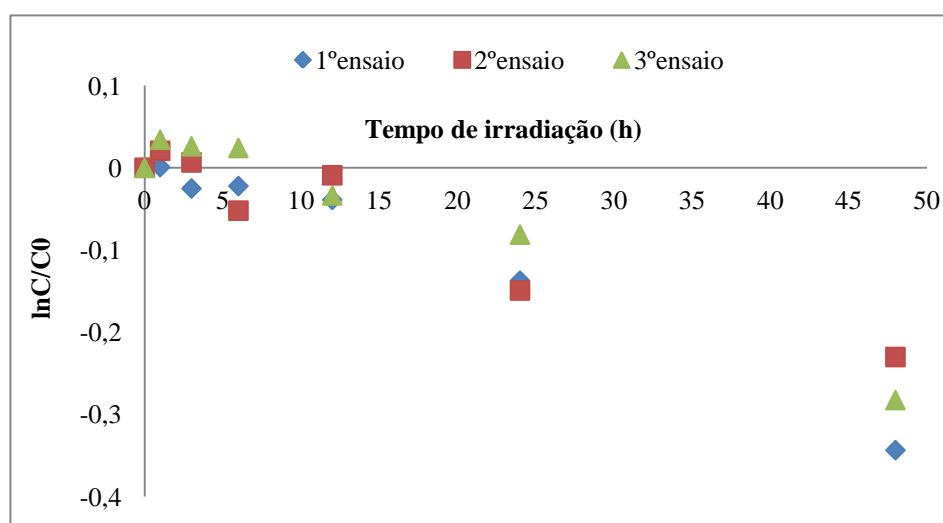


Figura 8: Resultados experimentais referentes a degradação do metoprolol ($C_0 \sim 50 \text{ mg/L}$) na presença de NO_3^- (10 mg/L), ajustados aos modelos cinéticos de pseudo - primeira ordem para os respetivos ensaios (1, 2 e 3).

Na tabela 7 apresentam-se os coeficientes de correlação (R^2) para cada um dos ensaios a constante cinética k , para cada um dos ensaios de degradação (1ºensaio, 2ºensaio e 3ºensaio).

Tabela 7: Coeficientes de correlação (R^2) e constantes cinéticas (K) da solução metoprolol na presença de NO_3^- para cada um dos ensaios

Ensaio	Coeficientes de correlação (R^2)	Constante cinética, $k \text{ h}^{-1}$
1º ensaio	0,9746	$5,2 \times 10^{-3}$
2º ensaio	0,9148	$7,1 \times 10^{-3}$
3º ensaio	0,9838	$6,3 \times 10^{-3}$

Para cada um dos ensaios 1, 2 e 3, obteve-se um $t_{1/2}$ de 98, 133 e 154 h, respectivamente. Nesta experiência, a percentagem de degradação do metoprolol ao fim de 48h e na presença de nitrato é de cerca de 25%, o que mostra um efeito fotossensibilizador reduzido do nitrato.

Desconhecemos a existência de estudos sobre o efeito do nitrato na fotodegradação do metoprolol. No entanto, estudos com outros beta-bloqueadores têm evidenciado efeitos opostos. Assim, Andreozzi *et al.* (2003), num estudo sobre a presença de fármacos em efluentes de ETARs e a fotodegradação de alguns deles (como a carbamazepina, diclofenac, ácido clofíbrico, ofloxacina, sulfametoxazol e propranolol) em solução aquosa, e sob a ação da luz solar, verificaram que na presença de NO_3^- (5,0 - 15,0 mg/L), o propranolol foi o único dos fármacos estudados que não sofreu uma redução no $t_{1/2}$ ou seja, uma aceleração na sua fotodegradação. Chen *et al.* (2009) também não se observaram qualquer efeito do nitrato na fotodegradação do propranolol em solução aquosa, por irradiação com lâmpada de Xénon e filtros para a eliminação da radiação abaixo de 300 nm. Pelo contrário, Ji *et al.* (2012) observaram efeito fotossensibilizador do nitrato na fotodegradação do atenolol em solução aquosa, sob ação de luz solar simulada, e demonstraram que esse efeito era atribuível à produção de radicais $\cdot\text{OH}$ induzida pela presença de nitrato.

4.5 Efeito de ácidos fúlvicos na degradação do metoprolol em água

Para este estudo prepararam-se soluções de metoprolol de 50 mg/L onde se adicionou ácidos fúlvicos (AF) 10 mg/L, conforme descrito na secção 3.5.2.

Na figura 9 apresentam-se os valores de C/C_0 das soluções de metoprolol na ausência de ácidos fúlvicos e na presença de ácidos fúlvicos em função do tempo de irradiação. A figura mostra que há um decréscimo na concentração das soluções de metoprolol na presença de ácidos fúlvicos, sobretudo a partir das 12 horas de irradiação. Estes resultados mostram que os ácidos fúlvicos induzem a degradação do metoprolol, a qual não ocorre na ausência dos mesmos.

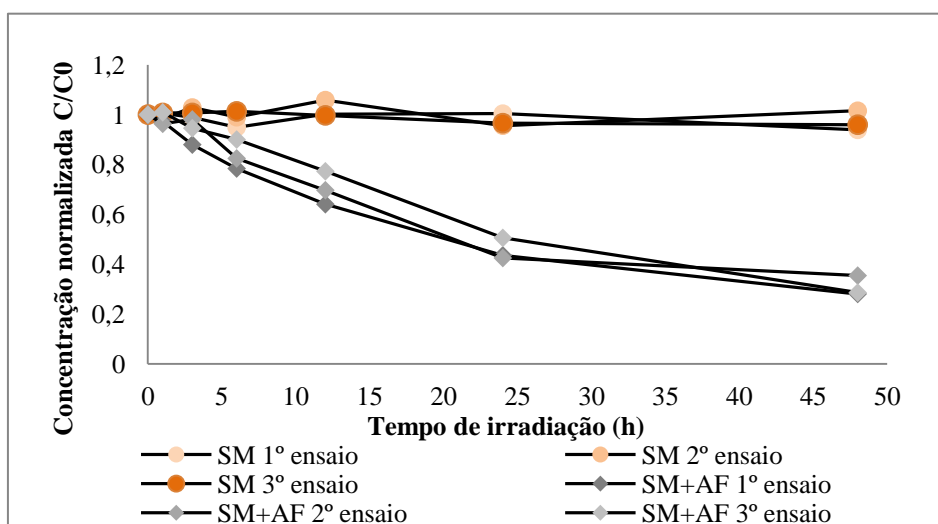


Figura 9: Comparação da degradação do metoprolol na ausência (SM 1ºensaio, SM 2ºensaio e SM 3ºensaio) e na presença dos ácidos fúlvicos (SM+AF 1ºensaio, SM+AF 2ºensaio e SM+AF 3ºensaio) ao longo do tempo de irradiação.

Para avaliar os resultados experimentais da fotodegradação do metoprolol na presença de ácidos fúlvicos (SM+AF 1ºensaio, SM+AF 2ºensaio e SM+AF 3ºensaio) ao longo do tempo, foi testado um modelo cinético de pseudo - primeira ordem, conforme mostra a figura 10. Nesta figura apresentam-se os valores de $\ln C/C_0$ em função do tempo de irradiação para as soluções de metoprolol ($C_0 \sim 50$ mg/L) na presença ácidos fúlvicos (10 mg/L).

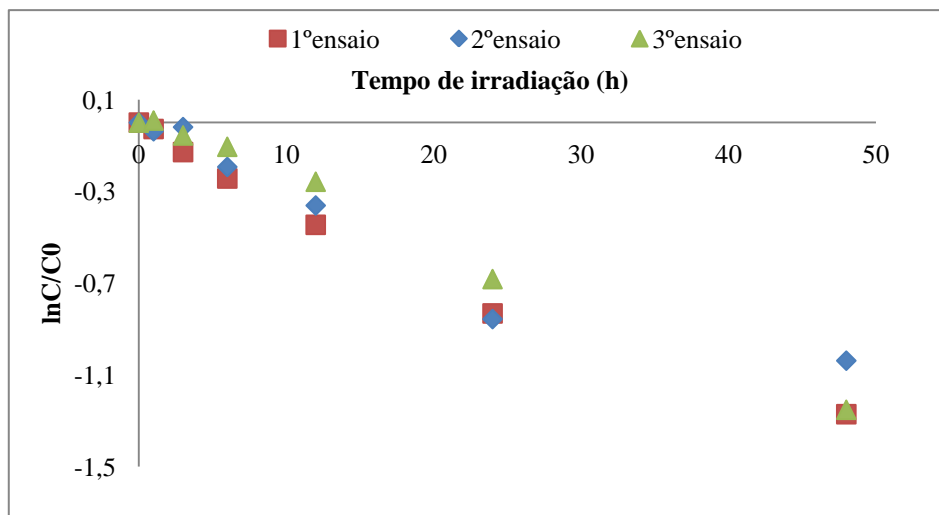


Figura 10: Resultados experimentais referentes a degradação do metoprolol ($C_0 \sim 50$ mg/L) na presença de ácidos fúlvicos (10 mg/L), ajustados aos modelos cinéticos de pseudo - primeira ordem para os respectivos ensaios (1, 2 e 3).

Na tabela 8 apresentam-se os coeficientes de correlação (R^2) e as constantes cinéticas (K), para cada um dos ensaios de degradação (1º ensaio, 2º ensaio e 3º ensaio).

Tabela 8: Coeficiente de correlação (R^2) e constantes cinéticas (k) das soluções metoprolol na presença de ácidos fúlvicos para cada um dos ensaios.

Ensaio	Coefficientes de correlação (R^2)	Constante cinética (K, h^{-1})
1º ensaio	0,9747	$2,69 \times 10^{-2}$
2º ensaio	0,9148	$2,34 \times 10^{-2}$
3º ensaio	0,9838	$2,88 \times 10^{-2}$

Para o cálculo do tempo de meia-vida, $t_{1/2}$ que se traduz no tempo necessário para degradar 50% da concentração inicial. O tempo de meia vida $t_{1/2}$ pode ser assim calculado:

$$t_{(1/2)} = \frac{\ln 2}{k} \quad (1.24)$$

Os $t_{1/2}$ obtidos para cada um dos ensaios (1ºensaio, 2ºensaio e 3ºensaio) conforme a expressão descrita anteriormente (1.24), foram de 26, 30 e 24 h respetivamente.

Neste estudo, verifica-se que o metoprolol na presença dos ácidos fúlvicos em água se degrada, quando comparado com o metoprolol na ausência de ácidos fúlvicos, apresentando uma percentagem média de degradação (para os três ensaios) de cerca de 69%, após 48 h de irradiação. Portanto, os ácidos fúlvicos são sensibilizadores na degradação do metoprolol.

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os estudos desenvolvidos por Piram *et al.* (2008a). Estes autores, compararam a fotodegradação de diversos beta-bloqueadores em água pura e em efluentes de ETAR. No caso do metoprolol, verificaram que estes não se fotodegradava em água desionizada mas em três efluentes de ETAR distintos, os $t_{1/2}$ calculados por estes autores para o metoprolol foram de 20, 20 e 48 h, respetivamente. Os autores atribuíram a fotodegradação do metoprolol em efluentes à presença de fotossensibilizadores nos mesmos, mas não conseguiram estabelecer qualquer relação entre a velocidade de degradação e a concentração de matéria orgânica dissolvida.

Também Liu *et al.* (2009), observaram uma maior velocidade de fotodegradação de metoprolol, propranolol e atenolol em águas de rios do que em água desionizada, facto que atribuíram a mecanismos fotocatalíticos nas águas dos rios. Os mesmos autores obtiveram correlações positivas significativas entre a concentração de matéria orgânica dissolvida em água de rios e a constante cinética de degradação (k) do metoprolol e do propranolol nessas águas, mas correlações negativas significativas no caso do atenolol, o que suscita algumas dúvidas sobre os vários tipos de fotossensibilizadores que podem ser responsáveis pela aceleração da fotodegradação destes beta-bloqueadores. Andreozzi *et al.* (2003), através de experiências de fotodegradação sob a ação da luz solar em soluções sintéticas na presença e na ausência de ácidos húmicos comerciais verificaram que ácidos húmicos comerciais (5,0 mg/L) atuavam como sensibilizadores na fotodegradação do propranolol. Também Chen *et al.* (2009) estudaram o efeito de ácidos húmicos e de ácidos fúlvicos comerciais na fotodegradação de propranolol e verificaram que enquanto os ácidos húmicos não provocavam efeito fotos-

sensibilizado na degradação, os ácidos fúlvicos aceleravam consideravelmente a degradação.

Convém salientar que os trabalhos acima referidos sobre o estudo da degradação do metoprolol tanto em águas como em efluentes de ETARs, não mencionam a detecção ou identificação de quaisquer produtos de degradação, com exceção do trabalho desenvolvido por Liu *et al.* (2009), onde foram detetados quatro grupos principais de produtos de fotodegradação do metoprolol. Com base em espectros de massa os autores propuseram a formação dos produtos indicados na figura 11.

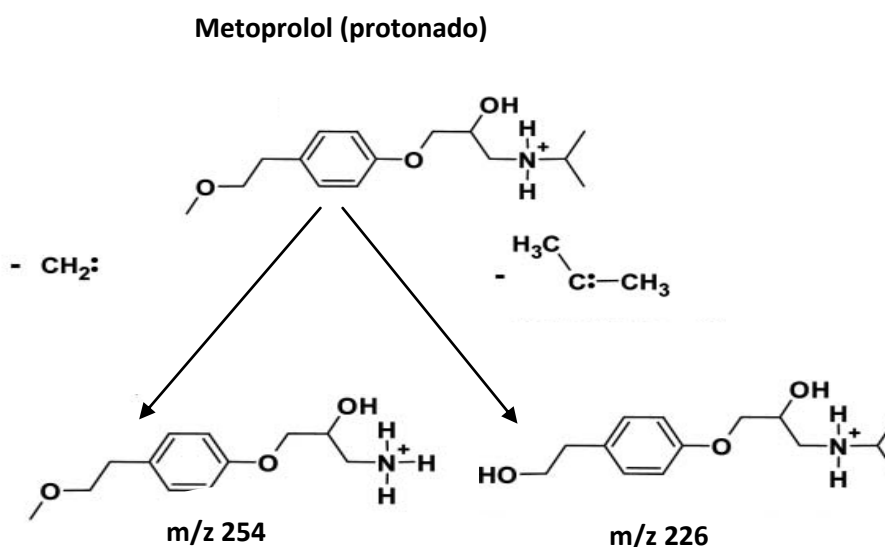


Figura 11: Estruturas propostas para a degradação do metoprolol em água dos rios: m/z 226 e m/z 254 (adaptado por Liu *et al.* 2009).

No presente trabalho, optou-se então por analisar os cromatogramas, a vários comprimentos de onda de deteção, das soluções de metoprolol irradiadas na presença de ácidos fúlvicos a fim de detetar eventuais produtos de degradação ao longo do tempo de irradiação, conforme será descrito mais à frente.

4.6 Detecção de produtos de degradação do metoprolol na presença de ácidos fúlvicos

Na tentativa de detetar os possíveis produtos de degradação do metoprolol na presença de ácidos fúlvicos, analisaram-se os cromatogramas a 222 nm ao longo do tempo de irradiação de soluções de metoprolol 50 mg/L. Na figura 12, apresenta-se um cromatograma da solução de metoprolol na presença de ácidos fúlvicos ao fim das 12 h de irradiação.

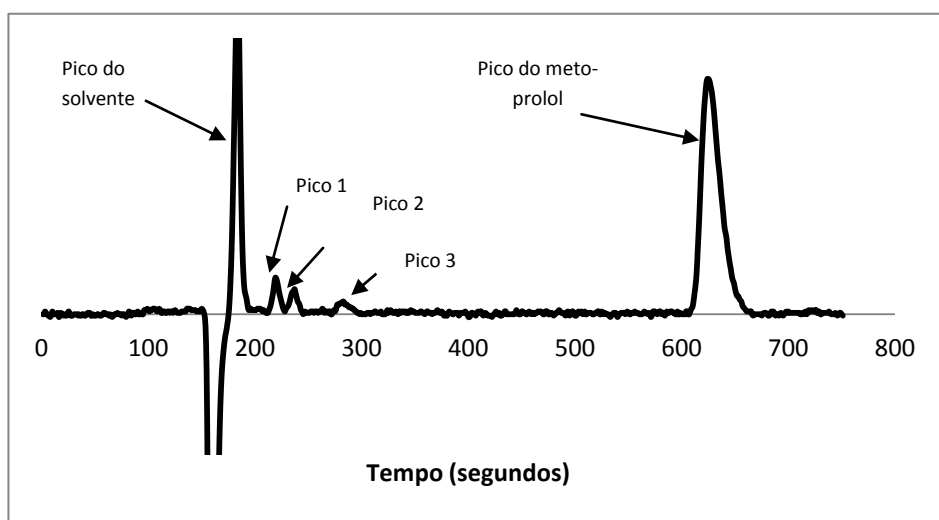


Figura 12: Cromatograma da solução de metoprolol na presença dos fúlvicos com ao fim de 12 h de irradiação.

Conforme se pode ver no cromatograma anterior, ao fim de 12 horas de irradiação, aparecem três picos adicionais para além do pico do metoprolol e do solvente. O primeiro pico apresenta um tempo de retenção (t_r) de 3,65 minutos, e apresenta-se próximo do pico do solvente. O segundo apresenta tempos de retenção (t_r) de 3,95 minutos, e o terceiro apresenta um tempo de retenção de 4,70 minutos. A visualização simultânea dos três picos só é possível a comprimento de onda de 222 nm. No entanto, fizeram-se os espectros aos tempos de retenção de cada pico a fim de identificar o máximo de absorção de cada composto. Estes espectros estão apresentados nas figuras 13, 14 e 15.

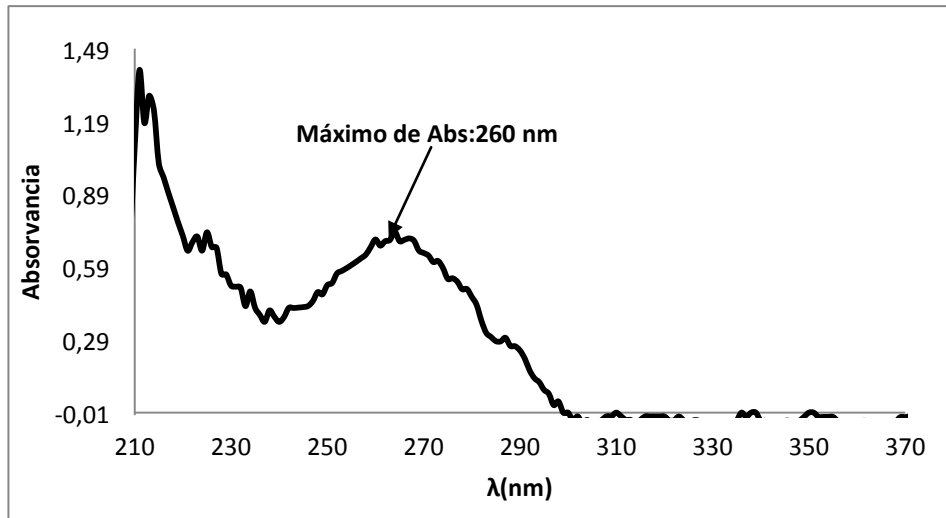


Figura 13: Espectro do produto correspondente ao pico 1 ($t_r = 3,65$ min) da solução metoprolol na presença de ácidos fúlvicos ao fim de 12 h de irradiação.

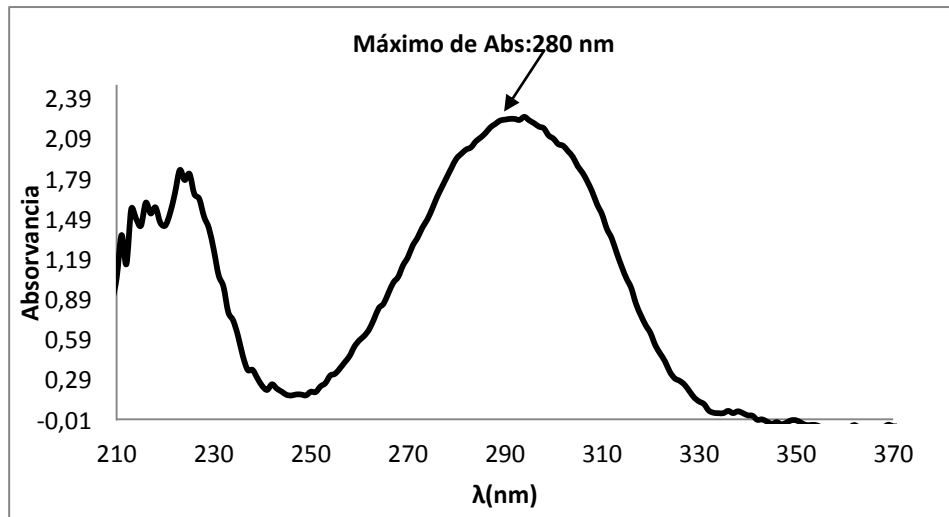


Figura 14: Espectro do produto correspondente ao pico 2 ($t_r = 3,95$ min) da solução metoprolol na presença de ácidos fúlvicos ao fim de 12 h de irradiação.

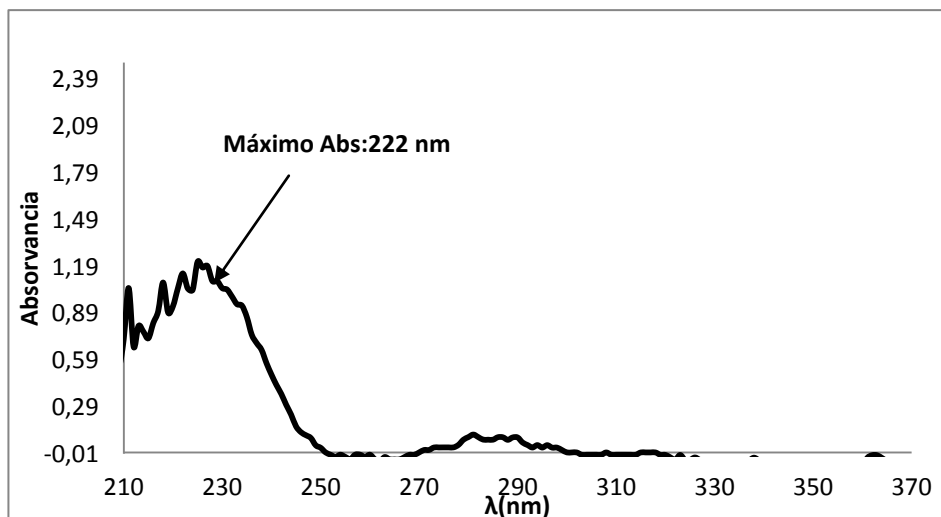


Figura 15: Espectro do produto correspondente ao pico 3 ($t_r = 4,70$ min) da solução metoprolol na presença de ácidos fúlvicos ao fim de 12 h de irradiação.

Na figura 16, apresenta-se um exemplo de cromatograma expandida da solução metoprolol na presença de ácidos fúlvicos após 12 h de irradiação com deteção a 222 nm, para uma melhor visualização dos picos de degradação.

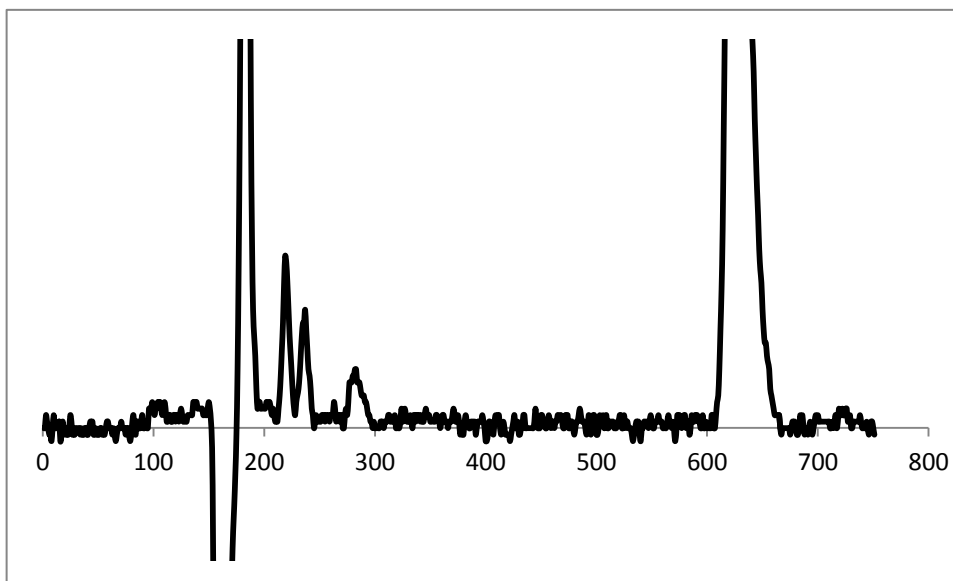


Figura 16: Cromatograma (expandido) da solução de metoprolol na presença dos fúlvicos ao fim de 12 h de irradiação.

Com o intuito de confirmar que os picos que aparecem no cromatograma acima indicado (figura 12) são devidos a degradação do metoprolol e não dos ácidos fúlvicos preparou-se uma solução de ácidos fúlvicos 10 mg/L, tal como foi descrito na secção

3.5.2, a qual foi irradiada durante os mesmos tempos que as soluções de metoprolol sendo posteriormente analisada no HPLC/UV-Vis. Os cromatogramas das soluções de ácidos fúlvicos não apresentam quaisquer picos aos tempos de retenção do metoprolol e dos seus produtos de degradação, como se pode ver na figura 17.

A solução de metoprolol irradiada na ausência de ácidos fúlvicos também não apresenta quaisquer picos aos tempos de retenção dos produtos de degradação anteriormente referidos, conforme está indicado na figura 18, o que está de acordo com o facto de não se ter observado qualquer degradação significativa do metoprolol na ausência de ácidos fúlvicos. Podemos portanto concluir que os picos 1, 2 e 3, anteriormente referidos são produtos de degradação do metoprolol.

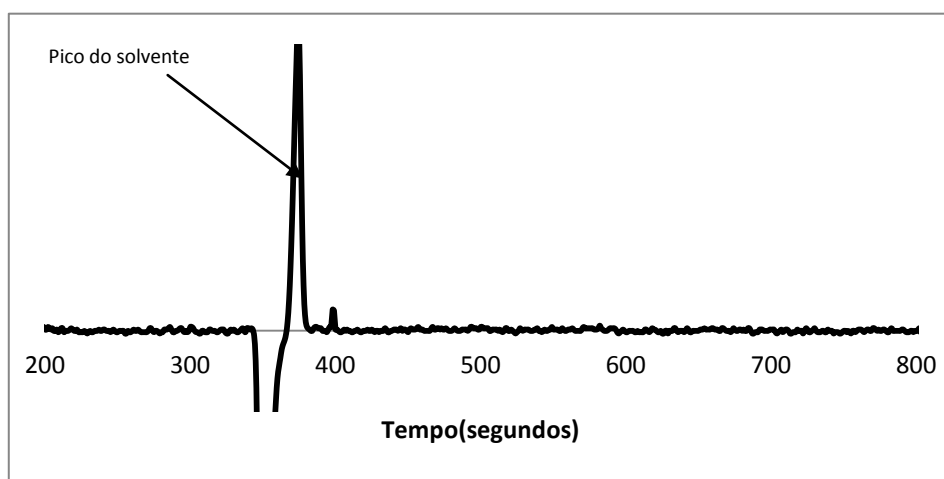


Figura 17: Cromatograma com deteção a 222 nm da solução de ácidos fúlvicos ao fim de 48 h de irradiação.

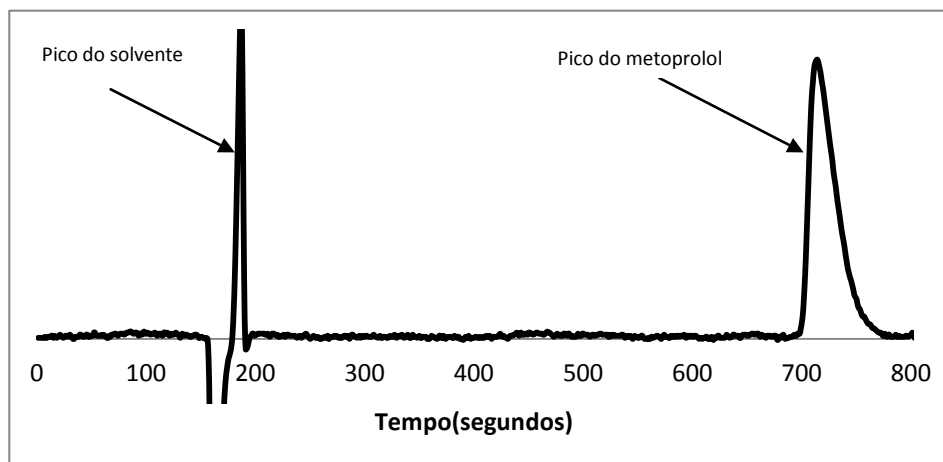


Figura 18: Cromatograma com detecção a 222 nm da solução de metoprolol na ausência de ácidos fúlvicos ao fim de 12 h de irradiação.

Os resultados obtidos nesta experiência, estão em grande parte de acordo com o estudo de Liu *et al.* (2007), no qual estes autores propuseram a formação de quatro produtos de degradação do succinato de metoprolol em águas de rios. Além desses quatro produtos de degradação, estes autores propuseram a formação de pelo menos mais dois produtos resultantes da oxidação do anel aromático, semelhante ao efeito verificado no caso da degradação do propranolol. Os mesmos autores propuseram a formação de quatro produtos de degradação do metoprolol em água dos rios, com base na razão m/z mas não só propuseram a estrutura para dois deles (Liu *et al.*, 2009). No subcapítulo seguinte, será discutido o efeito dos sequestradores de radicais $\cdot\text{OH}$ e de $^1\text{O}_2$ na degradação do metoprolol na presença de ácidos fúlvicos, a fim de elucidar o mecanismo pelo qual ocorre a degradação do metoprolol e a consequente formação de produtos.

4.7 Efeito dos sequestradores de radicais $\cdot\text{OH}$ e de $^1\text{O}_2$ na fotodegradação do metoprolol na presença de ácidos fúlvicos.

Para avaliar a via pela qual os ácidos fúlvicos promovem a fotodegradação do metoprolol realizaram-se experiências na presença de sequestradores, específicos de radicais $\cdot\text{OH}$ (manitol) e de $^1\text{O}_2$ (azida de sódio). Na figura 19, apresentam-se os valores da concentração normalizada (C/C_0) da solução metoprolol ($C_0 \sim 50$ mg/L) com ácidos fúlvicos, na ausência e na presença de manitol 25 mM em função do tempo de irradiação. Como se referiu anteriormente o manitol é um sequestrador de radicais $\cdot\text{OH}$.

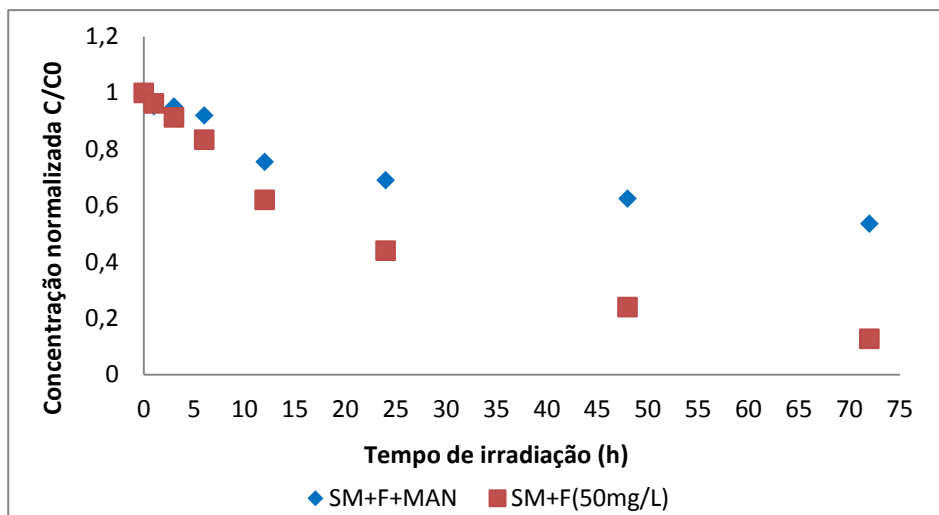


Figura 19: Comparação da degradação do metoprolol com ácidos fúlvicos na ausência (SM+F) e na presença do manitol (SM+F+MAN).

Na figura 20, apresentam-se os valores da concentração normalizada (C/C_0) da solução metoprolol ($C_0 \sim 50$ mg/L) com ácidos fúlvicos, na ausência e na presença de azida de sódio (NaN_3) 0,5 mM respetivamente em função do tempo de irradiação. Conforme já foi referido anteriormente a NaN_3 é um eficiente sequestrador de oxigénio singlete ($^1\text{O}_2$), e portanto, se o mecanismo envolver a reação com $^1\text{O}_2$, a fotodegradação do metoprolol deverá diminuir.

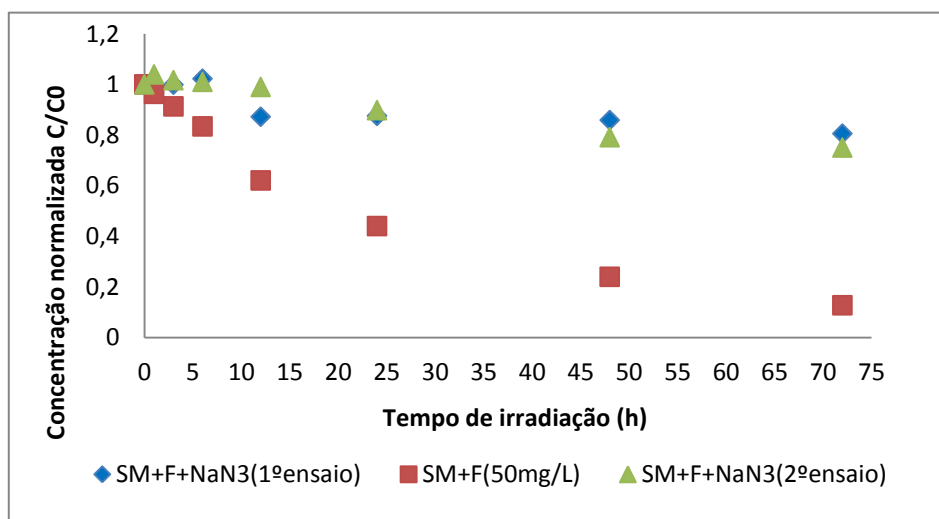


Figura 20: Comparação da degradação do metoprolol com ácidos fúlvicos na ausência (SM+F) e na presença (SM+F e SM+F+ NaN_3) de NaN_3 .

Através da análise da figura 20, pela comparação da degradação do metoprolol com ácidos fúlvicos na presença e na ausência de NaN_3 , pode-se verificar que ocorre uma diminuição evidente da degradação na presença de azida, o que sugere que o mecanismo pelo qual ocorre a degradação do metoprolol na presença de ácidos fúlvicos envolve o $^1\text{O}_2$. O efeito da azida é consideravelmente mais acentuado do que o efeito do manitol. Assim, ao fim de 72 h a percentagem de degradação do metoprolol na presença de ácidos fúlvicos 69%, diminuindo para 54% na presença de manitol e para 22% na presença de azida.

No global, os resultados obtidos apontam para que o oxigénio singlete seja a principal espécie reativa responsável pela fotodegradação indireta de metoprolol na presença de ácidos fúlvicos, embora os radicais $\cdot\text{OH}$ possam estar também envolvidos.

Como foi anteriormente referido na secção 4.5 do presente trabalho, Chen *et al.* (2009) estudaram o efeito de ácidos húmicos e ácidos fúlvicos comerciais na fotodegradação de propranolol e verificaram que os ácidos fúlvicos aumentavam significativamente a velocidade de fotodegradação do propranolol em solução aquosa. Os mesmos autores verificaram que os estados tripletos de ácidos fúlvicos eram a principal espécie reativa responsável pela fotodegradação indireta do propranolol. Desconheciam-se, à data de realização da maior parte do presente trabalho, quaisquer estudos sobre o efeito das substâncias húmicas na fotodegradação de metoprolol. No entanto, recentemente fomos confrontados com um trabalho sobre o efeito de ácidos fúlvicos comerciais extraídos de carvão na fotodegradação de metoprolol e atenolol (Chen *et al.*, 2012). Estes autores observaram também que a fotodegradação indireta na presença de ácidos fúlvicos, era acelerada, o que está de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho. Ainda mais recentemente Wang *et al.* (2012), estudaram o efeito de matéria orgânica natural aquática fornecida pela “*International Humic Substances Society*” na fotodegradação de atenolol, metoprolol e nadolol sob ação de luz solar simulada. No caso específico do metoprolol, observaram fotodegradação direta com uma constante de velocidade de $2,78 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2}$ de 29 dias), o que está em desacordo com os nossos resultados e os de Chen *et al.* (2012) segundo os quais a fotodegradação direta do metoprolol praticamente não ocorre. No entanto, estes autores também observaram um aumento da fotodegradação na presença da matéria orgânica natural (ácidos fúlvicos) o que está de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho e

no trabalho de Chen *et al.* (2012). Quanto à via pela qual os ácidos fúlvicos promovem a fotodegradação indireta do metoprolol, Chen *et al.* (2012), concluíram que a principal espécie reativa responsável pela fotodegradação indireta é o $^3\text{AF}^*$. De facto, estes autores estudaram o efeito da azida de sódio na fotodegradação do metoprolol na presença de ácidos fúlvicos e verificaram que a adição de azida não inibia a fotodegradação do metoprolol. Tal resultado levou os autores a concluir que o oxigénio singlete não era a espécie reativa envolvida na fotodegradação indireta do metoprolol.

Da mesma forma, experiências conduzidas na presença de 2-propanol como sequestrador de radicais $\cdot\text{OH}$, mostraram que este radical não estava envolvido na fotodegradação indireta de metoprolol na presença de substâncias húmicas. Por sua vez, a remoção de O_2 das soluções dos ácidos fúlvicos acelerou a fotodegradação dos dois beta-bloqueadores, o que resulta de a espécie $^3\text{AF}^*$ ser extremamente inibida na presença de oxigénio.

Os resultados do presente trabalho contrariam os resultados obtidos por Chen *et al.* (2012), o que pode ser explicado devido ao facto de serem usados ácidos fúlvicos de origem diferente em cada um dos casos. Conforme já foi referido anteriormente, as propriedades fotossensibilizadores das substâncias húmicas dependem em grande parte da sua origem e composição.

Em relação a este mecanismo de fotodegradação, Chen *et al.* (2012) propuseram um mecanismo para explicar a fotodegradação indireta do metoprolol e atenolol na presença de ácidos fúlvicos que se inicia no átomo de N, onde um eletrão é transferido para $^3\text{AF}^*$ dá origem a um produto (I), e estes ficam reduzidos. O produto (II) é formado pelo intermédio do produto (I) pela transferência de um H. Por último, o produto III que é formado pela clivagem das ligações C=N.

Wang *et al.* (2012), realizaram experiências de fotodegradação de três beta-bloqueadores (atenolol, metoprolol e nadolol) em água na presença de matéria orgânica natural (NOM). A fim de elucidar os mecanismos de fotodegradação destes beta-bloqueadores estes autores realizaram experiências de fotodegradação na presença de sequestradores específicos de radicais $\cdot\text{OH}$ e de $^1\text{O}_2$ e da $^3\text{NOM}^*$, de onde concluíram que as três vias são importantes na fotodegradação do beta-bloqueador atenolol (beta-bloqueador escolhido para estudos mais detalhados) na presença de NOM. Estes auto-

res sugerem que a reação direta com ^3NOM , é uma via predominante da perda destes beta-bloqueadores no meio ambiente. As vias de degradação envolvendo os radicais $\bullet\text{OH}$ e o $^1\text{O}_2$, revelaram ser de menor importância de acordo com as percentagens de contribuição de cada um destas vias na fotodegradação dos beta-bloqueadores através da fotólise direta e indireta.

4.8 Estudo do efeito da concentração na degradação do metoprolol na presença de ácidos fúlvicos

Para melhor deteção dos produtos de degradação e recolha dos picos do cromatograma (recolha da fase móvel à saída da coluna) com vista a uma posterior identificação por espectrometria de massa, decidiu-se fazer a fotodegradação usando soluções de metoprolol mais concentradas. Começou-se então por fazer um estudo comparativo da cinética de fotodegradação com diferentes concentrações iniciais.

Com o objetivo de verificar se a concentração das soluções de metoprolol na presença de ácidos fúlvicos tem influência na sua fotodegradação, fez-se uma comparação da degradação utilizando duas soluções de metoprolol de $C_0 \sim 50 \text{ mg/L}$ e $C_0 \sim 250 \text{ mg/L}$, ambas preparadas por diluição das soluções conforme se encontram descritos no capítulo 3. A figura 21 apresenta a variação da concentração normalizada de metoprolol nas soluções contendo ácidos fúlvicos para uma concentração inicial aproximadamente de 50 e 250 mg/L respetivamente, em função do tempo de irradiação. Como se pode ver na figura 21, a degradação da solução menos concentrada ($C_0 \sim 50 \text{ mg/L}$) é mais rápida do que a da mais concentrada ($C_0 \sim 250 \text{ mg/L}$), sobretudo a partir das 12 horas de irradiação, quando se verifica um decréscimo muito acentuado concentração da solução menos concentrada.

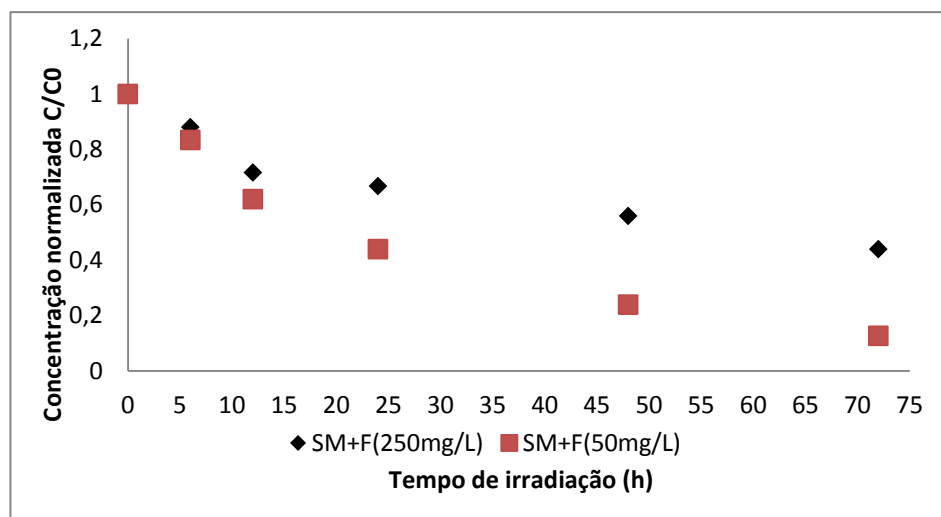


Figura 21: Comparação da degradação do metoprolol com ácidos fúlvicos 50 mg/L e 250 mg/L.

Os resultados obtidos nesta experiência, estão de acordo com os desenvolvidos por Zhang *et al.* (2011), que verificaram que as percentagens de degradação do diclofenac em água aumentam quando a concentração inicial é mais baixa. Segundo os autores, os resultados podem ser explicados devido a competição para a absorção da quantidade limitada de fótons disponíveis. Isto é, porque uma vez que a concentração inicial do diclofenac aumenta, mas o número de fótons não se altera, o número de moléculas suscetíveis de ser fotodegradadas mantém-se, e a taxa de degradação, neste caso do diclofenac diminui. Portanto, poderá ser também a razão pela qual foi constatado que a variação na concentração inicial do metoprolol altera a sua cinética de reação de fotodegradação.

Na figura 22 apresenta-se o cromatograma da solução metoprolol com $C_0 \sim 250$ mg/L na presença de ácidos fúlvicos ao fim de 24 horas de irradiação. Conforme mostra a figura 22, através dos tempos de retenção os produtos de degradação parecem ser os mesmos que foram observados na figura 12 para a solução metoprolol na presença de ácidos fúlvicos com $C_0 \sim 50$ mg/L (solução menos concentrada).

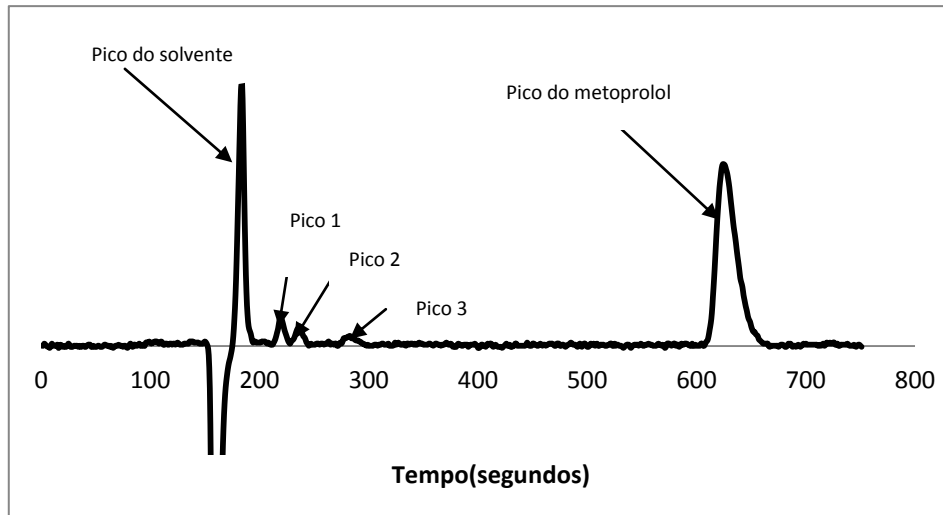


Figura 22: Cromatograma com detecção a 222 nm da solução de metoprolol (C_0 ~ 250 mg/L) na presença de ácidos fúlvicos ao fim de 24 h de irradiação.

Por fim, os picos foram recolhidos em várias injeções da solução irradiada e o solvente evaporado. Infelizmente, não foi possível obter os espectros de massa dos compostos até à entrega desta tese.

5 Conclusão

Este trabalho teve como objetivo estudar a fotodegradação do metoprolol em águas, a fim de e avaliar a influência da presença de ácidos fúlvicos e do ião nitrato.

Em primeiro lugar foi conseguido neste estudo uma otimização adequada da fase móvel indispensável na quantificação do metoprolol em água. Para otimizar a fase móvel, foram testados diferentes eluentes em proporções variáveis. A fase móvel escolhida foi acetonitrilo; água 10:90, contendo HCOOH 0,1% V/V, pois esta fase móvel foi a que apresentou melhores resultados, e condições experimentais na quantificação do metoprolol.

No que diz respeito á cinética de fotodegradação do metoprolol foi possível verificar que o metoprolol praticamente não é degradado pela luz solar simulada, mas nas mesmas condições e na presença de ácidos fúlvicos, o metoprolol sofre uma degradação gradual ao longo do tempo de irradiação. Assim, podemos concluir que os ácidos fúlvicos atuaram como sensibilizadores, na fotodegradação do metoprolol em água. Por outro lado, na presença de ácidos fúlvicos, os resultados da cinética de fotodegradação do metoprolol ajustaram-se a uma cinética de pseudo - primeira ordem, obtendo-se uma constante de $(2,7 \pm 0,7) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ ($n = 3$; $C = 95\%$). No caso do nitrato o mesmo efeito foi verificado, mas o efeito sensibilizador foi muito menos acentuado. Os resultados ajustaram-se também a uma cinética de pseudo - primeira ordem, e a constante cinética calculada foi de $(6,20 \pm 0,2) \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ($n = 3$; $C = 95\%$) pelo que o nitrato não mostrou uma evidência clara de ser um sensibilizador na degradação do metoprolol em solução aquosa.

Verificou-se que durante a fotodegradação do metoprolol na presença de ácidos fúlvicos ocorria a formação de três produtos de degradação diferentes. Por último, concluiu-se que a via pela qual as substâncias húmicas, nomeadamente os ácidos fúlvicos, promovem a fotodegradação do metoprolol em soluções aquosas deve envolver, muito provavelmente a formação do $^1\text{O}_2$.

Em relação ao estudo do efeito da concentração do metoprolol na fotodegradação da mesma na presença de ácidos fúlvicos, concluiu-se que a cinética é mais rápida na solução menos concentrada ($C_0 \sim 50 \text{ mg/L}$) do que para a solução mais concentrada ($C_0 \sim 250 \text{ mg/L}$). Contudo, os produtos de degradação detetados em ambos os casos,

parecem ser os mesmos, bem como o tempo de retenção mostram evidências que se tratam dos mesmos produtos.

6 Referências bibliográficas

Aguer J. P., Richard C., Andreux F. (1999). Effect of light on humic substances: Production of reactive species. *ANALUSIS* 27: n°5.

Alder A. C., Schaffner C., Majewsky M., Klasmeier J., Fenner K. (2010). Fate of β -blocker human pharmaceuticals in surface water: Comparison of measured and simulated concentrations in the Glatt Valley Watershed, Switzerland. *Water Research* 44: 936-948.

Andreozzi R., Raffaele M., Nicklas P. (2003). Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* 50: 1319-1330.

Andrisano V., Ballardini R., Hrelia P., Cameli N., Tosti A. (2001). Studies on the photostability and in vitro phototoxicity of Labetolol. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 12:495-504.

Andrisano V., Gotti R., Leoni A., Cavrini V. (1999). Photodegradation studies on Atenolol by liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 21: 851-857.

Bancirova, M. (2011). Sodium azide as a specific quencher of singlet oxygen during chemiluminescent detection by luminol and Cypridina luciferin analogues. *Luminescence* 26: 685-688

Basci N. E., Temizer A., Bozkurt A., Isimer A. (1998). Optimization of mobile phase in the separation of β -blockers by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 18: 745-750.

Bendz D., Paxéus N. A., Ginn, Timothy R., Loge, Frank J. (2005). Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Hoje River in Sweden. *Journal of Hazardous Materials* 122: 195-204.

Benitez F. Javier, Real Francisco J., Acero Juan L., Roldan Gloria (2009). Removal of selected pharmaceuticals in waters by photochemical processes. *Journal Chemical Technology Biotechnology* 84: 1186-1195.

Boule P., Bolte M. and Richard C. (1999). In the *Handbook of Environmental Chemistry- Volume 2, Part L- Reactions and Processes*, ed O. Hutzinger, pp, 181-215. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.

Boxall Alistair B. A. (2004). The environmental side effects of medication. *EMBO reports* Volume 5 N° 12: 1110-1116.

Buffle J. Characteristics of aquatic organic compounds. In: Buffle, J *Complexation reactions in aquatic systems: an analytical approach*. New York, Ellis Horwood, 1990: 146-192.

Calamari D., Zuccato E., Castiglioni S., Bagnati R., Fanelli R. (2003). Strategic Survey of Therapeutic Drugs in the Rivers Po and Lambro in Northern Italy. *Environmental Science and Technology* 37 :1241-1248.

Castiglioni S., Bagnati R., Fanelli R., Calamari D., Zuccato E. (2005). A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban waste waters. *Journal of Chromatography A* 1092: 206-215.

Castiglioni S., Bagnati R., Fanelli R., Pomati F., Calamari D., Zuccato E. (2006). Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. *Environmental Science and Technology* 40: 357-363.

Chen Yong, Hu C., Hu. X., Qu J. (2009). Indirect photodegradation of amine drugs in aqueous solution under simulated sunlight. *Environmental Science and Technology* 43: 2760-2765.

Chen Yong, Li H., Wang Z. Li H. Tao Tao, Zuo Y. (2012). Photodegradation of selected β -blockers in aqueous fulvic acid solutions: Kinetics, mechanism, and product analysis. *Water Research* 46: 2965-2972.

Chen Yong, Liu Z., Wang Z., Xue M., Zhu X., Tao Tao (2011). Photodegradation of propranolol by Fe (III)-citrate complexes: Kinetics, mechanism and effect of environmental media. *Journal of Hazardous Materials* 194: 202-208.

Cleuvers, Michael (2005). Initial risk assessment for three β - blockers found in the aquatic environment. *Chemosphere* 59: 199-205.

Conkle L. Jeremy, White J. R., Metcalfe D. Chris (2008). Reduction of pharmaceutically active compounds by a lagoon wetland wastewater treatment system in Southeast Louisiana. *Chemosphere* 73: 1741-1748.

Czaplicka Marianna (2005). Photo-degradation of chlorophenols in the aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials* 134 : 45-59.

Daneshvar A., Svanfelt J., Kronberg L., Prévost M., Weyhenmeyer G. A. (2010). Seasonal variations in the occurrence and fate of basic and neutral pharmaceuticals in a Swedish river - lake system. *Chemosphere* 80: 301-309.

Espinoza L. A. T., Neamtu M., Frimmel H. F. (2007). The effect of nitrate, Fe (III) and bicarbonate on the degradation of bisphenol A by simulated solar UV-irradiation. *Water Research* 41: 4479-4487.

Fent K., Weston A. A., Caminada D. (2006) Ecotoxicology of human pharmaceuticals - Review. *Aquatic Toxicology* 76: 122-519.

Garg S., Rose L. A., Waite T. David (2011). Photochemical production of superoxide and hydrogen peroxide from natural organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 75: 4310-4320.

Ginebreda A., Muñoz I., López de Alda M., Brix R., López-Doval J., Barceló D. (2010). Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: Relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain). *Environmental International* 36, 153-162.

Goldstone J. V., Pullin M. J., Bertilsson S., Voelker B. M. (2002). Reactions of hydroxyl radical with humic substances: bleaching, mineralization, and production of bioavailable carbon substrates. *Environmental Science and Technology* 36: 364-372.

Gómez M. J., Malato O. Ferrer I. Aguera A., Fernández-Alba A. R. (2007). Solid-phase extraction followed by liquid chromatography – time – of – flight – mass spectrometry to evaluate pharmaceuticals in effluents. A pilot monitoring study. *Journal of Environmental Monitoring* 9: 718-729.

Gómez M. J., Petrovic M., Fernández - Alba Amadeo R., Barceló D. (2006). Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid - phase extraction and liquid chromatography - tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *Journal of Chromatography (A)* 1114: 224-233.

Gros M., Petrovic M., Barcelo D. (2006). Multi-residue analytical methods using LC-tandem MS for the determination of pharmaceuticals in environmental and wastewater samples: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 386: 941-952.

Guilherme, J. G. Isabela (2009). Fotodegradação de ácidos fúlvicos provenientes de uma fábrica de papel na presença dos iões cloreto (Cl⁻) e nitrato (NO₃⁻). Tese de Dissertação de Mestrado. Universidade de Aveiro.

Halling-Sorensen B., Nielsen B.N., Lanzky P.F., Ingerslev F., Lutzhoft H.C.H., Jorgensen S.E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment, a review. *Chemosphere* 36, 357–394.

Hernando M. D., Heath E., Petrovic M., Barcelo D. (2006a). Trace-level determination of pharmaceutical residues by LC-MS/MS in natural and treated waters. A pilot-survey study. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 385: 985-991.

Hernando M. D., Mezcua M., Fernández-Alba A. R., Barceló D. (2006b). Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* 69: 334-342.

Hernando M. Dolores, Gómez M^a José, Aguera A., Fernández-Alba A. (2007). LC-MS analysis of Basic pharmaceuticals (beta-blockers and anti-ulcer agents) in wastewater and surface water. *Trends in Analytical Chemistry*, Volume 26, N^o 6.

Hernando M.D., Petrovic M., Fernandez-Alba A.R, Barceló D. (2004). Analysis by liquid chromatography - electrospray ionization tandem mass spectrometry and acute toxicity evaluation for β -blockers and lipid-regulating agents in wastewater samples. *Journal of Chromatography (A)* 1046: 133-140.

Huggett D.B., Khan I. A., Foran C.M., Schlenk D. (2003). Determination of beta - adrenergic receptor blocking pharmaceuticals in United States wastewater effluent. *Environmental Pollution* 121: 199-205.

INFARMED (2008). *Estatística do Medicamento 2007*.

Ji Yuefei, Zeng Chao, Ferronato Corinne, Chovelon Jean-Marc, Yang Xi (2012). Nitrate-induced photodegradation of atenolol in aqueous solution: Kinetics, toxicity and degradation pathways. *Chemosphere* 88: 644-649.

Lam Monica W., Mabury Scott A. (2005). Photodegradation of pharmaceuticals atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole. *Aquatic Science* 67: 177-188.

Larsson D.G. J., Fredriksson S., Sandblom E., Paxeus N., Axelsson M. (2006). Is heart rate in fish a sensitive indicator to evaluate acute effects of β -blockers in surface water. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 22: 338-340.

Lee Hing-Biu, Sarafin K., Peart E. T. (2007). Determination of β - blockers and β_2 - agonists in sewage by solid – phase extraction and liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography (A)* 1148: 158-167.

Li B., F. Ahmed and P. S. Bernstein (2010). Studies on the singlet oxygen scavenging mechanism of human macular pigment. *Archives of Biochemistry and Biophysics*: Article in press.

Li Yang, N. J., Wang W. (2011). Photolysis of Enrofloxacin in aqueous systems under simulated sunlight irradiation: Kinetics, mechanism and toxicity of photolysis products. *Chemosphere* 85: 892-897.

Liu Qin-Tao, Helene E. W. (2007). Kinetics and degradation products for direct photolysis of β – blockers in water. *Environmental Science and Technology* 41: 803-810.

Liu Quin-Tao, Cumming Rob I., D. Sharpe Alan (2009). Photo-induced environmental depletion processes of β -blockers in rivers waters. *Photochemical and Photobiology Science* 8: 768-777.

- López-Roldán R. López de Alda M., Gros M., Petrovic M., Martín-Afonso J. (2010). Advanced monitoring of pharmaceuticals and estrogens in the Llobregat River basin (Spain) by liquid chromatography–triple quadrupole-tandem mass spectrometry in combination with ultra performance liquid chromatography–time of flight-mass spectrometry. *Chemosphere* 80: 1337-1344.
- Maurer, M., Escher, B.I., Richle, P., Schaffner, C., Alder, A.C. (2007). Elimination of beta-blockers in sewage treatment plants. *Water Research* 41 (7): 1614-1622.
- Miège C., Favier M., Brosse C., Canler Jean-Pierre, Coquery M. (2006). Occurrence of betablockers in effluents of wastewater treatment plants from the Lyon area (France) and risk assessment for the downstream rivers. *Talanta* 70: 739-744.
- Miller, J. N., Miller, J.C. (2000). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Prentice Hall, Harlow, UK.
- Mistry B., Leslie J. L., Eddington N. D. (2001). Enantiomeric separation of metoprolol and α - hydroxymetoprolol by liquid chromatography and fluorescence detection using a chiral stationary phase. *Journal of Chromatography (B)* 758: 153-161.
- Neamtu, Mariana; Frimmel, Fritz H. (2006). Photodegradation of endocrine disrupting chemical nonylphenol by simulated solar UV – irradiation. *Science of Total Environment* 369: 295-306.
- Paxéus N. (2004). Removal of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), gemfibrozil, carbamazepine, β -blockers, trimethoprim and triclosan in conventional wastewater treatment plants in five EU countries and their discharge to the aquatic environment. *Water Science and Technology* Volume 50: 253-260.
- Peuravuori J., Pihlaja K. (2009). Phototransformations of selected pharmaceuticals under low - energy UVA - Vis and powerful UVB - UVA irradiations in aqueous solutions - role of natural dissolved organic chromophoric material. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394: 1621-1636.
- Piram A. Salvador A., Verne C., Herbreteau B. Faure R. (2008a). Photolysis of β - blockers in environmental waters, *Chemosphere* 73: 1265-1271.

Piram A., Salvador A., Gauvrit Jean-Yves, Lanteri P., Faure R. (2008b). Development and optimisation of a single extraction procedure for the LC/MS/MS analysis of two pharmaceutical classes residues in sewage treatment plant. *Talanta* 74: 1463-1475.

Radjenovic J., Petrovic M., Barceló D. (2007). Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387: 1365-1377.

Rivas F.J., Gimeno O., Borrallho T., Carbajo M. (2010). UV-C radiation based methods for aqueous metoprolol elimination. *Journal of Hazardous Materials* 179: 357-362.

Romero V., De la Cruz N., Dantas F. R., Marco P., Giménez J., Esplugas S. (2010). Photocatalytic treatment of metoprolol and propranolol. *Journal of Catalysis Today* 161: 115-120

Sacher F., Lange F.T., Brauch H.J., Blanjenhorn I. (2001). Pharmaceuticals in groundwaters: Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *Journal of Chromatography (A)* 938: 199-210.

Santos E. B. H. and Duarte R. (1998). The influence of pulp and paper mill effluents on the composition of the humic fraction of aquatic organic matter. *Water Research* 32: 597-608.

Shao B., Chen D., Zhang J., Wu Y., Sun C. (2009). Determination of 76 pharmaceutical drugs by liquid chromatography - tandem mass spectrometry in slaughterhouse wastewater. *Journal of Chromatography (A)* 1216: 8312-8318.

Skoog, D. A., Holler, F.J., Nieman, T.A. (1998). *Principles of Instrumental Analysis*; Saunders College & Company; United States of American.

Sortino S., Petralia S., Boscà F., Miranda Miguel A. (2002). Irreversible photo – oxidation of propranolol triggered by self – photogenerated singlet molecular oxygen. *Photochemical and Photobiology Science* 1: 136-140.

Ternes Thomas A. (2001). Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*, Volume 20, N° 8: 419-434.

Ternes, Thomas A. (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research* Volume 32, N° 11: 3245-3260.

Uwai K., Tani M., Ohtake Y., Abe S., Maruko A., Chiba T., Hamaya Y., Ohkubo Y., Takeshita M. (2005). Photodegradation products of propranolol: The structures and pharmacological studies 78: 357-365.

Vieno N. M., Tuhkanen, T., Kronberg, L. (2006). Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection. *Journal Chromatography (A)* 1134: 101-111.

Vieno N., Tuhkanen T. Kronberg L. (2007). Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. *Water Research* 41: 1001-1012.

Wang L., Xu H., Cooper, W.J., Song W. (2012). Photochemical fate of beta-blockers in NOM enriched waters. *Science of the Total Environment* 426: 289-295.

Weigel S., Kallenborn R., Huhnerfuss H. (2004). Simultaneous solid-phase extraction of acidic, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal Chromatography (A)* 1023: 183-195.

Wick A., Fink G., Joss A., Siegrist H., Ternes T. A. (2009). Fate of beta blockers and psycho - active drugs in conventional wastewater treatment. *Water Research* 43: 1060-1074.

Xia X., Gongchen L., Yang Z., Chen Y., Huang G. H. (2009). Effects of fulvic acid concentration and origin on photodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous solution: Importance of active oxygen. *Environmental Pollution* 157: 1352-1359.

Yang Hai, An T., Li G., Song W., Cooper W.J., Luo H., Guo X. (2010). Photocatalytic degradation kinetics and mechanism of environmental pharmaceuticals in aqueous suspension of TiO₂: A case of β – blockers. *Journal of Hazardous Materials* 179: 834-839.

Zhan M., Yahn Xi, Xian Q., Kong L. (2006). Photosensitized degradation of bisphenol A involving reactive species in the presence of humic substances. *Chemosphere* 63: 378-386.

Zhang Li, Su X., Zhang C., Ouyang L., Xie Q., Ma M., Yao S. (2010). Extraction and preconcentration of β -blockers in human urine for analysis with high performance liquid chromatography by means of carrier - mediated liquid phase microextraction. *Talanta* 82: 984-992.

Zhang Nan, Liu G., Liu H., Wang Y., He Z., Wang G. (2011). Diclofenac photodegradation under simulated sunlight: Effect of different forms of nitrogen and kinetics. *Journal of Hazardous Materials* 192: 411-418.

Zhang Z.L., Zhou J. L. (2007). Simultaneous determination of various pharmaceutical compounds in water by solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal Chromatography (A)* 1154: 205-213.

Zuccato E., Castiglioni S., Fanelli R. (2005). Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *Journal Hazardous Materials* 122: 205-209.