



LED/MB/¹O₂: Fotodegradação homogênea de fármacos em água superficial empregando lâmpadas LED como fonte de radiação

Eduardo da Silva Machado, Alyson Rogério Ribeiro, Susanne Rath

Instituto de Química, Departamento de Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas. Rua Josué de Castro, s/n – Cidade Universitária – Campinas, 13083-970 - Brasil - Tel: (19) – 3521-3014.

RESUMO: Atualmente, diversos aspectos relativos à qualidade das águas têm sido discutidos, sendo uma das principais pautas a indesejada presença de fármacos residuários. Estes representam uma importante classe de contaminantes e sua eliminação das matrizes aquosas é de grande relevância para a manutenção da qualidade das águas. Estudos têm demonstrado a eficiência dos Processos Oxidativos Avançados (POA) na degradação de fármacos e outros contaminantes orgânicos em matrizes aquosas. Nesses processos, a aplicação de espécies oxidantes, como o oxigênio singlete (¹O₂), sobre as matrizes, bem como o uso de substâncias fotossensibilizadoras, tem potencializado o rendimento dos POA. Diante disso, o presente projeto avaliou a degradação fotocatalisada dos fármacos cafeína, carbamazepina, ranitidina, sulfaquinoxalina e sulfametaxazol, por mecanismo mediado pelo fotossensibilizador azul de metileno (MB), utilizando reatores de baixo custo com emprego de lâmpadas multi-LED para a geração de radiação luminosa e ¹O₂. Com base nos ensaios preliminares em água ultrapura, estudou-se a degradação de ranitidina em amostra de água superficial coletada do Rio Atibaia (Atibaia-SP). Para a quantificação dos compostos e a avaliação da degradação em concentrações ambientalmente relevantes (ng mL⁻¹), utilizou-se extração em fase sólida *on-line* à cromatógrafa líquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (SPE-UHPLC-MS/MS). Verificou-se que o sistema LED/MB/¹O₂ é eficiente para degradação de ranitidina (meio neutro ou básico e fotossensibilizado) e que os demais fármacos estudados são recalcitrantes frente às condições avaliadas.

PALAVRAS-CHAVE: Oxigênio singlete POA; LED; fotodegradação; ranitidina.

MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS

O alto poder oxidante dos radicais e de algumas espécies excitadas resulta em um ótimo potencial destes em várias aplicações, que incluem a remoção de poluentes orgânicos ou a desinfecção de matrizes aquosas. Neste contexto, os processos oxidativos avançados (POA) baseados em fotodegradação têm sido apontados como tecnologia eficiente para o tratamento de soluções contendo fármacos. Entretanto, em matrizes aquosas reais, como efluentes e águas superficiais, a natural presença de íons como fosfato (PO₄³⁻), bicarbonato (HCO₃⁻) e sulfato (SO₄²⁻), bem como de compostos orgânicos (matéria orgânica, MO), reduz a ação dos POA, uma vez que essas espécies atuam como filtros internos, por mecanismos diversos (YE *et al*, 2017). Além da questão das espécies inibidoras dos radicais oxidantes, um dos principais desafios associados à aplicação ambiental de POA baseados em fotodegradação é a fonte de radiação. Lâmpadas de mercúrio de baixa e média pressão são tipicamente empregadas. Entretanto, os Diodos Emissores de Luz (LED, sigla em inglês) surgem como uma ótima alternativa na geração de radiação promotora deste tipo de POA. Os LED são fontes de luz baseados em materiais semicondutores, que apresentam uma elevada eficiência, longo tempo de vida e elevada robustez. De uma forma simplificada, trata-se de uma junção *p-n* de semicondutor, sujeita a uma tensão direta, convertendo energia elétrica em radiação eletromagnética, cujo comprimento de onda a ser emitido depende da energia da banda proibida (*bandgap*) do semicondutor (LORENZ *et al*, 2015; MATAFONOVA & BATOEV, 2018). Recentemente, esses dispositivos de radiação têm gerado um crescente interesse na área ambiental, devido a vantagens como o curto tempo de aquecimento das lâmpadas, a independência de materiais de alta periculosidade e/ou toxicidade nos dispositivos, o longo tempo de vida e a diversidade de espectro de emissão disponíveis (YEN *et al*, 2017). No âmbito dos processos fotossensibilizados homogêneos, segundo YEN *et al* (2017), o azul de metileno (MB) apresenta um ótimo potencial. Este composto absorve luz visível, evitando a ação dos “filtros internos” anteriormente discutidos, além de apresentar-se como bom formador de oxigênio singlete (¹O₂) (REDMOND & GAMLIN, 1999). A aplicação do MB como formador do oxidante ¹O₂ é apresentada na literatura com uma vasta gama de aplicações, incluindo desinfecção e tratamento de águas residuais, bem como eliminação de patógenos no sangue (HUANG *et al*, 2004; McCULLAG & ROBERTSON, 2006). Diante da importância apontada para o desenvolvimento de novas estratégias que potencializem a ação dos POA na eliminação de poluentes de matrizes aquosas e, considerando a relevância dos fármacos como contaminantes ambientais, o presente trabalho explorou a degradação fotossensibilizada



destes em matrizes aquosas, utilizando para isso um conjunto de lâmpadas LED para geração de radiação nas regiões do UV e visível, e excitação do MB. Para tal, investigou-se o potencial do $^1\text{O}_2$ para a fotodegradação de insumos farmacêuticos ativos priorizados previamente pelo nosso grupo de pesquisa, devido a sua alta relevância ambiental. Os fármacos estudados foram os seguintes: o estimulante cafeína (CAF), o antiepiléptico carbamazepina (CBZ), o antagonista do receptor H_2 ranitidina (RAN), os antimicrobianos sulfametoxazol (SMZ) e sulfaquinoxalina (SQX). Como fotossensibilizador, empregou-se o corante antisséptico azul de metileno (MB) Baseando-se no potencial do MB como gerador de $^1\text{O}_2$ quando excitado por radiação em comprimentos de onda do espectro UV-Visível e considerando-se a escassez dos estudos na literatura empregando o sistema LED/MB/ $^1\text{O}_2$ para a degradação de fármacos em águas superficiais e outras matrizes complexas, o presente trabalho buscou explorar a promoção da fotodegradação de CAF, CBZ, FFX, RAN, SMZ e SQX em matrizes aquosas utilizando esse sistema reacional. De forma mais específica, pretendeu-se avaliar o potencial de um conjunto de LED na excitação do MB, para geração de $^1\text{O}_2$. Para tal, avaliou-se, através de adequada quantificação analítica, a cinética da degradação dos insumos farmacêuticos ativos exposto a esse sistema.

MATERIAIS E MÉTODOS

PREPARO DAS SOLUÇÕES-TESTE

Soluções estoque contendo os padrões analíticos dos fármacos (99% de pureza) foram preparadas em metanol (1000 mg L^{-1}), mantidas refrigeradas (-4°C , no escuro) e posteriormente diluídas para obtenção das soluções teste. Os fármacos foram empregados na concentração inicial de 100 ng mL^{-1} em solução aquosa preparada com água ultrapura e água superficial (do Rio Atibaia), avaliando o efeito da concentração de fotossensibilizador bem como de pH do meio. Detalhes estão disponíveis na **Tabela 1**.

REATOR FOTOQUÍMICO E ENSAIOS

Foi montado um reator fotoquímico, baseado nos sistemas descritos por ESKANDARIAN *et al.* (2016) e YEN *et al.* (2017). Como inovação, empregou-se como fonte de radiação um conjunto de LED (doravante chamado de LED-cluster) comercializado para uso agrícola visando cultivo de plantas em ambientes fechados. O LED-cluster tipo spot (Laputa Lighting, China) possui 27 chips de emissão modelo 5730 SMD (*Surface Mount Device*, em inglês) e potência nominal de 28 W. Essa fonte de emissão inovadora foi devidamente caracterizada em termos de espectro de emissão global, irradiância e potência. Como apresentado no esquema descritivo abaixo (**Figura 1**), o reator constituiu-se de cuba de vidro sobre chapa de agitação. Sobre essa, posicionou-se concentricamente o LED-cluster a uma distância fixa em relação a superfície inicial do líquido. Em cada ensaio, inseriu-se na cuba 250 mL de solução teste, a qual foi mantida a rotação constante de 160 rpm. Após 5 minutos de aclimação no escuro e constante agitação (via agitadores magnéticos), a amostra inicial (t_0) foi retirada. Em seguida, a fonte de radiação foi ligada, dando início à reação. Durante o ensaio, alíquotas de 750 μL foram retiradas após 3, 5, 7, 9, 11 e 24 horas do início do experimento e abrigadas da luz em vidros âmbar até a injeção para análise quantitativa dos fármacos no SPE-UHPLC-MS/MS. Neste estudo, avaliou-se dez condições diferentes para o sistema de fotodegradação proposto em água ultrapura e água de rio. Em cada uma delas, foram avaliados os efeitos de diferentes parâmetros condicionais do meio. A **Tabela 1** apresenta os ensaios realizados, bem como as condições seguidas na realização de cada um destes, os quais foram conduzidos em duplicata para cada uma das matrizes estudadas.

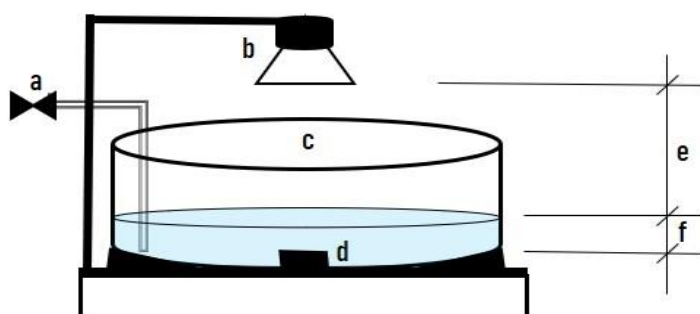


Figura 1: Esquema descritivo do reator fotoquímico. As letras representam respectivamente: a - seringa de amostragem de 5 mL, b - LED-Cluster, c - cuba de reação ($\phi 18$, altura 8,2, em cm), d - barra magnética para agitação (160 rpm), e - distância da superfície da solução à lâmpada (5 cm) e f - altura da solução na cuba (2,5 cm).

**Tabela 1:** Resumo dos experimentos conduzidos no presente estudo.

ENSAIO	MB*	LUZ**	PROPORÇÃO MB:FÁRMACOS***	pH	HIPÓTESES A SEREM AVALIADAS
I	NÃO	SIM	-	7	Fotólise direta
II	SIM	SIM	1:1	7	Fotossensibilização em meio neutro
III	SIM	SIM	7:1	7	Fotossensibilização em meio neutro
IV	SIM	NÃO	1:1	7	Degradação sem luz e em meio neutro
V	NÃO	SIM	-	3	Influência da especiação ácida
VI	SIM	SIM	1:1	3	Fotossensibilização em meio ácido.
VII	SIM	SIM	1:1	3	Fotossensibilização em meio ácido
VIII	NÃO	SIM	-	9	Influência da especiação básica
IX	SIM	SIM	1:1	9	Fotossensibilização em meio básico
X	SIM	SIM	7:1	9	Fotossensibilização em meio básico

*MB = azul de metileno; **uso da lâmpada LED durante a reação; ***proporção molar entre azul de metileno e fármacos na fortificação inicial.

QUANTIFICAÇÃO ANALÍTICA

Após amostragem do sistema reacional, todas as alíquotas foram fortificadas com uma solução mix dos padrões internos deuterados carbamazepina-d₁₀, sulfadimetoxina-d₆ e cafeína – d₃, resultando em concentrações finais de 45, 45 e 22,5 ng mL⁻¹, respectivamente. Após filtração (0,45 µm), as amostras foram analisadas empregando extração em fase sólida *on-line* à cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (SPE-UHPLC-MS/MS), utilizando-se um método analítico desenvolvido baseando-se no proposto por TETZNER *et al.* (2016). Resumidamente, utilizou-se coluna analítica HSS T3 C₁₈ (2.1 mm x 50 mm x 1.8 µm) (Waters, EUA) e coluna de SPE X-Bridge C₈ (2,1 x 30 mm, 10 µm) (Waters, EUA). Tanto a concentração na coluna de SPE quanto a separação cromatográfica foram conduzidas em gradiente, empregando diferentes proporções de solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (v/v), metanol e acetonitrila como fases de carregamento e eluição. Na detecção, um espectrômetro de massas triplo quadrupolo Xevo TQD (Waters, EUA) foi utilizado no modo de ionização positivo (ESI+), e operando no modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM). O método empregado na quantificação dos insumos farmacêuticos ativos foi desenvolvido e validado de acordo com os padrões de aceitabilidade do Guia de Validação Analítica do MAPA (BRASIL, 2015) para linearidade, exatidão, precisão intra- e inter-dia na faixa linear de 5 a 125 ng mL⁻¹.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

CARACTERIZAÇÃO DA FONTE LUMINOSA

Utilizando-se de um espectrômetro miniatura modelo USB2000 (Ocean Optics, EUA) e leitor tipo microcanal de fibra óptica, caracterizou-se individualmente cada chip de LED e assim obteve-se o espectro total de emissão do LED-*cluster* empregado. Pode-se observar uma emissão policromática na faixa de 369 a 720 nm. Empregando-se um foto-radiômetro modelo HD 2102.1 (Delta Ohm, Itália) e os respectivos filtros de banda, obteve-se como potência recebida por área irradiada da solução teste 476 Wm⁻² (315-400nm) e 113 Wm⁻² (400-1050 nm), valores estes obtidos a 5 cm (latitudinal, e na **Figura 1**).

ENSAIOS EM ÁGUA ULTRAPURA (UW)

Considerando os ensaios propostos e descritos na **Tabela 1**, as dez condições foram avaliadas inicialmente em UW para verificar o comportamento dos compostos frente às condições de fotodegradação sem a interferência de componentes da matriz ambiental. Em geral, os compostos apresentaram dois tipos de comportamentos frente às condições dos experimentos realizados. Os compostos CAF, CBZ, SMZ e SQX apresentaram, no que se refere a cinética de degradação, o comportamento similar ao descrito pelos gráficos demonstrados na **Figura 2a**, que apresenta os dados obtidos para CAF nas diferentes condições exemplificando as tendências observadas para estes compostos. Diferentemente dos demais compostos, a ranitidina (RAN) apresentou o comportamento em relação à cinética e degradação descrito pelo gráfico apresentado na **Figura 2b**. Pode-se observar que, para todas as condições avaliadas, CAF, CBZ, SQX e SMZ não apresentaram degradação no intervalo de 24 horas de ensaio. Já a RAN sofreu degradação em condições específicas. Observou-se a degradação de RAN nos ensaios realizados em pH 7,0 e pH 9,0 ambos em presença do fotossensibilizador. Com isso, verificou-se que, a RAN tem sua degradação inibida em meio ácido e catalisada em meio básico, visto que, embora a RAN tenha se degradado também em condição neutra, a taxa de degradação dessa foi mais



acentuada nos experimentos em pH 9,0. Além disso, pode-se verificar que a proporção de azul de metileno é importante na cinética de degradação desse composto. Como demonstrado na Figura 2, para mesmos valores de pH, os experimentos conduzidos com MB adicionado em excesso 7:1 (MB:fármaco) apresentaram taxas de degradação maiores que nos experimentos em que a proporção foi de 1:1 (MB:fármaco), evidenciando assim que o aumento da proporção do fotossensibilizador acelera a degradação da substância.

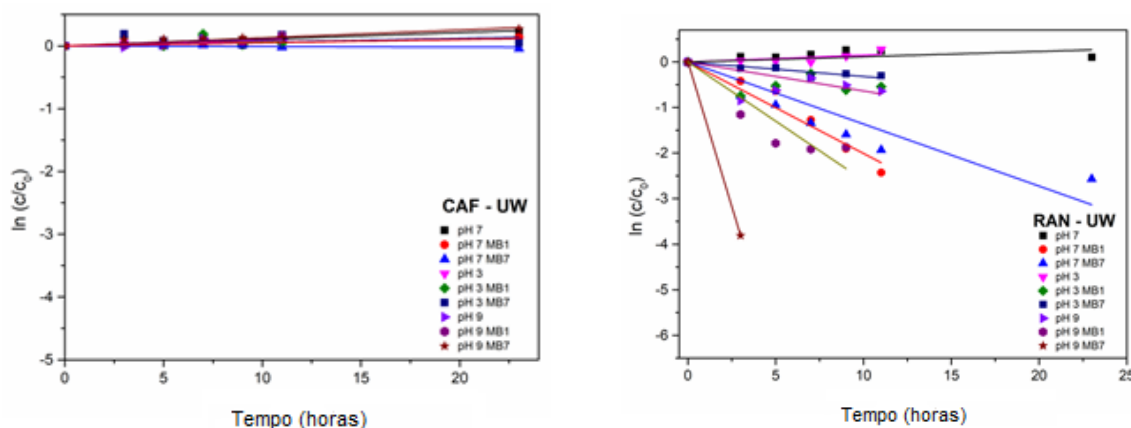


Figura 2: Curvas cinéticas de degradação de pseudo primeira-ordem dos fármacos cafeína (CAF, **2a**) e ranitidina (RAN, **2b**) em água ultra-pura (UW).

ENSAIOS EM ÁGUA DE RIO (RW)

Baseando-se nos ensaios preliminares realizados em água ultrapura, estudou-se o comportamento do fármaco RAN quando submetido às condições de fotodegradação descritas anteriormente, substituindo UW por RW, visando observar possíveis mudanças na sua cinética de degradação decorrente de efeitos da matriz. Utilizou-se as águas do Rio Atibaia, coletadas em ponto amostral (23°6'21"S 46°29'35"W) localizado no município de Atibaia-SP. Este corpo hídrico foi selecionado pois este é o responsável por aproximadamente 94% do abastecimento de água da cidade de Campinas (SP), polo industrial e tecnológico de São Paulo. Com base nos nossos resultados preliminares de ocorrência de fármacos, escolheu-se a localização acima descrita para realização da coleta, uma vez que trata-se de uma área rural e, portanto, apresentar menor presença de resíduos provenientes de atividade antropogênica, em relação a porções do rio localizadas em áreas de maior urbanização. A **Figura 3** apresenta as curvas de degradação de RAN obtidas dos ensaios em RW nas condições descritas na **Tabela 2**. Assim como fora observado nos ensaios em UW, verificou-se que a RAN sofre degradação análoga em RW para as mesmas condições (pH 7,0 ou pH 9,0). Como as taxas de degradação são bastante semelhantes, isso implica que não há efeito significativo dos componentes da matriz aquosa sobre a cinética de degradação de ranitidina para as condições estudadas. Segundo Ye e colaboradores (2017), as principais espécies oxidativas responsáveis pela degradação oxidativa da matéria orgânica e contaminantes orgânicos em presença de azul de metileno é o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) gerado a partir da excitação do oxigênio tripleto ($^3\text{O}_2$), espécie mais estável do gás dissolvido na água. Ainda de acordo com esses autores, ao incidir radiação sobre o azul de metileno, a espécie passa para um estado eletrônico excitado que conserva o spin dos elétrons do estado fundamental ($\text{MB} \rightarrow ^1\text{MB}$). Por conta da repulsão intereletrônica no estado excitado singlete, ocorre a diminuição de energia do estado excitado singlete para o estado excitado tripleto ($^1\text{MB} \rightarrow ^3\text{MB}$) por mecanismo denominado cruzamento intersistemas. Em outras palavras, ocorre a relaxação energética por inversão de spin do elétron, levando à estabilização do estado excitado. O estado excitado tripleto apresenta um tempo de vida considerável, que possibilita a aproximação do oxigênio tripleto ($^3\text{O}_2$) presente na matriz aquosa. Dessa forma, a energia liberada na relaxação do azul de metileno excitado ($^3\text{MB} \rightarrow \text{MB}$), promove a excitação do oxigênio tripleto a oxigênio singlete ($^3\text{O}_2 \rightarrow ^1\text{O}_2$), espécie instável e de tempo de vida bastante curto, que atua como forte oxidante de matéria orgânica. Além do $^1\text{O}_2$, outras espécies oxidantes podem ter sua formação mediada pela excitação eletrônica de matéria orgânica dissolvida (MOD) que atua como fotossensibilizador no sistema.

Trabalhos complementares estão sendo realizados para compreender as reações envolvidas na degradação observada do fármaco ranitidina frente ao sistema LED/MB/ $^1\text{O}_2$.

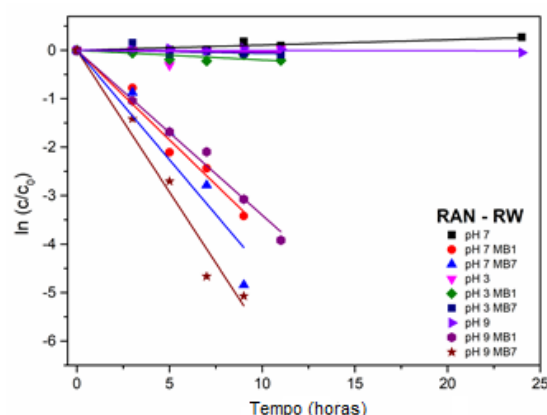


Figura 3: Curva cinética de degradação de pseudo primeira-ordem do fármaco Ranitidina (RAN) em água de rio (RW).

CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Compreender o sistema LED/MB/ $^1\text{O}_2$ do ponto de vista do funcionamento e aplicação na fotocatalise dos processos de degradação de CAF, CBZ, FXF, RAN, SQX e SMZ não é uma tarefa trivial, já que, o efeito das variáveis condicionais do sistema (pH, intensidade luminosa, concentração de fotossensibilizador, etc) ainda são pouco exploradas na literatura para sistemas envolvendo fontes de radiação policromáticas, em especial os LED. Diante do que fora estudado, verificou-se que o método analítico empregando SPE-UHPLC-MS/MS é eficiente para a quantificação dos insumos farmacêuticos ativos supracitados na faixa de concentrações entre 5 e 125 ng mL⁻¹. Além disso, verificou-se que o sistema LED/MB/ $^1\text{O}_2$ é eficiente para a degradação de RAN em condições de pH 7,0 ou pH 9,0, ambos em presença de azul de metileno dissolvido, sendo a condição básica a que proporcionou maior taxa de degradação para RAN. O conjunto LED/MB/ $^1\text{O}_2$, nas condições aqui estudadas, não foi capaz de degradar CAF, CBZ, SQX e SMZ, o que corrobora com dados da literatura sobre a persistência dos resíduos desses compostos em sua forma pura e inalterada frente à ação de diversos POA. A recalcitrância desses compostos frente a esse sistema proposto também evidencia a necessidade de estudos suplementares empregando tecnologias inovadoras visando a remoção de fármacos das matrizes aquosas. Destaca-se que o presente estudo foi conduzido com caráter exploratório, buscando um conhecimento inicial do sistema fotoquímico LED/MB/ $^1\text{O}_2$, sendo necessários experimentos envolvendo técnicas analíticas de maior resolução como MS Q-ToF para elucidar os mecanismos de degradação e conhecer as estruturas de espécies possíveis de serem formadas durante a degradação da RAN.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual de garantia da qualidade analítica: áreas de identidade e qualidade de alimentos e de insumos / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2015
- ESKANDARIAN, M. R. *et al.* Effects of UV-LED wavelengths on direct photolytic and TiO₂ photocatalytic degradation of emerging contaminants in water. *Chemical Engineering Journal*, v. 300, p. 414-422, 2016.
- McCULLAGH, C.; ROBERTSON, P.K.J. Photosensitized destruction of *Chlorella vulgaris* by methylene blue or nuclear fast red combined with hydrogen peroxide under visible light irradiation. *Environmental Science & Technology*, v. 40, n. 7, p. 2421-2425, 2006.
- HUANG, Q. *et al.* Inactivation of dengue virus by methylene blue/narrow bandwidth light system. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 77, n. 1-3, p. 39-43, 2004.
- LORENZ, K. *et al.* Diodos emissores de luz e iluminação. *Gazeta de Física da Universidade de Lisboa*. Lisboa, 2015. Disponível em <https://www.spf.pt/magazines/GFIS/119/article/991/pdf>
- MATAFONOVA, G.; BATOEV, V. Recent advances in application of UV light-emitting diodes for degrading organic pollutants in water through advanced oxidation processes: a review. *Water Research*, v. 132, p. 177-189, 2018.
- REDMOND, R.W.; GAMLIN, J.N.A. Compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochemistry and Photobiology*, v. 70, n. 4, p. 391-475, 1999.
- Tetzner, N.F. *et al.* On-line SPE-UHPLC-MS/MS as a powerful technique for the determination of sulfonamide residues in soils. *Journal of Chromatography A*, 1452, 89-97, 2016.
- YE, Y. *et al.* Homogeneous photosensitized degradation of pharmaceuticals by using red light LED as light source and methylene blue as photosensitizer. *Chemical Engineering Journal*, v. 316, p. 872-881, 2017.