

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Jaqueline Fabiane Reichert**

**ANTIPSIKÓTICOS EM EFLUENTE HOSPITALAR:  
OCORRÊNCIA, MÉTODO CROMATOGRÁFICO, AVALIAÇÃO  
DE RISCO E OZONIZAÇÃO**

**TESE DE DOUTORADO**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2018**



**Jaqueline Fabiane Reichert**

**ANTIPSIKÓTICOS EM EFLUENTE HOSPITALAR: OCORRÊNCIA,  
MÉTODO CROMATOGRÁFICO, AVALIAÇÃO DE RISCO E  
OZONIZAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **DOUTORA EM QUÍMICA**.

**Orientador: Prof. Emérito Tit. Dr. Ayrton Figueiredo Martins**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2018**

Reichert, Jaqueline  
ANTIPSIKÓTICOS EM EFLUENTE HOSPITALAR: OCORRÊNCIA,  
MÉTODO CROMATOGRÁFICO, AVALIAÇÃO DE RISCO E OZONIZAÇÃO /  
Jaqueline Reichert.- 2018.  
152 p.; 30 cm

Orientador: AYRTON FIGUEIREDO MARTINS  
Coorientador: VALDERI DRESSLER  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Química, RS, 2018

1. ANTIPSIKÓTICOS 2. EFLUENTE HOSPITALAR 3.  
PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO 4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA 5.  
AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO RISCO I. MARTINS, AYRTON  
FIGUEIREDO II. DRESSLER, VALDERI III. Título.

Jaqueline Fabiane Reichert

**ANTIPSICÓTICOS EM EFLUENTE HOSPITALAR: OCORRÊNCIA, MÉTODO  
CROMATOGRÁFICO, AVALIAÇÃO DE RISCO E OZONIZAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Química, Área de Concentração em Química  
Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria  
(UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção  
do grau de **Doutor em Química**

**Aprovado em 06 de setembro de 2018:**



**Ayrton Figueiredo Martins, Prof. Emérito Tit. Dr. (UFSM)**  
Presidente/Orientador



**Carla Sirtori, Dra. (UFRGS)**



**Liziara da Costa Cabrera, Dra. (UFFS)**



**Cezar Augusto Bizzi, Dr. (UFSM)**



**Carlos Alberto Araújo de Almeida, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, RS, Brasil  
2018



Dedico este trabalho à minha amada família e a todas as pessoas que me auxiliaram nesta jornada.





## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais **Alberi** e **Redir** e minha irmã **Karine**, pela presença em minha vida e apoio em todas minhas decisões. Vocês são o meu porto seguro, amo muito vocês!

Agradeço ao **Luis Fernando Nicolini**, por toda ajuda, pelo companheirismo, discussões e apoio em minhas escolhas. Obrigada por estar sempre ao meu lado, te amo.

Agradeço ao **Prof. Emérito Tit. Dr. Ayrton Figueiredo Martins**, pela orientação, conhecimentos, confiança e amizade. Obrigada pelas oportunidades e aprendizados ao longo destes quatro anos.

Agradeço aos membros que participaram da banca examinadora no estágio de qualificação deste trabalho: à **Profa. Dra Maria Tereza Friedrich**, **Profa. Dra. Martha Adaime**, **Profa. Dra. Paola de Azevedo Mello** e ao **Dr. Carlos Alberto Araújo de Almeida** pelas sugestões e relevantes contribuições.

Agradeço aos membros que fizeram parte da banca examinadora na defesa: à **Profa. Dra Carla Sirtori**, **Prof. Dr. Cezar Augusto Bizzi**, **Profa. Dra. Liziana da Costa Cabrera** e ao **Dr. Carlos Alberto Araújo de Almeida** por terem aceito o convite para participar como examinadores e pelas valiosas sugestões e contribuições.

À todos colegas do **LATER** pelo companheirismo nestes quatro anos de convivência, em especial à minha colega e amiga “de todas as horas” **Darlina Mello Souza** por ter me auxiliado em todas etapas deste trabalho. Às alunas de iniciação científica **Juliana**, **Haline** e **Vanessa** por terem me auxiliado nos ensaios e pela companhia nesta jornada.

À **UFSM** e aos **professores do Programa de Pós-Graduação em Química** pela contribuição na minha formação.

Aos funcionários da UFSM, especialmente ao **Ademir** e a **Valéria** pela atenção de sempre.

À **CAPES** pelo apoio financeiro.



“O aumento do conhecimento é como uma esfera dilatando-se no espaço: quanto maior a nossa compreensão, maior o nosso contato com o desconhecido.”

Blaise Pascal

“No meio de qualquer dificuldade encontra-se a oportunidade.”

Albert Einstein



## RESUMO

Tese de doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Química  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **ANTIPSIKÓTICOS EM EFLUENTE HOSPITALAR: OCORRÊNCIA, MÉTODO CROMATOGRÁFICO, AVALIAÇÃO DE RISCO E OZONIZAÇÃO**

Autora: Jaqueline Fabiane Reichert  
Orientador: Prof. Emérito Tit. Dr. Ayrton Figueiredo Martins  
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 06 de setembro de 2018.

Resíduos de fármacos psicoativos em amostras ambientais têm recebido grande atenção nos últimos anos, devido ao elevado consumo, aos impactos que podem causar aos ecossistemas e, também, à saúde humana. Os objetivos deste estudo consistem em estabelecer métodos cromatográficos por meio de HPLC-DAD-FLD e LC-ESI-MS, verificar a ocorrência de seis fármacos antipsicóticos (risperidona, olanzapina, haloperidol, clozapina, clorpromazina e pimozida) em efluente hospitalar, avaliar o risco preliminar ecotoxicológico e propor processos avançados de oxidação para a degradação dos analitos na matriz de efluente hospitalar. Inicialmente, os procedimentos de extração em fase sólida e microextração líquido-líquido dispersiva foram otimizados através de planejamentos experimentais e, posteriormente, os procedimentos foram validados conforme recomendado por normativas nacionais e internacionais. Ambos os procedimentos de extração demonstraram boa linearidade, limites de quantificação  $<1,4 \mu\text{g L}^{-1}$ , boa exatidão (recuperações de 70,2% a 101,2%) com RSD $<20\%$ , curvas analíticas com distribuição normal, homocedástica e resíduos independentes para todos analitos. Os procedimentos de extração foram aplicados para a quantificação dos seis antipsicóticos estudados durante uma semana de coleta, na qual olanzapina, clozapina, haloperidol, risperidona e clorpromazina foram encontrados em, pelo menos, um ponto de coleta. A avaliação preliminar do risco ecotoxicológico foi feita através do quociente de risco e, os analitos clozapina, clorpromazina e risperidona, apresentaram risco elevado. Para o estudo da degradação dos antipsicóticos foram utilizados os processos de fotólise e ozonização. Em ambos os processos, a degradação dos antipsicóticos selecionados foi avaliada em efluente hospitalar com diferentes valores de pH (5, 7 e 9), durante 60 min. Quando comparadas as eficiências dos processos pode-se concluir que os antipsicóticos apresentam maior degradação utilizando-se ozonização; e a degradação de todos os compostos ajustou-se à cinética de pseudo-primeira ordem em ambos os processos. Para o processo de fotólise, o antipsicótico que apresentou a menor taxa de degradação foi a clozapina, e, a clorpromazina, foi o antipsicótico degradado com maior eficiência, sendo que, para esse processo, o tempo de meia-vida dos analitos variou de 6,3 a 43,3 min. Quando aplicada a ozonização, os antipsicóticos clozapina e olanzapina demonstraram maior e menor taxa de degradação, respectivamente, e os tempos de meia-vida variaram de 3,9 a 15,1 min. Assim, os processos avançados de oxidação demonstram ser alternativas (pré-e/ou pós-tratamento) pertinentes à remoção de resíduos de antipsicóticos da matriz efluente hospitalar, uma vez que, tais psicofármacos apresentam propriedades de persistência, bioacumulação e toxicidade à organismos não-alvo.

**Palavras-chave:** Antipsicóticos, Efluente Hospitalar, Microextração Líquido-Líquido Dispersiva, Extração em Fase Sólida, Cromatografia Líquida, Processos Avançados de Oxidação.



# ABSTRACT

Doctor Thesis  
Post Graduate Program in Chemistry  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

## **ANTIPSYCHOTICS IN HOSPITAL EFFLUENT: OCCURRENCE, CHROMATOGRAPHIC METHOD, RISK ASSESSMENT AND OZONATION**

Author: Jaqueline Fabiane Reichert  
Advisor: Emeritus Professor Tit. Dr. Ayrton Figueiredo Martins  
Date and Place of Defense: Santa Maria, September 6th, 2018

Residues of psychoactive drugs in environmental samples have received great attention in recent years due to the high consumption and the impacts they can cause to ecosystems and also to human health. The objective of this study was to establish chromatographic methods of HPLC-DAD-FLD and LC-ESI-MS, to verify the occurrence of six antipsychotic drugs (risperidone, olanzapine, haloperidol, clozapine, chlorpromazine and pimozide) in hospital effluent, in order to evaluate the preliminary ecotoxicological risk and to propose advanced oxidation processes for the degradation of analytes in the hospital effluent matrix. Initially, the solid-phase extraction and liquid-liquid dispersion microextraction procedures were optimized through experimental designs and, subsequently, the procedures were validated as recommended by national and international rules. Both extraction procedures showed good linearity, quantification limits  $<1.4 \mu\text{g L}^{-1}$ , good accuracy (recoveries from 70.2% to 101.2%) with  $\text{RSD} < 20\%$ , analytical curves with normal and homocedastic distribution and independent residues for all the analytes. Extraction procedures were applied to quantify the six antipsychotics studied during a week of collection, in which olanzapine, clozapine, haloperidol, risperidone and chlorpromazine were found in at least one collection point. Preliminary assessment of the ecotoxicological risk was carried out through the risk quotient, and the analytes clozapine, chlorpromazine and risperidone show high environmental risk. Photolysis and ozonation processes were used to study the degradation of the antipsychotics. In both processes, the degradation of the selected psychodrugs was evaluated in hospital effluent with different pH values (5, 7 and 9) for 60 min. When comparing the process efficiencies, it can be concluded that the antipsychotics show greater degradation by the ozonation, and the degradation of all compounds was conform to a pseudo-first-order kinetics, in both processes. For the photolysis, the antipsychotic showing the lowest rate of degradation was clozapine, and chlorpromazine was degraded with higher efficiency. For this process, the half-life of the analytes ranged from 6.3 to 43.3 min. Applying ozonation, the antipsychotics clozapine and olanzapine showed higher and lower degradation rates, and the half-life times ranged from 3.9 to 15.1 min, respectively. Thus, advanced oxidation processes prove to be alternates (pre- and / or post-treatment) pertinent to the removal of antipsychotic residues from the hospital effluent matrix, since such psychoactive drugs show properties of persistence, bioaccumulation and toxicity to non-target organisms.

Keywords: Antipsychotics, Hospital Effluent, Liquid-Liquid-Dispersive Microextraction, Solid Phase Extraction. Liquid Chromatography, Advanced Oxidation Processes.





## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da rede de esgoto (a) relacionada ao HUSM e o sistema de tratamento de efluentes: (b) efluentes gerados pelo HUSM, (c) tanque séptico, (d) tanque anaeróbio e (e) descarte no corpo hídrico receptor.....	18
Figura 2 – Mapa demonstrativo da bacia hidrográfica do rio Vacacaí-Mirim, que passa pelo campus da UFSM. ....	19
Figura 3 – Possíveis rotas dos fármacos no meio ambiente. ....	22
Figura 4 – Etapas envolvidas na SPE. ....	31
Figura 5 – Etapas envolvidas na DLLME. ....	33
Figura 6 – Localização dos pontos de coleta de amostra. ....	51
Figura 7– Diagrama de blocos das variáveis avaliadas na otimização da DLLME. ....	59
Figura 8 – Esquema do fotorreator de bancada utilizado para o processo de fotólise.....	62
Figura 9 – Esquema do reator de bancada utilizado para o processo de ozonização.....	63
Figura 10 – Cromatogramas obtidos pelo DAD (a) e pelo FLD (b), após a análise da solução mistura dos antipsicóticos preparada em solvente orgânico nas concentrações de 4,8 mg L <sup>-1</sup> para risperidona e haloperidol; 2,4 mg L <sup>-1</sup> para olanzapina, clozapina e clorpromazina e 0,6 mg L <sup>-1</sup> para pimozida .....	68
Figura 11 – Cromatogramas obtidos pelo LC-ESI-MS após a análise da solução mistura dos antipsicóticos preparadas em metanol, na concentração de 375 µg L <sup>-1</sup> .....	70
Figura 12 – Redução (%) do sinal analítico dos antipsicóticos em diferentes condições de armazenamento, no período de 12 meses (março/2015 até março/2016).....	71
Figura 13 – Seleção do cartucho de SPE. ....	72
Figura 14 – Diagramas de Pareto mostrando as variáveis com efeitos significativos na SPE, para cada analito. ....	74
Figura 15 – Efeitos estimados através dos diagramas de Pareto para o planejamento DCCR no procedimento SPE. ....	75
Figura 16 – Perfil das variáveis independentes (pH da amostra, volume de metanol para eluição, volume de água para lavagem e % de ácido fórmico no metanol para eluição) relacionados à desejabilidade da recuperação dos antipsicóticos por SPE. ....	76
Figura 17 –Diagramas de Pareto mostrando as variáveis com efeitos significativos na DLLME, para cada analito. ....	80
Figura 18 – Diagramas de Pareto mostrando as variáveis estudadas no procedimento de DLLME, através do planejamento DCCR. ....	81
Figura 19 – Perfil das variáveis independentes (pH da amostra, volume de solvente extrator, força iônica e tempo de extração) relacionados à desejabilidade da recuperação dos antipsicóticos por DLLME. ....	82
Figura 20 – Efeito dos solventes extratores na recuperação dos antipsicóticos. ....	84
Figura 21 – Efeitos de diferentes solventes dispersores na recuperação dos antipsicóticos.....	86
Figura 22 – Cromatograma do extrato “branco” para SPE obtido através do HPLC-DAD-FLD.....	90

Figura 23 – Cromatograma do extrato “branco” para DLLME obtido através do HPLC-DAD-FLD. ....	91
Figura 24 – Cromatograma do extrato “branco” para SPE obtido através do LC-ESI-MS. ....	92
Figura 25 – Cromatograma do extrato “branco” para DLLME obtido através do LC-ESI-MS.....	92
Figura 26 – Degradação dos antipsicóticos estudados por meio do processo de fotólise. ....	104
Figura 27 –Estudo cinético da degradação dos antipsicóticos em efluente hospitalar através do processo de fotólise. ....	105
Figura 28 –Cromatogramas obtidos para a clorpromazina ambos em solução de efluente hospitalar com pH ajustado à 7 (a) antes do início do processo de fotólise e (b) após 60 min de processo. ....	107
Figura 29 – Degradação dos antipsicóticos estudados por meio do processo de ozonização.....	108
Figura 30 – Estudo cinético da degradação dos antipsicóticos em efluente hospitalar através do processo de ozonização.....	109

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Informações dos antipsicóticos estudados.....	26
Tabela 2- Levantamento dos trabalhos realizados que visam a determinação de antipsicóticos em matrizes ambientais.....	28
Tabela 3- Levantamento de alguns trabalhos que empregam PAOs para a degradação de antipsicóticos.....	41
Tabela 4- Valores de log $K_{ow}$ , PNEC e PBT para cada antipsicótico. ....	46
Tabela 5 - Matriz do planejamento Plackett & Burman de 12 ensaios para o procedimento SPE. ....	54
Tabela 6 - Matriz do planejamento DCCR para o procedimento SPE.....	55
Tabela 7- Matriz do planejamento fracionado $2^{6-2}$ para o procedimento DLLME.....	57
Tabela 8- Matriz do planejamento DCCR para o procedimento DLLME. ....	58
Tabela 9- Comprimentos de onda ( $\lambda$ ) e tempos de retenção ( $t_r$ ) para cada antipsicótico, quando utilizado HPLC-DAD-FLD. ....	66
Tabela 10- Parâmetros avaliados no estudo de validação dos procedimentos de DLLME e SPE através do emprego da técnica de HPLC-DAD-FLD.....	95
Tabela 11- Parâmetros avaliados no estudo de validação dos procedimentos de DLLME e SPE através do emprego da técnica de LC-ESI-MS.....	96
Tabela 12- Concentrações diárias ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de antipsicóticos encontrada no ponto de coleta A. ....	97
Tabela 13- Concentrações diárias ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de antipsicóticos encontrada no ponto de coleta B. ....	97
Tabela 14- Valores de PNEC, QR e PBT para os analitos estudados. ....	101
Tabela 15- Constante cinética, $t_{1/2}$ e ajuste do modelo da degradação de antipsicóticos por meio do processo de fotólise.....	106
Tabela 16- Constante cinética de pseudoprimeira ordem ( $k_{obs}$ ), $t_{1/2}$ e ajuste do modelo da degradação de antipsicóticos por meio do processo de ozonização.....	110



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- $\lambda_{Em}$  – Comprimento de onda de emissão  
 $\lambda_{Ex}$  – Comprimento de onda de excitação  
ANOVA – Análise de variância  
Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
ATC – Químico Terapêutico Anatômico, do idioma inglês, *Anatomical Therapeutic Chemical*  
CLO – Clozapina  
CLOR – Clorpromazina  
Conama – Conselho Nacional do Meio Ambiente  
CONSEMA – Conselho Estadual do Meio Ambiente  
DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional  
DLLME – Microextração Líquido-Líquido Dispersiva, do idioma inglês, *Dispersive Liquid Liquid Microextraction*  
DQO – Demanda Química de Oxigênio  
EMA – Agência Europeia de Avaliação de Medicamentos, do idioma inglês, *European Medicines Evaluation Agency*  
ESI – Ionização por Eletrobulização, do idioma inglês, *Electrospray Ionization*  
ETE – Estação de Tratamento de Efluentes  
HAL – Haloperidol  
HPAs – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos  
HPLC-DAD-FLD – Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos e Fluorescência, do idioma inglês, *High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector and Fluorescence Detector*  
HUSM – Hospital Universitário de Santa Maria  
INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial  
 $k_{ow}$  – Coeficiente de partição octanol/água  
LATER – Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Efluentes e Resíduos  
LC-ESI-MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa com ionização por eletrobulização, do idioma inglês, *Liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry*  
LC-MS/MS – Cromatografia a Líquido acoplada a Espectrometria de Massas em Série, do idioma inglês, *Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*  
LLE – Extração líquido-líquido, do idioma inglês, *Liquid-Liquid Extraction*  
LMR – Limite Máximo de Resíduos  
LOD – Limite de Detecção, do idioma inglês, *Limit of Detection*  
LOQ – Limite de Quantificação, do idioma inglês, *Limit of Quantitation*  
LOQ<sub>m</sub> – Limite de Quantificação do Método, do idioma inglês, *Method Limit of Quantification*  
MEC – Concentração Ambiental Medida, do idioma inglês, *Measured Environment Concentration*  
m/z – Razão massa carga  
OLA – Olanzapina  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
OSHA – Administração da Saúde e Segurança Ocupacional, do idioma inglês *Occupational Safety and Health Administration*  
PAOs – Processos Avançados de Oxidação

PBT – Persistentes, bioacumulativos e tóxicos, do idioma inglês, *Persistent, Bioaccumulative and Toxic*

PEC – Predição da Concentração Ambiental, do idioma inglês, *Predicted Environmental Concentration*

PIM – Pimozida

PNEC – Concentração Predita que Não Causa Efeito, do idioma inglês, *Predict No-Effect Environment Concentration*

PPCP – Fármacos e produtos de cuidado pessoal, do idioma inglês, *Pharmaceuticals and Personal Care Products*

QR – Quociente de Risco

$r^2$  – Coeficiente de Determinação

RIS – Risperidona

RSD – Desvio Padrão Relativo, do idioma inglês, *Relative Standard Deviation*

SANTE – Saúde e Proteção do Consumidor, do idioma francês, *Santé et protection des consommateurs*

SNC – Sistema Nervoso Central

SPE – Extração em Fase Sólida, do idioma inglês, *Solid Phase Extraction*

TOF – Tempo de vôo, do idioma inglês, *Time of Flight*

$t_R$  – Tempo de Retenção

UFMS – Universidade Federal de Santa Maria

UPG/HUSM – Unidade Psiquiátrica Paulo Guedes/Universidade Federal de Santa Maria

UV – Ultravioleta

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
1.1 OBJETIVOS.....	15
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>17</b>
2.1 HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA.....	17
2.2 EFLUENTES HOSPITALARES.....	20
2.3 RESÍDUOS DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS NO MEIO AMBIENTE.....	21
2.4 ANTIPSICÓTICOS .....	23
2.5 PREPARO DE AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS ANTIPSICÓTICOS.....	27
2.5.1 Extração em fase sólida .....	30
2.5.2 Microextração líquido-líquido dispersiva .....	31
2.6 PLANEJAMENTO FATORIAL .....	33
2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	34
2.7.1 Linearidade e faixa linear de trabalho .....	34
2.7.2 Limite de detecção.....	35
2.7.3 Limite de quantificação .....	35
2.7.4 Exatidão e recuperação.....	36
2.7.5 Precisão.....	37
2.7.6 Seletividade .....	38
2.7.7 Efeito matriz.....	38
2.8 PROCESSOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO .....	40
2.8.1 Fotólise .....	42
2.8.2 Ozonização .....	43
2.9 TOXICIDADE DOS ANTIPSICÓTICOS .....	43
2.10 AVALIAÇÃO DO RISCO AMBIENTAL .....	44
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
3.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	47
3.2 MATERIAIS.....	48

3.3 SOLVENTES, REAGENTES E GASES .....	49
3.4 SELEÇÃO DOS ANALITOS .....	49
3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS .....	50
3.5.1 Preparo das soluções estoque.....	50
3.5.2 Preparo das soluções para as curvas analíticas .....	50
3.5.3 Preparo das soluções para os processos de fotólise e ozonização .....	50
3.6 COLETAS DAS AMOSTRAS DE EFLUENTE HOSPITALAR .....	51
3.7 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA DETERMINAÇÃO DOS ANTIPSIÓTICOS .....	52
3.8 ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS .....	52
3.9 ESTUDO DOS PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO .....	53
3.9.1 Otimização da SPE .....	53
3.9.2 Otimização da DLLME .....	56
3.10 VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS SPE E DLLME .....	60
3.11 APLICAÇÃO DAS METODOLOGIAS VALIDADAS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS ANTIPSIÓTICOS EM EFLUENTE HOSPITALAR.....	60
3.12 AVALIAÇÃO DO RISCO ECOTOXICOLÓGICO .....	60
3.13 APLICAÇÃO DE PROCESSOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO .....	61
3.13.1 Fotólise .....	61
3.13.2 Ozonização .....	62
3.14 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO.....	63
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
4.1 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA DETERMINAÇÃO DOS ANTIPSIÓTICOS .....	65
4.1.1 Método cromatográfico empregando HPLC-DAD-FLD.....	65
4.1.2 Método cromatográfico empregando LC-ESI-MS .....	68
4.2 ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS .....	70
4.3 ESTUDO DOS PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO.....	72
4.3.1 Otimização da SPE .....	72
4.3.1.1 Metodologia proposta para SPE .....	78



4.3.2 Otimização da DLLME .....	78
4.3.2.1 Avaliação do solvente extrator .....	83
4.3.2.2 Avaliação do solvente dispersor .....	85
4.3.2.3 Avaliação da adição de sal .....	86
4.3.2.4 Avaliação da etapa de agitação .....	87
4.3.2.5 Avaliação da pH da amostra .....	87
4.3.2.6 Avaliação do tempo de extração .....	88
4.3.2.7 Avaliação do tempo de centrifugação .....	88
4.3.2.8 Metodologia proposta para a DLLME .....	89
<b>4.4 VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS DE SPE E DLLME .....</b>	<b>89</b>
<b>4.5 APLICAÇÃO DAS METODOLOGIAS PARA VERIFICAR A OCORRÊNCIA DE RESÍDUOS DE ANTIPSICÓTICOS .....</b>	<b>97</b>
<b>4.6 AVALIAÇÃO DO RISCO AMBIENTAL .....</b>	<b>100</b>
<b>4.7 APLICAÇÃO DE PROCESSOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO .....</b>	<b>102</b>
4.7.1 Fotólise .....	102
4.7.2 Ozonização .....	107
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>111</b>
<b>6. DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS .....</b>	<b>113</b>
<b>7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>115</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>117</b>
<b>9. APÊNDICES .....</b>	<b>133</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Um grande número de compostos químicos são utilizados pela população e acabam sendo introduzidos de forma direta ou indireta no meio ambiente. De fato, as atividades antropogênicas desempenham um papel importante quando nos referimos à contaminação de recursos hídricos e outros compartimentos ambientais (WANG et al., 2011).

Contaminantes emergentes são produtos químicos sem regulamentação, que têm sido encontrados em matrizes ambientais e podem causar impactos desconhecidos sobre o meio ambiente e a saúde humana (DEBLONDE; COSSU-LEGUILLE; HARTEMANN, 2011). Dentre os contaminantes ambientais considerados emergentes, os fármacos têm recebido atenção especial. Isto devido ao elevado consumo, presença em baixas concentrações, entrada contínua por diversas vias e impactos que podem causar ao homem e ao meio ambiente, uma vez que são compostos biologicamente ativos e podem alterar a fisiologia e o comportamento de organismos não-alvo, mesmo estando em doses baixas (ABELLÁN et al., 2007; KÜMMERER, 2009; CORCORAN; WINTER; TYLER, 2010; AUKIDY et al., 2012; ARNOLD et al., 2013; AL AUKIDY; VERLICCHI; VOULVOULIS, 2014; MILLER et al., 2018).

Alguns medicamentos psicotrópicos tais como os ansiolíticos, antiepilépticos, antidepressivos e antipsicóticos são caracterizados por agir diretamente sobre o sistema nervoso central (SNC) e estão entre as classes de medicamentos mais prescritos a nível mundial (CALISTO; ESTEVES, 2009; CALISTO; DOMINGUES; ESTEVES, 2011; TRAWIŃSKI; SKIBIŃSKI, 2017). Conforme o levantamento realizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) cerca de 44% dos 143 tipos de medicamentos sob venda controlada no Brasil são empregados para tratamentos de transtornos mentais. Dentre os medicamentos controlados pela Anvisa, os antipsicóticos, indicados principalmente para tratamentos de esquizofrenias, correspondem a 16,1% e em seguida os antidepressivos que correspondem a 15,4% (ANVISA, 2011).

Os fármacos são geralmente excretados através da urina e das fezes como uma mistura complexa do próprio composto inalterado e seus metabólitos, possuindo como destino principal a rede de esgotos (KHETAN; COLLINS, 2007;

KÜMMERER, 2009). As estações de tratamento de efluentes (ETEs) são designadas para a remoção de organismos patogênicos e a matéria orgânica e inorgânica suspensa. No entanto, as ETEs não são capazes de remover completamente os resíduos farmacêuticos e, portanto, são apontadas como a principal via de entrada destes contaminantes nos ambientes (PETROVIC et al., 2009).

O aparecimento de resíduos farmacêuticos em matrizes ambientais, principalmente nos últimos dez anos, está diretamente relacionado ao crescente consumo de medicamentos pertencentes à esta classe. Assim, faz-se necessário o estudo sobre os riscos ecotoxicológicos que estes contaminantes podem causar aos ecossistemas, bem como o estudo e aplicação de processos avançados de oxidação (PAOs) para a remoção dos psicofármacos presentes em efluentes hospitalares e urbanos.

## 1.1 OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivos:

- Estabelecer métodos cromatográficos para a separação e quantificação simultânea dos analitos por meio de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas com fonte de ionização por eletronebulização (LC-ESI-MS) e cromatografia líquida acoplada ao detector de arranjo de diodos e fluorescência, sequencialmente (HPLC-DAD-FLD);
- Otimizar e validar as metodologias de extração empregando extração em fase sólida (SPE) e microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) para a extração e pré-concentração dos analitos;
- Determinar a concentração dos antipsicóticos clorpromazina, clozapina, haloperidol, olanzapina, risperidona e pimozida em amostras de efluente hospitalar durante o período de uma semana;
- Avaliar o risco ambiental relativo ao descarte de antipsicóticos no efluente hospitalar do HUSM;
- Otimizar e aplicar PAOs, tais como fotólise e ozonização para o estudo da degradação dos antipsicóticos selecionados.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA

O Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) foi fundado no ano de 1970, encontra-se situado na Cidade de Santa Maria (latitude de 29° 43' 02" S e longitude de 53° 43' 4,2" O), e atualmente, é referência na área da saúde para a região central do Estado do Rio Grande do Sul (RS) (LIMA et al., 2010). O HUSM participa como órgão integrante da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), onde atua como hospital-escola, com a atenção voltada para o desenvolvimento do ensino, pesquisa e assistência em saúde (HUSM, 2016).

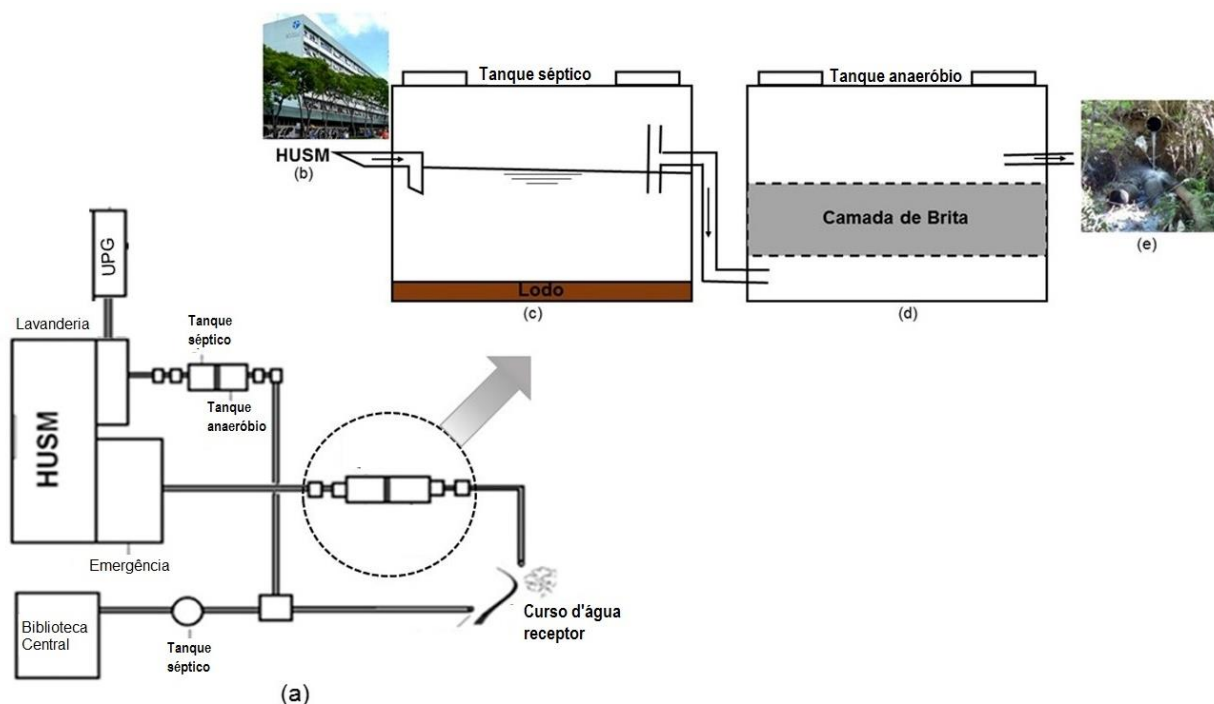
O hospital psiquiátrico da UFSM foi o primeiro instalado em um Campus Universitário na América Latina desde 1972 (LIMA et al., 2010). O HUSM dispõe de uma unidade psiquiátrica conhecida por Unidade Psiquiátrica Paulo Guedes, que contém 22 leitos e recebe pacientes com transtornos psiquiátricos graves, em situação de surtos psicóticos, estados de alteração de humor, risco de suicídio e auto/heteroagressão (UPG/HUSM, 2012; EBSERH, 2013). A psiquiatria realiza em média 300 consultas por semana e 14400 consultas por ano, sendo que nos anos de 2012 e 2013 foram registradas 81 e 90 internações por mês, respectivamente (EBSERH, 2013).

Todas as atividades relacionadas ao serviço de saúde resultam na produção de uma grande quantidade de resíduos líquidos e sólidos. Neste sentido, os hospitais representam uma contribuição considerável no consumo de água, aproximadamente 0,4 a 1,2 m<sup>3</sup> de água por leito a cada dia (EMMANUEL et al., 2005). No ano de 2015, o consumo médio de água pelo HUSM foi 1,18 m<sup>3</sup> de água/leito a cada dia. Por mais que este valor se encontra dentro da média, pode ser considerado elevado quando comparamos com hospitais localizados em outros países (BRÉCHET et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015).

O tratamento do esgoto gerado pelo HUSM é feito através de um sistema constituído por tanque séptico e tanque anaeróbio (Figura 1). Após passar por este sistema, o efluente tratado é lançado no córrego, que passa pelo Campus

da UFSM e deságua no arroio pertencente à sub-bacia hidrográfica do rio Vacacaí-Mirim (FRANK, 2008).

Figura 1 - Representação da rede de esgoto (a) relacionada ao HUSM e o sistema de tratamento de efluentes: (b) efluentes gerados pelo HUSM, (c) tanque séptico, (d) tanque anaeróbio e (e) descarte no corpo hídrico receptor.

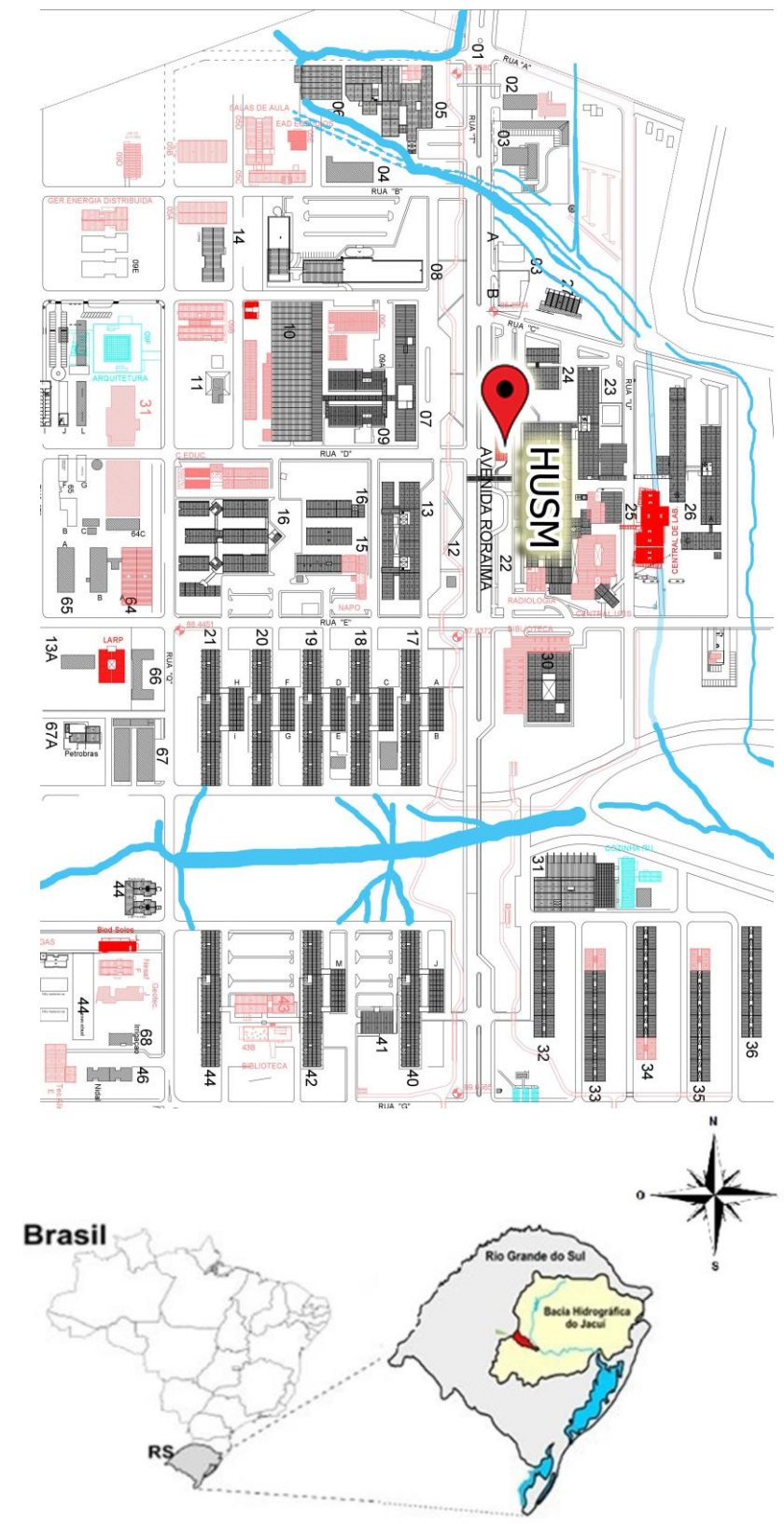


Fonte: Adaptado de Frank, 2008; Wilde, 2011 e De Almeida et al., 2015 (FRANK, 2008; WILDE, 2011; DE ALMEIDA et al., 2015).

O Campus da UFSM localiza-se na porção intermediária da pequena bacia hidrográfica que define uma das nascentes do Rio Vacacaí-Mirim (Figura 2). Esta bacia, possui área de 10 km<sup>2</sup>, situa-se na região central do Estado do Rio Grande do Sul sendo que o Campus da UFSM ocupa 65% da área total dessa bacia (SILVA et al., 2002). Assim, os efluentes e resíduos gerados pela UFSM, especialmente aqueles gerados pelo HUSM podem provocar efeitos negativos e contribuir de modo a impactar e degradar a qualidade dos recursos hídricos.



Figura 2 – Mapa demonstrativo da bacia hidrográfica do rio Vacacaí-Mirim, que passa pelo campus da UFSM.



Fonte: Adaptado de Paiva et al., 2006; UFSM, 2011 (PAIVA et al., 2006; UFSM, 2011).

## 2.2 EFLUENTES HOSPITALARES

Os efluentes hospitalares são caracterizados por apresentar uma matriz carregada de micro-organismos, metais, substâncias químicas tóxicas, elementos radioativos, substâncias quimicamente ativas e metabólitos. A descarga direta destes efluentes, sem tratamento preliminar, em sistemas de esgoto urbano e cursos d'água, constitui risco potencial para os ecossistemas (SUAREZ; LEMA; OMIL, 2009).

Segundo o Conama, o efluente final gerado pelos hospitais é a soma dos resíduos gerados por cada área hospitalar que compõe este tipo de estabelecimento, como por exemplo, resíduos da cozinha, lavanderia, centro de material esterilizado, ambulatórios, áreas de internação, centros cirúrgicos, caldeiras, laboratórios de análises clínicas e anatomopatológicas, serviços de diálise, lanchonetes e banheiros (CONAMA, 2009).

Além do uso terapêutico em hospitais, em alguns casos, o paciente recebe os medicamentos para dar continuidade ao tratamento em sua residência. Os resíduos farmacêuticos eliminados através da urina e fezes do paciente são direcionados às ETEs e alcançam o meio ambiente, muitas vezes sem receber tratamento adequado (KÜMMERER, 2001).

Embora os métodos e a instrumentação analítica tenham afetado grandes avanços tecnológicos nas últimas décadas, a etapa de preparo de amostra ainda permanece como uma das etapas mais importantes do protocolo analítico (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015). Fatores como a baixa concentração e a grande variedade de resíduos farmacêuticos presentes no efluente hospitalar, desafiam o estabelecimento de processos para tratamento de águas residuais e pesquisas que visam a determinação de contaminantes orgânicos em matrizes ambientais (LUO et al., 2014).

O Brasil não possui uma legislação específica que impõe limites máximos de resíduos (LMR) para fármacos no meio ambiente. No entanto, a portaria 306/2004 da ANVISA permite que o descarte dos efluentes gerados por hospitais seja realizado através da rede de esgotos ou em corpo hídrico receptor, desde que atendam respectivamente as diretrizes estabelecidas pelos órgãos ambientais, gestores de recursos hídricos e de saneamento competentes (ANVISA, 2004).

## 2.3 RESÍDUOS DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS NO MEIO AMBIENTE

Compostos farmacêuticos são moléculas complexas com diferentes funcionalidades e propriedades físico-químicas e biológicas. Eles são desenvolvidos e usados de acordo com sua atividade biológica específica, muitos são compostos polares e podem ser chamados de moléculas pequenas em virtude de suas baixas massas moleculares (KÜMMERER, 2009). Por sua persistência em águas de superfície, os fármacos podem ser considerados de grande potencial poluidor e, apesar da diluição, nada garante que determinadas espécies não sejam bioacumuladas (KÜMMERER, 2001).

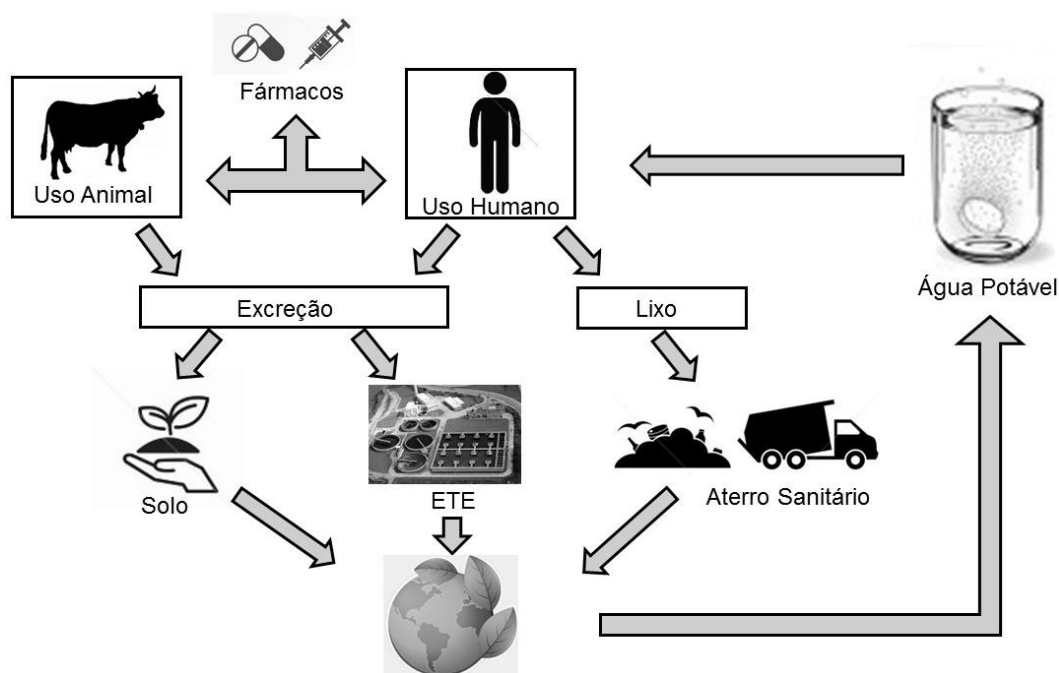
A nível mundial, resíduos de mais de 600 substâncias farmacêuticas têm sido encontrados em diversos compartimentos ambientais (KUSTER; ADLER, 2014), sendo que os estabelecimentos que desenvolvem atividades relacionadas à saúde humana são consideradas as principais responsáveis pelo lançamento de resíduos farmacêuticos no ambiente (ESCHER et al., 2011; VERLICCHI et al., 2012).

Os primeiros trabalhos relacionados à presença de compostos orgânicos em ambientes aquáticos foram publicados na década de 70 (KEITH, 1979). Atualmente, estudos de resíduos farmacêuticos no ambiente têm sido reportados em ETEs urbanos (BOROVA et al., 2014; SUBEDI et al., 2015), efluentes hospitalares (AUKIDY et al., 2012; SANTOS et al., 2013; YUAN et al., 2013; MENDOZA et al., 2015; AZUMA et al., 2016), águas superficiais (GRABIC et al., 2012; BOIX et al., 2014; CALDAS et al., 2016), águas subterrâneas (LÓPEZ-SERNA et al., 2013; K'OREJE et al., 2016), em solo (LI, 2014) e lodo das ETEs (GAGO-FERRERO et al., 2015; VERLICCHI; AL AUKIDY; ZAMBELLO, 2015; CERQUEIRA et al., 2018).

A Figura 3 apresenta possíveis rotas dos fármacos quando descartados no ambiente. Além da excreção dos fármacos de uso humano e veterinário e seus metabólitos, outras formas de contaminação ambiental podem ocorrer através do uso do esterco e lodos das ETEs na agricultura como fertilizantes, da disposição inadequada de resíduos da indústria farmacêutica e do descarte incorreto de medicamentos não utilizados ou com o prazo de validade vencido (BILA; DEZOTTI, 2003; DAUGHTON, 2004). Os fármacos e seus produtos de transformação (metabólitos e produtos de degradação) podem contaminar os

recursos hídricos que abastecem a população, e futuramente podem vir a causar efeitos negativos à saúde humana e ao ambiente (MOMPELAT; LE BOT; THOMAS, 2009).

Figura 3 – Possíveis rotas dos fármacos no meio ambiente.



Fonte: Adaptado de KÜMMERER, 2008 (KÜMMERER, 2008).

Não foram encontradas legislações que estabelecem os LMR para resíduos de produtos farmacêuticos no meio ambiente. Entretanto, existem discussões na comunidade científica em relação à algumas substâncias incluindo determinados pesticidas, ftalatos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e desreguladores endócrinos, os quais já estão listados e exigem atenção prioritária (DEBLONDE; COSSU-LEGUILLE; HARTEMANN, 2011; EUROPEAN UNION, 2013).

O Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Efluentes e Resíduos (LATER) da UFSM encontra-se inserido na UFSM e tem aplicado metodologias para a quantificação e avaliado a degradação oxidativa e/ou remoção de diferentes contaminantes orgânicos no efluente gerado pelo HUSM. Destacam-se os fármacos (ou classes) e xenobióticos: amoxicilina (FRANK, 2008), beta-bloqueadores (WILDE; MONTIPÓ; MARTINS, 2014), ciprofloxacina (VASCONCELOS et al., 2009), diclofenaco (MINETTO et al., 2012),

dexametasona (ARSAND; KÜMMERER; MARTINS, 2013), antimicrobianos (BRENNER et al., 2011), cefalosporinas e surfactantes não-iônicos (HENRIQUES, 2009), antiandrogêneos (BRENNER, 2013), antibióticos macrolídeos (MINETTO, 2013), ansiolíticos e antiepiléticos (DE ALMEIDA et al., 2013), estatinas (MARTINS et al., 2017b), cocaína e metabólitos (MARTINS et al., 2017a), benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (DA SILVA et al., 2013), parabenos (MAYER, 2013), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (SILVA, 2016) e anticânceres (SOUZA; REICHERT; MARTINS, 2018). Todos os trabalhos desenvolvidos no LATER até o momento confirmam que, a maioria dos fármacos e xenobióticos já estudados estão presentes no efluente do HUSM após o tratamento e, acabam sendo lançados no meio ambiente.

## **2.4 ANTIPSICÓTICOS**

Conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS), uma a cada 10 pessoas apresenta algum tipo de transtorno mental (ONU, 2015). No Brasil, 23 milhões de pessoas necessitam de algum atendimento em saúde mental e pelo menos 5 milhões de brasileiros sofrem com transtornos mentais graves e persistentes (ABP, 2010).

A prescrição de fármacos psicoativos têm aumentado nas últimas décadas em muitos países. Nos Estados Unidos, os antipsicóticos ocupam a quinta posição na relação das classes terapêuticas mais utilizadas (LINDSLEY, 2012). Na Alemanha os antipsicóticos são a classe de medicamentos mais utilizadas em hospitais, enquanto que em tratamentos domiciliares é a segunda classe terapêutica mais utilizada (KÜMMERER, 2008).

Os medicamentos antipsicóticos são indicados principalmente para o tratamento da esquizofrenia (OPAS, 2018), a qual é caracterizada por ocasionar delírios e distúrbios no pensamento (sintomas positivos), juntamente com isolamento social e falta das respostas emocionais (sintomas negativos) (VAN OS; KENIS; RUTTEN, 2010). Para o tratamento de bipolaridade, distúrbios psicóticos e hiperatividade, também são empregados antipsicóticos de maneira a amenizar os transtornos que essas doenças mentais trazem ao seu portador (DAZZAN et al., 2005).

Os antipsicóticos podem ser classificados em típicos (ou de primeira geração) e atípicos (ou de segunda geração). Os antipsicóticos típicos foram os primeiros medicamentos desta classe produzidos, apresentam alta afinidade pelos receptores de dopamina e maior eficiência na redução de sintomas positivos da esquizofrenia (DAZZAN et al., 2005). Demonstram-se pouco eficazes para os sintomas negativos característicos da doença, e ainda podem produzir elevadas taxas de efeitos colaterais como problemas cardiovasculares, aumento do peso corporal, discinesia tardia e o desenvolvimento de diabetes (DE SENA et al., 2003; WIEROŃSKA et al., 2015).

Os antipsicóticos atípicos possuem menor afinidade pelos receptores dopaminérgicos e maior afinidade pelos receptores serotoninérgicos (5-HT<sub>2A</sub>) (DAZZAN et al., 2005). O uso de antipsicóticos atípicos reduz os sintomas negativos, alterações cognitivas, previne de recaídas, melhora a capacidade funcional e a qualidade de vida, também são menos propensos a causar discinesia tardia. Por estes motivos, atualmente os antipsicóticos atípicos são a escolha preferencial para o tratamento de doenças mentais (MIYAMOTO et al., 2005).

Os medicamentos antipsicóticos são compostos lipofílicos e apresentam alta absorção após a administração oral (JAVAID, 1994). Até 10% da dose ingerida pode ser eliminada de maneira inalterada pela urina e fezes dos pacientes que receberam a medicação (SHEEHAN et al., 2010), embora estas parcelas sejam baixas, dependendo do número de doses que o hospital utiliza, estes valores podem tornar-se relevantes de modo a afetar os ecossistemas.

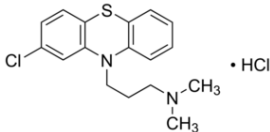
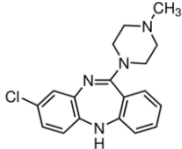
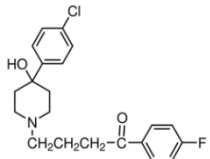
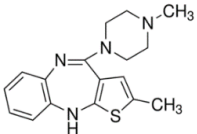
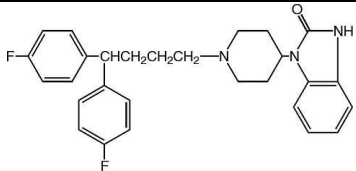
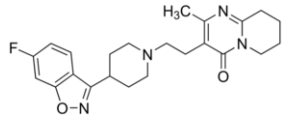
Pode-se destacar como principais metabólitos gerados pelos antipsicóticos, a 9-hidroxisiperidona produzida pela risperidona (ZHANG; TERRY; BARTLETT, 2007), a norclozapina e a desmetilclozapina que são produzidos pela clozapina (MERCOLINI et al., 2007), a olanzapina produz como metabólito a 10-N-glicuronida e a 4-N-desmetil olanzapina (WEIGMANN et al., 2001) e para o haloperidol destaca-se o haloperidol reduzido como principal metabólito (DESAI et al., 2003). Para a clorpromazina, teoricamente são possíveis 168 metabólitos, e destes 77 já foram identificados, sendo que alguns metabólitos podem ser detectados até 18 meses após a última dose do medicamento consumida (TRAUTWEIN; KÜMMERER, 2012).

Conforme as propriedades físico-químicas dos antipsicóticos selecionados apresentadas na Tabela 1, os seis analitos são bases fracas com constante de acidez ( $pK_a$ ) maior que 7, e a maioria dos antipsicóticos estudados encontra-se na forma protonada em pH ambientais ( $pH \sim 7$ ).

Dentre os analitos selecionados, a pimozida é o mais hidrofóbico com coeficiente de partição octanol-água ( $\log K_{ow}$ ) de 6,3 para a espécie neutra. Por outro lado a risperidona apresenta o menor valor para  $\log K_{ow}$ , demonstrando a sua maior hidrofilicidade.

Geralmente, o  $\log K_{ow}$  não é a maneira mais adequada de descrever as características físico-químicas para fármacos e, em termos de biota e meio ambiente, pode-se assumir o coeficiente de partição lipossoma-água ( $\log D_{lipw}$ ) como o melhor descritor de possíveis efeitos. Deste modo, a pimozida apresenta-se como o composto mais lipofílico e com maior potencial de bioacumulação, seguido da olanzapina, clozapina, haloperidol, clorpromazina e a risperidona. Assim, espera-se que a pimozida e olanzapina apresentem efeitos mais tóxicos para a biota, enquanto que a risperidona é o antipsicótico que apresenta menores efeitos.

Tabela 1- Informações dos antipsicóticos estudados.

Antipsicótico	Fórmula estrutural	Classe e classificação ATC*	Classificação	pKa	Log $k_{ow}$	Log $D_{lipw}$ (pH 7,4)	Consumo (g/ano) no HUSM
Clorpromazina		Fenotiazinas alifáticas (N05AA01)	Típico	9,3	5,35	2,74	504
Clozapina		Dibenzodiazepina (N05AH02)	Atípico	7,35 15,9	3,94	3,12	202
Haloperidol		Butirofenona (N05AD01)	Típico	8,05 13,9 6	4,3	2,93	72
Olanzapina		Tienobenzodiazepina (N05AH03)	Atípico	7,24 13,1 7	3,78	3,16	54
Pimozida		Difenilbutiropiridina (N05AG02)	Típico	8,38 12,9	6,3	4,80	0
Risperidona		Benzisoxazol (N05AX08)	Atípico	8,76	3,49	1,25	21

\*ATC- classificação Química Terapêutico Anatômica.

Fonte: Calculator Plugin (CHEMICALIZE, 2018).



## 2.5 PREPARO DE AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS ANTIPSICÓTICOS

A etapa de preparo de amostra é essencial no processo analítico. Apesar dos grandes avanços instrumentais, na maioria dos casos é necessário uma etapa de pré-concentração e/ou separação dos analitos e interferentes, principalmente quando a matriz apresenta elevada complexidade e os analitos estão presentes em baixas concentrações (ANDRUCH et al., 2013), como é o caso dos efluentes hospitalares.

A grande maioria dos trabalhos encontrados na literatura empregam a metodologia de SPE aliada à técnicas instrumentais hífenadas, como a cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas em série (LC-MS/MS) para a extração e quantificação de antipsicóticos, respectivamente. Embora técnicas de microextração tenham recebido atenção especial devido às suas vantagens frente à outras técnicas de extração, para a determinação de antipsicóticos em matrizes ambientais foi encontrado somente um estudo (CALDAS et al., 2016).

Na Tabela 2 estão listados os trabalhos relacionados à determinação dos antipsicóticos selecionados em matrizes ambientais. É possível perceber que as concentrações de antipsicóticos neste tipo de matriz são baixas e que, também, pode-se evidenciar um número crescente de estudos sobre esta classe de medicamentos em efluentes e águas superficiais, nos últimos seis anos, demonstrando preocupação que há mais de dez anos não se tinha. A maioria dos trabalhos encontrados na literatura investigam a determinação de várias classes de fármacos, sendo que para a classe dos antipsicóticos, destacam-se os antipsicóticos de segunda geração como a clozapina, risperidona e olanzapina.

Basicamente, todos trabalhos encontrados empregam a metodologia de SPE para extração e a técnica instrumental de LC-MS/MS para a quantificação. Isto se deve à algumas vantagens da técnica de LC-MS/MS frente ao HPLC-DAD: baixos LOD e LOQ obtidos por esta técnica; menor consumo de solvente; menores quantidades de amostra; confiança na detectabilidade; menores tempos de análise por amostra, e, a praticidade.

Tabela 2- Levantamento dos trabalhos realizados que visam a determinação de antipsicóticos em matrizes ambientais.

<b>Analitos</b>	<b>Amostra</b>	<b>Preparo da amostra</b>	<b>Técnica de análise</b>	<b>Referência</b>	<b>Concentração (ng L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Risperidona</b>	Efluente urbano, águas superficiais e água potável	SPE (HLB, 200 mg)	LC-MS/MS	(VANDERFORD; SNYDER, 2006)	0,25 – 2,5
<b>Risperidona</b>	Efluente	SPME	LC-MS/MS	(UNCETA et al., 2010)	0 – 364
<b>Olanzapina e risperidona</b>	Efluentes urbanos e águas superficiais	SPE (Oasis HLB 60 mg)	LC-MS/MS	(GRACIA-LOR; SANCHO; HERNÁNDEZ, 2011)	<48 – 58 -
<b>Haloperidol</b>	Águas superficiais	SPE (Oasis HLB, 200 mg)	LC-MS/MS	(K'OREJE et al., 2012)	-
<b>Haloperidol e risperidona</b>	Águas superficiais e efluentes doméstico	SPE (Oasis HLB, 200 mg)	LC-MS/MS	(GRABIC et al., 2012)	-
<b>Olanzapina</b>	Águas superficiais e efluente	SPE (Oasis HLB, 60 mg)	LC-QTOF/MS	(GRACIA-LOR et al., 2012)	0
<b>Clozapina, olanzapina e risperidona</b>	Efluentes hospitalares e urbanos	SPE (discos HLB)	LC-MS/MS	(YUAN et al., 2013)	15 – 13,200 0,3 – 127 3 – 69
<b>Olanzapina</b>	Efluente hospitalar e urbano	SPE (Oasis HLB, 60 mg)	LC-MS/MS	(SANTOS et al., 2013)	0 – 236
<b>Haloperidol</b>	Água superficial e água de beber	SPE (Strata X, 200 mg)	LC-MS/MS	(SILVEIRA et al., 2013)	100
<b>Haloperidol e risperidona</b>	ETE urbanos	SPE (Oasis HLB, 200 mg)	LC-MS/MS	(LOOS et al., 2013)	Até 2692
<b>Olanzapina</b>	Efluentes urbanos, águas subterrâneas e água potável	SPE (Oasis HLB, 60 mg)	LC-MS/MS	(PETROVI et al., 2014)	-

<b>Clorpromazina, Clozapina, olanzapina, risperidona</b>	ETE hospitalares	SPE (Strata-X e Strata-XC, ambos 200 mg)	LC-MS/MS	(BOROVA et al., 2014)	<4,9 <2,5 – 47,7 <0,4 <0,15 – 3,2
<b>Olanzapina</b>	Efluente urbano, águas superficiais	SPE	LC-MS/MS	(BOIX et al., 2014)	-
<b>Risperidona e olanzapina</b>	Águas superficiais, subterrâneas e efluentes urbanos	SPE (Oasis HLB, 200 mg)	LC-QTOF/MS	(HERNÁNDEZ et al., 2014)	-
<b>Clozapina</b>	Efluente urbano	SPE (Oasis HLB, discos)	LC-MS/MS	(SHENG et al., 2014)	53,4 – 163,9
<b>Risperidona</b>	Águas residuais	SPE (Oasis HLB, 200 mg)	LC-MS/MS	(VERGEYNST et al., 2015)	0 – 364
<b>Clozapina</b>	ETE urbanos	SPE (Oasis HLB 10 mg)	LC-MS/MS	(GURKE et al., 2015)	101,6 – 181,8
<b>Clozapina</b>	Água superficial	SPE (Oasis HLB 60 mg)	HPLC-MS/MS	(MATONGO et al., 2015)	2180 – 8890
<b>Haloperidol</b>	Água superficial	SD-DLLME	LC-MS/MS	(CALDAS et al., 2016)	0 – 40

-: Não foi encontrado.

Fonte: Autora

### 2.5.1 Extração em fase sólida

A SPE é uma das metodologias mais utilizadas para o preparo de amostras onde os analitos estão presentes em nível de traço (faixa de  $\text{ng L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Pelo fato das concentrações serem muito baixas, é necessário uma etapa de concentração dos analitos, a fim de atingir-se o nível de detecção do instrumento utilizado e a remoção dos principais interferentes (NÚÑEZ et al., 2012). Esta metodologia de extração é comumente usada para extração de analitos semivoláteis e não voláteis de amostras líquidas, porém também pode ser utilizada para amostras sólidas pré-extraídas por solventes (VIDAL; RIEKKOLA; CANALS, 2012).

O princípio da SPE consiste na partição dos compostos entre a fase líquida (amostra) e a fase sólida (sorbente), sendo que o analito deve apresentar maior afinidade pela fase sólida (KATAOKA, 2003; NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009). As forças intermoleculares entre as fases influenciam a retenção e eluição, a retenção pode envolver interações não-polares, polares ou iônicas, já a quantidade de sorbentes disponíveis para SPE, fornecem uma ampla gama de interações (KATAOKA, 2003).

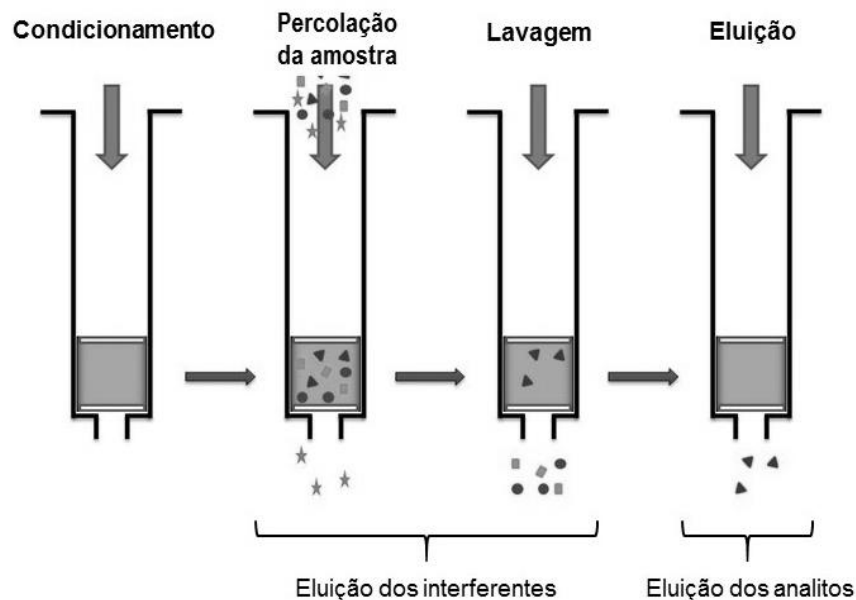
Os analitos presentes em uma matriz aquosa são extraídos após a passagem desta por um cartucho contendo um tipo de sorbente sólido. Em seguida, um solvente orgânico, seletivo, é utilizado para remover os interferentes, e então outro solvente é usado para a remoção dos analitos, os quais estão aderidos na fase sólida.

Como vantagens frente a extração líquido-líquido, destacam-se na SPE: o menor consumo de solventes orgânicos, altas porcentagens de recuperações dos analitos, menor produção de resíduos, ausência de emulsões capacidade de aumentar seletivamente a concentração do analito e disponibilidade comercial de muitos equipamentos e sorbentes (KATAOKA, 2003). Por outro lado, as desvantagens que a SPE apresenta são o elevados tempo de extração e o alto custo de cartuchos e outros materiais, como os *manifolds*.

Durante a otimização da metodologia SPE, fatores como a escolha do tipo e a quantidade do sorbente, volume de amostra e tipo e volume de solventes para ativação e eluição dos analitos do cartucho, são parâmetros que devem ser estudados antes e durante a execução da técnica (CALDAS et al., 2011).

Na Figura 4, estão demonstradas as etapas envolvidas no procedimento de SPE.

Figura 4 – Etapas envolvidas na SPE.



Fonte: Adaptado de Caldas e colaboradores (CALDAS et al., 2011).

### 2.5.2 Microextração líquido-líquido dispersiva

A Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME) foi desenvolvida por Rezaee e colaboradores em 2006, inicialmente, proposta para a determinação de HPAs em água (REZAAEE et al., 2006). Atualmente, esta metodologia se destaca no desenvolvimento e aplicação de metodologias para extração de compostos orgânicos em matrizes ambientais, biológicas e alimentares, devido a fácil operação, rapidez, baixo custo, baixo consumo de solventes orgânicos, valores de recuperações aceitáveis e compatibilidade com as técnicas instrumentais cromatográficas (CALDAS et al., 2011).

Na DLLME, os analitos são particionados através do uso de pequenos volumes de uma mistura constituída pelos solventes dispersor e extrator, para extrair e concentrar os analitos. O solvente dispersor deve ser miscível na amostra (fase aquosa) e no solvente extrator (fase orgânica) constituindo, assim,

um sistema ternário de fases. Dessa forma, os analitos são concentrados no solvente extrator que, após determinado tempo, com auxílio de centrifugação, será sedimentado no frasco e recolhido para ser analisado pela técnica instrumental mais adequada (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

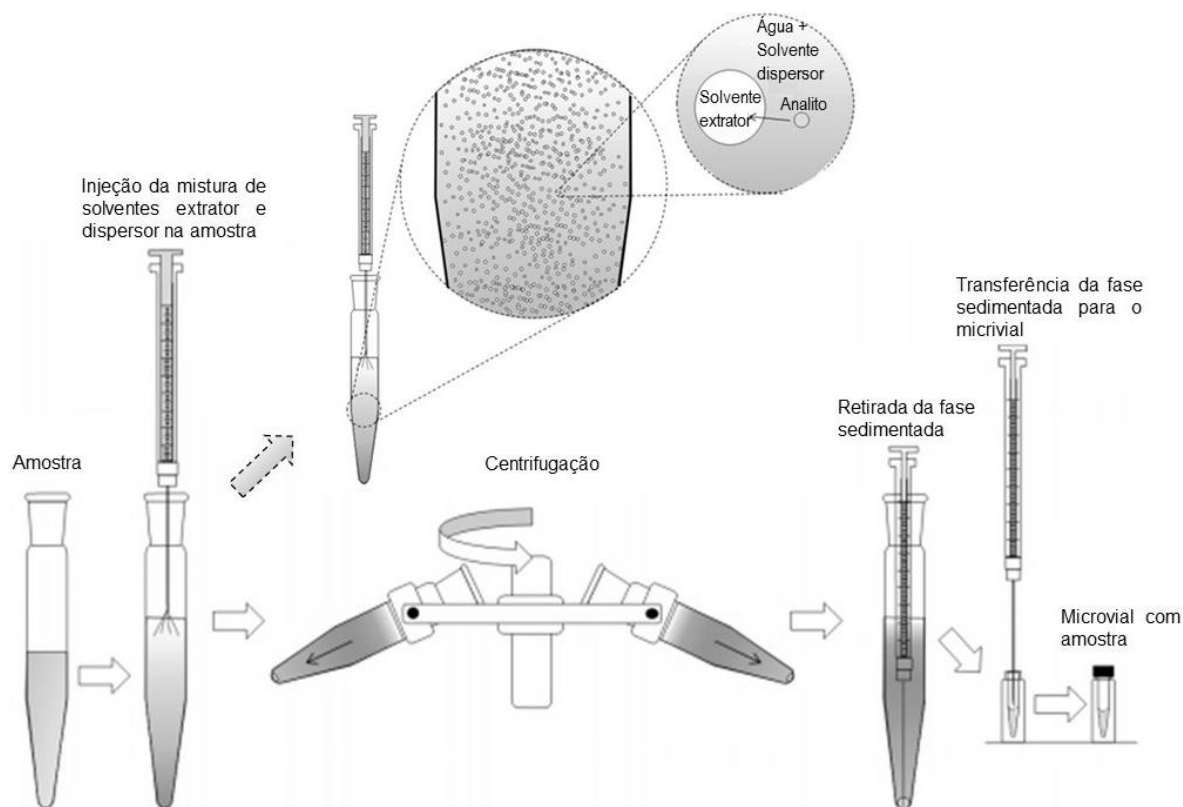
Alguns fatores podem influenciar no processo de extração da DLLME, como o tipo e volume de solvente extrator e dispersor, o tempo de extração, o pH da amostra e a força iônica. O solvente extrator, considerado o fator mais importante, deve apresentar maior densidade que a água, capacidade de extrair os compostos de interesse e uma boa performance cromatográfica (CALDAS et al., 2011).

Algumas adaptações, tais como o uso de ultrassom e vórtex tem sido aplicadas juntamente com a DLLME. O emprego do ultrassom pode facilitar a extração dos analitos, promover um aumento na eficiência de extração devido às vibrações ultrassônicas produzirem microgotas, ou seja, melhora a dispersão do solvente extrator e evita a redução do coeficiente de partição dos analitos no solvente extrator (DU et al., 2010; BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015). Por outro lado, o emprego do ultrassom pode levar a degradação dos analitos (ANDRUCH et al., 2013), nestes casos a DLLME assistida por vórtex pode ser útil para as extrações dos analitos contidos na matriz. Além disso, quando é empregado o vórtex, a dispersão é termodinamicamente menos estável, o que permite uma melhor separação da fase sedimentada.

Na Figura 5 estão demonstradas as etapas envolvidas na DLLME.

Além de não ter sido encontrado na literatura o emprego da metodologia de DLLME para a extração simultânea dos seis antipsicóticos de interesse em efluente hospitalar, também pode-se ressaltar que neste estudo foram realizadas tentativas para reduzir ao máximo o emprego do solvente clorado (tetracloreto de carbono) como extrator, tendo em vista sua elevada toxicidade, tanto para a preservação da saúde do analista, quanto para a do meio ambiente (OSHA, 2016).

Figura 5 – Etapas envolvidas na DLLME.



Fonte: Adaptado de Martins e colaboradores (MARTINS et al., 2012).

## 2.6 PLANEJAMENTO FATORIAL

O desenvolvimento e a otimização de metodologia analítica envolvem um grande número de etapas experimentais e, conseqüentemente, geram um grande volume de dados. Assim, tornou-se necessário o emprego de tratamentos mais complexos do ponto de vista matemático e estatístico, com a finalidade de obterem-se respostas precisas e interpretações seguras.

Muitas vezes, durante o procedimento de otimização de uma metodologia, as variáveis experimentais são avaliadas considerando o efeito de uma variável por vez (CUNICO et al., 2008). Algumas desvantagens da otimização univariada são o tempo gasto para otimização, o maior número de experimentos e o maior consumo de reagentes (CUNICO et al., 2008; BEZERRA et al., 2016).

O processo de otimização tem como objetivo melhorar o desempenho de um procedimento, de modo a alcançar os melhores resultados (BEZERRA et al., 2016). Em uma metodologia analítica, vários fatores podem influenciar na

magnitude das respostas obtidas, dessa forma o termo otimização tem sido empregado para designar um *set* de experimentos a serem realizados para encontrar a condição mais adequada e as melhores respostas analíticas (BEZERRA et al., 2016).

## 2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou implementação de métodos conhecidos, envolve o processo de avaliação para estimar sua eficiência na rotina do laboratório. Esse processo costuma ser denominado de validação (MESQUITA BRITO et al., 2003).

A validação de metodologias analíticas é um requisito importante na prática da análise química. Os resultados obtidos no estudo de validação podem ser empregados para julgar a qualidade, a confiabilidade e a consistência dos resultados (EURACHEM, 1998; ANVISA, 2003; RAMBLA-ALEGRE; ESTEVE-ROMERO; CARDA-BROCH, 2012). Alguns parâmetros, tais como a linearidade e a faixa linear de trabalho, precisão, exatidão, limites de detecção e de quantificação, seletividade, robustez e efeito matriz são requeridos como evidência do estudo da validação do método analítico (ANVISA, 2003; ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009; INMETRO, 2011).

### 2.7.1 Linearidade e faixa linear de trabalho

A linearidade está relacionada à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais às concentrações dos analitos, dentro de uma determinada faixa de aplicação. A relação matemática entre o sinal e a concentração pode ser expressa como uma equação polinomial de primeiro grau,  $y = ax + b$  (INMETRO, 2011).

Além dos coeficientes “a” e “b”, é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação ( $r$ ) e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ). A Anvisa recomenda  $r$  igual ou superior a 0,99, já o INMETRO recomenda que o valor esteja acima de 0,90.



A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, estar situada no centro da faixa de trabalho e deve, também, atender os requisitos de precisão e exatidão (INMETRO, 2011). Entretanto, apenas o valor do coeficiente de correlação não é suficiente para garantir a adequação do ajuste linear à curva. Deve-se avaliar a possibilidade da presença de resíduos ou pontos mal distribuídos ao longo da faixa linear. Sendo que o ajuste da equação matemática é feito pelo método dos quadrados mínimos, no qual a melhor reta é aquela que fornece o menor valor para a soma quadrática dos resíduos (Q) obtidos entre o sinal analítico medido e o sinal analítico predito, para um conjunto de N pontos experimentais (RIBEIRO; FERREIRA, 2008).

### 2.7.2 Limite de detecção

O limite de detecção (LOD, do idioma inglês, *Limit of Detection*) representa a menor concentração da substância em estudo que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (EURACHEM, 1998).

O LOD pode ser calculado de três maneiras diferentes: pelo método visual, método da relação sinal ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004). Para este último método, utiliza-se a Equação 1

$$LOD = \frac{3,3s}{S} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

s: Desvio-padrão da resposta;

S: Coeficiente angular da equação de calibração.

### 2.7.3 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LOQ, do idioma inglês, *Limit of Quantification*) é definido como a menor concentração do analito, que pode ser quantificado na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis sob as condições experimentais adotadas (EURACHEM, 1998).

A determinação do LOQ representa um compromisso entre concentração, precisão e exatidão exigidas. Isto significa que, quando decresce o nível de concentração do LOQ, a medição torna-se menos precisa. Se houver necessidade de maior precisão, uma concentração maior deve ser registrada para o LOQ (RIBANI et al., 2004). Para tal, utiliza-se a seguinte Equação 2:

$$LOQ = \frac{10s}{S} \quad (\text{Equação 2})$$

Considera-se o valor real do LOQ<sub>m</sub> (µg L<sup>-1</sup>), como sendo a menor concentração que, ao ser fortificada na matriz, apresenta recuperações entre 70 e 120%, com RSD menor ou igual a 20% (SANTE, 2018).

#### 2.7.4 Exatidão e recuperação

Exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (INMETRO, 2007).

A recuperação é a quantidade do analito remanescente na determinação final de uma amostra, após a sua adição, comumente a uma amostra isenta do analito (amostra “branco”) antes do procedimento de extração e sempre é considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança, ou seja, sempre associada a valores de precisão. Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços (EURACHEM, 1998; RIBANI et al., 2004).

Os valores de recuperação são calculados pela Equação 3 e, geralmente, expressos em porcentagem. Os intervalos aceitos devem estar entre 70 e 120% para a maioria dos métodos analíticos (SANTE, 2018).

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{c_1 - c_2}{c_3} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

$C_1$  = Concentração do analito determinada na amostra fortificada;

$C_2$  = Concentração do analito na amostra não fortificada;

$C_3$  = Concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

### 2.7.5 Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre os ensaios experimentais. Esta medida indica a tendência de maior ou menor afastamento (erro) entre os resultados do ensaio (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009). Usualmente, a precisão é expressa pelo desvio padrão relativo (RSD, do idioma inglês, *Relative Standard Deviation*), através da Equação 4:

$$RSD (\%) = 100 \frac{s}{x_m} \quad (\text{Equação 4})$$

Sendo:

$s$  = estimativa do desvio padrão absoluto;

$x_m$  = valor médio determinado;

A precisão é normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as três formas mais comuns de expressá-la são: por meio da repetitividade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão relativo e coeficiente de variação (INMETRO, 2011).

- Repetitividade: Precisão da medida de um analito, usando o mesmo método nas mesmas amostras e no mesmo laboratório em um curto período de tempo, durante o qual não ocorrem diferenças nos materiais, equipamentos utilizados e/ou analistas envolvidos (SANTE, 2018).
- Precisão intermediária: Indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes analistas, dias e equipamentos (RIBANI et al., 2004).
- Reprodutibilidade: Precisão da medida de um analito, usando o mesmo método em mais de um laboratório, por diferentes analistas, ou durante

um período no qual diferenças nos materiais e equipamentos possam ocorrer (SANTE, 2018).

A precisão intermediária representa a variabilidade dos resultados do laboratório e pode ser expressa através da estimativa do RSD (ANVISA, 2003; INMETRO, 2011). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabelece que os estudos de precisão intermediária devem ser conduzidos considerando três diferentes níveis de concentração e as determinações devem ser realizadas em 6 repetições.

### **2.7.6 Seletividade**

A seletividade é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em análise na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa (EURACHEM, 1998). A verificação da seletividade do método deve ser feita a partir da comparação entre os sinais advindos do processamento da matriz, do extrato fortificado e do analito (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009).

Uma matriz complexa pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração (INMETRO, 2011).

### **2.7.7 Efeito matriz**

O efeito matriz tem sido amplamente estudado e reconhecido como uma fonte de erros na análise quantitativa de uma série de tipos de amostra (NIESSEN; MANINI; ANDREOLI, 2006). Normalmente, o efeito matriz é causado pela interferência dos componentes da matriz que eluem no mesmo tempo de retenção que o analito. Quando se trabalha com matrizes complexas e com baixas concentrações dos analitos, a avaliação do efeito matriz é de grande importância para evitar resultados errôneos.

Pode-se empregar dois métodos para verificar o efeito matriz. O primeiro método baseia-se na comparação entre as áreas obtidas das soluções analíticas

em solvente orgânico e das áreas obtidas através das soluções analíticas preparadas no extrato “branco” da matriz. Para o cálculo do efeito matriz observado em cada nível de concentração estudado, podemos empregar a Equação 5.

$$Efeito\ matriz\ (\%) = \left( \frac{A_1 - A_2}{A_2} \right) \times 100 \quad (Equação\ 5)$$

Onde:

$A_1$  = Média das áreas de cada analito da solução analítica, preparada em matriz, numa dada concentração;

$A_2$  = Média das áreas de cada analito da solução analítica, preparada em solvente, numa dada concentração;

Outra maneira de avaliar o efeito matriz é através da comparação das inclinações das curvas analíticas preparadas em solvente orgânico e em extrato “branco” da matriz, de acordo com a Equação 6

$$Efeito\ matriz\ (\%) = \left( \frac{1 - S_m}{S_s} \right) \quad (Equação\ 6)$$

Sendo:

$S_m$  = Inclinação da curva preparada em extrato “branco” da matriz;

$S_s$  = Inclinação da curva preparada em solvente orgânico;

Através das Equações 5 e 6 é possível determinar se a matriz exerce efeito positivo (acréscimo na intensidade do sinal) ou negativo (supressão do sinal) sobre o resultado da análise. Quando os valores do efeito matriz encontram-se na faixa de -20% e 20% é considerado aceitável e este efeito não é significativo, pois esta variação está próxima aos valores de repetibilidade (FERRER et al., 2011). No entanto, quando o efeito matriz oscila de -50% e -20% ou 20% e 50% temos um efeito moderado, e se os valores encontram-se abaixo de -50% e acima de 50% este é considerado forte (FERRER et al., 2011). Assim, quando o efeito matriz apresentar valores fora da faixa aceitável, é necessário eliminar/compensar este efeito, o que pode ser feito utilizando-se

soluções analíticas preparadas no extrato da matriz (ZROSTLÍKOVÁ et al., 2001).

## 2.8 PROCESSOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO

Os produtos farmacêuticos são considerados uma ameaça ambiental devido aos potenciais riscos aos organismos dependentes de ambientes contaminados. Assim, métodos para a remoção destes contaminantes do meio ambiente são requeridos (KANAKARAJU; GLASS; OELGEMÖLLER, 2018).

Tecnologias envolvendo PAOs têm sido amplamente investigadas e aplicadas para o tratamento de águas residuais, e tornaram-se uma alternativa para o tratamento de efluentes quando as técnicas convencionais não são eficazes para a degradação dos contaminantes orgânicos presentes (GOGATE; PANDIT, 2004; EMMANUEL et al., 2005; SNYDER et al., 2006; SUÁREZ et al., 2008; KLAVARIOTI; MANTZAVINOS; KASSINOS, 2009; CHONG et al., 2010; FATTA-KASSINOS; VASQUEZ; KÜMMERER, 2011; FENG et al., 2016). Entretanto, os métodos baseados nos processos avançados de oxidação ainda não são usados rotineiramente em estações de tratamento efluentes (TRAWIŃSKI; SKIBIŃSKI, 2017).

Os PAOs baseiam-se, por exemplo, na utilização de oxidantes químicos (ozônio e/ou peróxido de hidrogênio) e físicos (radiação ultravioleta e/ou ultrassom) para a degradação de espécies químicas recalcitrantes. A combinação destes oxidantes, além de outras espécies, geram HO·, que apresenta elevado poder de oxidação (2,8 V) *in situ*. (VASCONCELOS, 2006; MINETTO, 2013). Os radicais gerados convertem a grande maioria dos compostos orgânicos em CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e ânions inorgânicos (GOGATE; PANDIT, 2004), contrário ao que ocorre no tratamento convencional. Isto os coloca como uma alternativa para o tratamento de efluentes hospitalares.

A Tabela 3 apresenta alguns trabalhos encontrados relacionados aos PAOs aplicados aos antipsicóticos em estudo.

Tabela 3- Levantamento de alguns trabalhos que empregam PAOs para a degradação de antipsicóticos.

<b>Analitos</b>	<b>PAOs</b>	<b>Amostra</b>	<b>Técnica de análise</b>	<b>Referência</b>
<b>Clorpromazina</b>	Fotólise	Efluentes	LC-MS/MS	(TRAUTWEIN; KÜMMERER, 2012)
<b>Olanzapina</b>	Fotocatálise heterogênea	Água de rio	Espectrofotômetro UV-Vis	(REGULSKA; KARPIŃSKA, 2012)
<b>Clorpromazina</b>	Fotocatálise Heterogênea	Água destilada	GC-MS	(KHATAEE; FATHINIA; JOO, 2013)
<b>Haloperidol e Risperidona</b>	Ozonização	Efluentes urbanos	LC-MS/MS	(ANTONIOU et al., 2013)
<b>Haloperidol e Risperidona</b>	Peroxônio	Efluentes urbanos	Espectrofotômetro UV-Vis	(HEY et al., 2014)
<b>Risperidona</b>	Fotocatálise heterogênea	Água destilada, água de torneira, água de rios e água de lagos	LC-MS	(CALZA et al., 2016)

Fonte: Autora

### 2.8.1 Fotólise

Os fármacos, são desenvolvidos para serem ingeridos de forma oral, e serem resistentes à hidrólise. Assim, a fotólise pode ser considerada como uma das principais rotas de degradação para estes compostos em águas superficiais através da decomposição ou dissociação dos compostos orgânicos por efeito da luz natural ou artificial (DOLL; FRIMMEL, 2003; FATTA-KASSINOS; VASQUEZ; KÜMMERER, 2011).

As reações fotolíticas são frequentemente complexas e envolvem vários tipos de reações, tais como a formação de foto-aduto, foto-oxidação, foto-rearranjo, fotociclização, descarboxilação e desalogenação e levam a vários produtos de degradação (PETROVIC; BARCELÓ, 2007; FATTA-KASSINOS; VASQUEZ; KÜMMERER, 2011; KAWABATA et al., 2013).

Basicamente, dois tipos de fotólise podem ser aplicados: a fotólise direta ou a fotólise indireta (Klavarioti et al., 2009; Tong et al., 2011). No processo de fotólise direta, o composto absorve luz, torna-se instável e, na sequência, se degrada (LAM; YOUNG; MABURY, 2005). Durante a fotólise direta a radiação absorvida é usada para produzir estados eletronicamente excitados das espécies fotossensíveis, iniciando o processo de desativação ou da formação de fotoprodutos. Os fótons necessários para iniciar o processo podem ser fornecidos pela luz solar ou por lâmpadas artificiais.

O pH da água é um dos fatores que pode influenciar o processo de fotólise direta. Muitos produtos farmacêuticos apresentam valores de pKa dentro ou perto da faixa de pH da água potável. Assim, compostos em diferentes estados de protonação pode ter diferentes propriedades de absorção e rendimentos quânticos (CARLSON et al., 2015).

Em relação ao emprego do processo de fotólise, um aspecto positivo tem sido a decomposição de psicofármacos liberados no meio ambiente e, como consequência, a redução de sua toxicidade (TRAWIŃSKI; SKIBIŃSKI, 2017). Por outro lado, este processo pode levar à formação de intermediários, os quais podem apresentar maior toxicidade que o composto original (ISIDORI et al., 2005).



## 2.8.2 Ozonização

A ozonização, é considerada uma tecnologia promissora para a remoção de micropoluentes orgânicos contidos em efluentes (HEY et al., 2014). O ozônio é um poderoso oxidante ( $E^\circ = 2,07 \text{ eV}$ ) que pode reagir através do mecanismo direto ou indireto. No entanto, deve ser gerado *in situ* devido a sua instabilidade química. Na reação direta, o ozônio molecular atua seletivamente, com baixa cinética de reação nas ligações duplas das moléculas orgânicas. Na reação indireta, a molécula de ozônio se decompõe através do método corona formando  $\text{HO}\cdot$ , o qual atua de modo não seletivo e com alta cinética de reação, aumentando a eficiência do processo.

O pH da reação influencia no mecanismo de reação. Quando o pH do meio reacional é inferior a 4, o principal mecanismo de reação do ozônio é a reação direta com compostos orgânicos, enquanto que quando o pH do meio reacional encontra-se entre 4 e 9, ambos os mecanismos podem estar presentes, tanto ozonização direta quanto via radicalar. Em valores de pH superiores a 9, a reação via radicalar é preferencial (GUNTEN, 2003).

## 2.9 TOXICIDADE DOS ANTIPSICÓTICOS

Poucos trabalhos relacionados aos efeitos tóxicos que os antipsicóticos podem causar aos organismos vivos foram encontrados na literatura. Dentre estes, o estudo de BRAMBILLA et al., 2009 aponta que os antipsicóticos haloperidol, olanzapina, risperidona e pimozida são classificados como carcinogênicos e não genotóxicos para *hamsters*. Ao contrário destes, a clorpromazina não é considerada carcinogênica (PETRUSKA et al., 2002) mas apresenta evidências de ser genotóxica para *hamsters* (BRAMBILLA; MATTIOLI; MARTELLI, 2009). Ainda, a clorpromazina pode ocasionar efeitos colaterais como fotoalergia e fototoxicidade ao homem (TRAUTWEIN; KÜMMERER, 2012) bem como acumular-se na lente do olho e córneas, podendo levar a cegueira (WOLNICKA-GLUBISZ et al., 2009).

Kalichak e colaboradores avaliaram os efeitos de três medicamentos psicotrópicos (fluoxetina, risperidona e diazepam) no desenvolvimento inicial de

peixe-zebra. Os autores constataram que a risperidona afeta negativamente as larvas de peixe-zebra devido à redução do comprimento dos embriões, diminuição da eclosão das larvas e redução da frequência cardíaca e, conseqüentemente, causa um aumento nas taxas de mortalidade da espécie (KALICHAK et al., 2016). Outro estudo, que investigou o desenvolvimento de peixe-zebra em contato com a clozapina, revelou que este antipsicótico provoca anomalias nesta espécie, podendo ser considerada teratogênica (AKANDE; ORN; NORRGREN, 2010).

Para os seres humanos, as doses consideradas tóxicas de clorpromazina, haloperidol, clozapina, olanzapina e risperidona são  $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ;  $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ;  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ;  $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente (DEAR; BATEMAN, 2016). A clozapina pode gerar agranulocitose, e por este motivo, o paciente medicado com este antipsicótico deve realizar exames para verificar o número de leucócitos durante o tratamento e até um mês após a retirada completa do medicamento (WULFF, 2007).

## 2.10 AVALIAÇÃO DO RISCO AMBIENTAL

Os estudos que avaliam o risco ambiental de determinada substância têm a finalidade de prever a possível contaminação no ambiente por este composto e apoiar tomadas de decisão sobre o poluente, com a finalidade de investigar seus impactos. Para avaliar o potencial de risco ambiental, existem ferramentas que podem ser empregadas baseando-se em dados como consumo, características físico-químicas, entre outros (ARSAND, 2010). A Agência Européia de Avaliação de Medicamentos (EMA) propôs metodologias para a avaliação do risco ambiental de alguma substância específica em estudo (EMA, 2006).

A relação entre o valor da Predição da Concentração Ambiental e o valor da Concentração Predita que Não Causa Efeito (PEC/PNEC) é utilizada para avaliar o risco ambiental de uma determinada substância. O valor resultante desta relação é conhecido como quociente de risco (QR) e um (1) representa o limite máximo para que uma substância não apresente risco ao meio ambiente. Também pode ser utilizada para o cálculo de QR a Concentração Ambiental Medida (MEC), a qual é estabelecida pela determinação do composto. Quando o

QR for inferior a 0,1, o medicamento apresenta risco mínimo para organismos aquáticos. Mas quando o QR apresenta valores na faixa entre 0,1 e 1, o medicamento apresenta risco médio. Quando o QR for maior que 1, considera-se que o medicamento apresenta alto risco (HERNANDO et al., 2006).

Para os antipsicóticos risperidona, clozapina, clorpromazina e olanzapina, os valores de PNEC encontrados na literatura estão apresentados na Tabela 4, com valores na faixa de  $8,8 \times 10^{-5}$  a  $44 \mu\text{g L}^{-1}$  (BERCU et al., 2008; ORIAS; PERRODIN, 2013). Baixos valores de PNEC, estão relacionados à um QR mais significativo aos ecossistemas e aos seres vivos dependentes do ambiente contaminado, demonstrando desta forma, a necessidade de estudos mais detalhados para prever o risco, bem como propor formas eficientes para a descontaminação dos ambientes contaminados. Estudos apontam que a clorpromazina apresentou QR maior que 1, enquanto que a clozapina e a risperidona apresentaram risco médio (ORIAS; PERRODIN, 2014). Para os demais antipsicóticos, não foram encontrados dados referentes ao QR.

O  $K_{ow}$  é o coeficiente de partição entre n-octanol e água, e pode ser utilizado como parâmetro para indicar a lipofilicidade de cada substância e, conseqüentemente, seu potencial de bioacumulação em tecidos adiposos de organismos aquáticos (GOSSETT; BROWN; YOUNG, 1983; FRANKE, 1996; MEYLAN; OWARD; OETHLING, 1999; TGD, 2003). Conforme o Documento de Orientação Técnica de Avaliação de Risco (TGD do idioma inglês, *Technical Guidance Document on Risk Assessment*) e o EMEA, substâncias com  $\log K_{ow}$  igual ou superior a 4,5 são classificadas como substâncias de risco devido à fácil bioacumulação (TGD, 2003; EMEA, 2006). Neste caso, a exposição contínua à microcontaminantes orgânicos pode levar ao aumento das concentrações destes, em diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar.

Na Tabela 4 estão apresentados os valores de  $K_{ow}$ , PNEC e valores de persistência, bioacumulação e toxicidade (PBT) para cada antipsicótico. Observa-se que o antipsicótico que apresenta maior tendência de bioacumular-se em organismos aquáticos é a pimozida e o que apresenta menor possibilidade de bioacumulação é a risperidona (maior hidrossolubilidade).

Tabela 4- Valores de log K<sub>ow</sub>, PNEC e PBT para cada antipsicótico.

Composto	log K <sub>ow</sub>	PNEC (µg L <sup>-1</sup> )	Valores de PBT		
			P	B	T
<b>Clorpromazina</b>	5,35	0,000088	2	2	3
<b>Clozapina</b>	3,94	0,0014	3	3	3
<b>Haloperidol</b>	4,30	-	3	3	2
<b>Olanzapina</b>	3,78	44	0	0	2
<b>Pimozida</b>	6,30	-	3	3	3
<b>Risperidona</b>	3,49	0,001	3	0	2

Fonte: Valores de K<sub>ow</sub>: DrugBank (<https://www.drugbank.ca/>)

Valores de PNEC: (BERCU et al., 2008; ORIAS; PERRODIN, 2013)

Valores de PBT: *software PBT profile*

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Ao longo dos últimos anos, o LATER tem trabalhado em estudos voltados à determinação e à degradação de microcontaminantes ambientais, tendo como matriz de investigação os efluentes hospitalares, especialmente, o efluente do HUSM. O laboratório atua no desenvolvimento, otimização e aplicação de metodologias analíticas bem como na avaliação do risco ambiental e estudos de degradação oxidativa por meio de PAOs (DE ALMEIDA et al., 2013, 2015; WILDE; MONTIPÓ; MARTINS, 2014). Os itens a seguir descrevem os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

#### 3.1 INSTRUMENTAÇÃO

- Cromatógrafo a líquido, sistema de HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japão, modelo Prominence) constituído por: bomba quaternária LC-20AT, degaseificador DGU-20A5, amostrador automático SIL 20A, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A, detector de fluorescência (FD) RF-10AXL e módulo comunicador de interface CBM-20A. Os cromatogramas foram adquiridos e analisados pelo *Software LC-Solution*;
- Cromatógrafo a líquido, sistema LC (Shimadzu, Kyoto, Japão, modelo Prominence) constituído por: bomba binária LC-20AD, degaseificador DGU-20A3R, amostrador automático SIL-20AHT, analisador de espectrometria de massas e módulo comunicador de interface CBM-20A. Os cromatogramas foram adquiridos e analisados pelo *Software LC-Solution*;
- Coluna cromatográfica LUNA C<sub>18</sub>, 150 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e 5 µm de tamanho de partícula, com pré-coluna (Phenomenex, Califórnia, EUA);
- Coluna cromatográfica Kinetex C<sub>18</sub>, 100 mm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro interno e 2,6 µm de tamanho de partícula (Phenomenex, Califórnia, EUA);
- Balança analítica de precisão (Bel Engineering, São Paulo, Brasil);

- Centrífuga, modelo 80-2B, capacidade para 12 tubos (CentriBio, Paraná, Brasil);
- Vórtex (Biomixer, Paraná, Brasil);
- Banho ultrassom frequência de 40 kHz e potência de 55 W (Thornton T14, São Paulo, Brasil);
- Sistema de purificação de água Direct-Q 3 Ultrapure Water Systems, (MilliPore, Massachusetts, EUA).
- Bomba de vácuo (Quimis, São Paulo, Brasília);
- pHmetro, modelo PHS-3B (PHTEK, Paraná, Brasil);
- Chapa de aquecimento (IKA, Rio de Janeiro, Brasil);
- Lâmpada UV 13 W, modelo UV-C 13W/GX23 (Bravoluz Lâmpadas, Paraná, Brasil);
- Ozonizador (Ozonebras, São José dos Campos, Brasil);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Eppendorff, Canadá, EUA e Brand, Wertheim, Alemanha).

### 3.2 MATERIAIS

Os materiais empregados neste trabalho foram:

- Seringa, capacidade de 1000  $\mu$ L (Hamilton, Nevada, EUA);
- Frascos de vidro, capacidade de 10 mL, com batoque de teflon;
- Filtro qualitativo (Unifil, Rio Grande do Sul, Brasil);
- Membranas de nitrato de celulose (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Alemanha);
- Balões volumétricos calibrados, com capacidade de 5 e 10 mL (Blau Brand, Alemanha).
- Frascos de vidro para centrífuga, em formato cônico;
- Vidrarias comuns de laboratório.

### 3.3 SOLVENTES, REAGENTES E GASES

- Acetona, grau PA (Qhemis, São Paulo, Brasil);
- Acetonitrila, grau HPLC (J.T. Baker, New York, EUA);
- Metanol, grau HPLC (J.T. Baker, New Jersey, EUA);
- Álcool etílico absoluto, grau PA (Qhemis, São Paulo, Brasil);
- Ácido fosfórico (orto), grau PA (Vetec, São Paulo, Brasil);
- Hidróxido de potássio, grau PA (Synth, São Paulo, Brasil);
- Fosfato de potássio monobásico, grau PA (Fmaia, São Paulo, Brasil);
- Formiato de amônio, grau PA (Sigma Aldrich, Missouri, EUA);
- Clorofórmio, grau PA (Fmaia, São Paulo, Brasil);
- Clorobenzeno, grau PA (Sigma Aldrich, Missouri, EUA);
- Tetracloreto de carbono, grau PA (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Diclorometano, grau HPLC (Mallinckrodt, Canadá, EUA);
- Padrões dos analitos: haloperidol, olanzapina, risperidona e pimozida (Janssen, São Paulo, Brasil); Clozapina (Novartis, São Paulo, Brasil); e clorpromazina (Cristália, São Paulo, Brasil). Todos os padrões apresentaram grau de pureza maior que 97%.
- Nitrogênio comprimido 2.2 (Air Products, Porto Alegre, Brasil).

### 3.4 SELEÇÃO DOS ANALITOS

Os analitos foram selecionados com base na lista dos medicamentos utilizados pelo HUSM (referente ao ano de 2012), sendo todos pertencentes à classe dos antipsicóticos. A necessidade de estudos sobre a avaliação do risco que os resíduos de antipsicóticos podem causar para os ecossistemas contribuiu para a escolha dos analitos, visto que esta informação é limitada na literatura.

## **3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS**

### **3.5.1 Preparo das soluções estoque**

As soluções estoque individuais de cada analito foram preparadas na concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup> levando em consideração a pureza e a solubilidade dos padrões dos analitos. Após o preparo da solução estoque individual dos antipsicóticos, preparou-se a solução mistura em metanol, contendo todos os analitos na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup>, e a partir desta foram preparadas as demais soluções.

Todas as soluções, tanto estoque quanto as de trabalho, foram mantidas à temperatura de aproximadamente -18 °C. Antes do uso, as soluções foram retiradas com antecedência e deixadas em repouso até alcançar a temperatura ambiente ( $\pm 25$  °C).

### **3.5.2 Preparo das soluções para as curvas analíticas**

Com as soluções na concentração de 5 e 1 mg L<sup>-1</sup> foram preparadas as soluções das curvas analíticas em solvente orgânico (acetoneitrila) para estimar os LOD e LOQ dos instrumentos. Para o estudo de validação, as curvas analíticas foram preparadas em solvente orgânico e extrato da matriz.

Cada solução foi analisada em triplicata e, na sequência, foram feitos os cálculos dos valores médios das áreas e dos RSDs%. Para avaliação dos dados obtidos no estudo da linearidade, foram aplicados os testes estatísticos de Cochran para avaliar a homocedasticidade dos resultados, teste de Anderson-Darling para avaliar a normalidade e teste de Durbin-Watson para o estudo da independência dos resíduos da regressão (FRIEDRICH, 2014).

### **3.5.3 Preparo das soluções para os processos de fotólise e ozonização**

Para a aplicação dos processos avançados de oxidação, as soluções na concentração de 2 mg L<sup>-1</sup> foram preparadas em efluente hospitalar a partir das soluções estoque individuais, para cada analito separadamente. O pH das



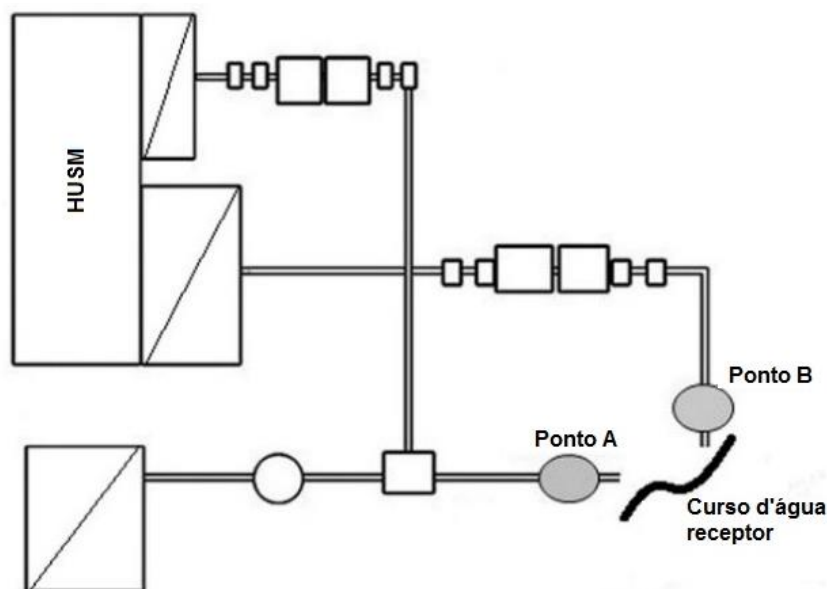
soluções foi ajustado em diferentes valores (5, 7 e 9) para o estudo da degradação.

### 3.6 COLETAS DAS AMOSTRAS DE EFLUENTE HOSPITALAR

A rede de esgotos do HUSM é dividida em duas linhas que abrangem as alas norte e sul do hospital, separadamente. A região que abrange a área psiquiátrica é reconhecida como ala norte, enquanto a ala sul é a região que contém o pronto atendimento (PA-HUSM).

As amostras foram coletadas em dois pontos da rede de esgoto do HUSM, localizados após a saída do sistema de tratamento de efluentes Figura 6. A caracterização do efluente coletado juntamente com os valores estabelecidos pelo Conama e pelo Conselho Estadual do Meio Ambiente (Consema) encontram-se no Apêndice A desta tese.

Figura 6 – Localização dos pontos de coleta de amostra.



Fonte: Adaptado de Martins e colaboradores (MARTINS et al., 2017a).

As amostras foram coletadas a cada duas horas (8:00 às 18:00) e amostras compostas foram feitas no final do dia, em cada dia de uma semana

(14 a 21 de dezembro de 2017). Imediatamente após a coleta, cada amostra foi homogeneizada no local através de agitação manual, transferida para um garrafa frasco âmbar e colocada em uma caixa térmica para transporte ao laboratório. Na sequência, as amostras foram acidificadas com uma solução de ácido clorídrico, filtradas e subsequentemente armazenadas a 4-8 °C até o momento da análise (dentro de 24 h).

### **3.7 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA DETERMINAÇÃO DOS ANTIPSICÓTICOS**

Inicialmente, os métodos cromatográficos empregando as técnicas instrumentais HPLC-DAD-FLD e LC-ESI-MS foram otimizados, de modo a obter-se a melhor separação dos analitos.

A composição, proporção, vazão e modo de eluição da fase móvel, temperatura do forno da coluna cromatográfica, comprimentos de onda e razão *m/z* foram avaliados para cada método cromatográfico. Além disso, a adição de modificador trietanolamina no componente da fase aquosa para o método por HPLC-DAD-FLD e acidificação da fase aquosa para LC-ESI-MS também foram avaliados.

O método por HPLC-DAD-FLD foi utilizado para otimização dos procedimentos de extração, enquanto que o método por LC-ESI-MS foi utilizado para a verificação da ocorrência dos antipsicóticos seccionados durante a semana de amostragem.

### **3.8 ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS**

A estabilidade das soluções estoque e de trabalho devem ser investigadas através da comparação do sinal analítico obtido de uma solução recém preparada com o sinal analítico de soluções mais antigas (armazenadas em diferentes condições ambientais).

Para este estudo, utilizaram-se soluções analíticas preparadas em solvente orgânico acetonitrila, na concentração de 5 mg L<sup>-1</sup>, que foram expostas em diferentes condições como: em presença de luz e temperatura ambiente, na

ausência de luz e temperatura ambiente e também quando mantida sob refrigeração (mesma temperatura que as soluções estoque individuais e a solução mistura de padrões estavam armazenadas).

Inicialmente, as soluções foram analisadas diariamente até completar uma semana após o preparo. Em seguida, as soluções foram analisadas uma vez a cada semana até completar 30 dias do preparo das soluções, e a partir do primeiro mês as soluções foram analisadas uma vez a cada mês até completar 12 meses do preparo das soluções. Todas análises foram conduzidas no equipamento HPLC-DAD-FLD.

### **3.9 ESTUDO DOS PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO**

#### **3.9.1 Otimização da SPE**

A maioria dos estudos encontrados na literatura utilizam o procedimento de SPE para a extração de antipsicóticos (YUAN et al., 2013; BOROVA et al., 2014). No entanto, poucos estudos empregaram planejamentos multivariados para encontrar as condições ótimas de extração. Assim, neste estudo, decidiu-se utilizar um planejamento fatorial para a escolha das condições mais adequadas para extração dos analitos por SPE.

Inicialmente, foram testados os seguintes sorbentes: Chromabond® C18 EC (6 mL/500 mg), Chromabond® C18 (6 mL/500 mg), Strata® SXC (6 mL/500 mg), Strata® C18-E (6 mL/500 mg), Strata-X® (6 mL/500 mg) e Supelcosil® (6 mL/500 mg). O procedimento geral para a SPE consistiu de condicionamento com 2 vezes de 5 mL de metanol e 2 vezes de 5 mL de água ultrapura. Em seguida passou-se 100 mL de amostra ( $\text{pH } 7,0 \pm 0,05$ ) fortificada em  $5 \text{ mg L}^{-1}$ , então adicionou-se 5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura e deixou-se secar o cartucho com ar durante 10 min. A eluição foi feita com 2 vezes de 2 mL de metanol. Na sequência, o solvente orgânico foi evaporado sob fluxo de  $\text{N}_2$  e aquecimento ( $\pm 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ), o resíduo foi reconstituído com 1 mL de metanol, agitado em vórtex durante 1 min e analisado por HPLC-DAD-FLD.

Após selecionar o sorbente mais adequado, procedeu-se com a execução do planejamento do tipo Plackett & Burman de 12 ensaios, para uma triagem das

variáveis que apresentam maior influência na extração dos analitos (Tabela 5), e em seguida, um segundo planejamento experimental (Tabela 6) foi necessário para estabelecer os valores ótimos de cada variável estudada (que apresentou maior influência no planejamento fracionado).

Os resultados obtidos foram submetidos à verificação do modelo que melhor se adequou a cada planejamento através do *software* Statistica 10.0. A variável dependente do planejamento foram as recuperações dos antipsicóticos estudados.

Tabela 5 - Matriz do planejamento Plackett & Burman de 12 ensaios para o procedimento SPE.

Fatores	Níveis	
	Baixo (-1)	Alto (+1)
pH da amostra	4	9
Volume de água condic. (mL)	5	10
Volume de MeOH condic. (mL)	5	10
Tempo de secagem (min)	5	10
Volume de água lavagem (mL)	0	5
Volume de MeOH eluição (mL)	1	4
Ácido fórmico (%)	0	0,1

Exp.	Vol. Água condic. (mL)	Vol. MeOH condic. (mL)	pH da amostra	Vol. Água de lavagem (mL)	Tempo de secagem (min)	Vol. MeOH MeOH (mL)	Ácido fórmico (MeOH eluição) (%)
1	10	5	9	5	5	1	0,1
2	10	10	4	10	5	1	0
3	5,0	10	9	5	10	1	0
4	10	5	9	10	5	4	0
5	10	10	4	10	10	1	0,1
6	10	10	9	5	10	4	0
7	5	10	9	10	5	4	0,1
8	5	5	9	10	10	1	0,1
9	5	5	4	10	10	4	0
10	10	5	4	5	10	4	0,1
11	5	10	4	5	5	4	0,1
12	5	5	4	5	5	1	0

Fonte: Autora.

Tabela 6 - Matriz do planejamento DCCR para o procedimento SPE.

Fatores	Níveis				
	- $\alpha$	Baixo (-1)	Central (0)	Alto (+1)	+ $\alpha$
pH da amostra	3	4,5	6	7,5	9
Volume de água lavagem (mL)	0	3	6	9	12
Volume de MeOH eluição (mL)	1	2	3	4	5
Ácido fórmico (%)	0	0,1	0,2	0,3	0,4

Exp	pH da amostra	Volume de água lavagem (mL)	Volume MeOH eluição (mL)	Ácido fórmico (%)
1	4,5	3,0	2,0	0,1
2	4,5	3,0	2,0	0,3
3	4,5	9,0	2,0	0,1
4	4,5	9,0	2,0	0,3
5	4,5	3,0	4,0	0,1
6	4,5	3,0	4,0	0,3
7	4,5	9,0	4,0	0,1
8	4,5	9,0	4,0	0,3
9	7,5	3,0	2,0	0,1
10	7,5	3,0	2,0	0,3
11	7,5	9,0	2,0	0,1
12	7,5	9,0	2,0	0,3
13	7,5	3,0	4,0	0,1
14	7,5	3,0	4,0	0,3
15	7,5	9,0	4,0	0,1
16	7,5	9,0	4,0	0,3
17	3,0	6,0	3,0	0,2
18	9,0	6,0	3,0	0,2
19	6,0	6,0	1,0	0,2
20	6,0	6,0	5,0	0,2
21	6,0	0,0	3,0	0,2
22	6,0	12,0	3,0	0,2
23	6,0	6,0	3,0	0,0
24	6,0	6,0	3,0	0,4
25	6,0	6,0	3,0	0,2
26	6,0	6,0	3,0	0,2

Fonte: Autora.

### 3.9.2 Otimização da DLLME

Foram encontrados poucos trabalhos científicos que empregam a DLLME para a extração de resíduos de medicamentos antipsicóticos. Além disso, a maioria dos trabalhos são aplicados para matrizes biológicas e não contemplam simultaneamente os seis antipsicóticos estudados.

Inicialmente, testes prévios univariados foram efetuados para avaliar diferentes solventes extratores (tetracloreto de carbono, clorofórmio, diclorometano, clorobenzeno, undecanol, acetato de etila, tolueno, hexano) e dispersores (acetona, metanol, etanol, acetonitrila).

A maioria dos estudos encontrados na literatura utilizam o NaCl para avaliar o efeito da adição de sal na extração. Neste estudo, foi investigada a presença dos sais NaCl e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ambos na concentração de 1 mol L<sup>-1</sup>, bem como a ausência da adição de sal. Outro fator avaliado no planejamento experimental foi uma etapa de agitação (vórtex e ultrassom) e a ausência de agitação.

Para isso, as seguintes condições experimentais foram estabelecidas: volume de amostra (10 mL), pH da amostra (9 ± 0,05), volume de solvente dispersor (450 µL), volume de solvente extrator (150 µL), tempo de extração (repouso durante 2 min), tempo de centrifugação (5 min) e velocidade de centrifugação (3500 rpm). Quando foi avaliado o tipo de solvente extrator, empregou-se como dispersor o etanol, e quando avaliado o tipo de solvente dispersor, fixou-se como extrator o tetracloreto de carbono.

Para otimizar os parâmetros experimentais que mais influenciaram a extração simultânea dos analitos por DLLME, dois planejamentos multivariados foram utilizados, sendo o primeiro fracionado e o segundo completo, Tabela 7 e Tabela 8, respectivamente, utilizado-se como resposta os valores de recuperações %. No fluxograma representado na Figura 7 estão demonstrados os planejamentos executados, bem como as condições avaliadas em cada planejamento experimental multivariado.

Tabela 7- Matriz do planejamento fracionado 2<sup>6-2</sup> para o procedimento DLLME.

Fatores	Níveis	
	Baixo (-1)	Alto (+1)
pH da amostra	5	10
Vol. Solvente extrator (µL)	100	250
Vol. Solvente dispersor (µL)	400	550
Tempo de extração (min)	1	4
Concentração de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	0	1
Tempo de centrifugação (min)	2	6

Exp	pH da amostra	Volume extrator (µL)	Volume dispersor (µL)	Tempo de extração (min)	[Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] (mol L <sup>-1</sup> )	Tempo de centrifugação (min)
1	5	100	400	1	0	2
2	10	100	400	1	1	2
3	5	250	400	1	1	6
4	10	250	400	1	0	6
5	5	100	550	1	1	6
6	10	100	550	1	0	6
7	5	250	550	1	0	2
8	10	250	550	1	1	2
9	5	100	400	4	0	6
10	10	100	400	4	1	6
11	5	250	400	4	1	2
12	10	250	400	4	0	2
13	5	100	550	4	1	2
14	10	100	550	4	0	2
15	5	250	550	4	0	6
16	10	250	550	4	1	6

Fonte: Autora.

Todos os ensaios foram executados em matriz efluente hospitalar. Na aplicação dos planejamentos, os analitos foram pré-concentrados 20 vezes, e após a seleção das condições experimentais mais adequadas para a maioria dos analitos, alcançou-se um fator de pré-concentração de 100 vezes, possibilitando a obtenção de valores mais baixos para os LOQ<sub>m</sub>. Para a análise dos resultados, levou-se em consideração a resposta analítica em termos de recuperações.

Tabela 8- Matriz do planejamento DCCR para o procedimento DLLME.

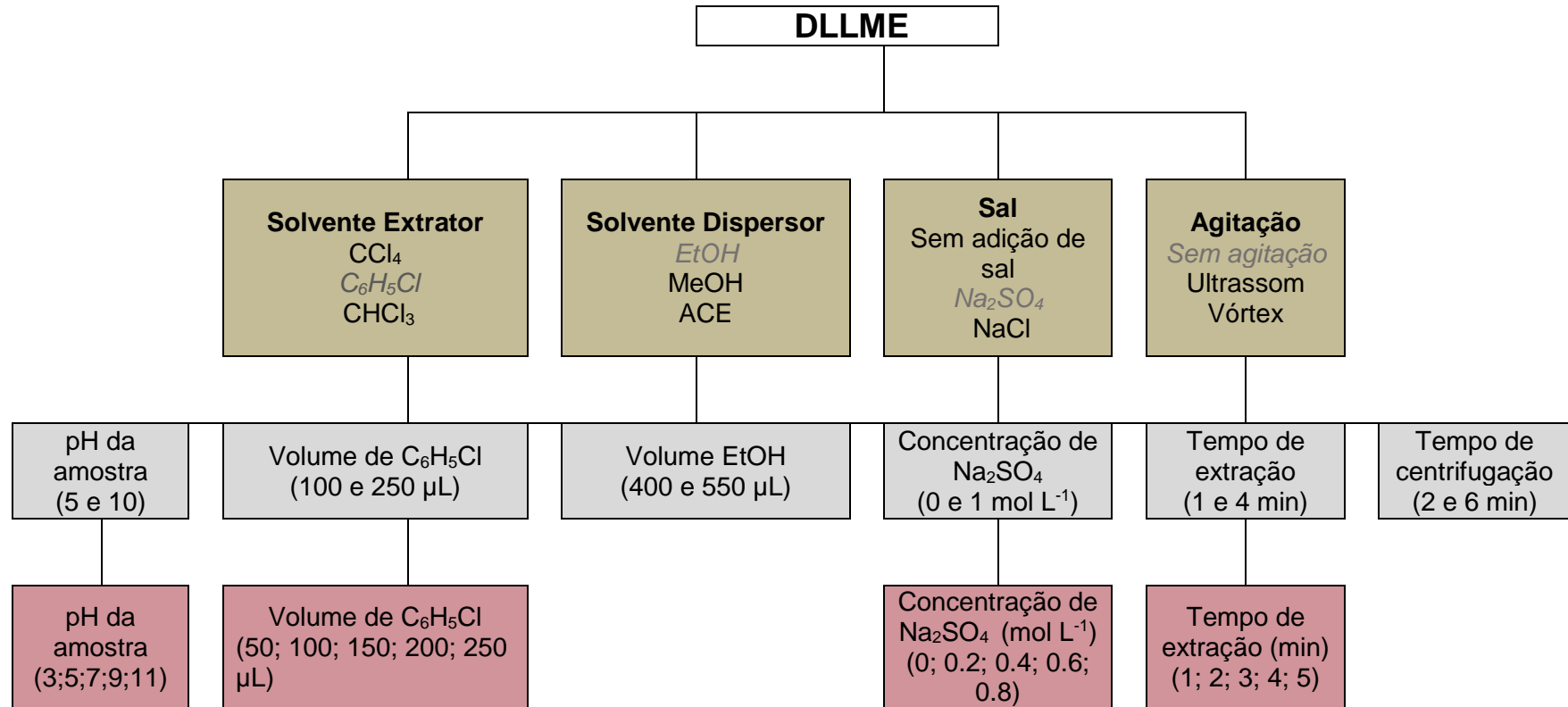
Fatores	Níveis				
	$-\alpha$	Baixo (-1)	Central (0)	Alto (+1)	$+\alpha$
pH da amostra	3	5	7	9	11
Vol. Solvente extrator ( $\mu\text{L}$ )	50	100	150	200	250
Tempo de extração (min)	1	2	3	4	5
Concentração de $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ( $\text{mol L}^{-1}$ )	0	0,2	0,4	0,6	0,8

Exp	pH da amostra	Volume extrator ( $\mu\text{L}$ )	$[\text{Na}_2\text{SO}_4]$ ( $\text{mol L}^{-1}$ )	Tempo de extração (min)
1	5	100	0,2	2
2	5	100	0,2	4
3	5	100	0,6	2
4	5	100	0,6	4
5	5	200	0,2	2
6	5	200	0,2	4
7	5	200	0,6	2
8	5	200	0,6	4
9	9	100	0,2	2
10	9	100	0,2	4
11	9	100	0,6	2
12	9	100	0,6	4
13	9	200	0,2	2
14	9	200	0,2	4
15	9	200	0,6	2
16	9	200	0,6	4
17	3	150	0,4	3
18	11	150	0,4	3
19	7	50	0,4	3
20	7	250	0,4	3
21	7	150	0	3
22	7	150	0,8	3
23	7	150	0,4	1
24	7	150	0,4	5
25	7	150	0,4	3
26	7	150	0,4	3

Fonte: Autora.



Figura 7– Diagrama de blocos das variáveis avaliadas na otimização da DLLME.

**Legenda:**

Seleção dos solventes, sais e modos de agitação

Planejamento DCCR

Planejamento fracionado  $2^{6-2}$

ACE: Acetona

Fonte: Autora

### **3.10 VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS SPE E DLLME**

Após o estudo das otimizações dos procedimentos de extração, efetuou-se o estudo de validação com a finalidade de verificar se os procedimentos estudados são adequados para os fins desejados, ou seja, para a quantificação simultânea dos antipsicóticos estudados em matriz de efluente hospitalar por meio de HPLC-DAD-FLD e LC-ESI-MS. Os parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade, limite de quantificação, exatidão, precisão e efeito matriz, conforme as diretrizes estabelecidas pela ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2005) e pelo documento internacional SANTE/11813/2017 da Comissão Europeia (SANTE, 2018).

### **3.11 APLICAÇÃO DAS METODOLOGIAS VALIDADAS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS ANTIPICÓTICOS EM EFLUENTE HOSPITALAR**

Após o estudo de validação, os procedimentos de extração otimizados e validados foram aplicados para a quantificação dos seis antipsicóticos, simultaneamente, no efluente hospitalar gerado pelo HUSM. Para isso, as amostras foram coletadas ao longo de uma semana, em dois pontos (Figura 6), ambos localizados nas proximidades do HUSM. Os pontos de coleta foram denominados como: ponto A (aquele que recebe os efluentes gerados na ala psiquátrica) e ponto B (recebe os efluentes da unidade de pronto atendimento).

### **3.12 AVALIAÇÃO DO RISCO ECOTOXICOLÓGICO**

Para a avaliação preliminar do risco ecotoxicológico, utilizou-se o índice do QR, através da relação MEC/PNEC. Para este cálculo, levou-se em consideração as maiores concentrações encontradas para cada analito, de modo à simular a pior

condição possível, já o valor da PNEC foi encontrado em estudos reportados pela literatura.

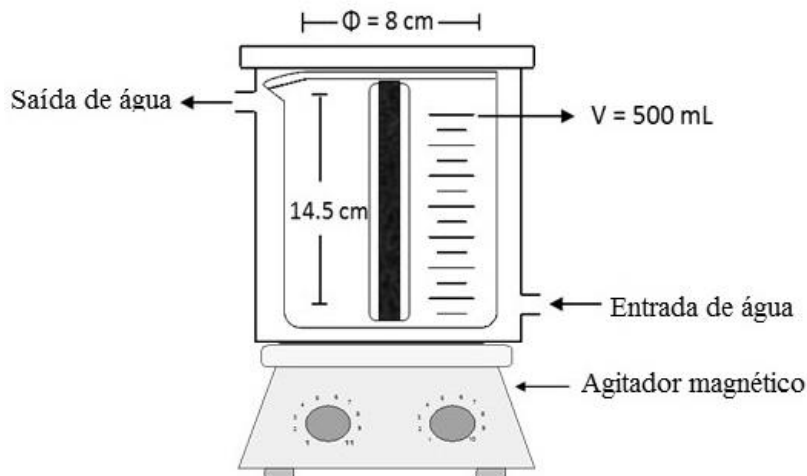
### **3.13 APLICAÇÃO DE PROCESSOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO**

#### **3.13.1 Fotólise**

Para os experimentos de degradação por meio de fotólise, utilizou-se um fotorreator do tipo tanque agitado provido de jaqueta termostática, sendo a parte interna contida em material de vidro com dimensões de 14,5 cm de altura e 8 cm de diâmetro, e a parte externa em material de aço inoxidável (Figura 8). A capacidade do reator é de 500 mL e utilizou-se uma lâmpada UVC (253,7 nm) de 13 W de potência e  $35 \mu\text{W cm}^{-2}$  de intensidade. A temperatura foi mantida entre  $27 \pm 2$  °C por recirculação de água.

Foram feitos experimentos para cada um dos analitos separadamente, utilizando soluções na concentração de  $2 \text{ mg L}^{-1}$ , preparadas em efluente hospitalar e pH ajustado a 5, 7 e 9. O tempo de duração de cada experimento foi de 60 min, sendo que as alíquotas (0,5 mL) foram coletadas da seguinte forma: a cada cinco min até completar metade do tempo total de reação e a cada 10 min até completar 60 min de processo. No total, foram coletadas 10 amostras em cada condição de pH avaliada. Na sequência, as alíquotas foram analisadas através de LC-ESI-MS.

Figura 8 – Esquema do fotorreator de bancada utilizado para o processo de fotólise.



Fonte: Autora.

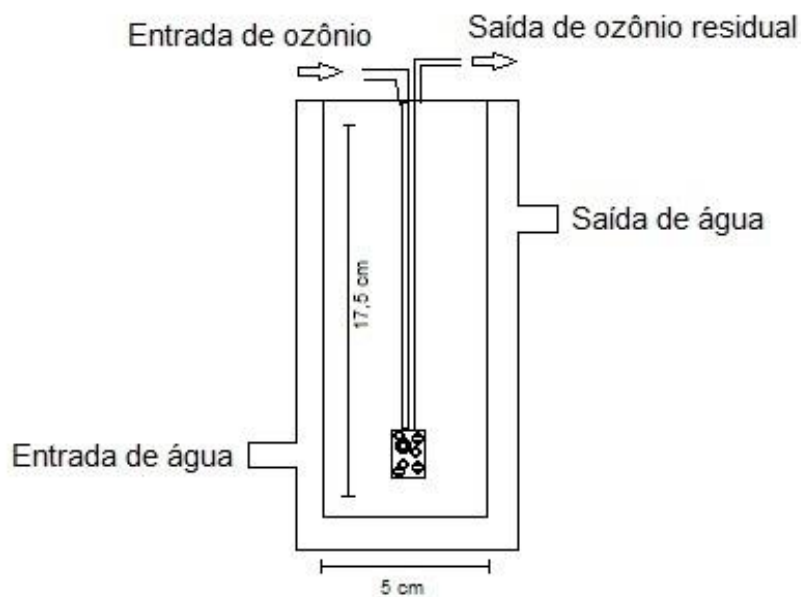
### 3.13.2 Ozonização

Os experimentos de ozonização foram conduzidos em um reator também desenvolvido no LATER, sendo este com capacidade de até 500 mL e produzido em material de aço inoxidável com dimensões internas de 17,5 cm de altura e 5 cm de diâmetro.

O gerador de ozônio utilizado, da marca Ozonebras, possui tecnologia de efeito corona, utilizando ar seco e a produção média de ozônio é de cerca de  $1,0 \text{ g h}^{-1}$ . No decorrer de 60 min de ozonização, as amostras (alíquotas de 0,5 mL) foram coletadas da mesma maneira como no processo de fotólise, ou seja, até completar 30 min as coletas foram feitas em intervalos de 5 min e, após 30 min de processo, as mesmas foram coletadas em intervalos de 10 min, totalizando 10 alíquotas para cada condição experimental, as quais foram analisadas por meio de LC-ESI-MS, conforme descrito no item 3.7.2.

Na Figura 9 está apresentado o esquema do reator desenvolvido para conduzir os experimentos de ozonização.

Figura 9 – Esquema do reator de bancada utilizado para o processo de ozonização.



Fonte: Autora.

### 3.14 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO

Estudos envolvendo a cinética de degradação dos analitos através de fotólise e ozonização foram avaliados e os tempos de meia vida ( $t_{1/2}$ ), para cada antipsicótico, foi calculado conforme a ordem de reação obtida.



## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Nesta seção da tese, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos em todas as etapas do estudo, as quais incluem: os métodos cromatográficos, procedimentos de extração, verificação da ocorrência dos antipsicóticos no efluente do HUSM, avaliação do risco ecotoxicológico preliminar e também a degradação dos analitos através dos processos de fotólise e ozonização.

### **4.1 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA DETERMINAÇÃO DOS ANTIPSICÓTICOS**

#### **4.1.1 Método cromatográfico empregando HPLC-DAD-FLD**

Nos estudos efetuados para avaliar a composição da fase móvel, foi possível verificar que a acetonitrila demonstrou um desempenho melhor na separação dos analitos frente ao metanol como solvente orgânico. Isto ocorre devido à maior força de eluição da acetonitrila, que além de permitir a separação dos analitos também reduziu o tempo, o custo e a quantidade de resíduos gerados no final da análise.

Como constituinte da fase móvel foi necessário o emprego de uma solução tampão. Dentre as soluções tampões avaliadas, a solução de formiato de amônio foi a que forneceu os melhores resultados e garantiu a reprodutibilidade das análises. Quando empregados os demais tampões foi possível perceber que para alguns analitos, o tempo de retenção sofria pequenas variações entre as análises cromatográficas, fato que poderia gerar problemas na aplicação do método para o estudo da ocorrência dos resíduos de antipsicóticos no efluente hospitalar e em águas superficiais.

O pH da solução tampão que forneceu os melhores resultados foi 7,3. Quando utilizados valores de pH ácidos, não foi possível a separação de todos os analitos, por outro lado quando foi utilizado valores de pH acima de 7,3, constatou-se o alargamento dos picos e também o aumento considerável do tempo de análise.

A concentração do tampão formiato de amônio foi avaliada e foi notório, experimentalmente, que a concentração ideal foi 40 mol L<sup>-1</sup>.

Após encontrar a composição da fase móvel adequada, procedeu-se avaliando a proporção dos constituintes da fase móvel, a vazão da fase móvel (0,5, 0,6; 0,7 e 0,8 mL min<sup>-1</sup>), modo de eluição (isocrático e gradiente) e a temperatura do forno da coluna cromatográfica (25; 30; 35 e 40 °C).

Os analitos clorpromazina, clozapina, haloperidol, olanzapina e risperidona foram detectados através do detector de arranjo de diodos (DAD), enquanto que a pimozida foi detectada pelo detector fluorescência (FLD) devido à sua fórmula estrutural e, conseqüentemente, devido à maior detectabilidade do sinal analítico quando comparada ao DAD.

A seleção dos  $\lambda$  no detector DAD foram feitas experimentalmente, por meio de espectros de absorção molecular, já a escolha dos  $\lambda$  para o FLD foram baseados no trabalho previamente publicado por Kerbusch e colaboradores (KERBUSCH et al., 1997). A Tabela 9 apresenta os  $\lambda$  para cada analito e os respectivos tempos de retenção ( $t_r$ ).

Tabela 9- Comprimentos de onda ( $\lambda$ ) e tempos de retenção ( $t_r$ ) para cada antipsicótico, quando utilizado HPLC-DAD-FLD.

<b>Analitos</b>	<b><math>\lambda</math> (nm) DAD</b>	<b><math>\lambda_{Em}</math> (nm)</b>	<b><math>\lambda_{Ex}</math> (nm)</b>	<b><math>t_r</math> (min)</b>
Risperidona	240	-	-	4,1
Olanzapina	281	-	-	5,5
Haloperidol	247	-	-	6,8
Clozapina	254	-	-	9,7
Clorpromazina	254	-	-	10,8
Pimozida	281	320	285	11,7

Fonte: Autora.

Após o estudo detalhado da fase móvel, as seguintes condições cromatográficas foram selecionadas para o método cromatográfico por HPLC-DAD-FLD:

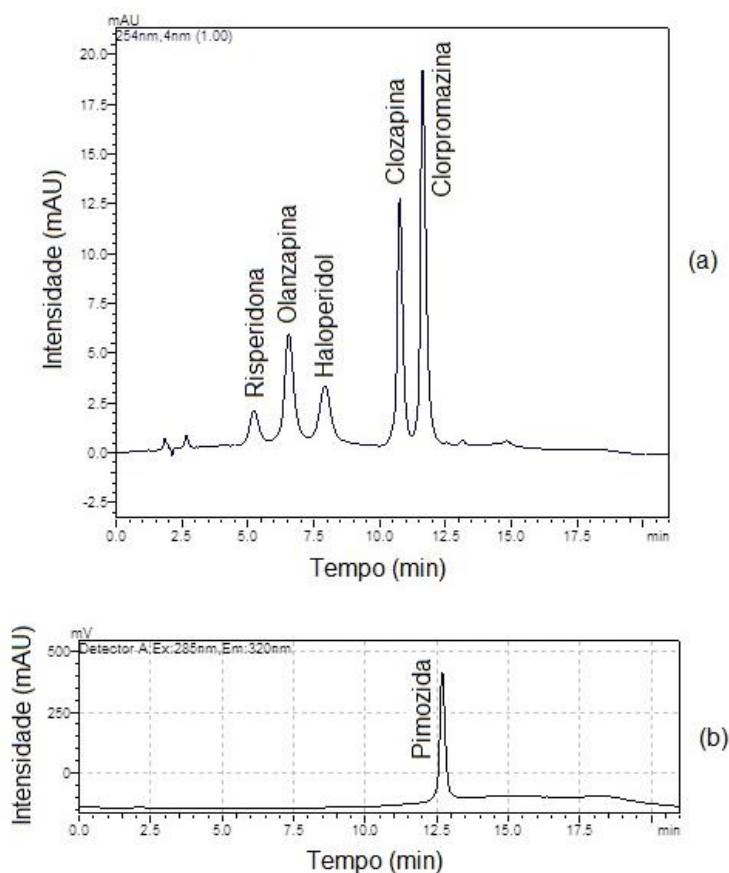


- ✓ Composição da fase móvel:  
Solução de formiato de amônio, contendo 0,01% trietanolamina (A) e acetonitrila (B);
- ✓ Proporção inicial da fase móvel: 40:60 (v/v); pH da solução de formiato de amônio: 7,3;
- ✓ Concentração da solução de formiato de amônio: 40 mmol L<sup>-1</sup>;
- ✓ Vazão da fase móvel: 0,8 mL min<sup>-1</sup>;
- ✓ Modo de eluição: gradiente;
- ✓ Gradiente da fase móvel: iniciou com 40% de B e permaneceu constante por 2 min. Em seguida, aumentou linearmente para 65% em 6 min e permaneceu constante por 5 min. Posteriormente, a condição inicial foi retomada e permaneceu constante por min para reequilíbrio da coluna cromatográfica;
- ✓ Volume da injeção: 20 µL;
- ✓ Temperatura do forno da coluna cromatográfica: 40 °C;
- ✓ Tempo total da análise cromatográfica: 21 min;
- ✓ Para a detecção dos analitos clozapina, clorpromazina, risperidona, haloperidol e olanzapina, utilizou-se o detector DAD e para a pimozida, utilizou-se o detector FLD (Tabela 9).

A Figura 10 apresenta os cromatogramas obtidos após análise de uma solução preparada em solvente orgânico acetonitrila, na concentração de 4,8 mg L<sup>-1</sup> para risperidona e haloperidol; 2,4 mg L<sup>-1</sup> para olanzapina, clozapina e haloperidol e 0,6 mg L<sup>-1</sup> para pimozida (antipsicóticos foram divididos em três grupos de acordo com suas detectabilidades).

O método cromatográfico estabelecido para o HPLC-DAD-FLD foi utilizado nos estudos da otimização e validação dos procedimentos de extração. No entanto, devido à menores limites de quantificação, o estudo para a determinação dos antipsicóticos na matriz do efluente hospitalar foi conduzido somente pela técnica instrumental de LC-ESI-MS.

Figura 10 – Cromatogramas obtidos pelo DAD (a) e pelo FLD (b), após a análise da solução mistura dos antipsicóticos preparada em solvente orgânico nas concentrações de 4,8 mg L<sup>-1</sup> para risperidona e haloperidol; 2,4 mg L<sup>-1</sup> para olanzapina, clozapina e clorpromazina e 0,6 mg L<sup>-1</sup> para pimozida .



Fonte: *Software* LC-Solution.

#### 4.1.2 Método cromatográfico empregando LC-ESI-MS

Para o método cromatográfico empregando a técnica instrumental de LC-ESI-MS, as condições cromatográficas também foram otimizadas tomando-se como base alguns métodos que avaliaram resíduos de antipsicóticos em amostras de efluentes urbanos e hospitalares (YUAN et al., 2013; BOROVA et al., 2014).

Inicialmente, foram avaliados os solventes para a composição da fase móvel. Como componentes da fase orgânica, avaliou-se os solventes metanol e acetonitrila

e como componente da fase aquosa foram avaliadas água ultrapura (com e sem acidificação) e solução de formiato de amônio 5 mmol L<sup>-1</sup> (com e sem acidificação). Por meio dos testes feitos, foi possível verificar que a composição mais adequada da fase móvel para a separação dos analitos selecionados foi acetonitrila e água ultrapura, ambos acidificados com ácido fórmico (0,1%).

Na sequência, procedeu-se avaliando a proporção dos constituintes da fase móvel, a vazão da fase móvel (0,2; 0,3 e 0,4 mL min<sup>-1</sup>), modo de eluição (isocrático e gradiente) e a temperatura do forno da coluna cromatográfica (30, 35 e 40 °C). A seguir estão descritas as condições cromatográficas estabelecidas para o método empregando LC-ESI-MS:

✓ Composição da fase móvel:

Água ultrapura, contendo 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila, contendo 0,1% de ácido fórmico (B);

✓ Proporção inicial da fase móvel: 10:90 (v/v);

✓ Vazão da fase móvel: 0,33 mL min<sup>-1</sup>;

✓ Modo de eluição: gradiente;

✓ Gradiente: iniciou com 10% de B e permaneceu constante por 1 min. Depois disso, a composição de B aumenta linearmente para 75% de em 8 min e essas condições são mantidas constantes por 1 min, e finalmente as condições iniciais são alcançadas e permanecem constantes por 4,5 min para reequilíbrio da coluna.

✓ Volume da injeção: 10 µL;

✓ Temperatura do forno da coluna cromatográfica: 35 °C;

✓ Tempo total da análise cromatográfica: 15 min;

Espectrômetro de massas

✓ Fonte de ionização: *Eletrospray* (ESI), modo positivo;

✓ Modo SIM (selected ion monitoring);

✓ Temperatura da interface: 350 °C;

✓ Temperatura do gás de dessolvatação: 250 °C;

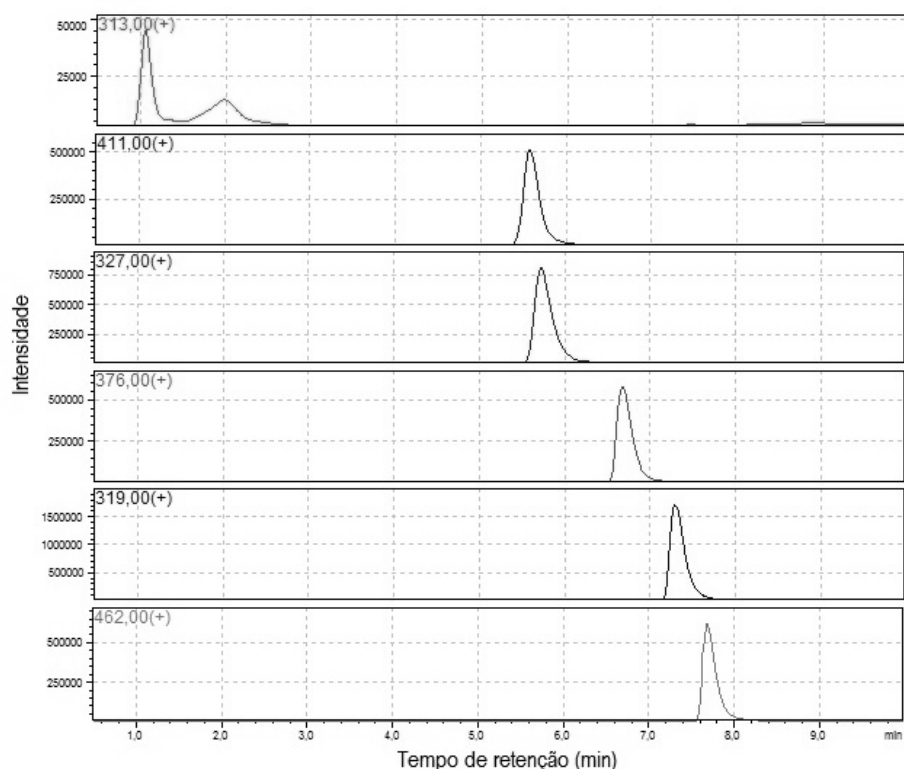
✓ Vazão do gás de dessolvatação: 10 L min<sup>-1</sup>;

✓ Vazão do gás de nebulização: 1,5 L min<sup>-1</sup>;

- ✓ As razões  $m/z$  para olanzapina, clozapina, clorpromazina, haloperidol, risperidona e pimozida foram 313, 327, 319, 376, 411 and 462, respectivamente.

O cromatograma apresentado na Figura 11, demonstra o perfil cromatográfico para os analitos estudados, quando utilizado o método empregando LC-ESI-MS.

Figura 11 – Cromatogramas obtidos pelo LC-ESI-MS após a análise da solução mistura dos antipsicóticos preparadas em metanol, na concentração de  $375 \mu\text{g L}^{-1}$ .



Fonte: *Software* LC-Solution.

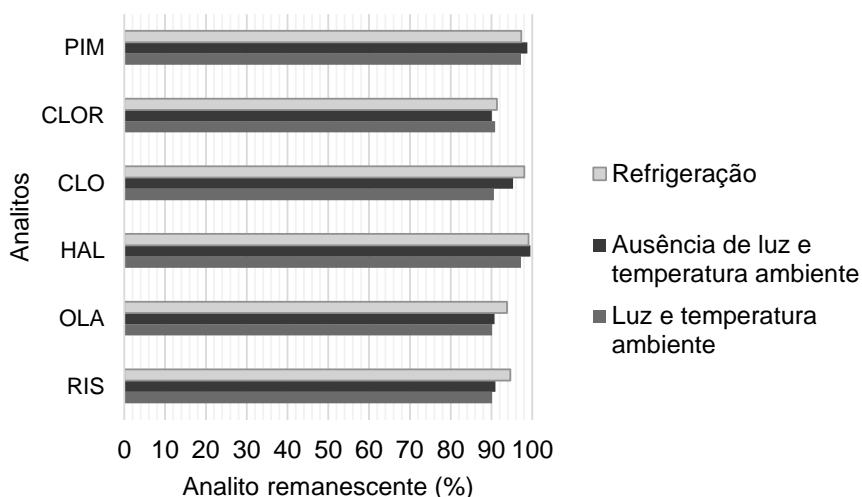
## 4.2 ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

Ao efetuar o estudo da estabilidade dos analitos em diferentes condições ambientais no período de 12 meses, foi possível perceber que todos os analitos são estáveis à temperatura ambiente e à presença de luz, uma vez que a redução da área do sinal analítico foi de no máximo 9,85% para todos os analitos, estando

estes valores em concordância ao valor estabelecido pelo SANTE (SANTE, 2018). Embora a diferença seja pequena, também é possível perceber que a maioria dos analitos apresentou maior estabilidade quando estocada sob refrigeração, o que já era esperado (Figura 12).

A estabilidade das soluções analíticas deve ser avaliada de modo a reproduzir as condições reais do armazenamento, manuseio e análise dos analitos nas soluções preparadas em solvente orgânico (ALBANO; RODRIGUEZ, 2009). Para que uma solução padrão seja considerada estável, poderá ser observado até 10% de redução no sinal analítico, em relação a uma solução recém preparada (SANTE, 2018).

Figura 12 – Redução (%) do sinal analítico dos antipsicóticos em diferentes condições de armazenamento, no período de 12 meses (março/2015 até março/2016).



Fonte: Autora.

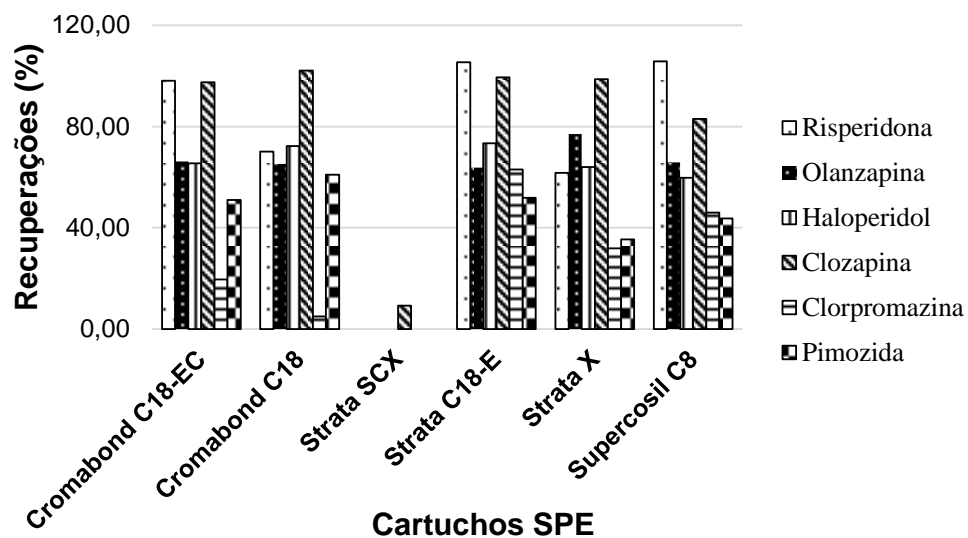
### 4.3 ESTUDO DOS PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO

#### 4.3.1 Otimização da SPE

A otimização do procedimento da SPE, iniciou-se pela escolha do sorbente mais adequado para a extração dos analitos. Seis diferentes sorbentes foram estudados univariadamente, sendo que o procedimento padrão foi realizado conforme descrito no item 3.9.1. Com esta metodologia, os analitos foram extraídos da matiz e pré-concentrados 100 vezes.

Como apresentado pela Figura 13, pode-se perceber que as recuperações médias para risperidona, clozapina e pimozida, quando utilizado cartuchos Chromabond C18-EC, Strata C18-E e Supercosil C8, foram semelhantes. No entanto, o cartucho Strata C18-E proporcionou a maior taxa de recuperação para clorpromazina e provou ser o mais barato. Tais fatores foram considerados ao escolher os cartuchos de SPE.

Figura 13 – Seleção do cartucho de SPE.



Fonte: Autora.

O principal mecanismo em sorvente apolares, como C18-E, é por força de van der Waals, porém interações secundárias como ligações dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio também podem ocorrer. Desta forma, os analitos devem estar, principalmente, na forma não ionizada (Hennion 1999).

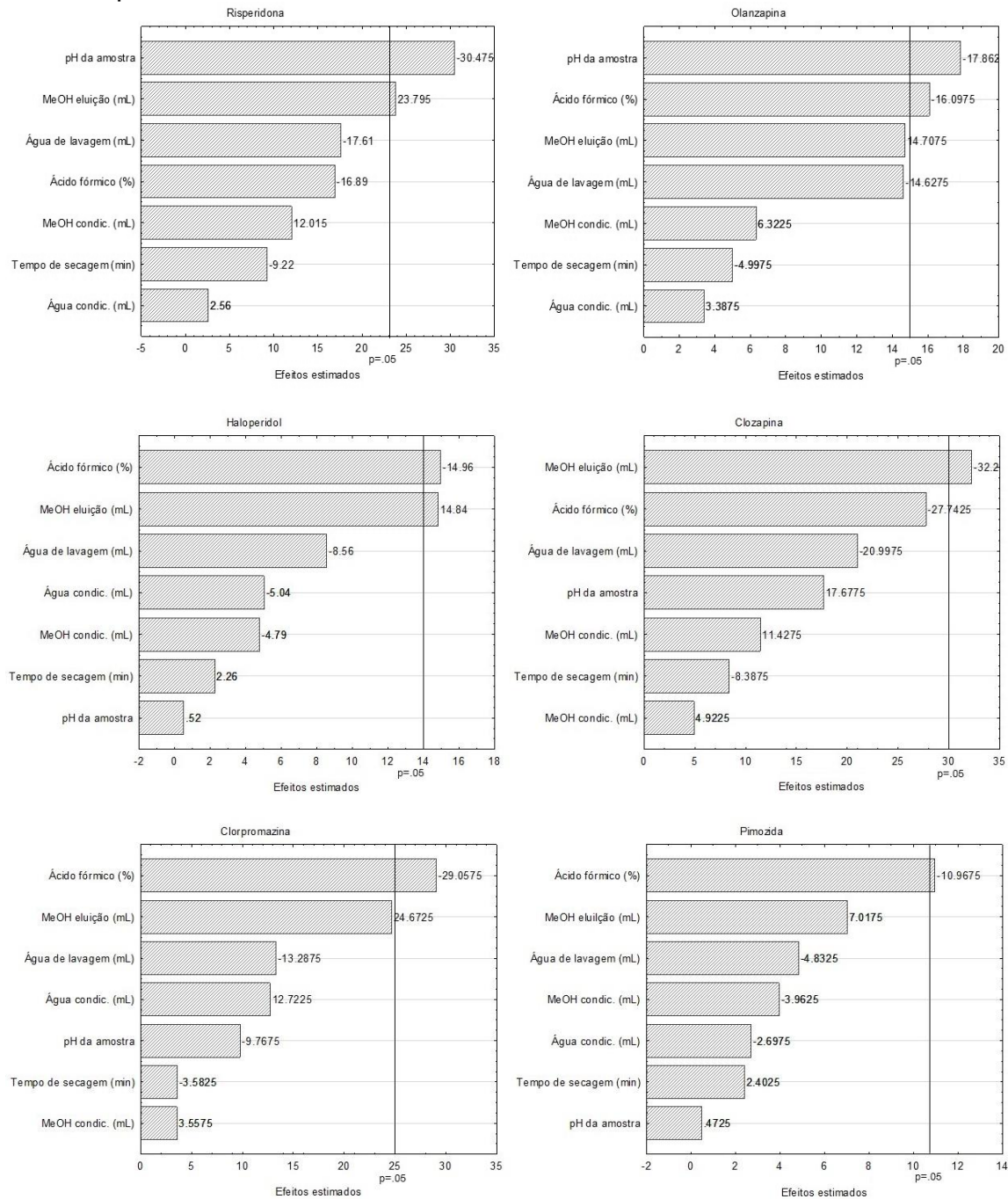
Após a seleção do cartucho, um planejamento fracionado (Plackett & Burman de 12 ensaios) foi utilizado para verificar quais variáveis apresentam maior influência na extração dos antipsicóticos estudados através do procedimento de SPE. Como pode ser visto na Figura 14, o volume de metanol na etapa de eluição apresentou efeito significativo para quatro analitos, a presença de ácido fórmico no metanol utilizado para eluição também foi significativa para cinco analitos, o pH da amostra para dois analitos e a água de lavagem embora não tenha apresentado efeito significativo para os analitos, esteve entre os quatro parâmetros que forneceram maiores efeitos, para todos analitos.

Posteriormente, um planejamento DCCR foi aplicado para encontrar as quantidades adequadas para cada variável pré-selecionada (matriz do planejamento encontra-se no item 3.9.2). Na Figura 15 é possível verificar quais variáveis apresentaram efeitos significativos no procedimento de extração por SPE.

A ANOVA revela os modelos que descrevem as respostas dos antipsicóticos em função das variáveis investigadas, considerando os parâmetros estatisticamente significativos. Os valores dos  $r^2$  asseguram que de 55,9% a 81,3% dos resultados gerados são explicados pelo modelo matemático. Observou-se, ainda, que o valor de F calculado é maior que o valor de F tabelado a um nível de confiança de 95%. Desta forma, pode-se assegurar que o referido modelo ofereceu significância estatística e satisfaz os requisitos para a construção das superfícies de resposta e curvas de contorno.

As condições otimizadas no CCRD podem ser vistas no gráfico de desejabilidade (Figura 16).

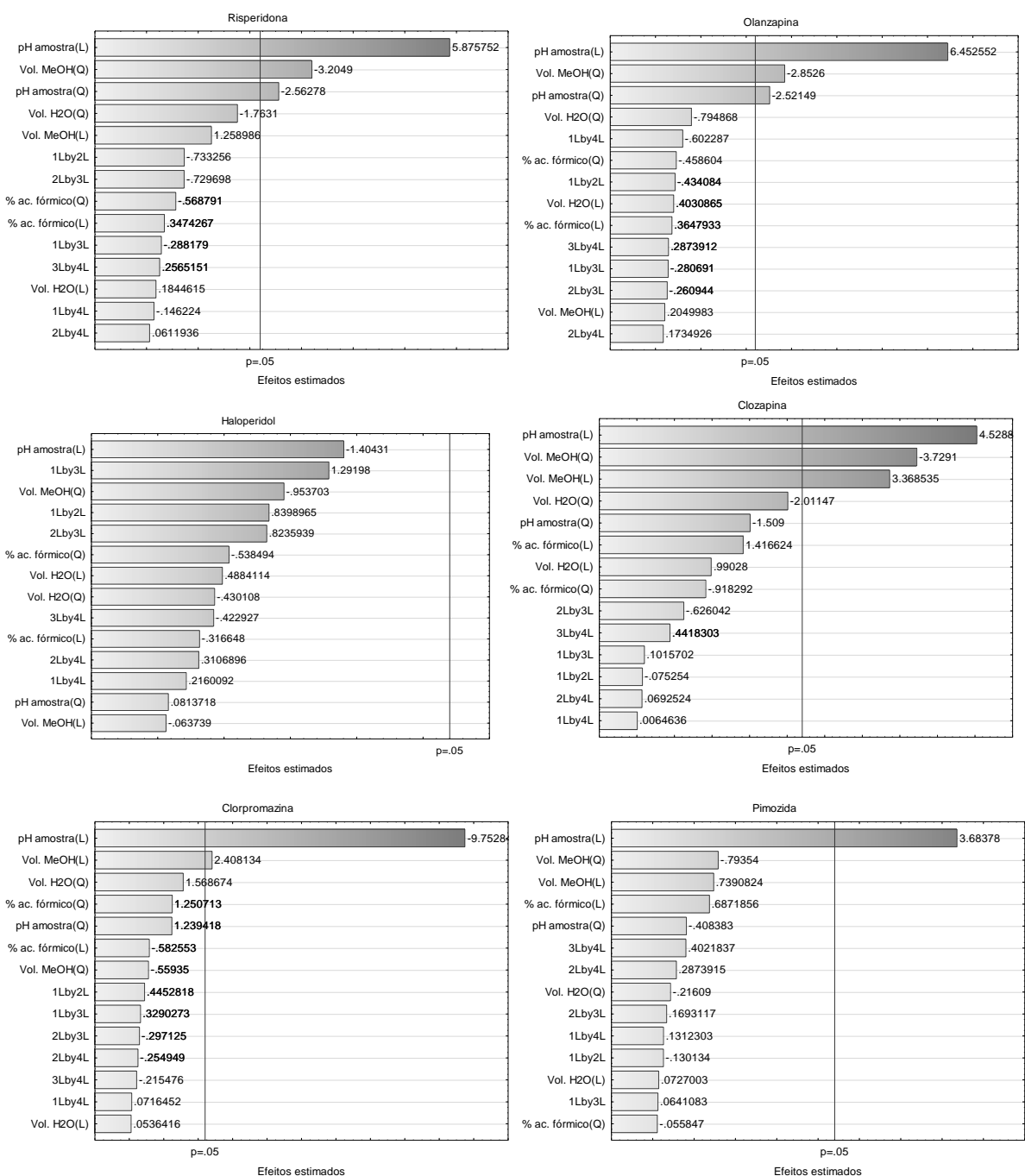
Figura 14 – Diagramas de Pareto mostrando as variáveis com efeitos significativos na SPE, para cada analito.



Fonte: *Software Statistica*.

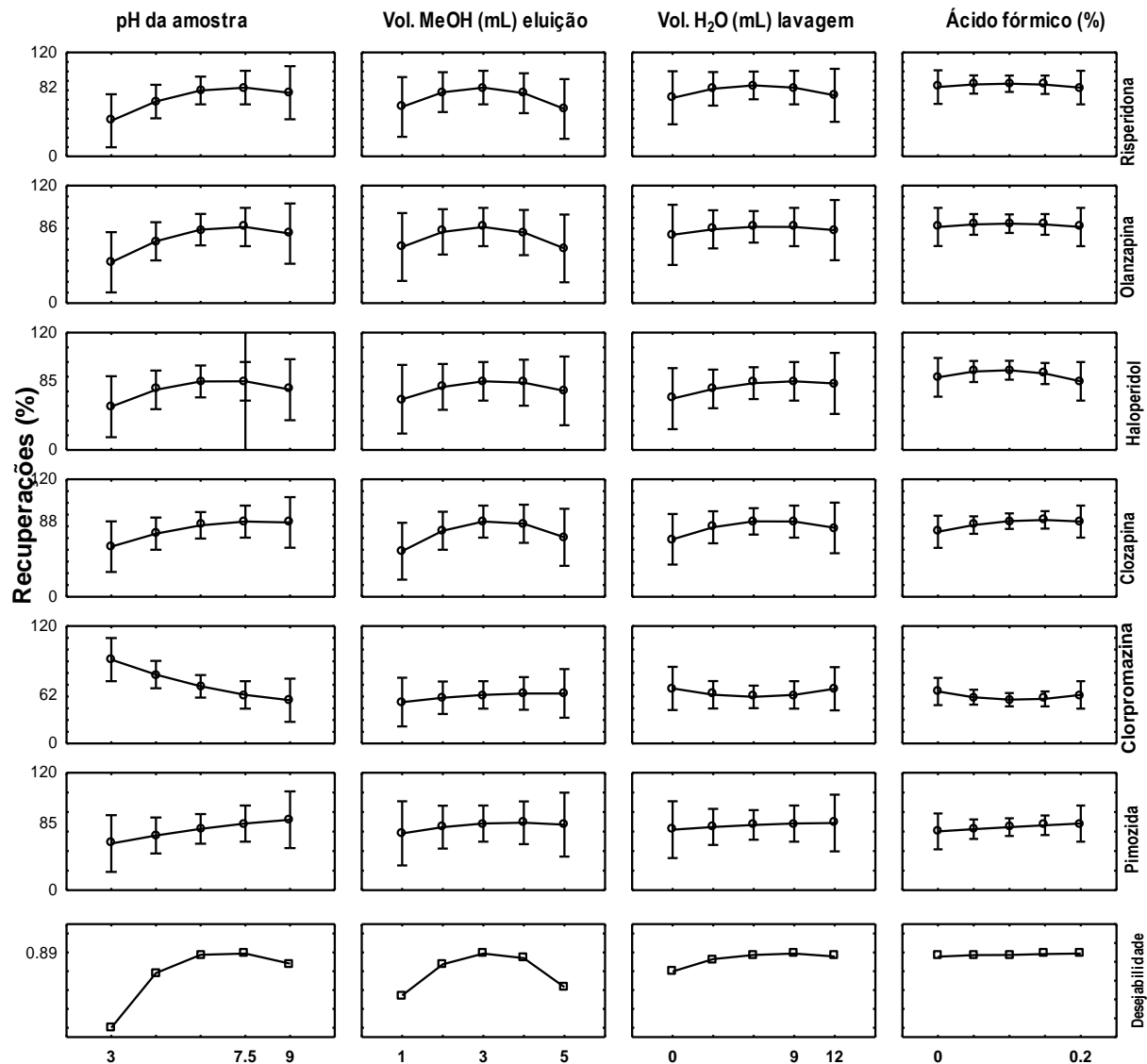


Figura 15 – Efeitos estimados através dos diagramas de Pareto para o planejamento DCCR no procedimento SPE.



Fonte: Software Statistica.

Figura 16 – Perfil das variáveis independentes (pH da amostra, volume de metanol para eluição, volume de água para lavagem e % de ácido fórmico no metanol para eluição) relacionados à desejabilidade da recuperação dos antipsicóticos por SPE.



Fonte: *Software* Statistica.

Através dos planejamentos multivariados, de modo geral, foi possível perceber que os antipsicóticos avaliados foram melhores se extraídos quando o pH do meio foi ajustado para próximo à neutro, com exceção da clorpromazina, que é melhor se extraída em condição ácida. No entanto, priorizou-se à escolha de uma

condição que extraia a maior quantidade de analitos simultaneamente, selecionando-se o pH da amostra 7,5, uma vez que cinco dos seis analitos responderam bem à essa condição.

Yuan e colaboradores usaram SPE com cartuchos HLB Oasis para extrair risperidona, olanzapina, clozapina e clorpromazina de efluentes hospitalares e urbanos, e obtiveram resultados semelhantes. O pH da amostra foi ajustado para 7,0 e as taxas de recuperação para procedimentos otimizados foram de 63-82% para risperidona, 65-70% para olanzapina, 99-112% para clozapina e 68-72% para clorpromazina (YUAN et al., 2013).

Outro fator importante no procedimento de extração por SPE é o condicionamento do sorbente, já que este é um fator determinante para a retenção dos analitos. Assim, para uma melhor ativação do sorbente, a primeira etapa do condicionamento foi conduzido com metanol, solvente polar, e, na sequência, água ultrapura, em ordem crescente de polaridade. As quantidades de metanol e água na etapa de condicionamento dos sorbentes foram avaliados, entretanto não apresentaram influência na extração, sendo assim, para o condicionamento utilizou-se 5 mL (2x) de metanol e 5 mL (2x) de água ultrapura pH 7,0.

Para a etapa de condicionamento e de lavagem, valores de pH próximos ao pKa dos analitos demonstraram ser melhores. Desta forma, para essas duas etapas da SPE, utilizou-se água ultrapura com pH ajustado à 7,0 e para a etapa de lavagem escolheu-se o volume de 5 mL de água, já que esta condição respondeu bem à todos analitos.

Como pode-se observar na Figura 16, o gráfico de desejabilidade demonstra que os volumes ótimos de metanol para etapa de eluição dos analitos foram na faixa de 3 e 4 mL, sendo escolhido o volume de 4 mL.

Outro parâmetro estudado foi a presença de ácido fórmico no metanol utilizado para eluição dos compostos, o qual demonstrou melhores resultados em volumes menores.

#### 4.3.1.1 Metodologia proposta para SPE

As condições estabelecidas para o procedimento SPE, consistem em condicionar os sorbentes do cartucho Strata C18-E com 5 mL de metanol (2x) e 5 mL de água ultrapura (pH 7,0) (2x). Após a etapa de condicionamento, alíquotas de 100 mL de efluente hospitalar (pH ajustado a 7,5 com HCl ou NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>) foram passadas através dos cartuchos. Em seguida, os cartuchos foram lavados com 5 mL de água ultrapura (pH 7,0) e subsequentemente secos sob vácuo durante 5 min. Os analitos foram eluídos com 1 mL de metanol (4x) e o solvente foi evaporado até a secura sob fluxo de N<sub>2</sub> e a temperatura mantida a 40 °C. Em seguida, os extratos foram reconstituídos em 1 mL de metanol, seguido por agitação (vórtex) durante 1 min e analisados pelas técnicas instrumentais de HPLC-DAD-FLD e LC-ESI-MS.

#### 4.3.2 Otimização da DLLME

A otimização de parâmetros experimentais é uma etapa crítica no desenvolvimento de trabalhos analíticos. Neste sentido, o planejamento experimental multivariado torna-se uma importante ferramenta, sendo possível obter-se o desempenho máximo nas condições em que um procedimento é desenvolvido (PERALTA-ZAMORA; MORAIS; NAGATA, 2005; BEZERRA et al., 2008).

Alguns tipos de planejamento multivariado são utilizados de modo a realizar uma varredura e, assim, investigar quais fatores apresentam efeitos significativos. Posteriormente, planejamentos completos e mais complexos podem ser aplicados para encontrar as condições ótimas de operação (TARLEY et al., 2009).

No presente estudo, a metodologia de DLLME foi otimizada como descrito no item 3.9.1. Para a determinação dos parâmetros que afetam cada variável, utilizou-se a análise de variância (ANOVA).

Para o planejamento DCCR, os valores de  $r^2$  asseguram que 90% (para haloperidol, clozapina e olanzapina), 85% (para risperidona), 70% (clorpromazina) e

65% (pimozida) dos resultados gerados, são explicados pelo modelo matemático obtido, uma vez que o F calculado foi significativo ( $p < 0,05$ ).

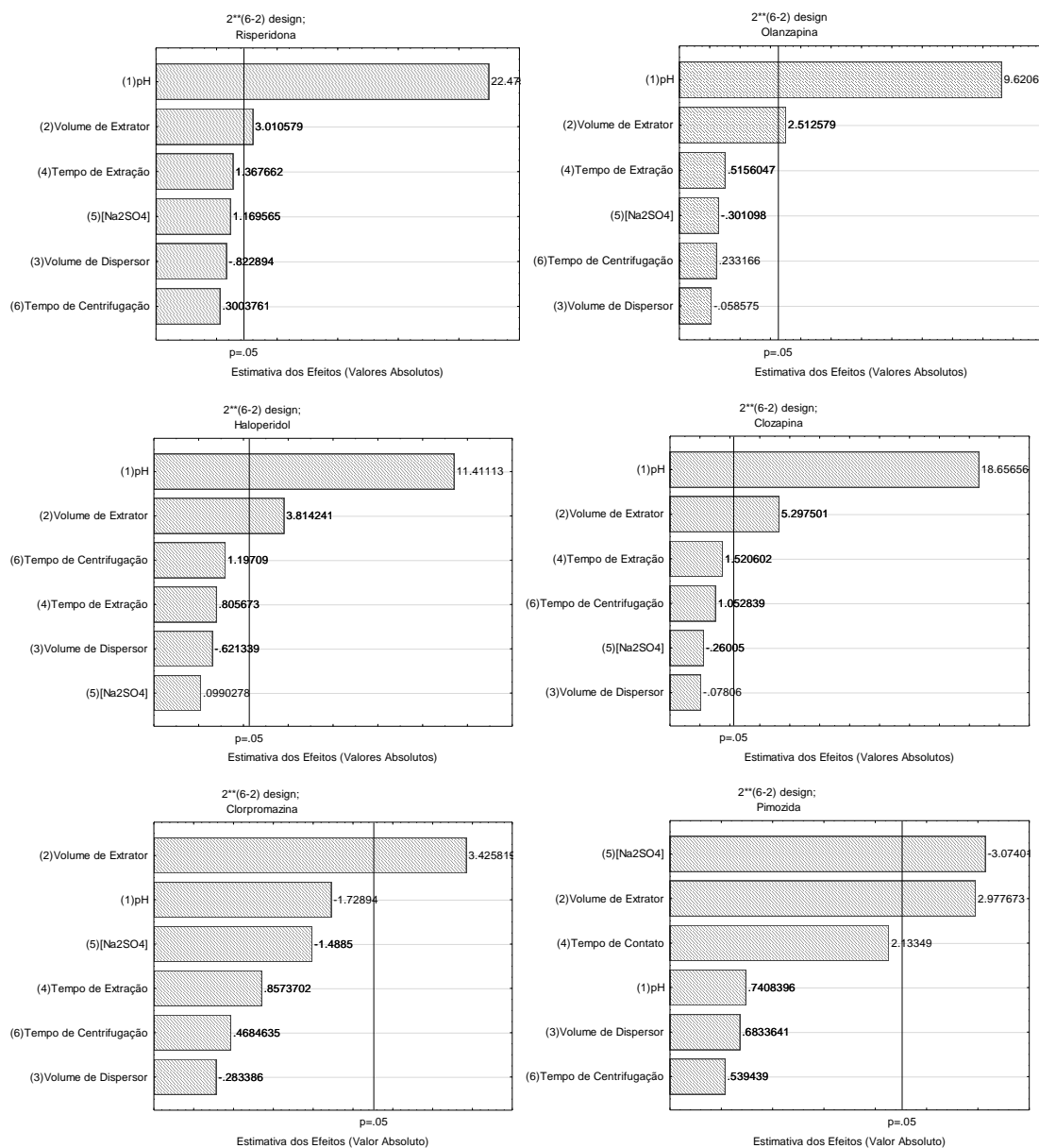
Após otimizar a metodologia, as condições mais adequadas e, que contemplam a maioria dos analitos foram aplicadas. Além de extrair os analitos, o procedimento proposto para DLLME também permite concentrar os analitos 100 vezes, assim como a SPE.

Na Figura 17 e Figura 18, encontram-se os resultados obtidos após a aplicação dos planejamentos experimentais fracionado e completo, respectivamente. Pode-se perceber que quando utilizado o planejamento fracionado, o pH é a variável que apresenta maior influência para quatro dos seis analitos estudados, o volume de solvente extrator e a concentração de sal apresentaram maiores efeitos somente para a extração de clorpromazina e pimozida, respectivamente. Ainda, através da Figura 17, é possível constatar que os valores de pH e o volume de solvente extrator apresentam maior tendência para valores mais altos. Por outro lado, a concentração de sal requer valores menores.

O planejamento completo (Figura 18) nos fornece informações adicionais, ou seja, além da avaliação individual dos fatores ele também demonstra os efeitos mais complexos quando combinados dois fatores diferentes.

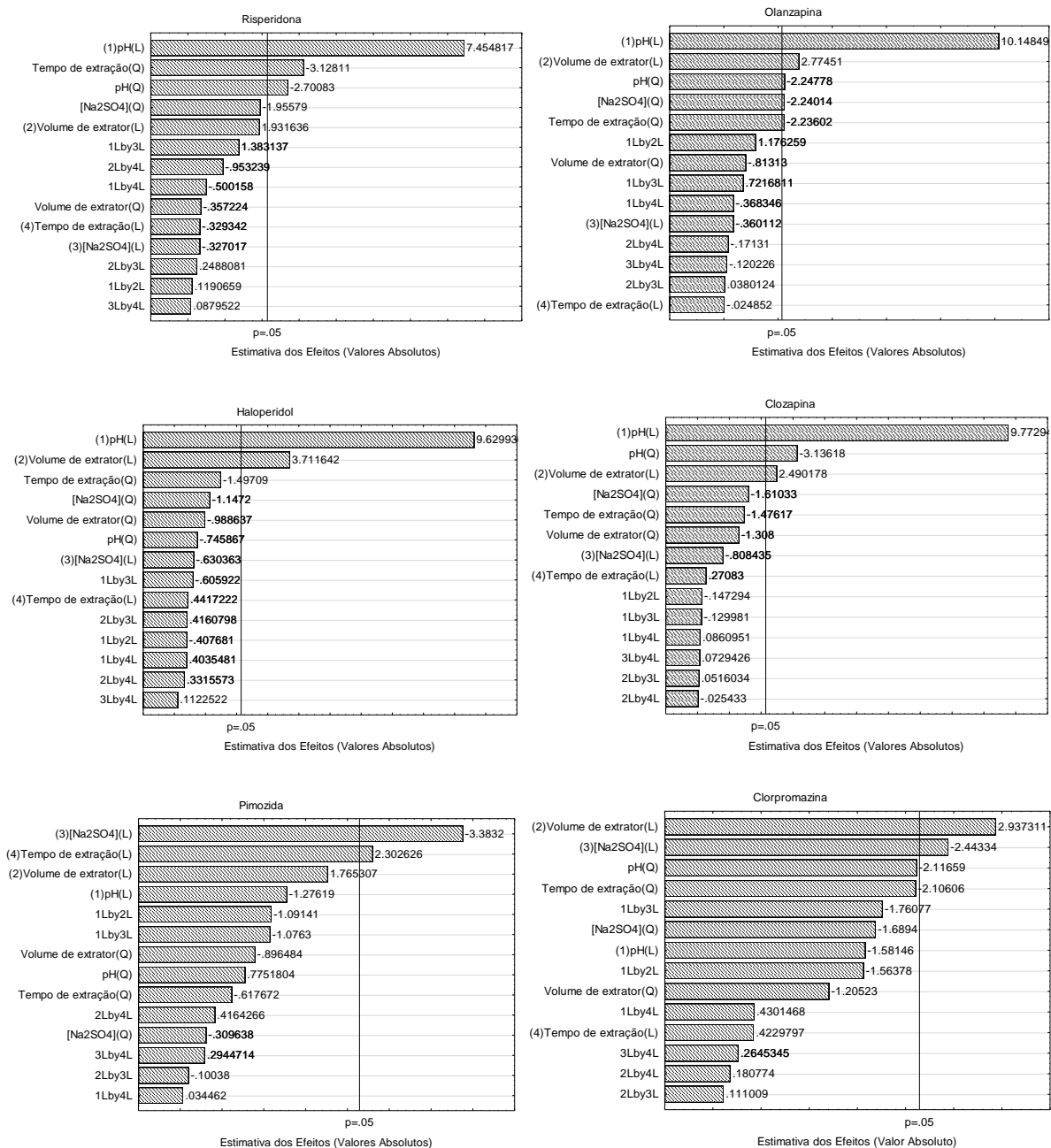
Para estabelecer as condições finais do procedimento de extração DLLME, utilizaram-se os perfis das variáveis independentes em função da desejabilidade (Figura 19), para valores mínimo (0%) e máximo (120%) de recuperação de para cada analito.

Figura 17 –Diagramas de Pareto mostrando as variáveis com efeitos significativos na DLLME, para cada analito.



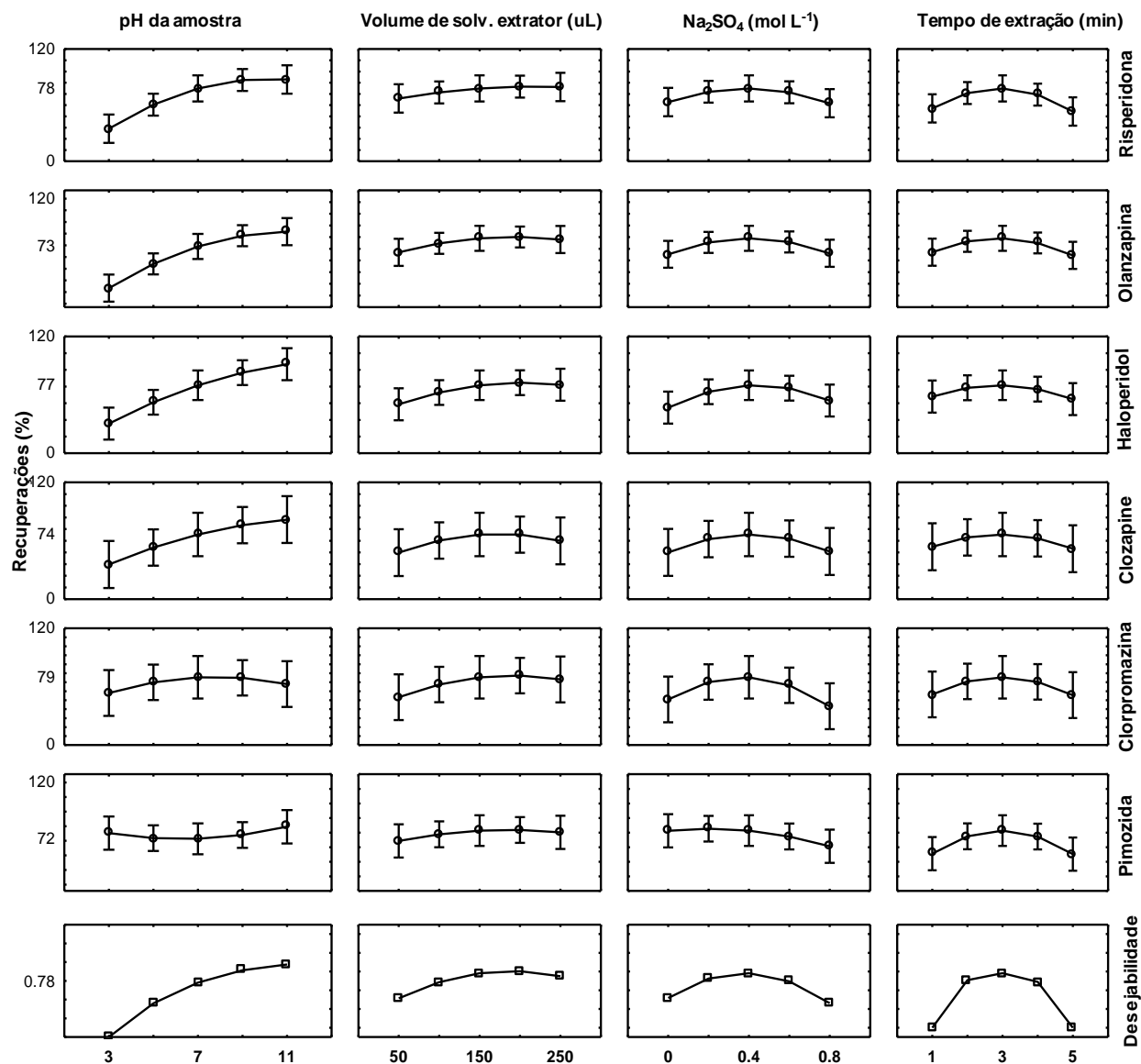
Fonte: *Software Statistica*.

Figura 18 – Diagramas de Pareto mostrando as variáveis estudadas no procedimento de DLLME, através do planejamento DCCR.



Fonte: Software Statistica.

Figura 19 – Perfil das variáveis independentes (pH da amostra, volume de solvente extrator, força iônica e tempo de extração) relacionados à deseabilidade da recuperação dos antipsicóticos por DLLME.



Fonte: *Software* Statistica.

Na literatura foi encontrado somente um estudo que utiliza a DLLME para extração do antipsicótico haloperidol em matriz ambiental. Devido à escassez de estudos que fazem o uso deste procedimento de microextração, decidiu-se realizar



uma discussão detalhada sobre cada variável estudada na DLLME para extração de antipsicóticos em matriz de efluente hospitalar.

#### **4.3.2.1 Avaliação do solvente extrator**

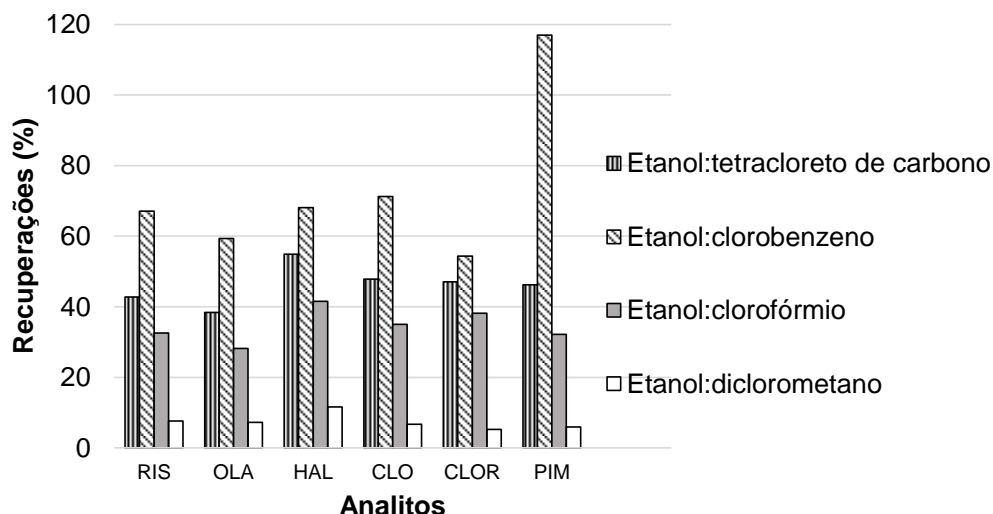
O solvente extrator deve ser escolhido com base na densidade, capacidade de extração dos analitos e adequação à técnica instrumental utilizada (REZAEI et al., 2006). Outras características importantes que o solvente extrator deve apresentar, é densidade maior que da água a fim de garantir a formação da fase sedimentada e também a baixa solubilidade em água de modo a permitir a separação adequada fase orgânica (REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010).

Nos testes prévios (univariados), foram avaliados diferentes solventes extratores, conforme descrito no item 3.9.2. Na Figura 20 estão apresentados os resultados obtidos para cada analito, em termos de recuperação (%), frente aos diferentes solventes extratores avaliados. Os solventes que apresentaram os melhores resultados foram clorobenzeno, tetracloreto de carbono e clorofórmio. Para o diclorometano, as recuperações foram consideravelmente baixas, ainda alguns dos solventes extratores testados (undecanol, acetato de etila, tolueno e hexano) não formaram a fase sedimentada e por isso não estão demonstrados na Figura 20.

Posteriormente, foram utilizados os melhores resultados obtidos através dos testes prévios univariados para a aplicação de um planejamento qualitativo para a escolha dos solventes extrator e dispersor, modo de agitação e sal mais adequados, levando-se em consideração aqueles que apresentaram as melhores respostas univariadamente.

Dentre os três solventes avaliados, o clorobenzeno proporcionou os melhores valores de recuperações para quatro dos seis analitos e para pimozida e clorpromazina o tetracloreto de carbono apresentou-se como melhor solvente extrator (Apêndice B).

Figura 20 – Efeito dos solventes extratores na recuperação dos antipsicóticos.



Fonte: Autora.

Conforme indicado pela *Occupational Safety and Health Administration* (OSHA), a concentração máxima da substância no ar, na qual um trabalhador pode ficar exposto durante 30 min, sem causar danos irreversíveis à saúde é de 200, 500 e 1000 mg kg<sup>-1</sup> para tetracloro de carbono, clorofórmio e clorobenzeno, respectivamente (OSHA, 2016). Assim, tendo em vista o maior desempenho para a maioria dos analitos e por ser considerado o solvente que apresenta menor risco ocupacional, o clorobenzeno foi selecionado como o solvente extrator.

Após executar os ensaios para o planejamento fracionado 2<sup>6-2</sup>, foi possível verificar que o volume do solvente extrator apresenta efeito significativo na extração de todos analitos avaliados (Figura 17).

Por fim, após determinado o solvente extrator, e sabendo que este apresenta efeitos significativos na extração dos antipsicóticos, através do planejamento experimental do tipo DCCR foi possível verificar que o volume de solvente extrator mais adequado foi de 200 µL (Figura 19).

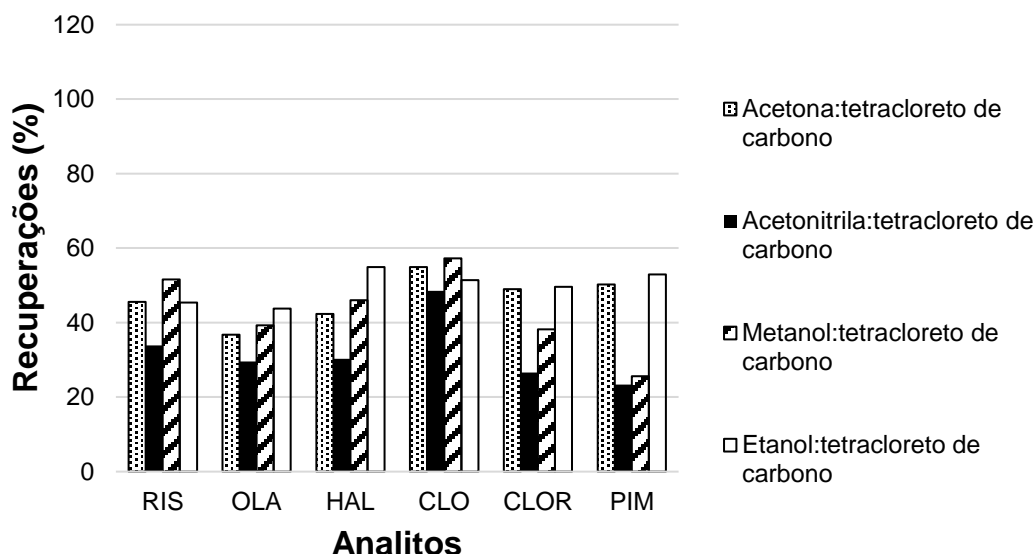
#### 4.3.2.2 Avaliação do solvente dispersor

A escolha do solvente dispersor está relacionada à solubilidade deste, tanto na fase aquosa quanto na fase orgânica. O volume de solvente dispersor é capaz de afetar diretamente a formação das microgotas, o grau de dispersão do solvente na fase aquosa e, conseqüentemente, a eficiência da extração (REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010).

Dos solventes dispersores avaliados (Figura 21), o etanol apresentou os melhores resultados para cinco analitos (Apêndice B). Além de ser produzido no Brasil, o etanol é produzido a partir de fontes renováveis, seu uso é ambientalmente correto, pode substituir solventes considerados tóxicos e seu custo/litro é menor quando comparado ao custo do metanol e acetona. Estes fatores, juntamente com o bom desempenho do etanol para a extração dos analitos, contribui de forma positiva para a escolha deste solvente como dispersor.

O volume de etanol foi estudado no planejamento fracionado, e como pode ser observado na Figura 17, o volume de solvente dispersor não apresentou efeito significativo para as extrações dos analitos. Assim, o volume deste solvente foi estabelecido em 450  $\mu$ L para ser utilizado nos demais planejamentos experimentais.

Figura 21 – Efeitos de diferentes solventes dispersores na recuperação dos antipsicóticos.



Fonte: Autora.

#### 4.3.2.3 Avaliação da adição de sal

Em procedimentos experimentais onde a extração dos compostos é baseada na partição entre uma fase aquosa e uma fase orgânica, a adição de sal pode aumentar a eficiência de extração dos compostos pela fase orgânica. Isso ocorre, por que quando o sal é adicionado à solução, as moléculas de água formam uma esfera de hidratação ao redor da molécula iônica de sal, de modo a reduzir a quantidade de água disponível para dissolver os analitos, e favorecendo assim, a extração dos mesmos pela fase orgânica. A esse efeito dá-se o nome de efeito *salting out* o qual é observado, preferencialmente para analitos com alta polaridade (MOREIRA; YOKOYA; GAITANI, 2014).

De modo geral, presença de sal proporcionou resultados melhores do que quando comparado sem a adição de sal. Para quatro analitos a adição de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  forneceu os melhores resultados, enquanto que para os outros dois analitos a adição de  $\text{NaCl}$  promoveu os melhores resultados (Apêndice B). Assim, selecionou-

se o  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  devido à este proporcionar os resultados superiores em termos de recuperação % para a maioria dos analitos

A etapa seguinte consistiu em aplicar o planejamento fracionado para examinar a influência da concentração de sal sobre a DLLME. Para isso, a extração foi realizada na presença de diferentes concentrações de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

A adição de sal apresentou efeito significativo somente para a extração da pimozida, e foi um dos parâmetros avaliados no DCCR, onde apresentou efeitos significativos para três analitos (olanzapina, pimozida e clorpromazina). Através da Figura 19, é possível perceber que para a maioria dos analitos a concentração de  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ , demonstra ser a concentração mais apropriada.

#### **4.3.2.4 Avaliação da etapa de agitação**

A agitação pode melhorar a extração dos analitos, devido ao aumento da interação do solvente extrator com a amostra.

Os resultados foram muito semelhantes quando utilizada agitação com o vórtex e na ausência de agitação (Apêndice B). Para dois analitos o ultrassom forneceu melhores resultados, enquanto que para os outros quatro analitos agitação por ultrassom apresentou a tendência de diminuir as recuperações. Assim, para as etapas seguintes, selecionou-se o modo sem agitação.

#### **4.3.2.5 Avaliação da pH da amostra**

Na DLLME, para a extração de compostos de caráter básico, manter o pH da amostra acima do valor do  $\text{pK}_a$  dos analitos pode melhorar a eficiência da extração, pois nesta condição, os analitos encontram-se presentes na forma não ionizada e podem ser transferidos para a fase orgânica mais facilmente (MOREIRA; YOKOYA; GAITANI, 2014; BAZREGAR et al., 2016).

O pH da amostra foi um dos fatores avaliado no planejamento fracionado. De acordo com a Figura 17, para quatro dos analitos avaliados, o pH da amostra foi a variável que apresentou efeitos mais significativos. Assim, este fator foi avaliado no

planejamento DCCR, e como demonstrado na Figura 18, esta variável requer valores mais elevados de pH, sendo assim, no procedimento estabelecido, o pH das amostras foi ajustado a 10,5.

#### **4.3.2.6 Avaliação do tempo de extração**

Na DLLME, o tempo de extração é definido como o intervalo de tempo entre a adição da mistura de solventes extrator e dispersor até iniciar a centrifugação (REZAEI et al., 2006).

A grande área superficial entre o solvente de extração e a fase aquosa (amostra), proporciona a rápida transferência dos analitos para a fase orgânica e o estado de equilíbrio é atingido com rapidez, o que resulta em tempos de extração curtos comparados à outras metodologias de extração.

Embora o tempo de extração não tenha apresentado efeito significativo para os analitos (Figura 17), este parâmetro foi inserido no planejamento DCCR, já que para todos analitos esteve entre os quatro fatores que apresentaram maiores influências na extração. Na Figura 19, pode-se perceber que o tempo de extração mais adequado para a extração dos analitos simultaneamente é de 3 min.

#### **4.3.2.7 Avaliação do tempo de centrifugação**

Tempos de centrifugação muito curtos podem não ser suficientes para depositar totalmente as microgotas no fundo do frasco, por outro lado, tempos muito elevados podem não fazer diferença na extração. De acordo com a Figura 17, o tempo de centrifugação não apresentou influência significativa para nenhum dos analitos estudados. Assim, o tempo de centrifugação e a velocidade de rotação foram estabelecidos em 5 min e 3500 rpm, para garantir que maioria dos analitos fossem transferidos para a fase sedimentada.

#### 4.3.2.8 Metodologia proposta para a DLLME

A metodologia proposta para a DLLME, consiste em preparar uma solução 0,4 mol L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em efluente hospitalar previamente filtrado (filtro qualitativo e filtro de nitrato de celulose) e ajustar o pH desta solução a 10,5 (±0,05) com soluções de NaOH ou HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

Uma amostra de 10 mL é pipetada em um tubo de fundo cônico, e 650 µL da solução de solventes extrator e dispersor (200:450 v/v) são injetados rapidamente na amostra, posteriormente a solução é mantida em repouso durante 3 min e então levada para uma etapa de centrifugação por 5 min, a 3500 rpm.

Em seguida, a fase sedimentada é removida da solução com auxílio de uma seringa e colocada em um *vial*. A fase sedimentada é evaporada, em banho-maria e sob fluxo de N<sub>2</sub>. O resíduo remanescente é reconstituído em 100 µL de acetonitrila e levado para análise por HPLC-DAD-FLD e LC-ESI-MS.

#### 4.4 VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS DE SPE E DLLME

Após o estudo da otimização dos procedimentos de extração, procedeu-se o estudo de validação para verificar se os procedimentos estudados são adequados para a quantificação dos antipsicóticos estudados em matriz de efluente hospitalar. Inicialmente os procedimentos foram validados para a técnica instrumental de HPLC-DAD-FLD e, posteriormente, para LC-ESI-MS.

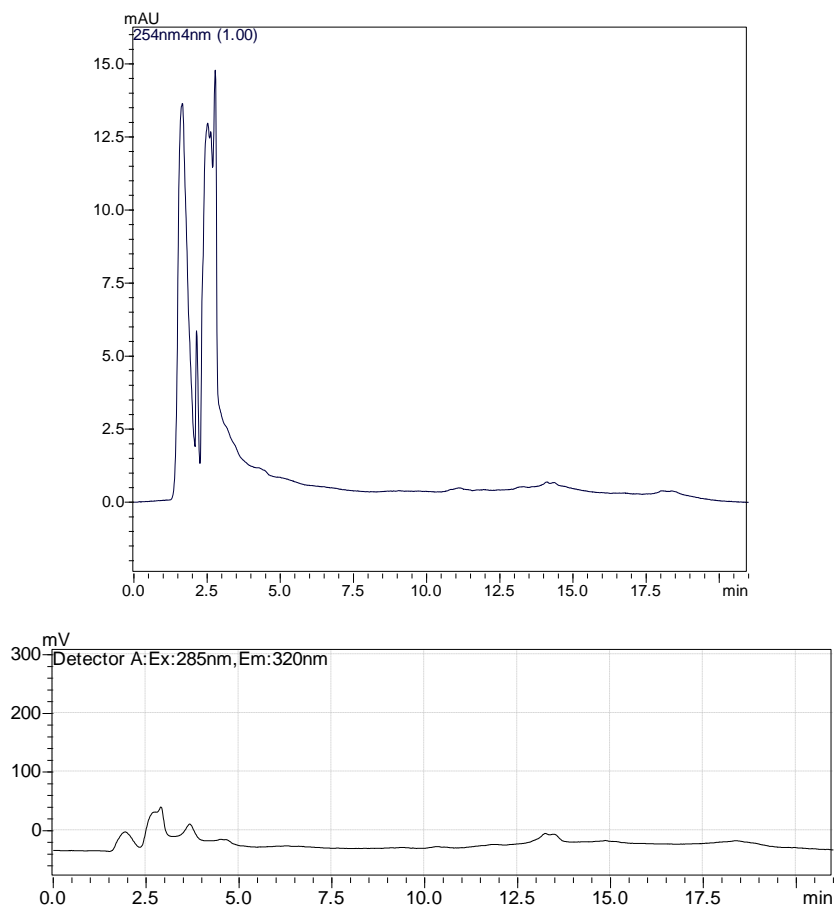
As normativas estabelecidas pelo INMETRO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2005) e SANTE (SANTE, 2018) foram utilizadas para validar os parâmetros que garantem a aplicabilidade dos métodos estudados, como seletividade, linearidade, limite de quantificação, exatidão, precisão e efeito matriz. Os resultados obtidos para os parâmetros avaliados, estão apresentados nas Tabela 10 e Tabela 11 para HPLC-DAD-FLD e LC-ESI-MS, respectivamente.

Os procedimentos são seletivos para a extração dos antipsicóticos estudados, uma vez que não foi observada co-eluição de componentes da matriz nos

tempos de retenção dos analitos. A seletividade das metodologias otimizadas podem ser constatadas através das Figura 22, Figura 23, Figura 24 e Figura 25.

Os picos cromatográficos contidos nos cromatogramas dos extratos “brancos” são referentes à co-extrativos presentes na matriz de efluente hospitalar e, apresentam tempos de retenção diferente dos antipsicóticos avaliados neste estudo, evidenciando que não é o analito. Para o extrato obtido através da DLLME e analisado por LC-ESI-MS (Figura 25) foi necessário descontar a área para o antipsicótico haloperidol, já que na amostra coletada evidenciou-se a ocorrência deste antipsicótico.

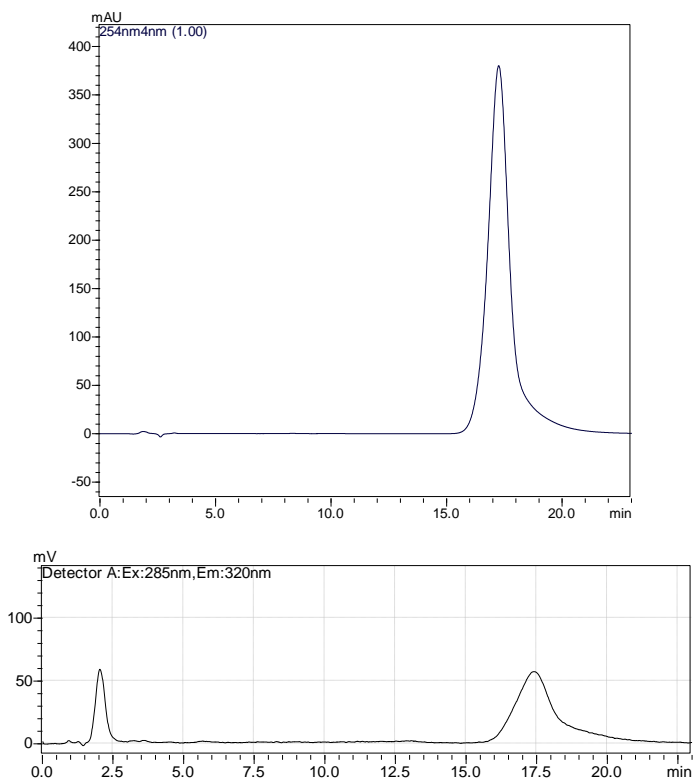
Figura 22 – Cromatograma do extrato “branco” para SPE obtido através do HPLC-DAD-FLD.



Fonte: LC-Solution.

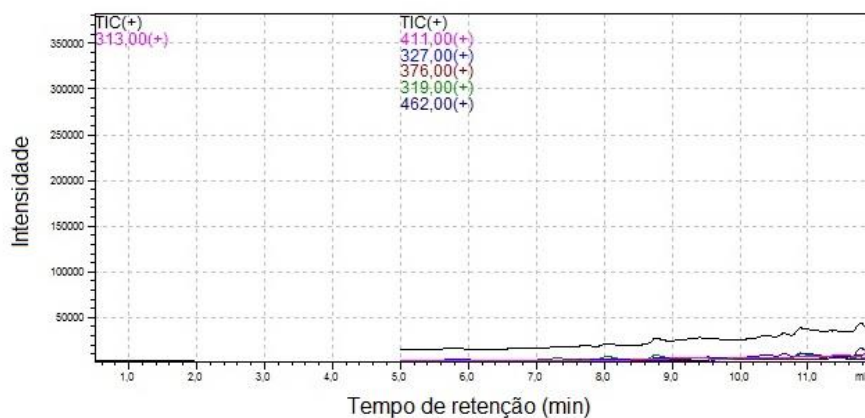


Figura 23 – Cromatograma do extrato “branco” para DLLME obtido através do HPLC-DAD-FLD.



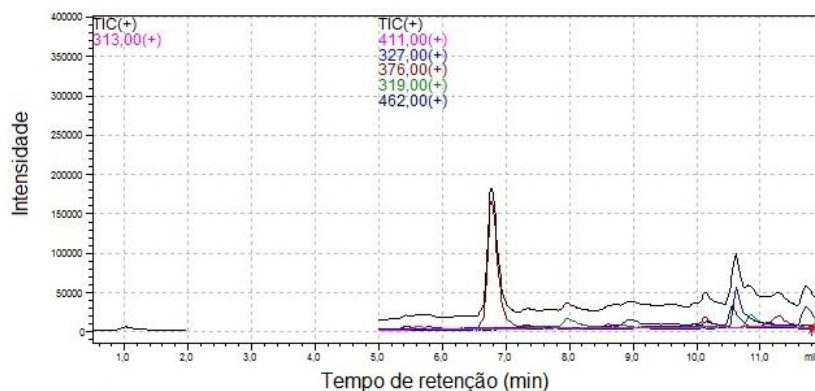
Fonte: *Software* LC-Solution.

Figura 24 – Cromatograma do extrato “branco” para SPE obtido através do LC-ESI-MS.



Fonte: *Software* LC-Solution.

Figura 25 – Cromatograma do extrato “branco” para DLLME obtido através do LC-ESI-MS.



Fonte: *Software* LC-Solution.

Ambos os procedimentos demonstraram ser lineares na faixa de concentração avaliada (0,1 a 13,5 mg L<sup>-1</sup> para HPLC-DAD-FLD e 15 a 7000 µg L<sup>-1</sup> para LC-ESI-MS), uma vez que os coeficientes de correlação ( $r^2$ ) foram superiores a 0.9815 para todos analitos.

Conforme os dados apresentados nos Apêndices C, D, E e F, pode-se garantir a aplicação segura da curva analítica para a quantificação dos analitos estudados em efluente hospitalar. Os dados experimentais obtidos no estudo da linearidade demonstraram-se normais conforme a aplicação do teste de Anderson-Darling, o qual rejeita a hipótese de normalidade quando o valor de  $p$  é inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ). Também foi possível perceber que os dados obtidos são homocedásticos, já que o valor calculado para o teste de Cochran foi inferior ao valor tabelado (0,6771), sendo a curva analítica preparada em sete pontos de concentração ( $n$ ) e três repetições ( $k$ ) para cada ponto. E através do teste de Durbin-Watson os resíduos da regressão demonstraram-se independentes ( $p > 0,05$ ).

O efeito matriz foi calculado através da comparação entre as curvas analíticas preparadas em solvente orgânico e em extrato “branco” da matriz, empregando-se a Equação 5. De maneira geral, os efeitos matriz foram mais pronunciados para o estudo da validação quando utilizado LC-ESI-MS, fato este que está de acordo com os dados reportados na literatura. De acordo com trabalhos publicados, em determinações de fármacos por LC-MS com fonte de ionização ESI, os efeitos da matriz são mais suscetíveis devido a ionização de compostos presentes na matriz estudada, ainda mais no caso de efluente hospitalar que é considerado uma matriz complexa, principalmente com alto teor de matéria orgânica e sais (BOROVA et al.. 2014; RIVERA-JAIMES et al.. 2018).

Como pode ser visto, na maioria dos casos o efeito foi de supressão do sinal analítico, o que corresponde à diminuição do sinal analítico comparado ao sinal obtido quando analisada a curva analítica em solvente orgânico. Também pode ser notado, que para vários analitos, o efeito matriz obtido permaneceu fora da faixa aceitável ( $\pm 20\%$ ), indicando que as curvas analíticas em matriz devem ser preparadas na matriz de efluente hospitalar.

O estudo de fortificação e recuperação foi feito para verificar a exatidão e precisão dos procedimentos experimentais. Como pode ser observado nas Tabela 10 e Tabela 11, obteve-se valores de recuperações na faixa aceitável (70-120%) para todos analitos, conforme recomendado pelas diretrizes nacionais e internacionais. Os procedimentos de extração também demonstraram-se precisos, já

que quando avaliada a precisão (*intraday* e *interday*) foi possível obter valores menores ou iguais a 15,72%, para todos analitos.

Os LOQ foram estabelecidos através do estudo de fortificação e recuperação, sendo considerado o LOQ de cada analito a menor concentração fortificada que apresentou valores aceitáveis para recuperações e exatidão. Quando empregada a técnica de HPLC-DAD-FLD os LOQ foram iguais ou inferiores a 16  $\mu\text{g L}^{-1}$  e para LC-ESI-MS os valores foram iguais ou inferiores a 1,4  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Tabela 10- Parâmetros avaliados no estudo de validação dos procedimentos de DLLME e SPE através do emprego da técnica de HPLC-DAD-FLD.

Analitos	r <sup>2</sup>			Fortificação (µg L <sup>-1</sup> )	DLLME				SPE			
	Solvente	Matriz			Rec (%)	RSD (%)		Efeito matriz (%)	Rec (%)	RSD (%)		Efeito matriz (%)
		DLLME	SPE			Intradiária	Interdiária			Intradiária	Interdiária	
Olanzapina	0,9927	0,9894	0,9994	8	70,7	10,51	3,43	-6,37	71,4	7,25	6,46	-6,37
				16	77,8	7,63	3,35		78,6	4,31	5,54	
				45	87,1	7,32	3,74		83,1	4,22	6,95	
Clozapina	0,9921	0,9912	0,9966	8	79,7	8,63	2,82	-3,93	79,5	5,26	8,43	-10,31
				16	81,1	5,36	1,77		81,6	3,69	5,39	
				45	86,8	5,79	1,50		82,5	2,96	0,74	
Clorpromazina	0,9917	0,9815	0,9984	8	92,7	12,78	6,12	-32,81	72,8	15,72	11,7	-11,31
				16	94,4	9,15	2,07		79,1	11,27	9,6	
				45	98,1	8,54	1,96		82,3	9,46	8,8	
Risperidona	0,9937	0,9930	0,9996	16	79,8	6,93	4,01	5,36	72,2	4,36	5,28	-7,4
				32	92,3	6,84	1,61		73,1	4,01	4,99	
				90	81,1	3,47	1,87		79,8	3,96	0,83	
Haloperidol	0,9901	0,9901	0,9995	16	74,9	7,15	5,48	5,51	76,1	4,91	4,05	-6,2
				32	76,6	3,95	2,80		77,2	3,25	1,85	
				90	95,6	3,36	1,58		78,4	1,97	1,34	
Pimozida	0,9944	0,9904	0,9982	2	70,4	14,63	6,82	-35,84	70,5	4,36	1,57	-5,32
				4	72,3	10,21	5,95		72,2	3,65	2,25	
				9	99,2	7,15	3,52		73,9	3,74	1,11	

n=3

Fonte: Autora

Tabela 11- Parâmetros avaliados no estudo de validação dos procedimentos de DLLME e SPE através do emprego da técnica de LC-ESI-MS.

Analitos	r <sup>2</sup>			Fortificação (µg L <sup>-1</sup> )	DLLME				SPE			
	Solvente	Matriz			Rec (%)	RSD (%)		Efeito matriz (%)	Rec (%)	RSD (%)		Efeito matriz (%)
		DLLME	SPE			Intradiária	Interdiária			Intradiária	Interdiária	
Olanzapina	0,9927	0,9836	0,9918	0,3	77,20	10,61	9,15	-76,06	88,15	5,15	3,18	-45,40
				1,5	77,45	3,77	3,98		88,54	3,14	2,78	
				7,5	83,03	2,84	2,50		90,15	3,58	1,15	
Clozapina	0,9921	0,9954	0,9947	0,5	70,85	11,50	8,96	-23,68	89,16	4,14	3,58	-13,24
				2,5	78,52	10,38	7,58		91,47	3,21	1,47	
				12,5	81,25	6,10	5,62		95,17	1,25	1,25	
Clorpromazina	0,9917	0,9939	0,9975	0,5	76,17	3,47	4,58	-19,92	78,47	3,47	4,56	-12,57
				2,5	75,03	3,35	2,65		76,15	3,14	2,96	
				12,5	86,20	5,11	4,57		81,17	2,58	2,57	
Risperidona	0,9937	0,9900	0,9964	0,9	80,35	5,38	4,85	-28,80	81,17	5,78	3,48	-22,60
				4,5	90,76	8,56	7,36		89,25	3,47	2,73	
				22,5	79,63	2,41	1,98		92,13	3,02	2,45	
Haloperidol	0,9901	0,9962	0,9979	1,4	77,36	8,93	6,57	-30,31	91,17	4,78	3,68	-19,97
				7,0	78,70	6,87	5,41		90,58	3,89	2,52	
				35,0	78,47	1,36	2,63		101,15	1,87	2,32	
Pimozida	0,9944	0,9967	0,9990	1,4	81,46	2,29	3,15	-28,46	78,13	2,47	4,25	1,37
				7,0	83,05	3,26	2,15		80,58	2,06	2,47	
				35,0	90,88	4,79	4,91		82,15	1,58	2,89	

n=3

Fonte: Autora

#### 4.5 APLICAÇÃO DAS METODOLOGIAS PARA VERIFICAR A OCORRÊNCIA DE RESÍDUOS DE ANTIPSICÓTICOS

As amostragens de efluente hospitalar para determinação e quantificação dos antipsicóticos foram feitas em dois pontos de amostragem, durante uma semana, conforme descrito no item 3.6.

As amostras compostas diárias foram submetidas à etapa de extração pelas metodologias otimizadas e validadas e posteriormente à determinação por LC-ESI-MS, conforme as condições descritas no item 4.1.2. As Tabela 12 e

Tabela 13 apresentam as concentrações diárias quantificadas para os antipsicóticos nos dois pontos de amostragem, por ambos os procedimentos de extração.

Tabela 12- Concentrações diárias ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de antipsicóticos encontrada no ponto de coleta A.

Dia da semana	Olanzapina		Clozapina		Haloperidol		Risperidona		Clorpromazina	
	DLLME	SPE	DLLME	SPE	DLLME	SPE	DLLME	SPE	DLLME	SPE
Domingo	-	-	0,91 $\pm$ 0,03	0,89 $\pm$ 0,01	1,65 $\pm$ 0,21	1,72 $\pm$ 0,12	-	-	-	-
Segunda-feira	-	-	0,81 $\pm$ 0,06	0,78 $\pm$ 0,02	1,87 $\pm$ 0,23	1,90 $\pm$ 0,15	0,95 $\pm$ 0,06	1,91 $\pm$ 0,13	0,52 $\pm$ 0,03	0,51 $\pm$ 0,02
Terça-feira	0,31 $\pm$ 0,02	0,30 $\pm$ 0,019	0,56 $\pm$ 0,05	0,52 $\pm$ 0,04	-	-	0,92 $\pm$ 0,05	0,89 $\pm$ 0,03	-	-
Quarta-feira	-	-	0,97 $\pm$ 0,04	0,92 $\pm$ 0,03	1,5 $\pm$ 0,11	1,62 $\pm$ 0,23	-	-	-	-
Quinta-feira	<0,3	<0,3	0,69 $\pm$ 0,06	0,71 $\pm$ 0,02	2,73 $\pm$ 0,04	2,52 $\pm$ 0,03	-	-	-	-
Sexta-feira	-	-	0,95 $\pm$ 0,13	0,91 $\pm$ 0,18	<1,4	<1,4	<0,9	<0,9	-	-
Sábado	-	-	-	-	<1,4	<1,4	<0,9	<0,9	-	-

-: não detectado.

Tabela 13- Concentrações diárias ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de antipsicóticos encontrada no ponto de coleta B.

Dia da semana	Olanzapina		Clozapina		Haloperidol	
	DLLME	SPE	DLLME	SPE	DLLME	SPE
Domingo	0,52 $\pm$ 0,03	0,48 $\pm$ 0,01	-	-	<1,4	<1,4
Segunda-feira	-	-	0,93 $\pm$ 0,03	0,88 $\pm$ 0,04	1,61 $\pm$ 0,09	1,58 $\pm$ 0,1
Terça-feira	-	-	0,65 $\pm$ 0,02	0,68 $\pm$ 0,01	1,58 $\pm$ 0,08	1,53 $\pm$ 0,05
Quarta-feira	-	-	0,72 $\pm$ 0,03	0,76 $\pm$ 0,01	1,67 $\pm$ 0,04	1,71 $\pm$ 0,07
Quinta-feira	<0,3	-	0,77 $\pm$ 0,11	0,73 $\pm$ 0,15	1,43 $\pm$ 0,12	<1,4
Sexta-feira	0,32 $\pm$ 0,01	<0,3	0,95 $\pm$ 0,05	0,91 $\pm$ 0,03	-	-
Sábado	-	-	-	-	2,32 $\pm$ 0,13	2,41 $\pm$ 0,19

-: não detectado.

As amostras foram coletadas no período de uma semana (14 a 21 de dezembro de 2017), sendo que os horários de coleta foram a cada duas horas entre 08:00 e 18:00. Cinco dos seis analitos estudados foram encontrados em concentrações superiores ao LOQ<sub>m</sub> no ponto de coleta A. No ponto de coleta B três dos antipsicóticos foram encontrados em concentrações também superiores ao LOQ<sub>m</sub>, em pelo menos um dos sete dias de coleta.

Durante os dias avaliados, foi possível perceber que as concentrações encontradas quando aplicados os procedimentos de extração foram muito similares. Aplicou-se o teste *T de Student*, e as diferenças entre as concentrações obtidas por SPE e DLLME não foram significativas, indicando assim, que ambos os procedimentos podem ser utilizados.

As maiores concentrações, em ambos pontos de coleta, foram obtidos para o haloperidol, o qual é utilizado para o tratamento do autismo e esquizofrenia crônica (uso contínuo). Cerca de 86% das amostras apresentaram concentrações acima de 1,43 µg L<sup>-1</sup>. Silveira et al. determinaram a presença de alguns fármacos, entre eles o haloperidol em amostras de águas superficiais por meio de LC-MS/MS, e encontraram o antipsicótico haloperidol em concentração média de 0,1 µg L<sup>-1</sup> (SILVEIRA et al., 2013); estas concentrações são inferiores às concentrações encontradas pelo HUSM, visto que, os contaminantes encontram-se mais diluídos em águas superficiais. No estudo de Loos e colaboradores alguns contaminantes orgânicos foram determinados em efluentes de 90 ETEs na Europa, sendo que o haloperidol foi encontrado em cerca de 83% das amostras avaliadas e a concentração máxima foi de 2,69 µg L<sup>-1</sup> (LOOS et al., 2013), concentração superior à encontrada no efluente do HUSM.

A clozapina foi encontrada em cerca de 79% das amostras avaliadas, em concentrações na faixa de 0,56 µg L<sup>-1</sup> a 0,97 µg L<sup>-1</sup>. Estes valores estão de acordo com estudos prévios reportados em efluente hospitalar (YUAN et al., 2013). Ademais, a clozapina também foi encontrada em amostras de água superficial na África, em concentrações maiores que aquelas encontradas no efluente do HUSM (MATONGO et al., 2015). Outros estudos reportam concentrações menores de clozapina em influente e efluente urbano (BOROVA et al., 2014; SHENG et al., 2014; LOGARINHO et al., 2016; DAVID et al., 2018).



O antipsicótico risperidona foi quantificado somente no ponto de coleta A (frequência de 29%), em concentrações na faixa de 0,92  $\mu\text{g L}^{-1}$  a 0,95  $\mu\text{g L}^{-1}$ . De maneira geral, as concentrações encontradas no efluente do HUSM foram superiores às concentrações de risperidona encontradas em trabalhos prévios (0,003–0,36  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (YUAN et al., 2013; BOROVA et al., 2014; VERGEYNST et al., 2015). Loos e colaboradores encontraram concentrações de risperidona (concentração máxima de 0,86  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) na Europa semelhantes às encontradas no efluente do HUSM (LOOS et al., 2013).

Cerca de 36% das amostras estudadas apresentaram traços de olanzapina, em concentração na faixa de 0,31 a 0,52  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Estes resultados também são considerados altos frente à trabalhos encontrados na literatura (YUAN et al., 2013; BOROVA et al., 2014). Entretanto, Santos et. al. avaliaram a ocorrência de alguns produtos farmaceuticos em efluentes de quarto hospitais em Portugal e encontraram olanzapina em concentrações de até 0,82  $\mu\text{g L}^{-1}$  (SANTOS et al., 2013), cujos valores são maiores que aqueles encontrados no efluente gerados pelo HUSM. Outros autores reportam olanzapina em concentrações próximas à 0,04  $\mu\text{g L}^{-1}$  em amostras de águas superficiais (GRACIA-LOR; SANCHO; HERNÁNDEZ, 2011; K'OREJE et al., 2016). As divergências entre as concentrações encontradas em efluente urbano, efluente hospitalar e águas superficiais podem ser relacionadas à diluição das amostras.

A clorpromazina foi quantificada somente na segunda feira (7% das amostras) da semana avaliada no Ponto A, em concentrações levemente acima do LOQ<sub>m</sub> (0,50  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Alguns autores relatam a ocorrência de clorpromazina em amostras de influente e efluente hospitalar em concentração na faixa de 0,002 a 0,364  $\mu\text{g L}^{-1}$  (FERNÁNDEZ et al., 2010; YUAN et al., 2013; LOGARINHO et al., 2016). Asghari et al. desenvolveram um método sequencial DLLME/HPLC-UV para a determinação de clozapina e clorpromazina em amostras de efluente, no entanto não aplicaram a metodologia desenvolvida. (ASGHARI et al., 2017).

O antipsicótico pimozida não foi detectado em nenhuma das amostras avaliadas, o que pode ser justificado ao seu uso limitado no HUSM. Nenhum estudo envolvendo a determinação de pimozida em efluentes hospitalares e/ou urbanos sobre a ocorrência de pimozida, foi encontrado em materiais disponíveis na literatura.

O conhecimento da ocorrência de drogas psicoativas em efluentes e seus efeitos sobre os ecossistemas é de grande importância, particularmente nos países em desenvolvimento, onde a maioria da população e os hospitais apresentam apenas sistemas sépticos para o tratamento de efluentes (BALAKRISHNA et al., 2017) e não se faz a diluição dos efluentes hospitalares com efluentes urbanos, por exemplo, antes do lançamento no meio ambiente.

Através dos dados experimentais obtidos neste estudo, fica evidente que o sistema séptico utilizado pelo HUSM não é capaz de remover totalmente os resíduos desta classe de medicamentos. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento e a aplicação de PAOs, permitindo a degradação completa destes resíduos e, conseqüentemente, reduzir os riscos ecotoxicológicos.

#### **4.6 AVALIAÇÃO DO RISCO AMBIENTAL**

As avaliações preliminares do risco permitem determinar os possíveis impactos dos produtos farmacêuticos no ecossistema. Embora vários estudos tenham sido publicados, principalmente a partir de 2013, sobre a ocorrência de antipsicóticos em matrizes ambientais, poucos desses estudos fazem a avaliação de risco. A concentração de psicofármacos no ambiente é baixa, no entanto, os valores da PNEC, para a maioria dos compostos pertencentes à esta classe, também são baixos. Motivo pelo qual requerem atenção especial.

As diretrizes para conduzir uma avaliação de risco ambiental de medicamentos humanos (EMEA, 2006) estipulam que, na fase preliminar, a avaliação deve descobrir se os produtos farmacêuticos são persistentes, bioacumulativos e tóxicos (PBT) ao mesmo tempo. Compostos PBT são poluentes prioritários devido ao risco potencial que representam para a saúde humana e o ecossistema. Eles podem resistir à degradação biótica e abiótica e persistir inalterados por muito tempo. Além disso, eles podem interagir com humanos e animais selvagens, acumular-se em organismos vivos e ter efeitos tóxicos (SANGION; GRAMATICA, 2016). Os valores de PBT podem variar em uma escala de 0 a 3, onde 3 é considerado o nível mais alto (ZAHARIA; SUTEU, 2012).

De acordo com a Tabela 14, os antipsicóticos risperidona, clozapina, haloperidol e pimozida são muito persistentes no ambiente. Clozapina, haloperidol e pimozida são bioacumulativos; e clozapina, clorpromazina e pimozida também apresentam alto grau de toxicidade. Devido à ocorrência de risperidona, haloperidol, clozapina e a clorpromazina no efluente do HUSM e aos elevados valores de PBT que estes resíduos podem apresentar, faz-se necessário estudar processos mais eficazes para o tratamento destes efluentes.

Tabela 14- Valores de PNEC, QR e PBT para os analitos estudados.

Analitos	PNEC ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Referencias <sup>a</sup>	QR			P	B	T	Referencia <sup>b</sup>
			Ponto A	Ponto B					
Olanzapina	44	(BERCU et al., 2008)	0.007	0.012	0	0	2	(STOCKHOLM COUNTY COUNCIL, 2014)	
Risperidona	0.001	(ORIAS; PERRODIN, 2013)	950	-	3	0	2	(STOCKHOLM COUNTY COUNCIL, 2014)	
Clozapina	0.0014	(ORIAS; PERRODIN, 2013)	693	679	3	3	3	(STOCKHOLM COUNTY COUNCIL, 2014)	
Clorpromazina	0.000088	(ORIAS; PERRODIN, 2013)	5909	-	2	2	3	(ENVIRONMENTAL HEALTH ANALYSIS CENTER, 2016)	
Haloperidol	-	-	-	-	3	3	2	(STOCKHOLM COUNTY COUNCIL, 2014)	
Pimozida	-	-	-	-	3	3	3	(ENVIRONMENTAL HEALTH ANALYSIS CENTER, 2016)	

Fonte: Autora.

O risco pode ser classificado como baixo quando o QR está entre os valores de 0,01 e 0,10; moderado, quando QR encontra-se na faixa entre 0,10 e

1,00 e, como alto, se assume valores superiores à 1,00 (HERNANDO et al., 2006). O QR pode ser calculado como a razão entre a concentração mais alta encontrada e o valor PNEC de cada composto.

Nas concentrações medias de antipsicóticos encontrados no efluente do HUSM, os antipsicóticos clozapina, clorpromazina e risperidona apresentam um alto risco ambiental, uma vez que os valores do QR ( $679 \geq QR \leq 5909$ ) são muito superiores a 1. A principal razão para isto é que os fármacos antipsicóticos que foram estudados têm valores muito pequenos de PNEC, como por exemplo,  $1,4 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-3}$  e  $8,8 \times 10^{-5} \mu\text{g L}^{-1}$  para clozapina, risperidona e clorpromazina, respectivamente (ORIAS; PERRODIN, 2013). A olanzapina apresenta um baixo risco para o ecossistema ( $QR \leq 0,012$ ). Ambos pontos de amostragem apresentaram um risco muito alto, podendo este ser atribuído à presença de clozapina, mas o risco apresentado pelo Ponto A foi muito maior, em virtude da ocorrência de clorpromazina e risperidona.

## 4.7 APLICAÇÃO DE PROCESSOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO

### 4.7.1 Fotólise

A maioria dos compostos orgânicos que absorvem radiação UV apresentam em suas estruturas ligações duplas ou ligações duplas conjugadas, envolvendo átomos de carbono, nitrogênio ou oxigênio, e são caracterizadas por possuírem elétrons pi ( $\pi$ ) desemparelhados. Estas características tornam os compostos propensos a absorverem a radiação UV (fotólise direta) ou a reagirem com espécies fotossensibilizadoras capazes de induzir a fotodegradação dos compostos em matrizes aquosas (fotólise indireta) (BOREEN; ARNOLD; MCNEILL, 2003).

Como descrito no item 3.13.1, no presente estudo aplicou-se o processo de fotólise para a degradação dos seis antipsicóticos estudados em efluente hospitalar. A Figura 26, demonstra a degradação (%) de cada um dos analitos quando utilizado o fotorreator de bancada desenvolvido no LATER (esquema apresentado na Figura 8) e equipado com uma lâmpada UVC.

Todos os ensaios para os estudos de degradação foram conduzidos diretamente em solução de efluente hospitalar. Nesta etapa do estudo, não

foram aplicados planejamentos experimentais, devido ao elevado custo das substâncias padrão e à pequena quantidade de padrões sólidos dos analitos.

Através da Figura 26 pode-se constatar que após 60 min de processo, apenas os antipsicóticos clozapina e pimozida não foram completamente degradados em nenhum dos valores de pH estudados.

Para determinação da ordem de reação e da constante cinética dos analitos ( $k_{obs}$ ), estudou-se os decaimentos das curvas experimentais obtidas, ajustado-as ao modelo representado pela Equação 7, para pseudoprimeira ordem, pois a concentração dos antipsicóticos estudados foi variada e a intensidade da radiação UV foi mantida constante.

$$\ln[C] = \ln[C_0] - k \cdot t \quad \text{(Equação 7)}$$

onde:  $C_0$  é concentração inicial do analito,

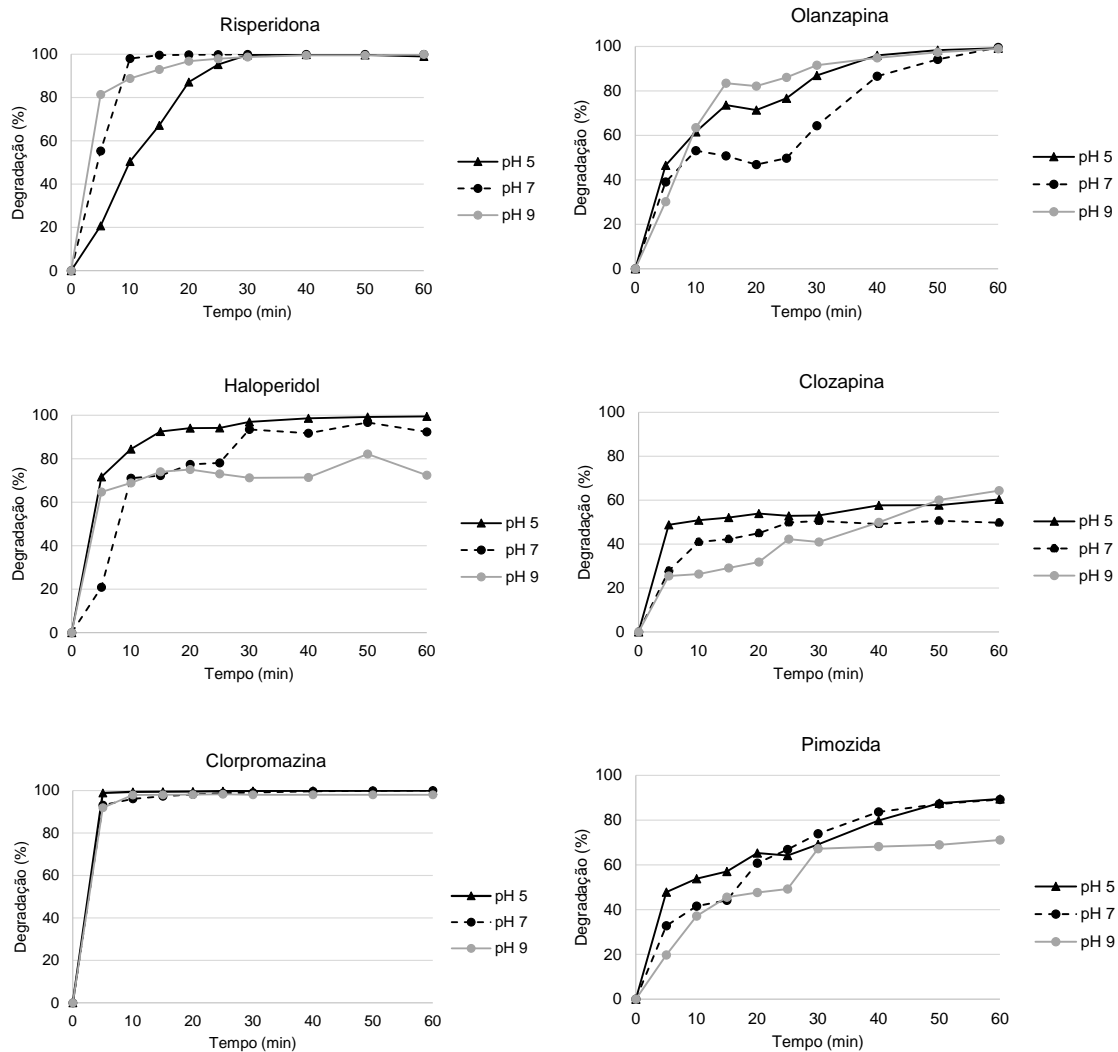
$C$  é a concentração em determinado tempo

$k$  é a constante de velocidade reacional.

A partir das curvas  $\ln C/C_0$  versus tempo (Figura 27), foi possível determinar a  $k_{obs}$  da degradação de todos os compostos, bem como os tempos de meia vida ( $t_{1/2}$ ) calculados através da Equação 8.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad \text{Equação 8}$$

Figura 26 – Degradação dos antipsicóticos estudados por meio do processo de fotólise.



Fonte: Autora.

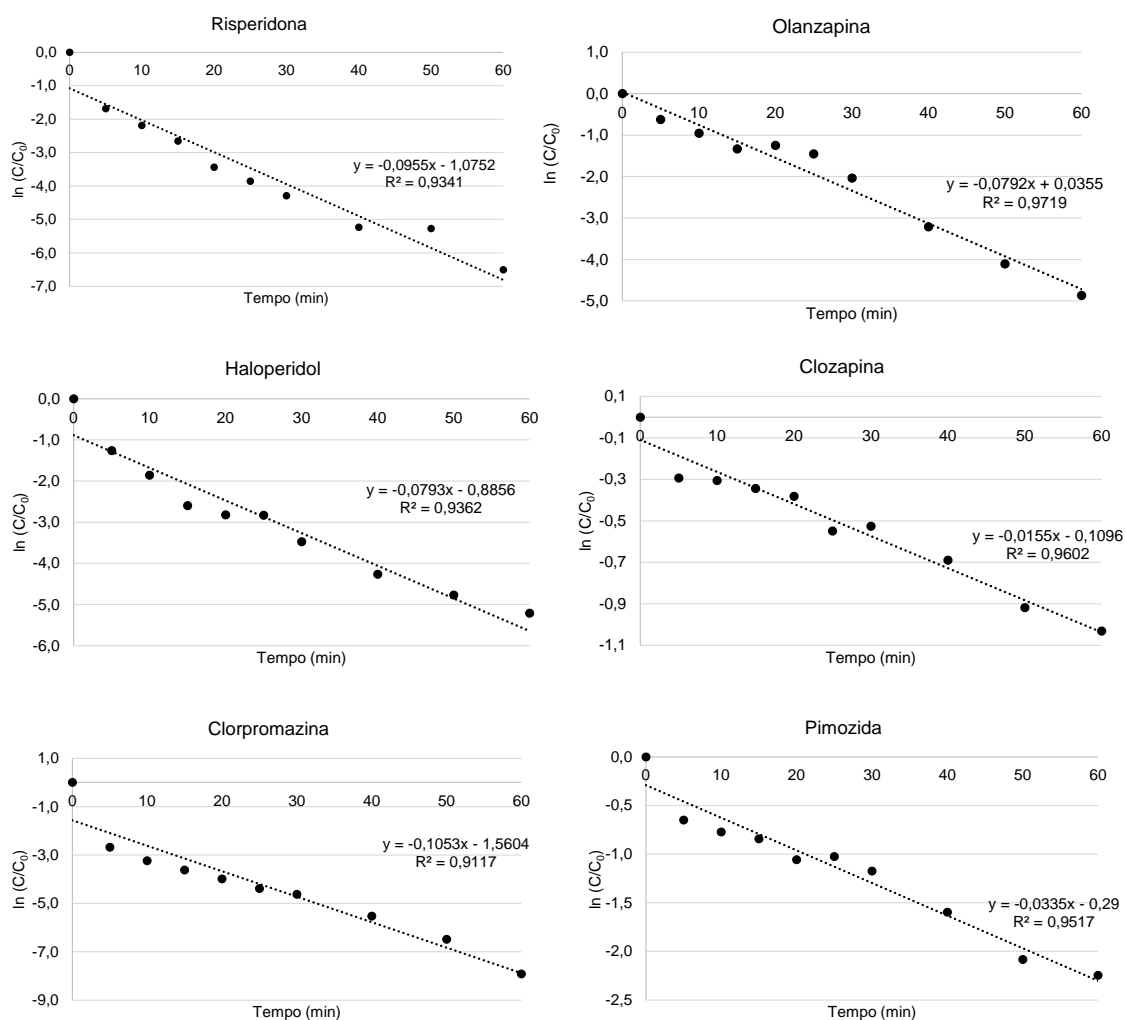
De maneira geral, a cinética de pseudoprimeira ordem tem sido reportada em muitos estudos envolvendo a fotodegradação de PPCPs (TRAWIŃSKI; SKIBIŃSKI; SZYMAŃSKI, 2018). Especificamente, para antipsicóticos em soluções aquosas, este modelo cinético foi reportado em dois estudos (REGULSKA; KARPIŃSKA, 2012; CALZA et al., 2016).

Pathak e Rajput aplicaram o processo de fotólise para o estudo da degradação de olanzapina, e relatam que este antipsicótico demonstra ser instável quando exposto à luz em condições ácidas, alcalinas ou neutras (faixa

de pH estudada no presente estudo (PATHAK; RAJPUT, 2009). Por outro lado, outro estudo relata que não houve degradação para olanzapina quando utilizada radiação UV-C (254 nm) (SHAH et al., 2008).

A maioria dos analitos apresentou maior valor para a  $k_{obs}$  em pH 5. Estes resultados, demonstraram que pH interfere no processo fotoquímico, uma vez que, em condições neutras e alcalinas a maioria dos compostos é mais estável e a taxa de fotodegradação diminui.

Figura 27 –Estudo cinético da degradação dos antipsicóticos em efluente hospitalar através do processo de fotólise.



Fonte: Autora.

Analisando-se as  $K_{obs}$  (Tabela 15) obtidas no estudo de fotodegradação dos antipsicóticos, pode-se observar que a clorpromazina apresentou maior valor, sendo assim, sua degradação completa ocorre em um tempo menor ao comparar aos demais analitos. Os analitos clozapina e pimozida foram os compostos que apresentaram as menores eficiências de degradação quando comparados aos dados obtidos para os demais antipsicóticos.

Tabela 15- Constante cinética,  $t_{1/2}$  e ajuste do modelo da degradação de antipsicóticos por meio do processo de fotólise.

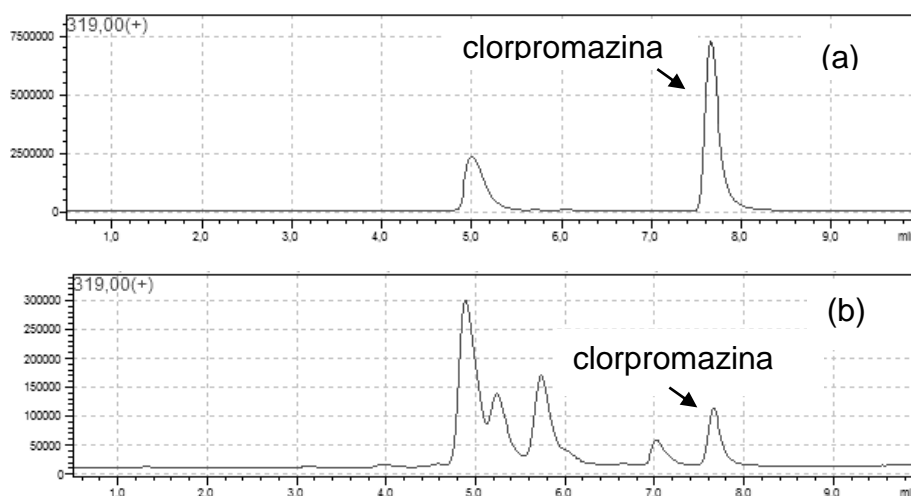
<b>Analito</b>	<b><math>k_{obs}</math> (<math>\text{min}^{-1}</math>)</b>	<b><math>t_{1/2}</math> (min)</b>	<b><math>r^2</math></b>
Risperidona	$9,55 \times 10^{-2}$	7,2	0,9141
Olanzapina	$7,92 \times 10^{-2}$	8,7	0,9719
Haloperidol	$7,9 \times 10^{-2}$	8,8	0,9362
Pimozida	$3,3 \times 10^{-2}$	21,0	0,9517
Clozapina	$1,6 \times 10^{-2}$	43,3	0,9602
Clorpromazina	$1,1 \times 10^{-1}$	6,3	0,9117

Fonte: Autora.

Ao aplicar o processo de fotólise para o antipsicótico clorpromazina, evidenciou-se a variação na cor da solução. Inicialmente a solução não apresentava coloração, e com o decorrer do tempo de irradiação a solução apresentou coloração em tons avermelhados. Esta variação na coloração também foi reportada no estudo de Trautwein e Kümmerer, os quais relatam que com o aumento do tempo de irradiação, o sinal do analito diminui e outros sinais analíticos podem ser visualizados nos cromatogramas em tempos de retenção inferiores aos do analito possibilitando a formação de aproximadamente 57 fotoprodutos (TRAUTWEIN; KÜMMERER, 2012), como demonstrado Figura 28 também verificado no presente estudo.



Figura 28 –Cromatogramas obtidos para a clorpromazina ambos em solução de efluente hospitalar com pH ajustado à 7 (a) antes do início do processo de fotólise e (b) após 60 min de processo.



Embora os contaminantes orgânicos absorvem radiação UV, a concentração destes compostos no meio ambiente é baixa ( $\mu\text{g L}^{-1}$  ou  $\text{ng L}^{-1}$ ) quando comparada ao teor de matéria orgânica e inorgânica presente no meio, assim a porção de luz absorvida é muito baixa. Neste caso, pode ocorrer uma competição pela luz UV incidida no tratamento e, conseqüentemente, uma redução na eficiência da remoção destes compostos quando comparado à processos que utilizam outros mecanismos para a degradação.

#### 4.7.2 Ozonização

Assim como na fotólise, os ensaios por meio de ozonização foram conduzidos no reator de bancada desenvolvido no LATER e os testes foram feitos em efluente hospitalar.

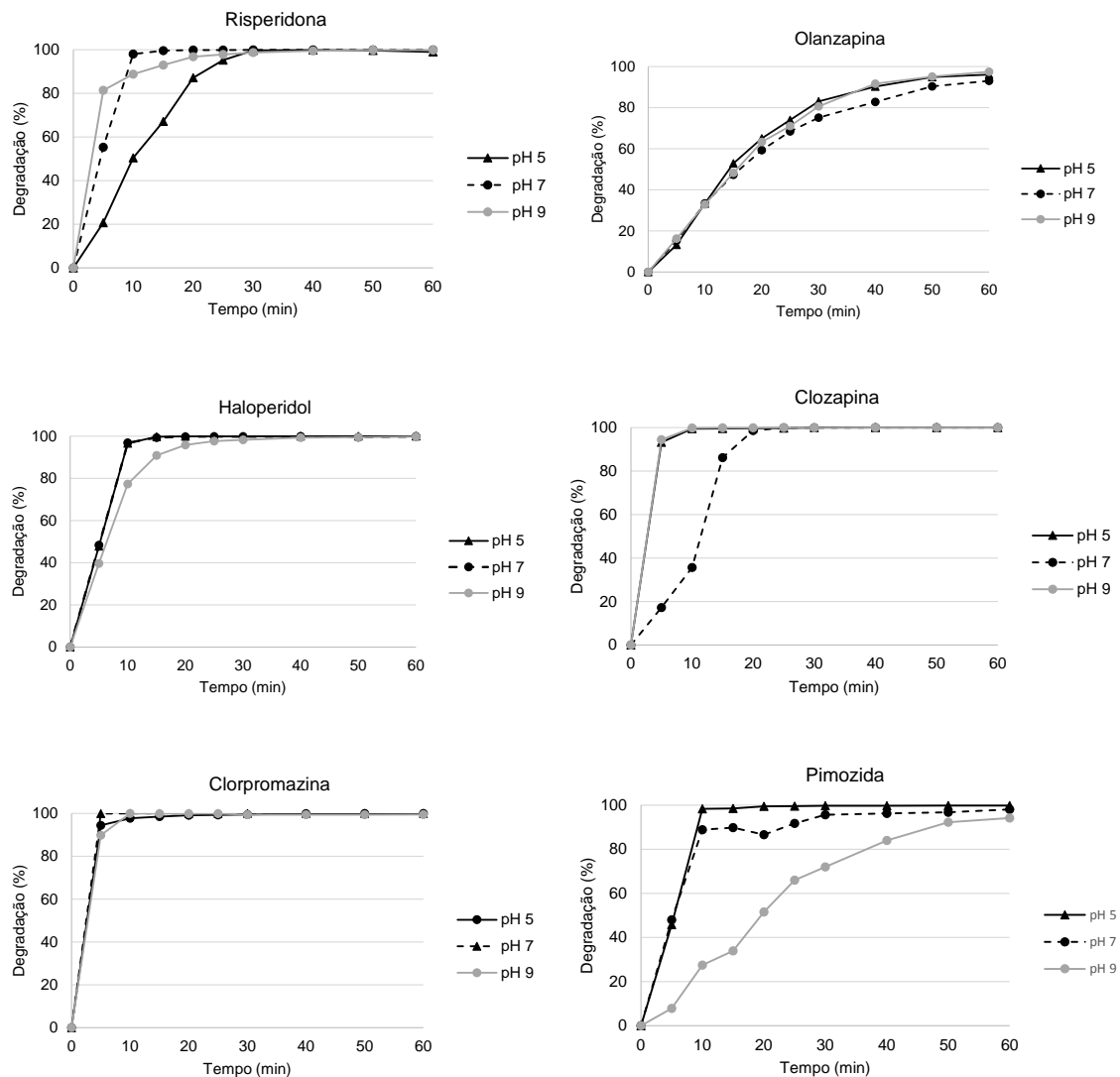
Como demonstrado na Figura 29, todos os antipsicóticos estudados foram degradados quase totalmente na faixa de pH avaliado, em no máximo 30 min de ozonização.

A estrutura química e os grupos funcionais de cada composto estudado determinam se a substância é facilmente ou dificilmente degradada através do ozônio. Ainda, devido à sua configuração eletrônica, o ozônio pode executar diferentes tipos de reações na água, incluindo reações de oxidação, cicloadições e reações de substituição eletrofílica (ANTONIOU et al., 2013).

O pH do meio reacional apresenta influência no mecanismo de reação, ou seja, quando o pH do meio reacional encontra-se entre 4 e 9 ambos os mecanismos podem estar presentes, tanto ozonização direta quanto via radicalar. Em valores de pH superiores a 9 a reação via radicalar é preferencial (GUNTEN, 2003). Na faixa de pH avaliados no presente estudo, tem-se ambos os mecanismos acontecendo (reação direta e reação indireta).

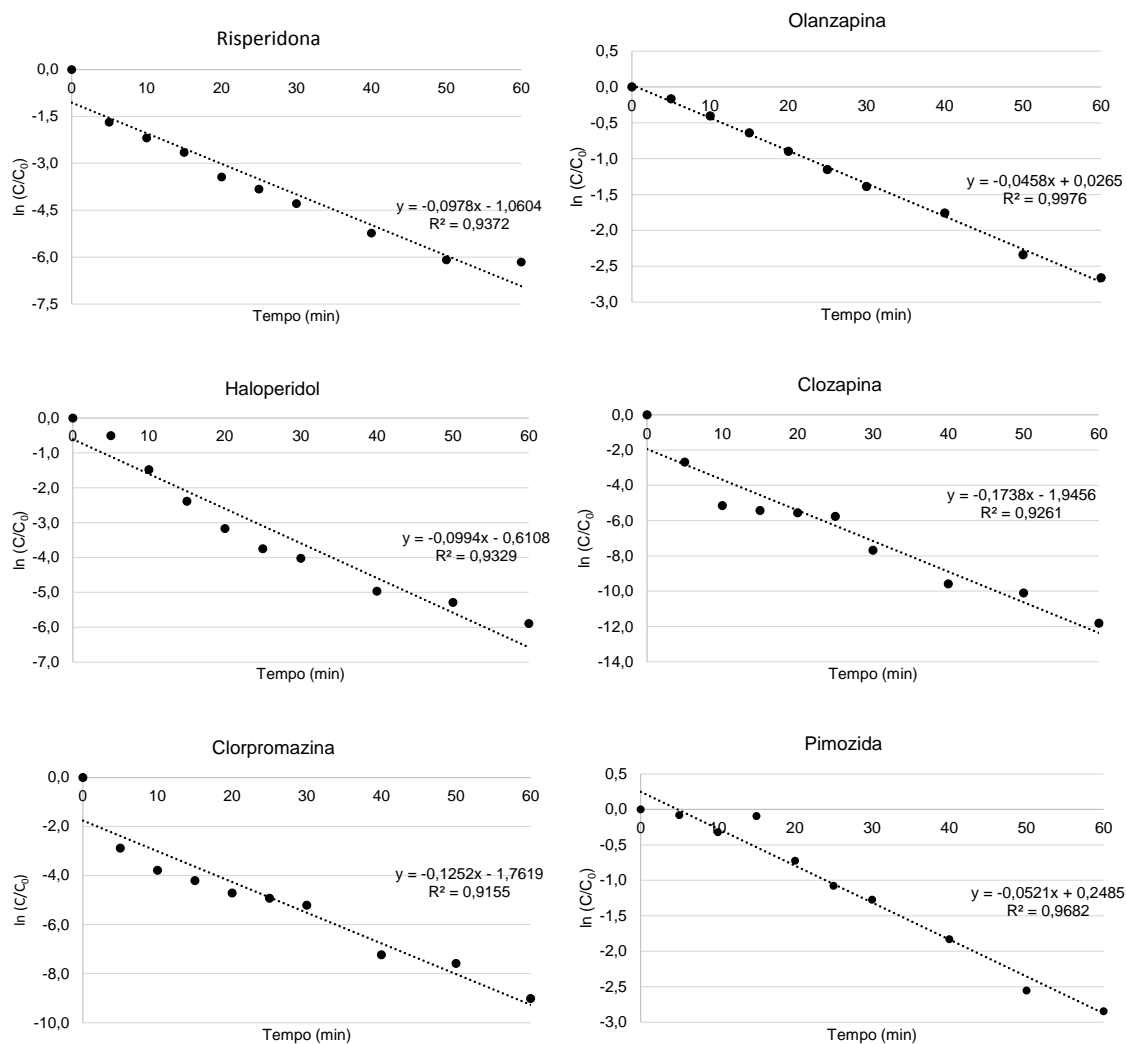
Através dos dados contidos na Tabela 16 e na Figura 30, pode-se concluir que por meio do processo de ozonização, a clozapina é o antipsicótico que se degrada mais rapidamente e a pimozida é o analito que degrada-se mais lentamente.

Figura 29 – Degradação dos antipsicóticos estudados por meio do processo de ozonização.



Fonte: Autora.

Figura 30 – Estudo cinético da degradação dos antipsicóticos em efluente hospiralar através do processo de ozonização.



Fonte: Autora.

Na Tabela 16 estão apresentados os valores de  $k_{obs}$  e também o  $t_{1/2}$  para cada analito estudado. O  $t_{1/2}$  segue a ordem inversa à  $k_{obs}$ , sendo a clozapina o antipsicótico que apresentou o menor  $t_{1/2}$  e a pimozida o analito que apresentou o maior  $t_{1/2}$ , o antipsicótico que necessita maior tempo de ozonização para reduzir a sua concentração inicial para a metade.

Tabela 16- Constante cinética de pseudoprimeira ordem ( $k_{obs}$ ),  $t_{1/2}$  e ajuste do modelo da degradação de antipsicóticos por meio do processo de ozonização.

<b>Analito</b>	<b><math>k_{obs}</math> (<math>\text{min}^{-1}</math>)</b>	<b><math>t_{1/2}</math> (min)</b>	<b><math>r^2</math></b>
Risperidona	$9,8 \times 10^{-2}$	7,1	0,9372
Olanzapina	$4,6 \times 10^{-2}$	15,1	0,9191
Haloperidol	$9,9 \times 10^{-2}$	6,9	0,9329
Pimozida	$5,2 \times 10^{-2}$	13,3	0,9682
Clozapina	$1,7 \times 10^{-1}$	3,9	0,9261
Clorpromazina	$1,3 \times 10^{-1}$	5,3	0,9155

Fonte: Autora.

O estudo de Antoniou e colaboradores, demonstra que a risperidona se degrada rapidamente e o haloperidol apresenta degradação moderada quando empregado o processo de oxidação avançada ozonização (ANTONIOU et al., 2013). No estudo relativo à degradação de antipsicóticos no efluente do HUSM, o haloperidol apresentou degradação levemente mais rápida que a risperidona, este fato pode estar relacionado à grande quantidade de substâncias presente no efluente do HUSM, as quais acabam interferindo na degradação dos analitos.

Quando comparados os dois processos de degradação estudados, é possível perceber que através da ozonização obtem-se a degradação completa para todos analitos, e adicionalmente mais rápida do que pelo processo de fotólise. Isto já era esperado, pois o ozônio pode atuar seletivamente, com baixa cinética de reação ou através da formação  $\text{HO}\cdot$ , que atua de modo não seletivo e com alta cinética de reação, aumentando a eficiência do processo.

## 5. CONCLUSÃO

Através deste estudo, foi possível realizar a quantificação de seis antipsicóticos em amostras de efluentes hospitalares utilizando LC-ESI-MS. Para isso, dois procedimentos de extração foram otimizados e validados de acordo com os critérios exigidos por órgãos nacionais e internacionais.

Os critérios de validação mostraram boa linearidade, seletividade, efeito matriz, precisão, exatidão e  $LOQ_m \leq 1,4 \mu\text{g L}^{-1}$  para todos os analitos em ambos os procedimentos de extração estudados, ressaltando-se que ambos podem ser aplicados à matriz de efluente hospitalar. Em ambos os procedimentos de extração estudados, o uso de curvas de calibração na matriz foi necessário para compensar os efeitos da matriz.

Os métodos validados foram empregados para determinação dos analitos em amostras de efluente hospitalar, nas quais olanzapina, risperidona, haloperidol, clozapina e clorpromazina foram encontrados em pelo menos um dos dois pontos de amostragem investigados.

A avaliação preliminar do risco ecotoxicológico revelou que a ocorrência de risperidona, clozapina e clorpromazina nos efluentes tratados no HUSM, é capaz de afetar o ecossistema aquático, pois seus QRs foram muito elevados. Ademais, devido aos seus índices de PBT, os antipsicóticos avaliados apresentam alta probabilidade de levar à persistência, bioacumulação e toxicidade no ecossistema.

Para o estudo da degradação dos antipsicóticos, dois processos avançados de oxidação foram conduzidos em solução efluente hospitalar. A oxidação fotoinduzida demonstrou ser mais lenta quando comparada ao processo de ozonização: o  $t_{1/2}$  dos antipsicóticos durante a degradação por meio da fotólise foi de no máximo 43,3 min (clozapina). Por outro lado, durante o processo de ozonização, o maior  $t_{1/2}$  obtido foi de 15,1 min (olanzapina). No processo de fotólise os analitos demonstraram maior degradação em valores de pH ácidos, enquanto que no processo de ozonização a degradação foi mais rápida em meio neutro e básico (pH 7,0 e 9,0, respectivamente).



## **6. DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS**

Os resíduos gerados no desenvolvimento deste trabalho foram encaminhados ao almoxarifado do Departamento de Química da UFSM e sua destinação final ficou sob responsabilidade de uma empresa terceirizada. Foram gerados resíduos líquidos e resíduos sólidos. Os líquidos foram armazenados em frascos identificados como halogenados e não-halogenados, de acordo com a presença ou ausência de halogênios em sua composição química, enquanto que os resíduos sólidos foram colocados em sacos plásticos, devidamente identificados.





## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

As seguintes atividades são propostas para trabalhos futuros:

- Analisar outros medicamentos antipsicóticos, tais como os antipsicóticos de terceira geração;
- Avaliar a presença de antipsicóticos em água superficial e sedimentos e/ou lodo;
- Investigar mais profundamente a avaliação de risco de fármacos lançados não apenas pelo HUSM, mas também por outras fontes presentes na cidade de Santa Maria;
- Identificar os produtos de degradação formados durante os processos de degradação de clorpromazina, clozapina, haloperidol, olanzapina, risperidona e pimizida empregando a técnica instrumental de cromatografia Líquida acoplada ao Espectrômetro de Massas em série (LC-MS/MS), ou de alta resolução (LC-TOF ou LC-QTOF).
- Verificar a toxicidade dos produtos de degradação;
- Avaliar e propor rotas de degradação para os antipsicóticos estudados.



## 8. REFERÊNCIAS

ABELLÁN, M. N.; BAYARRI, B.; GIMÉNEZ, J.; COSTA, J. Photocatalytic degradation of sulfamethoxazole in aqueous suspension of TiO<sub>2</sub>. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 74, n. 3-4, p. 233–241, 2007.

ABP. **Estimativas apontam que mais de 450 milhões de pessoas sofrem com transtornos mentais.** Disponível em: <<http://abp.org.br/porta1/clippingsis/exibClipping/?clipping=12532>>. Acesso em: 1 jan. 2016.

AKANDE, M. G.; ORN, S.; NORRGREN, L. Evaluation of the toxic Effects of clozapine in zebra fish (*Danio rerio*) embryos with the fish embryo toxicity test. **International Journal on Pharmaceutical and Biomedical Research**, v. 1, n. 4, p. 90–94, 2010.

AL AUKIDY, M.; VERLICCHI, P.; VOULVOULIS, N. A framework for the assessment of the environmental risk posed by pharmaceuticals originating from hospital effluents. **Science of the Total Environment**, v. 493, p. 54–64, 2014.

ALBANO, F. de M.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T. **Validação e garantia da qualidade de ensaios laboratoriais- guia prático.** 1. ed. Brasil: Rede de Metrologia RS, 2009.

ANDRUCH, V.; BURDEL, M.; KOCÚROVÁ, L.; ŠANDREJOVÁ, J.; BALOGH, I. S. Trends in Analytical Chemistry Application of ultrasonic irradiation and vortex agitation in solvent microextraction. **TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY**, v. 49, p. 1–19, 2013.

ANTONIOU, M. G.; HEY, G.; RODRÍGUEZ VEGA, S.; SPILIOPOULOU, A.; FICK, J.; TYSKLIND, M.; LA COUR JANSEN, J.; ANDERSEN, H. R. Required ozone doses for removing pharmaceuticals from wastewater effluents. **Science of the Total Environment**, v. 456-457, p. 42–49, 2013.

ANVISA. **RESOLUÇÃO-RE Nº 899, DE 29 DE MAIO DE 2003.** Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE\\_899\\_2003\\_Determina+a+publicação+do+Guia+para+validação+de+métodos+analíticos+e+bioanalíticos.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publicação+do+Guia+para+validação+de+métodos+analíticos+e+bioanalíticos.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 1 jan. 2014.

ANVISA. **RESOLUÇÃO RDC Nº 306, DE 7 DE DEZEMBRO DE 2004.** Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2004/res0306\\_07\\_12\\_2004.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2004/res0306_07_12_2004.html)>. Acesso em: 1 jan. 2016.

ANVISA. **Boletim de farmacoepidemiologia do sngpc.** Brasília-DF: SNGPC-ANVISA, 2011.

ARNOLD, K. E.; BOXALL, A. B. A.; BROWN, A. R.; CUTHBERT, R. J.; GAW, S.; HUTCHINSON, T. H.; JOBLING, S.; MADDEN, J. C.; METCALFE, C. D.; NAIDO, V.; SHORE, R. F.; SMITS, J. E.; TAGGART, M. A.; THOMPSON, H. M. Assessing the exposure risk and impacts of pharmaceuticals in the environment on individuals and ecosystems. **Biology Letters**, v. 9, p. 4, 2013.

ARSAND, D. R. **Anti-inflamatório dexametasona: estudos de biodegradabilidade, toxicidade, ocorrência e degradação oxidativa**

**avançada em efluente hospitalar.** 2010. Tese de Doutorado (Doutorado em Química Analítica)-Universidade Federal de Santa Maria, 2010.

ARSAND, D. R.; KÜMMERER, K.; MARTINS, A. F. Removal of dexamethasone from aqueous solution and hospital wastewater by electrocoagulation. **Science of the Total Environment**, v. 443, p. 351–357, 2013.

ASGHARI, A.; FAHIMI, E.; BAZREGAR, M.; RAJABI, M.; BOUTORABI, L. Rapid determination of some psychotropic drugs in complex matrices by tandem dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography. **Journal of chromatography B**, v. 1052, p. 51–59, 2017.

AUKIDY, M.; VERLICCHI, P.; JELIC, A.; PETROVIC, M.; BARCELÒ, D. Monitoring release of pharmaceutical compounds: occurrence and environmental risk assessment of two WWTP effluents and their receiving bodies in the Po Valley, Italy. **The Science of the total environment**, v. 438, p. 15–25, 2012.

AZUMA, T.; ARIMA, N.; TSUKADA, A.; HIRAMI, S.; MATSUOKA, R.; MORIWAKE, R.; ISHIUCHI, H.; INOYAMA, T.; TERANISHI, Y.; YAMAOKA, M.; MINO, Y.; HAYASHI, T.; FUJITA, Y.; MASADA, M. Detection of pharmaceuticals and phytochemicals together with their metabolites in hospital effluents in Japan, and their contribution to sewage treatment plant influents. **The Science of the total environment**, v. 548-549, p. 189–197, 2016.

BALAKRISHNA, K.; RATH, A.; PRAVEENKUMARREDDY, Y.; GURUGE, K. S.; SUBEDI, B. A review of the occurrence of pharmaceuticals and personal care products in Indian water bodies. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 137, p. 113–120, 2017.

BAZREGAR, M.; RAJABI, M.; YAMINI, Y.; SAFFARZADEH, Z.; ASGHARI, A. Tandem dispersive liquid-liquid microextraction as an efficient method for determination of basic drugs in complicated matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1429, p. 13–21, 2016.

BERCU, J. P.; PARKE, N. J.; FIORI, J. M.; MEYERHOFF, R. D. Human health risk assessments for three neuropharmaceutical compounds in surface waters. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 50, n. 3, p. 420–427, 2008.

BEZERRA, M. A.; DOS SANTOS, Q. O.; SANTOS, A. G.; NOVAES, C. G.; FERREIRA, S. L. C.; DE SOUZA, V. S. Simplex optimization: A tutorial approach and recent applications in analytical chemistry. **Microchemical Journal**, v. 124, p. 45–54, 2016.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965–977, 2008.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no Meio Ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523–530, 2003.

BOIX, C.; IBÁÑEZ, M.; SANCHO, J. V.; RAMBLA, J.; ARANDA, J. L.; BALLESTER, S.; HERNÁNDEZ, F. Fast determination of 40 drugs in water using large volume direct injection liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, ago. 2014.

BOREEN, A. L.; ARNOLD, W. a.; MCNEILL, K. Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment: A review. **Aquatic Sciences**, v. 65, n. 4, p. 320–341, 2003.

BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C. de; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. 1. ed. ed.Rio de Janeiro: LTC, 2015.

BOROVA, V. L.; MARAGOU, N. C.; GAGO-FERRERO, P.; PISTOS, C.; THOMAIDIS, N. S. Highly sensitive determination of 68 psychoactive pharmaceuticals, illicit drugs, and related human metabolites in wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 406, p. 4273–4285, 2014.

BRAMBILLA, G.; MATTIOLI, F.; MARTELLI, A. Genotoxic and carcinogenic effects of antipsychotics and antidepressants. **Toxicology**, v. 261, n. 3, p. 77–88, 2009.

BRÉCHET, C.; PLANTIN, J.; SAUGET, M.; THOUVEREZ, M.; TALON, D.; CHOLLEY, P.; GUYEUX, C.; HOCQUET, D.; BERTRAND, X. Wastewater treatment plants release large amounts of extended-spectrum ??-lactamase-producing escherichia coli into the environment. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 12, p. 1658–1665, 2014.

BRENNER, C. G. B. **Antiandrogênios em efluente hospitalar: extração com barras poliméricas, quantificação, identificação de metabólitos e subprodutos, proposição de rotas de degradação por processos avançados de oxidação**. 2013. Tese de doutorado (Doutorado em Química Analítica)-Universidade Federal de Santa Maria, 2013.

BRENNER, C. G. B.; MALLMANN, C. a.; ARSAND, D. R.; MAYER, F. M.; MARTINS, A. F. Determination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim and Their Metabolites in Hospital Effluent. **Clean - Soil, Air, Water**, v. 39, n. 1, p. 28–34, 2011.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604–1617, 2011.

CALDAS, S. S.; ROMBALDI, C.; DE OLIVEIRA ARIAS, J. L.; MARUBE, L. C.; PRIMEL, E. G. Multi-residue method for determination of 58 pesticides, pharmaceuticals and personal care products in water using solvent demulsification dispersive liquid–liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 146, p. 676–688, 2016.

CALISTO, V.; DOMINGUES, M. R. M.; ESTEVES, V. I. Photodegradation of psychiatric pharmaceuticals in aquatic environments - Kinetics and photodegradation products. **Water Research**, v. 45, n. 18, p. 6097–6106, 2011.

CALISTO, V.; ESTEVES, V. I. Psychiatric pharmaceuticals in the environment. **Chemosphere**, v. 77, n. 10, p. 1257–1274, 2009.

CALZA, P.; HADJICOSTAS, C.; SAKKAS, V. a.; SARRO, M.; MINERO, C.; MEDANA, C.; ALBANIS, T. a. Photocatalytic transformation of the antipsychotic drug risperidone in aqueous media on reduced graphene oxide—TiO<sub>2</sub> composites. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 183, p. 96–106, 2016.

CARLSON, J. C.; STEFAN, M. I.; PARNIS, J. M.; METCALFE, C. D. Direct UV photolysis of selected pharmaceuticals, personal care products and endocrine disruptors in aqueous solution. **Water Research**, v. 84, p. 350–361, 2015.

CERQUEIRA, M. B. R.; SOARES, K. L.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Sample as solid support in MSPD: A new possibility for determination of pharmaceuticals, personal care and degradation products in sewage sludge. **Chemosphere**, v. 211, p. 875–883, 2018.

CHEMICALIZE. **Calculation**. Disponível em: <<https://chemicalize.com/#/>>. Acesso em 10 Ago. 2018.

CHONG, M. N.; JIN, B.; CHOW, C. W. K.; SAINT, C. Recent developments in photocatalytic water treatment technology: A review. **Water Research**, v. 44, n. 10, p. 2997–3027, 2010.

CONAMA. **Proposta de revisão da RDC 357/05 do Subgrupo Lançamento de Efluentes de Serviços de Saúde - LESS**.

CORCORAN, J.; WINTER, M. J.; TYLER, C. R. Pharmaceuticals in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish. **Critical reviews in toxicology**, v. 40, n. 4, p. 287–304, 2010.

CUNICO, M. W. M.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; ZAWADZKI, S. F.; PERALTA-ZAMORA, P.; VOLPATO, N. Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**, v. 9, n. 1, p. 23–32, 2008.

DA SILVA, D. S.; BRENNER, C. G. B.; MAYER, F. M.; MONTIPÓ, S.; MARTINS, A. F. PDMS extraction bars for the determination of volatile aromatic hydrocarbons in water and wastewater. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 2, p. 362–368, 2013.

DAUGHTON, C. G. Non-regulated water contaminants: Emerging research. **Environmental Impact Assessment Review**, v. 24, n. 7-8, p. 711–732, 2004.

DAVID, A.; LANGE, A.; TYLER, C. R.; HILL, E. M. Concentrating mixtures of neuroactive pharmaceuticals and altered neurotransmitter levels in the brain of fish exposed to a wastewater effluent. **Science of the Total Environment**, v. 621, p. 782–790, 2018.

DAZZAN, P.; MORGAN, K. D.; ORR, K.; HUTCHINSON, G.; CHITNIS, X.; SUCKLING, J.; FEARON, P.; MCGUIRE, P. K.; MALLETT, R. M.; JONES, P. B.; LEFF, J.; MURRAY, R. M. Different effects of typical and atypical antipsychotics on grey matter in first episode psychosis: the AESOP study. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 4, p. 765–774, 2005.

DE ALMEIDA, C. A. a; BRENNER, C. G. B.; MINETTO, L.; MALLMANN, C. a; MARTINS, A. F. Determination of anti-anxiety and anti-epileptic drugs in hospital effluent and a preliminary risk assessment. **Chemosphere**, v. 93, n. 10, p. 2349–55, 2013.

DE ALMEIDA, C. A. A.; OLIVEIRA, M. S.; MALLMANN, C. a.; MARTINS, A. F. Determination of the psychoactive drugs carbamazepine and diazepam in hospital effluent and identification of their metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 21, p. 17192–17201, 2015.

DE SENA, E. P.; SANTOS SAMPAIO, A.; DE CASTRO QUARANTINI, L.; DE OLIVEIRA, I. R. Diabetes mellitus e antipsicóticos atípicos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, n. 4, p. 253–257, 2003.

DEAR, J.; BATEMAN, D. N. Antipsychotic drugs. **Medicine**, v. 40, n. 3, p. 105–106, 2016.

DEBLONDE, T.; COSSU-LEGUILLE, C.; HARTEMANN, P. Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 214, n. 6, p. 442–448, 2011.

DESAI, M.; TANUS-SANTOS, J. E.; LI, L.; GORSKI, J. C.; AREFAYENE, M.; LIU, Y.; DESTA, Z.; FLOCKHART, D. a. Pharmacokinetics and QT interval pharmacodynamics of oral haloperidol in poor and extensive metabolizers of CYP2D6. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 3, n. 2, p. 105–113, 2003.

DOLL, T. E.; FRIMMEL, F. H. Fate of pharmaceuticals - Photodegradation by simulated solar UV-light. **Chemosphere**, v. 52, n. 10, p. 1757–1769, 2003.

DU, J.; YAN, H.; SHE, D.; LIU, B.; YANG, G. Simultaneous determination of cypermethrin and permethrin in pear juice by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography. **Talanta**, v. 82, p. 698–703, 2010.

EBSERH. **Hospital universitário de santa maria – husm/ufsm**. Brasília - DF: EBSEH, 2013.

EMA. **Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use**. doc. ref. [emea/chmp/swp/4447/00](http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/ich/ichwp444700.pdf). London-uk: COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE (CHMP), 2006.

EMMANUEL, E.; PERRODIN, Y.; KECK, G.; BLANCHARD, J.-M.; VERMANDE, P. Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. **Journal of hazardous materials**, v. 117, n. 1, p. 1–11, 2005.

ENVIRONMENTAL HEALTH ANALYSIS CENTER. **Persistent, bioaccumulative and toxic profiles estimated for organic chemicals**. Disponível em: <<http://www.pbtprofiler.net/default.asp>>. Acesso em: 4 jan. 2018.

ESCHER, B. I.; BAUMGARTNER, R.; KOLLER, M.; TREYER, K.; LIENERT, J.; MCARDELL, C. S. Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. **Water Research**, v. 45, n. 1, p. 75–92, 2011.

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics**. Teddington: LGC, 1998.

FATTA-KASSINOS, D.; VASQUEZ, M. I.; KÜMMERER, K. Transformation products of pharmaceuticals in surface waters and wastewater formed during photolysis and advanced oxidation processes - Degradation, elucidation of

byproducts and assessment of their biological potency. **Chemosphere**, v. 85, n. 5, p. 693–709, 2011.

FENG, M.; YAN, L.; ZHANG, X.; SUN, P.; YANG, S.; WANG, L.; WANG, Z. Science of the Total Environment Fast removal of the antibiotic flumequine from aqueous solution by ozonation: Influencing factors, reaction pathways, and toxicity evaluation. **Science of the Total Environment**, v. 541, p. 167–175, 2016.

FERNÁNDEZ, C.; GONZÁLEZ-DONCEL, M.; PRO, J.; CARBONELL, G.; TARAZONA, J. V. Occurrence of pharmaceutically active compounds in surface waters of the Henares-jarama-tajo river system (Madrid, Spain) and a potential risk characterization. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 543–551, 2010.

FERRER, C.; MARTÍNEZ-BUENO, M. J.; LOZANO, A.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Pesticide residue analysis of fruit juices by LC-MS/MS direct injection. One year pilot survey. **Talanta**, v. 83, n. 5, p. 1552–1561, 2011.

FRANK, C. da S. **Concepção, construção e avaliação de fotorreatores catalisados na degradação de carga poluente e amoxicilina em efluente hospitalar**. 2008. Tese de doutorado (Doutorado em Química Analítica)-Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

FRANKE, C. How Meaningful is the Bioccentration Factor for Risk Assessment? **Chemosphere**, v. 32, n. 10, p. pp. 1897–1905, 1996.

FRIEDRICH, M. T. **Desenvolvimento e validação de método multirresíduo para determinação de agrotóxicos em trigo por LC-MS/MS e GC-MS/MS**. 2014. Tese de doutorado (Doutorado em Química Analítica)-Universidade Federal de Santa Maria. 2014.

GAGO-FERRERO, P.; BOROVA, V.; DASENAKI, M. E.; THOMAIDIS, N. S. Simultaneous determination of 148 pharmaceuticals and illicit drugs in sewage sludge based on ultrasound-assisted extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 4287–4297, 2015.

GOGATE, P. R.; PANDIT, A. B. A review of imperative technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions. **Advances in Environmental Research**, v. 8, p. 501–551, 2004.

GOSSETT, R. W.; BROWN, D. a; YOUNG, D. R. Predicting the Bioaccumulation of Organic-Compounds in Marine Organisms using Octanol Water Partition-Coefficients. **Marine pollution bulletin**, v. 14, n. 10, p. 387–392, 1983.

GRABIC, R.; FICK, J.; LINDBERG, R. H.; FEDOROVA, G.; TYSKLIND, M. Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in environmental samples using liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. **Talanta**, v. 100, p. 183–95, 2012.

GRACIA-LOR, E.; SANCHO, J. V; SERRANO, R.; HERNÁNDEZ, F. Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia. **Chemosphere**, v. 87, p. 453–462, 2012.



GRACIA-LOR, E.; SANCHO, J. V.; HERNÁNDEZ, F. Multi-class determination of around 50 pharmaceuticals, including 26 antibiotics, in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 16, p. 2264–2275, 2011.

GUNTEN, U. Von. Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation. **Water Research**, v. 37, p. 1443–1467, 2003.

GURKE, R.; ROSSMANN, J.; SCHUBERT, S.; SANDMANN, T.; RÖSSLE, M.; OERTEL, R.; FAULER, J. Development of a SPE-HPLC-MS/MS method for the determination of most prescribed pharmaceuticals and related metabolites in urban sewage samples. **Journal of chromatography B**, v. 990, p. 23–30, 2015.

HENNION, M.-C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 856, p. 3–54, 1999.

HENRIQUES, D. M. **Cefalosporinas e surfactantes não-iônico em efluente hospitalar: determinação, degradação por meio de fotólise e eletrocoagulação e identificação de subprodutos e metabólitos**. 2009. Tese de Doutorado (Doutorado em Química Analítica)-Universidade Federal de Santa Maria, 2009.

HERNÁNDEZ, F.; IBÁÑEZ, M.; PORTOLÉS, T.; CERVERA, M. I.; SANCHO, J. V.; LÓPEZ, F. J. Advancing Towards Universal Screening for Organic Pollutants in Waters. **Journal of Hazardous Materials**, v. 282, p. 86-95, 2015.

HERNANDO, M. D.; MEZCUA, M.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R.; BARCELÓ, D. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. **Talanta**, v. 69, p. 334–342, 2006.

HEY, G.; VEGA, S. R.; FICK, J.; TYSKLIND, M.; LEDIN, A.; JANSEN, J. C.; ANDERSEN, H. R. Removal of pharmaceuticals in WWTP effluents by ozone and hydrogen peroxide. **African Journal online**, v. 40, n. 1, p. 165–174, 2014.

HUSM. **Hospital Universitário de Santa Maria**. Disponível em: <<http://www.husm.ufsm.br/>>. Acesso em: 20 mar. 2016.

INMETRO. **ORIENTAÇÕES SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE ENSAIOS QUÍMICOS-DOQ-CGCRE-008/Revisão 02**. Disponível em: <[http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_02.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf)>. Acesso em: 15 jul. 2015.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008/Revisão 04**. Disponível em: <[http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8\\_04.pdf](http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf)>. Acesso em: 12 jul. 2015.

ISIDORI, M.; LAVORGNA, M.; NARDELLI, A.; PARRELLA, A.; PREVITERA, L.; RUBINO, M. Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products. **Science of the Total Environment**, v. 348, n. 1-3, p. 93–101, 2005.

JAVOID, J. I. Clinical pharmacokinetics of antipsychotics. **Journal of clinical pharmacology**, v. 34, n. 4, p. 286–295, 1994.

K'OREJE, K. O.; DEMEESTERE, K.; DE WISPELAERE, P.; VERGEYNST, L.; DEWULF, J.; VAN LANGENHOVE, H. From multi-residue screening to target analysis of pharmaceuticals in water: development of a new approach based on magnetic sector mass spectrometry and application in the Nairobi River basin, Kenya. **The Science of the total environment**, v. 437, p. 153–64, 2012.

K'OREJE, K.; VERGEYNST, L.; OMBAKA, D.; WISPELAERE, P. De; OKOTH, M.; LANGENHOVE, H. Van; DEMEESTERE, K. Occurrence patterns of pharmaceutical residues in wastewater, surface water and groundwater of Nairobi and Kisumu city, Kenya. **Chemosphere**, v. 149, p. 238–244, 2016.

KALICHAK, F.; IDALENCIO, R.; ROSA, J. G. S.; OLIVEIRA, T. a De; KOAKOSKI, G.; GUSSO, D.; ABREU, M. S. De; GIACOMINI, A. C. V.; BARCELLOS, H. H. a; FAGUNDES, M.; PIATO, A. L.; BARCELLOS, L. J. G. Waterborne psychoactive drugs impair the initial development of Zebrafish. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 41, p. 89–94, 2016.

KANAKARAJU, D.; GLASS, B. D.; OELGEMÖLLER, M. Advanced oxidation process-mediated removal of pharmaceuticals from water: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 219, p. 189–207, 2018.

KATAOKA, H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 232–244, 2003.

KAWABATA, K.; SUGIHARA, K.; SANOH, S.; KITAMURA, S.; OHTA, S. Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment by sunlight and UV-A, -B and -C irradiation. **The Journal of toxicological sciences**, v. 38, n. 2, p. 215–223, 2013.

KEITH, L. H. Recent Advances in the Identification and Analysis of Organic Pollutants in Water. **Life Sciences**, v. 24, n. c, p. 2093–2098, 1979.

KERBUSCH, T.; DESTA, Z.; SOUKHOVA, N. V; THACKER, D.; FLOCKHART, D. a. Sensitive assay for pimozide in human plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to pharmacokinetic studies. **Journal of chromatography B**, v. 694, p. 163–168, 1997.

KHATAEE, a. R.; FATHINIA, M.; JOO, S. W. Simultaneous monitoring of photocatalysis of three pharmaceuticals by immobilized TiO<sub>2</sub> nanoparticles: Chemometric assessment, intermediates identification and ecotoxicological evaluation. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 112, p. 33–45, 2013.

KHETAN, S. K.; COLLINS, T. J. Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to Green Chemistry. **Chemical reviews**, v. 107, n. 6, p. 2319–2364, jun. 2007.

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.

KÜMMERER, K. Drugs in the environment: Emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - A review. **Chemosphere**, v. 45, n. 6-7, p. 957–969, 2001.

KÜMMERER, K. **Pharmaceuticals in the environmental. sources, fate, effects and risks.** 3ª Ed ed. Berlin Heidelberg: Springer, 2008.

KÜMMERER, K. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. **Journal of Environmental Management**, v. 90, p. 2354–2366, 2009a.

KUSTER, A.; ADLER, N. Pharmaceuticals in the environment: scientific evidence of risks and its regulation. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 369, n. 1656, p. 1–8, 2014.

LAM, M. W.; YOUNG, C. J.; MABURY, S. a. Aqueous photochemical reaction kinetics and transformations of fluoxetine. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 2, p. 513–522, 2005.

LI, W. C. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. **Environmental Pollution**, v. 187, p. 193–201, 2014.

LIMA, S. B. S. de; LEITE, J. L.; ERDMANN, A. L.; PROCHNOW, A. G.; GARCIA, V. R. R. L.; STIPP, M. A. C. Resgatando fragmentos da história da enfermagem do Hospital Universitário de Santa Maria – RS/BRASIL. **História de Enfermagem:Revista Eletrônica-HERE**, v. 1, n. 1, p. 115–137, 2010.

LINDSLEY, C. W. The Top Prescription Drugs of 2011 in the United States: Antipsychotics and Antidepressants Once Again Lead CNS Therapeutics. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 3, n. 8, p. 630–631, 2012.

LOGARINHO, F.; ROSADO, T.; LOURENÇO, C.; BARROSO, M.; ARAUJO, A. R. T. S.; CALLARDO, E. Determination of antipsychotic drugs in hospital and wastewater treatment plant samples by gas chromatography/tandem mass. **Journal of Chromatography B**, v. 1038, p. 127–135, 2016.

LOOS, R.; CARVALHO, R.; ANTÓNIO, D. C.; COMERO, S.; LOCORO, G.; TAVAZZI, S.; PARACCHINI, B.; GHIANI, M.; LETTIERI, T.; BLAHA, L.; JAROSOVA, B.; VOORSPOELS, S.; SERVAES, K.; HAGLUND, P.; FICK, J.; LINDBERG, R. H.; SCHWESIG, D.; GAWLIK, B. M. EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents. **Water research**, v. 47, n. 17, p. 6475–87, 2013.

LÓPEZ-SERNA, R.; JURADO, A.; VÁZQUEZ-SUÑÉ, E.; CARRERA, J.; PETROVIĆ, M.; BARCELÓ, D. Occurrence of 95 pharmaceuticals and transformation products in urban groundwaters underlying the metropolis of Barcelona, Spain. **Environmental Pollution**, v. 174, p. 305–315, 2013.

LUO, Y.; GUO, W.; HAO, H.; DUC, L.; IBNEY, F.; ZHANG, J.; LIANG, S.; WANG, X. C. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, v. 473-474, p. 619–641, 2014.

MARTINS, A. F.; DOS SANTOS, J. B.; TODESCHINI, B. H.; SALDANHA, L. F.; DA SILVA, D. S.; REICHERT, J. F.; SOUZA, D. M. Occurrence of cocaine and metabolites in hospital effluent - A risk evaluation and development of a HPLC method using DLLME. **Chemosphere**, v. 170, p. 176–182, 2017a.

MARTINS, A. F.; FRANK, C. D. S.; ALTISSIMO, J.; DE OLIVEIRA, J. a.; DA SILVA, D. S.; REICHERT, J. F.; SOUZA, D. M. Determination of statin drugs in

hospital effluent with dispersive liquid–liquid microextraction and quantification by liquid chromatography. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 52, n. 10, p. 939–945, 2017b.

MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 1, p. 35–51, 2012.

MATONGO, S.; BIRUNGI, G.; MOODLEY, B.; NDUNGU, P. Pharmaceutical residues in water and sediment of Msunduzi River. **Chemosphere**, v. 134, p. 133–140, 2015.

MAYER, F. M. **Parabenos em efluente hospitalar: quantificação e identificação de metabólitos e subprodutos de oxidação avançada**. 2013. Dissertação de mestrado (Mestrado em Química Analítica)-Universidade Federal de Santa Maria, 2013.

MENDOZA, A.; ACEÑA, J.; PÉREZ, S.; LÓPEZ DE ALDA, M.; BARCELÓ, D.; GIL, A.; VALCÁRCEL, Y. Pharmaceuticals and iodinated contrast media in a hospital wastewater: A case study to analyse their presence and characterise their environmental risk and hazard. **Environmental Research**, v. 140, p. 225–241, 2015.

MERCOLINI, L.; BUGAMELLI, F.; KENNDLER, E.; BONCOMPAGNI, G.; FRANCHINI, L.; RAGGI, M. A. Simultaneous determination of the antipsychotic drugs levomepromazine and clozapine and their main metabolites in human plasma by a HPLC-UV method with solid-phase extraction. **Journal of chromatography B**, v. 846, p. 273–280, 2007.

MESQUITA BRITO, N.; JUNIOR, O. P. de A.; POLESE, L.; LÚCIA RIBEIRO, M. Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129–146, 2003.

MEYLAN, W. I. M. M.; OWARD, P. H. H. H.; OETHLING, R. O. S. B. Improved Method for Estimating Water Solubility From Octanol / Water Partition Coefficient. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 4, p. 664–672, 1999.

MILLER, T. H.; BURY, N. R.; OWEN, S. F.; MACRAE, J. I.; BARRON, L. P. A review of the pharmaceutical exposome in aquatic fauna. **Environmental Pollution**, v. 239, p. 129–146, 2018.

MINETTO, L. **Antibióticos macrolídeos: determinação e identificação de metabólitos e subprodutos de degradação em efluente hospitalar**. 2013. Tese de doutorado (Doutorado em Química Analítica)-Universidade Federal de Santa Maria, 2013.

MINETTO, L.; MAYER, F. M.; MALLMANN, C. a.; MARTINS, A. F. Quantification of Diclofenac in Hospital Effluent and Identification of Metabolites and Degradation Products. **Clean - Soil, Air, Water**, v. 40, n. 9, p. 950–957, 2012.

MIYAMOTO, S.; DUNCAN, G. E.; MARX, C. E.; LIEBERMAN, J. a. Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. **Molecular psychiatry**, v. 10, n. 1, p. 79–104, 2005.

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

MOREIRA, B. J.; YOKOYA, J. M. C.; GAITANI, C. M. De. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos , inovações e aplicações biológicas. **Scientia Chromatographica**, v. 6, n. 3, p. 186–204, 2014.

NIESSEN, W. M. A.; MANINI, P.; ANDREOLI, R. Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography-mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 25, p. 881–899, 2006.

NOVÁKOVÁ, L.; VLČKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, p. 8–35, 2009.

NÚÑEZ, O.; GALLART-AYALA, H.; MARTINS, C. P. B.; LUCCHI, P. New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1228, p. 298–323, 2012.

OLIVEIRA, T. S.; MURPHY, M.; MENDOLA, N.; WONG, V.; CARLSON, D.; WARING, L. Characterization of Pharmaceuticals and Personal Care products in hospital effluent and waste water influent/effluent by direct-injection LC-MS-MS. **Science of the Total Environment**, v. 518-519, p. 459–478, 2015.

ONU. **Uma em cada 10 pessoas sofre de doença de saúde mental, afirma OMS**. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/uma-em-cada-10-pessoas-sofre-de-doenca-de-saude-mental-oms/>>. Acesso em: 7 jan. 2016.

OPAS. **Folha informativa - Transtornos mentais**. Disponível em: <[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5652:folha-informativa-transtornos-mentais&Itemid=839](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5652:folha-informativa-transtornos-mentais&Itemid=839)>.

ORIAS, F.; PERRODIN, Y. Characterisation of the ecotoxicity of hospital effluents : A review. **Science of the Total Environment**, v. 454-455, p. 250–276, 2013.

ORIAS, F.; PERRODIN, Y. Pharmaceuticals in hospital wastewater: Their ecotoxicity and contribution to the environmental hazard of the effluent. **Chemosphere**, v. 115, n. 1, p. 31–39, 2014.

OSHA. **Occupational Safety & Health Administration**. Disponível em: <<https://www.osha.gov/>>. Acesso em: 1 jan. 2016.

PAIVA, J. B. D. de; GARCIA, J. B.; BRITES, A. P. Z.; SCAPIN, J.; HAGEMANN, S. E.; BELING, F.; ABELIN, S.; CARMO, J. A. R. do. **Demandas De Água Na Bacia Do Rio Vacacaí M Irim**.

PATHAK, a.; RAJPUT, S. J. Development of a stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of olanzapine and fluoxetine in combined dosage forms. **Journal of Chromatographic Science**, v. 47, n. 7, p. 605–611, 2009.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L. de; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitaria Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 106–110, 2005.

PETROVI, M.; BILJANA, Š.; JELENA, Ž.; FERRANDO-CLIMENT, L.; BARCELO, D. Science of the Total Environment Determination of 81 pharmaceutical drugs

by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with hybrid triple quadrupole – linear ion trap in different types of water in Serbia. **Science of the Total Environment**, v. 469, p. 415–428, 2014.

PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. LC-MS for identifying photodegradation products of pharmaceuticals in the environment. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 486–493, 2007.

PETROVIC, M.; DE ALDA, M. J. L.; DIAZ-CRUZ, S.; POSTIGO, C.; RADJENOVIC, J.; GROS, M.; BARCELO, D. Fate and removal of pharmaceuticals and illicit drugs in conventional and membrane bioreactor wastewater treatment plants and by riverbank filtration. **Philosophical Transactions of the Royal Society A**, v. 367, n. 1904, p. 3979–4003, 2009.

PETRUSKA, J. M.; FRANK, D. W.; FREEMAN, G. B.; EVANS, E. W.; MACDONALD, J. S. Toxicity and Carcinogenicity Studies of Chlorpromazine Hydrochloride and p -Cresidine in the p53 Heterozygous Mouse Model. **Toxicologic Pathology**, v. 30, n. 6, p. 696–704, 2002.

RAMBLA-ALEGRE, M.; ESTEVE-ROMERO, J.; CARDA-BROCH, S. Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. **Journal of Chromatography A**, v. 1232, p. 101–109, 2012.

REGULSKA, E.; KARPIŃSKA, J. Photocatalytic degradation of olanzapine in aqueous and river waters suspension of titanium dioxide. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 117-118, p. 96–104, 2012.

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; MILANI HOSSEINI, M.-R.; AGHAEI, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of chromatography. A**, v. 1116, p. 1–9, 2006.

REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2342–2357, 2010.

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

RIBEIRO, F. A. de L.; FERREIRA, M. M. C. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164–171, 2008.

RIVERA-JAIMES, J. A.; POSTIGO, C.; MELGOZA-ALEMÁN, R. M.; ACEÑA, J.; BARCELÓ, D.; LÓPEZ DE ALDA, M. Study of pharmaceuticals in surface and wastewater from Cuernavaca, Morelos, Mexico: Occurrence and environmental risk assessment. **Science of the Total Environment**, v. 613-614, p. 1263–1274, 2018.

SANGION, A.; GRAMATICA, P. PBT assessment and prioritization of contaminants of emerging concern: Pharmaceuticals. **Environmental Research**, v. 147, p. 297–306, 2016.

SANTE. **Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. Documento nº

11813/2017. Disponível em:  
[https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides\\_mrl\\_guidelines\\_wrkdoc\\_2017-11813.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf). Acesso em 15 Mai. 2018.

SANTOS, L. H. M. L. M.; GROS, M.; RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; DELERUE-MATOS, C.; PENA, A.; BARCELÓ, D.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: identification of ecologically relevant pharmaceuticals. **The Science of the total environment**, v. 461-462, p. 302–316, 2013.

SHAH, C. R.; SUHAGIA, B. N.; SHAH, N. J.; PATEL, D. R.; PATEL, N. M. Stability-indicating Simultaneous HPTLC Method for Olanzapine and Fluoxetine in Combined Tablet Dosage Form. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 70, p. 251–255, 2008.

SHEEHAN, J. J.; SLIWA, J. K.; AMATNIEK, J. C.; GRINSPAN, A.; CANUSO, C. M. Atypical antipsychotic metabolism and excretion. **Current drug metabolism**, v. 11, n. 6, p. 516–525, 2010.

SHENG, L.-H.; CHEN, H.-R.; HUO, Y.-B.; WANG, J.; ZHANG, Y.; YANG, M.; ZHANG, H.-X. Simultaneous determination of 24 antidepressant drugs and their metabolites in wastewater by ultra-high performance Liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Molecules**, v. 19, p. 1212–1222, 2014.

SILVA, C. E. da; SILVEIRA, G. L. da; IRION, C. A. de O.; CRUZ, J. C. Monitoramento quali-quantitativo dos recursos hídricos em pequena bacia. In: Gestión inteligente de los recursos naturales. Desarrollo y salud: Anales del XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Cancun, Quintana Roo, México. **Anais...** Cancun, Quintana Roo, México: Federación mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, 2002.

SILVA, D. S. da. **Hpas em águas superficiais e efluente hospitalar: degradação por paos e desenvolvimento de métodos para a determinação e identificação de subprodutos**. 2016. Tese de Doutorado (Doutorado em Química Analítica)-Universidade Federal de Santa Maria, 2016.

SILVEIRA, M. A. K.; CALDAS, S. S.; GUILHERME, J. R.; COSTA, F. P.; SOARES, B. M.; CERQUEIRA, M. B. R.; GUIMARÃES, B. de S.; PRIMEL, E. G. Quantification of pharmaceuticals and personal care product residues in surface and drinking water samples by SPE and LC-ESI-MS/MS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 9, p. 1385–1395, 2013.

SNYDER, S. a.; WERT, E. C.; REXING, D. J.; ZEGERS, R. E.; DRURY, D. D. Ozone Oxidation of Endocrine Disruptors and Pharmaceuticals in Surface Water and Wastewater. **Ozone: Science & Engineering**, v. 28, n. 6, p. 445–460, 2006.

SOUZA, D. M.; REICHERT, J. F.; MARTINS, A. F. A simultaneous determination of anti-cancer drugs in hospital effluent by DLLME HPLC-FLD, together with a risk assessment. **Chemosphere**, v. 201, p. 178–188, 2018.

STOCKHOLM COUNTY COUNCIL. **Environmentally Classified Pharmaceuticals**. Disponível em:  
<[http://www.janusinfo.se/Global/Miljo\\_och\\_lakemedel/Miljobroschyr\\_2014\\_engelsk\\_webb.pdf](http://www.janusinfo.se/Global/Miljo_och_lakemedel/Miljobroschyr_2014_engelsk_webb.pdf)>. Acesso em: 4 jan. 2018.

SUÁREZ, S.; CARBALLA, M.; OMIL, F.; LEMA, J. M. How are pharmaceutical and personal care products (PPCPs) removed from urban wastewaters? **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 125–138, 2008.

SUAREZ, S.; LEMA, J. M.; OMIL, F. Pre-treatment of hospital wastewater by coagulation-flocculation and flotation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 7, p. 2138–2146, 2009.

SUBEDI, B.; BALAKRISHNA, K.; SINHA, R. K.; YAMASHITA, N.; BALASUBRAMANIAN, V. G.; KANNAN, K. Mass loading and removal of pharmaceuticals and personal care products, including psychoactive and illicit drugs and artificial sweeteners, in five sewage treatment plants in India. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 3, n. 4, p. 2882–2891, 2015.

TARLEY, C. R. T.; SILVEIRA, G.; DOS SANTOS, W. N. L.; MATOS, G. D.; DA SILVA, E. G. P.; BEZERRA, M. A.; MIRÓ, M.; FERREIRA, S. L. C. Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. **Microchemical Journal**, v. 92, n. 1, p. 58–67, 2009.

TGD. **Technical guidance document in support of commission directive 93/67/eec on risk assessment for new notified substances, commission regulation (ec) no. 1488/94 on risk assessment for existing substances and directive 98/8/ec of the european parliament and**. Part II ed.Brussels, Belgium: European Communities, 2003. v. Part II

TRAUTWEIN, C.; KÜMMERER, K. Degradation of the tricyclic antipsychotic drug chlorpromazine under environmental conditions, identification of its main aquatic biotic and abiotic transformation products by LC–MSn and their effects on environmental bacteria. **Journal of Chromatography B**, v. 889-890, p. 24–38, 2012.

TRAWIŃSKI, J.; SKIBIŃSKI, R. Studies on photodegradation process of psychotropic drugs: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 1152–1199, 2017.

TRAWIŃSKI, J.; SKIBIŃSKI, R.; SZYMAŃSKI, P. Investigation of the photolysis and TiO<sub>2</sub>, SrTiO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated photocatalysis of an antipsychotic drug loxapine – Evaluation of kinetics, identification of photoproducts, and in silico estimation of properties. **Chemosphere**, v. 204, p. 1–10, 2018.

UFSM. **Mapa**. Disponível em: <[http://sites.multiweb.ufsm.br/noticias\\_ufsm/images/20111125\\_113514\\_221111\\_geral\\_foto1.jpg](http://sites.multiweb.ufsm.br/noticias_ufsm/images/20111125_113514_221111_geral_foto1.jpg)>. Acesso em: 5 mar. 2016.

UNCETA, N.; SAMPEDRO, M. C.; ABU BAKAR, N. K.; GÓMEZ-CABALLERO, A.; GOICOLEA, M. A.; BARRIO, R. J. Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in wastewaters by dual solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography electrospray ionization ion trap mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1217, n. 20, p. 3392–3399, 2010.

UPG/HUSM. **Plano de atividades práticas de formação profissional-2012**. Disponível em: <<http://200.18.45.28/sites/residencia/images/plano/Plano de Acao SM Hospital.pdf>>. Acesso em: 1 jan. 2015.



VAN OS, J.; KENIS, G.; RUTTEN, B. P. The environment and schizophrenia. **Nature**, v. 468, n. 7321, p. 203–212, 2010.

VANDERFORD, B. J.; SNYDER, S. a. Analysis of Pharmaceuticals in Water by Isotope Dilution Liquid Chromatography / Tandem Mass. **Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 23, p. 7312–7320, 2006.

VASCONCELOS, T. G. **Antimicrobial ciprofloxacina em efluente hospitalar: exposição ambiental, avaliação de risco e degradação através de processos avançados de oxidação**. 2006. Tese de doutorado (Doutorado em Química Analítica)-Universidade Federal de Santa Maria, 2006.

VASCONCELOS, T. G.; KÜMMERER, K.; HENRIQUES, D. M.; MARTINS, A. F. Ciprofloxacin in hospital effluent: Degradation by ozone and photoprocesses. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, n. 1-3, p. 1154–1158, 2009.

VERGEYNST, L.; HAECK, A.; DE WISPELAERE, P.; VAN LANGENHOVE, H.; DEMEESTERE, K. Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography-magnetic sector mass spectrometry: Method quality assessment and application in a Belgian case study. **Chemosphere**, v. 119, p. S2–S8, 2015.

VERLICCHI, P.; AL AUKIDY, M.; GALLETI, A.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Hospital effluent: investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. **The Science of the total environment**, v. 430, p. 109–118, 2012.

VERLICCHI, P.; AL AUKIDY, M.; ZAMBELLO, E. What have we learned from worldwide experiences on the management and treatment of hospital effluent? - An overview and a discussion on perspectives. **Science of the Total Environment**, v. 514, p. 467–491, 2015.

VIDAL, L.; RIEKKOLA, M.-L.; CANALS, A. Ionic liquid-modified materials for solid-phase extraction and separation: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 715, p. 19–41, 2012.

WANG, X.; HAN, J.; XU, L.; GAO, J.; ZHANG, Q. Effects of anthropogenic activities on chemical contamination within the Grand Canal, China. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 177, n. 1-4, p. 127–139, 2011.

WEIGMANN, H.; HÄRTTER, S.; MAEHRLEIN, S.; KIEFER, W.; KRÄMER, G.; DANNHARDT, G.; HIEMKE, C. Simultaneous determination of olanzapine, clozapine and demethylated metabolites in serum by on-line column-switching high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography B**, v. 759, n. 1, p. 63–71, 5 ago. 2001.

WIEROŃSKA, J. M.; ZORN, S. H.; DOLLER, D.; PILC, A. Metabotropic glutamate receptors as targets for new antipsychotic drugs: Historical perspective and critical comparative assessment. **Pharmacology & Therapeutics**, 2015.

WILDE, M. L. **Beta-bloqueadores em efluente hospitalar: ocorrência, degradação por processos avançados de oxidação e identificação de subprodutos**. 2011. Tese de doutorado (Doutorado em Química Analítica)-Universidade Federal de Santa Maria, 2011.

WILDE, M. L.; MONTIPÓ, S.; MARTINS, A. F. Degradation of  $\beta$ -blockers in hospital wastewater by means of ozonation and Fe<sup>2+</sup>/ozonation. **Water Research**, v. 48, n. 1, p. 280–295, 2014.

WOLNICKA-GLUBISZ, A.; LUKASIK, M.; PAWLAK, A.; WIELGUS, A.; NIZIOLEK-KIERECKA, M.; SARNA, T. Peroxidation of lipids in liposomal membranes of different composition photosensitized by chlorpromazine. **Photochemical & photobiological sciences**, v. 8, n. 2, p. 241–247, 2009.

WULFF, C. Clozapina, neutropenia y test de prednisona. **Revista Chilena de Neuro-Psiquiatria**, v. 45, n. 2, p. 114–119, 2007.

YUAN, S.; JIANG, X.; XIA, X.; ZHANG, H.; ZHENG, S. Detection, occurrence and fate of 22 psychiatric pharmaceuticals in psychiatric hospital and municipal wastewater treatment plants in Beijing, China. **Chemosphere**, v. 90, p. 2520–2525, 2013.

ZAHARIA, C.; SUTEU, D. Textile Organic Dyes – Characteristics, Polluting Effects and Separation/Elimination Procedures from Industrial Effluents – A Critical Overview. In: PUZYN, D. T. (Ed.). **Organic Pollutants Ten Years After the Stockholm Convention - Environmental and Analytical Update**. [s.l.] InTech, 2012. p. 1–34.

ZHANG, G.; TERRY, A. V.; BARTLETT, M. G. Sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of olanzapine, risperidone, 9-hydroxyrisperidone, clozapine, haloperidol and ziprasidone in rat brain tissue. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 858, n. 1-2, p. 276–81, 2007.

ZROSTLÍKOVÁ, J.; HAJŠLOVÁ, J.; GODULA, M.; MASTOVSKÁ, K. Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and on-column injection techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices. **Journal of chromatography A**, v. 937, p. 73–86, 2001.

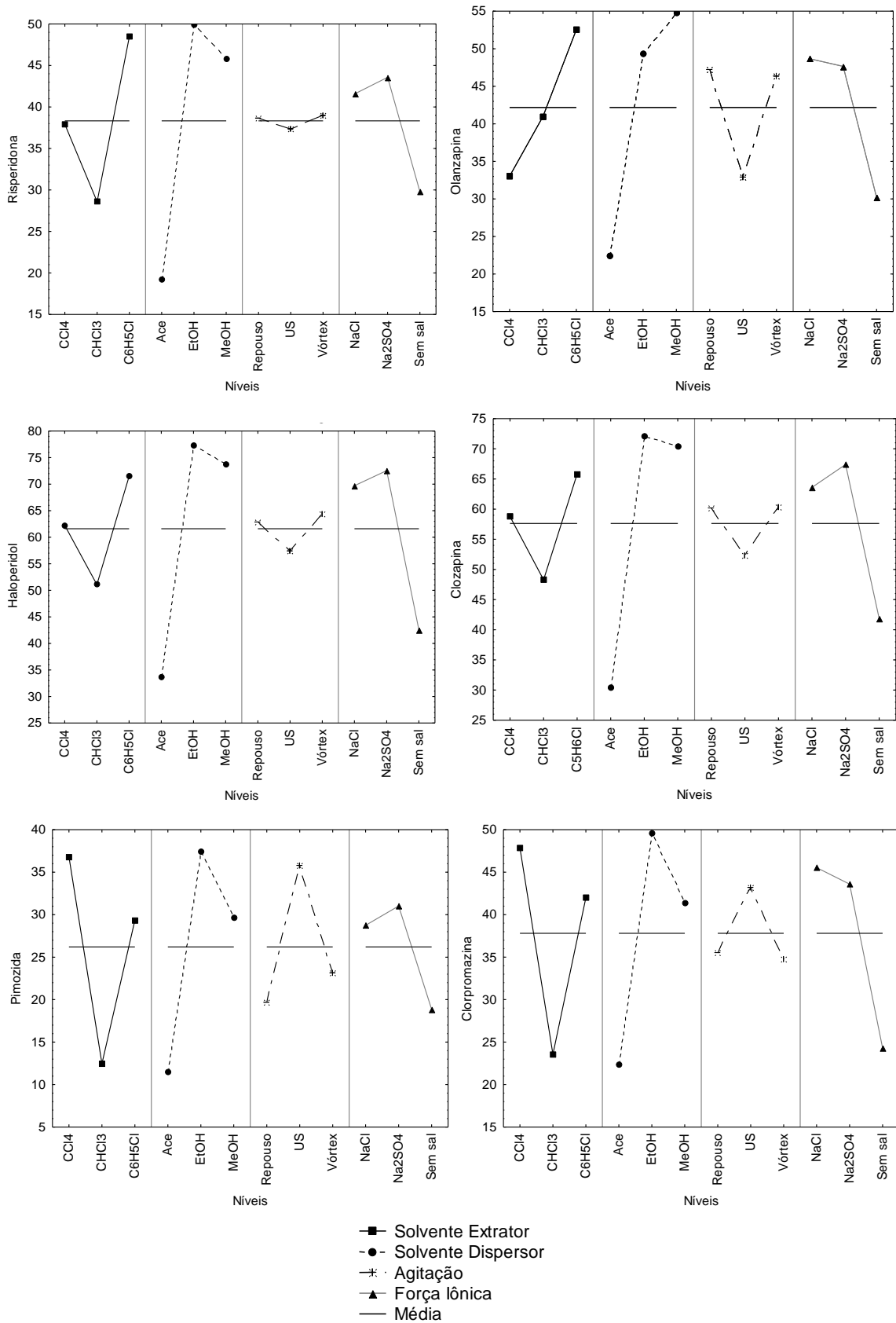
## 9. APÊNDICES

APÊNDICE A - Caracterização do efluente hospitalar.

<b>Parâmetro</b>	<b>Limites (CONAMA)</b>	<b>Limites (CONSEMA)</b>	<b>Efluente (PA-HUSM)</b>
Alcalinidade (mg L <sup>-1</sup> HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	-	-	39,5
Cloreto (mg L <sup>-1</sup> )	-	-	86,6
Fosfato (mg L <sup>-1</sup> )	1	-	13,9
Nitrato (mg L <sup>-1</sup> )	<10	-	3,8
Sulfato (mg L <sup>-1</sup> )	-	-	21,0
Potássio (mg L <sup>-1</sup> )	-	-	25,0 ± 0,3
Sódio (mg L <sup>-1</sup> )	-	-	45,9 ± 0,7
Sólidos suspensos (mg L <sup>-1</sup> )	≤ 150	≤ 140	25
Sólidos totais (mg L <sup>-1</sup> )	-	-	460,7
pH	5-9	6-9	8,2
Temperatura média (°C)	< 40	< 40	23,0

Fonte: Análises executadas pelo, LABORATÓRIO DE ANÁLISES QUÍMICAS INDUSTRIAIS E AMBIENTAIS (LAQIA), no ano de 2015.

Apêndice B - Seleção dos melhores solventes extratores e dispersores, a presença de agitação e de sal.



Apêndice C - Resultados da análise da regressão dos analitos procedimento de DLLME empregando HPLC-DAD-FLD.

Analitos	Teste de Normalidade	Teste de Cochran	Teste de Independência	Faixa linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$r^2$
	Curva analítica preparada em solvente orgânico				
Risperidona	0,050	0,644	0,249	800 a 13500	0,9937
Olanzapina	0,052	0,667	0,052	400 a 6750	0,9927
Haloperidol	0,116	0,498	0,055	800 a 13500	0,9901
Clozapina	0,051	0,658	0,468	400 a 6750	0,9921
Clorpromazina	0,901	0,526	0,576	400 a 6750	0,9917
Pimozida	0,812	0,372	0,078	100 a 1687,5	0,9944
Curva analítica preparada em matriz (DLLME)					
Risperidona	0,060	0,416	0,051	800 a 13500	0,9930
Olanzapina	0,463	0,465	0,190	400 a 6750	0,9894
Haloperidol	0,631	0,540	0,640	800 a 13500	0,9901
Clozapina	0,053	0,416	0,052	400 a 6750	0,9912
Clorpromazina	0,364	0,591	0,120	400 a 6750	0,9815
Pimozida	0,092	0,479	0,069	100 a 1687,5	0,9904

Apêndice D - Resultados da análise da regressão dos analitos estudados para o procedimento da SPE empregando HPLC-DAD-FLD.

Analitos	Teste de Normalidade	Teste de Cochran	Teste de Independência	Faixa linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$r^2$
	Curva analítica preparada em solvente orgânico				
Risperidona	0,050	0,644	0,2496	800 a 13500	0,9937
Olanzapina	0,052	0,667	0,052	400 a 6750	0,9927
Haloperidol	0,116	0,498	0,550	800 a 13500	0,9901
Clozapina	0,051	0,658	0,468	400 a 6750	0,9921
Clorpromazina	0,901	0,526	0,576	400 a 6750	0,9917
Pimozida	0,812	0,372	0,910	100 a 1687,5	0,9944
Curva analítica preparada em matriz (SPE)					
Risperidona	0,265	0,545	0,675	800 a 13500	0,9996
Olanzapina	0,124	0,623	0,070	400 a 6750	0,9994
Haloperidol	0,347	0,449	0,805	800 a 13500	0,9995
Clozapina	0,156	0,453	0,057	400 a 6750	0,9966
Clorpromazina	0,083	0,4641	0,209	400 a 6750	0,9984
Pimozida	0,340	0,589	0,401	100 a 1687,5	0,9982

Apêndice E - Resultados da análise da regressão dos analitos estudados para o procedimento de DLLME empregando LC-ESI-MS.

Analitos	Teste de Normalidade	Teste de Cochran	Teste de Independência	Faixa linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$r^2$
	Curva analítica preparada em solvente orgânico				
Risperidona	0,052	0,618	0,314	45 a 4500	0,99300
Olanzapina	0,064	0,669	0,067	15 a 1500	0,99810
Haloperidol	0,056	0,527	0,623	70 a 7000	0,99620
Clozapina	0,053	0,456	0,065	25 a 2500	0,99530
Clorpromazina	0,051	0,451	0,953	25 a 2500	0,99580
Pimozida	0,051	0,580	0,052	70 a 7000	0,99890
Curva analítica preparada em matriz (DLLME)					
Risperidona	0,053	0,631	0,792	45 a 4500	0,99400
Olanzapina	0,311	0,368	0,110	15 a 1500	0,99220
Haloperidol	0,886	0,341	0,400	70 a 7000	0,99810
Clozapina	0,346	0,404	0,057	25 a 2500	0,99770
Clorpromazina	0,100	0,616	0,078	25 a 2500	0,99770
Pimozida	0,051	0,590	0,426	70 a 7000	0,99840

Apêndice F - Resultados da análise da regressão dos analitos estudados para o procedimento da SPE empregando LC-ESI-MS.

Analito	Teste de Normalidade	Teste de Cochran	Teste de Independência	Faixa linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$r^2$
	Curva analítica preparada em solvente orgânico				
<b>Risperidona</b>	0,529	0,620	0,327	45 a 4500	0,99870
<b>Olanzapina</b>	0,054	0,548	0,419	15 a 1500	0,99810
<b>Haloperidol</b>	0,650	0,412	0,057	70 a 7000	0,99620
<b>Clozapina</b>	0,055	0,576	0,051	25 a 2500	0,99530
<b>Clorpromazina</b>	0,057	0,691	0,120	25 a 2500	0,99580
<b>Pimozida</b>	0,311	0,608	0,794	70 a 7000	0,99890
Curva analítica preparada em matriz (SPE)					
<b>Risperidona</b>	0,070	0,623	0,317	45 a 4500	0,99820
<b>Olanzapina</b>	0,649	0,664	0,068	15 a 1500	0,97050
<b>Haloperidol</b>	0,051	0,607	0,086	70 a 7000	0,99860
<b>Clozapina</b>	0,052	0,645	0,370	25 a 2500	0,99500
<b>Clorpromazina</b>	0,314	0,670	0,050	25 a 2500	0,99860
<b>Pimozida</b>	0,096	0,640	0,740	70 a 7000	0,99999