



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Instituto de Química- INQUI
Programa de Pós-Graduação em Química – Mestrado e Doutorado



ESTUDO DA DEGRADAÇÃO POR VIA OXIDATIVA DA NIMESULIDA

Débora Antonio da Silva

Orientador: Prof. Dr. Silvio César de Oliveira

Campo Grande - 2016

Unidade XI – Instituto de Química – UFMS

Cidade Universitária, s/n *Caixa Postal 549 Fone/Fax 067xx 3345-7009 Fone 067xx 3345-7010

79070-900 *Campo Grande (MS)*

<http://www.ufms.br> e-mail: pgquimica.propp@ufms.br



Serviço Público Federal

Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Instituto de Química- INQUI

Programa de Pós-Graduação em Química – Mestrado e Doutorado



ESTUDO DA DEGRADAÇÃO POR VIA OXIDATIVA DA NIMESULIDA

Débora Antonio da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química – Nível de Mestrado - da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de Mestre em Química (área de concentração: Química).

Prof. Dr. Silvio César de Oliveira

Campo Grande - 2016

Unidade XI – Instituto de Química – UFMS

Cidade Universitária, s/n *Caixa Postal 549 Fone/Fax 067xx 3345-7009 Fone 067xx 3345-7010

79070-900 *Campo Grande (MS)*

<http://www.ufms.br> e-mail: pgquimica.propp@ufms.br

DEDICATÓRIA

À minha mãe Irene e minha querida irmã Inêz;

À todos os amigos que conquistei ao longo desta pesquisa;

À todos que trabalham e acreditam que é possível construir um mundo melhor a partir da educação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida e por todas as bênçãos concedidas.

Aos meus familiares por representarem uma importante torcida, que com muito carinho sempre me apoiaram.

Ao professor Dr. Silvio César de Oliveira, meu orientador, pela constante orientação, paciência e pela confiança depositada em mim ao longo deste trabalho.

A todos os professores do instituto de química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Ao Celestino e Ademar, secretários do Programa de Pós-Graduação – Instituto de Química, UFMS.

A todos os amigos do grupo de Fotoquímica e Eletroquímica Aplicada, especialmente, Andréa, Diego, Fábio, Lucas, Rebeca, Thalita e Rodrigo.

Ao amigo Adailton, pelo apoio durante a realização deste trabalho.

A minha querida irmã Inêz que amo muito, por sempre apoiar.

A Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e a CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que confiaram em mim, meus sinceros agradecimentos.

Sumário

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1- INTRODUÇÃO.....	11
1.1 ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDES, AINES.....	13
1.1.1 NIMESULIDA	14
1.2 PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS, POAs.	16
1.2.1 PROCESSO UV/H ₂ O ₂	17
1.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	19
1.3.1 PLANEJAMENTO FATORIAL EM DOIS NÍVEIS	20
1.3.2 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL, DCC.	20
1.3.3 METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA, MSR.....	21
1.4 ENSAIOS DE TOXICIDADE	22
1.4.1 DAPHNIA SIMILIS.....	23
1.4.2 ENSAIO COM ARTEMIA SALINA	24
2 OBJETIVO.....	25
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. METODOLOGIA	26
3.1 DEGRADAÇÃO.....	26
3.1.1 PREPARO DA SOLUÇÃO DE NIMESULIDA.....	26
3.1.2 SISTEMA DE DEGRADAÇÃO	26
3.1.3 EXPERIMENTO DE DEGRADAÇÃO	27
3.2 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL – DEGRADAÇÃO.....	28
3.3 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL - MINERALIZAÇÃO	29
3.4 ANÁLISE DA DEGRADAÇÃO E MINERALIZAÇÃO.....	31
3.4.1 CARBONO ORGÂNICO TOTAL, COT.	31
3.4.2 ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL	31
3.4.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	32
3.5 ACTINOMETRIA	32
3.6 TESTE DE TOXICIDADE.....	34
3.6.1 TESTE PARA DAPHNIA SIMILIS.....	34
3.6.2 TESTE PARA ARTEMIA SALINA	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 EXPERIMENTO DE ACTINOMETRIA	35
4.2 TESTE INICIAIS	35
4.2.1 DEGRADAÇÃO.....	35
4.2.2 TOXICIDADE PARA DAPHNIA SIMILIS.....	37
4.3 EXPERIMENTOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL	39
4.3.1 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL - DEGRADAÇÃO	39
4.3.2 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL – MINERALIZAÇÃO	45
4.4 TESTE DE TOXICIDADE PARA ARTEMIA SALINA	51
4.5 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO	52
5. CONCLUSÕES.....	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Gráfico de publicações dos últimos 25 anos sobre contaminação ambiental por fármacos.	13
Figura 2: Principais rotas de Contaminação ambiental por medicamentos e produtos de higiene pessoal (Adaptado de SANTOS et al., 2010).	13
Figura 3: (a) Estrutura do ácido araquidônico. (b) prostaglandina.	15
Figura 4: Estrutura Química da Nimesulida	16
Figura 5: Ionização e estruturas de ressonância para nimesulida (adaptado de PEREIRA et al., 2011).	16
Figura 6: Reação de degradação fotoquímica sugerida para nimesulida (adaptado de HEMMATEENEJAD, et al., 2008).	17
Figura 7: Planejamento em estrela, adaptado de (BENÍCIO et al.,2010).	22
Figura 8: foto da fêmea embrionária de <i>Daphnia similis</i>	24
Figura 9: <i>Artemia salina</i> (adaptado de MESARIĆ et. al., 2015).	25
Figura 10: Fotografia do sistema de degradação utilizado.	28
Figura 11: Espectro de Absorção da Nimesulida.	33
Figura 12: Gráfico dos testes iniciais de Degradação da Nimesulida.	36
Figura 13: Gráfico de Degradação da nimesulida (mantendo pH constante; e adicionando todo H ₂ O ₂ no início do experimento).	38
Figura 14: Diagrama de Pareto para Degradação da Nimesulida.	43
Figura 15: (a) Valores previstos pelo modelo teórico em função do valor real observado (b) gráfico de probabilidade normal dos resíduos.	45
Figura 16: Superfície de resposta prevista para a interação entre as variáveis [H ₂ O ₂] e [NIM].	46
Figura 17: Gráfico de Pareto da mineralização da nimesulida.	49
Figura 18: (a) gráfico normal de resíduos e (b) valores previstos versus valores observados para mineralização da nimesulida.	50
Figura 19: Superfície de resposta para mineralização da nimesulida	51
Figura 20: Gráfico de degradação da nimesulida para diferentes concentrações de fármaco e peróxido de hidrogênio.	54
Figura 21: Gráfico da cinética de degradação da nimesulida em diferentes concentrações de fármaco e peróxido de hidrogênio.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sistemas mais comuns de POAs (adaptado de HUANG et al., 1993).	18
Tabela 2: Níveis dos fatores do DCC para degradação da nimesulida.	29
Tabela 3: Matriz de planejamento para degradação da nimesulida.	30
Tabela 4: Níveis dos fatores do delineamento composto central para mineralização da nimesulida.	31
Tabela 5: Matriz de planejamento para mineralização da nimesulida.	31
Tabela 6: Resultados do teste de toxicidade da nimesulida para omicrocrustáceo <i>Daphnia Similis</i> .	39
Tabela7: Efeitos estimados obtidos através do Estatística para variável degradação.	41
Tabela 8: Valores Previstos e observados para a degradação da nimesulida.	44
Tabela 9: Resultados do delineamento composto central – Mineralização.	47
Tabela 10: Efeitos estimados obtidos através do Estatística para variável mineralização.	48
Tabela 11: Teste de toxicidade para <i>Artemia salina</i> .	53
Tabela 12: Resultados obtidos para cinética de degradação da nimesulida.	55

GLOSSÁRIO DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

COT: Carbono Orgânico Total

HO[•]: Radical Hidroxila

HO₂[•]: Radical Hidroperoxila

k: Constante cinética de pseudo-primeira ordem

O₂^{•-}: Radical superóxido

[H₂O₂]: Concentração de peróxido de hidrogênio

[Nim]: Concentração de nimesulida

POAs: Processos oxidativos avançados

DCC: Delineamento composto central

MSR: Metodologia de superfície de resposta

AINE: Anti-inflamatório não esteroide

UV: radiação Ultravioleta

UV-Vis: Ultravioleta/Visível

CI: Carbono inorgânico

CT: Carbono Total

CL₅₀: Concentração letal à 50% dos organismos teste.

RESUMO

Os medicamentos beneficiam a humanidade, melhorando a qualidade de vida e proporcionando longevidade às pessoas na sociedade atual. Por consequência, há uma forte movimentação da indústria farmacêutica acarretando geração de resíduos, como compostos emergentes, persistentes, bioacumulativos e tóxicos. Por envolver contaminantes recalcitrantes normalmente os tratamentos convencionais não são eficientes para sua completa eliminação, surgindo assim, a necessidade de tecnologias adicionais de tratamento. Desta forma os processos oxidativos avançados (POAs) podem se apresentar como uma atraente alternativa, que visa à degradação dos contaminantes e a sua transformação em produtos inofensivos que não apresentem toxicidade e/ou sua completa destruição, transformando-os em CO₂, H₂O e ânions inorgânicos. Estes processos se baseiam na oxidação dos compostos orgânicos por meio de geração de espécies reativas, tais como o radical hidroxila e ozônio. Pensando nisso o objetivo deste trabalho é avaliar a degradação, mineralização e toxicidade da nimesulida N-(4-nitro-2-fenoxifenil)metanosulfonamida, um anti-inflamatório não esteroide indicado para condições que requeiram atividade anti-inflamatória, analgésica e antipirética. Para realização deste trabalho foi utilizada a técnica de planejamento fatorial, uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, otimizando-o e minimizando o empirismo. Os resultados obtidos foram otimistas obtendo-se completa degradação do medicamento, cerca de 80% de remoção do carbono orgânico total e diminuição considerável da toxicidade para *Daphnia Similis* e *Artemia Salina*.

PALAVRAS CHAVE: Nimesulida, Processos Oxidativos Avançados, Planejamento Experimental.

ABSTRACT

The pharmaceutical benefit the humanity improving the quality of life and providing longevity to persons are living in today's society. By consequence, this leads to a strong drive of the pharmaceutical industry, resulting in the generation of waste, being one of the major concerns for ecosystems, seeing that, generally these compounds are persistent, bioaccumulative and toxic. Since they are recalcitrant contaminants, usually conventional treatments are not efficient for their complete elimination, appearing so, the need for additional treatment technologies. This way, the Advanced Oxidative Processes (AOPs), can present itself as an attractive alternative aimed at the degradation of contaminants, in other words, its transformation into harmless products that do not exhibit toxicity and/or their complete destruction, turning into CO₂, H₂O and inorganic salts. These processes are based on oxidation of organic compounds by generation of reactive species, such as hydroxyl radical and ozone. Thinking about that, the aim of this study is to evaluate the degradation, mineralization and toxicity of nimesulide N-(4-Nitro-2-phenoxyphenyl)methanesulfonamide, an anti-inflammatory nonsteroidal indicated for conditions requiring anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity. For this work we opted for the factorial design technique, a tool based on the statistical theory, providing reliable information about the process, minimizing empiricism. The results were optimistic obtaining complete degradation of the pharmaceutical, about 80% removal of TOC and considerable decrease in toxicity for *Daphnia Similis* and *Artemia Salina*.

KEY WORDS: Nimesulide, Advanced Oxidative Processes, Experimental Design.

1- INTRODUÇÃO

O crescimento demográfico e a expansão industrial têm trazido vários problemas ao meio ambiente. Contaminação de solos, atmosfera, águas superficiais e subterrâneas são consequências sofridas por todo o planeta. Entre os vários contaminantes orgânicos estão os provenientes de fármacos, produtos de higiene pessoal e agroquímicos.

Os produtos farmacêuticos e de higiene pessoal representam uma grande porcentagem nesta contaminação pois, tais produtos estão fortemente ligados à saúde e bem-estar, e por isso o setor está sempre em constante crescimento.

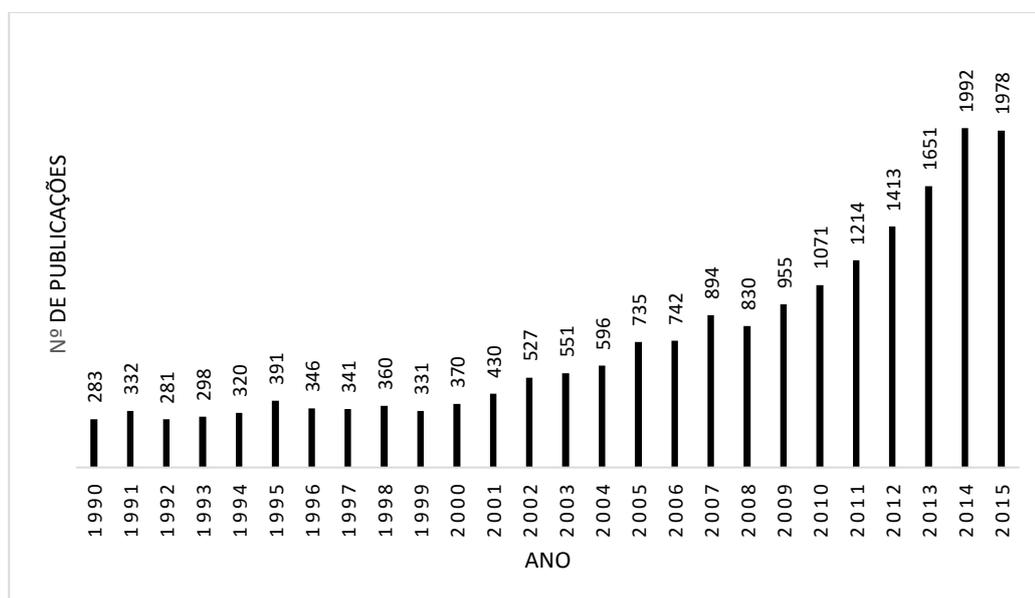
O mercado farmacêutico brasileiro foi o sexto maior do mundo em 2012, registrou uma receita bruta de R\$ 49,6 bilhões e em 2016, o Brasil deverá ser o quarto maior mercado farmacêutico do mundo, depois dos Estados Unidos, China e Japão. O mercado de fármacos no país deverá atingir vendas de R\$ 87 bilhões em 2017 segundo dados da Pharmaceutical Market Brazil.

A alta produção e consumo desses produtos aumenta a preocupação em relação aos resíduos gerados que, não são removidos totalmente nos processos convencionais de tratamento. Portanto, desenvolver estratégias para minimizar o impacto ambiental se faz necessário visto que, muitos compostos já foram detectados no ambiente em níveis de nanogramas à microgramas por litro (BARRON, 2009).

A consciência em relação ao impacto ambiental causado por estes contaminantes se reflete nas publicações na literatura especializada, que desde 1990 tem mostrado um crescimento exponencial no número de estudos sobre essa classe emergente de poluentes da água. A maioria desses poluentes frequentemente se apresentam como substâncias persistentes e bioacumulativas no meio ambiente (MOMPELAT et al., 2008).

Na figura 1 é apresentado um histograma do número de publicações (desde 1990) em função dos anos. As palavras chaves usadas na construção deste gráfico foram contaminantes, fármacos e meio ambiente e a base de dados utilizada foi o Science Direct.

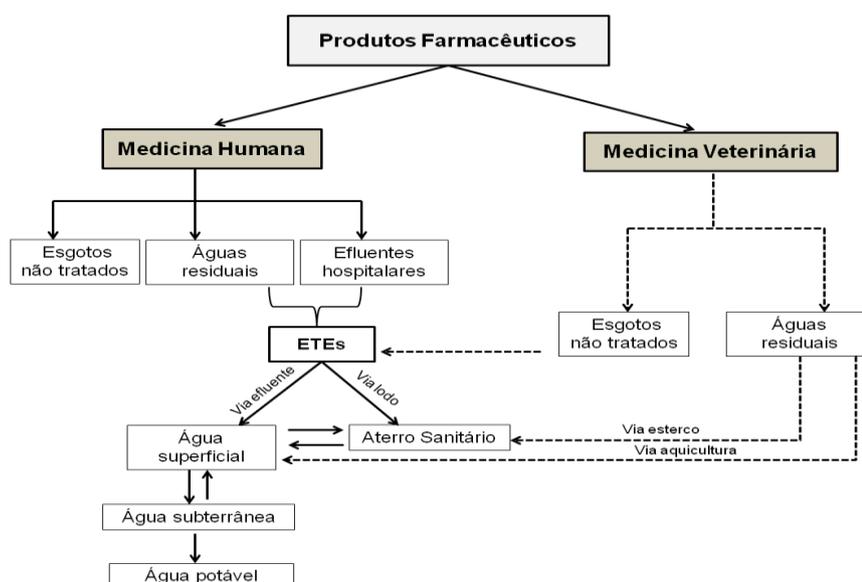
Figura 1: Gráfico de publicações dos últimos 25 anos sobre contaminação ambiental por fármacos.



Fonte: <http://www.sciencedirect.com/>

A maioria dos micropoluentes orgânicos tem origem antropogênica e estão sendo continuamente liberados nas águas residuais ou diretamente no meio ambiente (figura 2) (MOMPELAT et al., 2008).

Figura 2: Principais rotas de Contaminação ambiental por medicamentos e produtos de higiene pessoal (Adaptado de SANTOS et al., 2010).



Visto que os resíduos farmacêuticos trazem grande preocupação em relação ao impacto ambiental, se faz necessário a utilização de técnicas adicionais de tratamento nas

quais os processos oxidativos avançados (POAs) se apresentam como uma alternativa para o tratamento de compostos recalcitrantes.

Estes processos se baseiam na oxidação dos compostos orgânicos por meio de radicais oxidantes fortes, tais como radical hidroxila e ozônio (CAVALCANTE et al., 2015; GOZZI et al., 2012).

Neste trabalho o intuito é estudar a degradação da nimesulida, um anti-inflamatório não-esteróide (AINE) muito utilizado nas práticas de automedicação e comumente prescrito para condições que requeiram atividade anti-inflamatória, analgésica e antipirética.

Para o desenvolvimento deste trabalho optou-se por um tratamento estatístico, com objetivo de minimizar custos e número de experimentos, explorando o máximo de respostas fornecidas pelo sistema.

E por fim a realização de testes de toxicidade para soluções do fármaco tratado e não tratado.

1.1 ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDES, AINES.

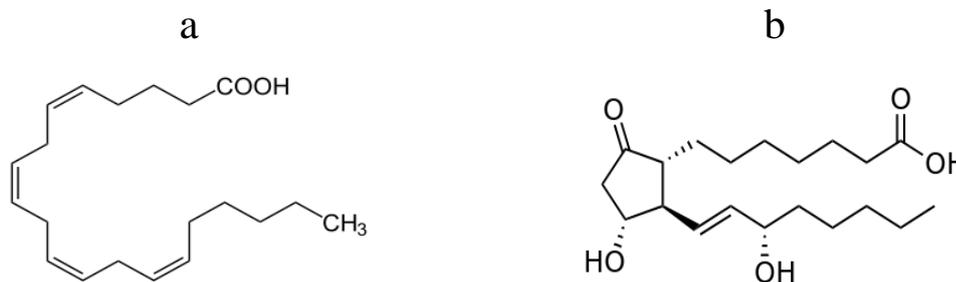
Os Anti-inflamatórios não esteróides AINEs fazem parte de uma das classes de medicamentos mais prescritos em todo o mundo para o tratamento de dor e inflamações, além de estarem entre os mais utilizados nas práticas de automedicação (SAKATA, 2008).

Os AINEs possuem ações analgésicas, anti-inflamatória, antitérmica e antitrombótica. São fármacos que inibem a inflamação por meio da inativação das isoenzimas ciclooxigenases constitutiva (COX-1) e induzível (COX-2) (NIEDJA et al., 2008).

A isoforma COX-1, induz a produção de prostaglandinas envolvidas na regulação de funções fisiológicas, como por exemplo a proteção da mucosa gástrica. Já a COX-2 é responsável pela formação das prostaglandinas que são liberadas juntamente com outras substâncias desencadeando o processo inflamatório (NIEDJA et al., 2008).

A enzima ciclooxigenase (COX) promove um processo de oxigenação e ciclização do ácido araquidônico (figura 3a) – liberado pela inflamação – produzindo assim a molécula biologicamente ativa prostaglandina (figura 3b) (SAMAD et al., 2002).

Figura 3: (a) Estrutura do ácido araquidônico. (b) prostaglandina.



Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/444899#section=Top>

A ação dos AINE é inibir a enzima ciclooxigenase eliminando assim a inflamação, no entanto alguns AINE apresentam efeitos adversos por inibir também a COX-1. Estes AINEs são os não seletivos, já outros AINE dentre os quais a nimesulida faz parte, são seletivos, pois atuam preferencialmente na COX-2 minimizando os efeitos adversos consequentes à inibição enzimática não seletiva (WANNMACHER e BREDEMEIER, 2004).

Por outro lado, diversos trabalhos mostram que alguns AINEs (incluindo a nimesulida) apresentam hepatotoxicidade (LICATA et al., 2009; TRAVERSA et al., 2003; TAN et al., 2007).

A hepatotoxicidade é a terminação dada a substâncias que causam lesão ao fígado. Os efeitos podem variar de transaminases séricas para hepatocelular ou lesão colestática e, ocasionalmente, a hepatite fulminante fatal. (AITHAL e DAY, 1999).

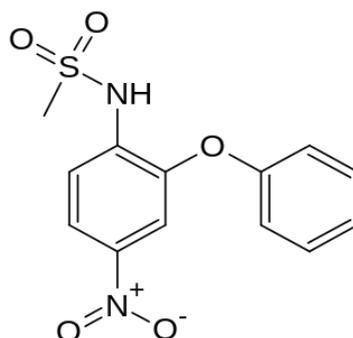
Dados da Organização Mundial da Saúde tem registrado cerca de 320 casos de problema hepático associados ao uso de nimesulida. (KHAN, 2008).

Devido ao risco apresentado por este medicamento, alguns países como Irlanda, Finlândia e Espanha proibiram a venda de nimesulida, já outros países como Estados Unidos, Canadá e Austrália não chegaram a comercializá-la por considerarem este medicamento de segurança questionável. No Brasil ainda não foram documentados relatos de toxicidade hepática relacionadas a nimesulida (ARAUJO, 2012).

1.1.1 NIMESULIDA

A nimesulida faz parte da classe das sulfonamidas, pois possui um radical sulfonamida no lugar do radical carboxila que é mais comum aos AINEs, sua estrutura é apresentada na figura 4. Ao radical sulfonamida é atribuída as características anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas (PIEL et al., 1997)

Figura 4: Estrutura Química da Nimesulida



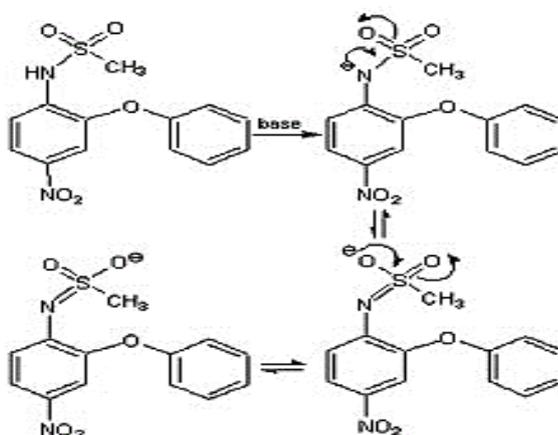
Fonte: [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4495?from=summary#section=3D-](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4495?from=summary#section=3D-Conformer)

Conformer

A nimesulida é um pó cristalino amarelo claro, praticamente inodoro e seu nome sistemático é *N*-(4-Nitro-2-fenoxifenil)metanosulfonamida. Seu pKa varia de 5,9 à 6,56 demonstrando assim que é uma substância levemente ácida. Seu ponto de ebulição está entre 147-148°C (KOVARIKOVA. et al,2003).

A solubilidade da nimesulida é alta em solventes orgânicos, já em água possui uma baixa solubilidade, cerca de 0,01mg/mL. No entanto essa solubilidade é afetada variando-se o pH. Em pH ácido a nimesulida é praticamente insolúvel, mas à medida que o pH é aumentado a solubilidade também aumenta. A figura 5 sugere as estruturas de ressonância para ionização da molécula. (KOVARIKOVA. et al.,2003).

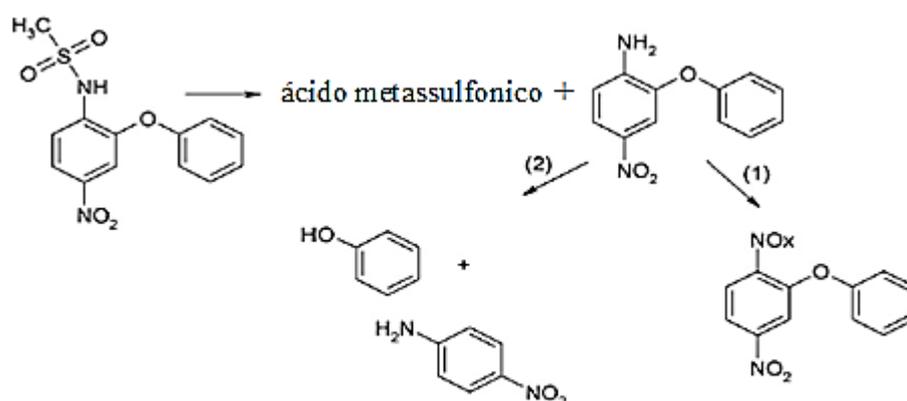
Figura 5: Ionização e estruturas de ressonância para nimesulida (adaptado de PEREIRA et al., 2011).



Na literatura não há relatos de POAs na aplicação de remoção da nimesulida, mas Kovaříková, Mokry e Klimes (2003) e Hemmateenejad, Javidnia e Saeidi-boroujeni (2008)

discutem a estabilidade fotoquímica da nimesulida. Em seu artigo Hemmateenejad, Javidnia e Saeidi-boroujeni (2008) relatam que o primeiro passo da fotodegradação da nimesulida em luz solar natural pode ser atribuído a clivagem da ligação N-S e formação de ácido metassulfônico e 2-fenoxi-4-nitroanilina (figura 6). O segundo passo da reação fotoquímica pode estar relacionado a degradação de 2-fenoxi-4-nitroanilina, que pode seguir duas rotas (1) oxidação do grupo NH_2 à NO_2 ou NO_3 (2) clivagem da ligação C-O e formação de 4-nitroanilina e fenol (HEMMATEENEJAD, et al., 2008).

Figura 6: Reação de degradação fotoquímica sugerida para nimesulida (adaptado de HEMMATEENEJAD, et al., 2008).



1.2 PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS, POAs.

Embora os processos físicos de separação contribuam muito para a redução do volume de efluentes, estes consistem apenas da mudança de fase do poluente, não sendo capazes de degradá-los ou eliminá-los.

O tratamento químico de águas contaminadas por compostos não biodegradáveis faz parte de uma estratégia a longo prazo para melhorar a qualidade dos nossos recursos hídricos, por isso técnicas de tratamento químico de água levaram a melhoria dos procedimentos de degradação oxidativa dos compostos orgânicos dissolvidos ou dispersos em meio aquoso. Tais técnicas são denominadas processos oxidativos avançados, POAs (LEGRINI et al., 1993).

Esses processos se caracterizam por transformar a grande maioria dos contaminantes em dióxido de carbono (CO_2), água (H_2O) e íons inorgânicos, através de reações de degradação oxidativa (MANSILLA et al., 2001; GOZZI et al., 2012).

Através dos POAs, o objetivo é gerar radicais hidroxila por meio de reações envolvendo oxidantes forte, como o ozônio (O_3) e radical hidroxila (HO^\bullet) (HUANG et al., 1993).

Os processos em que são utilizados catalisadores sólidos são chamados de heterogêneos, enquanto que os demais são chamados de homogêneos. Abaixo a tabela 1 apresenta os sistemas típicos de processos oxidativos avançados.

Tabela 1: Sistemas mais comuns de POAs (adaptado de HUANG et al., 1993).

	COM IRRADIAÇÃO
	O_3/UV
	H_2O_2/UV
	Feixe de Elétrons
	US (ultrassom)
Sistemas Homogêneos	H_2O_2/US
	US/UV
	SEM IRRADIAÇÃO
	O_3/H_2O_2
	O_3/OH^\bullet
	H_2O_2/Fe (Fenton)
	COM IRRADIAÇÃO
	$TiO_2/O_2/UV$
Sistemas Heterogêneos	$Ti/H_2O_2/UV$
	SEM IRRADIAÇÃO
	Eletro-Fenton

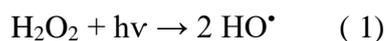
Os processos UV/H_2O_2 , UV/O_3 e $UV/H_2O_2/O_3$ empregam radiação UV para promover a fotólise do H_2O_2 e/ou O_3 para gerar radicais hidroxila. Na oxidação fotocatalítica o objetivo é o mesmo, mas neste caso o semicondutor absorve radiação a fim de gerar um par elétron-lacuna que desencadeará as reações de oxirredução (LEGRINI et al., 1993).

1.2.1 PROCESSO UV/H_2O_2

A radiação UV é eficiente em processos de desinfecção de águas, no entanto para remoção de compostos orgânicos, apenas a radiação UV não é suficiente, mas se essa radiação UV for combinada com H_2O_2 , os radicais hidroxila gerados dessa combinação são

extremamente potentes e capazes de oxidar compostos orgânicos persistentes (LEGRINI et al., 1993).

O peróxido de hidrogênio pode atacar diretamente o composto orgânico ao mesmo tempo que ocorre a fotólise de H_2O_2 . A radiação UV quebra a molécula H_2O_2 em radicais hidroxila com um rendimento de dois radicais HO^\bullet para cada molécula de H_2O_2 no comprimento de onda de 253,7nm, conforme a equação 1. (GHALY et al., 2001).



A taxa de fotólise de H_2O_2 depende de vários fatores, como o comprimento de onda utilizado e o pH que aumenta a taxa de fotólise em condições alcalinas. Isso pode ser devido principalmente ao coeficiente de absorção molar mais elevado do peróxido de hidrogênio em 253,7nm (LEGRINI et al., 1993).

As reações comumente descritas na literatura para oxidação de compostos orgânicos são diferentes e podem ocorrer por três diferentes rotas:

Abstração do átomo de hidrogênio:



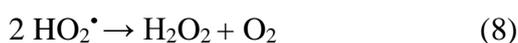
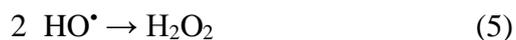
Adição eletrofílica:



Transferência eletrônica:



Outras reações também estão envolvidas nos POAs mas algumas promovem a inibição da degradação. Uma delas é a recombinação de radicais hidroxila (equação 5). Se um excesso de H_2O_2 é usado, os radicais hidroxila irão produzir radicais hidroperoxila que são menos reativos e aparentemente não contribuem para a degradação (equação 6 a 8) (LEGRINI et al., 1993).



O uso do processo UV/H₂O₂ traz algumas vantagens em comparação a outros métodos como a disponibilidade comercial do oxidante, estabilidade de armazenamento, alta solubilidade em água, não há problemas de transferência de massa associadas com gases, formação de dois mols de radical hidroxila para cada molécula de peróxido de hidrogênio no comprimento de onda de 253,7nm e procedimentos e operações simples (TAMBOSI, 2008).

Existem, no entanto, também obstáculos encontrados com o processo de UV/H₂O₂. A taxa de oxidação do contaminante está limitada pela taxa de formação de radicais hidroxila, existe também baixa absorvidade molar de H₂O₂ na região de 253,7nm. (LEGRINI et. al., 1993).

1.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Na sociedade atual há um enorme interesse em aperfeiçoar processos, minimizando custos e tempo, e maximizando qualidade e rendimento. Por isso muitos profissionais inclusive os cientistas têm buscado técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos.

Em qualquer área de pesquisa sempre há interesse em saber quais variáveis são importantes em algum estudo que esteja sendo realizado, assim como os limites superiores e inferiores dos valores dessas variáveis. O planejamento experimental é uma técnica que ajuda responder essas incertezas (CALADO e MONTGOMERY, 2003).

O emprego de conhecimentos estatísticos pode ajudar a responder perguntas de forma racional e econômica. Usando planejamentos experimentais baseados em princípios estatísticos é possível extrair do sistema em estudo o máximo de informação útil, fazendo um número mínimo de experimentos (BARROS NETO, et al., 2010).

Através desta técnica é possível determinar as variáveis que exercem maior influência no desempenho de um determinado processo, tendo como resultado: redução da variação dos valores pretendidos e os valores obtidos; redução do tempo de processo; redução do custo operacional e melhoria no rendimento do processo (CALADO e MONTGOMERY, 2003).

Pelas vantagens apresentadas, atualmente muitos trabalhos envolvendo POAs tem utilizado o planejamento experimental, com intuito de determinar as melhores condições na remoção de contaminantes orgânicos.

Por isso no presente trabalho optou-se pela utilização do planejamento fatorial, associado à análise de superfícies de resposta, que é uma ferramenta fundamentada na teoria

estatística. Foi utilizado o software Estatística que permite construir o planejamento experimental e analisa-lo.

1.3.1 PLANEJAMENTO FATORIAL EM DOIS NÍVEIS

Para executar um planejamento fatorial é necessário determinar os níveis em que cada fator deverá ser estudado. Quando são executados experimentos com todas as possíveis combinações dos níveis desses fatores, então é dito planejamento fatorial completo (BARROS NETO et al., 2010).

Para estudar a influência de qualquer fator sobre uma dada resposta, é necessário fazê-lo variar de nível e observar o resultado que essa variação produz sobre a resposta. Para κ fatores um planejamento completo de dois níveis exige a realização de $2 \times 2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^\kappa$ ensaios diferentes, sendo chamado por isso de planejamento fatorial 2^κ (BARROS NETO et al., 2010).

Na realização do planejamento 2^κ é necessário fazer os ensaios e registrar as respostas observadas em todas as possíveis combinações dos níveis escolhidos. A lista dessas combinações é chamada de matriz de planejamento e costuma-se identificar estes níveis com sinais (+) e (-) para níveis superior e inferior respectivamente. (BARROS NETO et al., 2010).

Quando o efeito de uma variável depende do nível da outra, dizemos que as duas variáveis interagem, e é possível calcular o valor de efeito de uma variável sobre a resposta e também calcular o efeito da interação entre as variáveis.

Para eliminar a necessidade de repetições em todos os pontos adiciona-se os pontos centrais, os quais permitem o cálculo de resíduos e conseqüentemente do erro padrão.

Os pontos centrais são importantes sobre a distribuição da variância na predição da resposta na região de interesse. Além de contribuir para o cálculo do erro, é útil para a estimativa dos termos quadráticos e fornecem informações adicionais quanto ao centro da região experimental (PERÁZIO, 2010).

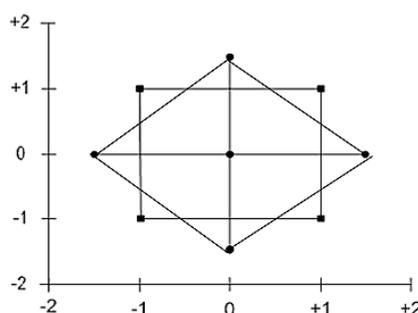
1.3.2 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL, DCC.

O delineamento composto central (DCC), conhecido também como planejamento em estrela é um dos mais populares delineamentos de modelos de segunda ordem (PERÁZIO, 2010).

Para fazer um planejamento estrela, simplesmente acrescentamos ao planejamento inicial um planejamento idêntico, porém girando 45° em relação à orientação de partida. O resultado é mostrado na figura 7 (DCC), assim os pontos estão a uma distância de $\sqrt{2}$ unidades codificadas do ponto central. Todos eles estão, portanto, sobre uma circunferência de raio $\sqrt{2}$ (BENÍCIO et al.,2010).

Os pontos adicionados neste delineamento são os pontos axiais, que são situados nos eixos do sistema de coordenadas com distância $\pm \alpha$ da origem. Estes pontos contribuem para as estimativas dos termos quadráticos, mas não para a estimativa da interação entre os fatores.

Figura 7: Planejamento em estrela, adaptado de (BENÍCIO et al.,2010).



Em um DCC um modelo quadrático é desenvolvido para estimar os parâmetros que indicam uma relação empírica entre as variáveis independentes e a variável resposta e este modelo tem a forma geral apresentada na equação 10 (GHAFOORI et al., 2012).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} X_i X_j + e \quad (10)$$

Onde, Y representa a resposta prevista, β_0 é um coeficiente constante (intercepto), β_i e β_{ii} representam os coeficientes lineares e quadráticos respectivamente, β_{ij} representa a interação entre os coeficientes, X_i e X_j são as variáveis independentes e e representa o resíduo (GHAFOORI et al., 2012).

1.3.3 METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA, MSR.

A metodologia de superfície de resposta (MSR) é um método que proporciona uma previsão da eficiência do processo para diferentes valores das variáveis independentes testadas e a superfície de contorno ajuda identificar o tipo de interação entre estas variáveis (KASIRI e KHATAEE, 2010).

A superfície de resposta obtida com o planejamento estrela é uma representação gráfica adequada para encontrar o local ideal do rendimento do processo. É possível obter a superfície de resposta no espaço tridimensional e o gráfico de contorno num plano, no qual cada contorno corresponde à altura da superfície. O valor ideal pode corresponder a um máximo ou mínimo que pode ser encontrado simplesmente por uma inspeção visual (CANDIOTI et al., 2014)

Quando mais de dois fatores são estudados, aquele que não está representado graficamente deve ser ajustado à um valor constante, assim uma parte limitada do domínio experimental é mostrado e o ótimo não é necessariamente observado no gráfico. Por isso deve-se ter cuidado ao selecionar o valor da variável fixa. As sobreposições das curvas de contorno também são úteis, pois permitem procurar visualmente a resposta mais satisfatória (CANDIOTI et al., 2014).

Uma superfície de resposta é a figura obtida quando uma variável resposta é representada graficamente em função de dois ou mais fatores do processo.

1.4 ENSAIOS DE TOXICIDADE

A resolução do CONAMA n°357 de 2005 estabelece condições e padrões para lançamento de efluentes, inclusive quanto ao potencial para provocar efeitos tóxicos no corpo receptor. A resolução CONAMA n°430 de 2011 altera e complementa a resolução n°537 estabelecendo critérios e parâmetros de toxicidade a serem cobrados pelos órgãos estaduais.

Os testes de avaliação da toxicidade das substâncias tóxicas obedecem a um modelo geral de procedimento, que consiste na exposição de organismos-teste a diferentes concentrações do agente tóxico em recipientes sob rigoroso controle das condições ambientais como temperatura, pH e alcalinidade (CESAR et al, 1997).

Nos testes de avaliação da toxicidade aguda das substâncias tóxicas estima-se, por meios de modelos matemáticos e/ou estatísticos, a CL_{50} , definida como a concentração estimada que produz mortalidade em 50% da população exposta ao agente tóxico por determinado período de tempo ou concentração efetiva (CE_{50}). Este período é variável com a espécie teste utilizada, mas geralmente situa-se entre 24 e 96 horas (RAND e PETROCELLI, 1985).

A toxicidade aguda é uma resposta severa e rápida dos organismos aquáticos a um estímulo que se manifesta num intervalo pequeno de tempo de zero a 96 horas.

Os bioensaios com organismos aquáticos possibilitam a qualificação e a mensuração dos efeitos dos compostos orgânicos tóxicos sobre a biota e a estimativa dos riscos de intoxicação ambiental. Os bioensaios, aplicados ao controle da poluição da água, permitem estimar os efeitos dos principais poluentes do meio ambiente, frente a organismos aquáticos, pertencentes a diferentes níveis tróficos destes ecossistemas (SOARES, 1985, *apud*. ALMEIDA, 1987).

1.4.1 DAPHNIA SIMILIS

Daphnia spp (figura 8) é um microcrustáceo encontrado no planctônico de água doce de todo o mundo, com tamanho médio de 5 a 6mm. Na cadeia alimentar é um consumidor primário entre os metazoários, alimentando-se por filtração de material orgânico particulado, principalmente de algas unicelulares (CESAR et al, 1997).

Figura 8: foto da fêmea embrionária de *Daphnia similis*.



A escolha de *Daphnia* como organismo teste fundamenta-se em alguns critérios: (a) pela reprodução ocorrer por partenogênese originando apenas fêmeas os descendentes são geneticamente idênticos, o que assegura uma certa uniformidade de resposta nos ensaios; (b) o manuseio é simples, por causa do tamanho relativamente grande da espécie, em comparação com outras espécies e (c) a espécie reage sensivelmente a uma ampla gama de agentes nocivos. (CESAR et al, 1997).

No Brasil a *Daphnia similis*, embora não seja uma espécie nativa vem sendo juntamente com a *Daphnia magna* uma das espécies mais estudadas e utilizadas em ensaios de avaliação de toxicidade aguda (ZAGATO, 2006).

Os ensaios e cultivo dos organismos utilizados neste trabalho foram realizados de acordo com Norma Brasileira 12713:2004. Na norma é possível encontrar as condições de cultivo dos organismos e o procedimento a ser seguido nos ensaios.

1.4.2 ENSAIO COM ARTEMIA SALINA

Artemia salina (figura 9) é um microcrustáceo que vive em lagos de água salgada e salina de todo mundo. Possui tamanho e colorações variadas, que vão do rosa-pálido a avermelhado, branco ou esverdeado dependendo do seu tipo de alimentação, atinge a fase adulta em cerca de vinte dias.

Figura 9: *Artemia salina* (adaptado de MESARIĆ et. al., 2015).



Este organismo é facilmente encontrado em lojas de aquaristas, pois é utilizado como alimento para peixes. Seu ciclo de vida inicia-se com a eclosão de cistos dormente, nos quais os embriões permanecem metabolicamente inativos e quando entram em contato com água salgada hidratam-se e reassumem seu desenvolvimento (GOMES, 1986 *apud* BORTOLOTTI, 2007).

Os motivos que favorecem o uso deste microcrustáceo em testes de toxicidade são: (a) tempo relativamente curto de eclosão dos cistos (24 horas); (b) pequena quantidade de amostra (2 a 20mg) e (c) a simplicidade do teste que não requer métodos assépticos, nem equipamentos especiais (SIQUEIRA et al., 1998).

A utilização de micro crustáceos é interessante pois são organismos sensíveis a uma ampla variedade de compostos e são espécies facilmente encontradas na no ecossistema natural.

Embora os testes de toxicidade apresentem uma estimativa da toxicidade do fármaco este não é suficiente para avaliar a toxicidade de um composto, pois um determinado composto pode apresentar toxicidade para uma espécie e não apresentar nenhum efeito para outra.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi realizar o estudo da degradação do medicamento anti-inflamatório nimesulida através do processo oxidativo avançado UV/H₂O₂.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar e aplicar o planejamento experimental buscando a otimização do processo de degradação do fármaco e remoção de carbono orgânico total (COT), nos níveis das variáveis independentes selecionadas.
- Estudar a degradação, mineralização e cinética de degradação da nimesulida por meio do sistema homogêneo de oxidação avançada com utilização de peróxido de hidrogênio combinado com irradiação ultravioleta (UV).
- Avaliar a toxicidade da solução do fármaco antes de ser submetido ao teste de toxicidade e da solução após degradação para os microcrustáceos *daphnia similis* e *artemia salina*.

3. METODOLOGIA

O desenvolvimento deste trabalho foi dividido da seguinte maneira:

Inicialmente foram realizados testes para conhecer o comportamento do fármaco frente ao processo de degradação bem como as condições a serem adotadas.

Em seguida foi elaborado o planejamento fatorial composto central para estudo das interações entre as variáveis selecionadas. Após o planejamento teórico, as degradações foram executadas aleatoriamente. Por fim, testes de toxicidade foram realizados com soluções aquosas do fármaco tratado e não tratado.

3.1 DEGRADAÇÃO

3.1.1 PREPARO DA SOLUÇÃO DE NIMESULIDA

Foi preparado soluções de nimesulida a partir da formulação padrão (Sigma Aldrich). As soluções foram preparadas diluindo o fármaco em 1 L de água deionizada (para os testes iniciais na concentração de 50mg L^{-1} e depois nas concentrações definidas no planejamento fatorial). Para a total solubilização da Nimesulida adicionou-se base (NaOH), ajustando-se o pH para 8.

3.1.2 SISTEMA DE DEGRADAÇÃO

Os experimentos foram conduzidos em um reator fotoquímico com 1 L de capacidade fabricado em vidro e um bulbo de quartzo para inserção da fonte de radiação (Figura 10). O reator foi acoplado a um banho termostático com recirculação com a finalidade de manter a temperatura da solução controlada em 25°C . A radiação ultravioleta foi proporcionada por uma lâmpada de vapor de mercúrio de média pressão 125 W sem o bulbo protetor (OSRAN), posicionada no interior de um tubo de quartzo. O peróxido de hidrogênio foi adicionado com auxílio de uma bomba peristáltica no fluxo de 1mL min^{-1} (Marconi, modelo MA 2400/4M). A homogeneização da solução durante o experimento foi promovida por um agitador magnético. Para coleta das alíquotas da solução foi utilizado um sistema montado com uma seringa acoplada a uma mangueira fina.

Figura 10: Imagem do sistema de degradação utilizado.



3.1.3 EXPERIMENTO DE DEGRADAÇÃO

A degradação foi realizada de acordo com as seguintes etapas: preparo da solução (em balão volumétrico protegido da luz; 5 minutos de espera (para atingir a emissão máxima de fótons); transferência para o reator; coleta de amostra inicial; lâmpada acionada; e adição de solução de peróxido de hidrogênio ao sistema periodicamente em um fluxo de 1 mL min^{-1} . Alíquotas de amostras foram coletadas em tempos adequados durante o período de reação. Em seguida as amostras foram filtradas com micro-filtro (Millipore, Millex-GV, tamanho de poro de $0,24 \mu\text{m}$) com auxílio de uma seringa.

3.1.3.1 TESTES INICIAIS

Com intuito de conhecer o comportamento do medicamento frente ao processo de tratamento, alguns testes foram realizados antes da aplicação do planejamento fatorial.

As condições testadas foram:

- Todas as degradações desta etapa foram realizadas na concentração de 50 mg L^{-1} de nimesulida;
- Adição total de peróxido de hidrogênio no início do processo;
- Adição em batelada de peróxido de hidrogênio durante 60 minutos;
- pH controlado (pH=10);
- pH não controlado;

• As concentrações de peróxido de hidrogênio utilizados nesta etapa foram de 300 mg L⁻¹; 250mg L⁻¹; 125mg L⁻¹ e 60mg L⁻¹.

3.2 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL – DEGRADAÇÃO

O DCC realizado neste trabalho é constituído de 8 pontos do planejamento fatorial, 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 experimentos.

O modelo DCC envolveu as seguintes etapas:

- Realização dos experimentos planejados estatisticamente a partir dos níveis dos fatores selecionados resumidos na tabela 2.
- Estimativa dos coeficientes do modelo matemático para prever a resposta;
- Verificação da adequação do modelo polinomial proposto.

As variáveis (tabela 2) foram codificadas da seguinte forma: (-1,68) representa o ponto axial inferior; (+1,68) representa o ponto axial superior; (0) representa o ponto central; (-1) representa o limite inferior e (+1) representa o limite superior do planejamento.

O planejamento bem como os gráficos resultantes foram gerados pelo programa StatSoft Statistica 10 Interprise.

Tabela 2: Níveis dos fatores do DCC para degradação da nimesulida.

Fatores	Níveis				
	-1,67	-1	0	+1	+1,67
[H ₂ O ₂] (mgL ⁻¹)	10	15	24	33	55
[Nim] (mgL ⁻¹)	5,7	8,5	15	21,5	35,92
tempo (min.)	3,35	5	10	15	25

A matriz de combinação entre os níveis dos fatores gerados para este DCC é apresentado na tabela 3.

Tabela 3: Matriz de planejamento para degradação da nimesulida.

Experimento	[H ₂ O ₂] (mg L ⁻¹)	[NIM] (mg L ⁻¹)	tempo (min.)
1	1,68179	0	0
2	-1	-1	1
3	-1	1	1
4	0	0	-1,68
5	0	0	1,68
6	-1,68	0	0
7	1	-1	-1
8	0	0	0
9	1	1	-1
10	0	1,68	0
11	1	1	1
12	-1	-1	-1
13	-1	1	-1
14	1	-1	1
15	0	-1,68	0
16	0	0	0
17	0	0	0

3.3 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL - MINERALIZAÇÃO

O modelo aplicado nesse trabalho compreende um planejamento fatorial completo, incluindo 3 repetições no ponto central e 6 pontos axiais. Os valores estudados estão apresentados na tabela 4 para mineralização.

Tabela 4: Níveis dos fatores do delineamento composto central para mineralização da nimesulida.

Fator	Níveis				
	-1,67	-1	0	+1	+1,67
[H ₂ O ₂] (mg L ⁻¹)	10	15	24	33	55
[NIM](mg L ⁻¹)	5,7	8,5	15	21,5	35,92
tempo (min.)	10	30	45	60	90

Após serem definidas as variáveis, estas foram inseridas no programa gerando de forma aleatória todas as combinações possíveis entre os níveis e variáveis, tabela 5.

Tabela 5: Matriz de planejamento para mineralização da nimesulida.

Experimento	[H ₂ O ₂] (mg L ⁻¹)		[Nim] (mg L ⁻¹)		tempo (min.)	
	Nível	Valor	Nível	Valor	Nível	Valor
1	-	15	-	8,5	-	30
2	-	15	+	21,5	+	60
3	+	33	-	8,5	+	60
4	+	33	+	21,5	-	30
5	0	24	0	15	0	45
6	-	15	-	8,5	+	60
7	-	15	+	21,5	-	30
8	+	33	-	8,5	-	30
9	+	33	+	21,5	+	60
10	0	24	0	15	0	45
11	-1,67	10	0	15	0	45
12	1,67	55	0	15	0	45
13	0	24	-1,67	5,69	0	45
14	0	24	1,67	35,92	0	45
15	0	24	0	15	-1,67	10
16	0	24	0	15	1,67	90
17	0	24	0	15	0	45

Após a obtenção dos resultados o modelo polinomial de segunda ordem foi testado para prever a % de remoção de carbono orgânico total (TOC) através do Estatística e para estudar os efeitos das interações entre as variáveis a resposta em 3D com base no modelo quadrático foram representadas graficamente.

Em seguida a adequação do modelo foi testada por meio da verificação dos resíduos e valores previstos pelo modelo.

3.4 ANALISE DA DEGRADAÇÃO e MINERALIZAÇÃO

3.4.1 CARBONO ORGÂNICO TOTAL, COT.

Carbono orgânico total (COT) é considerado a soma de todos os carbonos ligados a espécies orgânicas dissolvidas ou não. Assim, através da conversão dessas moléculas a CO₂ e suas medidas quantitativas, fornece informações relativos a mineralização dos compostos orgânicos presentes (GOZZI, 2010).

A quantidade de COT foi determinada utilizando analisador de carbono orgânico total da Shimadzu TOC – V CPN. 800µL de amostra são injetados no equipamento ocorrendo a adição de ácido fosfórico determinando-se o carbono inorgânico (CI). Posteriormente é injetado 800µL e é determinado o carbono total (CT) através da combustão da amostra. Para a realização destas análises foram obtidas as seguintes curvas de calibração:

Área = 235,74 + 988,11 [IC], R = 0,9997 e SD = 150,66. Intervalo de 1 mg L⁻¹ a 500 mg L⁻¹.

Área = 469,87 + 948,75 [TC], R = 0,9996 e SD = 174. Intervalo de 1 mg L⁻¹ a 500 mg L⁻¹.

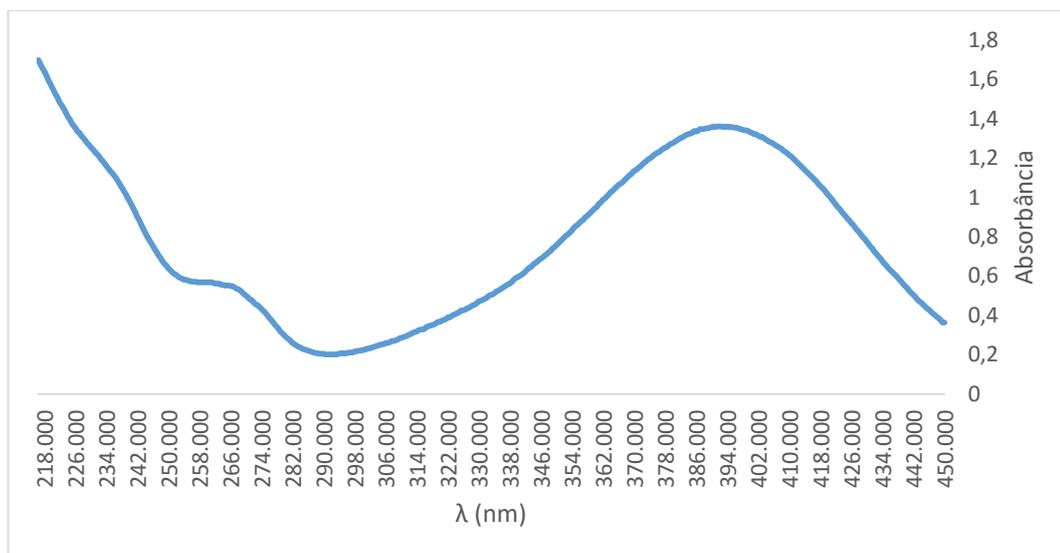
3.4.2 ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

Análises de espectrofotometria de absorção foram efetuadas na região do ultravioleta-visível (de 200 a 850 nm) para amostras de medicamentos e produtos de degradação, em um espectrofotômetro UV-Vis, HITACHI modelo U-3000, usando-se cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico.

Os testes iniciais foram submetidos a esta análise no intervalo de 5 à 50mg L⁻¹ no comprimento de onda igual à 393nm (região de pico máximo em pH=10 conforme figura 11), obtendo-se a seguinte curva de calibração:

Abs = 0,04297 + 0,02949 [Nim], com correlação de R = 0,9995 e SD = 0,0153.

Figura 11- Espectro de absorção da Nimesulida em pH=10



3.4.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

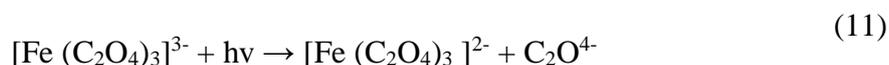
O decaimento na concentração de nimesulida ([Nim]) foi determinado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (equipamento da THERMO SCIENTIFIC), com coluna eclipse XDB C18 (4,6x250mm – partículas de 5 microns), utilizando como fase móvel acetonitrila e água (60:40), vazão de 0,6mL min⁻¹ e detecção em 300nm. Nestas condições determinou-se a curva de calibração no intervalo de concentração de 0,5 a 40 mg L⁻¹.

$$[\text{Nim}] = \text{área} / 345356,43116, \text{ correlação } R = 0,99968 \text{ e } SD = 183224,92.$$

3.5 ACTINOMETRIA

O fluxo de fótons da lâmpada utilizada nos experimentos de degradação foi determinado por actinometria com ferrioxalato de potássio (BRAUN et al., 1991).

Como actinômetro (Ac) escolheu-se ferrioxalato de potássio, uma substância que reage fotoquimicamente com rendimento quântico conhecido ($\Phi_{\text{Ac},\lambda}$). Determinou-se a quantidade de moléculas do actinômetro (Δn_{Ac}) que reagiram durante o tempo de irradiação. A irradiação da solução aquosa de ferrioxalato provoca a redução fotoquímica de Fe³⁺ a Fe²⁺ como mostrado nas Equações 11 e 12:





A quantidade de Fe(II) formada no intervalo de tempo de irradiação ($\Delta n_{\text{Ac}}/\Delta t$) foi determinada espectroscopicamente, medindo-se a absorvância do complexo formado pelo íon Fe^{2+} e 1,10-fenantrolina em 510 nm.

Assim foi preparada uma solução complexante de 1,10-fenantrolina (Sigma-Aldrich) $0,01\text{mol L}^{-1}$ em meio de tampão acetato de sódio $0,5\text{mol L}^{-1}$. Em seguida foi colocado 10mL desta solução em tubos revestidos com papel alumínio.

A solução de ferrioxalato de potássio $0,15\text{mol L}^{-1}$ foi preparada a partir de ácido oxálico (Vetec) e nitrato férrico (Vetec) e transferida para o reator fotoquímico. Uma amostra inicial foi coletada antes de iniciar o processo e a lâmpada foi acionada para iniciar o experimento, realizado sob agitação constante. Amostras foram coletadas a cada 15s durante 10 minutos (CAVALCANTE, 2012).

As amostras coletadas foram adicionadas aos tubos contendo a solução complexante (0,10mL de amostra para 10mL de solução complexante). Os tubos permaneceram em repouso em ambiente escuro por 1 hora e em seguida mediu-se a absorvância do complexo formado, tris(1,10-fenantrolina)- Fe^{2+} ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) em 510 nm. E na equação 13 obtém-se a expressão para cálculo da potência radiante incidente no reator fotoquímico.

$$L_{\text{incidente}} = \frac{\left(\frac{\Delta n_{\text{Ac}}}{\Delta t}\right)_{\text{exp}} \tilde{N}}{\sum \left[\frac{S_{e,\lambda} (1-10^{-A_{c,\lambda}}) \Phi_{A_{c,\lambda}} T_{\lambda}}{E_{f,\lambda}} \right]} = \frac{\left(\frac{\Delta n_{\text{Ac}}}{\Delta t}\right)_{\text{exp}} \tilde{N}}{\sum \left[\frac{S_{e,\lambda} (1-10^{-A_{c,\lambda}}) \Phi_{A_{c,\lambda}} T_{\lambda}}{hc/\lambda} \right]} \quad (13)$$

Onde, $S_{e,\lambda}$ corresponde à potência radiante relativa da lâmpada para cada comprimento de onda λ ; T_{λ} é a transmitância da parede do material em que se insere a lâmpada; $E_{f,\lambda}$ é a energia de um fóton de comprimento de onda (J fóton⁻¹), calculada pela Lei de Planck ($E_{f,\lambda} = hc/\lambda$), sendo h a constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34} \text{Js}^{-1}$) e c é a velocidade da luz ($3,0 \times 10^8 \text{ms}^{-1}$); e \tilde{N} é o número de Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$).

3.6 TESTE DE TOXICIDADE

3.6.1 TESTE PARA DAPHNIA SIMILIS

Os testes de toxicidade para *Daphnia similis* foram realizados segundo a Norma Brasileira 12713:2004 que dispõe sobre toxicidade aguda-método de ensaio com *Daphnia* spp.

O teste consiste em expor os organismos por um certo período de tempo sob várias concentrações da substância de interesse e ao término é registrado a imobilidade dos organismos.

Os testes foram realizados em duplicata (10 indivíduos por réplica) à temperatura de $22\text{ °C} \pm 2$ e fotoperíodo de 16h luz/8h escuro. No final do teste (48 horas) o efeito de imobilidade foi considerado quando os organismos permaneceram imóveis durante 15 segundos após uma leve agitação dos béqueres.

Para tratamento dos resultados foi utilizado o programa Trimmed Spearman-karber Method. Version 1.5 por meio do qual, foi obtido o valor de CL_{50} (concentração que causa letalidade à metade dos organismos teste) para cada teste.

3.6.2 TESTE PARA ARTEMIA SALINA

A metodologia utilizada para os ensaios de toxicidade utilizando *Artemia salina* foi baseado em (MEYER et al.,1982), em (NASCIMENTO et al., 1999) e nas normas da (CETESB-SP, 1991).

Cistos de *Artemia salina* foram incubados durante 24 horas em solução de sal marinho sintético (30g L^{-1}), com aeração e iluminação constantes.

Após a eclosão, os microcrustáceos foram submetidos ao teste. 20 organismos foram colocados em placas de Petri durante 48 horas a 25°C , na ausência de luz, nas concentrações de de fármaco: 50%; 25%; 12,5%; 6,25% e 3,12% sendo o controle negativo (concentração de 0mg L^{-1}) conduzido paralelamente usando apenas solução de sal marinho sintético.

Após 48 horas de incubação, foi analisada a morte dos indivíduos sendo esta considerada, caso os indivíduos não exibissem nenhum movimento durante 20 segundos de observação.

Logo após a contagem dos indivíduos mortos, foi calculada a CL_{50} através do método matemático Trimmed Spearman-Karber (HAMILTON et al., 1977).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXPERIMENTO DE ACTINOMETRIA

A actinometria química é uma medida da taxa de incidência de fótons em um reator fotoquímico de geometria específica. A incidência de fótons emitida pela lâmpada utilizada nos experimentos foi medida através da actinometria de ferrioxalato de potássio descrito previamente na literatura (BRAUN et al., 1991) e o valor determinado por meio da equação 13 para a lâmpada de vapor de mercúrio utilizada neste trabalho foi de $8,035 \cdot 10^{19}$ fotons. s^{-1} .

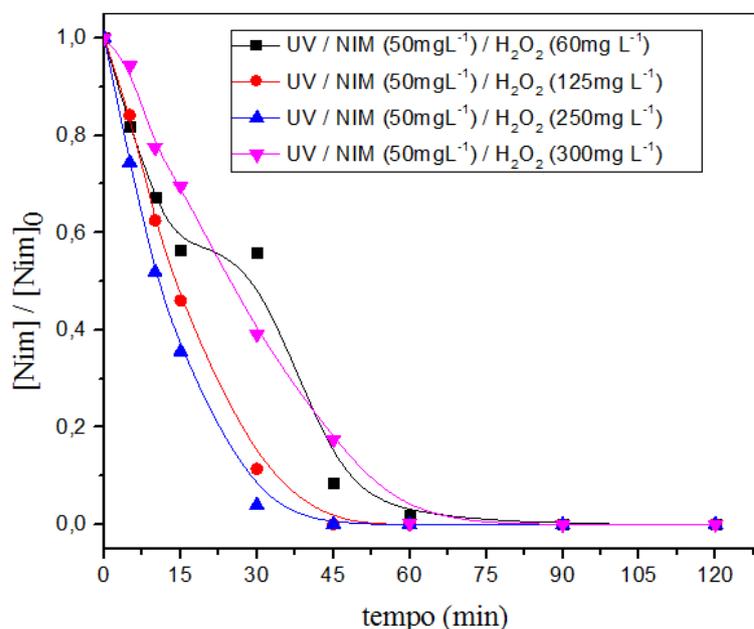
4.2 TESTE INICIAIS

Antes da aplicação do planejamento fatorial realizou-se alguns testes para conhecer o comportamento do fármaco frente ao processo UV/H₂O₂.

4.2.1 DEGRADAÇÃO

Nestes primeiros testes a concentração do fármaco foi mantido em 50mg L⁻¹ variando-se apenas a concentração de H₂O₂ adicionada ao sistema, na figura 12 é apresentado o gráfico de concentração normalizada do fármaco no eixo da ordenada (y) em função do tempo no eixo da abcissa (x).

Figura 12: Gráfico dos testes iniciais de Degradação da Nimesulida.



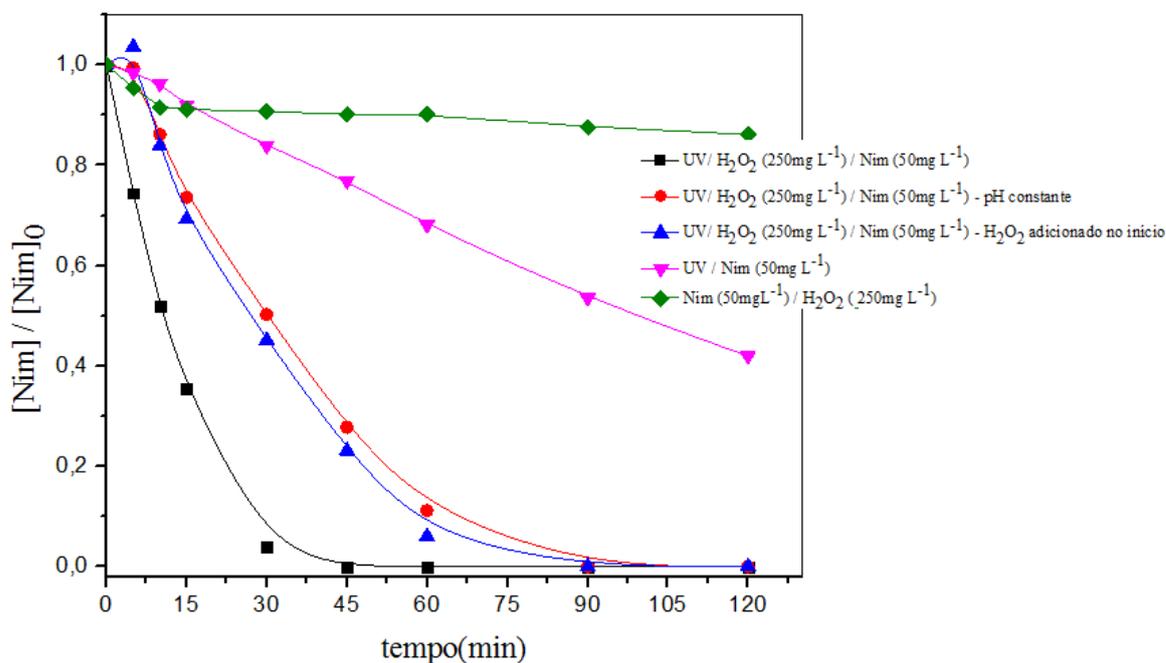
Observando o gráfico de degradação (figura 12) é possível verificar que todas as concentrações de peróxido de hidrogênio utilizado promoveram completa degradação do fármaco.

Com a menor concentração (60 mg L^{-1}) de peróxido de hidrogênio a degradação completa da molécula foi obtida em 60 minutos. Para as concentrações de 125 mg L^{-1} e 250 mg L^{-1} de peróxido de hidrogênio a degradação completa é observada em 50 e 45 minutos respectivamente. Já com a maior concentração de peróxido de hidrogênio testada (300 mg L^{-1}) a degradação completa é observada em torno de 75 minutos, mostrando assim que o aumento na concentração de peróxido de hidrogênio não melhorou o processo e esta evidencia pode ser atribuída a reações de inibição que consumiram radicais hidroxila (equação 5 a 8).

Pelos resultados apresentados no gráfico (figura 12) é possível verificar que a melhor resposta, isto é, a completa degradação em menor tempo (45 minutos) foi obtido com 250 mg L^{-1} de peróxido de hidrogênio, por isso esta concentração foi escolhida para a verificação da influência na forma de adição do peróxido de hidrogênio sobre o processo de degradação. Assim foi realizado um teste em que todo o H_2O_2 foi adicionado ao reator fotoquímico no início do processo de degradação (figura 12).

Na figura 13 é apresentado o gráfico da concentração normalizada do fármaco na ordenada em função do tempo na abcissa, para as degradações mantendo-se o pH constante; adicionando-se H_2O_2 de uma só vez logo no início do processo; fotólise do fármaco; e o branco (só H_2O_2)

Figura 13: Gráfico de Degradação da nimesulida (mantendo pH constante; e adicionando todo H_2O_2 no início do experimento).



Analisando-se o gráfico da figura 13, é possível verificar que o comportamento das curvas correspondente a fotólise e ao processo realizado apenas com H_2O_2 e nimesulida possuem perfis diferentes das demais curvas, nas quais irradiação UV e H_2O_2 foram utilizados em conjunto (figura 13).

Na fotólise foi obtido 50% de degradação após 120 minutos, a degradação realizada apenas com H_2O_2 e fármaco foi obtido 14% de degradação, enquanto que nas degradações em que foi combinado radiação UV com H_2O_2 a degradação foi completa no tempo de 120 minutos (figura 13).

Observa-se no gráfico (figura 13) que para a mesma concentração de nimesulida ($50mg L^{-1}$) e peróxido de hidrogênio ($250mg L^{-1}$), tanto o controle do pH quanto a adição de todo o H_2O_2 logo no início da degradação não contribuíram para melhorar a eficiência na degradação, portanto para os demais experimentos optou-se pela adição em batelada de H_2O_2 e o não controle do pH durante a degradação.

4.2.2 TOXICIDADE PARA DAPHNIA SIMILIS

Nesta etapa foram realizados também testes de toxicidade para o microcrustáceo *Daphnia Similis*, da solução aquosa do fármaco sem degradar ($50mg L^{-1}$), da solução

resultante da fotólise e degradação combinando radiação UV e H₂O₂. Os resultados são apresentados na tabela 6.

Vale ressaltar que os testes de toxicidade foram realizados sem remoção do H₂O₂ residual, assim a toxicidade obtida é devido ao H₂O₂ residual visto que houve completa degradação da nimesulida. Os resultados são expressos em CL₅₀, que é a concentração que causa letalidade a 50% dos organismos teste quando todos os organismos do teste morrem ou quando mais de 90% sobrevivem o cálculo da CL₅₀ não é estimado. Os dados foram calculados pelo programa Trimmed Spearman-karber Method. Version 1.5.

Tabela 6: Resultados do teste de toxicidade para *Daphnia Similis*.

Processo	Nº de Indivíduos	Indivíduos vivos (%)	Valor de CL ₅₀ (%)
UV	120	25	6
H ₂ O ₂	120	0	NC
UV/H ₂ O ₂ (250mg L ⁻¹)	120	77	62,99
UV/H ₂ O ₂ (125mg L ⁻¹)	120	81	64,74
UV/H ₂ O ₂ (60mg L ⁻¹)	120	91	70,71
Nimesulida (50mg L ⁻¹) sem degradar	120	27	7,86

*NC: não calculado pelo programa.

Os ensaios de ecotoxicidade aguda indicam a possibilidade de organismos aquáticos, no caso *Daphnia similis*, morrer em função da presença do fármaco que pode causar toxicidade na amostra testada. É um teste que indica se a solução aquosa em estudo pode causar efeito tóxico letal aos indivíduos nativos.

A CL₅₀ é uma forma de expressar os resultados de ecotoxicidade, quanto maior seu valor menos tóxico é o composto. O valor de LC₅₀ obtido para solução aquosa de nimesulida sem degradar (tabela 6) foi 7,86 isto significa que 7,86% de uma solução de nimesulida a 50mg L⁻¹ é suficiente para causar mortalidade de 50% da população dos organismos de *Daphnia similis*.

De acordo com os resultados experimentais reunidos na tabela 3 observa-se que o processo UV/H₂O₂ (60mg L⁻¹) causou menor número de mortes dos organismos teste, considerando-se que houve apenas 9% de mortalidade dos organismos este pode ser classificado como atóxico (PERSOONE, 2003). É possível observar que a fotólise promoveu maior toxicidade (75% de mortalidade) em relação ao fármaco antes de ser

submetido ao POA (73% de mortalidade), sugerindo assim que os produtos da degradação pelo POA UV/H₂O₂ sejam diferentes dos produtos obtidos a partir da fotólise.

4.3 EXPERIMENTOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL

4.3.1 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL - DEGRADAÇÃO

Buscando as melhores condições para a degradação da nimesulida [NIM] realizou-se o DCC para investigar a degradação da nimesulida.

Por meio do Estatística os valores dos efeitos das variáveis ([H₂O₂]), ([NIM]) e (tempo) e coeficientes de regressão foram calculados, e os dados são apresentados na tabela 7.

Com os dados de coeficientes estimados (tabela 7) é possível propor o modelo polinomial utilizado para correlacionar a variável resposta e as variáveis independentes (equação 14), em que X₁, X₂ e X₃ correspondem as variáveis concentração de peróxido de hidrogênio, concentração de nimesulida e tempo respectivamente.

$$Y = 57,4044 - 13,4543X_3 + 25,2559X_2 + 10,2600X_1X_2 \quad (14)$$

A equação 14 foi construída apenas com os termos estatisticamente significativos obtidos na tabela 7. Observa-se que nenhum dos termos quadráticos contribuem para o modelo, assim a equação pode ser considerada como modelo polinomial de primeira ordem.

O valor de efeito indica o quanto em média o rendimento da degradação varia quando a variável passa de seu nível inferior para o superior. Na tabela 7 o efeito do tempo linear é 51,51 como o valor é positivo indica que a degradação aumenta 51,51% quando o tempo passa de seu nível inferior (5 minutos) para seu nível superior (15 minutos) já o tempo quadrático aumenta apenas 0,0209% a taxa de degradação.

Para [H₂O₂] linear melhora 7,16% a degradação quando passa do nível inferior para o superior, já em [H₂O₂] quadrático diminui a eficiência em 3,31%.

A mudança de nível para a [Nim] linear e quadrática diminui a degradação em 26,9 e 6%, respectivamente.

Tabela7: Efeitos estimados obtidos através do Estatística para variável degradação.

Fator		Efeito	Erro padrão	t (7)	p	Coefficiente Estimado	Erro Padrão	Observação
Intervalo médio		57,4044	6,557769	8,75364	0,000051	57,4044	6,557769	Significativo
(1) [H ₂ O ₂] (mg L ⁻¹)	(L)	7,1638	6,159168	1,16311	0,282895	3,5819	3,079584	Não significativo
	(Q)	-3,3166	6,779062	-0,48925	0,639623	-1,6583	3,389531	Não significativo
(2) [Nim] (mg L ⁻¹)	(L)	-26,9086	6,159168	-4,36886	0,003279	-13,4543	3,079584	Significativo
	(Q)	-6,0072	6,779062	-0,88614	0,404956	-3,0036	3,389531	Não significativo
(3) tempo (min)	(L)	50,5117	6,159168	8,20106	0,000078	25,2559	3,079584	Significativo
	(Q)	0,0209	6,779062	0,00308	0,997626	0,0105	3,389531	Não significativo
1by 2	(L)	20,5200	8,047340	2,54991	0,038109	10,2600	4,023670	Significativo
1by 3	(L)	10,4850	8,047340	1,30291	0,233824	5,2425	4,023670	Não significativo
2by 3	(L)	0,0650	8,047340	0,00808	0,993781	0,0325	4,023670	Não significativo

Os valores de efeito não podem ser interpretados individualmente, pois como é sabido as variáveis interagem entre si, assim é necessário avaliar o efeito da interação entre as variáveis.

Na tabela 7 é apresentado o efeito das interações entre as variáveis. Observa-se que a única interação estatisticamente significativa é entre $[H_2O_2]$ e $[Nim]$ linear (1by2 na tabela 7) possivelmente pelos radicais hidroxilas formados na fotólise e que promovem maior taxa de degradação da nimesulida. Quando estas variáveis passam de seu nível inferior para o superior a interação entre elas contribui 20,52% para degradação. Observa-se que mesmo o fator $[H_2O_2]$ não sendo considerado estatisticamente significativo (pelo teste t) sua interação com a nimesulida é considerada significativa como apresentado na tabela.

O teste de significância e adequação do modelo é feito por análise de variância (ANOVA). O ANOVA subdivide a variação total dos resultados em dois componentes, a variação associada ao modelo e a variação associada ao erro experimental, mostrando se a variação do modelo é o não significativo quando comparado com as variações que estão associadas ao erro residual.

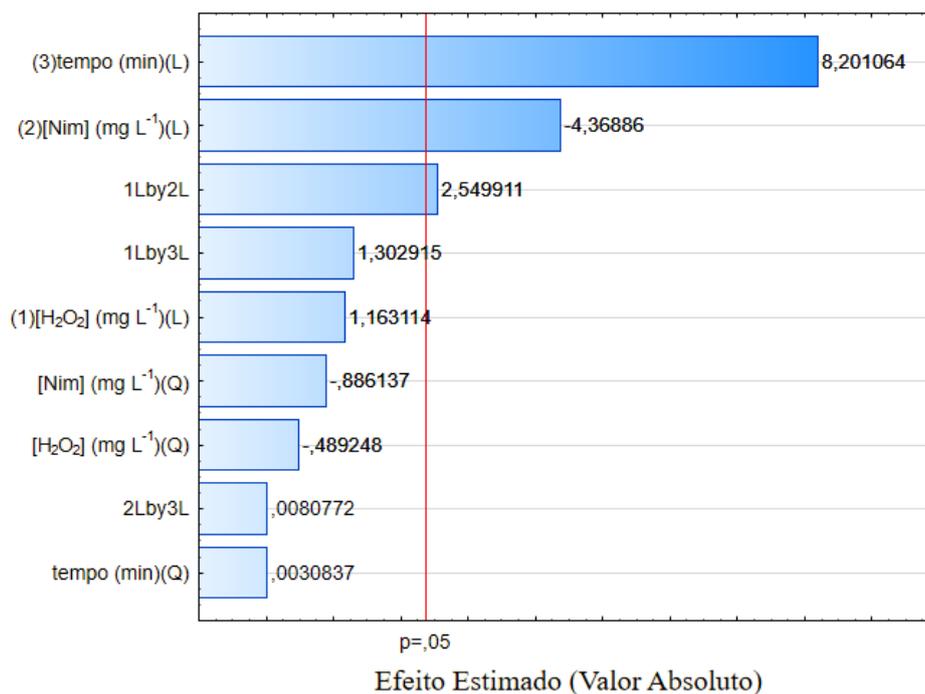
Esta comparação é realizada pelo valor-t, que é a relação entre a média quadrática do modelo e o erro residual. O valor-t deve ser maior que o valor-t tabelado para um certo número de graus de liberdade do modelo.

Observando-se os valores de t na tabela 7 é possível verificar que $[H_2O_2]$, tempo e a interação entre $[H_2O_2]$ e $[Nim]$ possuem valores maiores que t tabelado (2,355 com limite de 95% de confiança), assim estes parâmetros são os mais influentes na degradação da nimesulida.

O diagrama de Pareto é uma forma rápida e clara de apresentar os efeitos que são estatisticamente importantes. Na figura 14 o Pareto para a degradação da nimesulida é apresentado, na ordenada são apresentadas as variáveis e as interações entre elas e na abcissa é apresentado o valor de efeito. Os efeitos cujos histogramas estiverem à direita da linha divisória ($p = 0,05$) devem ser considerados no modelo matemático.

Como é possível verificar no gráfico de Pareto (figura 14) a interação entre as variáveis 2 e 3 não é estatisticamente significativa.

Figura 14: Diagrama de Pareto para Degradação da Nimesulida.



Na verificação de adequação do modelo, o coeficiente de determinação (R^2) avalia quantitativamente a correlação entre os dados experimentais e as respostas prevista pelo modelo (equação 14).

Os resultados experimentais e os valores previstos pelo modelo são relatados na tabela 8 e os coeficientes de determinação ajustado pelo modelo é 0,84868 sendo considerado razoavelmente bom em comparação com os dados experimentais ($R = 0,9338$).

O de R^2 obtido pelo modelo indica que cerca de 93% das variações na eficiência da degradação podem ser explicadas pelo modelo. Isto implica que 93% das variações na eficiência da degradação são explicadas pelas variáveis independentes escolhidas e o modelo não explica 7% das variações.

Tabela 8: Valores previstos e observados para DCC da degradação da nimesulida.

Experimento	[H ₂ O ₂] (mg L ⁻¹)		[NIM] (mg L ⁻¹)		tempo (min.)		% Degradação	
	Nível	Valor	Nível	Valor	Nível	Valor	Observado	Previsto
1	-	15	-	8,5	-	5	56,41	53,01
2	-	15	+	21,5	+	15	54,88	45,61
3	+	33	-	8,5	+	15	82,03	90,10
4	+	33	+	21,5	-	5	18,33	22,72
5	0	24	0	15	0	10	54,75	52,91
6	-	15	-	8,5	+	15	97,71	92,97
7	-	15	+	21,5	-	5	13,94	5,52
8	+	33	-	8,5	-	5	20,25	29,17
9	+	33	+	21,5	+	15	80,73	83,78
10	0	24	0	15	0	10	54,02	52,91
11	-1,68	10	0	15	0	10	31,35	46,58
12	1,68	55	0	15	0	10	73,28	58,58
13	0	24	-1,68	5,69	0	10	76,82	71,37
14	0	24	1,68	35,92	0	10	20,2	26,16
15	0	24	0	15	-1,68	3	15,86	14,84
16	0	24	0	15	1,68	25	98,21	99,70
17	0	24	0	15	0	10	55,9	52,912

Os valores experimentais e valores previstos apresentados na tabela 8 apresentam concordância razoavelmente boa validando assim o modelo matemático. Graficamente estes resultados são apresentados na figura 15a, em que é apresentado os valores previstos no eixo da ordenada em função dos valores observados experimentalmente no eixo da abcissa.

Os resíduos (resposta observada e os valores de resposta prevista) são elementos de variação não explicado pelo modelo, e portanto, espera-se que eles ocorram com uma distribuição normal.

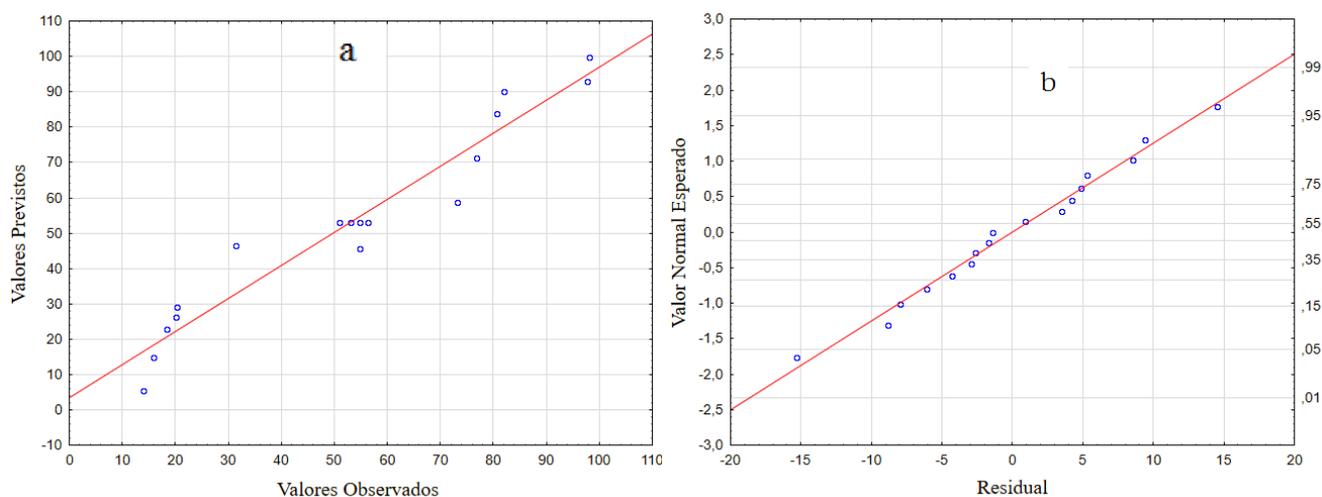
Probabilidade normal é um método gráfico adequado para avaliar a normalidade dos resíduos. Os resíduos são traçados contra o valores esperados (figura 15b). Para uma dada distribuição normal dos resíduos o gráfico deve seguir aproximadamente uma linha reta (KASIRI e KHATAEE, 2010).

A tendência observada na figura 15b revela um comportamento razoavelmente adequado para o modelo proposto.

Quanto mais próximos os pontos experimentais estiverem da linha contínua, mais válida será a suposição de normalidade dos resíduos, ou seja, normalidade dos erros. Se os erros forem distribuídos normalmente, então 95% dos resíduos cairão no intervalo -2 a $+2$ do valor normal esperado (CALADO e MONTGOMERY, 2003).

Observando-se os pontos da figura 14 b verifica-se que não há pontos muito distante da reta, e que os pontos estão no limite de -2 a $+2$, assim sendo não há evidencias de ausência de normalidade dos resíduos, podendo então considerar-se que as pressuposições do modelo estão satisfeitas.

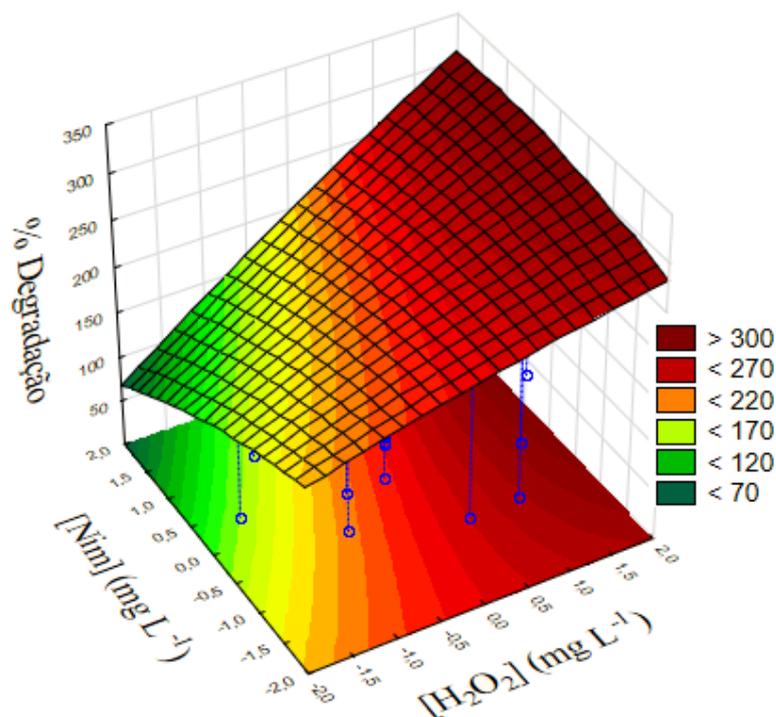
Figura 15: (a) gráfico valores previstos pelo modelo teórico em função do valor real observado (b) gráfico de probabilidade normal dos resíduos.



A superfície de resposta (figura 16) obtida a partir do modelo proposto, que é uma relação feita entre a variável dependente e as independentes e obtém-se uma tendência do comportamento do sistema (figura 16).

Trata-se de um gráfico tridimensional com os eixos, porcentagem (%) de degradação (variável resposta) em função das variáveis independentes, que na figura 15 são tempo $[H_2O_2]$ e $[Nim]$.

Figura 16: superfície de resposta prevista para a interação entre as variáveis $[H_2O_2]$ e $[Nim]$.



O gráfico figura 16 foi gerado fixando o tempo em 10 minutos. A MSR permite prever a resposta em função das variáveis independentes. Observa-se que no nível superior da variável H_2O_2 a degradação completa é obtida em todo o intervalo de $[Nim]$ estudado, já no limite inferior de $[H_2O_2]$ a taxa de degradação é limitada pela $[Nim]$. Este efeito pode ser explicado pela absorção de radiação UV pelas moléculas de nimesulida (filtro interno), assim a permeabilidade da luz se tornou menor em maiores $[Nim]$ e conseqüentemente diminuição na formação de radicais hidroxila que é a principal espécie responsável pela degradação da nimesulida.

4.3.2 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL – MINERALIZAÇÃO

O DCC foi realizado também para investigar a taxa de remoção de carbono orgânico total (COT)

Os resultados de mineralização obtidos são apresentados na tabela 9, e possuem boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo.

Tabela 9: Resultados do delineamento composto central – Mineralização.

Experimento	[H ₂ O ₂] (mgL ⁻¹)	[NIM] (mgL ⁻¹)	tempo (min.)	Mineralização %	
				Observado	Previsto
1	-	-	-	51,92	56,0807
2	-	+	+	81,41	80,9558
3	+	-	+	18,01	20,7020
4	+	+	-	16,48	16,0281
5	0	0	0	55,01	55,3568
6	-	-	+	57,41	64,0499
7	-	+	-	24,82	28,3316
8	+	-	-	3,86	10,5195
9	+	+	+	68,84	70,8656
10	0	0	0	51,77	55,3568
11	-1,67	0	0	33,42	66,6712
12	1,67	0	0	60	42,983
13	0	-1,67	0	47,75	36,5103
14	0	1,67	0	18,8	18,762
15	0	0	-1,67	26,44	5,4552
16	0	0	1,67	81,19	80,5352
17	0	0	0	55,63	55,3568

O modelo quadrático desenvolvido foi utilizado para estimar os parâmetros que indicam uma relação empírica entre as variáveis independentes e a variável resposta, o modelo proposto considerando apenas os termos significativos é dado na equação 12.

$$Y = 59,19011 - 3,80697X_1 + 17,98418X_3 + 3,83958X_1X_2 + 11,80625X_2X_3 - (1,33009)^2X_1 - (4,61092)^2X_2 - (3,00600)^2X_3 \quad (12)$$

O modelo quadrático para prever a % de remoção de COT foi testado através de análise de variância (ANOVA), os resultados são mostrados na tabela 10.

Tabela 10: Efeitos estimados obtidos através do Estatística para variável mineralização.

Fator		Efeito	Erro padrão	t (7)	p	Coefficiente Estimado	Erro Padrão	Observação
Intervalo médio		59,19011	2,703086	21,89724	0,000000	59,19011	2,703086	Significativo
(1) [H ₂ O ₂] (mg L ⁻¹)	(L)	-7,61393	2,251178	-3,38220	0,011723	-3,80697	1,125589	Significativo
	(Q)	-2,66018	1,052551	-2,52737	0,039384	-1,33009	0,526276	Significativo
(2) [Nim] (mg L ⁻¹)	(L)	1,27233	4,329936	0,29384	0,777398	0,63616	2,164968	Não significativo
	(Q)	-9,22184	1,784654	-5,16730	0,001299	-4,61092	0,892327	Significativo
(3) tempo (min)	(L)	35,96836	4,165828	8,63414	0,000056	17,98418	2,082914	Significativo
	(Q)	-6,01200	1,417338	-4,24176	0,003832	-3,00600	0,708669	Significativo
1by 2	(L)	7,67917	2,234999	3,43587	0,010898	3,83958	1,117500	Significativo
1by 3	(L)	-0,08740	2,234999	-0,03911	0,969898	-0,04370	1,117500	Não significativo
2by 3	(L)	23,61250	4,467512	5,28538	0,001141	11,80625	2,233756	Significativo

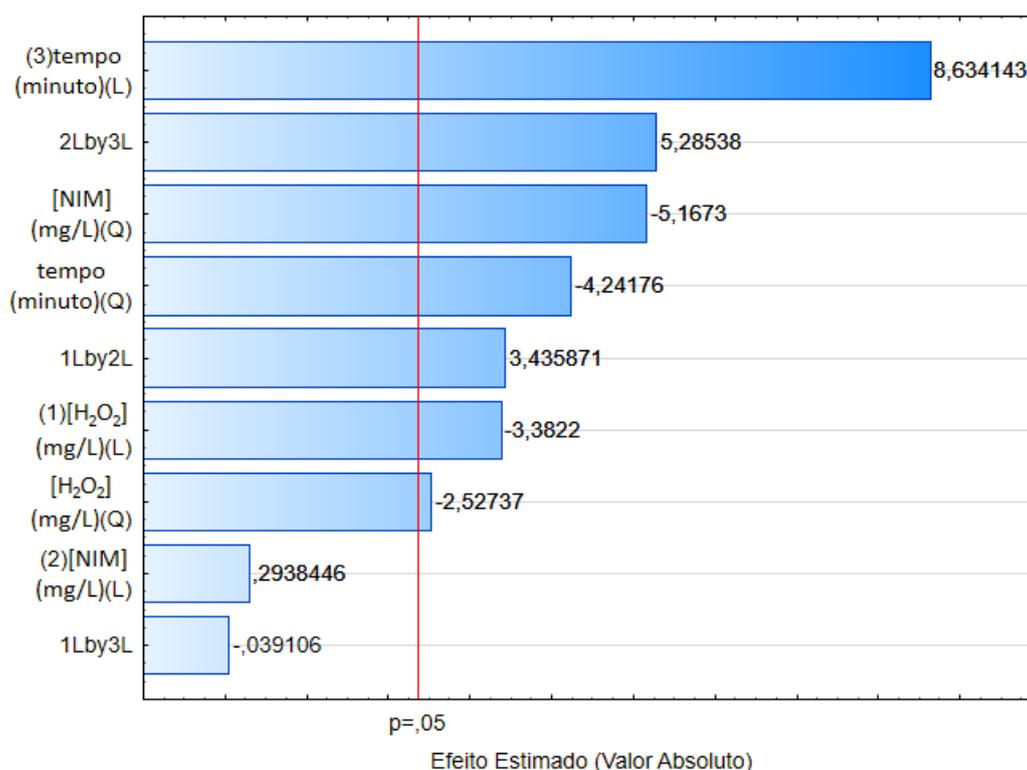
Como mostra os valores reunidos na tabela 10, um pequeno valor de probabilidade ($p < 0,0001$) indicam que o modelo foi altamente significativo.

De forma rápida e clara o Pareto (figura 17) apresenta as variáveis que foram estatisticamente significativas para a mineralização da NIM, no eixo da ordenada são apresentadas as variáveis em termos lineares e quadráticos e, as interações entre as variáveis também em termos lineares e quadráticos. No eixo da abcissa é apresentado o valor de efeito. Os efeitos cujos histogramas estiverem à direita da linha divisória ($p = 0,05$) devem ser considerados no modelo matemático pois são estatisticamente significativos.

Observa-se que todas as variáveis e interações em termos lineares e quadráticos são estatisticamente significativas exceto a variável [NIM] linear e a interação entre tempo e [H₂O₂] e, portanto, estes valores podem ser excluídos no modelo quadrático.

Ainda para os dados da tabela 10 observa-se que as variáveis que não foram significativas apresentam valores de desvio padrão maiores que o valor do efeito, ressaltando que estes valores não são confiáveis.

Figura 17: Gráfico de Pareto para a Mineralização

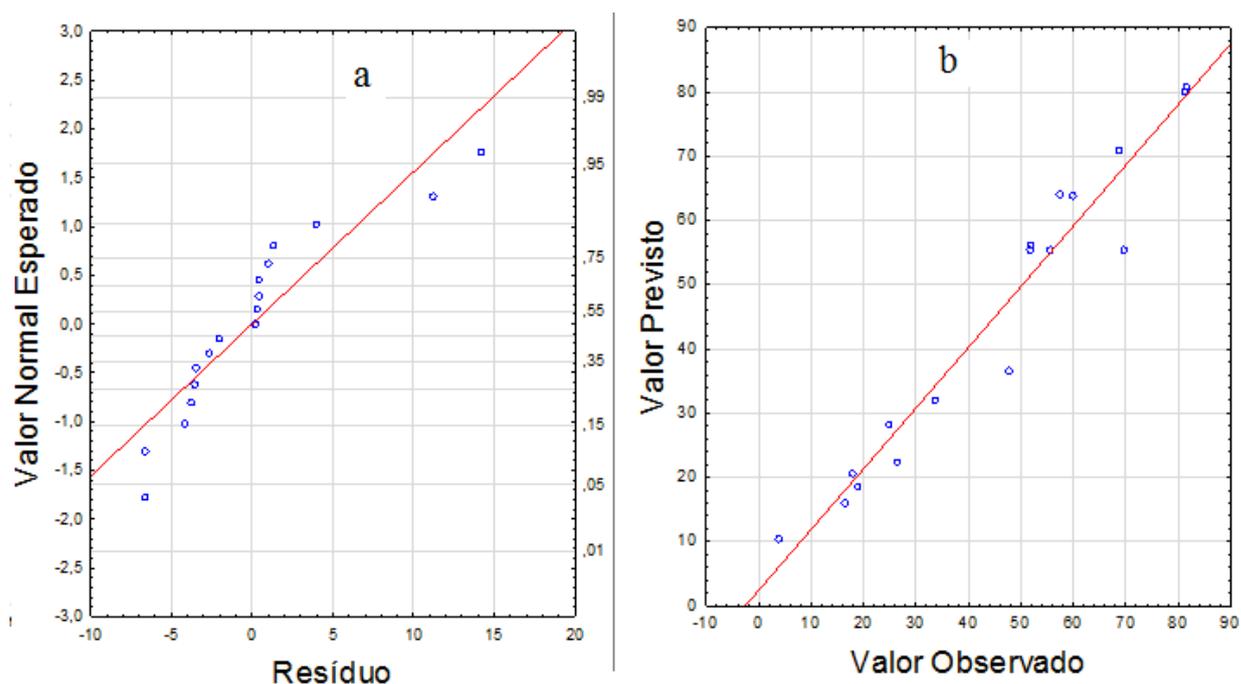


Em um modelo com precisão adequada é possível medir o intervalo de resposta prevista em relação ao seu erro associado (ou seja, a relação sinal ruído), por meio do software foram gerados o gráfico normal de resíduo em função dos valores esperados para a mineralização da nimesulida (figura 18a) e o gráfico relacionando os valores obtidos experimentalmente em função dos valores calculados pelo modelo (figura 18b).

Observando os gráficos nota-se que embora alguns pontos estejam mais distantes da linha contínua, os dados têm uma boa concordância entre os resultados experimentais e os resultados teóricos (figura 18b).

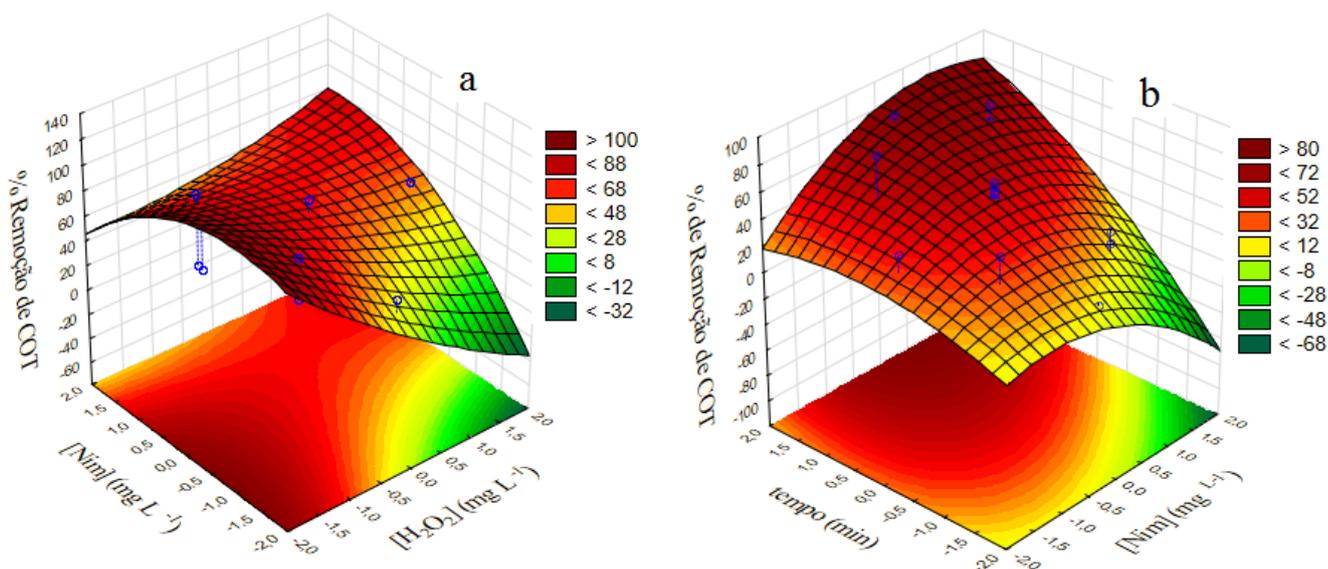
O coeficiente de determinação apresentam boa concordância entre o experimental ($R^2 = 0,9761$) e ajustado pelo modelo (0,9335).

Figura 18: (a) gráfico normal de resíduos e (b) valores previstos versus valores observados para mineralização da nimesulida.



De modo a estudar os efeitos de interação entre as variáveis, a resposta em 3D, com base no modelo quadrático foram representados graficamente (figura 19).

Figura 19: (a) e (b) Superfícies de respostas para a mineralização da nimesulida.



A na figura 19a, a resposta foi plotada em função [Nim] e [H₂O₂] mantendo-se o tempo constante 45 em minutos. Já na figura 19b, [H₂O₂] foi mantido constante em 24mg L⁻¹ e a resposta é dada em função do tempo e [Nim]. As regiões de cores mais intensas indicam maior taxa de remoção de COT.

A medida que o tempo de vida dos radicais hidroxila é curta eles só reagem onde estão sendo formados, assim aumentando o nível de [Nim] aumenta também a probabilidade de colisão entre o composto orgânico e as espécies oxidantes levando a um aumento na % de remoção de COT. Este efeito pode ser observado na figura 19a, onde no nível inferior de [H₂O₂] a taxa de mineralização aumenta conforme aumenta a [Nim].

Por outro lado, no nível superior de [Nim], verifica-se que a % de remoção de COT diminui (figura 19a).

O efeito de menor remoção de COT na concentração superior do fármaco pode ser atribuído à absorção de radiação UV por moléculas de nimesulida na região de 300 a 390nm, produzindo um efeito conhecido como filtro interno, assim a permeabilidade da luz se torna menor em concentrações maiores de nimesulida (GHAFORI et al., 2012).

O efeito de filtro interno resulta na redução de absorção de radiação UV pelo H₂O₂ e, conseqüentemente, menor formação de radicais hidroxilas, que é a principal espécie responsável pela decomposição da nimesulida.

O aumento na concentração de H_2O_2 resulta em melhoria na resposta até uma concentração ótima de H_2O_2 e após esta concentração ótima a % de mineralização tende a diminuir, devido ao excesso de H_2O_2 que promove reações competitivas que consomem os radicais hidroxila. O efeito mais pronunciado desta inibição é observado no nível superior de $[H_2O_2]$ para o nível inferior de $[Nim]$ (figura 18a).

Os valores ótimos obtidos para remoção de COT obtendo-se 66,24% de remoção de COT foram de $0,58450 \text{ mg L}^{-1}$ de H_2O_2 , $6,75715 \text{ mg L}^{-1}$ em 20 minutos.

Na figura 19b a porcentagem (%) de mineralização é dada em função do tempo e $[Nim]$. Observa-se que o tempo é um fator importante na taxa de mineralização, pois tanto no nível inferior quanto superior da variável $[Nim]$ o maior nível de tempo é requerido para obtenção de mineralização.

A este efeito pode ser atribuído o fato de que conforme aumenta o tempo mais radicais hidroxila (HO^*) são formados, principal espécie responsável pela remoção de COT.

Verifica-se que a concentração de H_2O_2 é estatisticamente significativa para mineralização, mas não para degradação, este efeito pode ser devido a molécula de nimesulida ser afetada pela radiação UV que promove degradação significativa mas não é suficiente para mineralizá-la, já os radicais hidroxila são importantes na remoção de carbono orgânico não removido na degradação.

4.4 TESTE DE TOXICIDADE PARA ARTEMIA SALINA

Após a realização e execução dos experimentos do planejamento fatorial as soluções do fármaco tratado pelo POA e não tratado foram submetidas a novos testes de toxicidade, agora com o organismo *Artemia salina*, assim como a *Daphnia*, a *Artemia* também é microcrustáceo mas de água salgada. Os testes realizados foram com a solução aquosa resultante da fotólise, solução aquosa do fármaco antes de ser submetido ao tratamento por POA e a solução de nimesulida ($8,5 \text{ mg L}^{-1}$) após 120 minutos de tratamento com UV/ H_2O_2 (15 mg L^{-1}). Os resultados são apresentados na tabela 11, é importante ressaltar que os testes foram realizados sem a remoção do H_2O_2 residual, assim os resultados apresentam a toxicidade da solução do fármaco mais H_2O_2 residual.

Tabela 11: Teste de toxicidade para *Artemia salina*.

Processo	Nº de Indivíduos	Indivíduos vivos (%)	Valor de CL ₅₀ (%)
UV	100	61	37,89
H ₂ O ₂	100	0	NC
UV/H ₂ O ₂	100	96	NC
Solução sem degradar	100	51	14,48

*NC= não calculado

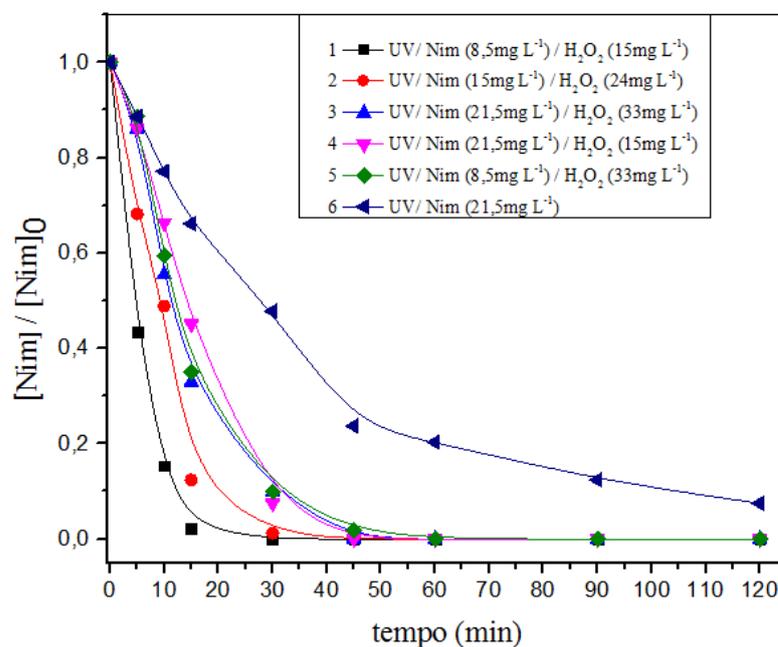
Quanto menor o valor da CL₅₀ mais tóxico é o composto, assim observando-se a tabela12, é possível dizer que o tratamento com peróxido de hidrogênio é o mais tóxico pois todos os organismos do teste morreram não sendo possível estimar o valor de CL₅₀. Em seguida a solução antes de ser submetida ao POA apresenta menor valor de CL₅₀ seguida pelo processo de fotólise. Já o tratamento UV/H₂O₂ apresenta diminuição significativa no número de morte dos organismos (4% de mortalidade), sugerindo assim que os produtos da degradação da nimesulida são menos tóxicos que na presença da molécula sem tratamento.

4.5 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO

Como esperado a nimesulida foi oxidada pelos radicais hidroxila e/ou oxidantes gerados a partir da quebra de H₂O₂. O consumo de nimesulida foi acompanhado por CLAE e a figura 20 apresenta esse decaimento normalizado da [Nim] no eixo da ordenada (y) em função do tempo na abcissa (x).

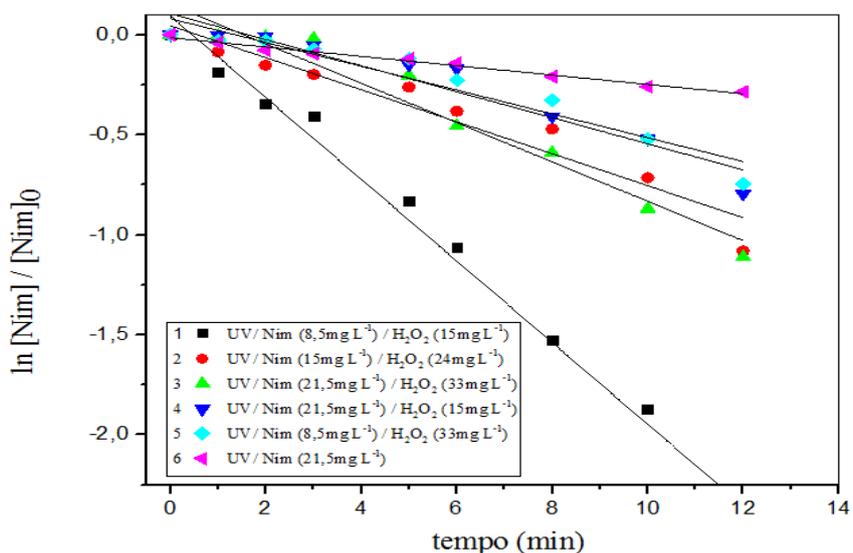
Pelo gráfico da figura 20 observa-se que foi obtido total degradação da nimesulida nos processos utilizando UV/H₂O₂. A curva que apresenta 100% de degradação em menor tempo de reação (15 minutos) é resultante da combinação das menores concentrações de nimesulida (8,5mg L⁻¹) e peróxido de hidrogênio (15mg L⁻¹) testados (curva 1), enquanto que na curva 4 foram utilizados 21,5mg L⁻¹ de nimesulida para a mesma concentração de peróxido de hidrogênio (15mg L⁻¹) e a degradação completa foi observada em 45 minutos, já a fotólise apresentou 90% de degradação com 21,5mg L⁻¹ de nimesulida em 120 minutos.

Figura 20: Gráfico de degradação da nimesulida para diferentes concentrações de fármaco e peróxido de hidrogênio.



Para os minutos iniciais dos processos testados, os resultados de decaimento da concentração em relação ao tempo obtidos por CLAE permitiram a determinação de constantes cinéticas de pseudo-primeira ordem (tabela 13) gerados a partir da relação entre o logaritmo natural da razão da concentração em determinado tempo pela concentração inicial no eixo da ordenada (y) em função do tempo no eixo da abcissa (x) apresentados na figura 21.

Figura 21: Gráfico da cinética de degradação da nimesulida em diferentes concentrações de fármaco e peróxido de hidrogênio.



Com os fatores de correlação em índices confiáveis (tabela 13) e aceitando a extrapolação de que a quantidade de radicais hidroxila no meio reacional não é o fator limitante, os valores de k revelam o experimento 1 como o mais rápido ($k = 0,0577\text{min}^{-1}$) seguido dos experimentos 2, 3, 5 e 4 respectivamente, e a fotólise como o experimento mais lento ($k = 0,0103\text{min}^{-1}$) cerca de 5 vezes em relação ao experimento mais rápido (experimento 1).

Tabela 12: Resultados obtidos para cinética de degradação da nimesulida.

Experimento	[H ₂ O ₂] (x10 ⁻⁵ mgL ⁻¹)	[NIM] (mgL ⁻¹)	Constante cinética k (min ⁻¹)	R
1	15	8,5	0,0577	0,9935
2	24	15	0,0522	0,9667
3	33	21,5	0,0511	0,9618
4	15	21,5	0,0336	0,9528
5	33	8,5	0,0415	0,9623
6 (fotólise)	-	21,5	0,0103	0,9763

5. CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que o emprego do tratamento UV/H₂O₂ para remoção do anti-inflamatório nimesulida foi satisfatório obtendo-se 100 % de degradação do fármaco em cerca de 15 minutos e 81,19% de remoção do carbono orgânico total em 100 minutos.

O planejamento fatorial proporcionou análise das variáveis, concluindo-se que tempo, concentração do fármaco e concentração de peróxido de hidrogênio são estatisticamente significativas no processo de degradação e mineralização da nimesulida.

O delineamento composto central permitiu prever o comportamento da resposta em função das variáveis estudadas, com boa adequação do modelo proposto com altos valor de coeficiente de determinação ($R = 0,976$ e R ajustado = $0,9335$) para mineralização, garantindo assim um modelo satisfatório para remoção de COT da nimesulida.

O tratamento da nimesulida com UV/H₂O₂ proporcionou diminuição significativa da toxicidade tanto para *Daphnia similis* quanto para *Artemia Salina*.

Em relação ao DCC foi possível verificar a região de máxima remoção de COT na superfície de resposta, obtendo-se 66,24% de remoção de COT foram de $0,58450 \text{ mg L}^{-1}$ de H₂O₂, $6,75715 \text{ mg L}^{-1}$ em 20 minutos, no entanto as melhores condições de degradação não foram otimizadas visto que esta é afetada fortemente pela radiação UV.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A EUROMONEY INSTITUTIONAL INVESTOR COMPANY (Brasil) (Org.). **Pharmaceutical Sector Brazil**. 2014. Disponível em: <http://www.securities.com/emis/sites/default/files/EMIS_Insight_-_Brazil_Pharmaceutical_Sector.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2016.

A SAMAD, Tarek; SAPIRSTEIN, Adam; WOOLF, Clifford J. Prostanoids and pain: unraveling mechanisms and revealing therapeutic targets. **Trends in Molecular Medicine**, [s.l.], v. 8, n. 8, p.390-396. 2002.

AITHAL, P G; DAY, C P. The natural history of histologically proved drug induced liver disease. **Gut**, [s.l.], v. 44, n. 5, p.731-735, 1999.

ARAUJO, Marcio Antonio Rodrigues. Hepatotoxicidade associada à nimesulida: uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Farmácia**, São Luís, v. 3, n. 93, p.283-289, jul. 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12.713: Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda** – método de ensaio com *Daphnia* spp. (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro, 2009. 21 p.

BARRON, Leon., PURCELL, Martha., HAVEL, Josef., THOMAS, Kevin., TOBIN, John e PAULL, Brett.; Occurrence and Fate of Pharmaceuticals and Personal Care Products within Sewage Sludge and Sludge-Enriched Soils. **Environmental Protection Agency**, Irlanda, n. 34, 2009.

BARROS NETO, Benício de; SCARMINIO, Ieda Spacino; BRUNS, Roy Edward. **Como Fazer Experimentos**. 4. ed. Porto Alegre, Rs: Bookman, 2010. 413 p.

BRASIL. **Resolução CONAMA N° 357, de 17/03/2005**. Brasília, 2005.

BRASIL. **Resolução CONAMA N° 454, de 01/11/2012**. Brasília, 2012.

CALADO, Verônica; MONTGOMERY, Douglas C.. **Planejamento de Experimentos usando o Statistica**. Rio de Janeiro, Rj: E-papers, 2003. 260 p.

CANDIOTI, Luciana Vera et al. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, [s.l.], v. 124, p.123-138, jun. 2014

CAVALCANTE, Rodrigo Pereira et al. Synthesis and characterization of B-doped TiO₂ and their performance for the degradation of metoprolol. **Catalysis Today**, [s.l.], v. 252, p.27-34, set. 2015.

CESAR, Augusto; SILVA, Sérgio Luíz Rodrigues da; SANTOS, Aldo Ramos. TESTES DE TOXICIDADE AQUÁTICA NO CONTROLE DA POLUIÇÃO. **Universidade de Santo Cecília**, Santos Sp, 4 ed. 1997.

CETESB. São Paulo (1991). Água do Mar – Teste de Toxicidade Aguda com Artemia. **Norma Técnica L5.021**, São Paulo.

Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Resolução nº430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as Condições e Padrões de Lançamento de Efluentes. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646> Acesso em 24 de fevereiro de 2015.

GHAFOORI, Samira; MEHRVAR, Mehrab; CHAN, Philip K.. Free-Radical-Induced Degradation of Aqueous Polyethylene Oxide by UV/H₂O₂: Experimental Design, Reaction Mechanisms, and Kinetic Modeling. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, [s.l.], v. 51, n. 46, p.14980-14993, 21 nov. 2012.

GHALY, Montaser Y. et al. Photochemical oxidation of p-chlorophenol by UV/H₂O₂ and photo-Fenton process. A comparative study. **Waste Management**, [s.l.], v. 21, n. 1, p.41-47, jan. 2001

GOZZI, Fábio et al. Investigation of chlorimuron-ethyl degradation by Fenton, photo-Fenton and ozonation processes. **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 210, p.444-450, nov. 2012

GOZZI, Fábio. **Estudo Da Degradação do Herbicida Clorimurum Etilico a Partir de Processos Fenton, Foto-Fenton, O₃, O₃:Luz E O₃:Luz:H₂O₂**. 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2010.

HAMILTON, Martin A.. Statistical analysis of the cladoceran reproductivity test. **Environmental Toxicology And Chemistry**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.205-212, fev. 1986.

HEMMATEENEJAD, Bahram; JAVIDNIA, Katayoun; SAEIDI-BOROUJENI, Mehdi. Spectrophotometric monitoring of nimesulide photodegradation by a combined hard-soft multivariate curve resolution-alternative least square method. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 47, n. 3, p.625-630, jul. 2008.

HUANG, C.p.; DONG, Chengdi; TANG, Zhonghung. Advanced chemical oxidation: Its present role and potential future in hazardous waste treatment. **Waste Management**, [s.l.], v. 13, n. 5-7, p.361-377, jan. 1993.

KASIRI, M.b.; KHATAEE, A.r.. Photooxidative decolorization of two organic dyes with different chemical structures by UV/H₂O₂ process: Experimental design. **Desalination**, [s.l.], v. 270, n. 1-3, p.151-159, abr. 2011.

KHAN, S. Nimesulide and adverse drug reactions: Time for a database. **Journal Of Postgraduate Medicine**, [s.l.], v. 54, n. 3, p.242-242, 2008. Medknow. DOI: 10.4103/0022-3859

KOVAŘDĀKOVÁ, Petra; MOKRÝ, Milan; KLIMEĽ, Jiří. Photochemical stability of nimesulide. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 31, n. 4, p.827-832, mar. 2003.

LEGRINI, O.; OLIVEROS, E.; BRAUN, A. M.. Photochemical processes for water treatment. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 93, n. 2, p.671-698, mar. 1993.

LICATA, A. et al. Clinical course and outcomes of drug-induced liver injury: Nimesulide as the first implicated medication. **Digestive And Liver Disease**, [s.l.], v. 42, n. 2, p.143-148, fev. 2010.

MANSILLA, H et al. Homogeneous and heterogeneous advanced oxidation of a bleaching effluent from the pulp and paper industry. **Water Science And Technology**, [s.l.], v. 35, n. 4, p.273-278, 1997.

MESARIĀ, Tina et al. High surface adsorption properties of carbon-based nanomaterials are responsible for mortality, swimming inhibition, and biochemical responses in *Artemia salina* larvae. **Aquatic Toxicology**, [s.l.], v. 163, p.121-129, jun. 2015.

MOMPELAT, S.; BOT, B. Le; THOMAS, O.. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. **Environment International**, [s.l.], v. 35, n. 5, p.803-814, jul. 2009

NIEDJA M. G. C. Grangeiro, HELLĀDA V. Chaves, A. ALFREDO R. Silva, J. RONALDO V. Graça, VILMA Lima e MIRNA M. Bezerra. Enzimas Ciclooxygenases 1 e 2: Inflamaçāo e GastroCardio proteçāo. **Pesquisa Mēdica**, Cearā, v. 2, n. 3, p.13-20, 2008.

PERĀZIO, Brāulia Aparecida de Almeida. **Efeitos dos Pontos Axiais e Centrais Sobre a Eficiēncia do Delineamento Composto Central**. 2010. 68 f. Dissertaçāo

(Mestrado) - Curso de Magister Scientiae, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

PEREIRA, Airton Vicente et al. Determinação da constante de dissociação (K_a) do captopril e da nimesulida: experimentos de química analítica para o curso de farmácia. **Química Nova**, [s.l.], v. 34, n. 9, p.1656-1660, 2011.

PIEL, G. et al. Study of the Influence of Both Cyclodextrins and L-Lysine on the Aqueous Solubility of Nimesulide; Isolation and Characterization of Nimesulide–L-Lysine–Cyclodextrin Complexes. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 86, n. 4, p.475-480, 1997.

RAND, G. M. ; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Washington, 1985. 665 p.

RODRIGUES, Maria Isabel; LEMMA, Antonio Francisco. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**: Uma estratégia sequencial de planejamentos. 2. ed. Campinas, SP: Casa do Pão, 2005. 326 p.

SAKATA, Rioko Kimiko; ISSY, Adriana Machado. **Fármacos para Tratamento da Dor**. São Paulo: Editora Manole Ltda, 2008. 340 p.

SANTOS, Lúcia H.m.l.m. et al. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal Of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 175, n. 1-3, p.45-95, 2010.

SIQUEIRA, João Máximo de et al. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* leach. **Química Nova**, [s.l.], v. 21, n. 5, p.557-559, 1998.

TAMBOSI, L.J. **Remoção de fármacos e avaliação de seus produtos de degradação através de tecnologias avançadas de tratamento**. 2008. 141f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, 2008.

Tan, H.H., Ong, W.M.C., Lai, S.H., *et al.* Nimesulide-induced hepatotoxicity and fatal hepatic failure. **Singapore Med J.**, v. 6, n. 48, p.582-585, jun. 2007.

TRAVERSA, G.. Cohort study of hepatotoxicity associated with nimesulide and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Bmj**, [s.l.], v. 327, n. 7405, p.18-22, 3 jul. 2003

WANNMACHE, Lenita; BREDEMEIER, Markus. Antiinflamatórios não-esteróides: Uso indiscriminado de inibidores seletivos de cicloxigenase-2. **Uso Racional de Medicamentos**, Brasília, v. 1, n. 2, p.1-6, 2004.

ZAGATTO, Pedro Antônio; BERTOLETTI, Eduardo. **Ecotoxicologia Aquática: Principios e Aplicações**. 2. ed. São Paulo: Rima, 2006. 464 p.