

MARIANA ROBERTO GAMA

**DEGRADAÇÃO DE HORMÔNIOS POR PROCESSOS FENTON
MEDIADOS POR CICLODEXTRINA**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Fernandes Pupo Nogueira

Araraquara

2010

DADOS CURRICULARES

1. Dados pessoais

Nome: Mariana Roberto Gama

Filiação: Jacqueline Maria Roberto Gama e José Alfredo Gama

Data de nascimento: 12 de junho de 1984

Naturalidade: Campinas-SP

Nacionalidade: Brasileira

Endereço: Rua Paul Harris, 627 Americana – SP

e-mail: marianaroberto@gmail.com

2. Formação acadêmica

2.1. Mestrado em Química

Mestrado em Química, área de concentração: Química Analítica, concluído em 24 de junho de 2010, pelo Instituto de Química de Araraquara – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, sob orientação da Profa. Dra. Raquel Fernandes Pupo Nogueira.

2.2. Graduação em Farmácia-Bioquímica

Bacharelado em Farmácia-Bioquímica com habilitação em Fármaco e Medicamento (modalidade Industrial) concluído em 01 de dezembro de 2007, pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

3. Resumos publicados em anais de congressos

3.1. GAMA, M. R.; NOGUEIRA, R. F. P. Complexação do íon Fe^{2+} por beta-ciclodextrina: aplicação na degradação do interferente endócrino etinilestradiol por processo Fenton. In: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia-SP, 2010.

3.2. GAMA, M. R.; NOGUEIRA, R. F. P. Influência do sacarídeo β -ciclodextrina na degradação do interferente endócrino etinilestradiol por processos Fenton. In: V EnQAmb – Encontro Nacional de Química Ambiental, São Pedro-SP, 2010.

3.3. GAMA, M. R.; NOGUEIRA, R. F. P. Degradação de hormônio por processo Fenton: incorporação em ciclodextrina. In: V EPOA - Encontro sobre Aplicações Ambientais de Processos Oxidativos Avançados, São Paulo-SP, 2009.

3.4. GAMA, M. R.; NOGUEIRA, R. F. P. Comportamento de inclusão de hormônios estrógenos em beta-ciclodextrina. In: 17º Encontro da SBQ Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti, Araraquara-SP, 2009.

4. Apresentações orais de trabalho

4.1. V EnQAmb – Encontro Nacional de Química Ambiental.

Apresentação em sessão coordenada: “Influência do sacarídeo β -ciclodextrina na degradação do interferente endócrino etinilestradiol por processos Fenton”.

4.2. V EPOA - Encontro sobre Aplicações Ambientais de Processos Oxidativos Avançados.

Apresentação em sessão coordenada: “Degradação de hormônio por processo Fenton: incorporação em ciclodextrina”.

*Dedico este trabalho primeiramente a Deus e
à minha família, por todo amor a mim dispensado.*

Agradecimentos

A Deus, pelas graças alcançadas. Por guiar meus passos e iluminar meu caminho. Pela saúde, perseverança, coragem e superação a mim concedidas. Pela proteção em todos os momentos difíceis.

Aos meus adorados pais, Jacqueline e José Alfredo, pelo amor e carinho, por acreditarem sempre nas minhas conquistas e por serem meus modelos de integridade e honestidade.

Ao meu amado irmão Guilherme, pelo imenso amor à distância.

Ao meu querido noivo Marcelo, pela total compreensão e apoio incondicional após todos estes anos de companhia.

À minha tia Isabel, por ter me proporcionado esta oportunidade.

À minha orientadora Raquel, pelos ensinamentos, pela tranquilidade nas horas difíceis e por ter me proporcionado mais que crescimento profissional nestes anos de convivência.

A todos os meus amigos de laboratório, atuais e passados: Alam, Daniely, Ivonete, João Angelo, Jorge e Michele, com os quais compartilhei muito mais que um espaço.

Às minhas amigas da copa: Anahi, Dirce, Giselle, Marinaiva e Vilma, pelos conselhos, risadas e palavras de motivação.

Às minhas amigas de república: Alessandra, Karen, Lia, Rebeca e Thaís, pela companhia e amizade.

Aos professores Maria Del Pilar Sotomayor e Alberto Cavalheiro, pela contribuição que me ofereceram no exame de qualificação.

A todos os professores, funcionários e colegas do Instituto de Química que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

À Capes, pela bolsa concedida.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse concretizado.

*“Direi do Senhor: Ele é o meu refúgio e a minha fortaleza, o meu Deus,
em quem confio”.*

Salmos 91:2.

RESUMO

O estudo de interferentes endócrinos em águas tem sido relevante devido aos efeitos deletérios promovidos por estes compostos, encontrados no ambiente em baixíssimas concentrações, na faixa de ng L^{-1} até $\mu\text{g L}^{-1}$. Hormônios estrógenos são importantes interferentes endócrinos. Neste trabalho, foi avaliada a influência da β -ciclodextrina (β -CD) na degradação dos hormônios estrógenos 17β -estradiol (E2) e 17α -etinilestradiol (EE2) por processo Fenton e foto-Fenton, com irradiação artificial. Por meio de métodos espectrofotométricos, determinou-se que a estequiometria de inclusão de E2: β -CD e EE2: β -CD é 1:1, e a constante de inclusão assume valores da ordem de 10^3 L mol^{-1} para ambos os hormônios. A constante de complexação Fe^{2+} - β -CD apresentou maior valor em pH 4,0, quando comparados aos valores encontrados em pH 2,5 e 6,0. Já a constante de complexação Fe^{3+} - β -CD foi maior em pH 6,0. A degradação de E2 e EE2 foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a mineralização por determinações de carbono orgânico total (COT). Foi observado que o processo Fenton ($\text{Fe}^{2+} = 0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ e $\text{H}_2\text{O}_2 = 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) em pH 2,5 e 4,0 reduziu a concentração do EE2 a valores abaixo do limite de detecção do equipamento após 90 minutos de reação e em pH 6,0, a redução na concentração alcançou somente 50% após o mesmo tempo; entretanto, não ocorreu a remoção do COT das amostras, indicando que houve a formação de intermediários de reação. Na presença de β -CD, a eficiência da reação de Fenton foi menor e a redução na concentração de EE2 chegou a cerca de 50% nos valores de pH testados. Novamente, não foi observada remoção do COT das amostras. Observou-se que a degradação do EE2 por processo foto-Fenton reduz a concentração do hormônio até abaixo do limite de detecção do equipamento após 30 minutos de reação nos valores de pH 2,5 e 4,0 e cerca de 60% após 60 minutos de reação em pH 6,0. Sob irradiação, 80% de mineralização foi observada em pH 2,5, indicando a degradação dos intermediários formados. Na presença de β -CD, o processo foto-Fenton teve sua eficiência reduzida em pH 2,5 e 6, mas em pH 4, a remoção de COT foi favorecida alcançando quase 100%. A aplicação do processo foto-Fenton na degradação do E2 mostrou que a redução na concentração deste hormônio em pH 2,5 e 4,0 chegou a 50% após 120 minutos de reação. Embora a eficiência da reação nestes dois valores de pH tenha sido semelhante, o consumo de peróxido de hidrogênio foi maior em pH 4,0. A adição de β -CD não resultou em aumento da eficiência de degradação do E2 por processo foto-Fenton em pH 2,5 e 4,0. Tanto na presença quanto na ausência de β -CD, foi observada baixa formação de intermediários de reação, evidenciada pelos cromatogramas, que pode ser associada ao seqüestro de radicais pelo metanol, presente no sistema.

Palavras-chave: Interferentes endócrinos. Processos oxidativos avançados. β -ciclodextrina.

ABSTRACT

The study of endocrine disruptors in water has been important due to the deleterious effects promoted by these compounds, found in the environment at very low concentrations. Estrogens are important endocrine disruptors. In this study, the influence of β -cyclodextrin (β -CD) in the degradation of the hormones estrogen 17 β -estradiol (E2) and 17 α -ethinylestradiol (EE2) by Fenton and photo-Fenton process using artificial irradiation was evaluated. Using spectrophotometric methods, it was determined that the stoichiometry of the inclusion of E2 and EE2 in β -CD is 1:1, and the inclusion constant assumes values around 10^3 L mol⁻¹ for both hormones. The Fe²⁺- β -CD complexation showed the highest value at pH 4.0, which was compared to values found at pH 2.5 and 6.0. The Fe²⁺- β -CD complexation was higher at pH 6.0. The degradation of E2 and EE2 was determined by high performance liquid chromatography and mineralization by determination of total organic carbon (TOC). It was observed that the Fenton process (Fe²⁺ = 0,01 mmol L⁻¹ e H₂O₂ = 0,5 mmol L⁻¹) at pH 2.5 and 4.0 reduced the concentration of EE2 to values below the detection limit of the equipment after 90 minutes of reaction and at pH 6.0, the reduction in the concentration reaches only 50% after same time. However, the removal of TOC of the samples is not observed, indicating the formation of intermediates. In the presence of β -CD, the reaction efficiency is reduced and the reduction in the concentration of EE2 reaches about 50% at the pH values tested. Again, there was no mineralization of the samples. It was observed that the degradation of EE2 by photo-Fenton process reduces the concentration of the hormone to levels below the detection limit of the equipment after 30 minutes of reaction at pH 2.5 and 4.0 and about 60% degradation is observed after 60 minutes reaction at pH 6.0. The mineralization in these samples reached 80% at pH 2.5, indicating degradation of the intermediates formed. In the presence of β -CD, the photo-Fenton process has lower efficiency at pH 2.5 and 6, however, at pH 4, the mineralization achieved almost 100% The application of photo-Fenton process in the degradation of E2 showed that the concentration of this hormone at pH 2.5 and 4.0 decreased to 50% after 120 minutes of reaction. Although the reaction efficiency has been similar in these pH values, the hydrogen peroxide consumption, was higher at pH 4.0, when it was almost 100% compared with 70% consumed after 120 minutes of reaction at pH 2.5. The addition of β -CD did not increase the efficiency of E2 degradation by photo-Fenton at pH 2.5 and 4.0. In both presence and absence of β -CD, the formation of reaction intermediates was low, as evidenced by the chromatograms, what may be associated with the removal of radicals by methanol, present in the system.

Keywords: Endocrine disruptors. Advanced oxidation processes. β -cyclodextrin.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Porcentagem da população mundial com acesso a água potável em 2008. Fonte: Ministério da Educação e Cultura. 23
- Figura 2.** Estrutura química do núcleo ciclopentano-fenantreno. 29
- Figura 3.** (A) Estrutura química do 17 β -estradiol (E2) e (B) do 17 α -etinilestradiol. 30
- Figura 4.** Distribuição das espécies hidroxiladas de Fe³⁺ em meio aquoso, de acordo com o pH ($\leq 5,0$). Fonte: FENG; NANSHENG, 2000. 39
- Figura 5.** Estrutura química da glicose (α -D-glicopirranose). 44
- Figura 6.** Estrutura e dimensões das ciclodextrinas. Fonte: VENTURINI et al., 2008. 44
- Figura 7.** Representação esquemática das estequiometrias de inclusão entre ciclodextrina e substrato. (A) 1:1. (B) 2:1. (C) 1:2. (D) 2:2. 47
- Figura 8.** Representação esquemática do reator usado nas reações de foto-Fenton. 70
- Figura 9.** (A) Espectros de absorção na região do UV para E2, em água; concentração do hormônio entre 0,0025 e 0,03 mmol L⁻¹. (B) EE2 em água, concentração do hormônio entre 0,01 e 0,08 mmol L⁻¹. Acima das concentrações utilizadas, foi observado prejuízo na solubilidade em meio aquoso. 73
- Figura 10.** Curvas analíticas de E2 (A) e EE2 (B), no comprimento de onda de 280 nm. 74
- Figura 11.** Representação gráfica do método das variações contínuas para E2 (A) e EE2 (B). O gráfico relaciona a fração molar do respectivo hormônio em relação à absorbância e a concentração de β -CD. 76

- Figura 12.** Diagrama de solubilidade em fase de E2 (A) e de EE2 (C). Porção linear inicial do diagrama de E2 (B) e EE2 (D). $\lambda = 280$ nm. 79
- Figura 13.** Espectros de absorção do Fe^{2+} em pH 2,5 em água. (A) Variação da concentração de Fe^{2+} de 0 a $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$ e (B) de $\beta\text{-CD}$ de 0 a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. (C) $\beta\text{-CD} = 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. (D) $\text{Fe}^{2+} = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. 81
- Figura 14.** Possíveis sítios de interação da $\beta\text{-CD}$. 82
- Figura 15.** Determinação da constante de complexação entre Fe^{2+} e $\beta\text{-CD}$ em pH 2,5, segundo método adaptado de Hoshino A constante K corresponde à inclinação da porção linear da curva. 83
- Figura 16.** Cálculo da constante de complexação $\text{Fe}^{2+}\text{-}\beta\text{-CD}$ em pH 2,5 (A), pH 4,0 (B) e pH 6,0 (C), em $\lambda = 224$ nm. 84
- Figura 17.** Cálculo da constante de complexação $\text{Fe}^{3+}\text{-}\beta\text{-CD}$ em pH 2,5 (A), pH 4,0 (B) e pH 6,0 (C), em $\lambda = 302$ nm. 86
- Figura 18.** (A) Cromatograma de E2 $7,5 \text{ mg L}^{-1}$, fase móvel 85:15 metanol/0,2% ácido acético:água. (B) EE2 $5,0 \text{ mg L}^{-1}$, fase móvel 65:35 metanol/0,2% ácido acético:água. Vazão $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura do forno da coluna $40 \text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda=280$ nm. 89
- Figura 19.** Curvas analíticas, preparadas em metanol, com concentração de $1,0$ a 200 mg L^{-1} para E2 (A) e concentração de $0,5$ a 200 mg L^{-1} para EE2 (B). 90
- Figura 20.** Linearidade para E2 (A) e EE2 (B), admitindo variação de 5%. 91
- Figura 21.** Efeito do ajuste do pH na concentração de EE2. 97

- Figura 22.** (A) Degradação de EE2 por processo Fenton. Condições iniciais: EE2 = 2,8 mg L⁻¹, Fe²⁺ = 0,2 mmol L⁻¹ e H₂O₂ = 10 mmol L⁻¹ em pH 2,5. (B) Remoção de COT; COT₀ = 6,5 mg L⁻¹. 98
- Figura 23.** (A) Degradação de EE2 por processo Fenton. Condições iniciais: EE2 = 3,7 mg L⁻¹, Fe²⁺ = 0,1 mmol L⁻¹ e H₂O₂ = 5,0 mmol L⁻¹ em pH 2,5. (B) Remoção de COT; COT₀ = 5,7 mg L⁻¹. 99
- Figura 24.** Influência do tempo de agitação, da adição de 0,1 mmol L⁻¹ de Fe²⁺ e da adição de 5,0 mmol L⁻¹ de H₂O₂ na concentração de EE2, após ajuste de pH. 99
- Figura 25.** (A) Degradação de EE2 por processo Fenton. Condições iniciais: EE2 = 3,3 mg L⁻¹, Fe²⁺ = 0,01 mmol L⁻¹ e H₂O₂ = 0,5 mmol L⁻¹, pH 2,5. (B) Remoção de COT; COT₀ = 6,5 mg L⁻¹. 100
- Figura 26.** (A) Degradação de EE2 por processo Fenton em diferentes valores de pH. Condições iniciais EE2 = 3,5 mg L⁻¹; Fe²⁺ = 0,01 mmol L⁻¹; H₂O₂ = 0,5 mmol L⁻¹. (B) Remoção de COT; COT₀ = 6,0 mg L⁻¹. 101
- Figura 27.** Especificação do Fe²⁺ em água em função do pH, a 1,0 mol L⁻¹ de força iônica, a 25 °C (adaptado de PIGNATELLO; OLIVEROS; McKAY, 2006). 102
- Figura 28.** Degradação de EE2 por processo Fenton em pH 6,0. Condições iniciais: EE2 = 4,0 mg L⁻¹; Fe²⁺ = 0,01 mmol L⁻¹; H₂O₂ = 0,5 mmol L⁻¹. Alíquotas acidificadas até pH 2,5 antes da pré-concentração. 104
- Figura 29.** Cromatogramas de amostras de EE2 durante processo Fenton em pH 2,5. (A) Amostra inicial. (B) Após 1, 15 e 60 minutos de reação. A concentração das amostras de (B) está 20 vezes maior que a original (após pré-concentração). 105

- Figura 30.** Cromatogramas de amostras de EE2 durante processo Fenton em pH 4,0. (A) Amostra inicial. (B) Após 1, 12 e 60 minutos de reação. A concentração das amostras de (B) está 20 vezes maior que a original (após pré-concentração). 106
- Figura 31.** Cromatogramas de amostras de EE2 durante processo Fenton em pH 6,0. (A) Amostra inicial. (B) Após 1, 20 e 90 minutos de reação. A concentração das amostras de (B) está 20 vezes maior que a original (após pré-concentração). 106
- Figura 32.** Remoção de COT de β -CD 115 mg L⁻¹ submetida ao processo Fenton. Condições iniciais: Fe²⁺ = 0,01 mmol L⁻¹; H₂O₂ = 0,5 mmol L⁻¹. COT₀ = 42 mg L⁻¹. 107
- Figura 33.** (A) Degradação de EE2, na presença de β -CD, por processo Fenton em diferentes valores de pH. Condições iniciais: EE2 = 12 mg L⁻¹; Fe²⁺ = 0,01 mmol L⁻¹; H₂O₂ = 0,5 mmol L⁻¹. (B) Remoção de COT; COT₀ = 52 mg L⁻¹; apenas do EE2 = 10 mg L⁻¹. 108
- Figura 34.** Cromatogramas de amostras de EE2 na presença de β -CD durante processo Fenton em pH 2,5. (A) Amostra inicial. (B) Após 1, 15 e 90 minutos de reação. A concentração das amostras de (B) está 20 vezes maior que a original (após pré-concentração). 110
- Figura 35.** Cromatogramas de amostras de EE2 na presença de β -CD durante processo Fenton em pH 4,0. (A) Amostra inicial. (B) Após 1, 12 e 60 minutos de reação. A concentração das amostras de (B) está 20 vezes maior que a original (após pré-concentração). 110

- Figura 36.** Cromatogramas de amostras de EE2 na presença de β -CD durante processo Fenton em pH 6,0. (A) Amostra inicial. (B) Após 1, 20 e 90 minutos de reação. A concentração das amostras de (B) está 20 vezes maior que a original (após pré-concentração). 111
- Figura 37.** (A) Influência do pH na degradação de EE2 por processo foto-Fenton, sob irradiação artificial. Condições iniciais: EE2 = 5,7 mg L⁻¹; Fe²⁺ = 0,01 mmol L⁻¹; H₂O₂ = 0,5 mmol L⁻¹. (B) Remoção de COT; COT₀ = 6 mg L⁻¹. (B) Remoção de COT; COT₀ = 6 mg L⁻¹. 113
- Figura 38.** Cromatogramas de amostras de EE2 durante processo foto-Fenton sob irradiação artificial, em pH 2,5. (A) Amostra inicial. (B) Após 1, 15 e 60 minutos de reação. A concentração das amostras de (B) está 20 vezes maior que a original (após pré-concentração). 114
- Figura 39.** Cromatogramas de amostras de EE2 durante processo foto-Fenton sob irradiação artificial, em pH 4,0. (A) Amostra inicial. (B) Após 1, 15 e 60 minutos de reação. A concentração das amostras de (B) está 20 vezes maior que a original (após pré-concentração). 115
- Figura 40.** Cromatogramas de amostras de EE2 durante processo foto-Fenton sob irradiação artificial, em pH 6,0. (A) Amostra inicial. (B) Após 1, 15 e 60 minutos de reação. A concentração das amostras de (B) está 20 vezes maior que a original (após pré-concentração). 115
- Figura 41.** Remoção de COT de β -CD 115 mg L⁻¹ submetida ao processo foto-Fenton. Condições iniciais: Fe²⁺ = 0,01 mmol L⁻¹; H₂O₂ = 0,5 mmol L⁻¹. COT₀ = 42 mg L⁻¹. 116

- Figura 42.** (A) Degradação de EE2 por processo foto-Fenton, sob irradiação artificial, na presença de β -CD em diferentes valores de pH. Condições iniciais: EE2 = 12 mg L⁻¹; Fe²⁺ = 0,01 mmol L⁻¹; H₂O₂ = 0,5 mmol L⁻¹. (B) Remoção de COT; COT₀ = 52 mg L⁻¹; apenas do EE2 = 12 mg L⁻¹. 118
- Figura 43.** Consumo de H₂O₂ durante degradação de EE2 por foto-Fenton na presença de β -CD. Condições iniciais: EE2 = 12 mg L⁻¹; Fe²⁺ = 0,01 mmol L⁻¹; H₂O₂ = 0,5 mmol L⁻¹. 119
- Figura 44.** Cromatogramas de amostras de EE2 na presença de β -CD, durante processo foto-Fenton sob irradiação artificial, em pH 2,5. (A) Amostra inicial. (B) Após 1, 15 e 60 minutos de reação. A concentração das amostras de (B) está 20 vezes maior que a original (após pré-concentração). 120
- Figura 45.** Cromatogramas de amostras de EE2 na presença de β -CD, durante processo foto-Fenton sob irradiação artificial, em pH 4,0. (A) Amostra inicial. (B) Após 1, 15 e 60 minutos de reação. A concentração das amostras de (B) está 20 vezes maior que a original (após pré-concentração). 120
- Figura 46.** Cromatogramas de amostras de EE2 na presença de β -CD, após reação de foto-Fenton sob irradiação artificial, em pH 6,0. (A) Amostra inicial. (B) Após 1, 15 e 60 minutos de reação. A concentração das amostras de (B) está 20 vezes maior que a original (após pré-concentração). 121
- Figura 47.** (A) Degradação de E2 por processo foto-Fenton, sob irradiação artificial, em pH 2,5 e 4,0. Condições iniciais: E2 = 4,0 mg L⁻¹; Fe²⁺ = 0,01 mmol L⁻¹; H₂O₂ = 0,5 mmol L⁻¹. 122
- Figura 48.** Consumo de H₂O₂ durante degradação de E2 por processo foto-Fenton. Condições iniciais: E2 = 4,0 mg L⁻¹; Fe²⁺ = 0,01 mmol L⁻¹; H₂O₂ = 0,5 mmol L⁻¹. 123

Figura 49. (A) Degradação de E2 por processo foto-Fenton sob irradiação artificial, em pH 2,5 e 4,0, na presença de 50 mg L⁻¹ de β-CD. Condições iniciais: E2 = 4,0 mg L⁻¹; Fe²⁺ = 0,01 mmol L⁻¹; H₂O₂ = 0,5 mmol L⁻¹. 125

Figura 50. Consumo de H₂O₂ durante degradação de E2, na presença de β-CD, por foto-Fenton. Condições iniciais: E2 = 4,0 mg L⁻¹; Fe²⁺ = 0,01 mmol L⁻¹; H₂O₂ = 0,5 mmol L⁻¹. 126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Estrogenicidade relativa de alguns hormônios.	31
Tabela 2.	Excreção diária per capita de hormônios estrógenos (em µg).	31
Tabela 3.	Principais características das ciclodextrinas de ocorrência natural.	45
Tabela 4.	Concentrações de E2, EE2 e β-CD usadas na determinação da estequiometria de inclusão (para um volume de 1 L de solução).	62
Tabela 5.	Coeficiente de absorvidade molar de E2 e EE2 em água, em L mol ⁻¹ cm ⁻¹ .	74
Tabela 6.	Constante de inclusão aparente (K) e solubilidade inicial extrapolada (S ₀) de estrógenos em água, em λ= 280 nm.	78
Tabela 7.	Valor obtido para constante de inclusão Fe ²⁺ -β-CD em diferentes valores de pH.	84
Tabela 8.	Valor obtido para constante de inclusão Fe ³⁺ -β-CD em diferentes valores de pH.	86
Tabela 9.	Parâmetros cromatográficos para estradiol e etinilestradiol.	91
Tabela 10.	Eficiência da recuperação de 3,5 mg L ⁻¹ de EE2 em cartuchos novos.	92
Tabela 11.	Recuperação de 3,5 mg L ⁻¹ de EE2 em cartuchos reutilizados.	93
Tabela 12.	Recuperação de 6,2 mg L ⁻¹ de EE2 em cartuchos reutilizados.	93

Tabela 13. Recuperação de 11,4 mg L ⁻¹ de EE2, na presença de 115 mg L ⁻¹ de β-CD, em cartuchos reutilizados.	94
Tabela 14. Recuperação de 2,7 mg L ⁻¹ de E2 na presença de 50 mg L ⁻¹ de β-CD, em cartuchos reutilizados.	95
Tabela 15. Recuperação de 10 mg L ⁻¹ de E2 na ausência e na presença de 50 mg L ⁻¹ de β-CD, em cartuchos reutilizados.	96
Tabela 16. Comparativo de recuperação entre alíquotas de 10 mL de EE2 3,5 mg L ⁻¹ , submetidas à acidificação antes da pré-concentração.	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β-CD	β -ciclodextrina
$\mu\text{g L}^{-1}$	Micrograma por litro
μL	Microlitro
μm	Micrômetro (10^{-6} m)
CI	Carbono inorgânico
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COT	Carbono orgânico total
CT	Carbono total
CV	Coefficiente de variação
DAD	Detector de arranjo de diodos
E2	17 β -estradiol
EE2	17 α -etinilestradiol
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
K_{ow}	Coefficiente de partição octanol-água
mg L⁻¹	Miligrama por litro
min	minuto
ng L⁻¹	Nanograma por litro
POA	Processos oxidativos avançados
R	Recuperação
UV	Ultravioleta
Vis	Visível
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1. CONTAMINANTES EMERGENTES.....	23
1.1.1 Interferentes endócrinos.....	25
1.1.1.1. <i>Fontes de interferentes endócrinos no ambiente.....</i>	26
1.1.1.2. <i>Efeitos promovidos em organismos.....</i>	27
1.1.2. Hormônios estrógenos.....	28
1.1.2.1. <i>Estradiol e etinilestradiol.....</i>	29
1.1.2.2. <i>Hormônios como contaminantes ambientais.....</i>	32
1.2. ALTERNATIVAS NA REMOÇÃO DE CONTAMINANTES ORGÂNICOS.....	34
1.2.1. Processos oxidativos avançados (POA).....	35
1.2.1.1. <i>O processo Fenton.....</i>	36
1.2.1.2. <i>O processo foto-Fenton.....</i>	38
1.2.1.3. <i>Vantagens e limitações dos processos Fenton.....</i>	41
1.3. CICLODEXTRINAS.....	42
1.3.1. Histórico.....	42
1.3.2. Propriedades e aspectos estruturais das ciclodextrinas.....	43
1.3.3. Complexos de inclusão ciclodextrina:substrato.....	46
1.3.3.1. <i>Mecanismos de inclusão.....</i>	48
1.3.3.2. <i>Caracterização dos complexos de inclusão.....</i>	49
1.3.4. Aplicações das ciclodextrinas.....	51
1.3.4.1. <i>Aplicações industriais.....</i>	51
1.3.4.2. <i>Aplicações em química analítica.....</i>	52
1.3.4.3. <i>Aplicações em química ambiental.....</i>	53
1.3.4.4. <i>Outras aplicações.....</i>	55
1.4. CICLODEXTRINAS E OS PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS.....	56
2. OBJETIVOS.....	58

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
3.1. REAGENTES.....	59
3.2. PREPARO DE SOLUÇÕES.....	59
3.2.1. Preparo de solução de valerato de estradiol (E2) na ausência e na presença de β -ciclodextrina.....	59
3.2.2. Preparo de solução de etinilestradiol (EE2) na ausência e na presença de β -ciclodextrina.....	60
3.3. DETERMINAÇÕES ESPECTROFOTOMÉTRICAS.....	61
3.3.1. Determinação do coeficiente de absorvidade molar de estradiol e etinilestradiol em água.....	61
3.3.2. Determinação da estequiometria de inclusão dos hormônios em β -ciclodextrina.....	62
3.3.3. Determinação dos valores das constantes de inclusão aparentes..	63
3.3.4. Determinação da estequiometria e da constante de complexação Fe^{2+} - β -ciclodextrina.....	64
3.3.5. Determinação da constante de complexação Fe^{3+} - β -ciclodextrina.	65
3.4. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (EFS).....	65
3.4.1. Estudos de recuperação e reuso de cartuchos para extração em fase sólida.....	66
3.5. ANÁLISES QUÍMICAS.....	67
3.5.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	67
3.5.2. Carbono orgânico total (COT).....	68
3.5.3. Determinação de H_2O_2 residual pelo método do metavanadato de amônio.....	68
3.6. EXPERIMENTOS DE DEGRADAÇÃO.....	69
3.6.1. Degradação de etinilestradiol por processo Fenton.....	69
3.6.2. Degradação dos hormônios por processo foto-Fenton.....	70
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
4.1. DETERMINAÇÕES ESPECTROFOTOMÉTRICAS.....	72

4.1.1. Determinação do coeficiente de absorvidade molar do estradiol e do etinilestradiol em água.....	72
4.1.2. Estequiometria de inclusão de estradiol e etinilestradiol em β -ciclodextrina.....	75
4.1.3. Constantes de inclusão aparentes estradiol: β -ciclodextrina e etinilestradiol: β -ciclodextrina.....	76
4.1.4. Constante de complexação Fe^{2+} - β -ciclodextrina.....	80
4.1.5. Constante de complexação Fe^{3+} - β -ciclodextrina.....	85
4.2. PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS APLICADOS NA DETERMINAÇÃO DE ESTRADIOL E ETINILESTRADIOL.....	87
4.2.1. Estabelecimento da proporção da fase móvel e volume de injeção de estradiol e etinilestradiol.....	87
4.2.2. Parâmetros cromatográficos para estradiol e etinilestradiol.....	89
4.3. ESTUDOS DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO E RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	92
4.3.1. Etinilestradiol.....	92
4.3.2. Estradiol.....	94
4.4. DEGRADAÇÃO POR PROCESSO FENTON.....	96
4.4.1. Efeito do pH na concentração de etinilestradiol.....	96
4.4.2. Definição das condições de degradação do etinilestradiol.....	97
4.4.3. Efeito do pH na degradação de etinilestradiol por processo Fenton na ausência de β -ciclodextrina.....	101
4.4.4. Degradação do etinilestradiol por processo Fenton na presença de β -ciclodextrina.....	107
4.5. DEGRADAÇÃO POR PROCESSO FOTO-FENTON.....	112
4.5.1. Efeito do pH na degradação de etinilestradiol na ausência de β -ciclodextrina.....	112
4.5.2. Efeito da β -ciclodextrina na degradação de etinilestradiol em diferentes valores de pH.....	116
4.5.3. Efeito do pH na degradação de valerato de estradiol na ausência de β -ciclodextrina.....	121
4.5.4. Efeito da β -ciclodextrina na degradação de estradiol em diferentes valores de pH.....	124

5. CONCLUSÕES.....	127
6. PERSPECTIVAS.....	129
REFERÊNCIAS.....	130

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONTAMINANTES EMERGENTES

Uma das principais e mais recentes preocupações sociais é a proteção do ambiente e de seus recursos naturais.

Em algumas regiões do planeta, a água já se tornou escassa e o acesso a ela se torna cada vez mais difícil (Figura 1). O crescimento populacional e os avanços da agricultura e indústria fazem com que a demanda por recursos hídricos seja cada vez maior.

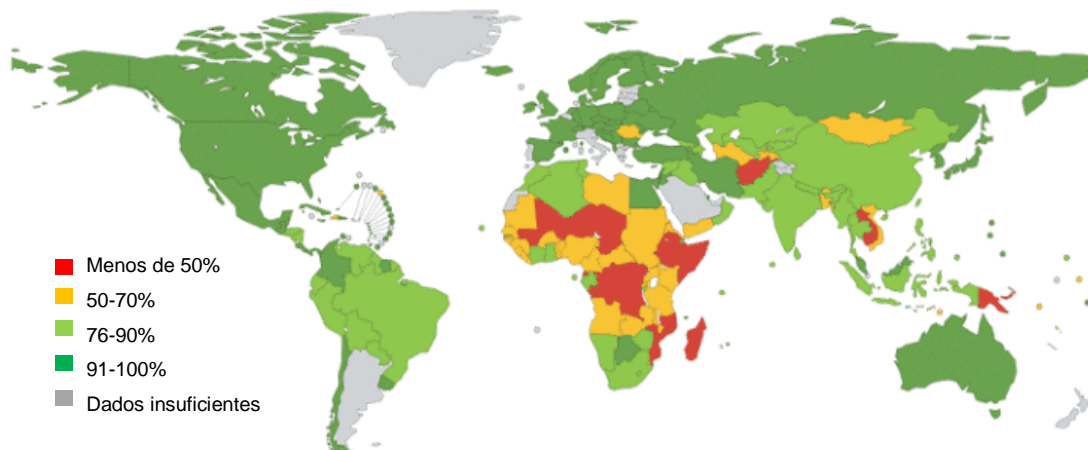


Figura 1. Porcentagem da população mundial com acesso a água potável em 2008 (Fonte: Ministério da Educação e Cultura).

Dessa maneira, se faz necessário o uso consciente da água, assim como a busca por alternativas que permitam o reuso da mesma.

Nas últimas décadas, com o aprimoramento de técnicas analíticas que permitiram a detecção e a quantificação de substâncias a nível traço, houve um aumento de substâncias detectadas em águas bem como a descoberta de diversos

micropoluentes em ambientes aquáticos. Esses micropoluentes, chamados de *contaminantes emergentes*, estão presentes em concentrações da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} (KVANLI et al., 2008; WELLS et al., 2009).

De maneira geral, os diversos contaminantes emergentes são substâncias associadas à industrialização, à agricultura e ao aumento populacional (BLASTO; PICÓ, 2009). O Quadro 1 apresenta alguns contaminantes emergentes aquáticos.

Quadro 1. Principais contaminantes aquáticos considerados emergentes.

Produtos de desinfecção	Bromatos, trihalometanos, ácido tricloroacético
Substâncias inorgânicas	Arsênio, chumbo, cobre, selênio, tálio
Substâncias orgânicas	Acrilamidas, benzopirenos, dioxinas, clorobenzenos, lindano, alquilfenóis
Fármacos	Diversas classes terapêuticas
Produtos de higiene pessoal	Fragrâncias, triclosan
Hormônios	Etinilestradiol, estrona, dietilestilbestrol, fitoestrógenos
Desinfetantes para tratamento de água	Cloraminas, dióxido de cloro

Fonte: ELJARRAT; BARCELÓ, 2003; USEPA, 2009.

Infelizmente, a legislação vigente não estabelece limites seguros para estes contaminantes, já que estes passaram a ser detectados no ambiente nas últimas décadas e a legislação se refere a contaminantes identificados há muitos anos atrás. Atualmente, estuda-se a ocorrência destes contaminantes, os efeitos deletérios

produzidos em organismos a eles expostos e as alternativas na remoção dos mesmos do ambiente (BOLONG et al., 2009).

1.1.1. Interferentes endócrinos

O termo interferente endócrino, do inglês *endocrine disruptor*, começou a ser empregado na década de 90 pela pesquisadora Theo Colborn para denominar substâncias químicas presentes no ambiente, capazes de se acumular no solo e nos sedimentos dos rios, contaminar a cadeia alimentar, se ligar a receptores endócrinos e promover alterações na síntese, secreção, metabolismo ou ação hormonais de organismos (COLBORN; SAAL; SOTO, 1993). Atualmente, o Programa Internacional de Segurança Química (International Programme on Chemical Safety, IPCS) define como interferente endócrino substâncias ou misturas presentes no ambiente capazes de interferir no sistema endócrino, causando efeitos adversos em um organismo intacto ou em sua prole (FONTENELLE et al., 2010).

Muitas substâncias químicas, algumas naturais outras sintéticas, têm sido identificadas como interferentes da atividade endócrina em organismos, inclusive em humanos (KUSTER et al., 2009).

Como principais substâncias que atuam como interferentes endócrinos estão algumas classes de pesticidas, conservantes, alguns surfactantes, plastificantes, medicamentos, hormônios naturais e sintéticos, entre outros (RICHARDSON; TERNES, 2005). O Quadro 2 mostra os principais interferentes endócrinos conhecidos, relatados na literatura.

Quadro 2. Principais interferentes endócrinos conhecidos.

Ftalatos	Pesticidas	Retardantes de chama
Alquilfenóis	DDT	Hidrocarbonetos
Octilfenol	Atrazina	policíclicos aromáticos
Nonilfenol	Lindano	Fitoestrógenos
Organoclorados	Bifenilas policloradas	Isoflavonas, lignanas
Bisfenol	Metais pesados	Estrógenos sintéticos
Bisfenol A	Chumbo	Dietilestilbestrol
Parabenos	Cádmio	17 α -etinilestradiol
Metilparabeno	Mercúrio	Estrógenos naturais
Etilparabeno	Zinco	17 β -estradiol
Benzilparabeno	Compostos de estanho	estrona

Fonte: BILA; DEZOTTI, 2007.

1.1.1.1. Fontes dos interferentes endócrinos no ambiente

A principal via de exposição a interferentes endócrinos é a água. Isso acontece porque a água atua como destino final de inúmeros contaminantes (TERNES et al., 1999).

A origem de interferentes endócrinos no ambiente pode ser dividida em fontes pontuais e não-pontuais. As fontes pontuais incluem descarga de esgotos municipal e industrial, efluentes da pecuária, lixiviação de aterros e liberação de esgoto doméstico. Já as fontes não-pontuais incluem descarte da agricultura, lixiviação de

asfalto e deposições atmosféricas (BOLONG et al., 2009; GHISELLI; JARDIM, 2007).

A presença de interferentes endócrinos em alimentos e água potável já foi descrita (BEDDING et al., 1982; HARTMANN; LACORN; STEINHART, 1998). Outras fontes de interferentes endócrinos são produtos de higiene pessoal, cosméticos, brinquedos, embalagens e até mesmo em material particulado na atmosfera. Estima-se que cerca de 90% dessas substâncias sejam absorvidas por via digestiva, embora também seja possível o contato por meio das vias respiratória e cutânea (BILA; DEZOTTI, 2007).

1.1.1.2. Efeitos observados em organismos

Os compostos interferentes endócrinos não apresentam uma estrutura química específica, mas promovem um mesmo efeito biológico (BLEDZKA; GRYGLIK; MILLER, 2009; LI et al., 2008).

Observou-se que interferentes endócrinos em concentrações de $1,0 \text{ ng L}^{-1}$ são capazes de promover efeitos biológicos em organismos. Entretanto, esse valor ainda é alvo de discussão, tendo em vista que outros fatores de cada indivíduo, fenotípicos e genotípicos, podem interferir no surgimento de tais efeitos (KUSTER et al., 2009).

Entre os vários efeitos provocados pelos interferentes endócrinos em organismos humanos descritos na literatura, os mais importantes incluem alterações na função reprodutiva, baixa contagem de células reprodutivas masculinas e infertilidade, crescimento celular desordenado e aumento da incidência de diferentes formas de câncer (CALIMAN; GAVRILESCU, 2009).

São também descritas alterações metabólicas como obesidade, diabetes e outros desvios de metabolismo (NEWBOLD; PADILLA-BANKS; JEFFERSON, 2009). Outros efeitos relatados incluem bioacumulação e toxicidade crônica (FONTENELLE et al., 2010).

Em organismos aquáticos diretamente expostos a estas substâncias, foram descritos efeitos como feminização de indivíduos machos, prejuízo em funções reprodutivas e embrionárias, e alterações nos ciclos de vida dos organismos expostos (HARMON, 2009; JUKOWSKY; WATZIN; LEITER, 2008).

1.1.2. Hormônios estrógenos

Os hormônios estrógenos são importantes interferentes endócrinos. Em mamíferos, os estrógenos são sintetizados principalmente nos ovários, e em outros tecidos como testículos, cérebro, hipotálamo, tecido adiposo e placenta. Hormônios estrógenos derivam de colesterol e pregnenolona, que são transformados em androstenediona e testosterona; estes últimos são os precursores diretos dos três principais estrógenos naturais: estrona, estradiol e estriol (COMBALBERT; HERNANDEZ-RAQUET, 2010).

Estrógenos são constituídos por 18 átomos de carbono, distribuídos em três anéis hexagonais, denominados A, B e C, e um pentagonal (D). A diferença na posição dos substituintes hidroxílicos no núcleo ciclopentano-fenantreno é o que diferencia as moléculas estrogênicas (Figura 2).

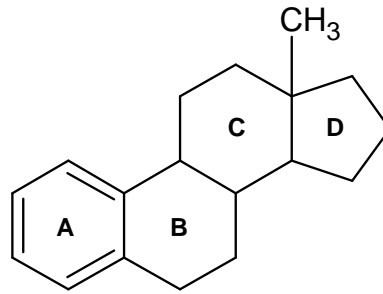


Figura 2. Estrutura química do núcleo ciclopentano-fenantreno.

A solubilidade dos estrógenos em água é baixa. Estudos mostram que a solubilidade aproximada dos estrógenos naturais é menor que a dos estrógenos sintéticos, e ambas variam entre valores de 3 a 19 mg L⁻¹ (SHAREEF et al., 2006). O coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) dos estrógenos varia entre 2,8 e 4,6, sendo que a hidrofobicidade é particularmente alta para estrógenos sintéticos. A baixa pressão de vapor denota a baixa volatilidade destes compostos (COMBALBERT; HERNANDEZ-RAQUET, 2010).

1.1.2.1. Estradiol e etinilestradiol

Neste trabalho, foi estudada a degradação de dois hormônios estrógenos, 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2), os quais são mostrados na Figura 3. Entretanto, devido à disponibilidade, este trabalho foi executado usando o valerato de 17 β -estradiol como modelo para a molécula de 17 β -estradiol.

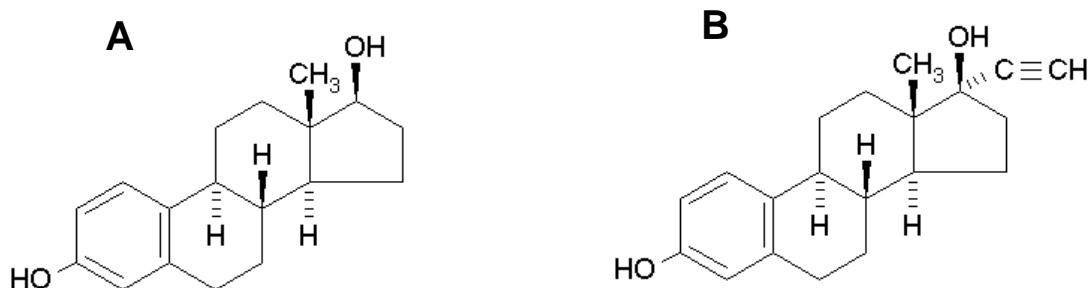


Figura 3. (A) Estrutura química do 17 β -estradiol e (B) do 17 α -etinilestradiol.

Tais substâncias são utilizadas principalmente na terapia de reposição hormonal feminina e em formulações de contraceptivos orais (NOPPE et al., 2005). O uso de estrógenos no tratamento de artrite reumatóide e na melhora dos sintomas do mal de Parkinson tem sido estudado nos últimos anos (CUTOLO, 2010; GILLIES; McARTHUR, 2010).

17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol têm, respectivamente, origem natural e sintética. Ambos são os mais potentes estrógenos conhecidos, quando comparados a outras moléculas de reconhecida estrogénica (Tabela 1).

Tabela 1. Estrogenicidade relativa de alguns hormônios.

Molécula	Atividade estrogênica relativa
17 β -estradiol	100
17 α -etinilestradiol	246
17 α -estradiol	0,26
estrona	2,54
Hormônios conjugados (produtos de metabolismo)	
17 β -estradiol 3-sulfato	2,5
17 β -estradiol 17-D-glucoronídeo	2,0

Fonte: LAI et al., 2000.

As principais fonte de estradiol e etinilestradiol são o aporte humano e a pecuária. Embora todos os mamíferos silvestres excretem hormônios estrógenos diariamente, a contribuição desta fonte é desconsiderada. A Tabela 2 mostra a estimativa de excreção diária dos dois hormônios por humanos.

Tabela 2. Excreção diária per capita de hormônios estrógenos (em μg).

	17 -estradiol	17 -etinilestradiol
Homens	1,6	-
Mulheres em menstruação	3,5	-
Mulheres em menopausa	2,3	-
Gestantes	259	-
Usuárias de contraceptivos orais	-	35

Fonte: JOHNSON; BELFROID; DI CORCIA, 2000.

Estima-se que no Brasil sejam vendidos anualmente cerca de 130 milhões de caixas de contraceptivos orais. Na década de 60, cada comprimido apresentava uma dose de hormônios estrogênicos que chegava a 150 µg; hoje, esta dose é menor que 50 µg por comprimido. De todo hormônio absorvido, uma parcela é metabolizada pelo organismo e o restante é excretado em sua forma não-metabolizada, biologicamente ativa (ANVISA, 2009).

São possíveis duas vias de excreção de estrógenos por humanos. A forma conjugada é solúvel em água e permite que os estrógenos sejam excretados na urina; tal forma corresponde a 80% do total diário. A forma livre dos estrógenos, biologicamente ativa, apresenta baixa solubilidade em água e é eliminada pelas fezes (GAULKE et al., 2009; SNYDER et al., 1998).

1.1.2.2. Hormônios como contaminantes ambientais

Estradiol e etinilestradiol contribuem com grande parcela dos contaminantes presentes em efluentes de estação de tratamento de esgoto com estrogenicidade (NOPPE et al., 2005).

Embora a forma conjugada dos estrógenos, biologicamente menos ativa, contribua com a maior parte dos metabólitos excretados por um organismo, o rompimento da conjugação ocorre no contato com bactérias presentes no ambiente, como coliformes termotolerantes, produtoras de enzimas hidrolíticas específicas. Esta hidrólise torna novamente ativos os estrógenos lançados nos corpos d'água (LOPES et al., 2010).

O crescimento contínuo da população mundial promoveu, nos últimos anos, um aumento significativo dos níveis ambientais de estradiol e etinilestradiol. Isto se

deve principalmente ao difundido uso de contraceptivos orais em mulheres em idade reprodutiva e como alternativa medicamentosa nas terapias de reposição hormonal, que se tornou mais frequente nos últimos anos. A ampla utilização destas substâncias como promotores de crescimento em animais de corte também contribui para o aumento de estrógenos no ambiente (ALVES et al., 2007; LI et al., 2008; TYLER et al., 2009).

A estabilidade química frente à degradação e a baixa volatilidade favorecem o depósito e a biomagnificação dos hormônios (KVANLI et al., 2008). No ambiente, o etinilestradiol é geralmente mais resistente à degradação do que o estradiol. Trabalhos anteriores afirmam que o estradiol permaneceu inalterado mesmo após ser submetido a 120 horas de tratamento em lodo ativado (HWANG et al., 2008; SNYDER et al., 1998).

Outros estudos mostram que quando submetidos a 12 horas diárias de irradiação natural simulada em laboratório, estes estrógenos apresentam meia-vida de pelo menos 10 dias, período considerado longo em termos ambientais (MAZELLIER; MÉITÉ; DE LAAT, 2008).

A eficácia na remoção dos hormônios pelos processos convencionais em estações de tratamento é questionada. Dessa maneira, os estrógenos retornam ao sistema de distribuição de água tratada em concentrações da ordem de ng L^{-1} , suficientes para promover os efeitos deletérios conhecidos (JANEX-HABIBI et al., 2009).

1.2. ALTERNATIVAS NA REMOÇÃO DE CONTAMINANTES AMBIENTAIS

A preocupação em manter os recursos naturais é especialmente importante no caso da água. Dessa maneira, é necessária a aplicação de métodos viáveis do ponto de vista tecnológico e econômico no tratamento e reutilização deste recurso. Algumas das tecnologias atuais disponíveis para o tratamento de água são mostradas no Quadro 3.

Quadro 3. Métodos convencionais de tratamento de água.

Tratamentos Físicos	Tratamentos Químicos
Adsorção por carvão ativado	Catálise
Centrifugação	Hidrólise
Destilação	Neutralização
Filtração	Oxidação
Floculação	Redução
Sedimentação	Precipitação
Ultrafiltração	Fotólise
Eletrodíálise	Ozonólise
Troca iônica	
Adsorção em material polimérico	Tratamentos Biológicos
Osmose reversa	Lodo ativado
Arraste a ar	Lagoa aerada
Cristalização por congelamento	Tratamento enzimático
Micro-ondas	Lagoa de estabilização
Extração líquido-líquido	Digestão anaeróbia

De maneira geral, os processos físicos envolvem transferência de fase, o que exige um posterior tratamento do contaminante. Além disso, os processos biológicos, hoje amplamente utilizados por serem de baixo custo, requerem um longo tempo de tratamento do efluente e podem receber contaminantes que não são passíveis de degradação pelos microorganismos envolvidos, fazendo com que permaneçam ainda como contaminantes nas lagoas de tratamento.

Atualmente, os métodos convencionais utilizados no tratamento de água são incapazes de remover alguns contaminantes orgânicos persistentes. A busca por alternativas mais eficazes é uma necessidade atual. Neste contexto, os processos oxidativos avançados constituem uma importante alternativa no tratamento de água.

1.2.1. Processos oxidativos avançados (POA)

Os processos oxidativos avançados (Quadro 4) são reconhecidos como uma importante possibilidade para o tratamento de efluentes contendo interferentes endócrinos persistentes no ambiente (KLAVARIOTI; MANTZAVINOS; KASSINOS, 2009; LIU; KANJO, MIZUTANI, 2009; MELO et al., 2009; ZHAO; HU; JIN, 2008). Estes processos geralmente empregam radiação ultravioleta ou visível, catálise metálica, ozônio, peróxido de hidrogênio, ou combinações destes, e exploram a característica de produzir radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$), espécies fortemente oxidativas (HABER; WEISS, 1934).

Quadro 4. Principais processos oxidativos avançados.

Ozonização	O ₃ /H ₂ O ₂ O ₃ /UV O ₃ /H ₂ O ₂ /UV
Fotólise de H₂O₂	H ₂ O ₂ /UV
Reagente de Fenton	Fe ²⁺ /H ₂ O ₂
Foto-Fenton	Fe ²⁺ ou Fe ³⁺ /H ₂ O ₂ /UV
Fotocatálise	TiO ₂ /UV TiO ₂ / H ₂ O ₂ /UV

A formação do radical hidroxila, uma espécie altamente reativa e não-seletiva, oxida uma grande variedade de compostos orgânicos, levando-os à água, dióxido de carbono e íons inorgânicos (LEGRINI; OLIVEROS; BRAUN, 1993).

A estrutura do contaminante orgânico rege o tipo de reação que ocorre com o radical hidroxila. Podem ocorrer reações como abstração de átomos de hidrogênio, adições eletrofílicas em moléculas insaturadas ou aromáticas, transferência eletrônica, quando as duas primeiras reações não são favorecidas, e finalmente, reações radical-radical, que são indesejadas pois podem consumir os radicais hidroxilas gerados durante a reação (NOGUEIRA et al., 2007).

1.2.1.1. O processo Fenton

Dentre os processos oxidativos avançados conhecidos, destaca-se o processo Fenton. A história deste processo data de 1894 quando H. J. Fenton relatou que o peróxido de hidrogênio poderia ser ativado por íons ferro na oxidação do ácido tartárico (FENTON, 1894).

O fundamento do processo está baseado na formação de radicais hidroxila provenientes da decomposição catalítica do peróxido de hidrogênio, em meio ácido (PIGNATELLO, 1992).



Na ausência de um substrato, o radical hidroxila formado oxida outro íon Fe^{2+} , como mostra a Equação 2.



Embora as espécies de ferro existam na forma de aquocomplexos quando em solução aquosa, as águas de hidratação foram omitidas a fim de simplificar as representações.

Os íons Fe^{3+} formados podem decompor H_2O_2 a H_2O e O_2 , de acordo com as Equações 3-7. É importante ressaltar que estas reações são dependentes do pH do meio, tendo em vista a exigência dos íons H^+ nas reações (NOGUEIRA et al. 2007).



A Equação 7 mostra que H_2O_2 pode atuar como sequestrante de radicais hidroxila. A formação do radical hidroperoxila ($\text{HO}_2\bullet$) é indesejada, pois o potencial de redução desta espécie é menor que de $\bullet\text{OH}$. Esse fato ocorre quando H_2O_2 está em excesso no meio: a reação entre Fe^{2+} e peróxido (Equação 1) é mais lenta que as reações de sequestro do radical hidroxila pela molécula de peróxido (Equação 7) (JIANG et al., 2010).

A reação de Fenton já foi utilizada na degradação de muitos contaminantes persistentes como clorofenóis, clorobenzenos, halometanos, aminas, entre outros. Entretanto muitas moléculas ainda são resistentes ao tratamento oxidativo como acetona, metanol, parafinas, etc. (BAUTISTA et al., 2008; PERA-TITUS et al., 2004).

1.2.1.2. O processo foto-Fenton

A utilização de radiação UV ou visível potencializa o processo Fenton e, conseqüentemente, a degradação de compostos orgânicos (PIGNATELLO, 1992). O então denominado processo foto-Fenton promove formação adicional de radicais hidroxila e íons Fe^{2+} , tornando estes últimos novamente disponíveis para a oxidação (Equações 8 e 9).



Os íons Fe^{2+} produzidos na Equação 9 voltam a ser oxidados na reação de Fenton, formando um ciclo $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$.

Como mencionado anteriormente, os íons ferro, quando em solução aquosa, estão na forma de aquocomplexos. Por exemplo, em pH 0 e na ausência de outros ligantes, o Fe^{3+} está na forma de $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$. O aumento do pH promove a hidrólise deste aquocomplexo, formando espécies hidroxiladas, cuja proporção depende do pH (Figura 4).

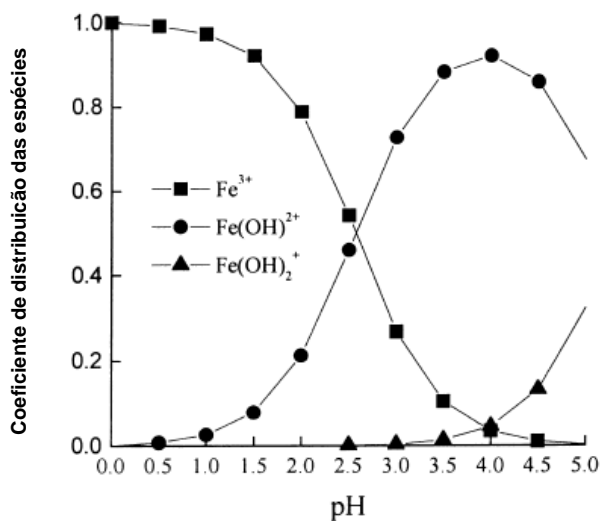


Figura 4. Distribuição das espécies hidroxiladas de Fe^{3+} em meio aquoso, de acordo com o pH ($\leq 5,0$). Fonte: FENG; NANSHENG, 2000.

A proporção de cada espécie de ferro muda em cada faixa de pH. Observa-se, por exemplo, que a espécie predominante em pH 2,0 é Fe^{3+} , enquanto que em pH 4,0, a espécie predominante é $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$.

Cada uma das espécies hidroxiladas de ferro possui um espectro de absorção diferente, o que resulta em diferentes rendimentos quânticos de formação de $\bullet\text{OH}$ (FENG; NANSHENG, 2000).

A absorvidade destas espécies hidroxiladas em geral se estende até o comprimento de onda na região do visível, o que permite a utilização de irradiação

solar na geração de radicais hidroxila (FENG; NANSHENG, 2000; NOGUEIRA et al., 2007).

Concomitante ao processo foto-Fenton, a radiação pode promover a fotólise do peróxido de hidrogênio, gerando dois radicais hidroxila (Equação 10). Entretanto, a contribuição desta reação no processo foto-Fenton é limitada, visto que a absorvidade do peróxido de hidrogênio é muito baixa (cerca de $20 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em 254 nm e desaparece acima de 350 nm). Além disso, a contribuição depende da alta concentração de H_2O_2 , da baixa concentração de Fe^{2+} no meio e da fonte de irradiação.

A recombinação de radicais hidroxila formados regenerando o H_2O_2 pode ocorrer, embora esta reação seja pouco importante para a redução da disponibilidade de $\bullet\text{OH}$ (LEGRAND; OLIVEROS; BRAUN, 1993; NOGUEIRA et al., 2007).



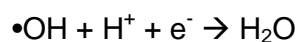
Lofrano e colaboradores (2009) compararam os processos Fenton, foto-Fenton e fotocatalise na oxidação do catecol, um contaminante orgânico. A equipe avaliou a porcentagem de mineralização alcançada e a redução na aromaticidade, observada no comprimento de onda de 280 nm. Enquanto, uma pequena redução nestes valores foi observada com a fotocatalise, o processo foto-Fenton promoveu a mineralização quase completa do catecol, assim como significativa redução na aromaticidade da amostra.

1.2.1.3. Vantagens e limitações dos processos Fenton

É possível salientar vantagens do processo Fenton, como reagentes de baixo custo e ambientalmente seguros – por exemplo o ferro, que é atóxico e abundante na natureza e o peróxido, que é de fácil manuseio se decompõe em CO₂ e H₂O; não há limitações de transferência de massa devido à natureza homogênea da reação. Além disso, a oxidação é eficiente em condições brandas de reação, que incluem temperatura e pressão ambientais, simplificando a aplicação do processo (BIGDA, 1995; PIGNATELLO; OLIVEROS; MacKAY, 2006).

A presença de alguns íons inorgânicos como cloreto, sulfato e fosfato, por exemplo, pode causar a complexação do íon ferro ou ainda, agir como sequestrante de radicais hidroxila (DE LAAT; LE; LEGUBE, 2004).

Uma das grandes limitações dos processos Fenton é a estreita faixa de pH em que a reação é viável. A maior eficiência para valores de pH entre 2,5 e 3,0 é decorrente da precipitação de Fe³⁺ em valores de pH altos, o que diminui a interação do íon com peróxido de hidrogênio e, conseqüentemente, a produção de •OH (SAFARZADEH-AMIRI; BOLTON; CATER, 1996). Em valores de pH inferiores a 2,5, a alta concentração de H⁺ pode promover o sequestro de radicais hidroxila e reduzir a eficiência da reação, de acordo com a Equação 12 (SPINKIS; WOODS, 1990). Além disso, o Fe³⁺, espécie predominante em pH < 2, apresenta baixa absorvidade e não contribui para a geração de radicais •OH em valores de pH muito baixos.



$$k_{12} = 7,0 \cdot 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1} \quad (12)$$

A limitação da faixa de pH tem sido contornada com a utilização de complexos orgânicos de ferro. Tais complexos permitem a estabilização do ferro em uma faixa de pH mais ampla do que a conhecida e estendem a faixa de absorção de radiação para a região do visível (ZUO; HOIGNÉ, 1992). Além disso, moléculas como ciclodextrinas, que são capazes de complexar o ferro, têm sido descritas como uma interessante alternativa na minimização dos efeitos de precipitação apresentados pelo íon (TARR, 2001).

1.3. CICLODEXTRINAS

1.3.1. Histórico

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos constituídos por seis (α), sete (β), oito (γ) ou mais unidades de glicose unidas por uma ligação α -(1,4). Elas também são conhecidas por cicloamiloses, ciclomaltoses ou dextrinas de Schardinger (CONNORS, 1997; VENTURINI, 2005). As ciclodextrinas são resultado de uma transglicosilação intramolecular do amido pela enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), presente em bactérias como o *Bacillus macerans* (MOSINGER et al., 2001).

Em 1891, Villiers observou que a digestão do amido gerava uma pequena quantidade de cristais, após a precipitação em álcool. O pesquisador determinou que os cristais possuíam a fórmula mínima $C_6H_{10}O_3 \cdot 3H_2O$ e os nomeou “celulosina”.

Schardinger, em 1911, descobriu que a bactéria *Bacillus macerans*, isolada anos antes, produzia uma quantidade significativa de duas substâncias - entre 25 e 30% - a partir do amido. O autor nomeou os produtos de α -dextrina e β -dextrina

cristalizadas. Somente em 1935, a γ -dextrina foi isolada (apud VENTURINI et al., 2008).

A partir de então, foram desenvolvidos inúmeros métodos de produção e isolamento de ciclodextrinas. Em 1942, as estruturas da α - e β -dextrina foram determinadas por cristalografia de raio-X e descobriu-se que as estruturas possuíam uma organização cíclica, informação agregada a seus nomes; em 1948, foi conhecida a estrutura da γ -ciclodextrina (apud DEL VALLE, 2004).

No início da década de 70, a obtenção das ciclodextrinas ainda apresentava alto custo e a utilização em humanos era temida, uma vez que suspeitava-se que as moléculas fossem tóxicas. Alguns anos depois, a toxicidade das ciclodextrinas foi refutada após estudos toxicológicos adequados, o que acarretou o aumento nas pesquisas na área biológica (SZEJTLI, 1998).

1.3.2. Propriedades e aspectos estruturais das ciclodextrinas

Como os monômeros de glicose estão unidos por ligações do tipo α -(1,4), a configuração mais estável da ciclodextrina tem a forma característica de cone. Como consequência das ligações 4C_1 , as hidroxilas secundárias estão situadas na cavidade da molécula, enquanto as hidroxilas primárias estão dispostas na região externa da ciclodextrina. Essa disposição confere à molécula uma superfície exterior de alta polaridade e uma cavidade menos polar, decorrente da alta densidade eletrônica promovida pelos pares de elétrons não ligados dos oxigênios glicosídicos (LOFTSSON; STEFANSSON, 1997; SONG et al., 2009; SZEJTLI, 1998). Além disso, a configuração das ligações 4C_1 é a responsável pelo cone com superfície

mais larga formada pelos grupos hidroxila secundários e mais estreita pelos grupos hidroxila primários (SAENGER et al.,1998).

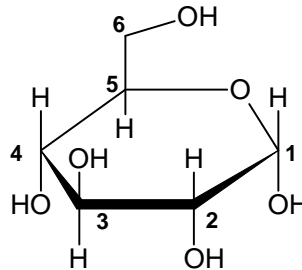


Figura 5. Estrutura química da glicose (α -D-glicopiranosose).

As mais importantes ciclodextrinas de ocorrência natural são a α -, β - e γ -ciclodextrina (Figura 6). São denominadas “naturais” por serem obtidas diretamente do amido.

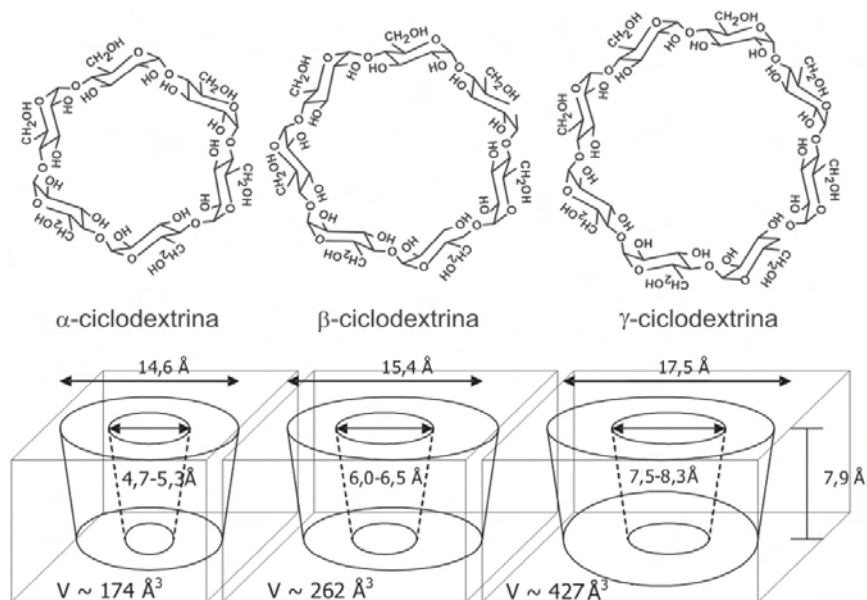


Figura 6. Estrutura e dimensões das ciclodextrinas. Fonte: VENTURINI et al., 2008.

Entre as três ciclodextrinas, a de maior interesse comercial e científico é a β -ciclodextrina. A preferência se deve ao tamanho da cavidade, que permite acomodar porções apolares de moléculas comuns; associado a isto, a β -ciclodextrina é a ciclodextrina de maior acessibilidade e menor custo (FENYVESI et al., 2004; MEHTA et al., 2005; WANG et al., 2006; ZARZYCKI; KULHANEK; SMITH, 2002).

Algumas propriedades são listadas na Tabela 3.

Tabela 3. Principais características das ciclodextrinas de ocorrência natural.

	α	β	γ
Número de unidades de glicose	6	7	9
Massa molar (g mol ⁻¹)	972	1135	1297
Solubilidade em água em g L ⁻¹ , a 25 °C	145	18,5	232
Forma dos cristais	Hexagonal	Quadrático	Prismático
% água (m/m)	10,2	13,2-14,5	8,13- 17,7
pK	12,33	12,20	12,08
Número de moléculas de água na cavidade	5-6	6-7	17
Rotação específica, a 25 °C	+150 ± 0,5	+162,5 ± 0,5	+177,4 ± 0,5

Fonte: adaptado de CONNORS, 1997; MOSINGER et al., 2001; SZEJTLI, 1998.

As ciclodextrinas modificadas surgiram a partir da necessidade de alterar ou melhorar suas estruturas para obter substâncias mais adaptadas aos âmbitos industrial e científico. Devido ao fato de serem compostos polihidroxílicos, as

ciclodextrinas podem ser transformadas em uma grande variedade de derivados. Os derivados são geralmente produzidos por aminações, esterificações ou eterificações da hidroxila primária da molécula. As derivatizações realizadas nas hidroxilas secundárias do macrociclo são menos comuns (HARATA, 1998; MOSINGER et al., 2001).

Dependendo da derivatização realizada, a solubilidade da ciclodextrina modificada pode ser diferente da solubilidade da molécula parental. Boa parte das moléculas modificadas apresenta mudança de volume da cavidade hidrofóbica; as alterações realizadas podem ser capazes de melhorar a estabilidade química ou a reatividade da ciclodextrina (DEL VALLE, 2004).

A alta solubilidade das ciclodextrinas em água e em outros solventes polares é justificada pela distribuição dos grupos hidrofílicos e hidrofóbicos. O interior da cavidade é ocupado pelos pares de elétrons livres das pontes de hidrogênio glicosídicas, o que gera uma alta densidade eletrônica e um caráter de base de Lewis, conferindo características apolares à cavidade. Os grupos hidrofílicos estão situados na superfície externa da molécula, o que proporciona uma destacada solubilidade em água (LOFTSSON; STEFANSSON, 1997).

1.3.3. Complexos de inclusão ciclodextrina:substrato

As ciclodextrinas formam complexos de inclusão não covalentes com uma grande variedade de substratos de média e baixa solubilidade em água, tendo como condição fundamental a possibilidade do substrato em se adaptar à cavidade, ainda que parcialmente (VENTURINI et al., 2008).

São comuns quatro tipos de estequiometria de inclusão ciclodextrina:substrato: 1:1, 1:2, 2:1 e 2:2 (Figura 7), os quais dependem do tamanho e das características químicas e estruturais do substrato (CHALUMOT et al., 2009; SONG et al., 2009).

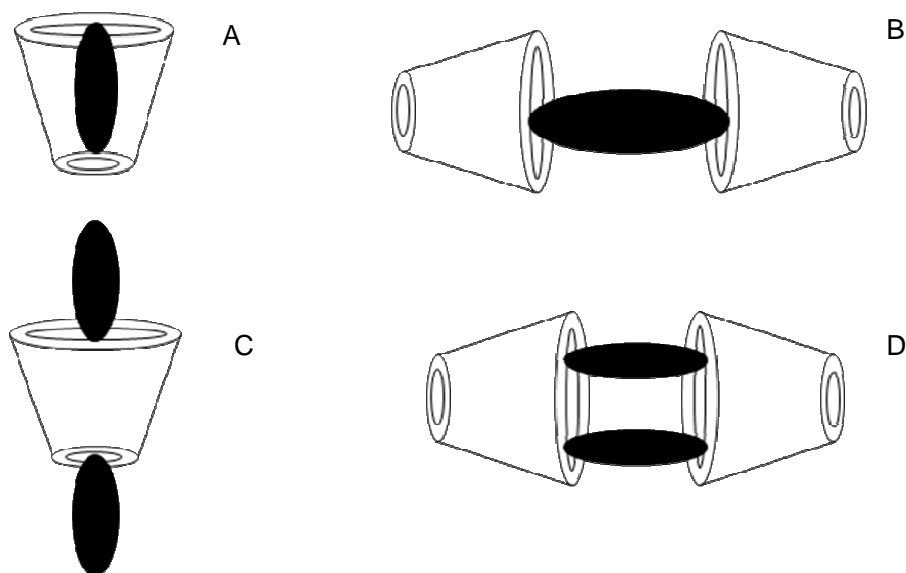


Figura 7. Representação esquemática das estequiometrias de inclusão entre ciclodextrina e substrato. (A) 1:1. (B) 2:1. (C) 1:2. (D) 2:2.

Embora exista a possibilidade de diversas estequiometrias de inclusão entre ciclodextrina e substrato, a mais comum delas é a 1:1. Isso acontece devido ao tamanho da maioria das moléculas disponíveis para inclusão, que é compatível com apenas uma molécula de ciclodextrina (CONNORS, 1997).

A equação do equilíbrio da inclusão 1:1 é descrita pela Equação 13, onde S é o substrato e L é o ligante, no caso a ciclodextrina.



Dessa maneira, a constante de equilíbrio da inclusão 1:1 pode ser descrita pela Equação 14.

$$K = \frac{[SI]}{[S][L]} \quad (14)$$

A constante de equilíbrio é mensurável e é determinada frequentemente por técnicas espectroscópicas, como UV/Vis e fluorescência. Os métodos mais difundidos levam os nomes de seus autores e são amplamente utilizados no meio científico (BENESI; HILDEBRANDT, 1949; HIGUCHI; CONNORS, 1965).

1.3.3.1. Mecanismos de inclusão

O fenômeno de reconhecimento molecular do substrato pela ciclodextrina não envolve interações covalentes, mas interações como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas, interações dipolo-dipolo, transferências de cargas e efeitos estéricos (SONG et al., 2009).

Moléculas pequenas formam facilmente complexos de inclusão com α - e β -ciclodextrina, já que existe compatibilidade entre o volume do substrato e da ciclodextrina. No caso da γ -ciclodextrina, se acaso a molécula for muito pequena, o encaixe no macrociclo se torna desfavorável, já que a cavidade é muito maior que a molécula.

As extremidades da cavidade da ciclodextrina isolada são abertas, permitindo que o substrato penetre no macrociclo por ambos os lados (VENTURINI, 2005). Em solução aquosa, a cavidade apolar é ocupada por moléculas de água que são energeticamente desfavoráveis, dada a natureza da interação polar-apolar; assim,

essas moléculas podem ser facilmente substituídas por um substrato que seja menos polar que a água. É admitido que a força motriz para a complexação seja a substituição das moléculas de água de alta entalpia por substratos de menor entalpia (SZEJTLI, 1998; VENTURINI et al., 2008).

Em relação ao mecanismo de inclusão, é possível afirmar que importantes contribuições para a termodinâmica da incorporação são originárias da entrada do substrato na cavidade da ciclodextrina e da quebra da estrutura de solvatação do substrato orgânico (ROSS; REKHARSKY, 1996). Deve-se considerar que a natureza e a força motriz da inclusão em solventes orgânicos podem ser diferentes daquelas em água, dependendo da natureza prótica ou aprótica dos mesmos.

1.3.3.2. Caracterização dos complexos de inclusão

A formação de complexos de inclusão provoca mudanças significativas nas características do substrato, ou seja, as propriedades físicas e químicas que o substrato apresenta neste microambiente, de polaridade reduzida e geometria restrita, são diferentes daquelas apresentadas em fase aquosa. Além disso, a molécula anteriormente hidrofóbica, sob complexação, torna-se hidrofílica (DEL VALLE, 2004).

A caracterização dos complexos de inclusão pode ser feita por meio de diversas técnicas de análise como ressonância magnética nuclear, dicroísmo circular, espectrofotometria no UV/Vis, espectroscopia de fluorescência, análise termogravimétrica, entre outras (HEDGES, 1998; MOSINGER et al, 2001; WIMMER et al., 2002).

Yañes e colaboradores (2007) investigaram a formação de complexos de inclusão entre estrona e estradiol, dois hormônios estrógenos, e β -ciclodextrina. Para tanto, foram utilizadas as técnicas de voltametria de pulso diferencial e cromatografia líquida de alta eficiência. As mudanças observadas nas propriedades eletroquímicas dos hormônios na presença de ciclodextrina permitiram a determinação da estequiometria de inclusão bem como da constante de inclusão.

Stancanelli e colaboradores (2008) avaliaram a formação de complexos de inclusão entre uma molécula imunoativa semi-sintética, o 9-fluorenon-2-carboxiéster, e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Para tanto, os pesquisadores utilizaram técnicas de UV/Vis e FTIR. Foi concluído que a estequiometria de inclusão entre as duas moléculas era 1:1, e que a constante de inclusão era próxima de 10^4 L mol^{-1} .

Mehta e colaboradores (2005) caracterizaram o complexo de inclusão formado entre rifampicina, um antibiótico de baixa solubilidade em água utilizado no tratamento da tuberculose, e ciclodextrina por meio de técnicas, como espectrofotometria no UV/Vis e condutimetria. Foi determinado que a associação entre o antibiótico e o macrociclo era fraca, atribuída a fatores termodinâmicos.

Li e Xu (2010) utilizaram as técnicas de FTIR e calorimetria por varredura diferencial para avaliar a influência de diferentes métodos de preparo de complexos de inclusão entre berberina e β -ciclodextrina e concluíram que os métodos propostos resultaram na formação dos complexos de inclusão desejados.

1.3.4. Aplicações das ciclodextrinas

1.3.4.1. Aplicações industriais

Como mencionado anteriormente, a formação de complexos de inclusão entre ciclodextrinas e inúmeros substratos altera as propriedades físicas e químicas da molécula inclusa. Essa propriedade torna a ciclodextrina muito atraente do ponto de vista técnico e industrial. Além disso, a constatação da baixa toxicidade da ciclodextrina favorece a aplicação da mesma em diversos setores industriais (SZEJTLI, 1998).

Na indústria farmacêutica, a aplicação da ciclodextrina visa o aumento da estabilidade química do fármaco (LOFTSSON; BREWSTER, 1996; UZQUEDA et al., 2010), aumento da solubilidade de fármacos pouco solúveis em água (PARMAR et al., 2009; YU; HUANG, 2010), melhora na biodisponibilidade de algumas substâncias (AGUEROS et al., 2009; MADAN et al., 2010) ou ainda, como molécula carreadora de fármacos (RAJEWSKI; STELLA, 1996). Além disso, o emprego da ciclodextrina na redução de efeitos alergênicos já foi relatado (FENYVESI et al., 2004).

A indústria de alimentos utiliza a ciclodextrina na eliminação de sabores e odores indesejáveis formados durante o processamento industrial, na redução de material gorduroso de produtos lácteos, na estabilização de corantes e aromatizantes (DEL VALLE, 2004; HEDGES, 1998).

Na indústria química, a ciclodextrina pode catalisar hidrólises e oxidações, ou mesmo acelerar processos enzimáticos. A área têxtil aplica o macrociclo na estabilização de corantes e no prolongamento da liberação de perfumes, e a

cosmética busca maior durabilidade de ativos constituintes de uma formulação na presença de ciclodextrina (HEDGE, 1998; SINGH; SHARMA; BANERJEE, 2002).

1.3.4.2. Aplicações em química analítica

Pode-se destacar o emprego da ciclodextrina em técnicas analíticas como cromatografia e eletroforese.

Cromatografia

Ciclodextrinas têm sido extensivamente utilizadas em métodos de separação. Elas são capazes de diferenciar isômeros de posição, grupos funcionais e enantiômeros. Recentemente, a propriedade de enantiosseletividade tem sido muito explorada (BARKER; WORM; DOLLE, 2009; BHUSHAN; KUMAR, 2009; TANG et al., 2010).

As moléculas de ciclodextrinas são utilizadas principalmente em cromatografia líquida, a gás e em fluido supercrítico, em cromatografia em camada delgada, em extrações em fases líquida e sólida, em técnicas eletroforéticas, entre outras (MOSINGER et al., 2001).

Bicchi e colaboradores (2010) utilizaram uma β -ciclodextrina modificada para separar estereosseletivamente um óleo essencial de lavanda por meio de cromatografia a gás com detecção de ionização em chama e espectrometria de massas. Os resultados mostraram que, após a otimização dos parâmetros cromatográficos, a ciclodextrina atuou como um excelente seletor quiral.

Eletroforese

Esta técnica é frequentemente utilizada na separação quiral de enantiômeros ou na sua quantificação. São passíveis de utilização tanto ciclodextrinas de ocorrência natural quanto suas modificações (CHI et al., 2009; HA et al., 2004).

Béni e colaboradores (2010) separaram as formas enantioméricas de um analgésico utilizando eletroforese capilar, cujo revestimento foi modificado por diversos tipos de ciclodextrinas. Os complexos de inclusão foram caracterizados por ressonância magnética nuclear, e a porção da molécula inclusa na cavidade da ciclodextrina pode ser determinada por esta técnica. A presença do macrociclo se mostrou excelente na separação dos enantiômeros.

1.3.4.3. Aplicações em química ambiental

Ciclodextrinas desempenham um importante papel em aplicações ambientais, onde a formação de complexos de inclusão promove solubilização de contaminantes orgânicos, enriquecimento e remoção de poluentes orgânicos e metais pesados do solo, água e atmosfera (BIZZIGOTTI, REYNOLDS, KUEPER, 1997; WANG; BRUSSEAU, 1995).

No tratamento de águas, Wu e Fan (1998) afirmaram a inclusão de contaminantes em ciclodextrinas aumenta a remoção dos mesmos. Usando ciclodextrinas, substâncias tóxicas podem ser removidas de efluentes industriais por meio da formação de complexos de inclusão (apud SINGH; SHARMA; BANERJEE, 2002).

A utilização de ciclodextrinas na potencialização de processos de degradação de poluentes foi proposta por diversos autores. Wang e colaboradores (2007)

aplicaram diferentes ciclodextrinas na fotodegradação de um interferente endócrino originário da indústria de plásticos e resinas, utilizando uma lâmpada UV com emissão em 254 nm como fonte de irradiação. Eles concluíram que a presença de ciclodextrina aumentava a eficiência da fotodegradação em cinco vezes e que a β -ciclodextrina reduzia a concentração do contaminante a 85% da inicial, diferente dos 15% de redução observado quando o poluente foi irradiado na ausência de β -ciclodextrina.

Kamiya e Nakamura (1995) compararam o efeito da ciclodextrina na fotólise do pesticida parathion e seu produto de oxidação, paraoxon. Os pesquisadores concluíram que, no caso do parathion, a ciclodextrina prejudicou a redução na concentração do pesticida, diferente do paraoxon, onde o macrociclo potencializou a fotólise da molécula.

Outro importante papel das ciclodextrinas na proteção ambiental é seu uso em formulações de pesticidas. Subba e colaboradores (2000) utilizaram ciclodextrinas para aumentar a solubilidade de um inseticida natural, a azadiractina-A. Com a maior disponibilidade do agente, foi possível a redução do volume de inseticida utilizado (apud SINGH; SHARMA; BANERJEE, 2002).

Na remediação de solos, a ciclodextrina já foi utilizada no tratamento de uma área contaminada por 2,4,6-trinitro-tolueno, a partir da melhora da solubilidade do contaminante e o posterior tratamento por processo foto-Fenton (YARDIN; CHIRON, 2006).

Segundo Bardi e colaboradores (2000), a biocompatibilidade e a degradação efetiva de contaminantes na presença de ciclodextrina sugere que o macrociclo seja uma ferramenta útil nos processos biorremediativos.

Embora seja interessante na remoção de contaminantes ambientais, os processos de remediação envolvendo ciclodextrinas apresentam um alto custo e por isso, sua aplicabilidade deve ser discutida (BONENFANT et al, 2009).

1.3.4.4. Outras aplicações

A versatilidade dos complexos de inclusão permite diversificar o uso das ciclodextrinas. O Quadro 5 exhibe outros exemplos da utilização dos macrociclos em diferentes segmentos.

Quadro 5. Outras aplicações das ciclodextrinas.

Área de aplicação	Uso	Benefício
Adesivos	Catalisador de reações	Melhoria dos filmes coesivos
Alimentícia	Conservação de aditivos de alto custo	Redução de custo
Papel	Redução na quantidade de oxidantes requerida	Redução de custo, ambientalmente adequado
Testes de diagnósticos	Maior eficiência entre reagentes	Melhores resultados, com mínimas interferências
Odontologia	Aditivos em formulações	Agentes antiplaca mais palatáveis e efetivos
Agroquímica	Melhora na dispersão de ativos, utilizando somente veículos aquosos	Redução de custos, minimização de toxicidade
Tintas	Compatibilidade entre componentes da mistura	Melhoria nas propriedades do produto

Fonte: adaptado de SINGH; SHARMA; BANERJEE, 2002.

1.4. CICLODEXTRINAS E OS PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS

Estudos mostram que a degradação de poluentes ambientais pelo processo Fenton pode ser potencializada na presença de ciclodextrinas. Isso se deve à formação, em solução aquosa, de complexos ternários entre o composto orgânico alvo, ciclodextrina e Fe^{2+} (LINDSEY et al., 2003).

Zheng e Tarr (2006) utilizaram ressonância magnética nuclear e espectroscopia de fluorescência para avaliar a formação de complexos ternários entre ferro, 2-naftol e diferentes tipos de ciclodextrina em solução aquosa. Foi concluído que houve formação de complexos ternários com a maioria das ciclodextrinas estudadas.

Os processos Fenton requerem baixos valores de pH a fim de manter a solubilidade do ferro e prevenir a formação de óxidos e hidróxidos insolúveis do elemento, o que inviabilizaria a reação. Entretanto, Lindsey e colaboradores (2003) mostraram que, na presença de ciclodextrina, experimentos de degradação utilizando o processo Fenton sem ajuste de pH apresentaram resultados similares aos que tiveram o pH ajustado em 3,0.

Além de formar os complexos ternários, as ciclodextrinas são capazes de minimizar a ação de sequestrantes de radicais hidroxilas, por exemplo, íons cloreto ou carbonato, que podem diminuir a eficiência do processo Fenton. Na presença de ciclodextrinas, a formação dos radicais hidroxila ocorre nas proximidades de onde ele será consumido, o que diminui a probabilidade dos radicais serem sequestrados (LINDSEY et al., 2003).

Outra propriedade das ciclodextrinas é de aumentar a solubilidade de moléculas pouco solúveis em água, como benzo[a]pirenos por exemplo, tornando-as mais disponíveis para a degradação por processos Fenton (VEIGNIE et al., 2009).

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar a influência de β -ciclodextrina na eficiência de degradação dos hormônios estrógenos 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol por processo Fenton e foto-Fenton, utilizando irradiação artificial.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. REAGENTES

- Hormônios estrógenos valerato de 17β -estradiol (E2) e 17α -etinilestradiol (EE2) (Pharma Nostra)
- β -ciclodextrina (β -CD) 98% (Sigma-Aldrich)
- Peróxido de hidrogênio 29% (m/m) (Synth)
- Metanol grau CLAE (J.T. Baker)
- Ácido acético (Qhemis)
- Ácido sulfúrico (Synth)
- Hidróxido de sódio (Synth)
- Sulfato de ferro (II) heptahidratado (Carlo Erba)
- Sulfato de ferro (III) hidratado (J. T. Baker)
- Metavanadato de amônio (Vetec)

3.2. PREPARO DE SOLUÇÕES

3.2.1. Preparo de solução de valerato de estradiol (E2) na ausência e na presença de β -ciclodextrina

Foi preparada uma solução-estoque de E2 em metanol na concentração de $1,0 \text{ g L}^{-1}$.

Na ausência de β -CD, diluiu-se 1,0 mL dessa solução-estoque em 1,0 L de água ultrapura, de maneira que a concentração do metanol na solução de hormônio

não ultrapassasse 0,1% (v/v) e a concentração aproximada do hormônio em água fosse próxima a 10 mg L^{-1} , que é o limite de solubilidade do valerato de E2, observado experimentalmente. A solução foi, então, agitada por cerca de 10 minutos no escuro.

Na presença de β -CD, dissolveu-se em 1,0 L de água ultrapura cerca de 45 mg do macrociclo e adicionou-se, em seguida, 1,0 mL da solução-estoque de E2 anteriormente preparada. A solução foi agitada por 10 minutos, também no escuro. A massa de β -CD foi calculada a partir da relação estequiométrica 2:1 de β -CD:E2, a fim de garantir que todas as moléculas de hormônio estivessem inclusas.

As soluções foram imediatamente utilizadas após o preparo.

3.2.2. Preparo de solução de etinilestradiol (EE2) na ausência e na presença de β -ciclodextrina

Na ausência de β -CD, soluções de EE2 foram preparadas a partir da dissolução de cerca de 15 mg do hormônio em 1 L de água ultrapura, submetidos à agitação por uma noite, em frasco tampado. Já na presença de β -CD, cerca de 15 mg de EE2 e 100 mg de β -CD foram dissolvidos em 1 L de água ultrapura, e igualmente submetidos a agitação por uma noite. A massa de β -CD foi calculada a partir da relação estequiométrica 2:1 de β -CD:EE2, a fim de garantir que todas as moléculas de hormônio estivessem inclusas.

Em seguida, as soluções foram filtradas a vácuo em membrana de nitrato de celulose, de porosidade igual a $0,45 \mu\text{m}$. O filtrado foi acondicionado em frasco âmbar, sob refrigeração, por um período máximo de 4 dias.

3.3. DETERMINAÇÕES ESPECTROFOTOMÉTRICAS

Nas determinações em que a técnica de espectrofotometria foi empregada, utilizou-se um espectrofotômetro Shimadzu UV mini-1240.

3.3.1. Determinação do coeficiente de absorvidade molar de estradiol e etinilestradiol em água

Foram preparadas soluções-estoque 10 mmol L^{-1} de cada hormônio; para tanto, dissolveu-se 0,0365 g de valerato de E2 (que corresponde a 0,0272g de E2 em sua forma livre) e 0,0296 g de EE2 em 10 mL de metanol cada. As soluções-estoque foram acondicionadas em frascos âmbar e mantidas sob congelamento.

A partir da diluição dos estoques, foram preparadas em água ultrapura soluções de concentração entre 0 e $0,03 \text{ mmol L}^{-1}$ para E2 e entre 0 e $0,08 \text{ mmol L}^{-1}$ para EE2. As respectivas concentrações foram estabelecidas de acordo com a solubilidade máxima dos hormônios em água.

O caminho óptico da cubeta de quartzo utilizada foi de 1,0 cm. Os espectros de absorção das soluções foram registrados no intervalo de 200 a 400 nm em espectrofotômetro UV/Vis e o comprimento de onda no qual ambas as substâncias apresentaram máximos de absorção foi 280 nm. Para este comprimento de onda, foi construído o gráfico do valor de absorbância obtido em função da concentração, em mol L^{-1} ; a inclinação da reta da representação gráfica corresponde ao coeficiente de absorvidade molar da substância, dado em $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.3.2. Determinação da estequiometria de inclusão dos hormônios em β -ciclodextrina

A estequiometria de inclusão E2: β -CD e EE2: β -CD foi determinada por espectrofotometria de UV/Vis, utilizando o método descrito por Job em 1928 (apud JULLIAN et al., 2008).

As soluções foram preparadas de acordo com as concentrações mostradas na Tabela 4, a partir da diluição de soluções-estoque dos hormônios e da β -CD, previamente preparadas.

Imediatamente após o preparo, a absorbância das soluções foi medida no comprimento de onda de 280 nm. Os resultados foram expressos como a fração molar do hormônio na solução *versus* o produto entre a absorbância e a concentração de β -CD.

Tabela 4. Concentrações de E2, EE2 e β -CD usadas na determinação da estequiometria de inclusão.

Fração molar do hormônio	E2 (mol L ⁻¹)	β -CD (mol L ⁻¹)	EE2 (mol L ⁻¹)	β -CD (mol L ⁻¹)
0	0	$3,0 \cdot 10^{-5}$	0	$6,0 \cdot 10^{-5}$
0,2	$0,6 \cdot 10^{-5}$	$2,4 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-5}$	$4,8 \cdot 10^{-5}$
0,4	$1,2 \cdot 10^{-5}$	$1,8 \cdot 10^{-5}$	$2,4 \cdot 10^{-5}$	$3,6 \cdot 10^{-5}$
0,5	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$3,0 \cdot 10^{-5}$	$3,0 \cdot 10^{-5}$
0,6	$1,8 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-5}$	$3,6 \cdot 10^{-5}$	$2,4 \cdot 10^{-5}$
0,8	$2,4 \cdot 10^{-5}$	$0,6 \cdot 10^{-5}$	$4,8 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-5}$
1,0	$3,0 \cdot 10^{-5}$	0	$6,0 \cdot 10^{-5}$	0

3.3.3. Determinação dos valores das constantes de inclusão aparentes

Os valores das constantes de inclusão aparentes E2:β-CD e EE2:β-CD foram obtidos utilizando o método de fases de solubilidade (HIGUCHI; CONNORS, 1965; STANCANELLI et al., 2008).

Dez miligramas de cada hormônio foram pesados e, em seguida, colocados em frascos âmbar contendo massas de β-CD correspondentes a concentrações crescentes do macrociclo (0; 0,25; 0,50; 1,00; 1,50; 2,00; 4,00 e 8,00 mmol L⁻¹); o volume de água ultrapura adicionada em cada um dos frascos foi de 10 mL.

Os frascos foram vedados e mantidos a temperatura ambiente, protegidos da luz, durante 72 horas. A agitação manual foi realizada em intervalos de 12 horas. Em seguida, as soluções foram filtradas em membrana de 0,45 μm, com posterior obtenção dos espectros de absorção, na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm.

Um diagrama de fases de solubilidade foi construído a partir dos valores de absorbância registrados no comprimento de onda de 280 nm. Em posse da absorvidade molar de cada hormônio, a concentração molar de E2 e de EE2 solubilizado foi calculada a partir do valor da absorbância. O diagrama relaciona concentração de β-CD *versus* concentração de hormônio solubilizado, ambos na concentração em mol L⁻¹. A constante de inclusão aparente foi calculada a partir da primeira porção linear do diagrama, assumindo estequiometria 1:1, de acordo com a Equação:

$$K = \frac{\text{Inclinação}}{S_0 (1-\text{inclinação})} \quad (15)$$

onde S_0 é a concentração do hormônio na ausência de β-CD e *inclinação* se refere à inclinação da porção linear da curva no diagrama.

3.3.4. Determinação da estequiometria e da constante de complexação Fe^{2+} - β -ciclodextrina

A estequiometria de complexação Fe^{2+} - β -CD foi determinada por dois métodos empregando espectrofotometria no UV/Vis.

No primeiro, a concentração de Fe^{2+} foi fixada enquanto a concentração de β -CD foi variada. A fonte de Fe^{2+} foi uma solução-estoque de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ na concentração de 10 mmol L^{-1} . A diluição desta solução-estoque foi feita a fim de se alcançar uma solução com concentração final de Fe^{2+} de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. A concentração de β -CD variou entre 0 e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

Em uma cubeta de quartzo contendo $2,0 \text{ mL}$ da solução de Fe^{2+} , foram adicionadas alíquotas de uma solução-estoque de β -CD, de maneira que a concentração do macrociclo fosse aumentada gradualmente até atingir $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Foi construído um gráfico do valor de absorvância obtida em 304 nm , comprimento de onda máximo de absorção do complexo Fe^{2+} - β -CD, em função da concentração de β -CD.

No segundo método, a variação foi proposta para a concentração de Fe^{2+} ; a concentração de β -CD foi mantida em $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$, enquanto que a concentração de Fe^{2+} variou entre 0 e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

Em uma cubeta de quartzo, foram colocados $2,0 \text{ mL}$ da solução de β -CD. Foram adicionadas alíquotas sucessivas da solução-estoque de Fe^{2+} de maneira que a concentração do íon atingisse $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Foi construído um gráfico do valor de absorvância obtida em 304 nm , comprimento de onda máximo de absorção do complexo Fe^{2+} - β -CD, em função da concentração do íon Fe^{2+} .

Um posterior tratamento matemático dos dados obtidos, proposto por Hoshino e colaboradores (1981), permitiu o cálculo da constante de complexação entre Fe^{2+} e β -CD em valores de pH 2,5; 4,0 e 6,0, ajustados com NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ou H_2SO_4 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

3.3.5. Determinação da constante de complexação Fe^{3+} - β -ciclodextrina

Em uma cubeta de quartzo contendo 2,0 mL de uma solução de β -CD $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$, foram adicionadas alíquotas de uma solução-estoque de Fe^{3+} , de maneira que a concentração do íon fosse aumentada gradualmente até atingir $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Foi construído um gráfico do valor de absorvância obtida no comprimento de onda de 302 nm.

A constante de complexação foi determinada a partir do gráfico dos valores de absorvância obtidos no comprimento de onda máximo de absorção do complexo Fe^{3+} - β -CD em função da concentração de β -CD, nos valores de pH 2,4; 4,0 e 6,0, ajustados com NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ou H_2SO_4 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (HOSHINO et al., 1981).

3.4. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (EFS)

A técnica de EFS foi utilizada visando dois objetivos: (1) interromper a reação de Fenton ou foto-Fenton e (2) pré-concentrar a amostra, de maneira que as concentrações das alíquotas retiradas durante a reação estivessem acima dos limites de detecção e quantificação do equipamento.

Os cartuchos de extração em fase sólida Sep-Pak C-18 (preenchimento por octadecilsilano; massa = 360 mg; área superficial = 313 m²g⁻¹; tamanho de partícula = 88,9 µm), da marca Waters, foram utilizados para extração dos hormônios.

O condicionamento foi feito com 5,0 mL de metanol, seguido de 5,0 mL de água, seguindo instruções do fabricante. O volume de amostra percolado foi 10,0 mL e a fase aquosa foi descartada. A vazão utilizada nos procedimentos foi controlada manualmente, sendo estimada em 2,0 mL min⁻¹.

O analito foi eluído com 5,0 mL de metanol. O solvente foi completamente evaporado em fluxo brando de nitrogênio e ressuspenso em 500 µL de metanol.

3.4.1. Estudos de recuperação e reuso de cartuchos para extração em fase sólida

Visando a validação da etapa de pré-concentração das amostras, foi necessário realizar estudos de recuperação dos hormônios e reuso dos cartuchos, na presença e ausência de β-CD. Para tanto, foram utilizadas soluções preparadas de acordo com os itens 3.2.1. e 3.2.2.

Após o condicionamento do cartucho, 10,0 mL de solução foram percolados em cartuchos C-18, previamente descritos. Descartou-se a fase aquosa e executou-se o experimento na sequência previamente descrita no item anterior.

A concentração das amostras foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD). A recuperação foi calculada, em função da massa do hormônio por meio da Equação 16.

$$\% R = \frac{\text{massa recuperada}}{\text{massa aplicada}} \times 100\% \quad (16)$$

Os parâmetros avaliados incluíram porcentagem de recuperação dos hormônios e condições de reutilização do cartucho.

3.5. ANÁLISES QUÍMICAS

3.5.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A concentração dos hormônios estudados foi monitorada por CLAE-DAD, em fase reversa. O equipamento utilizado consistia em um sistema composto por quatro módulos principais: desgaseificador, autoinjeter, forno da coluna e detector por arranjo de diodos.

As condições cromatográficas utilizadas foram adaptadas da proposta analítica de Lopez de Alda e Barceló (2000).

Para a análise, utilizou-se uma coluna Luna 5 µm C-18 fase reversa 250 x 4,60 mm, Phenomenex. As condições cromatográficas foram:

- E2: eluição em sistema isocrático, com fase móvel de composição 85:15 metanol:água, acidificada com 0,2% de ácido acético a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹, a 40 °C. Volume de injeção de 50 µL e comprimento de onda de detecção em 280 nm.
- EE2: eluição em sistema isocrático, com fase móvel de composição 65:35 metanol:água, acidificada com 0,2% de ácido acético a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹, a 40 °C. O volume de injeção foi de 30 µL e comprimento de onda de detecção em 280 nm.

3.5.2. Carbono orgânico total (COT)

A concentração de carbono orgânico total (COT) foi monitorada durante as reações de degradação. A redução da concentração de COT é um indicativo da mineralização de uma substância orgânica, ou seja, sua conversão a CO_2 e H_2O .

Para tanto, utilizou-se um analisador de carbono orgânico total da marca Shimadzu, modelo TOC-5000A, que mede a quantidade de carbono total (CT) e carbono inorgânico da amostra (CI). O COT é dado pela diferença entre CT e CI. Para a determinação de CT, a amostra injetada é carregada por um tubo de combustão a 680°C contendo platina suportada em alumina e sofre oxidação catalítica a CO_2 . Para a determinação de CI, a amostra injetada reage com ácido fosfórico 25%, convertendo todo o CI a CO_2 . O CO_2 produzido, tanto na oxidação catalítica como proveniente de CI, é quantificado por absorção no infravermelho não dispersivo. As concentrações de CT e CI são obtidas por interpolação utilizando curvas analíticas (área do pico x concentração) previamente preparadas por injeção de padrões.

As amostras foram retiradas e submetidas à análise sem nenhum tipo de pré-tratamento.

3.5.3. Determinação de H_2O_2 residual pelo método do metavanadato de amônio

A medida de peróxido de hidrogênio residual foi realizada a fim de se verificar o consumo deste reagente durante os experimentos de degradação.

Para tanto, empregou-se o método descrito por Nogueira, Oliveira e Paterlini (2005) em que a formação do íon peroxovanádio, a partir da reação com H_2O_2 , é

quantificada por espectrofotometria em seu comprimento de onda máximo de absorção, 450 nm (Equação 17).



Nesta análise, foram adicionados 5,0 mL de amostra em 1030 μL de uma solução de metavanadato de amônio $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,56 \text{ mol L}^{-1}$, preparada anteriormente sob agitação.

O volume foi completado com água ultrapura para 10,0 mL. Em seguida, mediante uma curva de calibração pré-estabelecida no equipamento, a concentração de peróxido de hidrogênio residual em solução foi determinada.

3.6. EXPERIMENTOS DE DEGRADAÇÃO

3.6.1. Degradação de etinilestradiol por processo Fenton

A um volume de 500 mL de solução, preparada como descrito no item 3.2.2., foi adicionada solução acidificada de FeSO_4 para resultar em $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ de Fe^{2+} . Em seguida, o pH da solução foi ajustado com H_2SO_4 1 mol L^{-1} ou NaOH 1 mol L^{-1} para valores de 2,5; 4,0 ou 6,0. O início da reação se deu ao adicionar $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio à solução.

As reações de degradação foram feitas em um béquer tampado e protegido da luz. Em tempos determinados, sucessivas alíquotas de 10 mL foram retiradas da reação, que foi interrompida por EFS. O monitoramento da degradação do hormônio foi feito por CLAE e a mineralização monitorada por determinações de COT.

3.6.2. Degradação dos hormônios por processo foto-Fenton

Nos experimentos de reação por foto-Fenton, foi utilizado um reator descrito por Nogueira e Guimarães (2000). O reator consiste em tubo cilíndrico de vidro de 3,80 cm de diâmetro interno, 42,0 cm de altura e volume total de 280 mL, com uma lâmpada concêntrica (Figura 8).

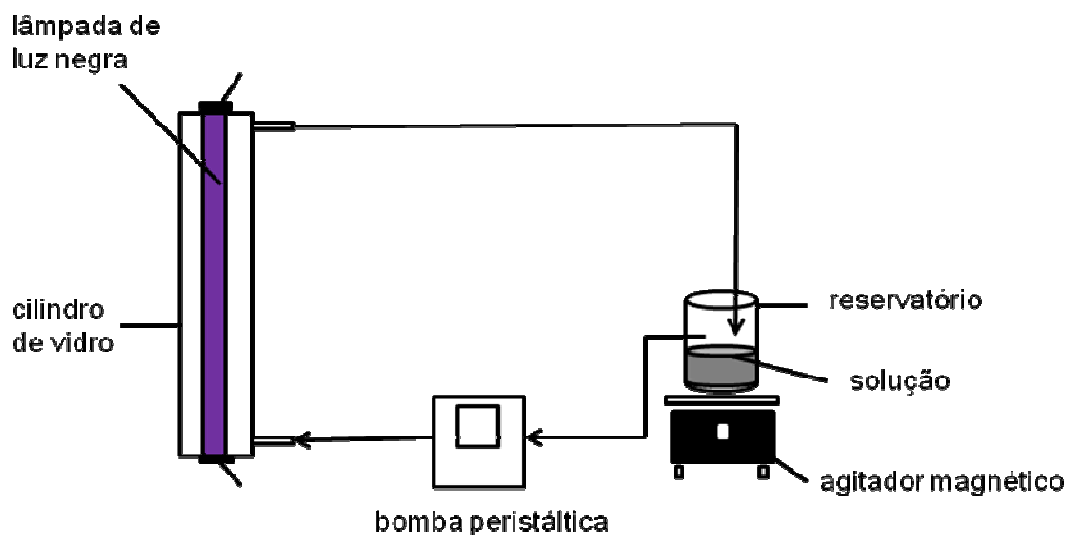


Figura 8. Representação esquemática do reator usado nas reações de foto-Fenton.

Uma lâmpada de luz negra de 15 W de potência e emissão máxima no comprimento de onda de 365 nm foi empregada nos experimentos. Antes do início do experimento, a lâmpada foi ligada por 2 minutos a fim de ser estabilizada.

A um volume total de 500 mL de solução, preparada de acordo com os itens 3.2.1 ou 3.2.2, foram adicionados 0,01 mmol L⁻¹ de Fe²⁺. Em seguida, a amostra teve o pH ajustado para valores de 2,5; 4,0 ou 6,0. A solução foi submetida à recirculação no reator por meio de uma bomba peristáltica MasterFlex Cole-Parmer modelo 7518-

12, a uma vazão de 35 mL min⁻¹. A adição de 0,5 mmol L⁻¹ de H₂O₂ e o ligamento da lâmpada deram início à reação de foto-Fenton.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. DETERMINAÇÕES ESPECTROFOTOMÉTRICAS

4.1.1. Determinação do coeficiente de absorvidade molar do estradiol e do etinilestradiol em água

A transição eletrônica de um estado de menor para um de maior energia é fenômeno responsável pelas bandas na região do ultravioleta e só ocorre quando a molécula absorve energia suficiente para realizar este fenômeno. Neste processo, um elétron presente em um determinado orbital molecular ligante ou não-ligante é excitado e vai para um orbital antiligante, cujo nível energético é maior que dos orbitais anteriores.

Elétrons de ligações simples (elétrons σ), de ligações insaturadas (elétrons π) ou ligados a heteroátomos participante de ligações com carbonos de hibridização sp^2 (elétrons n) podem ser elevados a orbitais antiligantes pela radiação UV. São possíveis quatro tipos de transições eletrônicas: $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \sigma^*$, embora sejam mais comuns na região do ultravioleta as transições $n \rightarrow \sigma^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$.

Os hormônios apresentaram um espectro de absorção evidente na região do ultravioleta, ambos com uma banda de absorção no comprimento de onda de 280 nm (Figura 9). Essa banda, por ser comum aos espectros das duas moléculas, possivelmente corresponde às transições ocorridas no conjunto ciclopentano-fenantreno, comum a ambas as estruturas. A presença do sistema conjugado, na forma de anel aromático, na estrutura de E2 e EE2 foi fundamental para a possibilidade de transições eletrônicas de cada uma das moléculas.

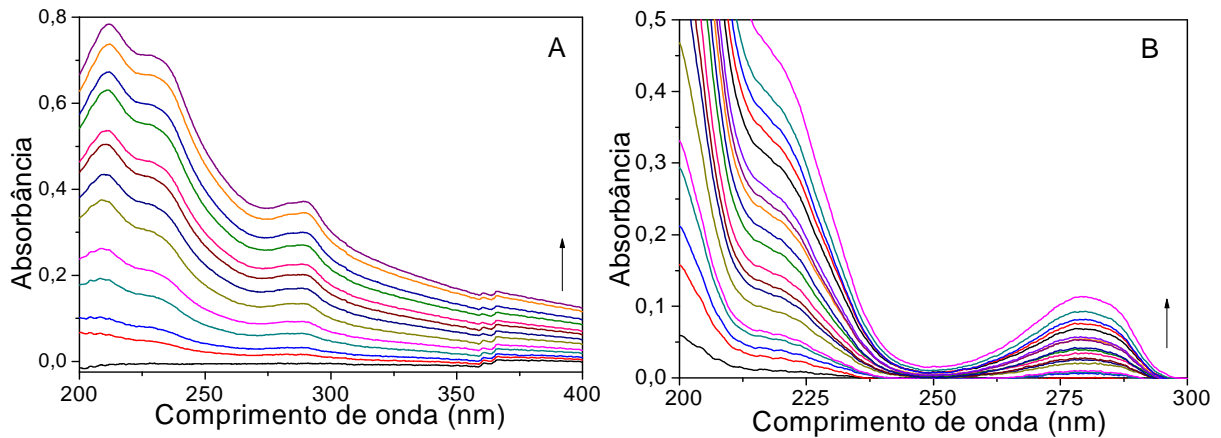


Figura 9. (A) Espectros de absorção na região do UV para E2, em água; concentração do hormônio entre 0,0025 e 0,03 mmol L⁻¹. (B) EE2 em água, concentração do hormônio entre 0,01 e 0,08 mmol L⁻¹. Acima das concentrações utilizadas, foi observado prejuízo na solubilidade em meio aquoso.

De acordo com a Lei de Lambert-Beer, a concentração da substância é relacionada ao valor de sua absorbância A pela Equação 18.

$$A = \varepsilon b C \quad (18)$$

onde ε corresponde à absorvidade molar do analito e é característico de cada substância, b é o caminho ótico que a radiação percorre ao atravessar a solução, comumente confinada em uma cubeta, e C é a concentração da solução, expressa em mol L⁻¹.

A técnica de espectrofotometria exige a completa dissolução do analito na solução-amostra; além disso, para que a Lei de Lambert-Beer seja válida, é necessário que as soluções sejam diluídas (HARRIS, 2007). Assim, a faixa de concentração de trabalho foi fixada de acordo com a solubilidade máxima de cada hormônio em água.

A absorptividade molar é uma constante característica de cada substância. Os valores típicos para dienos conjugados, como é o caso dos anéis aromáticos, estão na faixa de $\epsilon = 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (McMURRY, 2005).

Os resultados, ilustrados pela Figura 10, mostraram que embora os hormônios tenham estruturas químicas muito parecidas, o coeficiente de absorptividade molar do estradiol é da ordem de 10^4 , enquanto do etinilestradiol é da ordem de 10^3 .

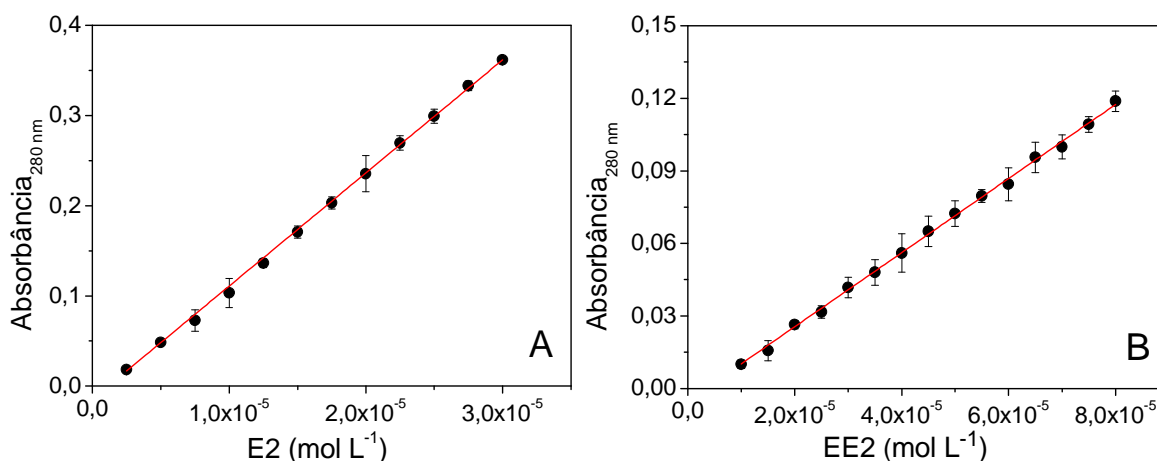


Figura 10. Curvas analíticas de E2 (A) e EE2 (B), no comprimento de onda de 280 nm.

Os parâmetros das curvas analíticas são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Coeficiente de absorptividade molar de E2 e EE2 em água, em $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

	$\epsilon_{280 \text{ nm}}$	Equação da reta	r^2
E2	12540 ± 55	$y = -0,01447 + 12540 x$	0,99981 (n = 12)
EE2	1533 ± 13	$y = -0,00514 + 1533 x$	0,99904 (n = 15)

A diferença nos valores dos coeficientes de absorvidade molar das duas substâncias pode ser atribuída ao grupamento etino, presente somente na molécula de EE2. O substituinte $-C\equiv CH$ apresenta um maior número de transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, o que não ocorre na molécula de E2.

4.1.2. Estequiometria de inclusão de estradiol e etinilestradiol em β -ciclodextrina

O método utilizado para a determinação da estequiometria de inclusão estrógeno: β -CD foi descrito por Job, em 1928. Neste trabalho, chamado método das variações contínuas, o autor propôs a determinação da estequiometria de complexação metal:ligante pela variação da fração molar do primeiro em relação ao segundo, com monitoramento da complexação por medidas dos valores de absorbância do conjunto de soluções. A estequiometria de complexação predominante era dada para o maior valor de absorbância apresentado pelas medidas (apud JULLIAN et al., 2008).

Assim, uma adaptação do método foi utilizada considerando-se que o hormônio totalmente solubilizado em água interagiria com a β -CD, que atuou como ligante.

Os gráficos mostram que a fração molar em que o produto entre absorbância e concentração de β -CD apresentou maior valor foi em 0,5. Nesta fração molar, a interação entre hormônio e β -CD é máxima (Figura 11).

Desse modo, como na fração molar 0,5 as concentrações de hormônio e da β -CD são equimolares, é possível concluir que a estequiometria de inclusão predominante E2: β -CD e EE2: β -CD é 1:1.

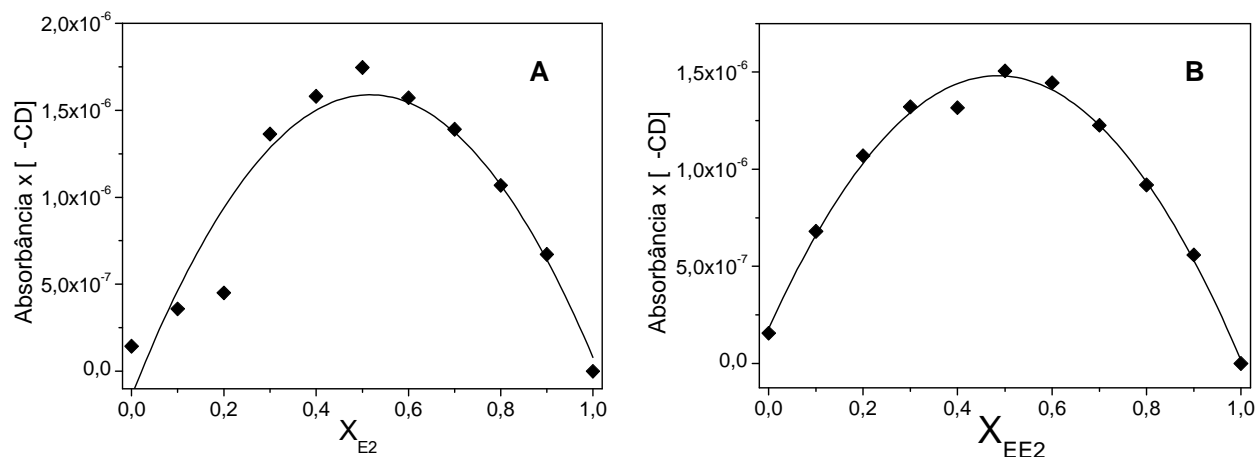


Figura 11. Representação gráfica do método das variações contínuas para E2 (A) e EE2 (B). O gráfico relaciona a fração molar do respectivo hormônio em relação à absorbância e a concentração de β -CD.

As principais interações entre a cavidade da β -CD e as moléculas de hormônios são as interações hidrofóbicas, proporcionadas pelos anéis e, secundariamente, as ligações de hidrogênio entre as hidroxilas situadas na superfície externa da β -CD e aquelas presentes nas moléculas dos estrógenos.

O tamanho da cavidade da β -CD permitiu acomodar adequadamente apenas uma molécula de hormônio, acarretando a estequiometria 1:1.

4.1.3. Constantes de inclusão aparentes estradiol: β -ciclodextrina e etinilestradiol: β -ciclodextrina

A constante de inclusão indica o quão favorável é a inclusão de uma molécula na cavidade da β -CD. Quanto maior o valor da constante, maior a afinidade do substrato pelo sítio de inclusão que a β -CD oferece.

Na determinação da constante de inclusão aparente, o diagrama de fases de solubilidade foi construído com a concentração do hormônio solubilizado em água em função da concentração de β -CD (Figura 12). A porção linear inicial foi destacada e parâmetros como inclinação e intersecção foram determinados; a partir destes, a constante de inclusão aparente foi calculada de acordo com a Equação 15.

Para o E2, o diagrama começa a perder linearidade quando a concentração de β -CD se iguala a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$; neste ponto, a concentração de E2 solubilizado corresponde a aproximadamente $0,005 \text{ mmol L}^{-1}$. Esperava-se que a concentração do hormônio fosse próxima a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, já que a inclusão E2: β -CD ocorre na proporção de 1:1 e quando incluso, o substrato passa a ser solúvel em água. Entretanto, deve-se considerar que a interação entre o macrociclo e o hormônio segue um equilíbrio dinâmico de incorporação e dissociação do complexo formado, o que pode influenciar a medida do E2 solúvel em um determinado instante.

Uma das prováveis justificativas para a baixa concentração de hormônio solubilizado foi a agitação irregular das amostras, que deveria ter sido ininterrupta durante o experimento e, no entanto, foi realizada de 12 em 12 horas.

Quanto ao EE2, a solubilização deste hormônio foi maior que de E2. Neste caso, o diagrama começa a perder linearidade quando a concentração de β -CD é igual a $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$; no caso, a concentração solubilizada do hormônio chega a aproximadamente $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$. Do mesmo modo, é possível que a agitação durante o experimento tenha sido insuficiente para promover a adequada solubilização do EE2.

Embora o experimento tenha apresentado possíveis problemas em sua execução, devido a limitações de ordem técnica, as constantes de inclusão aparentes foram calculadas e são mostradas na Tabela 6.

Tabela 6. Constante de inclusão aparente (K) e solubilidade inicial (S_0) de estrógenos em água, em $\lambda = 280$ nm.

Estrógeno	Equação da reta	r^2	S_0 (mol L ⁻¹)	log K (L mol ⁻¹)
E2	$y = 1,15 \cdot 10^{-7} + 5,05 \cdot 10^{-3} x$	0,994	$1,15 \cdot 10^{-7}$	4,65
EE2	$y = 2,05 \cdot 10^{-5} + 0,620 x$	0,992	$2,05 \cdot 10^{-5}$	4,90

Os hormônios apresentaram valores próximos de inclusão aparente, o que indica que a β -CD incorpora as duas moléculas com intensidades semelhantes.

Isso se deve, possivelmente, à semelhança entre as estruturas químicas dos dois estrógenos, o que favorece interações igualmente semelhantes entre os hormônios e a cavidade da β -CD.

Além disso, as informações permitem inferir que a solubilidade em água do EE2 é maior que a do E2, o que pode ser observado pelos valores obtidos de S_0 , que corresponde à solubilidade do hormônio na ausência de β -CD (graficamente, corresponde à intersecção da reta com o eixo y).

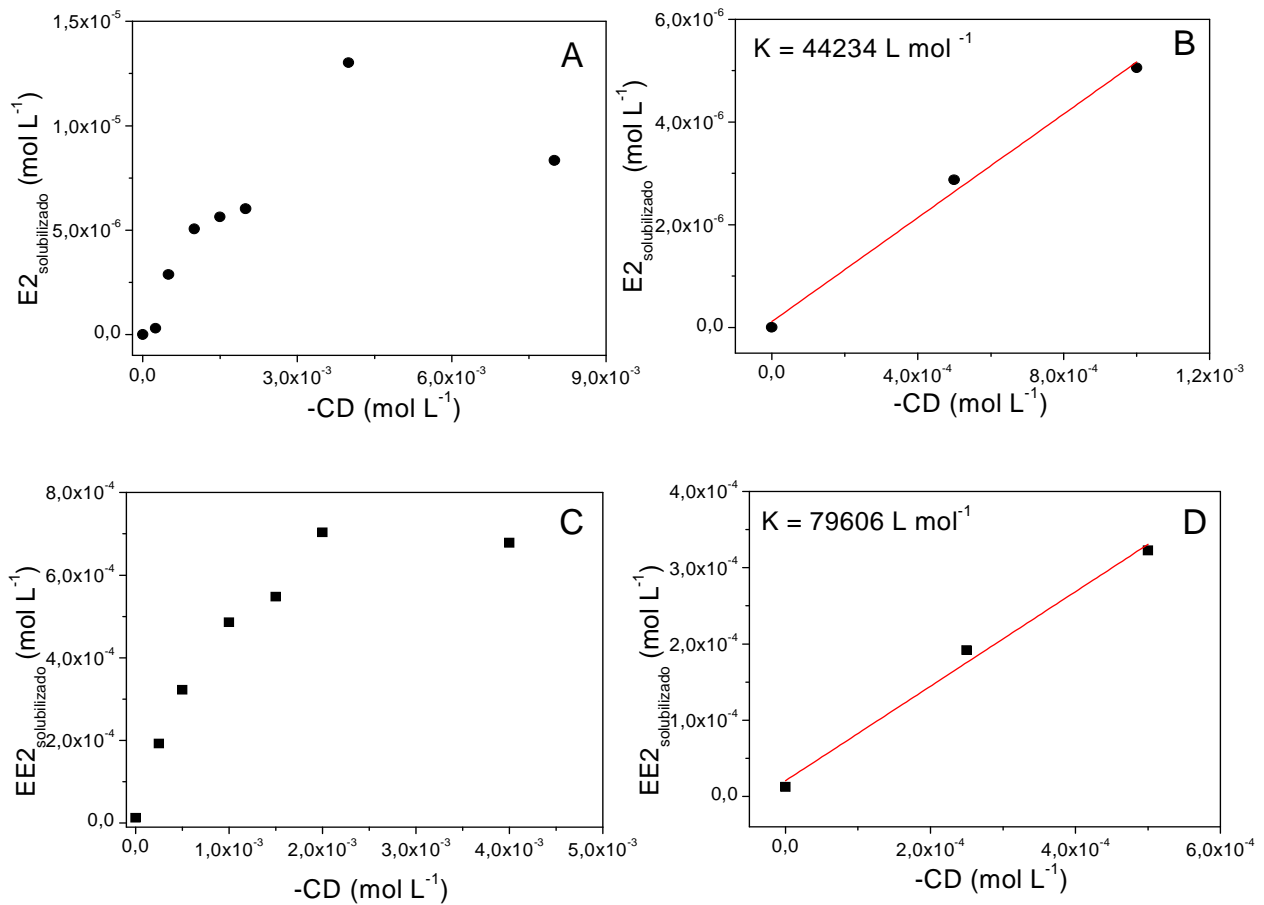


Figura 12. Diagrama de fases de solubilidade de E2 (A) e de EE2 (C). Porção linear inicial do diagrama de E2 (B) e EE2 (D). $\lambda = 280 \text{ nm}$.

Outras moléculas podem apresentar valores de constante de inclusão em β -CD tão amplos quanto 20 ou 30000 L mol^{-1} (LUCAS-ABELLÁN et al., 2008; MELO et al., 2008; STANCANELLI et al., 2008; BERTACHE et al., 2006).

Trabalhos anteriores relatam valores de K de estradiol em β -CD discrepantes como 28200 ou ainda, 970 e 1100 L mol^{-1} , utilizando o mesmo método de fases de solubilidade. Isto indica que este método, embora amplamente utilizado, pode não ser uma alternativa confiável na determinação da constante de inclusão (LOFTSSON; HREINSDÓTTIR; MÁSSON, 2005; MÁSSON et al., 1995).

Alguns autores defendem que a inexatidão na determinação da constante geralmente é atribuída aos valores inexatos de solubilidade inicial, principalmente para substâncias cujo S_0 seja menor que $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$, como é o caso de E2 e EE2. Tais erros provocam grandes deturpações nos valores reais da constante, já que S_0 é uma grandeza diretamente envolvida no cálculo (LOFTSSON; HREINSDÓTTIR; MÁSSON, 2005).

4.1.4. Constante de complexação Fe^{2+} - β -ciclodextrina

É sabido que a interação com ciclodextrinas pode alterar o comportamento espectroscópico de moléculas ou íons, por isso empregou-se a espectrofotometria na avaliação de complexação de íons Fe^{2+} por β -CD (CONNORS, 1997).

Nos espectros de absorção registrados em pH 2,5, a ausência de pontos isobésticos é um indicativo de que a β -CD não incorpora o íon Fe^{2+} em sua cavidade (Figura 13A).

Contudo, foi observada uma discreta mudança na inflexão da curva que relacionava absorbância em 224 nm em função da concentração do íon Fe^{2+} (Figura 13C). Esse comportamento é um indicativo de possíveis interações estabelecidas entre o íon e a β -CD, embora não seja possível determinar o tipo de interação ocorrida.

A formação de complexos de estequiometria conhecida entre Fe^{2+} e β -CD deveria ser evidenciada pela intersecção de curvas com inclinações diferentes obtidas no gráfico representado pela Figura 13C, entretanto, a ausência deste comportamento mostra que não é possível prever a estequiometria dos complexos formados.

O método empregado se mostrou ineficaz na avaliação da formação de complexos entre Fe^{2+} e $\beta\text{-CD}$ nos valores de pH 4,0 e 6,0, já que não foi possível observar nenhuma mudança na absorção em 224 nm.

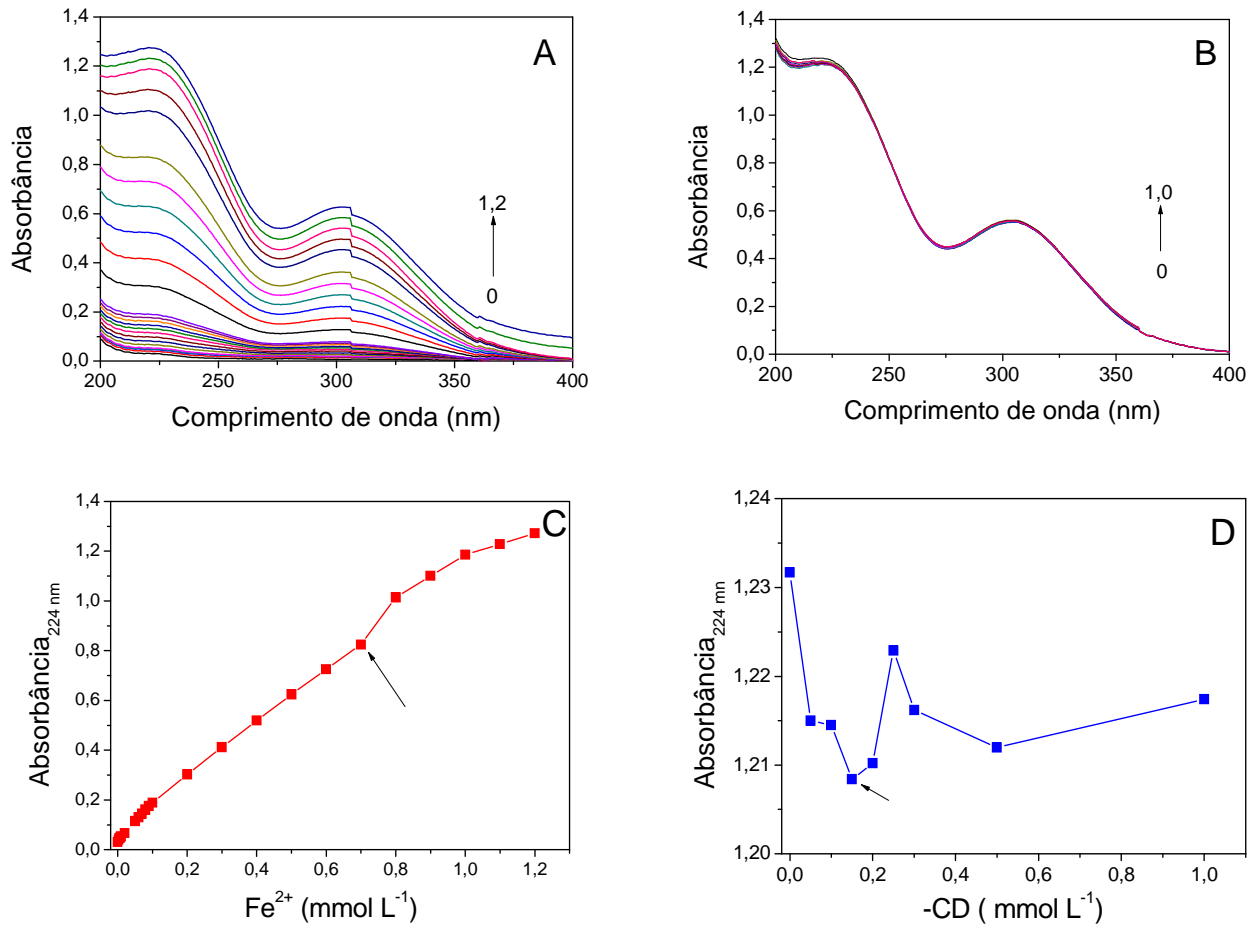


Figura 13. Espectros de absorção do Fe^{2+} em pH 2,5 em água. (A) Variação da concentração de Fe^{2+} de 0 a 1,2 mmol L^{-1} e (B) de $\beta\text{-CD}$ de 0 a 1,0 mmol L^{-1} . (C) $\beta\text{-CD} = 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. (D) $\text{Fe}^{2+} = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

É possível que a interação dos aquocomplexos de Fe^{2+} ocorra com a região externa da molécula de β -CD, de maneira que a melhor hipótese para os sítios de interação seja a ilustrada pela Figura 14.

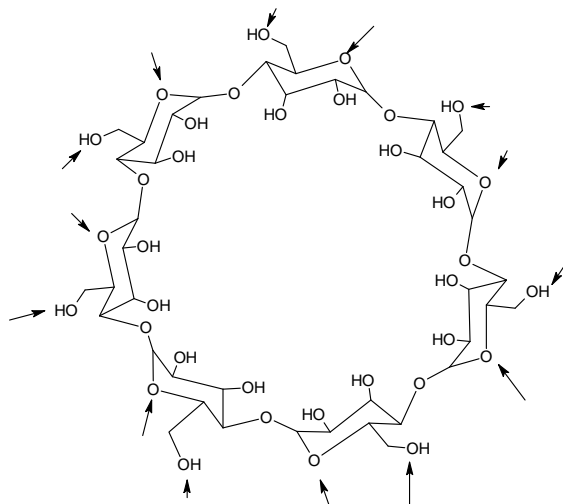


Figura 14. Possíveis sítios de interação da β -CD.

A proposta de interação foi baseada no fato de que as hidroxilas internas estão envolvidas em ligações de hidrogênio intramoleculares e com isso, o átomo de oxigênio participante destas ligações esteja menos disponível para estabelecer interações, assim como o átomo de oxigênio participante da ligação glicosídica. Com isso, é mais provável que os aquocomplexos de Fe^{2+} interajam com a região externa da β -CD, estabelecendo interações do tipo ligações de hidrogênio entre as moléculas de água dos complexos e os sítios da β -CD.

Como a β -CD possui vários sítios de interação com o Fe^{2+} , é possível que ocorram diversas estequiometrias de complexação, com o preenchimento total ou parcial dos sítios disponíveis do macrociclo. Assim, uma molécula de β -CD poderia complexar um número variável de íons Fe^{2+} , dificultando a determinação da estequiometria exata de complexação.

O cálculo da constante de complexação foi feito segundo o método previamente descrito por Hoshino e colaboradores (1981). Neste método, a constante, dada em $L \text{ mmol}^{-1}$, corresponde à inclinação da porção linear de uma curva que relaciona a razão entre absorvância e concentração de Fe^{2+} em mmol L^{-1} em função da absorvância em um determinado comprimento de onda (Figura 15).

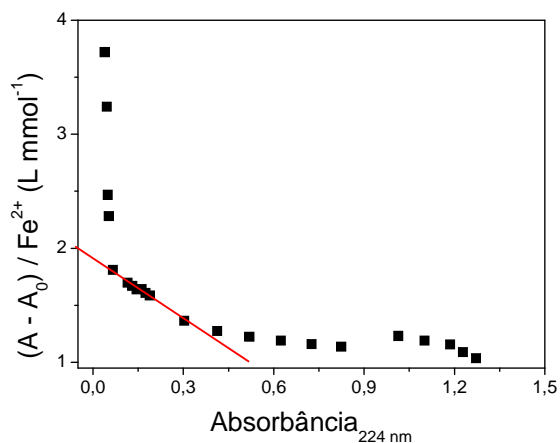


Figura 15. Determinação da constante de complexação entre Fe^{2+} e $\beta\text{-CD}$ em pH 2,5, segundo método adaptado de Hoshino. A constante K corresponde à inclinação da porção linear da curva.

Dessa maneira, as representações gráficas das constantes calculadas nos valores de pH 2,5; 4,0 e 6,0 são mostradas na Figura 16 e os resultados são apresentados na Tabela 7.

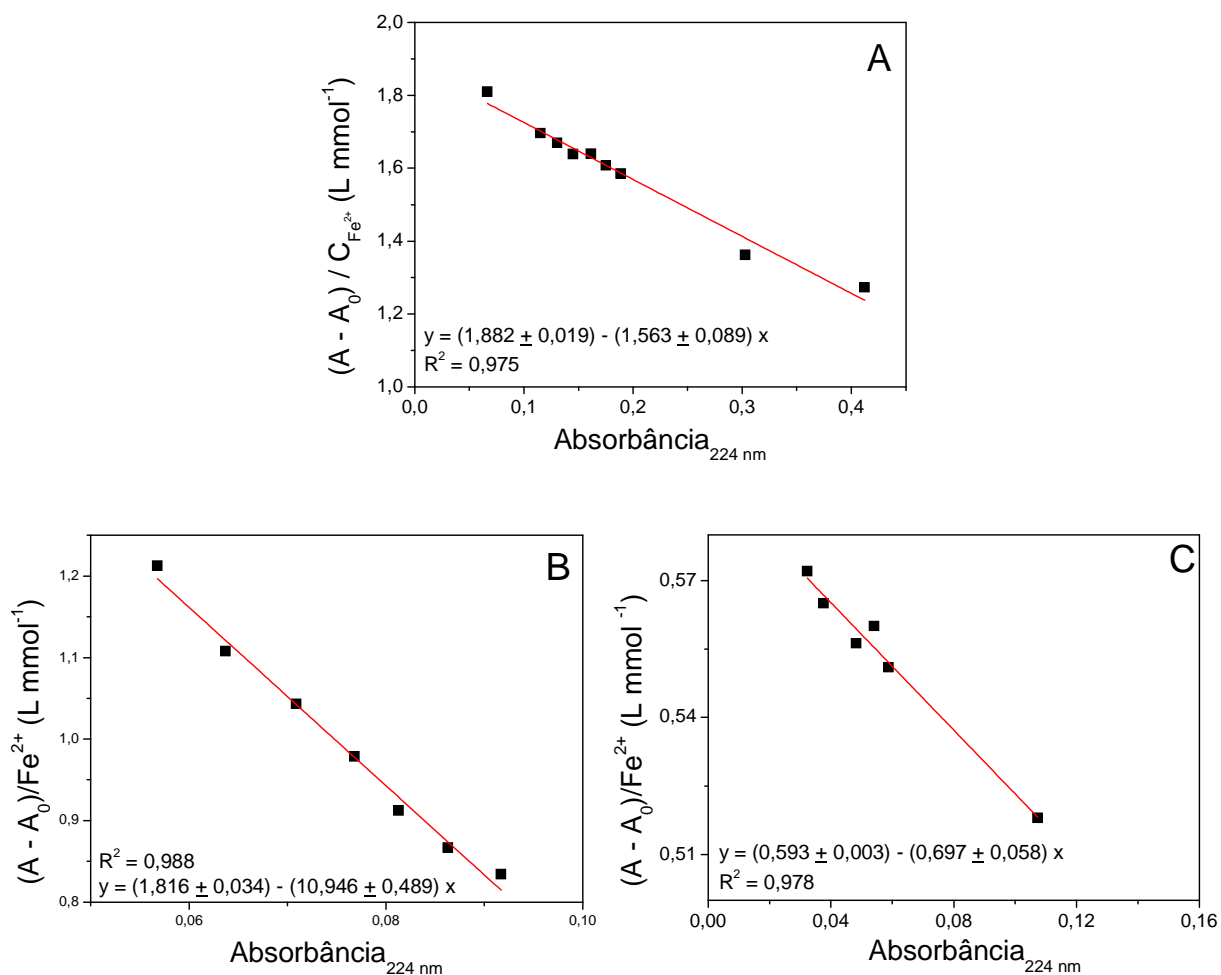


Figura 16. Cálculo da constante de complexação Fe^{2+} - β -CD em pH 2,5 (A), pH 4,0 (B) e pH 6,0 (C), em $\lambda = 224 \text{ nm}$.

Tabela 7. Valor obtido para constante de inclusão Fe^{2+} - β -CD em diferentes valores de pH.

pH	K (L mol ⁻¹)
2,5	1563 ± 89
4,0	10946 ± 489
6,0	697 ± 58

Os resultados mostram que o menor valor da constante foi observado em pH 6,0. Esses valores são insatisfatórios, já que se esperava que a complexação do Fe^{2+} em valores de pH próximos à neutralidade pudesse minimizar o efeito da insolubilidade do metal em altos valores de pH. Entretanto, a melhor complexação foi em pH 4,0, o que poderá aumentar a eficiência dos processos Fenton realizados posteriormente neste pH.

4.1.5. Constante de complexação Fe^{3+} - β -ciclodextrina

Na determinação das constantes de complexação Fe^{3+} - β -CD em diferentes valores de pH, a concentração do Fe^{3+} no meio teve de ser diminuída, já que a absorvidade desta espécie é maior que a do Fe^{2+} e os efeitos da adição do íon não iriam ser observados nas concentrações empregadas para Fe^{2+} . Entretanto, a metodologia empregada não permitiu determinar a estequiometria de inclusão entre Fe^{3+} e β -CD, pois não foram observadas mudanças no comportamento de absorção das espécies que pudessem ser atribuídas a interações entre o íon e o macrociclo.

O comprimento de onda escolhido foi de 302 nm, região em que a banda de absorção do íon está bem definida.

As representações gráficas das constantes calculadas nos valores de pH 2,5; 4,0 e 6,0 são mostradas na Figura 17 e os resultados são apresentados na Tabela 8.

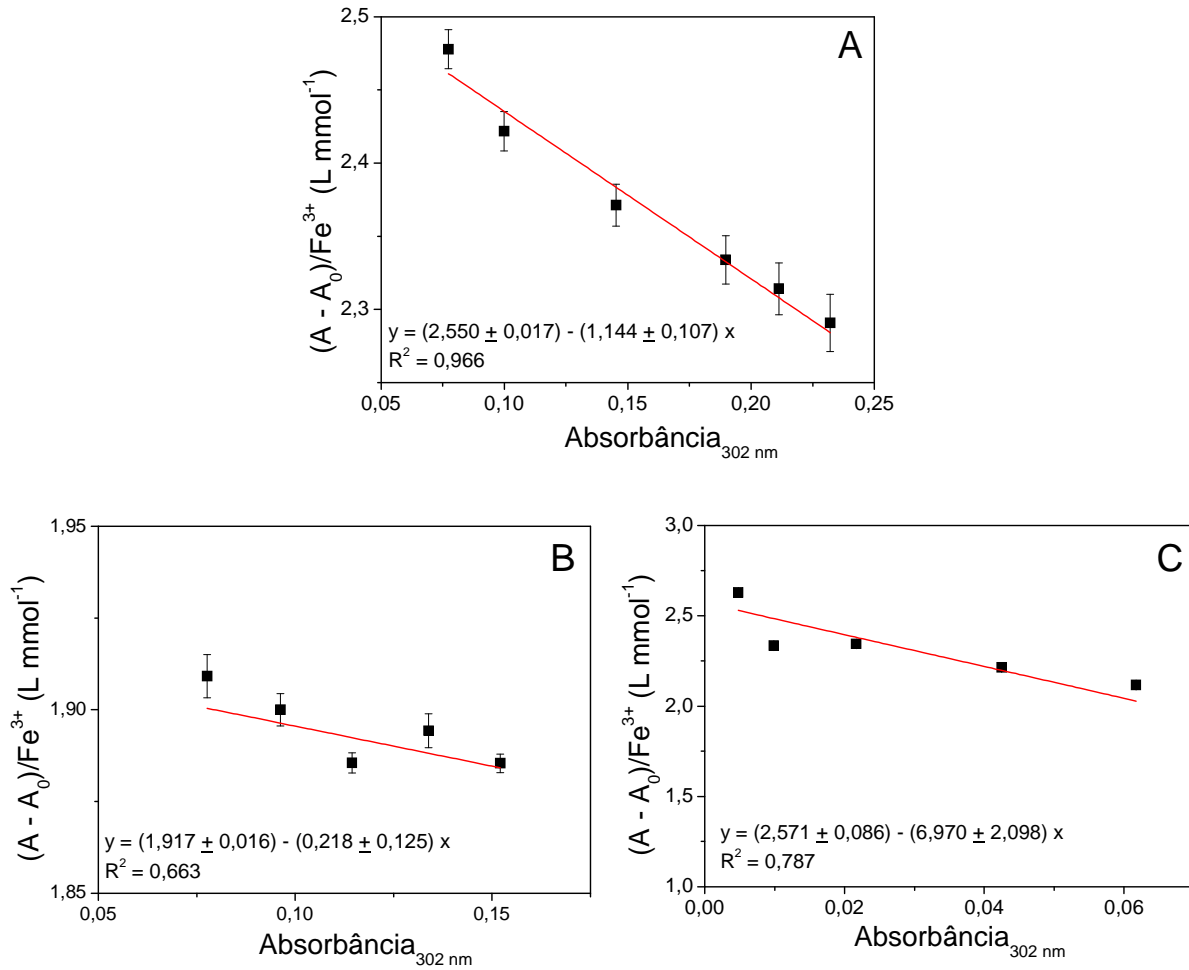


Figura 17. Cálculo da constante de complexação Fe^{3+} - β -CD em pH 2,5 (A), pH 4,0 (B) e pH 6,0 (C), em $\lambda = 302 \text{ nm}$.

Tabela 08. Valor obtido para constante de inclusão Fe^{3+} - β -CD em diferentes valores de pH.

pH	K ($L \text{ mol}^{-1}$)
2,5	1144 ± 107
4,0	218 ± 125
6,0	6970 ± 2098

Estes resultados mostram que, diferente do que foi observado para o Fe^{2+} , a maior constante de complexação determinada foi em pH 6,0, enquanto o menor valor observado foi atribuído ao pH 4,0. Tais resultados mostram que a ciclodextrina estabelece interações diferenciadas com cada aquocomplexo de ferro, cuja proporção depende do pH.

4.2. PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS APLICADOS NA DETERMINAÇÃO DE ESTRADIOL E ETINILESTRADIOL

As condições cromatográficas aplicadas para a determinação dos estrógenos foram adaptações da literatura (LOPEZ DE ALDA; BARCELÓ, 2000), quando os autores utilizaram a acetonitrila como componente da fase móvel. Neste trabalho, a acetonitrila foi substituída por metanol por ser da mesma série eluotrópica, apresentando comportamento cromatográfico semelhante.

4.2.1. Estabelecimento da proporção da fase móvel e volume de injeção de estradiol e etinilestradiol

Todas as condições aqui descritas incluíram vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura do forno da coluna a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e monitoramento em $\lambda = 280 \text{ nm}$.

Para o E2, foi testada primeiramente a condição de 100% metanol. O analito apresentou tempo de retenção (t_R) de 2,5 minutos, indicando que sua eluição ocorreu no volume morto da coluna. Esse comportamento indica que nenhuma interação entre o E2 e a fase estacionária foi estabelecida, provavelmente devido à

forte interação com a fase móvel. Portanto, foi necessário reduzir a força de eluição da fase móvel.

A próxima condição testada foi 90% metanol. Nesta condição, o t_R do E2 foi de 7,4 minutos.

Na terceira condição testada, adicionou-se 0,2% (v/v) de ácido acético na fase móvel, a fim de reduzir a assimetria do pico, o que foi alcançado na presença do ácido.

Foram também testados 70 e 75% de metanol com 0,2% de ácido acético. Em ambos os casos, o pico cromatográfico apresentou t_R maior que 20 minutos, o que tornou o tempo de análise muito longo.

A condição final testada foi 85% metanol acidificado: 15% água. O t_R do analito foi de 11,4 minutos, o que foi considerado adequado.

Para avaliar a influência do volume de injeção, uma solução-estoque 10 mmol L⁻¹ de E2 foi utilizada. O volume injetado de 20 µL apresentou baixa intensidade no sinal cromatográfico. Já o volume de 80 µL apresentou encaudamento do pico. Finalmente, o volume de injeção de 50 µL foi considerado adequado por apresentar um sinal de alta intensidade no equipamento bem como a simetria do pico cromatográfico.

Vale ressaltar que estas condições estabelecidas são aplicadas ao valerato de E2, que foi utilizado neste trabalho como precursor para o E2.

Tendo em vista as condições estabelecidas para o E2, as mesmas condições cromatográficas foram aplicadas à determinação do EE2. Entretanto, com tal proporção de fase móvel, o t_R do analito foi de 3,9 minutos, indicando que a eluição ocorria próxima ao volume morto.

Em seguida, a força de eluição da fase móvel foi reduzida para 75% de metanol acidificado e o volume de injeção reduzido para 40 μL , já que na condição anterior o pico apresentou assimetria. Nesta condição, o encaudamento foi reduzido, mas a eluição ainda ocorria no mesmo t_R .

Após sucessivas adequações, a condição final estabelecida foi de 65% metanol acidificado com 0,2% de ácido acético e 35% água, apresentando t_R aproximado de 10,3 minutos, e volume de injeção de 30 μL , com total simetria do pico cromatográfico.

Os cromatogramas de E2 e EE2 nas condições cromatográficas determinadas são mostrados na Figura 18.

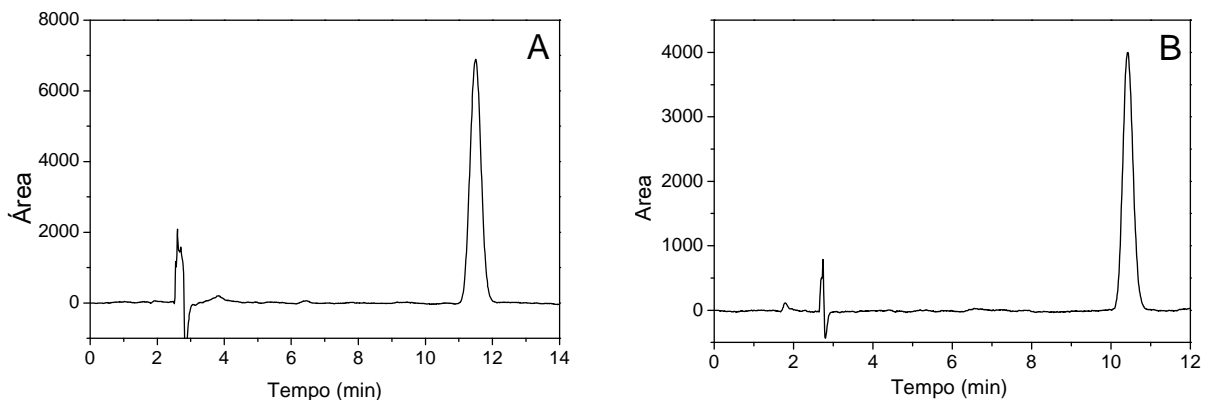


Figura 18. (A) Cromatograma de E2 7,5 mg L⁻¹, fase móvel 85:15 metanol/0,2% ácido acético:água. (B) EE2 5,0 mg L⁻¹, fase móvel 65:35 metanol/0,2% ácido acético:água. Vazão 1,0 mL min⁻¹, temperatura do forno da coluna 40 °C, $\lambda=280$ nm.

4.2.2. Parâmetros cromatográficos para estradiol e etinilestradiol

Após estabelecidas as condições cromatográficas ideais para a determinação dos hormônios, uma curva analítica foi construída para cada um dos analitos a fim

de se determinar os parâmetros limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e linearidade do equipamento (Figura 19).

O parâmetro LD é a menor concentração do analito que pode ser detectada, enquanto o LQ é a menor concentração que pode ser quantificada com confiabilidade.

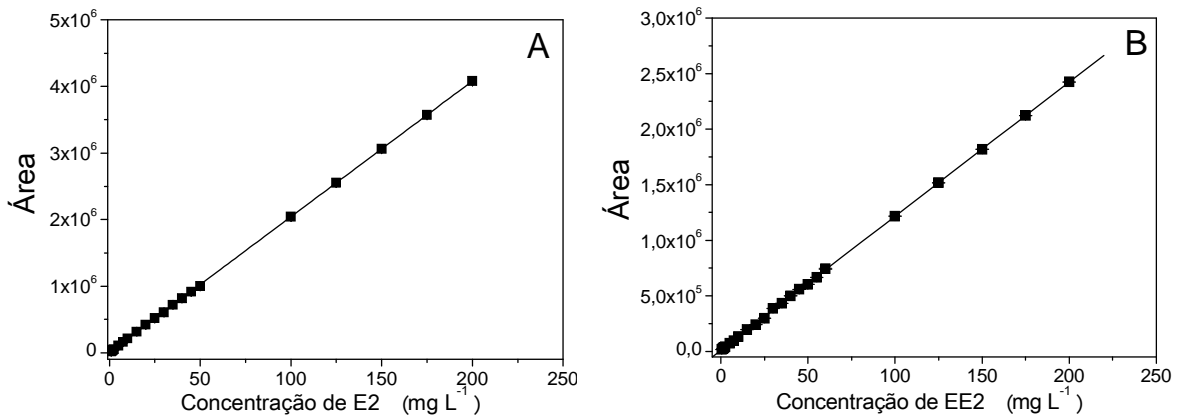


Figura 19. Curvas analíticas, preparadas em metanol, com concentração de 1,0 a 200 mg L⁻¹ para E2 (A) e concentração de 0,5 a 200 mg L⁻¹ para EE2 (B).

Para tais determinações, utilizou-se os parâmetros da curva analítica estabelecida de acordo com as recomendações da IUPAC (CURRIE, 1999). Segundo a literatura, o LD é igual a $3 \times s/S$ e o LQ igual a $10 \times s/S$, onde s é a estimativa do desvio padrão da curva analítica e S é o coeficiente angular desta mesma curva.

A linearidade para E2 e EE2 também foi determinada segundo Etre (1993), admitindo-se uma variação entre 95 e 105% (Figura 20).

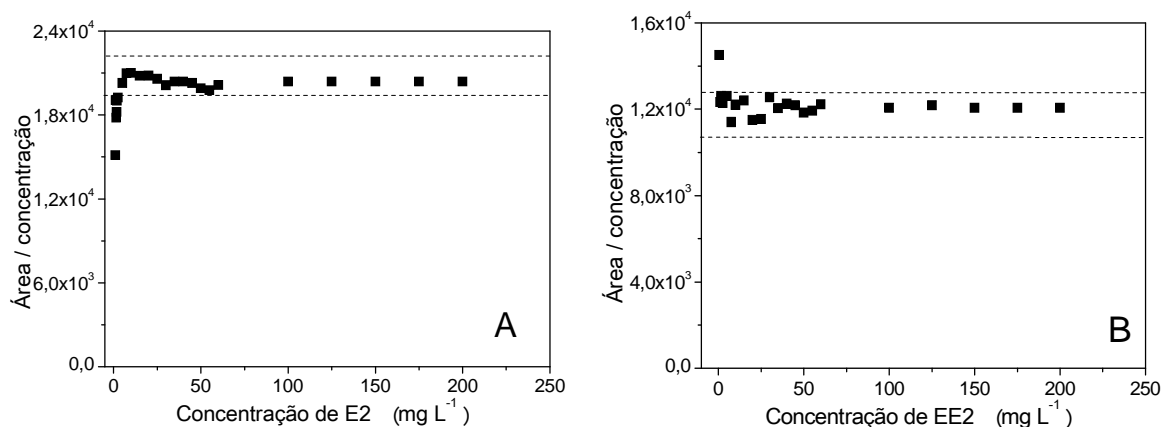


Figura 20. Linearidade para E2 (A) e EE2 (B), admitindo variação de 5%.

Os parâmetros analíticos são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Parâmetros cromatográficos para estradiol e etinilestradiol.

	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)	Equação da reta	Intervalo de linearidade (mg L ⁻¹)	r ²
E2	0,19	0,64	$y = 1172 + 20638 x$	5-200	0,999
EE2	0,70	2,33	$y = 11615 + 11644 x$	1-200	0,997

Outro parâmetro avaliado foi a precisão das injeções. Segundo o fabricante, a variação máxima em diferentes injeções efetuadas pelo equipamento é de 5,0%. As injeções apresentaram coeficiente de variação menor que 5,0%. Como a precisão está dentro dos limites preconizados, foi realizada uma única injeção das amostras retiradas das reações de degradação.

4.3. ESTUDOS DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO E RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

4.3.1. Etinilestradiol

Segundo Ribani e colaboradores (2004), o intervalo aceitável para a recuperação de analitos está compreendido entre 70 e 120%, com coeficiente de variação de 20%. Se a complexidade da matriz é maior, são aceitáveis valores entre 50 e 120%.

Inicialmente, os experimentos foram realizados com dois volumes diferentes percolados de amostra. As recuperações de EE2, a partir de soluções de concentrações aproximadamente 1,5 vezes maior que o LQ, ou seja, de $3,5 \text{ mg L}^{-1}$, foram avaliadas e são mostradas pela Tabela 10. Todos os estudos foram realizados em triplicata.

A recuperação foi calculada, em função da massa do EE2, conforme Equação 16.

Tabela 10. Eficiência da recuperação de $3,5 \text{ mg L}^{-1}$ de EE2 em cartuchos novos.

V (mL)	R (%)	CV (%)
5,0	97,80	0,93
10,0	119,23	6,27

A recuperação em cartuchos utilizados também foi testada nesta concentração e indicou que não ocorre diminuição na recuperação do analito até o terceiro uso do cartucho (Tabela 11).

Tabela 11. Recuperação de 3,5 mg L⁻¹ de EE2 em cartuchos reutilizados.

	5,0 mL		10,0 mL	
	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
1º uso	97,80	0,93	119,23	6,27
2º uso	98,13	0,81	110,27	9,54
3º uso	98,20	1,06	116,87	4,71

Os resultados mostram que os valores encontrados para a recuperação do etinilestradiol nesta matriz está situado na faixa considerada aceitável na literatura.

Outro nível de concentração do EE2, correspondente a cerca de 3 vezes o LQ, foi testado e os resultados são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12. Recuperação de 6,2 mg L⁻¹ de EE2 em cartuchos reutilizados.

	5,0 mL	
	R (%)	CV (%)
1º uso	102,30	14,53
2º uso	115,83	24,05

Os resultados para este nível de concentração apresentaram um coeficiente de variação muito alto e por isso, essa concentração não foi utilizada nos experimentos.

Por oferecer recuperações satisfatórias e fornecer amostras 20 vezes mais concentradas que a inicial, a eluição de 10,0 mL de amostra foi utilizada para EFS, o que resultou em análises com maior sensibilidade e em amostras com concentrações muito acima dos limites de detecção e quantificação.

A agitação do EE2 na presença de β -CD permite maior solubilização do hormônio, o que não pode ser alcançado na ausência do sacarídeo, constatado experimentalmente neste trabalho. Sendo assim, a concentração da amostra utilizada nestes estudos de recuperação foi muito maior que as utilizadas previamente nos estudos na ausência de β -CD.

A recuperação do EE2 testada na presença de β -CD é mostrada na Tabela 13. Os valores obtidos se encontram na faixa aceita pela literatura, embora os valores de CV estejam próximos do limite preconizado pela literatura. O reuso do cartucho é recomendado até a terceira reutilização.

Tabela 13. Recuperação de $11,4 \text{ mg L}^{-1}$ de EE2, na presença de 115 mg L^{-1} de β -CD, em cartuchos reutilizados.

	10,0 mL	
	R (%)	CV (%)
1º uso	101,14	19,55
2º uso	97,30	10,43
3º uso	85,24	19,31

Foi possível observar que a presença de β -CD não afetou a recuperação do EE2, tendo em vista que os valores observados estão próximos a 100%, um indicativo que a recuperação foi bem sucedida mesmo na presença do macrociclo.

4.3.2. Estradiol

A recuperação do E2 foi testada na ausência e na presença de β -CD. Entretanto, na ausência de β -CD, as concentrações das soluções de hormônio

obtidas pela dissolução do valerato de E2 em água estavam provavelmente abaixo do LD, não sendo possível calcular a massa de hormônio na solução antes da pré-concentração.

Desta maneira, calculou-se apenas a recuperação na presença de β -CD, que é mostrada pela Tabela 14. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 14. Recuperação de $2,7 \text{ mg L}^{-1}$ de E2 na presença de 50 mg L^{-1} de β -CD, em cartuchos reutilizados.

	10,0 mL	
	R (%)	CV (%)
1º uso	80,74	14,83
2º uso	103,83	3,88
3º uso	93,21	7,70

Embora os resultados tenham se apresentado dentro da faixa recomendada pela literatura, optou-se por trabalhar com soluções de E2 preparadas a partir da diluição de uma solução-estoque do hormônio preparada em metanol. Esta decisão foi baseada no fato de que a preparação da solução a partir de uma solução metanólica mais concentrada permite o alcance de maiores concentrações de E2 em solução, enquanto que a dissolução direta do hormônio em água leva a soluções de baixíssima concentração. A diluição da solução-estoque no preparo da solução de E2 é interessante para contornar situações em que a concentração de hormônio dissolvida seria muito baixa, como quando na ausência de β -CD.

Por isso, foi testada a recuperação de E2 a partir destas soluções. Os resultados são mostrados na Tabela 15 e se mostraram adequados com a faixa descrita pela literatura. A presença de β -CD não interferiu na recuperação do analito.

Tabela 15. Recuperação de 10 mg L^{-1} de E2 na ausência e na presença de 50 mg L^{-1} de β -CD, em cartuchos reutilizados.

	Sem β -CD		Com β -CD	
	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
1º uso	101,33	3,44	98,21	4,90
2º uso	100,82	2,09	100,07	3,87
3º uso	99,65	4,56	100,94	2,55

4.4. DEGRADAÇÃO POR PROCESSO FENTON

4.4.1. Efeito do pH na hidrólise de etinilestradiol

O processo Fenton exige que o ferro presente no meio reacional esteja completamente solúvel. Entretanto, valores altos de pH fazem com que o íon forme óxidos e hidróxidos insolúveis, precipitando-o e inviabilizando a reação de Fenton. A presença de β -CD poderia minimizar este problema, a partir da complexação do ferro. Esta complexação dificultaria a precipitação do ferro em valores de pH mais altos, permitindo com que a faixa de execução do processo Fenton fosse ampliada.

Com o objetivo de avaliar se ocorria hidrólise de EE2, o pH de uma solução deste hormônio na ausência de Fe^{2+} foi ajustado para os valores de 2,5; 4,0 e 6,0 e a concentração de EE2 foi monitorada por CLAE-DAD por 60 minutos. Como a

concentração de EE2 se manteve constante após 36 minutos de monitoramento, a concentração foi determinada até 60 minutos.

Após 60 minutos, verificou-se que não houve mudança significativa na concentração de uma solução de EE2 após o ajuste de pH para 4,0 e 6,0. Entretanto, em pH 2,5 o ajuste das condições levaram à redução de cerca de 20% na concentração de EE2, o que poderia ser atribuído à uma pequena hidrólise da molécula de hormônio neste pH (Figura 21).

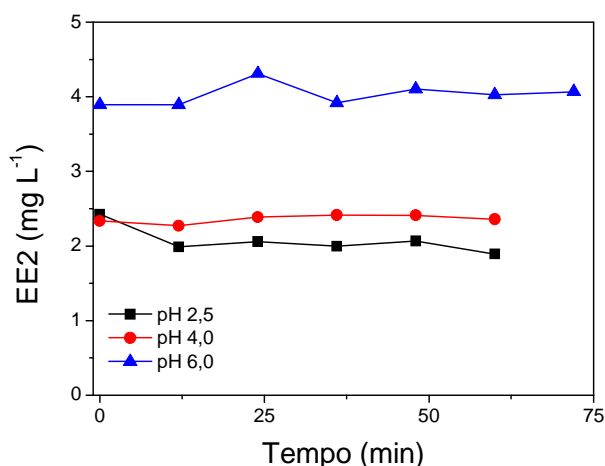


Figura 21. Efeito do ajuste do pH na concentração de EE2.

4.4.2. Definição das condições de degradação do etinilestradiol

Durante o processo de definição das condições de degradação do EE2 diversas condições foram testadas.

Primeiramente, a condição de 0,2 mmol L⁻¹ de Fe²⁺ e 10 mmol L⁻¹ de H₂O₂ - em pH 2,5 - foi testada. O perfil de degradação mostrou que houve uma rápida redução na concentração de EE2, atingindo concentração abaixo do LQ após 5

minutos de reação mesmo utilizando o recurso da pré-concentração. No entanto, a remoção de COT das amostras foi de apenas 10% após 20 minutos de reação (Figura 22).

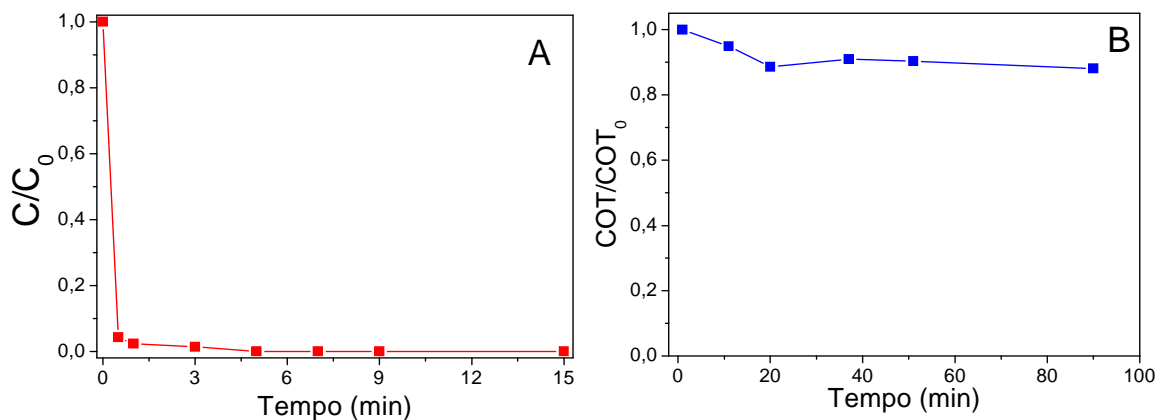


Figura 22. (A) Degradação de EE2 por processo Fenton. Condições iniciais: EE2 = 2,8 mg L⁻¹, Fe²⁺ = 0,2 mmol L⁻¹ e H₂O₂ = 10 mmol L⁻¹ em pH 2,5. (B) Remoção de COT; COT₀ = 6,5 mg L⁻¹.

Na tentativa seguinte, estabeleceu-se condições mais brandas, como a concentração de Fe²⁺ de 0,1 mmol L⁻¹ e H₂O₂ = 5,0 mmol L⁻¹, em pH 2,5. Novamente, a redução na concentração foi rápida e após 7 minutos de reação, a concentração do analito já estava abaixo do LQ. A remoção de COT chegou a cerca de 15% após 15 minutos de reação (Figura 23).

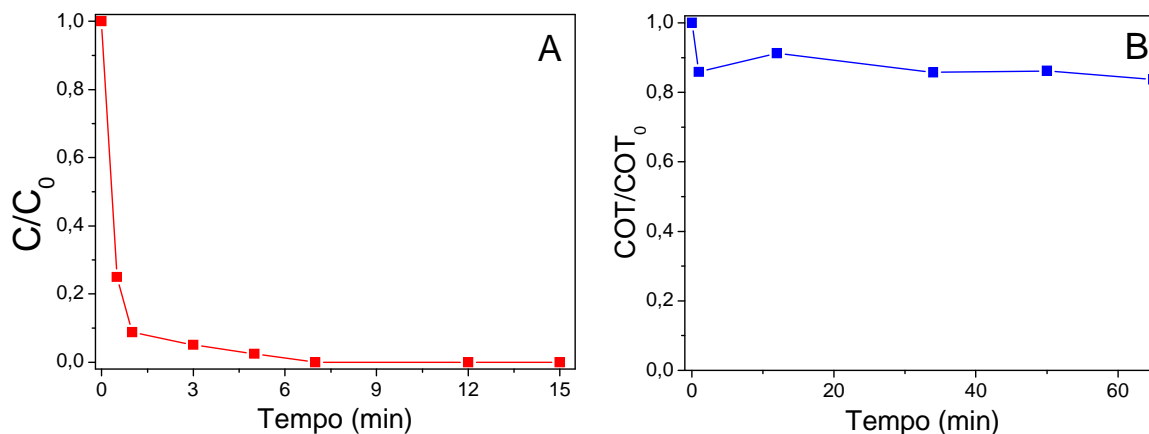


Figura 23. (A) Degradação de EE2 por processo Fenton. Condições iniciais: EE2 = 3,7 mg L⁻¹, Fe²⁺ = 0,1 mmol L⁻¹ e H₂O₂ = 5,0 mmol L⁻¹ em pH 2,5. (B) Remoção de COT; COT₀ = 5,7 mg L⁻¹.

Com estes resultados, suspeitou-se que outro processo estivesse envolvido na redução da concentração do EE2 que não propriamente a degradação.

Por isso, a concentração de uma solução de EE2 - com o pH ajustado em 2,5 - foi avaliada após um determinado tempo sob agitação, após a adição de Fe²⁺ e após a adição de H₂O₂ (Figura 24).

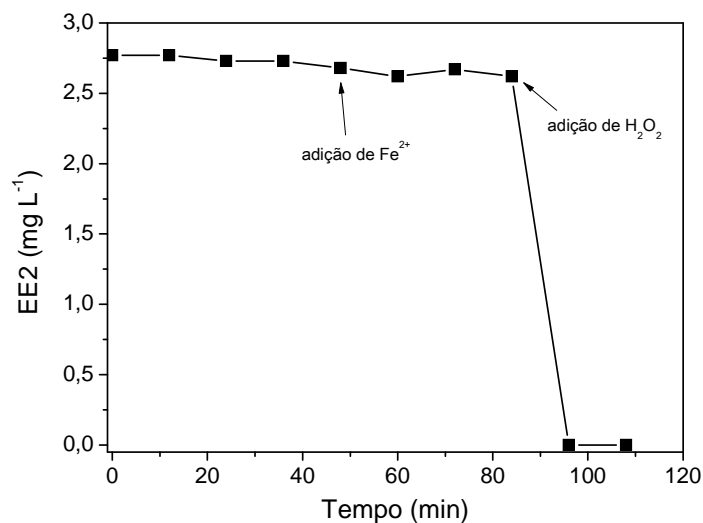


Figura 24. Influência do tempo de agitação, da adição de 0,1 mmol L⁻¹ de Fe²⁺ e da adição de 5,0 mmol L⁻¹ de H₂O₂ na concentração de EE2, após ajuste de pH.

Concluiu-se que a agitação e a adição de Fe^{2+} não promovem quaisquer efeitos sobre a redução do EE2 em solução. Entretanto, a adição de H_2O_2 leva à instantânea redução na concentração do hormônio, indicando que realmente a reação de Fenton é a responsável pela diminuição da concentração do hormônio em solução.

Sabendo-se que a concentração de peróxido de hidrogênio utilizada levava à rápida degradação do EE2, testou-se a redução das quantidades de reagentes em solução. A nova proposta foi de $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ de Fe^{2+} e $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de H_2O_2 .

Os resultados indicaram que esta condição se mostrou mais adequada para avaliar o decaimento da concentração, visto que o perfil de degradação do EE2 pode finalmente ser observado (Figura 25). Dessa maneira, as concentrações de Fe^{2+} e H_2O_2 aplicadas na degradação do EE2 por Fenton foram definidas em $0,01$ e $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente.

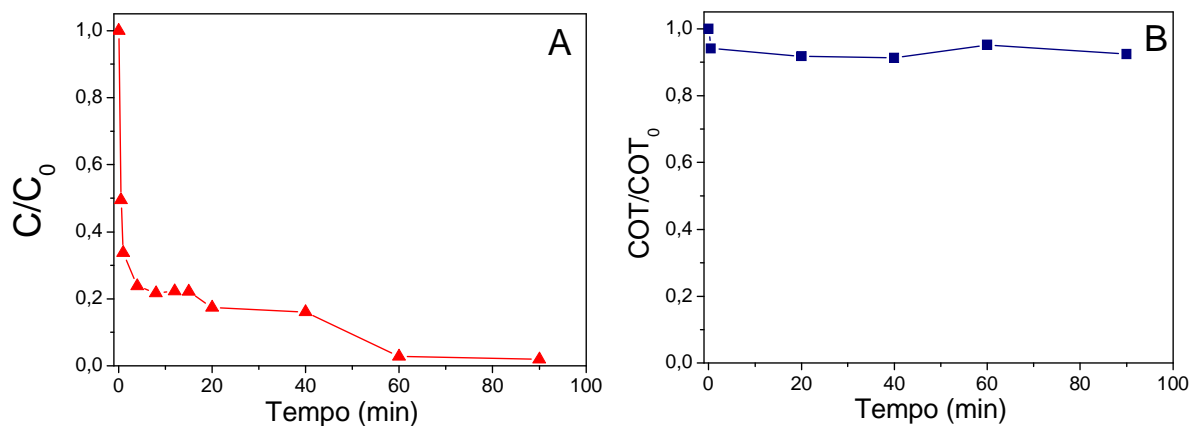


Figura 25. (A) Degradação de EE2 por processo Fenton. Condições iniciais: EE2 = $3,3 \text{ mg L}^{-1}$, $\text{Fe}^{2+} = 0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ e $\text{H}_2\text{O}_2 = 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 2,5. (B) Remoção de COT; $\text{COT}_0 = 6,5 \text{ mg L}^{-1}$.

4.4.3. Efeito do pH na degradação de etinilestradiol por processo Fenton na ausência de β -ciclodextrina

Após as condições de degradação serem definidas, o efeito do pH na degradação de EE2 foi estudado. Os resultados mostraram que as condições utilizadas promoveram rápida degradação do hormônio nos primeiros minutos da reação, principalmente nos valores de pH 2,5 e 4,0. Nestes valores de pH, a redução na concentração atingiu valores de 90 e 95%, respectivamente, após 12 minutos de reação.

Já em pH 6,0, a redução na concentração de EE2 atingiu cerca de 50% após 20 minutos de reação, embora a concentração do hormônio seja reduzida em cerca de 40% no primeiro minuto da reação (Figura 26).

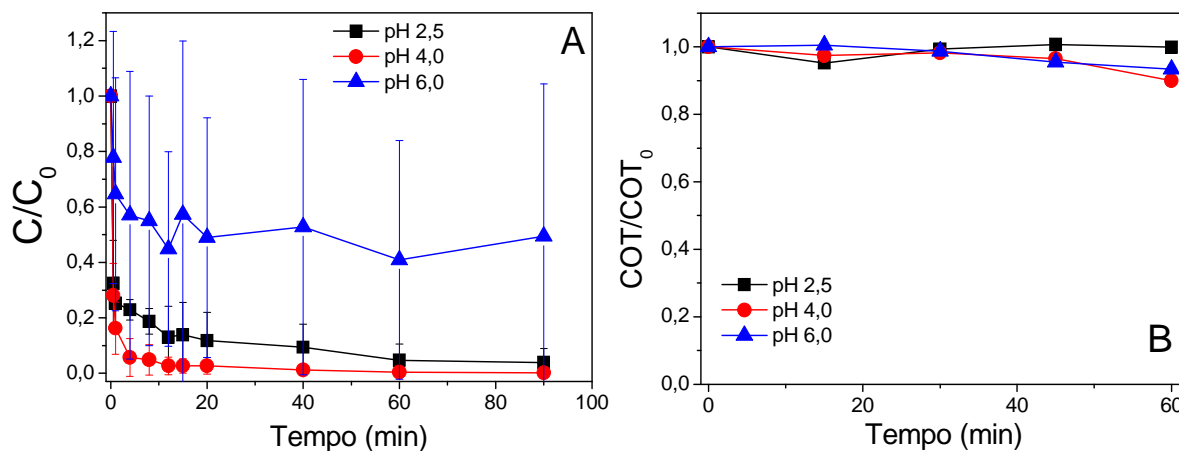


Figura 26. (A) Degradação de EE2 por processo Fenton em diferentes valores de pH. Condições iniciais EE2 = 3,5 mg L⁻¹; Fe²⁺ = 0,01 mmol L⁻¹; H₂O₂ = 0,5 mmol L⁻¹. (B) Remoção de COT; COT₀ = 6,0 mg L⁻¹.

A especiação do íon Fe^{2+} em água, mostrada pelas Equações 19 e 20, tem grande influência na eficiência das reações de Fenton.



A formação das espécies de ferro é dependente do pH e é ilustrada na Figura

27.

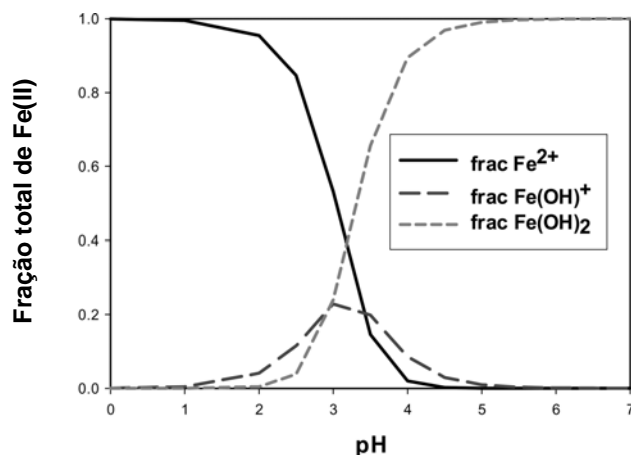


Figura 27. Especiação do Fe^{2+} em água em função do pH, a $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de força iônica, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (adaptado de PIGNATELLO; OLIVEROS; McKAY, 2006).

Enquanto a constante de velocidade de reação entre o íon Fe^{2+} e H_2O_2 é de cerca de $80 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Equação 1), a constante de velocidade de reação entre $\text{Fe}(\text{OH})_2$ e H_2O_2 é quase cerca de sete vezes maior, chegando a $586 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (PIGNATELLO; OLIVEROS; McKAY, 2006), o que indica que a reação é mais rápida em pH acima de 3,0.

Como em pH 4,0, a fração predominante do ferro está na forma $\text{Fe}(\text{OH})_2$, mais reativa, a eficiência na degradação do EE2 em pH 4,0 foi maior que em pH 2,5, situação em que a espécie predominante do ferro é Fe^{2+} .

Os grandes desvios observados na degradação do EE2 em pH 6,0 devem-se provavelmente à baixa solubilidade do ferro, e conseqüentemente sua precipitação como óxidos e hidróxidos insolúveis, como por exemplo o $\text{Fe}(\text{OH})_3$ que pode ter interferido na recuperação do EE2, promovendo tais desvios nas concentrações de hormônio determinadas.

Para averiguar esta possibilidade, foi realizado um experimento em que, na presença de Fe^{2+} , a recuperação do EE2 foi testada para alíquotas de amostras acidificadas e não-acidificadas antes do procedimento de pré-concentração, a fim de melhor avaliar a extração. Neste experimento, as alíquotas foram retiradas e acidificadas até pH 2,5, no qual a solubilidade do Fe^{2+} estaria assegurada (Tabela 16).

Tabela 16. Comparativo de recuperação entre alíquotas de 10 mL de EE2 3,5 mg L⁻¹, submetidas à acidificação antes da pré-concentração^a.

	R (%)	CV (%)
Amostra acidificada (pH 2,5)	121,30	3,30
Amostra não acidificada (pH 6,0)	111,20	2,30

^aanálise realizada em triplicata

Observou-se que os valores de recuperação de amostras acidificadas e não-acidificadas foram próximos. Isto indica que a recuperação do analito não é afetada pela possível formação de precipitados de ferro.

Mesmo em posse de tais resultados, a degradação do EE2 foi avaliada para amostras acidificadas antes da pré-concentração. Embora menores, grandes desvios ainda foram observados (Figura 28).

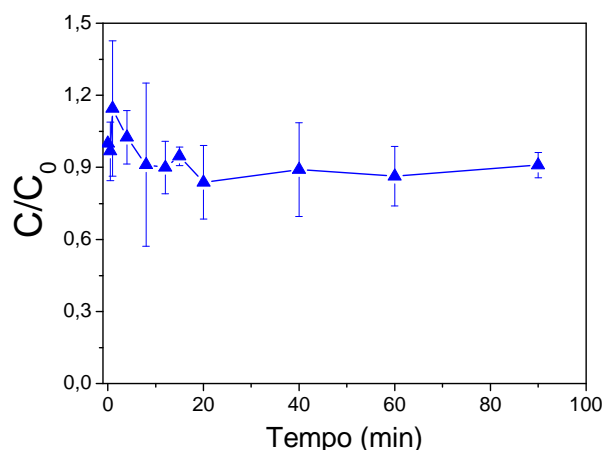


Figura 28. Degradação de EE2 por processo Fenton em pH 6,0. Condições iniciais: EE2 = 4,0 mg L⁻¹; Fe²⁺ = 0,01 mmol L⁻¹; H₂O₂ = 0,5 mmol L⁻¹. Alíquotas acidificadas até pH 2,5 antes da pré-concentração.

Como a faixa de recuperação indicada pela literatura está entre 70 e 120% e os resultados indicaram proximidade nos valores de recuperação de amostras acidificadas e não-acidificadas, optou-se por executar os experimentos com estas últimas. Tal decisão é suportada também no menor coeficiente de variação apresentado na análise de amostras não-acidificadas.

Embora a concentração do EE2 tenha sido reduzida, o COT da solução não acompanhou este comportamento, apresentando no máximo 10% de remoção após 60 minutos de reação em pH 4,0 (Figura 26B). Este é um indicativo da transformação do hormônio em produtos orgânicos resistentes à degradação.

A formação de intermediários de degradação, evidenciados pela não remoção do COT, é também destacada pelos picos que surgiram nos cromatogramas após o primeiro minuto de reação, eluídos em tempos de retenção menores que do analito. Com o aumento do tempo de reação, os intermediários formados foram degradados uma vez que seus picos diminuíram de intensidade (Figuras 29 a 31).

Nos três valores de pH, destaca-se a presença de dois picos cromatográficos bem definidos de t_R aproximados de 6 e 8 minutos, atribuídos a intermediários formados durante a reação. Acompanhando o comportamento comum aos outros picos, tais intermediários são degradados no decorrer do processo Fenton.

As características destes subprodutos não permitiram uma boa resolução por CLAE-DAD nas mesmas condições das utilizadas para o EE2, o que exigiria modificações nas condições cromatográficas utilizadas a fim de melhorar a resolução da análise, o que não estava nos objetivos deste trabalho.

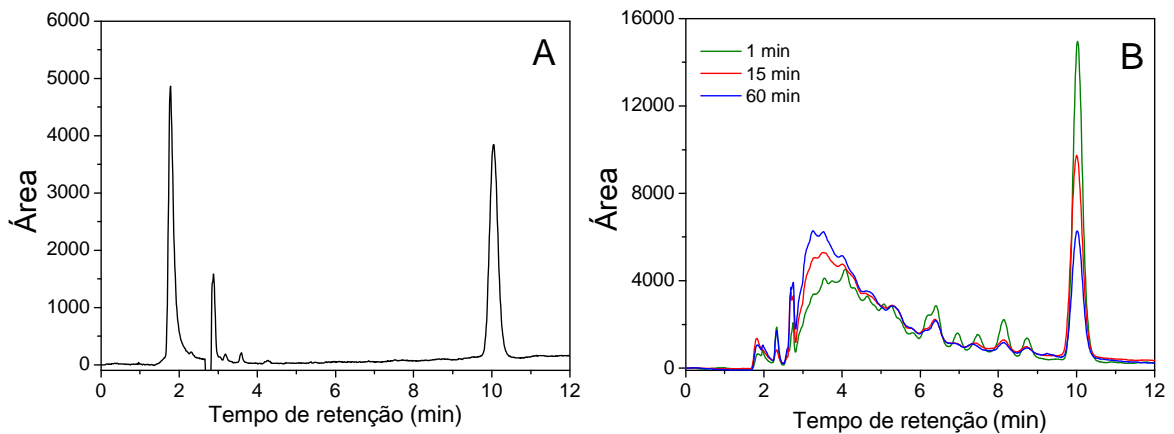


Figura 29. Cromatogramas de amostras de EE2 durante processo Fenton em pH 2,5. (A) Amostra inicial. (B) Após 1, 15 e 60 minutos de reação. A concentração das amostras de (B) está 20 vezes maior que a original (após pré-concentração).

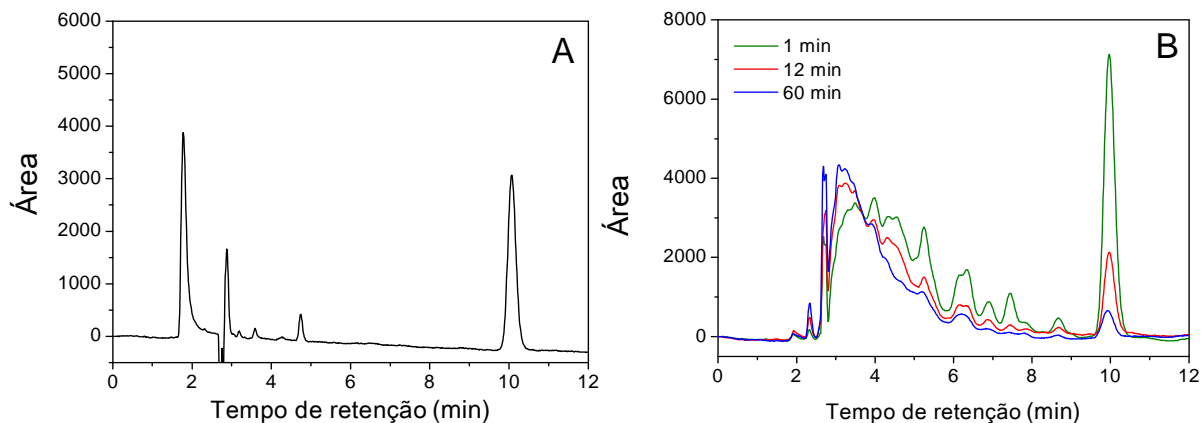


Figura 30. Cromatogramas de amostras de EE2 durante processo Fenton em pH 4,0. (A) Amostra inicial. (B) Após 1, 12 e 60 minutos de reação. A concentração das amostras de (B) está 20 vezes maior que a original (após pré-concentração).

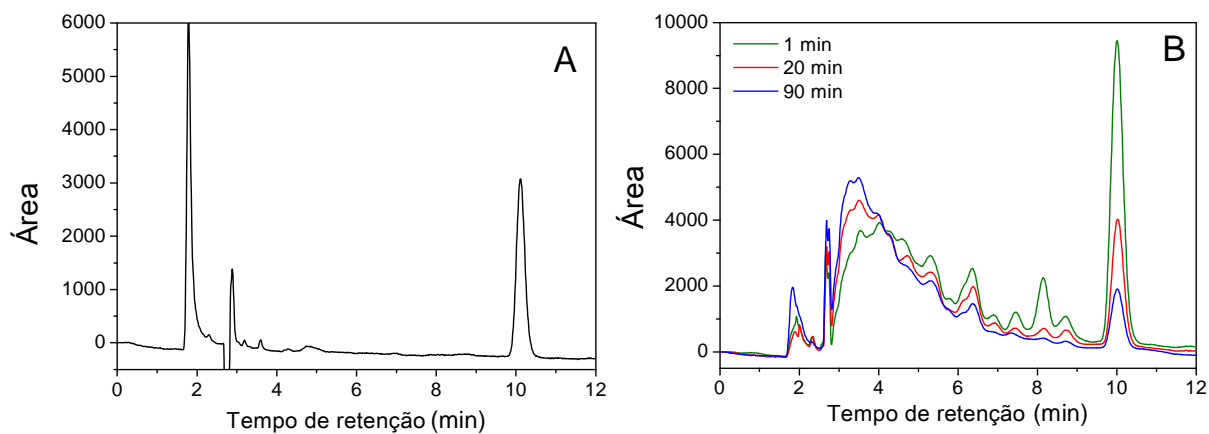


Figura 31. Cromatogramas de amostras de EE2 durante processo Fenton em pH 6,0. (A) Amostra inicial. (B) Após 1, 20 e 90 minutos de reação. A concentração das amostras de (B) está 20 vezes maior que a original (após pré-concentração).

4.4.4. Degradação do etinilestradiol por processo Fenton na presença de β -ciclodextrina

Antes da execução dos experimentos de degradação de EE2 na presença de β -CD, avaliou-se se a β -CD era resistente ao processo oxidativo. Para tanto, o COT de uma solução de β -CD foi monitorado sob condições exatamente iguais às aplicadas nos experimentos.

Os resultados mostraram que não há remoção de COT da solução de β -CD, após 60 minutos de reação, indicando que o macrociclo não é oxidado a CO_2 (Figura 32). No entanto, não é possível avaliar por esta análise se β -CD é oxidada a outros compostos orgânicos ou se permanece inalterada.

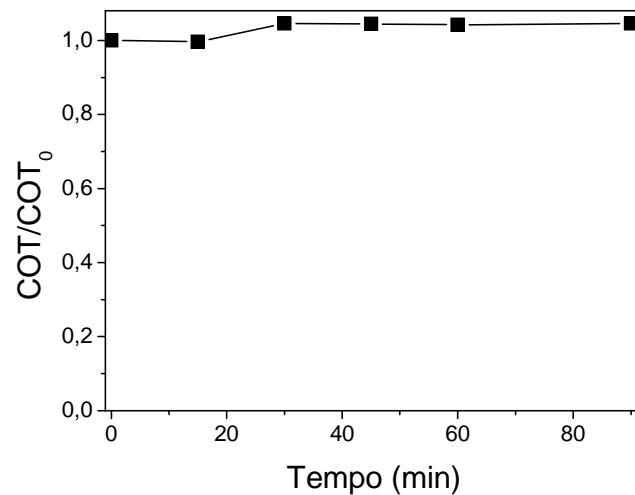


Figura 32. Remoção de COT de β -CD 115 mg L^{-1} submetida ao processo Fenton. Condições iniciais: $\text{Fe}^{2+} = 0,01 \text{ mmol L}^{-1}$; $\text{H}_2\text{O}_2 = 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. $\text{COT}_0 = 42 \text{ mg L}^{-1}$.

Sabendo-se que a β -CD não é degradada a CO_2 em até 90 minutos de reação, os valores de COT do macrociclo foram descontados do valor total da amostra a fim de avaliar a remoção do COT referente somente ao hormônio.

A influência do pH na degradação de EE2 na presença de β -CD mostrou um comportamento semelhante ao observado na ausência de β -CD (Figura 33).

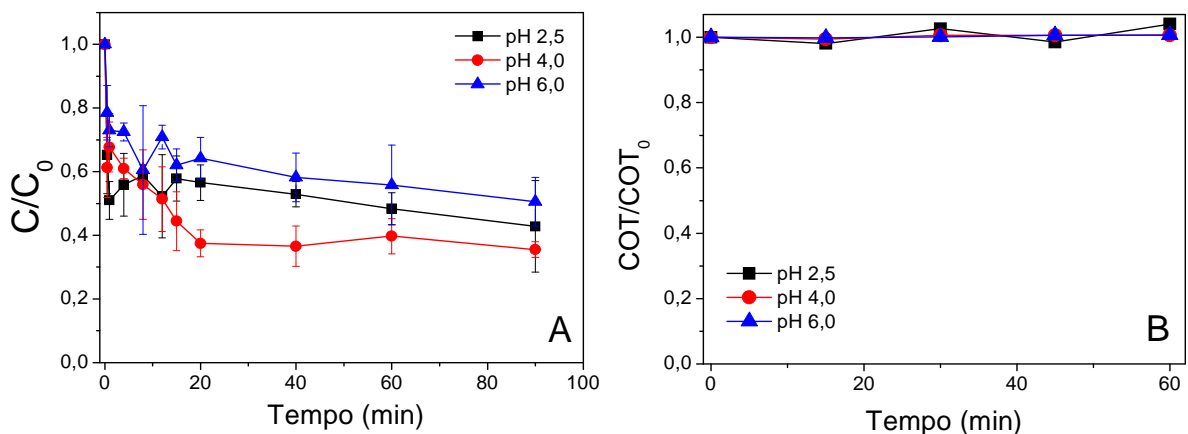


Figura 33. (A) Degradação de EE2, na presença de β -CD 115 mg L^{-1} , por processo Fenton em diferentes valores de pH. Condições iniciais: EE2 = 12 mg L^{-1} ; Fe^{2+} = $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$; H_2O_2 = $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. (B) Remoção de COT; COT_0 = 52 mg L^{-1} ; apenas do EE2 = 10 mg L^{-1} .

Em valores de pH 2,5 e 4,0, a degradação do EE2 foi aparentemente prejudicada pelo macrociclo, alcançando reduções de 45 e 60% após 20 minutos de reação, respectivamente, frente aos 90 e 95% obtidos na ausência de β -CD. A redução da degradação pode ser atribuída à complexação do Fe^{2+} pela superfície da β -CD, que possivelmente torna os íons menos disponíveis para a reação, reduzindo a eficiência do processo.

Porém, a degradação do EE2 na presença de β -CD continuou a ser rápida nos instantes iniciais da reação, assim como na ausência de β -CD.

Por outro lado, a presença de β -CD melhorou a eficiência de degradação do EE2 em pH 6,0, principalmente quando os resultados são comparados com os resultados das amostras na ausência de β -CD e acidificadas. Neste pH, a melhoria na degradação é possivelmente decorrente da complexação do ferro pela β -CD, evitando a precipitação do mesmo em suas formas insolúveis.

A remoção de COT - inicialmente na concentração de 10 mg L^{-1} , referente somente ao EE2 - não foi observada nas condições aplicadas, mostrando que embora houvesse a degradação do EE2, a formação de intermediários de reação recalcitrantes ocorreu de maneira significativa.

Embora a formação dos intermediários de reação também tenha sido observada na presença de β -CD (Figuras 34 a 36), os cromatogramas mostram que estes subprodutos de degradação foram formados em menor quantidade na presença de β -CD do que na ausência do macrociclo, mostrado anteriormente pelas Figuras 29 a 31. A formação destes intermediários de reação foi especialmente baixa em pH 6,0, onde foi possível observar apenas a redução no pico cromatográfico de EE2.

Em pH 2,5, houve a formação dos intermediários com t_R de 6 e 8 minutos, semelhantes aos formados na ausência de β -CD. Isto demonstra que estes subprodutos são formados mesmo na presença de β -CD.

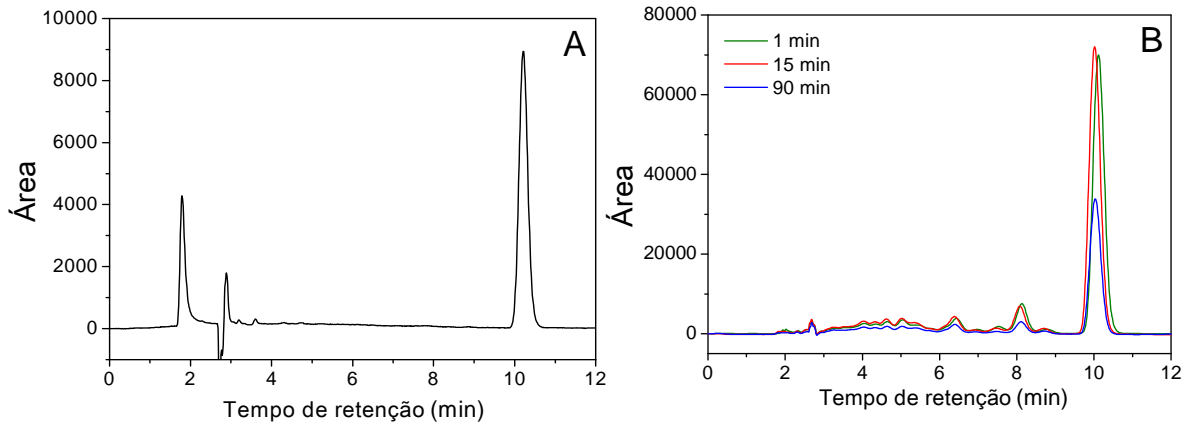


Figura 34. Cromatogramas de amostras de EE2 na presença de β -CD durante processo Fenton em pH 2,5. (A) Amostra inicial. (B) Após 1, 15 e 90 minutos de reação. A concentração das amostras de (B) está 20 vezes maior que a original (após pré-concentração).

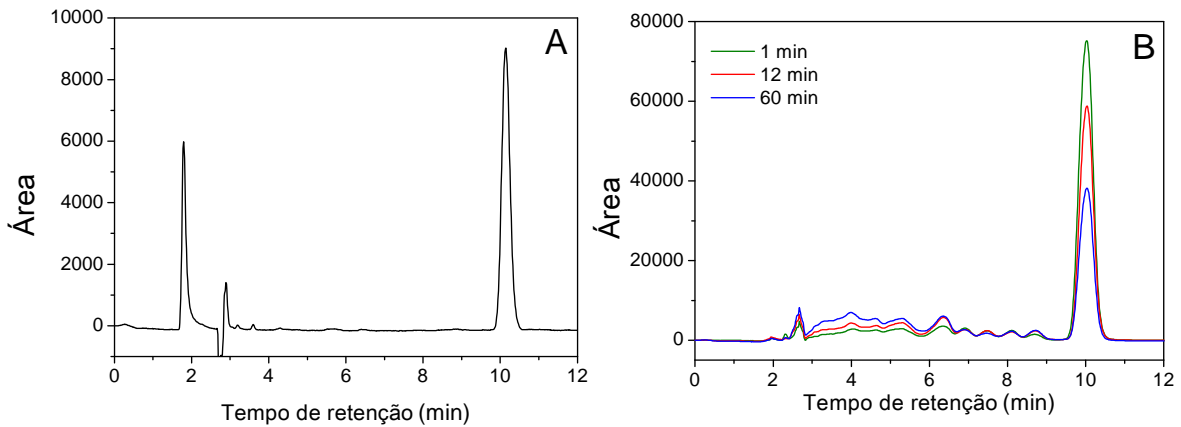


Figura 35. Cromatogramas de amostras de EE2 na presença de β -CD durante processo Fenton em pH 4,0. (A) Amostra inicial. (B) Após 1, 12 e 60 minutos de reação. A concentração das amostras de (B) está 20 vezes maior que a original (após pré-concentração).

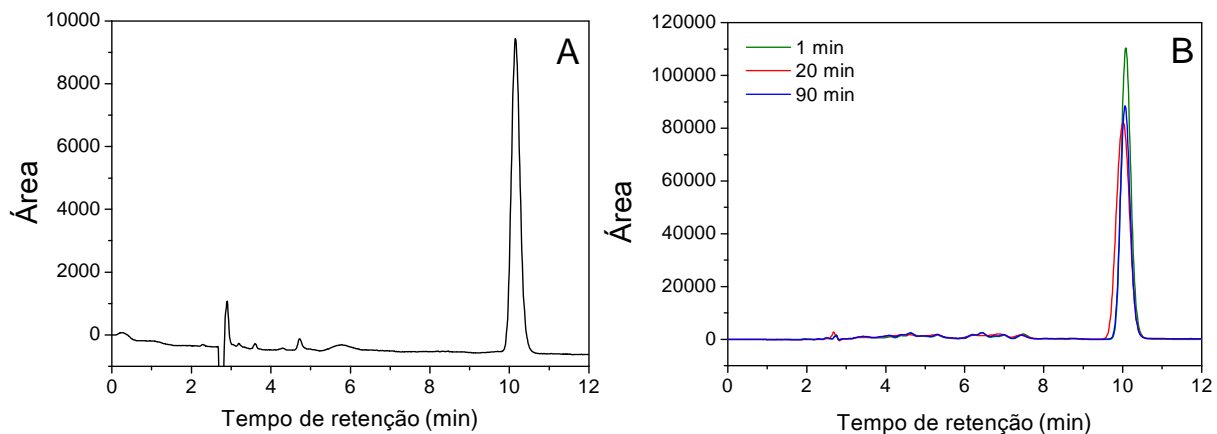


Figura 36. Cromatogramas de amostras de EE2 na presença de β -CD durante processo Fenton em pH 6,0. (A) Amostra inicial. (B) Após 1, 20 e 90 minutos de reação. A concentração das amostras de (B) está 20 vezes maior que a original (após pré-concentração).

Na literatura, a influência da β -CD em processos Fenton foi pouco explorada. Lindsey e colaboradores (2003) avaliaram o efeito de presença de ciclodextrinas na degradação de compostos orgânicos hidrofóbicos por processo Fenton. Estudou-se a adição de β -CD e carboximetil- β -CD na degradação de poluentes aromáticos modelo, como antraceno, pireno e fenol, onde foi concluído que a presença de CD aumentou a eficiência da reação de Fenton por coordenar simultaneamente o ferro e o poluente orgânico, fazendo com que a geração de radicais \bullet OH ocorresse nas proximidades da molécula alvo.

Neste trabalho, no entanto, a aplicação da β -CD na degradação do EE2 reduziu a eficiência do processo Fenton. Embora tenha sido constatado anteriormente que o Fe^{2+} é complexado pela β -CD e que este foi um dos motivos sugeridos para a aplicação da β -CD no processo oxidativo, os resultados indicaram que esta complexação não foi bem sucedida. Além disso, a forte associação entre o

hormônio e a β -CD poderia tornar o hormônio menos disponível para a degradação em meio aquoso, reduzindo a eficiência do processo.

4.5. DEGRADAÇÃO POR PROCESSO FOTO-FENTON

4.5.1. Efeito do pH na degradação de etinilestradiol na ausência de β -ciclodextrina

Os experimentos realizados anteriormente mostraram que a redução na concentração do EE2 por processo Fenton foi significativa, embora a remoção do COT não tenha acompanhado este comportamento.

Sabendo-se que a eficiência de degradação pode ser maior sob irradiação, testou-se o processo foto-Fenton na degradação de EE2.

Os resultados mostraram que a redução na concentração do estrógeno alcançou 100% em pH 2,5 e 4,0, após 30 minutos de reação. Em pH 6,0, a redução atingiu 60% após 60 minutos de reação. Esses resultados foram muito promissores e indicaram que o processo foto-Fenton foi capaz de reduzir o hormônio a concentrações abaixo do limite de detecção em 30 minutos, usando baixas concentrações de Fe^{2+} e H_2O_2 (Figura 37).

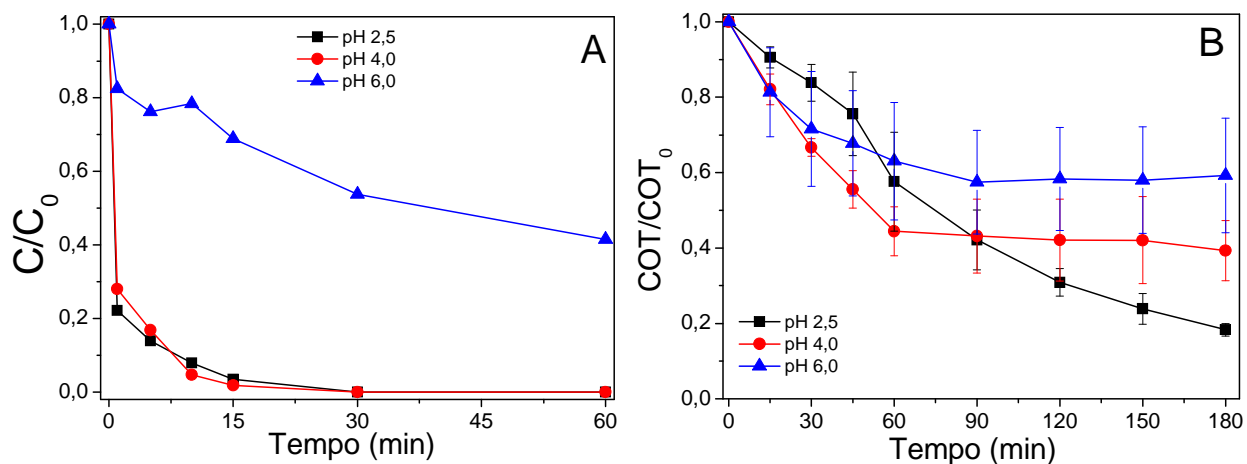


Figura 37. (A) Influência do pH na degradação de EE2 por processo foto-Fenton, sob irradiação artificial. Condições iniciais: EE2 = 5,7 mg L⁻¹; Fe²⁺ = 0,01 mmol L⁻¹; H₂O₂ = 0,5 mmol L⁻¹. (B) Remoção de COT; COT₀ = 6 mg L⁻¹.

A remoção de COT em pH 2,5 chegou a 80%, após 180 minutos de reação, e indica que os subprodutos formados durante a reação foram em grande parte degradados, visto que somente 20% do carbono orgânico inicial permaneceu em solução. Em pH 4,0 e 6,0, cuja remoção de COT alcançou respectivamente 60 e 40% após 180 minutos de tratamento, foi mostrado que somente uma parcela dos subprodutos de reação foram degradados, pois ainda restou em solução boa parte da concentração de COT (Figura 37B).

Estes resultados podem ser atribuídos às formas de Fe³⁺ em solução. Em pH 2,5, as formas que contribuem para a formação dos radicais •OH são Fe³⁺ e Fe(OH)²⁺, enquanto que em pH 4,0, destaca-se a contribuição quase total de Fe(OH)²⁺ (Figura 4). Estas espécies apresentam um rendimento quântico de formação de •OH destacável, indicando que quando submetidas à irradiação em comprimento de onda adequado às suas propriedades fotoquímicas, produziram

uma grande quantidade de radicais $\bullet\text{OH}$, responsáveis pela degradação do hormônio em solução.

Já em pH 6,0, a forma que contribui para a fotoformação de radicais $\bullet\text{OH}$ é o dímero do Fe^{3+} , o $\text{Fe}_2(\text{OH})_2^{4+}$, cujo rendimento quântico de formação de $\bullet\text{OH}$ é relativamente baixo. Assim, a baixa geração de radicais levou à menor degradação neste pH, fazendo com que a redução na concentração do EE2 não fosse menor em pH 6,0 do que em pH 2,5 e 4,0.

Os cromatogramas mostraram que a geração de subprodutos de reação é pouco significativa em pH 6,0. Em pH 2,5 e 4,0, foi possível observar mudanças no comportamento cromatográfico das amostras, indicando a degradação de subprodutos de reação, formados logo no primeiro minuto do processo foto-Fenton (Figuras 38 a 40).

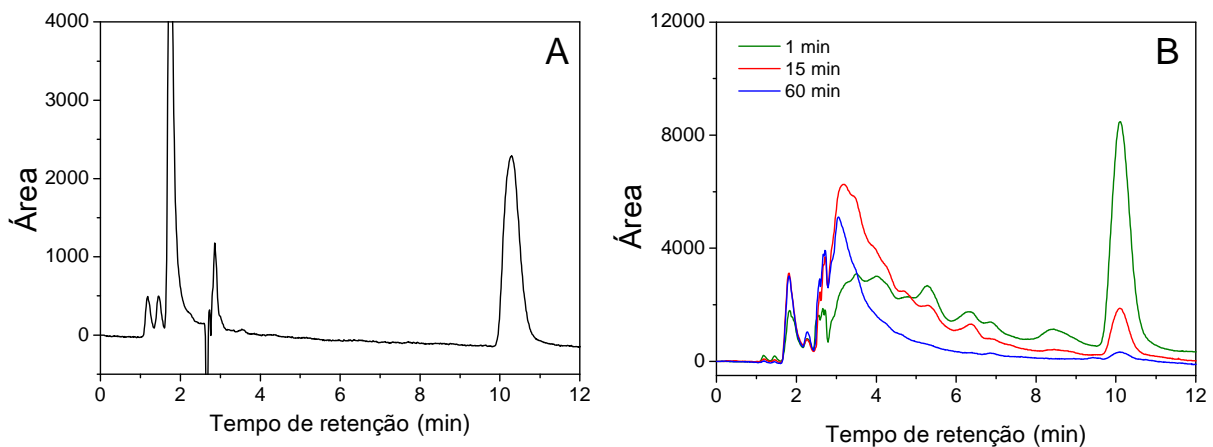


Figura 38. Cromatogramas de amostras de EE2 durante o processo foto-Fenton sob irradiação artificial, em pH 2,5. (A) Amostra inicial. (B) Após 1, 15 e 60 minutos de reação. A concentração das amostras de (B) está 20 vezes maior que a original (após pré-concentração).

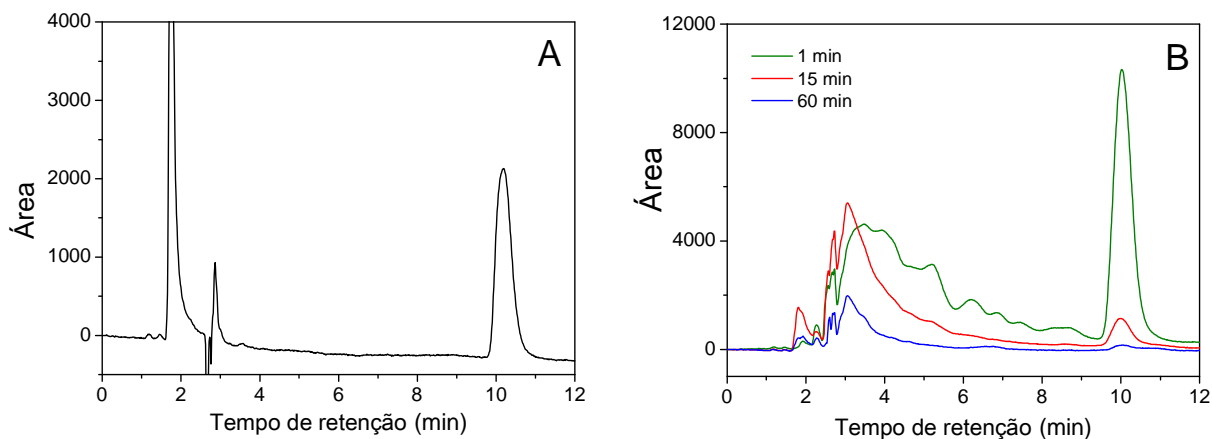


Figura 39. Cromatogramas de amostras de EE2 durante o processo foto-Fenton sob irradiação artificial, em pH 4,0. (A) Amostra inicial. (B) Após 1, 15 e 60 minutos de reação. A concentração das amostras de (B) está 20 vezes maior que a original (após pré-concentração).

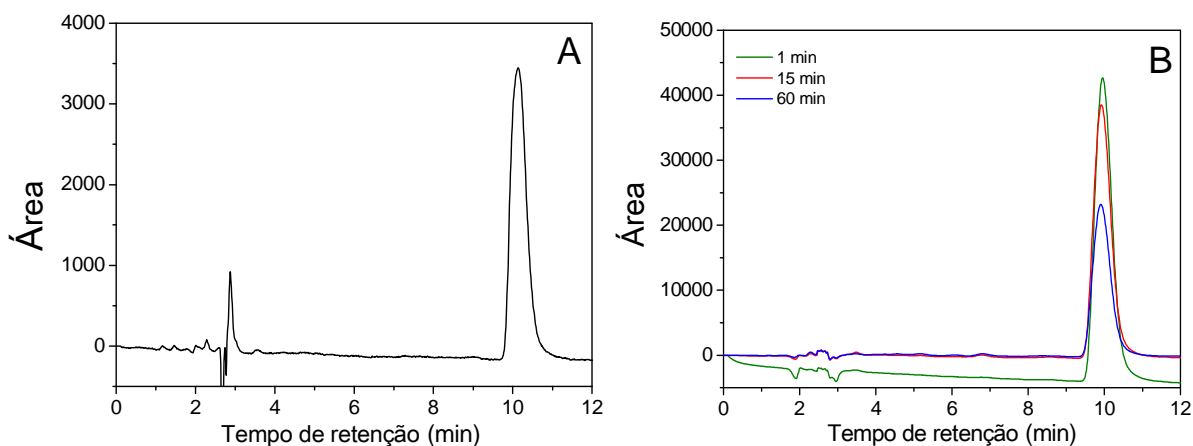


Figura 40. Cromatogramas de amostras de EE2 durante o processo foto-Fenton sob irradiação artificial, em pH 6,0. (A) Amostra inicial. (B) Após 1, 15 e 60 minutos de reação. A concentração das amostras de (B) está 20 vezes maior que a original (após pré-concentração).

4.5.2. Efeito da β -ciclodextrina na degradação de etinilestradiol em diferentes valores de pH

Antes de avaliar a degradação de EE2 na presença de β -CD, monitorou-se sua degradação por meio da avaliação de remoção de COT. Os resultados mostraram que a mineralização da β -CD por processo foto-Fenton é de cerca de 4% após 30 minutos de reação. A pequena degradação do sacarídeo foi descontada dos valores de COT de soluções que continham β -CD, para que os valores observados se referissem somente à remoção de COT do EE2 (Figura 41).

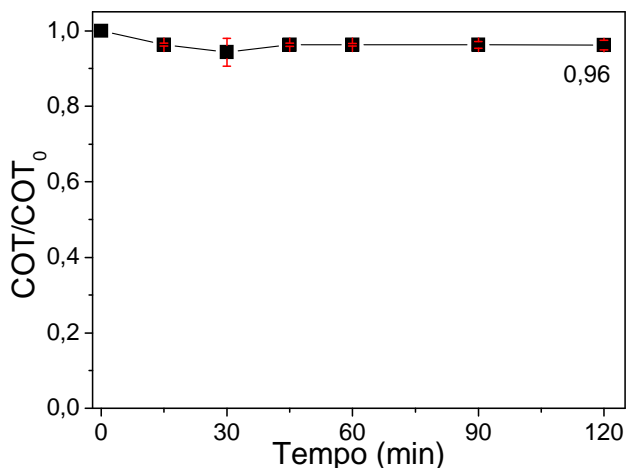


Figura 41. Remoção de COT de β -CD 115 mg L^{-1} submetida ao processo foto-Fenton. Condições iniciais: $\text{Fe}^{2+} = 0,01 \text{ mmol L}^{-1}$; $\text{H}_2\text{O}_2 = 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. $\text{COT}_0 = 42 \text{ mg L}^{-1}$.

Na presença de β -ciclodextrina, a redução na concentração do EE2 atingiu os valores de 80, 98 e 20% em pH 2,5, 4,0 e 6,0, respectivamente. O melhor resultado foi observado em pH 4,0, em que a degradação de EE2 foi próxima a 100% após 60 minutos de reação (Figura 42).

Em comparação com os resultados obtidos na ausência de β -CD, a presença do macrociclo reduz a eficiência do processo foto-Fenton em pH 2,5 e 6,0. Isso é decorrente da complexação do Fe^{2+} , espécie predominante no pH 2,5, impedindo que ele reaja com H_2O_2 e forme Fe^{3+} (reação de Fenton). A indisponibilidade do Fe^{2+} livre reduz a eficiência da reação por gerar menos radicais $\bullet\text{OH}$, levando a uma menor redução na concentração do EE2.

Em pH 4,0, a eficiência da reação de degradação na presença de β -CD foi muito próxima da observada na ausência de β -CD. Isso acontece porque a forma predominante do ferro neste pH é $\text{Fe}(\text{OH})_2$ e esta espécie não ionizada apresenta provavelmente baixa interação com a β -CD, fazendo com que a geração de radicais $\bullet\text{OH}$ não seja prejudicada.

Em pH 6,0, a baixa eficiência na degradação pode ser atribuída tanto à complexação do Fe^{2+} em β -CD, prejudicando o ciclo do processo Fenton $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, quanto às formas insolúveis do ferro, que estão presentes neste pH. Embora a maior contribuição seja do segundo fator, tais condições tornaram a reação pouco eficiente, levando a uma redução na concentração do EE2 de apenas 20% após 60 minutos de reação.

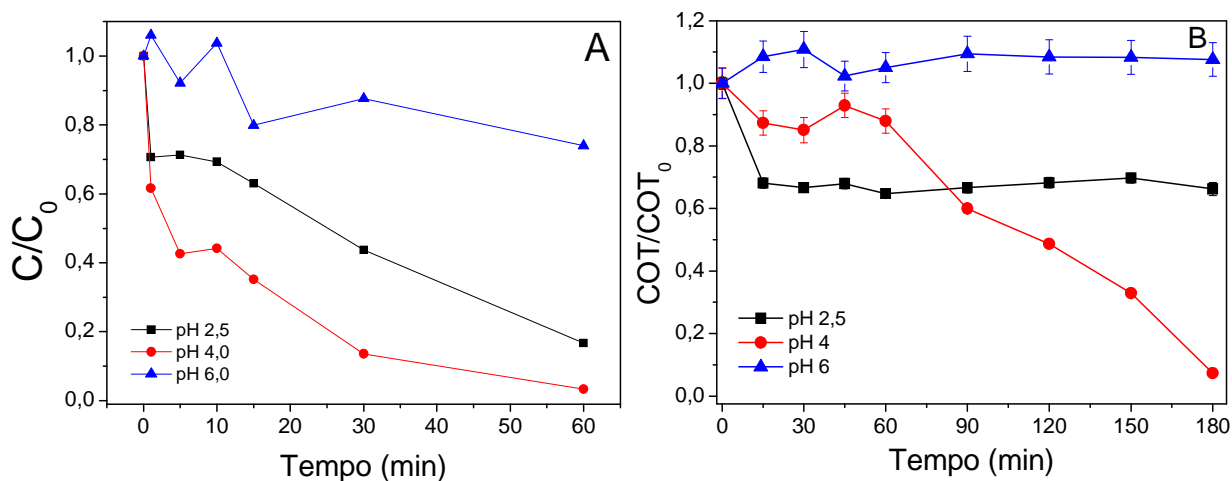


Figura 42. (A) Degradação de EE2 por processo foto-Fenton, sob irradiação artificial, na presença de β -CD em diferentes valores de pH. Condições iniciais: EE2 = 12 mg L⁻¹; Fe²⁺ = 0,01 mmol L⁻¹; H₂O₂ = 0,5 mmol L⁻¹. (B) Remoção de COT; COT₀ = 52 mg L⁻¹; apenas do EE2 = 12 mg L⁻¹.

A remoção de COT foi quase total em pH 4,0, alcançando cerca de 95% após 180 minutos de reação, o que indica que os subprodutos de reação formados neste pH estão sendo degradados.

Já em pH 2,5, a máxima remoção de COT é atingida aos 15 minutos de reação e permanece em 30% de remoção mesmo com o aumento do tempo de irradiação da amostra. Neste caso, houve um indicativo de que os subprodutos de reação fossem recalcitrantes ou de que o H₂O₂ tivesse sido consumido totalmente. Determinações de H₂O₂ demonstraram que havia H₂O₂ em solução suficiente para ocorrer a reação, e que a formação de intermediários recalcitrantes nestas condições era a hipótese mais provável para a baixa remoção de COT da amostra.

Em pH 6,0, embora uma pequena degradação do EE2 tenha sido observada, não houve nenhuma remoção de COT.

O monitoramento da concentração de H_2O_2 residual (Figura 43) mostrou que ocorre o rápido consumo de peróxido de hidrogênio durante a reação em pH 4,0, que foi repostado aos 60 minutos, assim que todo reagente foi consumido. Tal ação permitiu que a degradação do EE2 neste pH tivesse continuidade.

Em pH 2,5, o consumo total do peróxido de hidrogênio ocorreu somente após 120 minutos de reação, indicando que até este ponto, havia disponibilidade de reagente para formação de radicais $\bullet\text{OH}$. Em pH 6,0, após 180 minutos de reação, havia em solução ainda 40% da quantidade de H_2O_2 adicionada, não sendo necessária adição deste reagente.

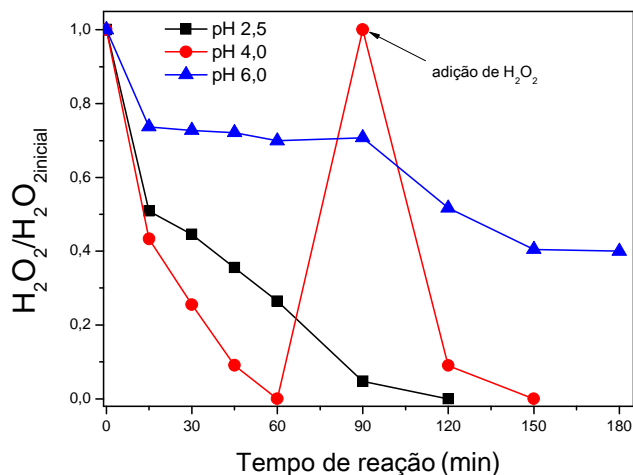


Figura 43. Consumo de H_2O_2 durante degradação de EE2 por foto-Fenton na presença de β -CD. Condições iniciais: EE2 = 12 mg L^{-1} ; Fe^{2+} = $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$; H_2O_2 = $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$.

Os cromatogramas das reações em pH 2,5 e 4,0 mostraram que o aumento do tempo de reação levou à formação de subprodutos de degradação, evidenciado pelos picos cromatográficos (Figuras 44 e 45).

Em pH 6,0, não são observados picos referentes à formação de intermediários, decorrente da baixa degradação do EE2. Foi possível observar apenas a pequena redução no pico cromatográfico do analito (Figura 46).

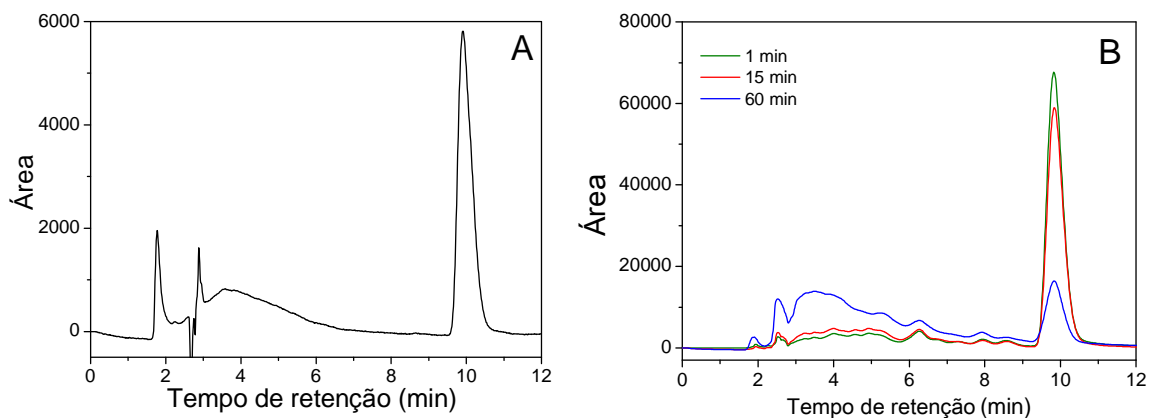


Figura 44. Cromatogramas de amostras de EE2 na presença de β -CD durante processo foto-Fenton sob irradiação artificial, em pH 2,5. (A) Amostra inicial. (B) Após 1, 15 e 60 minutos de reação. A concentração das amostras de (B) está 20 vezes maior que a original (após pré-concentração).

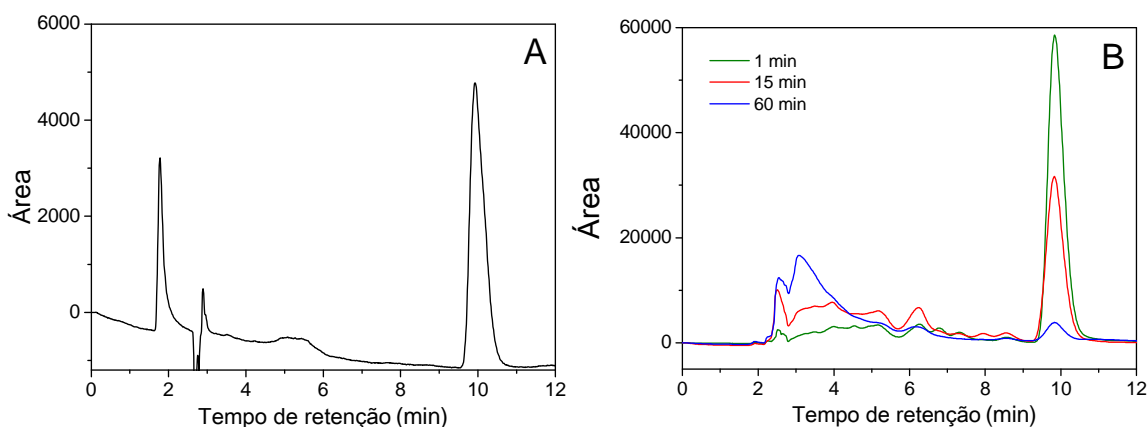


Figura 45. Cromatogramas de amostras de EE2 na presença de β -CD durante processo foto-Fenton sob irradiação artificial, em pH 4,0. (A) Amostra inicial. (B) Após 1, 15 e 60 minutos de reação. A concentração das amostras de (B) está 20 vezes maior que a original (após pré-concentração).

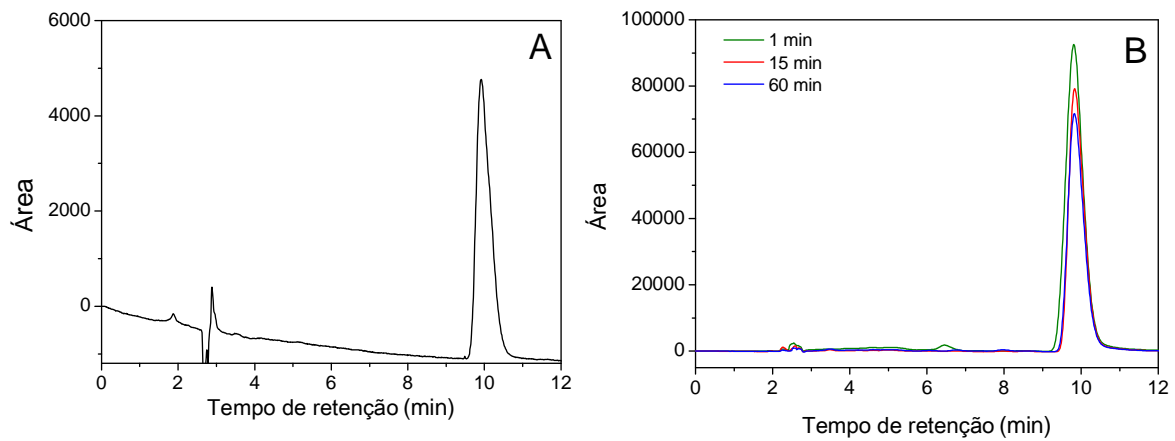


Figura 46. Cromatogramas de amostras de EE2 na presença de β -CD durante processo foto-Fenton sob irradiação artificial, em pH 6,0. (A) Amostra inicial. (B) Após 1, 15 e 60 minutos de reação. A concentração das amostras de (B) está 20 vezes maior que a original (após pré-concentração).

4.5.3. Efeito do pH na degradação de valerato de estradiol na ausência de β -ciclodextrina

Observou-se que a degradação do E2 por processo foto-Fenton em pH 2,5 e 4,0 apresenta uma variação até os 20 primeiros minutos de reação, tempo a partir do qual a concentração do hormônio começa a diminuir até chegar a 50% da inicial, após 120 minutos de reação (Figura 47).

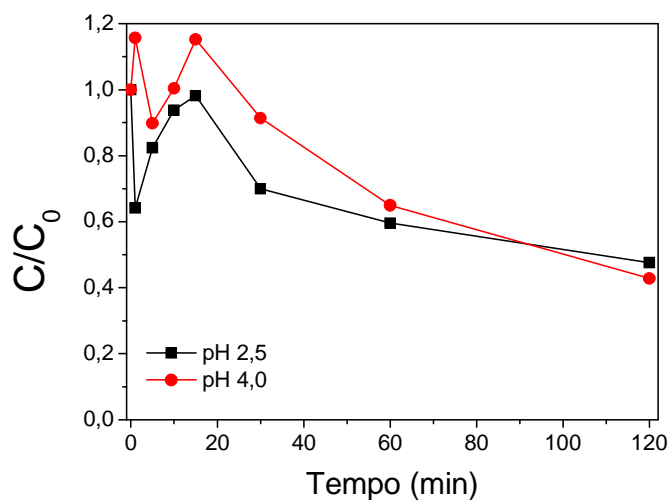


Figura 47. (A) Degradação de E2 por processo foto-Fenton, sob irradiação artificial, em pH 2,5 e 4,0. Condições iniciais: E2 = 4,0 mg L⁻¹; Fe²⁺ = 0,01 mmol L⁻¹; H₂O₂ = 0,5 mmol L⁻¹.

Esse comportamento é decorrente da baixa solubilidade do E2 em água. Ainda que o tempo de dissolução do hormônio em água tenha sido suficiente - 10 minutos, a discrepância observada no gráfico é decorrente de problemas na dissolução, o que pode ter prejudicado a recuperação adequada do analito, provocando a oscilação da concentração em fase aquosa nos primeiros minutos da degradação.

O monitoramento de H₂O₂ residual mostrou que aos 30 minutos de reação cerca de 40% do peróxido adicionado ainda não havia sido consumido, indicando que a produção de radicais •OH foi relativamente baixa (Figura 48).

Entretanto, após 120 minutos de reação, a quantidade de peróxido de hidrogênio residual na reação em pH 4,0 era de menos de 5%, o que denota a produção de radicais •OH durante o processo. Comportamento semelhante foi observado em pH 2,5, em que após 120 minutos de reação, apenas 30% do peróxido de hidrogênio adicionado inicialmente permanecia na amostra.

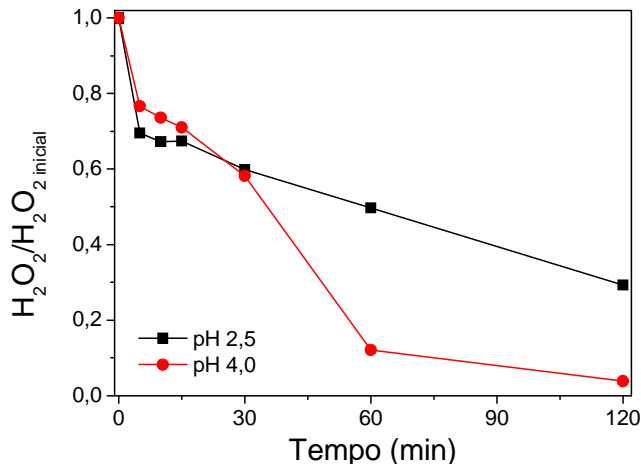


Figura 48. Consumo de H_2O_2 durante degradação de E2 por processo foto-Fenton. Condições iniciais: $\text{E2} = 4,0 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{Fe}^{2+} = 0,01 \text{ mmol L}^{-1}$; $\text{H}_2\text{O}_2 = 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$.

Embora a quantidade de metanol utilizada na dissolução de E2 seja pequena (0,1% v/v), a presença deste reagente pode ter prejudicado a eficiência da reação. O metanol age como sequestrante de radicais hidroxilas, reduzindo a disponibilidade destes radicais no meio (SAFARZADEH-AMIRI; BOLTON; CATER, 1997); com isso, o processo perde eficiência e o contaminante deixa de ser degradado adequadamente.

As condições experimentais utilizadas para o E2 são diferentes das condições utilizadas para o EE2, o que torna desaconselhável a comparação da eficiência do processo para os dois hormônios.

Análises cromatográficas das amostras em pH 2,5 e 4,0 mostram que não são formados intermediários de degradação, tendo em vista que nenhum pico cromatográfico foi observado após o início da reação (dado não mostrado).

Feng e colaboradores (2005) avaliaram a degradação de E2 por processo foto-Fenton, irradiação acima de 313 nm. Foi concluído que há melhora na eficiência

da reação quando aumenta-se a concentração inicial de H_2O_2 e diminui-se a concentração inicial de hormônio. Foi mostrado também que a redução na concentração de E2 chegou a valores de até 75%, embora a mineralização do hormônio não tenha passado de 20%.

Não se pode atribuir a baixa eficiência na degradação de E2 por foto-Fenton somente ao possível seqüestro de radicais $\bullet OH$ pelo metanol em solução. Uma outra possibilidade para a baixa eficiência é a estrutura da molécula de E2, que pode ser resistente à degradação por processos oxidativos avançados.

4.5.4. Efeito da β -ciclodextrina na degradação de estradiol em diferentes valores de pH

Em pH 2,5, a dissolução de E2 é observada nos quinze primeiros minutos, o que afeta a degradação. Nota-se que a concentração inicial do hormônio é elevada em 50% até o 15º minuto, a partir do qual sua concentração diminui (Figura 49). Este comportamento não é observado em pH 4,0, indicando que possíveis problemas na dissolução foram observados somente no pH 2,5.

Em ambos os casos, a redução na concentração do E2 chegou a cerca de 60% após 120 minutos, valor próximo do observado na ausência de β -CD. Dessa maneira, os resultados mostram que a presença de β -CD não influencia a degradação do E2 por foto-Fenton.

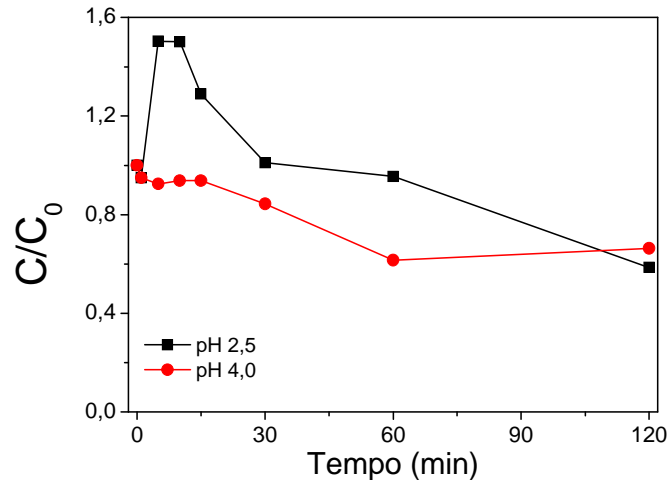


Figura 49. (A) Degradação de E2 por processo foto-Fenton sob irradiação artificial, em pH 2,5 e 4,0, na presença de 50 mg L⁻¹ de β-CD. Condições iniciais: E2 = 10,0 mg L⁻¹; Fe²⁺ = 0,01 mmol L⁻¹; H₂O₂ = 0,5 mmol L⁻¹.

Em relação ao peróxido de hidrogênio residual, a redução do reagente chega a mais de 90% em pH 2,5 e próxima a 80% em pH 4,0, após 120 minutos de reação (Figura 50). Embora o consumo tenha sido elevado, a presença do metanol pode ter reduzido a eficiência do processo a partir do seqüestro dos radicais hidroxila.

Era esperado que a β-ciclodextrina reduzisse os possíveis efeitos provocados pelo metanol em solução, tornando a reação mais eficiente na presença do que na ausência de β-CD. Entretanto, a presença do macrociclo não minimizou a ação deste sequestrante e a eficiência na degradação alcançou valores próximos aos observados na ausência de β-CD, após 120 minutos de reação.

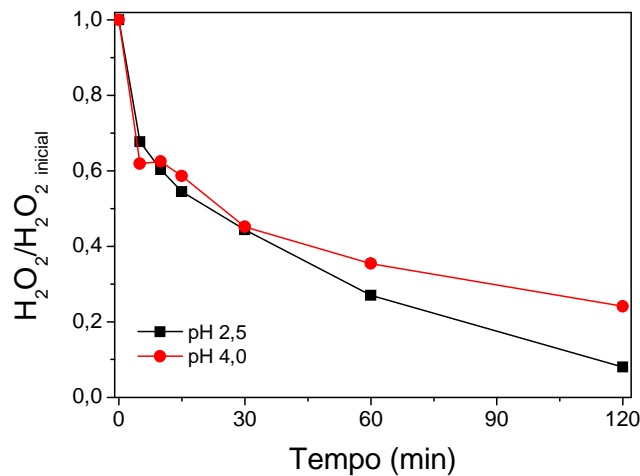


Figura 50. Consumo de H_2O_2 durante degradação de E2, na presença de $\beta\text{-CD}$, por processo foto-Fenton. Condições iniciais: $\text{E2} = 10,0 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{Fe}^{2+} = 0,01 \text{ mmol L}^{-1}$; $\text{H}_2\text{O}_2 = 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$.

Os resultados observados nos cromatogramas em pH 2,5 e 4,0 mostraram que não há formação de intermediários de degradação do E2 na presença de $\beta\text{-CD}$. Esse comportamento é decorrente da baixa eficiência na degradação do E2, gerando baixas concentrações de subprodutos de reação, que não puderam ser detectados (dados não mostrados).

Estudos recentes mostram que a participação de $\beta\text{-CD}$ em processos Fenton está limitada somente à aplicação no aumento da solubilidade de moléculas-alvo (HANNA; CHIRON; OTURAN, 2005; VEIGNIE et al., 2009; YARDIN; CHIRON, 2006).

5. CONCLUSÕES

A aplicabilidade da β -ciclodextrina foi mostrada neste trabalho, em que este macrociclo foi utilizado na degradação dos hormônios estradiol e etinilestradiol por processos Fenton e foto-Fenton com irradiação artificial.

Inicialmente, avaliou-se a interação da β -CD com os estrógenos. Para tanto, calculou-se a estequiometria de inclusão, a qual mostrou que a formação de complexos de inclusão entre os hormônios estrógenos e a β -CD seguiu a estequiometria 1:1. Este comportamento indicou que a cavidade da β -CD foi capaz de acomodar somente uma molécula de estrógeno por vez.

As constantes de inclusão aparentes E2: β -CD e EE2: β -CD mostraram valores muito próximos para os dois hormônios, demonstrando que a similaridade estrutural entre as duas moléculas faz com que as interações estabelecidas entre a cavidade da β -CD e cada uma das moléculas sejam semelhantes.

A complexação do Fe^{2+} pela β -CD depende do valor do pH do meio; esse fato pode ser atribuído às diferentes interações estabelecidas entre as espécies pH-dependentes de ferro e a β -CD. A constante de complexação Fe^{2+} - β -CD foi decrescente na ordem: pH 4,0 > pH 2,5 > pH 6,0. Outros resultados mostraram que constante de complexação Fe^{3+} - β -CD é igualmente dependente do pH e decrescente na ordem: pH 6,0 > pH 2,5 > pH 4,0.

A extração em fase sólida permitiu o alcance de soluções com concentrações acima dos LD e LQ, as quais são analiticamente mais viáveis. Além da pré-concentração das amostras, a técnica foi responsável pela interrupção dos processos Fenton e foto-Fenton. A presença de β -CD não exerceu influência na recuperação dos hormônios.

Os processos Fenton e foto-Fenton aplicados aos hormônios estrógenos estradiol e etinilestradiol, promoveram rápida degradação destes hormônios.

Na ausência de β -CD, a degradação do EE2 por processo Fenton é eficiente em pH 2,5 e 4,0, mas pouco eficiente em pH 6,0. A formação de intermediários durante a degradação foi observada pela baixa remoção de COT e pelo surgimento de diversos picos cromatográficos. O mesmo comportamento foi observado na presença de β -CD, embora a eficiência dos processos nos diferentes valores de pH tenha sido menor quando o macrociclo foi adicionado.

No caso do E2, o processo foto-Fenton apresentou eficiência semelhante em pH 2,5 e 4,0. Não foram detectados subprodutos de degradação de E2 na ausência de β -CD, visto que a redução na concentração do hormônio foi baixa e as análises cromatográficas não ofereceram nenhuma informação importante.

O consumo de H_2O_2 foi quase total durante o processo foto-Fenton na degradação de E2. Isso leva a crer que embora estivessem sendo formados radicais hidroxila, a presença do metanol – que age como sequestrante destes radicais- pode ter reduzido a eficiência da reação, que não passou de 50%. Os resultados observados na presença de β -CD são muito semelhantes aos observados na ausência do macrociclo.

De maneira geral, a presença de β -CD reduziu a eficiência dos processos Fenton tanto na degradação de E2 quanto de EE2, demonstrando que a complexação do Fe^{2+} com o macrociclo não aumenta a eficiência do processo, como foi proposto. Entretanto, a presença de β -CD permitiu que os processos Fenton fossem aplicados a substâncias de baixa solubilidade em água.

6. PERSPECTIVAS

- Avaliação da formação de complexos ternários CD-hormônio-Fe²⁺.
- Eficiência dos processos Fenton mediados por outras ciclodextrinas, como carboximetil-β-CD e hidroxipropil-β-CD.
- Estudo da toxicidade das amostras durante a degradação dos hormônios.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Mercado nacional de medicamentos em 2008**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/listas/index.htm>>. Acesso em: 28 jul. 2009.

AGUEROS, M.; RUIZ-GATON, L.; VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K.; ESPUELAS, S.; PONCHEL, G.; IRACHE, J. M. Combined hydroxypropyl- β -cyclodextrin and poly(anhydride) nanoparticles improve the oral permeability of paclitaxel. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 4, p. 405-403, 2009.

ALVES, C.; FLORES, L. C.; CERQUEIRA, T. S.; TORALLES, M. P. B. Environmental exposure to endocrine disruptors with estrogenic activity and the association with pubertal disorders in children. **Reports in Public Health**, v. 23, n. 5, p. 1005-1014, 2007.

BARDI, L.; MATTEI, A.; STEFFAN, S.; MARZONA, M. Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with beta-cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 9, p. 709-713, 2000.

BARKER, W. M.; WORM, K.; DOLLE, R. E. High performance liquid chromatography enantioseparation of methanobenzazocines. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 45, p. 7708-7714, 2009.

BAUTISTA, F.; MOHEDANO, A. F.; CASAS, J. A.; ZAZO, J. A.; RODRIGUEZ, J. J. An overview of the application of Fenton oxidation to industrial wastewaters treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 1323-1338, 2008.

BEDDING, N. D.; McINTYRE, A. E.; PERRY, R.; LESTER, J. N. Organic contaminants in the aquatic environment I. Sources and occurrence. **Science of the Total Environment**, v. 25, n. 2, p. 143-167, 1982.

BENESI, H. A.; HILDEBRAND, H. Spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons. **Journal of American Chemical Society**, v. 71, p. 2703-2707, 1949.

BENI, S.; SOHAJDA, T.; NEUMAJER, G.; IVANIY, R.; SZENTE, L.; NOSZAL, B. Separation and characterization of modified pregabalins in terms of cyclodextrin complexation, using capillary electrophoresis and nuclear magnetic resonance. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 4, p. 842-852, 2010.

BERTACHE, V.; LORENZI, N.; NAVA, D.; PINI, E.; SINCO, C. Host-guest interaction study of resveratrol with natural and modified cyclodextrins. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 55, n. 3-4, p. 279-287, 2006.

BHUSHAN, R.; KUMAR, R. Comparative application of microwave, ultrasonication, ultracentrifugation and conventional heating for preparation of sample as dinitrophenyl derivative for direct enantioseparation of certain amino alcohols and 1-amino-2-propanol from vitamin B₁₂ hydrolysate on α_1 -acid glycoprotein and β -cyclodextrin columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 45, p. 7941-7945, 2009.

BICCHI, C.; BLUMBERG, L.; CAGLIERO, C.; CORDERO, C.; RUBIOLO, P.; LIBERTO, E. Development of fast enantioselective gas-chromatographic analysis using gas-chromatographic method-translation software in routine essential oil analysis (lavender essential oil). **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 9, p. 1530-1536, 2010.

BIGDA, R. J. Consider Fenton's chemistry for wastewater treatment. **Chemical Engineering Progress**, v. 91, n. 12, p. 62-66, 1995.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.

BIZZIGOTTI, G. O.; REYNOLDS, D. A.; KUEPER, B. H. Enhanced solubilization and destruction of tetrachloroethylene by hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and iron. **Environmental Science & Technology**, v. 31, n. 2, p. 472-478, 1997.

BLASTO, C.; PICÓ, Y. Prospects for combining chemical and biological methods for integrated environmental assessment. **TrAC-Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 745-757, 2009.

BLEDZKA, D.; GRYGLIK, D.; MILLER, J. S. Photodegradation of butylparaben in aqueous solution by 254 nm irradiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 203, n. 1-2, p. 131-136, 2009.

BOLONG, N.; ISMAIL, A. F.; SALIM, M. R.; MATSUURA, T. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. **Desalination**, v. 239, p. 229-246, 2009.

BONENFANT, D.; NIQUETTE, P.; MIMEAULT, M.; FURTOS-MATEI, A.; HAUSLER, R. UV-VIS and FTIR spectroscopic analyses of inclusion complexes of nonylphenol and nonylphenol ethoxylate with beta-cyclodextrin. **Water Research**, v. 43, n. 14, p. 3575-3581, 2009.

BRASIL. Ministério da Educação e Cultura. **Acesso a água potável**. Disponível em: <<http://portaldoprofessor.mec.gov.br/fichaTecnicaAula.html?aula=1713>>. Acesso em: 16 maio 2010.

CALIMAN, F. A.; GAVRILESCU, M. Pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting agents in the environment – a review. **Clean- Soil, Air, Water**, v. 37, n. 4-5, p. 277-303, 2009.

CHALUMOT, G.; YAO, C.; PINO, V.; ANDERSON, J. L. Determining the stoichiometry and binding constants of inclusion complexes formed between aromatic compounds and beta-cyclodextrin by solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 27, p. 5242-5248, 2009.

CHI, L.; LI, Z.; DONG, S.; HE, P.; WANG, Q.; FANG, Y. Simultaneous determination of flavonoids and phenolic acids in chinese herbal tea by beta-cyclodextrin based capillary zone electrophoresis. **Microchimica Acta**, v. 167, p. 179-185, 2009.

COLBORN, T.; SAAL, S. V.; SOTO, A. M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environmental Health Perspectives**, v. 101, n. 5, p. 378-384, 1993.

COMBALBERT, S.; HERNANDEZ-RAQUET, G. Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 1671-1692, 2010.

CONNORS, K. A. The stability of cyclodextrin complexes in solution. **Chemical Reviews**, v. 97, p. 1325-1357, 1997.

CURRIE, L. Detection and quantification limits: origins and historical overview. **Analytical Chimica Acta**, v. 391, n. 2, p. 127-134, 1999.

CUTOLO, M. Hormon therapy in rheumatic diseases. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 22, n. 3, p. 257-263, 2010.

DE LAAT, J.; LE, G. T.; LEGUBE, B. A comparative study of the effects of chloride, sulphate and nitrate ions on the rates of decomposition of H_2O_2 and organic compounds by $Fe(II)/H_2O_2$ and $Fe(III)/H_2O_2$. **Chemosphere**, v. 55, n. 5, p. 715-723, 2004.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1033-1046, 2004.

ELJARRAT, E.; BARCELÓ, D. Priority lists for persistent organic pollutants and emerging contaminants based on their relative toxic potency in environmental samples. **TrAC-Trends in Analytical Chemistry**, v. 2, n. 10, p. 655-665, 2003.

ETTRE, L. S. Nomenclature for chromatography. **Pure & Applied Chemistry**, v. 65, n. 4, p. 819-872, 1993.

FENG, W.; NANSHENG, D. Photochemistry of hydrolytic iron (III) species and photoinduced degradation of organic compounds. A minireview. **Chemosphere**, v. 41, n. 8, p. 1137-1147, 2000.

FENG, X.; TU, J. F.; DING, S.; FENG, W.; NANSHENG, D. Photodegradation of 17β -estradiol in water by UV-vis/ $Fe(III)/H_2O_2$ system. **Journal of Hazardous Materials**, v. 127, p. 129-133, 2005.

FENTON, H. J. H. Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. **Journal of Chemical Society**, v. 65, p. 899-910, 1894.

FENYVESI, E.; OTTA, K.; KOLBE, I.; NOVÁK, Cs.; SZEJTLI, J. Cyclodextrin complexes of UV filters. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 48, p. 117-123, 2004.

FONTENELLE, E. G. P.; MARTINS, M. R. A.; QUIDUTE, A. R. P.; MONTENEGRO JUNIOR, R. M. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 54, n. 1, p. 6-16, 2010.

GAULKE, L. S.; STRAND, S. E.; KALHORN, T. F.; STENSEL, H. D. Estrogen biodegradation kinetics and estrogenic activity reduction for two biological wastewater treatment methods. **Environmental Science & Technology**, v. 43, p. 7111-7116, 2009.

GILLIES, G. E.; McARTHUR, S. Independent influences of sex steroids of systemic and central origin in a rat model of Parkinson's disease: a contribution to sex-specific neuroprotection by estrogens. **Hormones and Behavior**, v. 57, n. 1, p. 23-34, 2010.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 695-706, 2007.

HA, P. T. T.; VAN SCHEPDAEL, A.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, E. R. Investigating the potential of erythromycin and derivatives as chiral selector in capillary electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, n. 5, p. 861-870, 2004.

HABER, F.; WEISS, J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. **Proceedings of the Royal Society of London: Part A**, v. 147, p. 332-351, 1934.

HANNA, K.; CHIRON, S.; OTURAN, M. A. Coupling enhanced water solubilization with cyclodextrin to indirect electrochemical treatment for pentachlorophenol contamination soil remediation. **Water Research**, v. 39, n. 12, p. 2763-2773, 2005.

HARATA, K. Structural aspects of stereodifferentiation in the solid state. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 1803-1827, 1998.

HARMON, S. M. Effects of pollution on marine organisms. **Water Environment Research**, v. 81, n. 10, p. 2030-2069, 2009.

HARRIS, D. C. **Quantitative chemical analysis**. 7th ed. New York: W. H. Freeman, 2007. 663 p.

HARTMANN, S.; LACORN, M.; STEINHART, H. Natural occurrence of steroid hormones in food. **Food Chemistry**, v. 62, n. 1, p. 7-20, 1998.

HEDGES, A. R. Industrial applications of cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 2035-2044, 1998.

HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A. Phase solubility techniques. **Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation**, v. 4, p. 117-212, 1965.

HOSHINO, M.; IMAMURA, M.; IKEHARA, K.; HAMA, Y. Fluorescence enhancement of benzene derivatives by forming inclusion complexes with β -cyclodextrin in aqueous solution. **Journal of Physical Chemistry**, v. 85, p. 1820-1823, 1981.

HWANG, S.; LEE, D. I.; LEE, C. H.; AHN, I. S. Oxidation of 17 α -ethinylestradiol with Mn(III) and product identification. **Journal of Hazardous Materials**, v. 155, p. 334-341, 2008.

JANEX-HABIBI, M.; HUYARD, A.; ESPERANZA, M.; BRUCHET, A. Reduction of endocrine disruptor emissions in the environment: the benefit of wastewater treatment. **Water Research**, v. 43, p. 1565-1576, 2009.

JIANG, C.; PANG, S.; OUYANG, F.; MA, J.; JIANG, J. A new insight into Fenton and Fenton-like processes for water treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 174, n. 1-3, p. 813-817, 2010.

JOHNSON, A. C.; BELFROID, A.; DI CORCIA, A. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. **Science of the Total Environment**, v. 256, p. 163-173, 2000.

JUKOWSKY, J. A.; WATZIN, M. C.; LEITER, J. C. Elevated concentrations of ethinylestradiol, 17 β -estradiol and medroxyprogesterone have little effect on reproduction and survivor of *Ceriodaphnia dubia*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 81, p. 230-235, 2008.

JULLIAN, C.; MORALES-MONTECINOS, J.; ZAPATA-TORRES, G.; AGUILERA, B.; RODRIGUEZ, J.; ARÁN, V.; OLEA-AZAR, C. Characterization, phase-solubility, and molecular modeling of inclusion complex of 5-nitroindazole derivative with cyclodextrins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 9, p. 5078-5084, 2008.

KAMIYA, M.; NAKAMURA, K. Cyclodextrin inclusion effects on photodegradation rates of organophosphorus pesticides. **Environment International**, v. 21, n. 3, p. 299-394, 1995.

KLAVARIOTI, M.; MANTZAVINOS, D.; KASSINOS, D. Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. **Environment International**, v. 35, n. 2, p. 402-417, 2009.

KUSTER, M.; AZEVEDO, D. A.; LÓPEZ DE ALDA, M. J.; AQUINO NETO, F. R.; BARCELÓ, D. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). **Environment International**, v. 35, n. 7, p. 997-1003, 2009.

KVANLI, D. M.; MARISSETTY, S.; ANDERSON, T. A.; JACKSON, W. A.; MORSE, A. N. Monitoring estrogen compounds in wastewater recycling systems. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 188, p. 31-40, 2008.

LAI, K. M.; JOHNSON, K. L.; SCRIMSHAW, M. D.; LESTER, J. N. Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems. **Environmental Science & Technology**, v. 34, p. 3890-3894, 2000.

LEGRINI, O.; OLIVEROS, E.; BRAUN, A. M. Photochemical process for water treatment. **Chemical Reviews**, v. 93, n. 2, p. 671-698, 1993.

LI, C.; LI, X. Z.; GRAHAN, N.; GAO, N. Y. The aqueous degradation of bisphenol A and steroids estrogens by ferrate. **Water Research**, v. 42, p. 109-120, 2008.

LI, N.; XU, L. Thermal analysis of β -cyclodextrin/berberine chloride inclusion compounds. **Thermochimica Acta**, v. 499, n.1-2, p. 166-170, 2010.

LINDSEY, M. E.; XU, G.; LU, J.; TARR, M. A. Enhanced Fenton degradation of hydrophobic organics by simultaneous iron and pollutant complexation with cyclodextrins. **Science of the Total Environment**, v. 307, p. 215-229, 2003.

LIU, Z. H.; KANJO, Y.; MIZUTANI, S. Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment - physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: a review. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 731-748, 2009.

LOFRANO, G.; RIZZO, L.; GRASSI, M.; BELGIORNO, V. Advanced oxidation of catechol: a comparison among photocatalysis, Fenton and photo-Fenton processes. **Desalination**, v. 249, n. 2, p. 878-883, 2009.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrin. 1. Drug solubilisation and stabilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, p. 1017-1025, 1996.

LOFTSSON, T.; STEFANSSON, E. Effects of cyclodextrin on topical drug delivery to the eye. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 23, n. 5, p. 473-481, 1997.

LOFTSSON, T.; HREINSDÓTTIR, D.; MÁSSON, M. Evaluation of cyclodextrins solubilization of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 302, n. 1-2, p. 18-28, 2005.

LOPES, L. G.; MARCHI, M. R. R.; SOUZA, J. B. G.; MOURA, J. A.; LORENZON, C. S.; CRUZ, C.; AMARAL, L. A. Estrógenos em águas naturais e tratadas da região de Jaboticabal – São Paulo. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 639-643, 2010.

LOPEZ DE ALDA, M. J.; BARCELÓ, D. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 892, p. 391-406, 2000.

LUCAS-ABELLÁN, C.; FORTEA, M. I.; GABALDÓN, J. A.; NUÑES-DELICADO, E. Complexation of resveratrol by native and modified cyclodextrins: determination of complexation constant by enzymatic, solubility and fluorimetric assays. **Food Chemistry**, v. 111, n. 1, p. 262-267, 2008.

MADAN, J.; DHIMAN, N.; PARMAR, V. K.; SARDANA, S.; BHARATAN, P. V.; ANEJA, R.; CHANDRA, R.; KATYAL, A. Inclusion complexes of noscapine in beta-cyclodextrin offer better solubility and improved pharmacokinetics. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 65, n. 3, p. 537-548, 2010.

MÁSSON, B.; SIGURDARDÓTTIR, V.; MATHÍASSON, K.; LOFTSSON, T. Investigation of drug-cyclodextrin complexes by a phase-distribution method: some theoretical and practical considerations. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 8, p. 958-964, 2005.

MAZELLIER, P.; MÉITÉ, L.; DE LAAT, J. Photodegradation of the steroid hormones 17 beta-estradiol (E2) and 17 alpha-ethinylestradiol (EE2) in dilute aqueous solution. **Chemosphere**, v. 73, n. 8, p. 1216-1223, 2008.

McMURRY, J. **Química orgânica**. São Paulo: Pioneira, 2005. 2 v.

MEHTA, S. K.; BHASIN, K. K.; MEHTA, N.; DHAM, S. Behavior of rifampicin in association with β -cyclodextrin in aqueous media: a spectroscopy and conductometric study. **Colloid and Polymer Science**, v. 283, p. 532-538, 2005.

MELO, N. F. S.; GRILLO, R.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Interaction between nitroheterocyclic compounds with beta-cyclodextrins: phase solubility and HPLC studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, n. 4-5, p. 865-869, 2008.

MELO, S. A. S.; TROVÓ, A. G.; BAUTITZ, I. R.; NOGUEIRA, R. F. P. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 188-197, 2009.

MOSINGER, J.; TOMÁNKOVÁ, V.; NEMCOVÁ, I.; ZÝKA, J. Cyclodextrins in analytical chemistry. **Analytical Letters**, v. 34, n. 12, p. 1979-2004, 2001.

NEWBOLD, R. R.; PADILLA-BANKS, E.; JEFFERSON, W. N. Environmental estrogens and obesity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 304, n. 1-2, p. 84-89, 2009.

NOGUEIRA, R. F. P.; GUIMARÃES, J. R. Photodegradation of dichloroacetic acid and 2,4-dichlorophenol by ferrioxalate/H₂O₂ system. **Water Research**, v. 34, p. 895-901, 2000.

NOGUEIRA, R. F. P.; OLIVEIRA, M. C.; PATERLINI, W. C. Simple and fast spectrophotometric determination of H₂O₂ in photo-Fenton reactions using metavanadate. **Talanta**, v. 66, n. 1, p. 86-91, 2005.

NOGUEIRA, R. F. P.; TROVÓ, A. G.; SILVA, M. R. A.; VILLA, R. D.; OLIVEIRA, M. C. Fundamentos e aplicações ambientais dos processos Fenton e foto-Fenton. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 400-408, 2007.

NOPPE, H.; DE WASCH, K.; POELMANS, S.; VAN HOOF, N.; VERSLYCKE, T.; JANSSEN, C. R.; DE BRABANDER, H. F. Development and validation of an analytical method for detection of estrogens in water. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, n. 1, p. 91-98, 2005.

PARMAR, K. R.; PATEL, K. A.; SHAH, S. R.; SHETH, N. R. Inclusion complexes of lamotrigine and hydroxy propyl β -cyclodextrin: solid state characterization and dissolution studies. **Journal of Inclusion Phenomena and Macroscopic Chemistry**, v. 65, p. 263-268, 2009.

PERA-TITUS, M.; GARCIA-MOLINA, V.; BAÑOS, M. A.; GIMENEZ, J.; ESPLUGAS, S. Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation processes: a general review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 47, n. 4, p. 219-256, 2004.

PIGNATELLO, J. J. Dark and photoassisted Fe^{3+} -catalyzed reaction of chlorophenoxy herbicides by hydrogen peroxide. **Environmental Science & Technology**, v. 26, n. 5, p. 944-951, 1992.

PIGNATELLO, J. J.; OLIVEROS, E.; MacKAY, A. Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 36, n. 1, p. 1-84, 2006.

RAJEWSKI, R. A.; STELLA, V. J. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. *In vivo* drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, p. 1142-1169, 1996.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RICHARDSON, S. D.; TERNES, T. A. Water analysis: emerging contaminants and current issues. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 12, p. 3807-3838, 2005.

ROSS, P. D.; REKHARSKY, M. V. Thermodynamics of hydrogen bond and hydrophobic interactions in cyclodextrin complexes. **Biophysical Journal**, v. 71, n. 4, p. 2144-2154, 1996.

SAENGER, W. ; JACOB, J.; GESSLER, K.; STEINER, T.; HOFFMANN, D. SANBE, H.; KOIZUMI, K.; SMITH, S. M.; TAKAHA, T. Structures of the common cyclodextrins and their larger analogues - beyond the doughnut. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 1787-1802, 1998.

SAFARZADEH-AMIRI, A.; BOLTON, J. R.; CATER, S. R. The use of iron in advanced oxidative processes. **Journal of Advanced Oxidation Technology**, v. 1, n. 1, p. 18-26, 1996.

SAFARZADEH-AMIRI, A.; BOLTON, J. R.; CATER, S. R. Ferrioxalate-mediated photodegradation of organic pollutants in contaminated water. **Water Research**, v. 31, n. 4, p. 787-798, 1997.

SHAREEF, A.; ANGOVE, M. J.; WELLS, J. D.; JOHNSON, B. B. Aqueous solubilities of estrone, 17 β -estradiol, 17 α -ethynylestradiol, and bisphenol A. **Journal of Chemical Engineering Data**, v. 51, p. 879-881, 2006.

SINGH, M.; SHARMA, R.; BANERJEE, U. C. Biotechnological applications of cyclodextrins. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 341-359, 2002.

SJEZTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 1743-1753, 1998.

SNYDER, S. A.; KEITH, T. L.; VERBRUGGE, D. A.; SNYDER, E. R.; GROSS, T. S.; KANNAN, K.; GEISY, J. P. Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures. **Environmental Science & Technology**, v. 33, p. 2814-2820, 1998.

SONG, L. X.; BAI, L.; XU, X. M.; HE, J.; PAN, S. Z. Inclusion complexation, encapsulation interaction and inclusion number in cyclodextrin chemistry. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, p. 1276-1284, 2009.

SPINKS, J. W. T.; WOODS, R. J. **An introduction to radiation chemistry**. 3 rd ed. New York: John Wiley, 1990. 574 p.

STANCANELLI, R.; FICARRA, R.; CANNAVÀ, C.; CALABRÒ, M. L.; FICARRA, P.; OTTANÀ, R.; MacCARI, R.; CRUPI, V.; MAJOLINO, D.; VENUTI, V. UV-Vis and FTIR-ATR characterization of 9-fluorenon-2-carboxyester/(2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin inclusion complex. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, p. 704-709, 2008.

TANG, K.; SONG, L.; LIU, Y.; PAN, Y.; JIANG, X. Separation of flurbiprofen enantiomers by biphasic recognition chiral extraction. **Chemical Engineering Journal**, v. 158, n.3, p. 411-417, 2010.

TARR, M. A. Improve Fenton based degradation with cyclodextrin. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 221, p. U482-U482, 2001.

TERNES, T. A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, R. D.; SERVOS, M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 225, p. 81-90, 1999.

TYLER, C. R.; FILBY, A. L.; BICKLEY, L. K.; CUMMING, R.; GIBSON, R.; LABADIE, P.; KATSU, Y.; LINEY, K. E.; SHEARS, J. A.; SILVA-CASTRO, V.; URUSHITANI, H.; LANGE, A.; WINTER, M. J.; SENIGUCHI, T.; HILL, E. M. Environmental health impacts of equine estrogens derived from hormone replacement therapy. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 10, p. 3897-3904, 2009.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Drinking water contaminants**. Disponível em: <<http://www.epa.gov/safewater/contaminants/index.html>>. Acesso em: 11 maio 2010.

UZQUEDA, M.; MARTÍN, C.; ZORNOZA, A.; SÁNCHEZ, M.; VELÁZ, I. Physicochemical characterization of terbinafine-cyclodextrin complexes in solution and in the solid state. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 66, p. 393-402, 2010.

VEIGNIE, E.; RAFIN, C.; LANDY, D.; FOURMENTIN, S.; SURPATEANU, G. Fenton degradation assisted by cyclodextrins of a high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon benzo[a]pyrene. **Journal of Hazardous Materials**, v. 168, p. 1296-1301, 2009.

VENTURINI, C. G. **Estudo do comportamento de corantes solvatocrômicos em soluções de ciclodextrinas**. 2005. 77 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2005.

VENTURINI, C. G.; NICOLINI, J.; MACHADO, C.; MACHADO, V. G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 360-368, 2008.

WANG, G.; WU, F.; ZHANG, X.; LUO, M.; DENG, N. Enhanced TiO₂ photocatalytic degradation of bisphenol A by β -cyclodextrin in suspended solutions. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 179, p. 49-56, 2006.

WANG, G.; XUE, X.; LI, H.; WU, F.; DENG, N. β -cyclodextrin-enhanced photodegradation of bis(4-hydroxyphenyl)ethane under UV irradiation. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 276, p. 143-149, 2007.

WANG, X.; BRUSSEAU, M. L. Simultaneous complexation of organic-compounds and heavy-metals by a modified cyclodextrin. **Environmental Science & Technology**, v. 29, p. 2632-2635, 1995.

WELLS, M. J. M.; MORSE, A.; BELL, K. Y.; PELLEGRIN, M. L.; FONON, L. J. Emerging pollutants. **Water Environment Research**, v. 81, n. 10, p. 2211-2254, 2009.

WIMMER, R.; AACHMAN, F. L.; LARSEN, K. L.; PETERSEN, S. B. NMR diffusion as a novel tool for measuring the association constant between cyclodextrin and guest molecules. **Carbohydrate Research**, v. 39, n. 9, p. 841-849, 2002.

YAÑES, C.; BASUALDO, J.; JARA-ULLOA, P.; SQUELLA, A. Inclusion complexes of estrone and estradiol with β -cyclodextrin: voltametric and HPLC studies. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 20, p. 499-505, 2007.

YARDIM, G.; CHIRON, S. Photo-Fenton treatment of TNT contaminated soil extract solution obtained by soil flushing with cyclodextrin. **Chemosphere**, v. 62, p. 1395-1402, 2006.

YU, H.; HUANG, Q. Enhanced *in vitro* anti-cancer activity of curcumin encapsulated in hydrophobically modified starch. **Food Chemistry**, v. 112, n. 2, p. 669-674, 2010.

ZARZYCKI, P. K.; KULHANEK, K. M.; SMITH, R. Chromatographic behavior of selected steroids and their inclusion complexes with β -cyclodextrin on octadecylsilica stationary phases with different carbon loads. **Journal of Chromatography A**, v. 955, p. 71-78, 2002.

ZHAO, Y.; HU, J.; JIN, W. Transformation of oxidation products and reduction of estrogenic activity of 17 beta-estradiol by a heterogeneous photo-Fenton reaction. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 14, p. 5277-5284, 2008.

ZHENG, W.; TARR, M. A. Assessment of ternary iron-cyclodextrin-2-naphthol complexes using NMR and fluorescence spectroscopies. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 65, p. 1098-1103, 2006.

ZUO, Y.; HOIGNÉ, J. Formation of hydrogen peroxide and depletion of oxalic acid in atmosphere water by photolysis of iron(III)-oxalate complexes. **Environmental Science & Technology**, v. 26, p. 1014-1022, 1992.