

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

Rômulo de Oliveira Schwaickhardt

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MÉTODO POR UHPLC-  
MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS EM EFLUENTES  
TRATADOS EM SISTEMAS DE WETLANDS CONSTRUÍDOS**

Santa Maria, RS  
2021

Rômulo de Oliveira Schwaickhardt

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MÉTODO POR UHPLC-MS/MS PARA  
DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS EM EFLUENTES TRATADOS EM SISTEMAS  
DE WETLANDS CONSTRUÍDOS**

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 a obtenção do título de **Doutor em Ciências**.

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria, RS  
2021

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Schwaickhardt, Rômulo de Oliveira

Desenvolvimento e aplicação de método por UHPLC-MS/MS para determinação de fármacos em efluentes tratados em sistemas de wetlands construídos / Rômulo de Oliveira Schwaickhardt.- 2021.

99 f.; 30 cm

Orientador: Renato Zanella

Coorientadora: Martha Bohrer Adaime

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, RS, 2021

1. Wetlands Construídos 2. UHPLC-MS/MS 3. SPE 4. Fármacos 5. Efluentes I. Zanella, Renato II. Adaime, Martha Bohrer III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

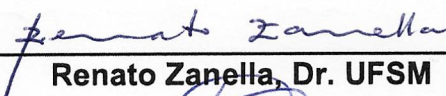
Declaro, RÔMULO DE OLIVEIRA SCHWAICKHARDT, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

**Rômulo de Oliveira Schwaickhardt**

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MÉTODO POR UHPLC-MS/MS PARA  
DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS EM EFLUENTES TRATADOS EM SISTEMAS  
DE WETLANDS CONSTRUÍDOS**

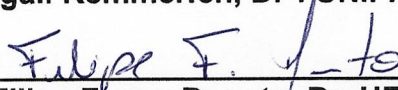
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutor em Ciências**.

**Aprovado em 18 de dezembro de 2021**

  
Renato Zanella, Dr. UFSM

  
Liziara da Costa Cabrera, Dr<sup>a</sup>. UFFS

  
Magali Kemmerich, Dr<sup>a</sup>. UNIPAMPA

  
Filipe Fagan Donato, Dr. UFSM

  
Osmar Damian Prestes, Dr. UFSM

Santa Maria, RS  
2021

## Agradecimentos

Agradeço a Deus por me proporcionar uma vida de oportunidades as quais me trouxeram até aqui.

Em especial à minha família: Meu pai Antenor, minha mãe Mazilda, meus irmãos Diogo e Tiago e minhas cunhadas Ana Paula e Fabiana por todo o apoio durante minha trajetória acadêmica.

À Marisa, pessoa que o doutorado trouxe para minha vida, que sempre me apoiou e sem dúvidas tem uma grande parcela de contribuição neste trabalho e em minha vida.

Ao prof. Dr. Renato Zanella pela oportunidade em fazer parte do LARP, por todo o conhecimento transmitido durante o doutorado.

Aos professores Dr. Osmar Damian Prestes e professora Dr<sup>a</sup>. Martha Bohrer Adaime, por toda a ajuda prestada durante o tempo em que estive no LARP.

Ao prof. Dr. Ênio Leandro Machado, por abrir as portas do mundo acadêmico desde a graduação e pela parceria proporcionada para o desenvolvimento deste estudo.

Aos professores da banca avaliadora: Dr<sup>a</sup> Liziara da Costa Cabrera, Dr<sup>a</sup> Magali Kemmerich, Dr. Filipe Fagan Donato, Dr. Osmar Damian Prestes, por dedicar seu tempo na leitura da tese, pelas correções e pelas contribuições ao estudo.

A Luana Floriano pela parceria e todo o auxílio prestado desde meu primeiro dia no LARP.

A todos os colegas do LARP que tive o prazer de conhecer e conviver durante este tempo, em especial ao colegas do “clube da bóia” por proporcionar ótimos momentos juntos.

A UFSM e a todos os professores e funcionários do curso de pós graduação em Química da UFSM.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para minha formação e para a conclusão deste trabalho, MUITO OBRIGADO!

## RESUMO

### DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MÉTODO POR UHPLC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS EM EFLUENTES TRATADOS EM SISTEMAS DE WETLANDS CONSTRUÍDOS

AUTOR: Rômulo de Oliveira Schwaickhardt  
ORIENTADOR: Prof. Dr. Renato Zanella

O crescimento na produção e conseqüentemente no uso de fármacos e produtos de cuidado pessoal ao longo dos anos tornou os efluentes domésticos gerados tanto em grandes cidades quanto em pequenas carregados destes compostos, sendo praticamente impossível encontrar efluentes urbanos livres desses resíduos. Este aumento de forma exponencial não foi acompanhado pelas estações de tratamento de efluentes convencionais. Assim novas alternativas de tratamentos como os *wetlands* construídos surgem como potencial tecnologia de remoção destes contaminantes dos efluentes. Portanto, para avaliar a eficiência deste e de outros tipos de sistemas de tratamentos de efluentes faz-se necessários o desenvolvimento de métodos multiclasse para o controle do tratamento. Neste trabalho desenvolveu-se um método multiclasse para análise de 37 compostos entre medicamentos em efluente bruto e tratado por *wetlands* construídos em diversas configurações. A determinação foi realizada por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (UHPLC-MS/MS). O método de extração em fase sólida (SPE) foi desenvolvido utilizando cartucho Oasis HLB, a amostra percolada em pH 5 e com 0,01 mol L<sup>-1</sup> de EDTA foi eluída com metanol e adicionada uma etapa posterior de limpeza do extrato com sorvente PSA (d-SPE). O método apresentou recuperações entre 70 e 120%, precisão e precisão intermediária (RSD ≤ 20%). O limite de quantificação (LQ) ficou entre 0,025 e 0,100 µg L<sup>-1</sup> e o limite de detecção entre 0,008 e 0,030 µg L<sup>-1</sup>. O método validado foi aplicado para avaliar a remoção dos fármacos presentes no efluente após passar por um sistema de *wetlands* construídos com 4 diferentes configurações de tratamento. Dos 14 compostos encontrados no efluente bruto apenas 8 ainda foram detectados e em menores concentrações após o sistema de *wetlands* construídos em sua melhor configuração.

**Palavras-chave:** Wetlands construídos, UHPLC-MS/MS, SPE, Fármacos, Efluentes.

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT AND APPLICATION OF A METHOD BY UHPLC-MS/MS FOR DETERMINATION OF DRUGS IN EFFLUENTS TREATED BY CONSTRUCTED WETLAND SYSTEMS

AUTHOR: Rômulo de Oliveira Schwaickhardt  
ADVISOR: Prof. Dr. Renato Zanella

The growth in production and consequently in the use of pharmaceuticals and personal care products over the years has made domestic effluents generated both in large cities and in small cities loaded with these compounds, making it practically impossible to find urban effluents free of these residues. This exponential increase was not followed by conventional effluent treatment plants. Thus, new treatment alternatives such as constructed wetlands emerge as a potential technology for removing these contaminants from effluents. Therefore, to evaluate the efficiency of this and other types of effluent treatment systems, it is necessary to develop multiclass methods to control the treatment. In this work, a multiclass method was developed for the analysis of 37 compounds among drugs in raw and treated effluent from wetlands constructed in different configurations. The determination was performed by ultra performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). The solid phase extraction method (SPE) was developed using Oasis HLB cartridge, the sample percolated at pH 5 and with 0.01 mol L<sup>-1</sup> of EDTA was eluted with methanol and a subsequent step of cleaning the extract with PSA sorbent was added. (d-SPE). The method showed recoveries between 70 and 120%, precision and intermediate precision (RSD ≤ 20%). The limit of quantification (LQ) was between 0.025 and 0.100 µg L<sup>-1</sup> and the detection limit between 0.008 and 0.030 µg L<sup>-1</sup>. The validated method was applied to evaluate the removal of drugs present in the effluent after passing through a system of wetlands built with 4 different treatment configurations. The 14 compounds found in the raw effluent, only 8 were still detected and in lower concentrations after the constructed wetlands system in best configuration.

**Keywords:** Constructed Wetlands, UHPLC-MS/MS, SPE, pharmaceuticals, Wastewater.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação das configurações de fluxo livre: (A) submersos, (B) emergentes, (C) folhas flutuantes, (D) flutuante livre. ....	24
Figura 2 - Classificação das configurações dos wetlands construídos.....	26
Figura 3 - Sistema híbrido com irradiação solar em TiO <sub>2</sub> .....	28
Figura 4 - Etapas de um processo de SPE. ....	30
Figura 5 - Esquema de um espectrômetro de massas triplo quadrupolo. ....	<b>Erro!</b>
<b>Indicador não definido.</b>	
Figura 6 - Configuração do sistema Wetlands construídos avaliados. ....	47
Figura 7 - Sistema Wetlands construídos avaliados.....	48
Figura 8 - Gráfico comparativo de avaliação do uso de modificadores na fase móvel. ....	55
Figura 9 - Gráfico demonstrando a média das áreas de acordo com a temperatura da coluna.....	55
Figura 10 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por UHPLC-MS/MS para uma mistura dos analitos na concentração de 20 µg/L. ....	56
Figura 11 - Comparação do número de compostos para cada faixa de recuperação obtidas em diferentes valores de pH.....	59
Figura 12 - Área média dos compostos após extração SPE com adição de diferentes concentrações de EDTA.....	60
Figura 13 - Número de compostos com recuperações adequadas entre os diferentes valores de pH testados com efluente contendo 0,01% de EDTA. ....	61
Figura 14 - Comparativo entre pH 5 e 6 considerando a soma das recuperações dos compostos avaliados.....	61
Figura 15 - Comparação visual da limpeza com diferente sorventes testados antes (efluente) e após a etapa de limpeza por d-SPE.....	62
Figura 16 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD ( $\lambda = 260$ a 380 nm) comparando o efluente após a SPE mas sem limpeza (efluente) e com os sete sorventes testados em d-SPE.....	63
Figura 17 - Gráfico tipo "radar" das recuperações dos compostos avaliados, comparando os sorventes testados.....	64
Figura 18 - Comparativo entre as diferentes massas de sorvente avaliadas considerando a soma das recuperações dos compostos.....	65



Figura 19 - Cromatograma de íons totais do tiabendazol no nível de fortificação de 0,025 µg L <sup>-1</sup> sobreposto ao branco.....	68
Figura 20 - Curva analítica do composto clindamicina. ....	69
Figura 21 - Efeito matriz calculado para os analitos em estudo. ....	70
Figura 22 - Fluxograma do procedimento de preparo de amostra realizado para determinação de fármacos em efluentes, empregando SPE e d-SPE...	76
Figura 23 - Comparação entre as etapas de tratamento para o albendazol e os 3 metabólitos. ....	81
Figura 24 - Principais vias metabólicas do fármaco albendazol. ....	82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais fármacos e alguns metabólitos com suas informações físico-químicas. ....	15
Tabela 2 - Concentrações de alguns PPCPs encontrados em efluentes de acordo com estudos recentes. ....	17
Tabela 3 - Sorventes poliméricos mais comumente utilizados em SPE. ....	31
Tabela 4 - Sorventes utilizados para determinação de fármacos em efluentes. ....	35
Tabela 5 - Condições cromatográficas utilizados pela literatura na determinação de medicamentos em águas e efluentes. ....	40
Tabela 6 - Parâmetros avaliados durante a etapa de validação de métodos analíticos. ....	43
Tabela 7 - Condições instrumentais do sistema UHPLC-MS/MS. ....	51
Tabela 8 - Parâmetros avaliados na validação do método. ....	52
Tabela 9 - Gradiente da fase móvel utilizado para determinação de fármacos em efluente no sistema UHPLC-MS/MS. ....	54
Tabela 10 - Transições de monitoramento de reação selecionada (SRM) usadas para os fármacos, padrão de controle (PC) e padrão interno (PI). ....	56
Tabela 11 - Resultados de validação do método para linearidade ( $r^2$ ), faixa linear, efeito matriz, limite de quantificação (LOQ), limite de detecção (LOD), exatidão (recuperação, %) e precisão (repetibilidade e precisão intermediária, RSD %). ....	72
Tabela 12 - Concentrações ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) dos fármacos e alguns metabólitos encontrados nas amostras coletadas na ETE da UNISC. ....	78

## LISTA DE SIGLAS

ACE	Acetona
AcEt	Acetato de Etila
ACN	Acetonitrila
AGR	Aquisição dos Genes Resistentes
APCI	Ionização química a pressão atmosférica, do inglês <i>Atmospheric pressure Chemical ionization</i>
BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CAG	Carbono Ativado Granular
COT	Carbono Orgânico Total
CPCEM	Centro de Pesquisa em Cromatografia e Espectrometria de Massas
DAD	Detector de arranjo de diodos, do inglês <i>Diode Array Detector</i>
DCM	Diclorometano
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
d-SPE	Extração em fase sólida dispersiva, do inglês <i>Dispersive solid phase extraction</i>
d- $\mu$ SPE	Micro-extração em fase sólida dispersiva, do inglês <i>dispersive solid phase microextraction</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês <i>Ethilenediamine tetraacetic acid</i>
EM	Efeito Matriz
ESI	Ionização por Eletronebulização, do inglês <i>Eletrospray Ionization</i>
ETA	Estação de tratamento de Água
ETE	Estação de tratamento de Efluentes
HCOOH	Ácido fórmico
HLB	Balanço hidrofílico-lipofílico, do inglês <i>Hydrophilic-lipophilic balance</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
LARP	Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação

MeOH	Metanol
MCX	Trocador polimérico de cátions de modo misto, do inglês <i>Mixed-mode polymeric cation exchange</i>
MRM	Monitoramento de reações múltiplas, do inglês <i>multiple reaction monitoring</i>
MSPE	Extração em fase sólida magnética, do inglês <i>Magnetic solid phase extraction</i>
MS/MS	Espectrômetro de massa em série, do inglês <i>Tandem Mass Spectrometry</i>
NSAID	Anti-inflamatórios não esteroides, do inglês <i>Non-steroidal anti-inflammatory drugs</i>
N-NH <sub>4</sub>	Nitrogênio Amoniacal
PC	Padrão de controle
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI	Padrão Interno
POA	Processos Oxidativos Avançados
PPCPs	Fármacos e produtos de cuidados pessoais, do inglês <i>Pharmaceuticals and personal care products</i>
PSA	Amina primária-secundária, do inglês <i>Primary-secondary amine</i>
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês <i>Relative standard deviation</i>
SPE	Extração em fase sólida, do inglês <i>solid phase extraction</i>
SRM	Monitoramento de Reações Seleccionadas, do inglês <i>selected reaction monitoring</i>
SS	Sólidos Suspensos
TIC	Cromatograma de íons totais, do inglês <i>Total ion chromatogram</i>
TMCS	Trimetilclorosilano
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra alta eficiência, do inglês <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>
UNISC	Universidade de Santa Cruz do Sul
USEPA	Agência de proteção ambiental do Estados Unidos, do inglês <i>United States Environmental Protection Agency</i>
WAX	Trocador de ânions fracos, do inglês <i>weak anion exchange</i>
WWTP	Planta de tratamento de efluentes, do inglês <i>Wastewater treatment plant</i>

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
2.	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	15
2.1	FÁRMACOS E PRODUTOS DE CUIDADOS PESSOAIS .....	15
2.1.1	<b>Antibióticos</b> .....	19
2.1.2	<b>β-bloqueadores</b> .....	20
2.1.3	<b>Fármacos para tratamento psiquiátrico</b> .....	21
2.1.4	<b>Anti-inflamatórios, antipiréticos e analgésicos</b> .....	21
2.1.5	<b>Esteroides</b> .....	22
2.2	WETLANDS CONSTRUÍDOS .....	23
2.3	PREPARO DE AMOSTRA .....	29
2.3.1	<b>Extração em fase sólida</b> .....	29
2.3.1.1	<i>Extração em fase sólida em análises de fármacos em efluentes</i> .....	32
2.4	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM SÉRIE (LC-MS/MS) .....	38
2.4.1	<b>LC-MS/MS aplicada à análise de fármacos em águas e efluentes.</b> .....	39
2.5	VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA .....	43
3.	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	44
3.1	INSTRUMENTAÇÃO .....	44
3.2	MATERIAIS, REAGENTES E SOLVENTES .....	45
3.3	PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS .....	46
3.4	FÁRMACOS SELECIONADOS .....	46
3.5	COLETA DE AMOSTRA .....	46
3.6	PREPARO DA AMOSTRA .....	48
3.6.1	<b>Seleção do sorvente no SPE</b> .....	49
3.6.2	<b>Ajuste do pH da amostra</b> .....	49
3.6.3	<b>Adição de EDTA</b> .....	49
3.6.4	<b>Desenvolvimento de método de limpeza do extrato empregando d-SPE</b> . .....	50
3.7	CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS DO SISTEMA LC-MS/MS .....	50
3.7.1	<b>Utilização de padrão interno (PI) e padrão de controle (PC)</b> .....	51
3.8	VALIDAÇÃO DO MÉTODO .....	51
3.9	APLICAÇÃO NAS AMOSTRAS COLETADAS NO SISTEMA DE TRATAMENTO POR WETLANDS .....	53

<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	54
4.1	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS .....	54
4.2	DESENVOLVIMENTO DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE) .....	58
4.3	DESENVOLVIMENTO DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DISPERSIVA (D-SPE) .....	62
4.4	VALIDAÇÃO .....	67
4.4.1	<b>Seletividade</b> .....	67
4.4.2	<b>Linearidade e faixa linear</b> .....	68
4.4.3	<b>Efeito Matriz</b> .....	69
4.4.4	<b>Exatidão e Precisão</b> .....	71
4.4.5	<b>Limite de detecção e limite de quantificação do método</b> .....	71
4.5	MÉTODO VALIDADO .....	75
4.6	APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS.....	77
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	86
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	87
	<b>ANEXO A – Distribuição das espécies de EDTA formadas de acordo com o pH do meio</b> .....	95

## 1. INTRODUÇÃO

Os fármacos e produtos de cuidados pessoais (PPCPs, do inglês *pharmaceuticals and personal care products*) têm levantado preocupações nos últimos 30 anos devido a serem encontrados em diferentes locais e em concentrações cada vez maiores. Fármacos e produtos de cuidados pessoais englobam todo o grupo de medicamentos de uso humano e veterinário além de produtos de higiene pessoal (RIVERA-JAIMES *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2017). São compostos facilmente encontrados em estações de tratamentos de efluentes urbanos pois em geral, apenas um percentual é absorvido pelo organismo humano sendo parte do medicamento excretado em sua fórmula original (VYMAZAL *et al.*, 2017).

Plantas convencionais de tratamento de efluentes não são capazes de remover fármacos ativos. Por outro lado, estações que possuem os sistemas de *wetlands* construídos, também chamados de “sistemas alagados construídos”, os quais consistem em um sistema de lagoas com plantas aquáticas que auxiliam no tratamento de efluentes, demonstram ser promissores na remoção destes compostos por apresentar mecanismos de aeração da rizosfera neste tipo de sistema (HE *et al.*, 2018; VON SPERLING, 2005; ZHANG *et al.*, 2012).

Diversos estudos demonstram os riscos toxicológicos dos PPCPs que são classificados como micropoluentes e descartados diariamente nos corpos hídricos sem nenhum tipo de tratamento, além dos tratamentos ineficientes para remoção destes compostos (KIDD *et al.*, 2007; SCHWAIGER *et al.*, 2004; WOLKOWICZ *et al.*, 2016). Devido à baixa concentração dos PPCPs no meio ambiente, os métodos de preparo de amostra devem ser capazes de extrair as moléculas alvo, concentrar e limpar os extratos. Além disso, as técnicas de separação e de detecção utilizadas como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas devem apresentar baixos limites de detecção e quantificação para os compostos avaliados (GONZÁLEZ-MARIÑO *et al.*, 2018; PENG; GAUTAM; HALL, 2019; RIVERA-JAIMES *et al.*, 2018).

O objetivo deste trabalho é desenvolver, validar e aplicar um método para a determinação multiclasse de fármacos em efluentes brutos e tratados por sistemas de *wetlands* construídos, empregando extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) e cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS, do inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled Triple Quadrupole Mass Spectrometry*).

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 FÁRMACOS E PRODUTOS DE CUIDADOS PESSOAIS

De acordo com a USEPA (*United States Environmental Protection Agency*) a definição de PPCP é: “...em geral, qualquer produto usado por indivíduos para problemas de saúde, ou como cosmético, ou utilizado pelo agronegócio para aumentar o crescimento ou a saúde...”.

Os PPCPs do grupo de medicamentos incluem antibióticos, anti-inflamatórios, hormônios,  $\beta$ -bloqueadores entre outras drogas, enquanto que nos produtos de cuidado pessoal têm-se bactericidas, repelentes, fragrâncias e protetores solar (LIU; WONG, 2013). A Tabela 1 apresenta fármacos e alguns metabólitos com suas informações físico-químicas.

Tabela 1 – Principais fármacos e alguns metabólitos com algumas informações físico-químicas.

COMPOSTO	MASSA MOLECULAR (g mol <sup>-1</sup> )	FÓRMULA MOLECULAR	CAS	pKa	Log K <sub>ow</sub>
5-OH-Tiabendazol	217,25	C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> OS	948-71-0		-
Acido nalidíxico	232,23	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	389-08-2	8,6	1,41
Acido oxolínico	261,23	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>5</sub>	14698-29-4	6,8	0,94
Ácido salicílico	138,12	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	69-72-7	2,3	2.26
Albendazol	265,33	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	54965-21-8	6,9	1,27
Albendazol amino	239,29	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	80983-34-2	-	-
Albendazol sulfona	297,33	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	75184-71-3	-	-
Albendazol sulfóxido	281,33	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	54029-12-8	-	-
Androstenediona	286,41	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	63-05-8	-	2,75
Atenolol	266,34	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	29122-68-7	9,6	0,16
Carbamazepina	236,27	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	298-46-4	7	2,45
Ciprofloxacino	331,34	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	85721-33-1	6,09	0,28
Clindamicina	424,98	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S	18323-44-9	7,45	2,16
Cloranfenicol	323,13	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	56-75-7	13,5	1,14
Dipirona (metamizol)	311,36	C <sub>13</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	50567-35-6	4,2	-2,61
Espiramina	843,05	C <sub>43</sub> H <sub>74</sub> N <sub>2</sub> O <sub>14</sub>	8025-81-8	7,88	1,87
Fenbendazol	299,35	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	43210-67-9	-	3,85
Haloperidol	375,86	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> ClFNO <sub>2</sub>	52-86-8	8,3	4,30
Ibuprofeno	206,28	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	15687-27-1	4,9	3,79



Levamisol	204,29	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> S	14769-73-4	8	1,84
Lincomicina	406,54	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S	154-21-2	7,6	0,20
Lomefloxacino	351,35	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	98079-51-7	5,7	-0,30
Mebendazol	295,29	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	31431-39-7	6,6	2,83
Metronidazol	171,15	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	443-48-1	2,38	-0,02
Norfloxacino	319,33	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	70458-96-7	6,34	0,46
Ofloxacino	361,37	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	82419-36-1	5,97	-0,39
Paracetamol	151,16	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	103-90-2	9,4	0,46
Praziquantel	312,41	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	55268-74-1	19,38	2,5
Progesterona	314,46	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	57-83-0	18,9	3,87
Propanolol	259,34	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>2</sub>	525-66-6	9,6	3,48
Sulfacloropiridazina	284,72	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	80-32-0	5,9	0,31
Sulfadoxina	310,33	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S	2447-57-6	1,59	0,70
Sulfametoxazol	253,28	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	723-46-6	5,7	0,89
Testosterona	288,42	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	58-22-0	-	3,32
Tiabendazol	201,25	C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> S	148-79-8	4,64	2,47
Trimetoprima	290,32	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	738-70-5	6,6	0,91

Fonte: pubchen.com e chemspider.com

Nos últimos anos, a produção destes compostos assim como o registro de novas moléculas tem aumentado exponencialmente. Em 1993, a produção mundial de PPCPs ultrapassou um milhão de toneladas sendo a Alemanha responsável por mais de 50% da produção (DAUGHTON; TERNES, 1999). Já em 2011 a China, maior produtor mundial de PPCPs e responsável por 20% do total produzido, alcançou sozinha a marca de dois milhões de toneladas de medicamentos produzidos (SERI, 2012).

O aumento do uso de PPCPs associado a sistemas de tratamento ineficientes fazem com que seja possível encontrar estes compostos em concentrações que podem variar desde partes por trilhão (ng L<sup>-1</sup>) até partes por milhão (mg L<sup>-1</sup>) em águas subterrâneas, superficiais, efluentes e até águas de abastecimento de consumo humano (ARCHER *et al.*, 2017; LIU; WONG, 2013; YANG *et al.*, 2017). As fontes dessa contaminação podem ser provenientes tanto de efluentes domésticos, como o descarte de unidades de saúde, estações de tratamentos de efluentes (ETEs) ou estações de tratamento de água (ETAs) (RIVERA-JAMES *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2017).

Entre as classes de medicamentos encontradas nos corpos d'água podemos citar os sedativos, antidepressivos, anti-hipertensivos, antimicrobianos antibióticos, analgésicos, anti-histamínicos, anti-inflamatórios, estimulantes e substâncias ilícitas (BALAKRISHNA *et al.*, 2017; RIVERA-JAMES *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2017). A tabela 2 apresenta alguns PPCPs encontrados em diversas concentrações e em diversos locais de estudo.

Tabela 2 - Concentrações de alguns PPCPs encontrados em efluentes domésticos e corpos receptores de acordo com estudos recentes.

COMPOSTO	CLASSE	CONCENTRAÇÃO ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	REFERÊNCIAS
Ácido Acetilsalicílico	Analgésico e Anti-inflamatório	88 – 2.891	Gómez-Canela <i>et al.</i> , 2019
Ácido salicílico	Anti-inflamatório	0,022 – 0,778	Andrés-Costa; Carmona; Picó, 2016 Rivera-Jaimes <i>et al.</i> , 2018
Atenolol	Anti- hipertensivos	0,026 – 7,1	Archer <i>et al.</i> , 2017; Rivera-Jaimes <i>et al.</i> , 2018 Soriano-Molina <i>et al.</i> , 2019; Subedi <i>et al.</i> , 2017
Bisfenol A	Plastificante	0,036 – 4,0	Andrés-Costa; Carmona; Picó, 2016 Archer <i>et al.</i> , 2017
Cafeína	Estimulante	0,810 – 389,5	Archer <i>et al.</i> , 2017; Gómez-Canela <i>et al.</i> , 2019; Subedi <i>et al.</i> , 2017
Carbamazepina	Antiepilético	0,020 – 5,4	Archer <i>et al.</i> , 2017; Botero-Coy <i>et al.</i> , 2018; Gómez-Canela <i>et al.</i> , 2019; Rivera-Jaimes <i>et al.</i> , 2018 Subedi <i>et al.</i> , 2017
Ciprofloxacino	Antibiótico	0,618 – 3,4	Botero-Coy <i>et al.</i> , 2018; Soriano-Molina <i>et al.</i> , 2019
Clindamicina	Antibiótico	0,003 – 0,790	Botero-Coy <i>et al.</i> , 2018; Subedi <i>et al.</i> , 2017
Diclofenaco	Anti-inflamatório	0,020 – 7,3	Andrés-Costa; Carmona; Picó, 2016 Archer <i>et al.</i> , 2017; Botero-Coy <i>et al.</i> , 2018;

			Gómez-Canela <i>et al.</i> , 2019; Rivera-Jaimes <i>et al.</i> , 2018.
Doxiciclina	Antibacteriano	0,082 – 0,159	Botero-Coy <i>et al.</i> , 2018;
Eritromicina	Antibiótico	0,016 – 0,056	Botero-Coy <i>et al.</i> , 2018; Szekeres <i>et al.</i> , 2017.
Ibuprofeno	Anti-inflamatório	0,153 – 67	Andrés-Costa; Carmona; Picó, 2016 Archer <i>et al.</i> , 2017; Gómez-Canela <i>et al.</i> , 2019; Rivera-Jaimes <i>et al.</i> , 2018. Subedi <i>et al.</i> , 2017;
Lincomicina	Antibiótico	0,280 – 1,8	Subedi <i>et al.</i> , 2017
Metronidazol	Antibacteriano	0,072 – 0,385	Botero-Coy <i>et al.</i> , 2018;
Norfloxacino	Antibiótico	0,633 – 2,0	Botero-Coy <i>et al.</i> , 2018;
Paracetamol	Analgésico	0,021 – 1.227	Andrés-Costa; Carmona; Picó, 2016 Archer <i>et al.</i> , 2017; Botero-Coy <i>et al.</i> , 2018; Brown; Wong, 2018; Rivera-Jaimes <i>et al.</i> , 2018; Subedi <i>et al.</i> , 2017.
Propranolol	Anti-hipertensivos	0,020 – 0,062	Brown; Wong, 2018; Subedi <i>et al.</i> , 2017 Archer <i>et al.</i> , 2017; Botero-Coy <i>et al.</i> , 2018; Brown; Wong, 2018;
Sulfametoxazol	Antiparasitário	0,025 – 4,6	Gómez-Canela <i>et al.</i> , 2019; Rivera-Jaimes <i>et al.</i> , 2018 Soriano-Molina <i>et al.</i> , 2019; Subedi <i>et al.</i> , 2017.
Tetraciclina	Antibiótico	0,276 – 0,383	Botero-Coy <i>et al.</i> , 2018;
Tiabendazol	Antiparasitário	0,025 – 0,440	Subedi <i>et al.</i> , 2017 Archer <i>et al.</i> , 2017; Botero-Coy <i>et al.</i> , 2018;
Trimetoprima	Antibiótico	0,022 – 11,1	Rivera-Jaimes <i>et al.</i> , 2018; Subedi <i>et al.</i> , 2017; Szekeres <i>et al.</i> , 2017.

Em geral, os PPCPs não são degradados efetivamente em sistemas tradicionais de tratamento de águas ou efluentes, tendo um percentual abaixo de 30% de remoção destes em sistemas como os de filtração, sedimentação ou coagulação/floculação (YANG *et al.*, 2017). Se for observado somente a classe de antibióticos o percentual de remoção é ainda menor, ficando abaixo dos 10% em sistemas tradicionais de tratamento (LIU *et al.*, 2016). A baixa eficiência de remoção de PPCPs pelos sistemas tradicionais de tratamento pode ser explicado pelo fato desses sistemas terem sido desenvolvidos para a remoção de altas concentração de matéria orgânica e de sólidos suspensos. Assim, os sistemas de tratamento são considerados uma fonte primária de descarte dos PPCPs na natureza (YANG *et al.*, 2017).

Diversos fatores podem afetar a eficiência das ETEs na remoção de fármacos como as condições de oxidação-redução, sorção, tempo de retenção hidráulico, organização dos estágios biológicos individuais (aeróbico, anaeróbico e/ou anóxico), idade do lodo (em sistemas de lodo ativado) nas estações, ou fatores como temperatura, a estação do ano, o pH e as propriedades físico-químicas dos compostos (MACKULAK *et al.*, 2019).

### **2.1.1 Antibióticos**

Os antibióticos são um grupo diversificado de compostos que podem ser divididos em diferentes subgrupos de acordo com sua estrutura química: beta-lactamas, quinolonas, tetraciclina, macrolídeos, sulfonamidas entre outros (KUMMERER, 2009). São ainda separados entre naturais, semissintéticos e sintéticos: os naturais são produzidos por micro-organismos, semissintéticos são produzidos a partir de modificações físico-químicas dos compostos naturais e os sintéticos são compostos feitos em laboratório baseados nos compostos naturais (BILAL *et al.*, 2020).

Em geral, antibióticos são estruturas complexas que podem possuir diferentes funcionalidades dentro de uma mesma molécula (KUMMERER, 2009). A maioria dos antibióticos do mundo são fabricados na China e na Índia devido aos custos mais baixos de mão-de-obra e as regulamentações ambientais (ŠIMATOVIĆ; UDIKOVIĆ-KOLIĆ, 2019). Em 2013, a China produziu aproximadamente 53.800 toneladas de

antibióticos, sendo que 44% destes pertenciam aos grupos das tetraciclinas, quinolonas e sulfonamidas (YAN *et al.*, 2018).

As descargas de efluentes das indústrias de medicamentos contribuem para a poluição de corpos aquáticos com antibióticos, causando mudanças pronunciadas nas comunidades bacterianas (MILAKOVIĆ *et al.*, 2020). Estudos demonstram a presença de antibióticos em pequenas quantidades ( $\text{ng L}^{-1}$ ) em amostras da água do mar na Antártida, onde já é possível observar bactérias resistentes a antibióticos como trimetoprima e alguns compostos do grupo das quinolonas (HERNANDÉZ *et al.*, 2019).

A presença de antibióticos em ETEs, por exemplo, pode aumentar a resistência destes em bactérias, pois as concentrações não são altas suficientes para matá-las e promovem uma aquisição dos genes resistentes (AGR) a antibióticos por estes micro-organismos (SONG *et al.*, 2018). Sistemas de tratamentos convencionais apresentam bons percentuais de remoção para alguns antibióticos, no entanto, é possível observar um grande número de bactérias com AGR em estações de tratamento (LIU *et al.*, 2019).

Nos EUA observou-se que 70% das infecções hospitalares tem resistência a alguma classe de antibióticos (LEEB, 2004). No ambiente aquático os genes resistentes a sulfonamidas e as tetraciclinas são os mais frequentemente encontrados (YAN *et al.*, 2018).

### **2.1.2 $\beta$ -bloqueadores**

O atenolol é um dos  $\beta$ -bloqueadores mais utilizados em casos de hipertensão e arritmia grande parte do que é ingerido não é absorvido e pode ser encontrado em estações de tratamentos de efluentes (VERLICCHI; AL AUKIDY; ZAMBELLO, 2012). Pode ser facilmente encontrado em efluentes como já demonstrado em diversos estudos, onde suas concentrações podem variar de  $\text{ng L}^{-1}$  até  $\text{mg L}^{-1}$  (AUVINEN *et al.*, 2017; BALAKRISHNA *et al.*, 2017).

Apesar de apresentar baixa toxicidade o atenolol, quando na presença de outros  $\beta$ -bloqueadores, pode apresentar efeito sinérgico aumentando a toxicidade do efluente (XU *et al.*, 2017). A presença do atenolol em corpos d'água normalmente está acompanhada de outros tipos de medicamentos de diversas classes (AUVINEN *et al.*, 2017; BALAKRISHNA *et al.*, 2017).

### 2.1.3 Fármacos para tratamento psiquiátrico

Os diversos fármacos utilizados no tratamento da saúde mental, como carbamazepina, diazepam, venlafaxina, fluoxetina e risperidona, são facilmente encontrados em efluentes, pois são utilizados em diversas doenças como ansiedade, depressão, esquizofrenia, isquemia cardíaca, transtorno bipolar, epilepsia, entre outros (FEKADU *et al.*, 2019).

A carbamazepina é um medicamento derivado da benzodiazepina e muito utilizado para o tratamento de convulsões e dores neuropáticas, é um medicamento muito encontrado em águas superficiais e ETEs, sendo seus metabólitos por vezes encontrados em concentrações muito altas em sistemas de tratamentos de efluentes (DANIELE *et al.*, 2017; FERNÁNDEZ *et al.*, 2014). O composto caracteriza-se por ser recalcitrante, o que a torna mais difícil de ser biodegradado por sistemas biológicos como os *wetlands* construídos (YAN *et al.*, 2016). Grande parte da carbamazepina é metabolizada pelo fígado e apenas 5% são excretadas na forma inalterada. Assim, em alguns casos os metabólitos podem ser encontrados em concentrações maiores que o composto precursor (FEKADU *et al.*, 2019). No entanto, enquanto a carbamazepina pode ser encontrada em concentrações que variam de 20 até 5.400 ng L<sup>-1</sup> (Tabela 2), seus metabólitos são encontrados em concentrações de 1 até 1.670 ng L<sup>-1</sup> (FEKADU *et al.*, 2019; LOPÉZ-SERNA *et al.*, 2012).

### 2.1.4 Anti-inflamatórios, antipiréticos e analgésicos

Os anti-inflamatórios, antipiréticos e analgésicos são amplamente utilizados devido a sua capacidade de reduzir a dor e a inflamação, podem ser encontrados nas formas sintéticas ou naturais, esteroidais ou não-esteroidais (NSAID) (YUAN *et al.*, 2020). Nos Estados Unidos estima-se que sejam prescritas mais de 70 milhões de receitas e sejam consumidas mais de 30 bilhões de doses ao ano (PAROLINI, 2020).

O ácido acetilsalicílico é um dos anti-inflamatórios mais utilizados pelo mundo nos últimos 90 anos. Apesar de ter boa parte metabolizada no fígado (~80%), em torno de 20% é excretado na forma inalterada (PAROLINI, 2020).

Os anti-inflamatórios/analgésicos são os compostos mais frequentemente encontrados em matrizes aquáticas, como rios, lagos e efluentes urbanos (PAÍGA; SANTOS; DELARUE-MATOS, 2017; FEKADU *et al.*, 2019). Anti-inflamatórios como o

ibuprofeno e diclofenaco são facilmente encontrados em efluentes em concentrações de  $\text{ng L}^{-1}$  até  $\mu\text{g L}^{-1}$ , conforme Tabela 2 e seus efeitos no meio ambiente ainda são desconhecidos (AZIZ *et al.*, 2017; GÓMEZ-CANELA *et al.*, 2019).

A codeína é um anti-inflamatório muito utilizado na Europa e facilmente encontrado em corpos aquáticos devido a sua baixa biodegradabilidade e baixa remoção em sistemas de tratamento como de lodos ativados (FEKADU *et al.*, 2019). Já o diclofenaco é o anti-inflamatório mais consumido na Europa e África e mais detectado em amostras ambientais pelo mundo, junto com o ibuprofeno e o naproxeno (FEKADU *et al.*, 2019; PAROLINI, 2020).

Mesmo que em baixas concentrações o diclofenaco não apresenta valores significativos de ecotoxicidade, porém em animais que estavam em contato por um período maior que 4 semanas se observou o início de danos nos rins (SCHWAIGER *et al.*, 2004). A toxicidade aguda em peixes é observada em aproximadamente  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , enquanto o teste de toxicidade crônica para um período de 28 dias demonstrou efeitos tóxicos a partir de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  (MACKULAK *et al.*, 2019).

Quando na presença de outros anti-inflamatórios mesmo em baixas concentrações têm-se um aumento da ecotoxicidade do diclofenaco (SCHWAIGER *et al.*, 2004). A frequente presença de diclofenaco em amostras de água entrou no radar das autoridades europeias que adicionou o composto a “*First Watch List under the Environmental Quality Standards Directive*” (CARVALHO *et al.*, 2015).

### **2.1.5 Esteroides**

Os estrogênios são hormônios esteroides estudados devido ao seu potencial de disrupção endócrina, ou seja, seu potencial para alterar funções fisiológicas que acontecem naturalmente. No meio ambiente, podem reduzir drasticamente a população de peixes pois pode atingir os órgãos reprodutivos de diversas formas, inibindo o desenvolvimento das gônadas, causando a feminização de machos, hermafroditismo e infertilidade (ANA; ESPINO, 2020; KIDD *et al.*, 2007).

Enquanto na Europa tem-se níveis de concentração de hormônios na faixa dos  $\text{ng L}^{-1}$ , no continente africano é possível encontrar na faixa de  $\text{mg L}^{-1}$  em rios e efluentes. Compostos como estriol e progesterona chegam a concentrações vinte mil vezes maiores em locais como a África do Sul, onde há pouco ou nenhum tratamento

dos efluentes domésticos descartados nos corpos hídricos, em relação a países da Europa (FEKADU *et al.*, 2019).

Entre os compostos mais comuns desta classe estão os naturais: testosterona, estrona, estradiol, progesterona e estriol, encontrados em corpos aquáticos provenientes de excreções de humanos e de fazendas de animais. Os hormônios sintéticos mais facilmente encontrados são os derivados do estradiol:  $17\beta$ -estradiol e  $17\alpha$ -etinilestradiol, este último utilizado no tratamento de câncer de mama, próstata, osteoporose e outras doenças (ARIS; SHAMSUDDIN; PRAVEENA, 2014).

## 2.2 WETLANDS CONSTRUÍDOS

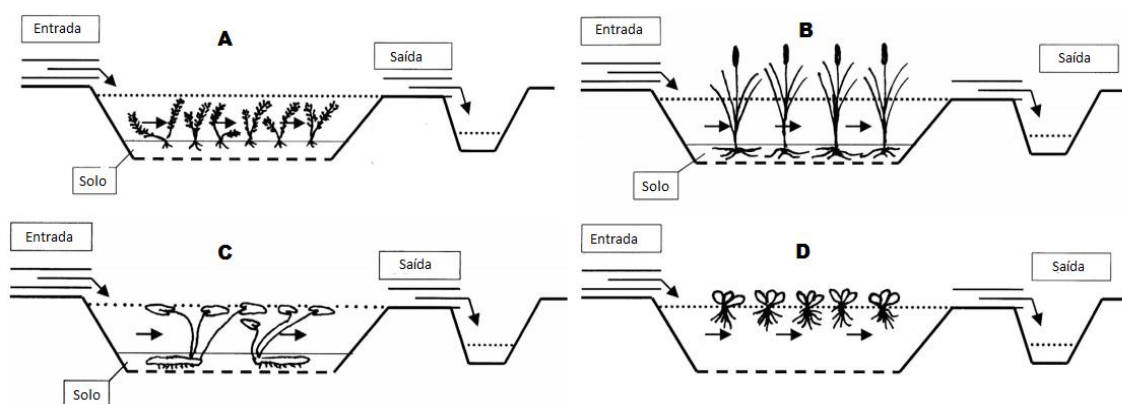
Os sistemas de *wetlands* construídos são uma alternativa de baixo custo e eficiente para o tratamento de efluentes em países em desenvolvimento (LUTTERBECK *et al.*, 2017). A utilização dos *wetlands* construídos para a remoção de contaminantes mais comuns é largamente empregada e, integrada a outros processos, pode trazer benefícios além do próprio tratamento como o possível reuso da água e a recuperação de nutrientes e energia (MACHADO *et al.*, 2015).

Os *wetlands* construídos, em geral, apresentam vantagens como: boa purificação da água, baixo consumo de energia, além de baixo custo de construção e manutenção. Devido a estas vantagens diversas configurações deste processo são desenvolvidas, buscando a redução das cargas orgânicas e de nutrientes e compostos específicos (AUVINEN *et al.*, 2017; HIJOSA-VALSERO *et al.*, 2016; MACHADO *et al.*, 2015; SONG *et al.*, 2018).

A eficiência na remoção de micropoluentes nos *wetlands* construídos ainda é reduzida em sistemas em grande escala e bons resultados até então foram atingidos somente em sistemas em condições controladas (MACHADO *et al.*, 2016). As configurações são desenvolvidas e classificadas de acordo com o regime de fluxo, podendo ser de fluxo livre, subsuperficial ou híbrido (VYMAZAL, 2018). A configuração de fluxo livre ainda pode ser classificada, conforme demonstrado na Figura 1, de acordo com o tipo de macrófita, sendo flutuante livre, com folhas flutuantes, emergentes ou submersas (VYMAZAL, 2018).



Figura 1 - Classificação das configurações de fluxo livre: (A) submersos, (B) emergentes, (C) folhas flutuantes, (D) flutuante livre.



Adaptado de Vymazal (2018).

Os *wetlands* construídos de fluxo livre dependem muito do tempo de retenção hidráulica e tamanho do sistema, além de terem uma reduzida capacidade de remoção de nutrientes como o fósforo. No entanto, apresentam bons resultados para a remoção de sólidos suspensos (SS), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e nitrogênio amoniacal ( $N-NH_4$ ), e são uma opção viável para a restauração ecológica ou tratamento terciário em plantas de tratamento (WANG *et al.*, 2017).

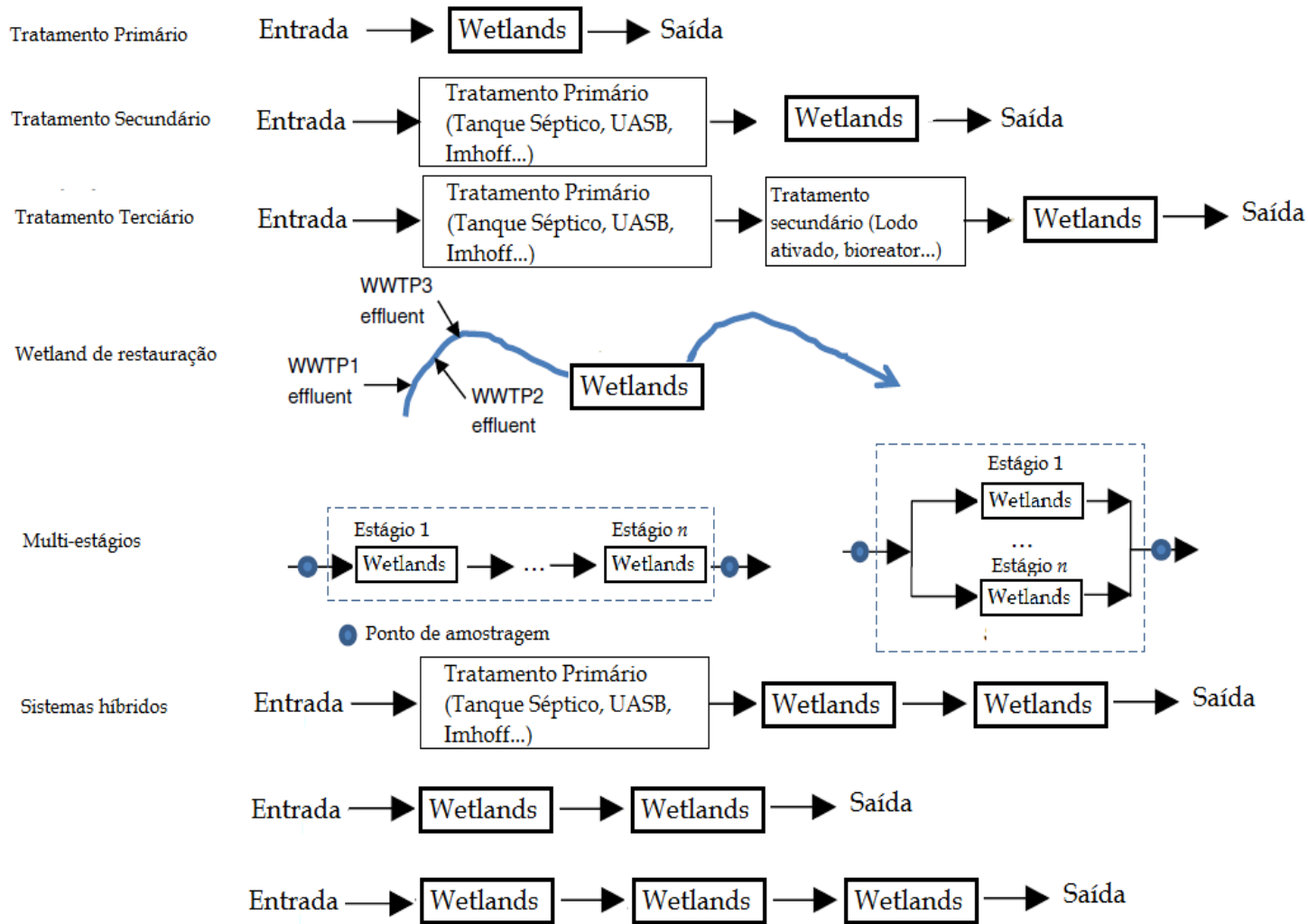
Os sistemas de fluxo subsuperficial são divididos entre horizontal e vertical, enquanto que o fluxo horizontal é o mais utilizado e resultado em um tratamento menos aeróbico, o vertical tem maior custo de operação e manutenção e é mais aeróbico (VYMAZAL, 2018; WANG *et al.*, 2017). Como vantagens do sistema de fluxo horizontal temos alta remoção de SS, DBO e DQO e reduzida eficiência para  $N-NH_4$ . Já o sistema de fluxo vertical apresenta taxas de remoção maiores para SS e  $N-NH_4$ , no entanto menores para DBO e DQO (WANG *et al.*, 2017).

Segundo Zhang e colaboradores (2016), os *wetlands* construídos podem apresentar bons resultados na remoção de fármacos específicos, observando-se a redução da população bacteriana e alteração de sua estrutura taxonômica quando comparados a um grupo de controle. Alguns estudos demonstram que as formas de degradação dos compostos farmacêuticos no sistema são as mais diversas podendo serem absorvidos e/ou metabolizados pelas plantas, fotodegradados, biodegradados por sistemas aeróbios/anaeróbios, ou adsorvidos nas raízes das plantas ou no material de fixação das raízes (areia, brita etc.) (CARRANZA-DIAZ *et al.*, 2014).

As propriedades físico-químicas como solubilidade em água, massa molecular e coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ ) estão ligadas a forma com que o composto será absorvido e degradado pelo sistema de tratamento (MADIKIZELA *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2013). Compostos orgânicos com massa molecular abaixo de 1000 ou baixos valores de  $K_{ow}$  são mais facilmente absorvidos pelas raízes (ZHANG *et al.*, 2017), entretanto, em alguns casos os valores de  $K_{ow}$  não são capazes de demonstrar relação direta com o tratamento. Assim, considera-se o coeficiente de distribuição octanol-água ( $D_{ow}$ ) que é calculado em função do pH sendo  $D_{ow} = K_{ow}/(1 + 10^{pH - pK_a})$  tende a ser mais apropriado como indicador de remoção da matéria orgânica em sistemas wetlands (TERNES *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2018).

Os *wetlands* construídos podem estar inseridos de diversas formas nos processos de tratamento de efluentes e assim são classificados de acordo com a configuração apresentada na Figura 2 (VERLICCHI; ZAMBELLO, 2014).

Figura 2 - Classificação das configurações dos *wetlands* construídos



Adaptado de Verlicchi e Zambello (2014).

Outros fatores que podem influenciar na eficiência do sistema em relação da degradação de moléculas específicas são as variações hidrológicas causadas por chuvas, mistura incompleta no tratamento ou biotransformações que as moléculas podem sofrer (BRUNSCH *et al.*, 2018a).

Diferentes configurações dos *wetlands* construídos são responsáveis por diferentes resultados na remoção de carbono orgânico, nitrogênio e compostos específicos como demonstrado por SgROI e colaboradores (2018), onde o sistema de fluxo subsuperficial vertical insaturado obteve as melhores remoções para carbono orgânico (DBO<sub>5</sub>, DQO e carbono orgânico total (COT)), enquanto que o sistema de fluxo subsuperficial vertical parcialmente saturado apresentou boa remoção do nitrogênio total e de compostos específicos como cafeína, trimetoprima e sulfametoxazol. Processos aeróbicos são indicados para a remoção de compostos como ibuprofeno, genfibrozila e naproxeno além da remoção de amônia, enquanto que o cetoprofeno e o diclofenaco são melhores removidos em sistemas sem plantas e com maior incidência de luz, ou seja, por fotólise (ZHANG *et al.*, 2018).

A espécie de planta utilizada nos *wetlands* construídos tem uma grande importância na degradação dos compostos farmacêuticos, dentre as espécies de macrófitas utilizadas pode-se citar os gêneros *Typha*, *Acorus*, *Phragmites*, *Cyperus*, *Canna* e *Scirpus* (LI *et al.*, 2016; PARK *et al.*, 2018; YAN *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2013). Macrófitas do gênero *Typha angustifolia* são capazes de reduzir a concentração de ibuprofeno em efluentes contaminados através de translocação, fitorremediação e rizodegradação do composto (LI *et al.*, 2016). Wang e colaboradores (2019) demonstraram o potencial de fitorremediação da mesma espécie para 8 PPCPs, incluindo ibuprofeno, porém neste caso não foi observado a translocação deste para a planta mas somente sua biodegradação.

Em uma comparação entre as espécies *Typha* e *Acorus* é possível observar que as plantas possuem um potencial de remediação semelhante, porém a diferença de solo entre os sistemas torna a espécie *Acorus* mais eficiente em alguns casos (PARK *et al.*, 2018).

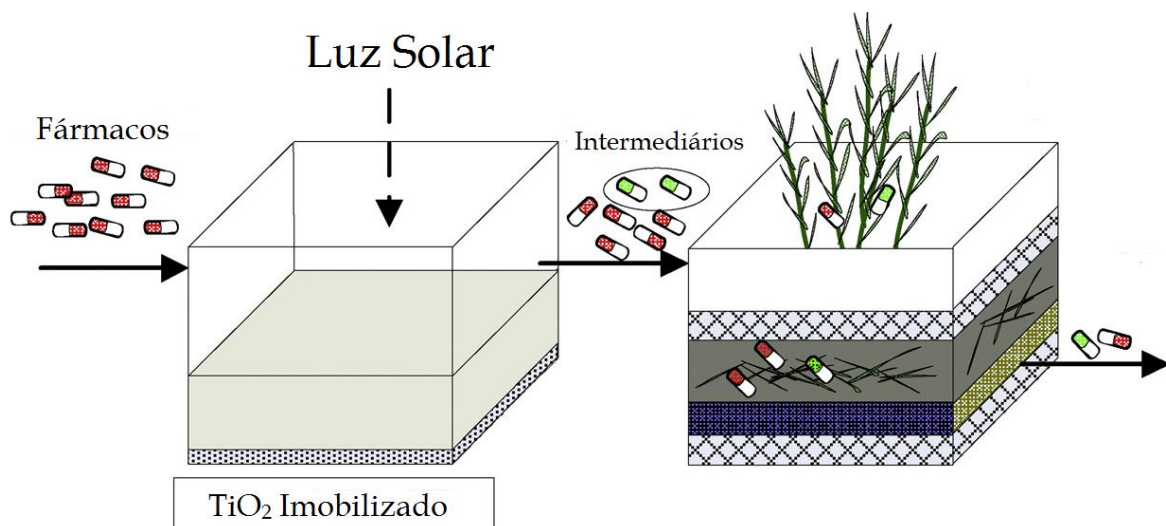
O uso da espécie *Cyperus alternifolius* no tratamento de uma amostra que simulava um efluente contaminado com 8 fármacos demonstrou que, seja por absorção ou por ação da rizosfera, o sistema com esta espécie de planta é capaz de reduzir até mesmo compostos mais recalcitrantes como a carbamazepina (YAN *et al.*, 2016). Utilizando a espécie *Canna indica* L. em uma planta de pequena escala foi

possível observar a remoção de até 90% dos compostos como naproxeno, ibuprofeno e diclofenaco (ZHANG *et al.*, 2018). Já a espécie *Phragmites australis* alcançou altas taxas na remoção de cafeína e trimetoprima, porém não foi tão eficiente para a remoção de sucralose e sulfametoxazol (SGROI *et al.*, 2018). Já no estudo de Carranza-Diaz e colaboradores (2014), a comparação entre um sistema de tratamento com a presença de plantas da espécie *Phragmites australis* em relação a um sistema sem plantas demonstrou que os dois sistemas removem PPCPs. Em geral, o sistema com plantas apresentou maiores reduções em relação ao sistema sem plantas, com exceção da cafeína que teve taxas de redução semelhantes nos dois sistemas.

O uso de outros materiais em conjunto com as macrófitas podem tornar o sistema mais eficiente, como no estudo realizado por Brunsch e colaboradores (2018b), onde os sistemas com *Phragmites australis* com e sem a adição de carvão ativado granular (CAG) demonstraram que a utilização de CAG aumentou tanto a degradação da carga orgânica dissolvida, quanto de micropoluentes como diclofenaco e carbamazepina.

Sistemas híbridos como um sistema de irradiação em  $\text{TiO}_2$  prévio ao sistema de plantas como apresentado na Figura 3 também demonstraram que os *wetlands* construídos podem apresentar melhores reduções de micropoluentes quando os efluentes passam por um tratamento oxidativo previamente, principalmente em relação aos compostos farmacêuticos considerados recalcitrantes (HE *et al.*, 2018).

Figura 3 - Sistema híbrido com irradiação solar em  $\text{TiO}_2$ .



Adaptado de He *et al.* (2018).

A aplicação de outros processos, como Processos de Oxidação Avançada (POAs), em conjunto com os *wetlands* construídos podem trazer melhores resultados. Apesar dos sistemas híbridos se apresentarem com grande potencial para a remoção de compostos orgânicos como fármacos, maiores estudos são necessários para observar seu comportamento (KRZEMINSKI *et al.*, 2019).

## 2.3 PREPARO DE AMOSTRA

Apesar de alguns estudos apresentarem métodos de preparo mais simples, com etapas de filtração ou centrifugação, métodos elaborados com maior número de etapas para a extração de fármacos em efluentes melhoram os limites de quantificação devido a maior limpeza do extrato e fatores de concentração dos analitos de cada método (CHEN *et al.*, 2016; DASENAKI; THOMAIDIS, 2015; GÓMEZ-CANELA *et al.*, 2019).

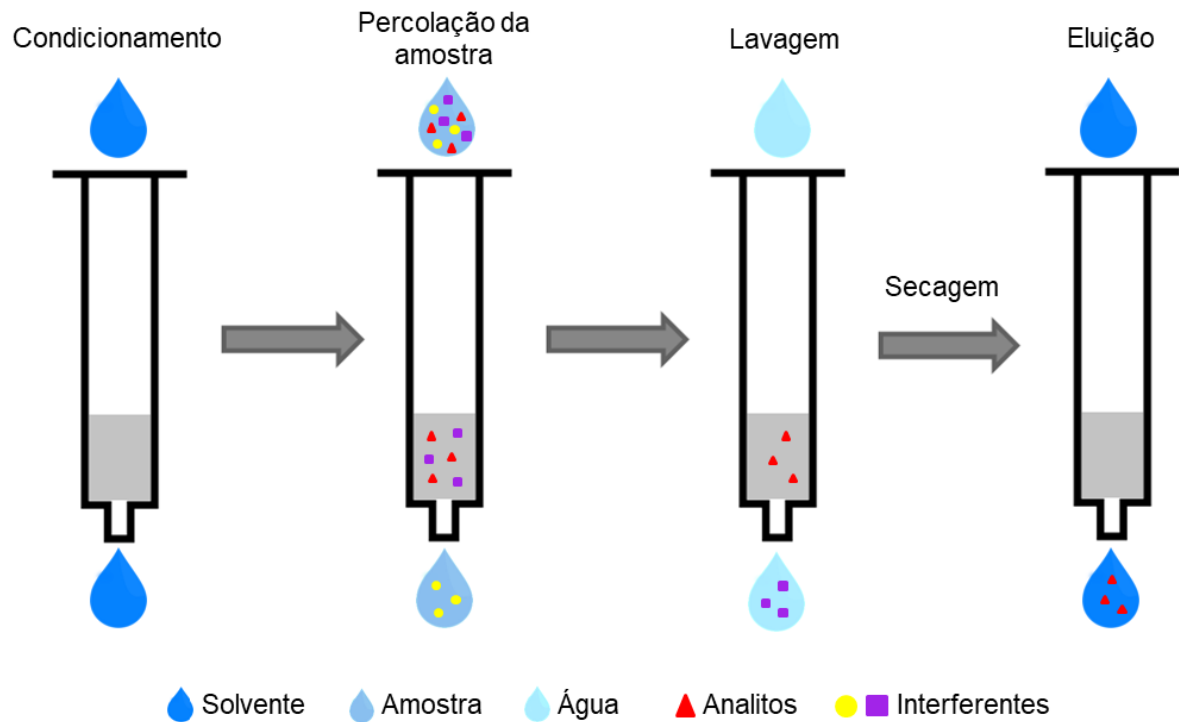
O preparo de amostra eficiente pode diminuir o efeito matriz observado em análises de fármacos em efluentes com detectores espectrométricos, onde a supressão do sinal no equipamento pode chegar a mais de 50% para alguns fármacos devido à complexidade dos efluentes (PAÍGA; SANTOS; DELARUE-MATOS, 2017).

Dentre as técnicas mais utilizados no preparo de amostras líquidas temos a extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*), método que substituiu a extração líquido-líquido clássica (LLE, do inglês *liquid-liquid extraction*) em análises de amostras de alimentos, biológicas e ambientais (PŁOTKA-WASYLKA *et al.*, 2016).

### 2.3.1 Extração em fase sólida

O procedimento clássico de extração em fase sólida é demonstrado na Figura 4, em que o sorvente é pré-condicionado, a amostra é percolada no sorvente para a concentração dos analitos, seguido de uma lavagem do sorvente para retirada de coextrativos e posterior eluição dos analitos com solventes adequados (WATERS, 2015; CALDAS *et al.*, 2011).

Figura 4 - Etapas de um processo de SPE.

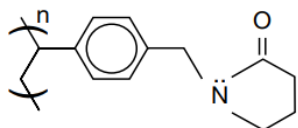
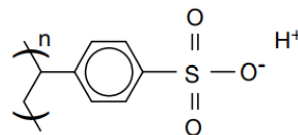
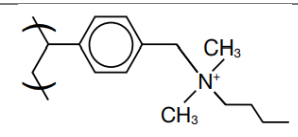
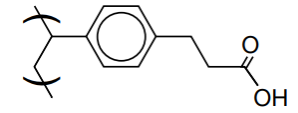
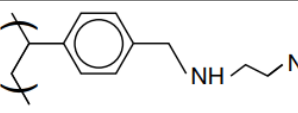


Fonte: Adaptado de CALDAS *et al.* (2011).

Com o desenvolvimento dos métodos de extração em fase sólida, apareceram diferentes designs como os discos, versões miniaturizadas com múltiplas placas (tornando a análise muito mais rápida e com menos gasto de solventes), além de sistemas “on-line” onde todo o processo de concentração e eluição da amostra acontece em um equipamento acoplado a um cromatógrafo (JARDIM, 2010; PŁOTKA-WASYLKA *et al.*, 2016).

Os sorventes podem ser divididos em três categorias: óxidos inorgânicos, sorventes com baixa especificidade e sorventes para compostos específicos ou classes específicas. Os sorventes poliméricos porosos são a base de resina de divinilbenzeno ou materiais a base de carbono, enquanto os sorventes de óxidos inorgânicos podem ser de sílica, alumina, ou silicato de magnésio e são limitados para a extração devido à natureza das interações entre os analitos e estes tipos de sorvente (AUGUSTO *et al.*, 2013; PŁOTKA-WASYLKA *et al.*, 2016). Na tabela 3 os sorventes poliméricos mais comumente utilizados nos métodos de SPE.

Tabela 3 - Sorventes poliméricos mais comumente utilizados em SPE.

Nome comercial	Estrutura do sorvente	Descrição
Oasis HLB ou Strata-X		Sorvente de equilíbrio hidrofílico-lipofílico; recheio de fase reversa para compostos de ampla faixa de polaridades, exemplo de fármacos e seus metabólitos polares. Um sorvente para aplicações gerais de SPE
Oasis MCX ou Strata-X-C		Sorvente de modo misto, troca catiônica forte e fase reversa para bases. Alta seletividade para compostos básicos
Oasis MAX ou Strata-X-A		Sorvente de modo misto, troca aniônica forte e fase reversa para ácidos. Alta seletividade para compostos ácidos
Oasis WCX ou Strata-X-CW		Sorvente de modo misto, troca catiônica fraca e fase reversa. Retém bases fortes (ex. aminas quaternárias)
Oasis WAX ou Strata-X-AW		Sorvente de modo misto, troca aniônica fraca e fase reversa. Retém ácidos fortes (ex. sulfonatos).

Fonte: Phenomenex, 2015.

Outros tipos de processos baseados em SPE como extração em fase sólida magnética (MSPE), extração em fase sólida *on-chip*, extração em fase sólida com impressão molecular simulada e microextração em fase sólida dispersiva (D- $\mu$ SPE) são desenvolvidos buscando otimizar a técnica, reduzindo o tempo de análise, a quantidade de sorvente e amostra, melhorando a eficiência da extração ou automatizando a análise (LI *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2019; CHISVERT; CÁRDENAS; LUCENA, 2019; EL-SHEIKH; QAWARIQ; ABDELGHANI, 2019).

O método de SPE *on-line* reduz o tempo e o trabalho envolvido na análise já que a amostra é extraída e analisada pelo equipamento automaticamente (LINDBERG *et al.*, 2014). No entanto, o custo de operação e manutenção, além da sensibilidade e flexibilidade analítica ainda tornam a SPE *off-line* mais atrativa e mais utilizada atualmente (ZHANG *et al.*, 2020), principalmente para matrizes mais complexas, como efluentes.



### 2.3.1.1 Extração em fase sólida em análises de fármacos em efluentes

Nos estudos de análises de fármacos em efluentes os cartuchos SPE contendo sorventes poliméricos são amplamente utilizados devido a apresentar boas taxas de recuperação em uma mesma extração para múltiplos compostos, possibilitando a análise multiclasse para até 168 fármacos diferentes como observado na Tabela 4 (ARCHER *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2020). Além disso, devido aos fatores de concentração e a característica dos sorventes de retirar coextrativos, os níveis de quantificação chegam a  $\text{ng L}^{-1}$  (GONZÁLEZ-MARIÑO *et al.*, 2018; PENG; GAUTAM; HALL, 2019; RIVERA-JAIMES *et al.*, 2018).

Comparando sorventes poliméricos como Strata<sup>TM</sup>-X com os poliméricos mistos com troca de cátions Oasis<sup>®</sup> MCX, é possível observar que o primeiro apresenta as melhores recuperações para 33 fármacos, como antibióticos, anti-inflamatórios e drogas psiquiátricas, em amostras de efluentes e rios (PAÍGA; SANTOS; DELARUE-MATOS, 2017). No estudo de Dasenaki e Thomaidis (2015) foram obtidos resultados semelhantes comparando os sorventes Strata<sup>TM</sup>-X e Strata<sup>TM</sup>-X-C, sendo este último similar ao Oasis<sup>®</sup> MCX, o sorvente com troca catiônica apresentou menores recuperações em relação ao sorvente polimérico neutro para os 89 fármacos avaliados.

Quando comparado os sorventes poliméricos de características semelhantes como Oasis HLB e Strata<sup>TM</sup>-X, ambos com balanceamento hidrofílico-lipofílicos, observa-se que o Oasis<sup>®</sup> HLB é mais utilizado e apresenta melhores recuperações para compostos como amoxicilina, clorfeniramina, megestrol e clormetiazol comparado ao Strata<sup>TM</sup>-X (GÓMEZ-CANELA *et al.*, 2019). No estudo de Opriş e colaboradores (2017), o sorvente Oasis<sup>®</sup> HLB foi mais eficiente na extração de antibióticos em efluentes em relação aos cartuchos Strata<sup>TM</sup>-X e HyperSep Retain PEP. Apesar de menos encontrado na literatura o sorvente polimérico Cleanert<sup>®</sup> PEP-2 demonstrou maior eficiência na recuperação de fármacos em relação a outros dois cartuchos de balanceamento hidrofílico-lipofílicos, o Oasis<sup>®</sup> HLB e Polysery HLB (ZHANG *et al.*, 2020).

Os cartuchos poliméricos neutros de balanceamento hidrofílico-lipofílicos são mais eficientes na extração de fármacos como ácido acetilsalicílico, carbamazepina, paracetamol e sulfametoxazol em meio ácido comparados ao pH neutro ou a outros

tipos de sorventes de modo misto contendo troca aniônica (GÓMEZ-CANELA *et al.*, 2019; TRAN; HU; ONG, 2013).

Diversas modificações no procedimento de extração são realizadas como alterações de pH, uso de compostos complexantes e misturas de solventes de eluição a fim de obter a recuperação na faixa adequada para os compostos alvos. As alterações do pH buscam uma melhor interação dos compostos com o sorvente. No caso de fármacos em geral, a maior parte são compostos ácidos e diversos trabalhos demonstram que valores de pH ácidos entre 2,5 e 4,0 apresentam melhores resultados em comparação a testes realizados em pH básico ou neutro (CABAN *et al.*, 2019; DASENAKI; THOMAIDIS, 2015; GÓMEZ-CANELA *et al.*, 2019; PAÍGA; SANTOS; DELARUE-MATOS, 2017; PENG; GAUTAM; HALL, 2019). No entanto, alguns autores encontram melhores resultados na extração em pH neutro, simplificando o processo de extração pois, em geral, não há a necessidade de alterar o pH das amostras (KOSMA *et al.*, 2014; SHRAIM *et al.*, 2017). Devido a alguns compostos apresentarem baixas recuperações para extrações em pH ácido, no estudo de Zhang e colaboradores (2020) foram realizadas duas extrações, uma em pH ácido ( $3,0 \pm 0,5$ ) e outra em pH neutro ( $7,0 \pm 0,5$ ), considerando as diferentes recuperações em cada pH para as diversas classes de compostos que avaliaram.

No estudo de Dasenaki e Thomaidis (2015) e Pugajeva e colaboradores (2017), a redução do pH para a faixa de 2 a 3 demonstrou ser mais eficiente na extração de antibióticos, NSAIDs e hormônios em relação a pH menos ácido (4) e neutro (7). Já no estudo de Opriş e colaboradores (2017), o pH 5,5 foi mais eficiente que pH mais ácidos (2,0) e básicos (9,0) para a recuperação de 14 antibióticos em efluentes. O método foi aplicado posteriormente por Szekeres e colaboradores (2017) em efluentes provenientes de três hospitais.

A adição de agentes quelantes como o  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  em amostras aquosas é necessário para avaliar principalmente antibióticos, pois estes compostos complexam facilmente com cátions multivalentes de metais presentes nas amostras e reduzem a recuperação na extração. Assim, com a adição de agentes quelantes os antibióticos tendem a interagir melhor com o sorvente e ficam retidos no cartucho de SPE (DASENAKI; THOMAIDIS, 2015; OPRIŞ *et al.*, 2017; PUGAJEVA *et al.*, 2017; SHRAIM *et al.*, 2017). No método utilizado por Dasenaki e Thomaidis (2015), a adição de 0,1% (m/v) de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  melhorou a recuperação de sulfonamidas e tetraciclina.

O uso de metanol como solvente para a eluição foi escolhido buscando o solvente com melhor recuperação dos compostos e mais amigável ambientalmente.

O método de extração aplicado por Shraim e colaboradores (2017) em amostras de efluente coletadas em uma ETE, que recebe majoritariamente efluentes domésticos e, por vezes efluentes hospitalares e industriais, utiliza EDTA como agente quelante e também ácido ascórbico como agente redutor a fim de remover residuais de cloro.

Buscando aumentar a retenção dos coextrativos do efluente no cartucho, Caban e colaboradores (2019) adicionaram diferentes materiais, como Florisil®, alumina, PSA (amina primária secundária) e carvão ativado ao cartucho polimérico Strata™-X. A adição de PSA e alumina forneceu as melhores recuperações tanto para fármacos ácidos, básicos como para neutros.

O PSA é uma amina primária e secundária de estrutura bidentada que possibilita a limpeza de extrato sendo capaz de remover pigmentos, ácidos graxos de cadeia curta, açúcares e compostos de elevada polaridade devido ao seu efeito quelante (CABRERA *et al.*, 2012). A terra diatomácea é um sorvente de baixo custo e com elevada área superficial e suas superfícies ocas propiciam a adsorção de coextrativos. É um silicato amorfo composto de sílica, alumínio, ferro, cálcio, magnésio, sódio e potássio (KIRSCHNER, 2017). A Celite® é uma terra diatomácea calcinada a alta temperatura (SIGMA-ALDRICH, 2021). O Florisil® é uma alternativa a sílica sendo uma sílica gel carregada com magnésio extremamente polar e ideal para isolar compostos polares em matrizes apolares (AGILENT, 2021). Zeólitas são estruturas cristalinas, geralmente constituídos de cristais de aluminossilicatos de formato tetraédrico com alta capacidade de adsorção química, estabilidade química e térmica além de capacidade de troca iônica (BAILE; VIDAL; CANALS, 2019).

Tabela 4 - Sorventes utilizados para determinação de fármacos em efluentes.

Sorvente utilizado	Volume de amostra	Nº de fármacos estudados	Solvente de eluição	Ressuspensão	LOD/LOQ (ng L <sup>-1</sup> )	Ref.
Oasis HLB (60 mg)	50 mL	90	4 mL MeOH	500 µL H <sub>2</sub> O / MeOH (80:20)	- / -	Archer <i>et al.</i> , 2017
Oasis HLB (200 mg)	100 mL	35	6 mL MeOH + 6 mL ACE / MeOH / Acetato de etila (2:2:1)	1 mL MeOH	- / 0,1	Subedi <i>et al.</i> , 2017
Strata-X (200 mg)	100 mL pH 2 c/ HCl (0,1% Na <sub>2</sub> EDTA)	33	10 mL MeOH	500 µL ACN / H <sub>2</sub> O (30:70)	0,02 / 0,04	Paíga; Santos; Delarue-Matos, 2017
Strata-X (200 mg)	200 mL (20 µL 0,1M Na <sub>2</sub> EDTA e 100 µL Ác. Acético)	24	6 mL MeOH	100 µL H <sub>2</sub> O / MeOH (80:20)	- / 0,01	Pugajeva <i>et al.</i> , 2017
Oasis MCX (150 mg)	100 mL	38	10 mL MeOH (5% NH <sub>3</sub> )	100 µL MeOH	- / 0,3	González- Mariño <i>et al.</i> , 2018
Oasis MCX (60 mg)	500 mL (GC)	6	3 mL AcEt + 3 mL AcEt / ACE (1:1) + 3 mL AcEt / ACE / NH <sub>4</sub> OH (48/48/2)	1,5 mL AcEt	0,8 / 2,8	Fernández <i>et al.</i> , 2014
Oasis HLB (200 mg)	150 mL (0,1% Na <sub>4</sub> EDTA)	138	2 x 5 mL MeOH	500 µL MeOH	0,03 / 0,1	Papageorgiou <i>et al.</i> , 2019
Cleanert PEP-2 (200 mg)	50 mL pH 7 e 3 c/ HCl (25mg Na <sub>4</sub> EDTA)	168	2 x 2 mL MeOH	100 µL MeOH (ajuste a 500 µL c/ H <sub>2</sub> O 0,125% ác. Fórmico)	0,01 / 0,10	Zhang <i>et al.</i> , 2020

<b>Oasis HLB (200 mg)</b>	100 mL pH 2	44	6 mL MeOH/HCOOH (95:5) + 6 mL MeOH	200 µL ACN / H <sub>2</sub> O (30:70)	0,1 / -	Gómez-Canela <i>et al.</i> , 2019
<b>Strata-X (60 mg)</b>	50 mL pH 2	1 (IBU)	5 mL MeOH	-		Li <i>et al.</i> , 2016
<b>Strata-X (200 mg)</b>	250 mL	22	6 mL MeOH + 3 mL MeOH/DCM (1:1)	1 mL H <sub>2</sub> O / MeOH (70:30)		Andrés-Costa; Carmona; Picó, 2016
<b>Oasis HLB (500 mg)</b>	500 mL pH 3 (0,5 g Na <sub>4</sub> EDTA)		6 mL MeOH + 6 mL MeOH (5% NH <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O)	1 mL H <sub>2</sub> O (10% MeOH)		Liu <i>et al.</i> , 2019
<b>Oasis HLB (500 mg)</b>	250 mL	23	5 mL MeOH	1 mL H <sub>2</sub> O	0,2 / 0,668	Afonso-Olivares <i>et al.</i> , 2017
<b>Oasis HLB</b>	100 mL	78	10 mL MeOH	1 mL H <sub>2</sub> O / MeOH (75:25)		Biel-Maeso <i>et al.</i> , 2018
<b>Strata-X (200 mg)</b>	50 mL pH 2,5 (1 mL, 5% EDTA em H <sub>2</sub> O)	89	2 x 3 mL MeOH	500 µL 0,05% ác. Fórmico / MeOH (75:25)	1,1 / 3,21	Dasenaki e Thomaidis, 2015
<b>Oasis HLB (500 mg)</b>	200 mL (pH 2,5 e 7)	83	10 mL MeOH	H <sub>2</sub> O / MeOH (75:25)	<0,01 / <0,01	Baena-Nogueras <i>et al.</i> , 2016
<b>Oasis HLB (60 mg)</b>	100 mL	35	2 x 3 mL MeOH	1 mL H <sub>2</sub> O / MeOH (90:10)	1,1 / 3,7	Rivera-Jaimes <i>et al.</i> , 2018
<b>Oasis MCX (150 mg)</b>	500 mL (10 mg Na <sub>4</sub> EDTA; 0,05 mg ácido ascórbico)	19	2 x 4 mL ACN 2 x 4 mL ACN (5% NH <sub>4</sub> OH)	500 µL H <sub>2</sub> O / ACN (80:20) 500 µL H <sub>2</sub> O / MeOH (80:20)	0,11 / 0,33	Shraim <i>et al.</i> , 2017
<b>Chromabond HR-X (500 mg)</b>	250 mL pH 2	24	2 x 5 mL MeOH	1 mL H <sub>2</sub> O / MeOH (25:75)	0,1 / 0,3	Tran; Hu; Ong, 2013

<b>Strata-X-Drug B (60 mg)</b>	200 mL pH 2	20	2 mL AcEt / isopropanol (85:15) 2 x 2 mL AcEt / isopropanol / NH <sub>4</sub> OH (70:20:10)	100 µL ACN / H <sub>2</sub> O 0,5% HCOOH (5:95)	0,01 / 0,03	Peng; Gautam; Hall, 2019
<b>Strata-X (200 mg) + PSA + Alumina</b>	250 mL pH 3,5	15	5 mL MeOH	100 µL piridina / BSTFA 1% TMCS	3 / 10	Caban <i>et al.</i> , 2019
<b>Oasis HLB (500 mg)</b>	100 mL pH 5,5 (0,2 g EDTA)	14	10 mL MeOH	2 mL H <sub>2</sub> O	- / -	Opriş <i>et al.</i> , 2017

IBU: Ibuprofeno;  
GC: Cromatografia á gás.

## 2.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM SÉRIE (LC-MS/MS)

A LC-MS/MS é amplamente utilizada para a determinação de contaminantes emergentes em matrizes ambientais devido a sua ótima seletividade, sensibilidade, robustez e confiabilidade na identificação dos compostos alvo (BOTERO-COY *et al.*, 2018; DONATO *et al.*, 2017). Em conjunto com a SPE, que propicia uma limpeza adequada do extrato, grandes volumes de injeção podem ser utilizados em LC-MS/MS, além da boa detectabilidade da espectrometria de massas (PETRIE *et al.*, 2016).

O uso de técnicas mais modernas como a cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC, do inglês *Ultra-high performance liquid chromatography*) - técnica em que a fase estacionária da coluna tem tamanho de partícula < 2 µm e as colunas são mais curtas e estreitas - tornam possível análises mais rápidas, boas resoluções devido a picos mais estreitos e detecções em níveis muito baixos de concentrações (ng L<sup>-1</sup>) (PAÍGA; SANTOS; DELERUE-MATOS, 2017; RIZZETI *et al.*, 2018).

A ionização por eletronebulização (ESI, do inglês *Eletrospray ionization*) é uma técnica importante de ionização da espectrometria de massas especialmente para moléculas de média e alta polaridade, condição característica da maioria dos fármacos (PRIMEL; CALDAS; ESCARRONE; 2012). A ESI em alguns casos é mais sensível que outras fontes, alcançando menores limites de quantificação, além de apresentar efeito matriz menos intenso em comparação com a ionização química à pressão atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric pressure Chemical Ionization*) (SILVA *et al.*, 2019).

O espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo apresenta as características de formação do íon molecular e diversos modos de quantificação dos analitos (PRIETO-SANTIAGO *et al.*, 2022). Entre os modos de determinação do espectrômetro o monitoramento de reações selecionadas (SRM, do inglês *Selected reaction monitoring*) aumenta a especificidade e reduz o ruído e interferências a partir da seleção de um íon precursor e um íon produto específico da quebra gerada pelo gás de colisão (YANG *et al.*, 2002). O modo de monitoramento de múltiplas reações (MRM, do inglês *Multiple reaction monitoring*) usa o mesmo conceito do SRM, porém após a fragmentação, dois ou mais fragmentos são monitorados, ou ainda, vários fragmentos de vários íons precursores podem ser monitorados (GUO *et al.* 2012;

PRIETO-SANTIAGO *et al.*, 2022). Quando utilizado o modo MRM para um analito a determinação se torna mais sensível para detectar e quantificar moléculas em relação aos outros modos (PRIETO-SANTIAGO *et al.*, 2022).

#### **2.4.1 LC-MS/MS aplicada à análise de fármacos em águas e efluentes.**

Os métodos cromatográficos desenvolvidos para analisar fármacos em amostras aquosas utilizam normalmente uma fase aquosa e outra fase orgânica com metanol (MeOH) ou acetonitrila (ACN), adicionam-se em ambas fases modificadores como, por exemplo, o íon formiato, na forma de ácido fórmico ou de sal como o formiato de amônio, para a ionização por ESI positiva e/ou negativa. Alguns trabalhos ainda utilizam o íon acetato como modificador para a ionização negativa conforme demonstrados na Tabela 5.

As colunas cromatográficas utilizadas nos métodos multiclasse para determinação de fármacos por UHPLC-MS/MS são em sua maioria preenchidas com fase estacionária C18 com tamanho de partícula entre 1,6 e 1,9  $\mu\text{m}$  e comprimentos que variam de 50 a 150 mm. O volume de injeção também diminui na UHPLC quando comparado ao utilizado em HPLC, variando entre 2 e 5  $\mu\text{L}$  (BOTERO-COY *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2016; GONZÁLEZ-MARIÑO *et al.*, 2018).



Tabela 5 - Condições cromatográficas utilizados pela literatura na determinação de medicamentos em águas e efluentes.

Equipamento	Coluna	Fase Móvel	Modificador	Temp.	Vazão (mL/min)	Nº de compostos	Vol. Inj. (µL)	Referência
<b>Waters Acquity UPLC – Xevo TQS MS/MS</b>	Acquity UPLC BEH C18 (100 × 2.1 mm, 1.7 µm)	A: H <sub>2</sub> O B: MeOH	0,01% ác. fórmico e 1mM NH <sub>4</sub> Ac	-	0,4	28	100	Botero-Coy <i>et al.</i> , 2018
<b>Agilent 1260 HPLC – 6460 triple quadrupole MS</b>	ZORBAX Eclipse Plus C18 (100 × 4.6 mm, 3.5 µm)	A: H <sub>2</sub> O B: ACN	0,1% ác. fórmico	-	0,4	12	75	Brunsch <i>et al.</i> , 2018a
<b>Agilent 1200 LC 5500 QTRAP analyser UHPLC – QqLIT – MS/MS</b>	Zorbax Eclipse XDB C18 (50 × 4.6 mm, 1.8 µm)	A: H <sub>2</sub> O B: ACN	0,1% ác. fórmico	-	0,4	88	10	Campos-Mañas <i>et al.</i> , 2017
<b>Agilent 1200 UHPLC – 6410 triple quadrupole MS/MS</b>	Zorbax Eclipse XDB C18 (100 × 4.6 mm, 3.5 µm) (ESI+) Zorbax Eclipse XDB C18 (150 × 4.6 mm, 3.5 µm) (ESI-)	A: H <sub>2</sub> O B: MeOH	0,1% ác. fórmico e 5 mM formiato de amônio (ESI+) 0,05% ác. acético (ESI-)	-	0,25	32	500 (ESI +) 1000 (ESI -)	Chen <i>et al.</i> , 2016
<b>Thermo Scientific Accela UHPLC – TSQ Quantum Access QqQ MS/MS</b>	Atlantis T3 C18 (100 × 2.1 mm, 3 µm)	A: H <sub>2</sub> O B: MeOH	0,1% ác. fórmico	30	0,1	72	10	Dasenaki e Thomaidis, 2015
<b>Agilent 1260 LC – Sciex Triple Quad 6500+</b>	Zorbax Eclipse Plus C18 (150 × 2,1 mm, 3.5 µm)	A: H <sub>2</sub> O B: ACN	0,1% ác. fórmico ou 0,1% ác. acético (ESI +/-)	-	-	154	80	Hermes <i>et al.</i> , 2018

<b>UPLC - MS/MS</b>	Intensity Solo HPLC RP C18 (100 x 2.1 mm, 2 µm)	A: MeOH B: H <sub>2</sub> O	0,05% ác. fórmico e 0,06% formiato de amônio (ESI+) 0,04 % acetato de amônio e 0,04% amônia (ESI-)	-	0,4	83	10	Baena-Nogueras et al., 2016
<b>Agilent 1100 HPLC - 6410 triple quadrupole MS</b>	Betabasic™ C18 (100 x 2.1 mm, 3 µm)	A: H <sub>2</sub> O B: ACN	0,3% ác. fórmico	-	0,2	13	20	Mullen <i>et al.</i> , 2017
<b>Shimadzu Nexera UHPLC - LCMS-8030 TQ-MS</b>	Cortecs™ UPLC C18 (100 x 2.1 mm, 1.6 µm) (ESI+) Kinetex C18 (150 x 2.1 mm, 1.7 µm) (ESI-)	A: H <sub>2</sub> O B: ACN	0,1% ác. fórmico (ESI+)	30	0,3 (ESI+) 0,22 (ESI-)	33	5	Paíga; Santos; Delarue-Matos, 2017
<b>Waters Acquity UPLC -</b>	Acquity UPLC BEH C18 (150 x 1.0 mm, 1.7 µm)	A: H <sub>2</sub> O/MeOH (80:20) B: H <sub>2</sub> O/MeOH (5:95) (ESI+) MeOH (ESI-)	1 mM formiato de amônio (ESI+) 5 mM acetato de amônio (ESI-)	25	0,04	90	15	Petrie <i>et al.</i> , 2016
<b>Thermo Fisher Accela 1250 UHPLC – Q- orbitrap-HRMS</b>	Kinetex C18 (100 x 2.1 mm, 2.6 µm)	A: H <sub>2</sub> O B: MeOH	0,1% ác. fórmico	40	0,2	24	5	Pugajeva <i>et al.</i> , 2017
<b>HPLC Symbiosis™ Pico – Sciex 4000 QTRAP MS</b>	Purospher Star RP-18 (125 x 2 mm, 5 µm)	A: H <sub>2</sub> O B: ACN (ESI+) ACN/MeOH (1:1) (ESI-)	0,1% ác. fórmico (ESI+) 10 mM acetato de amônio (ESI-)	-	0,3 (ESI+) 0,2 (ESI-)	35	-	Rivera-Jaimes <i>et al.</i> , 2018

<b>Agilent 1290 UHPLC - 6460 MS/MS</b>	SunFire C18 (150 x 2.1 mm, 3.5 µm)	A: H <sub>2</sub> O B: ACN:MeOH (2:1)	0,3% ác. fórmico (compostos ácidos e neutros) 20 mM NH <sub>4</sub> OH (compostos básicos)	-	0,5	19	10	Shraim <i>et al.</i> , 2017
<b>Shimadzu HPLC - LCMS-8030 TQ-MS</b>	Zorbax® SB-C18 (150 x 2.1, 3,5 µm)	A: H <sub>2</sub> O B: MeOH	2 mM acetato de amônio	40	0,25	24	5	Tran; Hu; Ong, 2013
<b>Waters LC-MS/MS Xevo TQS</b>	Synergi Polar-RP (250 x 4.6 mm, 4 µm)	A: ACN B: H <sub>2</sub> O	0,1% ác. fórmico	-	0,4	44	10	Gomez-Canela <i>et al.</i> , 2019
<b>Waters UPLC Xevo TQD</b>	Kinetex EVO C18 (50 x 2.1 mm, 1.7 µm)	A: H <sub>2</sub> O B: MeOH	5 mM de NH <sub>3</sub>	50	0,5	38	2	González-Mariño <i>et al.</i> , 2018
<b>Water Acquity UPLC Xevo TQS</b>	Acquity UPLC C18 (100 x 2.1 mm, 1.8 µm)	A: H <sub>2</sub> O B: MeOH	0,1 mM acetato de amônio	-	0,3	29	50	Hernández <i>et al.</i> , 2019
<b>Shimadzu Prominence UPLC – AB Sciex 4500 TQ MS/MS</b>	Kinetex C18 (50 x 3.0mm, 2.6 µm)	A: H <sub>2</sub> O B: ACN	0,1% ác. fórmico	35	0,4	168	10 (ESI+) 20 (ESI-)	Zhang <i>et al.</i> , 2020
<b>Shimadzu Nexera UHPLC - LCMS-8030 TQ-MS</b>	Acquity UPLC BEH C18 (150 x 2.1 mm, 1.7 µm)	A: ACN B: H <sub>2</sub> O	0,5% ác. fórmico	30	0,2	20	10	Peng; Gautam; Hall, 2019
<b>Thermo Scientific LC-MS/MS – Thermo TSQ Quantum Access Max</b>	Hypersil Gold C18 (100 x 2.1mm, 1.9 µm)	A: H <sub>2</sub> O B: MeOH	5 mM formiato de amônia	50	0,2- 0,56	138	-	Papageorgiou <i>et al.</i> , 2019

## 2.5 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

A validação é um procedimento capaz de confirmar que um método desenvolvido/criado no laboratório é apropriado para uso, a partir de evidências objetivas e que atendam a requisitos pré-estabelecidos por ela. A partir da validação o laboratório é capaz de garantir a confiabilidade e a qualidade adequada de seus resultados (INMETRO, 2020).

Alguns dos parâmetros envolvidos no processo de validação estão destacados na Tabela 6, entre eles: seletividade, linearidade, faixa linear de trabalho, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão.

Tabela 6 - Parâmetros avaliados durante a etapa de validação de métodos analíticos.

Parâmetro	Definição	Aplicação
<b>Seletividade</b>	Distinção entre as respostas dos analitos	Resposta de amostras de controle em branco e fortificadas
<b>Linearidade e Faixa Linear</b>	Avaliação da linearidade das curvas analíticas do tipo $y = ax + b$ obtidas pela correlação entre a resposta analítica e a concentração de cada composto injetado no equipamento.	Verificação da linearidade de no mínimo 5 níveis (n=3), com RSD $\leq$ 20% e $r^2 > 0,99$
<b>Exatidão</b>	Grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro. Para o cálculo utiliza-se a fórmula: $Rec (\%) = \frac{C1 - C2}{C3} \times 100$ C1: Conc. determinada na amostra fortificada C2: Conc. determinada na amostra não fortificada C3: Conc. usada para fortificação	Mínimo 3 níveis de fortificação (baixo, médio, alto) (n=6). Considera-se valores de recuperação aceitáveis entre 70 e 120%.
<b>Precisão (Repetibilidade)</b>	Avaliada através da fórmula do desvio padrão relativo para as 6 réplicas do mesmo nível de fortificação. $RSD (\%) = \frac{DP}{CMD} \times 100$ DP: Desvio Padrão CMD: Conc. Média Determinada	RSD $\leq$ 20%
<b>Precisão Intermediária</b>	Repetição do ensaio de exatidão e precisão (n=6) nos mesmos níveis de concentração, em diferentes dias e/ou analistas.	Rec. entre 70-120% e RSD $\leq$ 20%
<b>Efeito Matriz</b>	Comparação entre as inclinações das retas obtidas com as curvas analíticas preparadas no solvente e na matriz através da fórmula: $EM = \frac{x1 - x2}{x2} \times 100$ x1: inclinação da curva analítica extraída x2: inclinação da curva analítica preparada no solvente	Abordar o efeito matriz quando a supressão ou aprimoramento de sinal for $> 20\%$
<b>Limite de quantificação (LQ)</b>	Menor nível em que o analito pode ser quantificado com exatidão e precisão aceitável em um método validado.	n=6 com Rec. entre 70-120% e RSD $\leq$ 20%
<b>Limite de quantificação (LD)</b>	A menor quantidade do analito que pode ser detectada, mas não quantificada	$LOD = \frac{LOQ}{3,33}$

Fonte: INMETRO, 2011; SANTE, 2015.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental deste trabalho foi realizado no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Centro de Pesquisa em Cromatografia e Espectrometria de Massas (CPCEM) ligados ao Departamento de Química (DQ) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

#### 3.1 INSTRUMENTAÇÃO

- ✓ Agitador vórtex Phoenix, modelo AP56 (Brasil);
- ✓ Agitador vórtex - Biomixer QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- ✓ Balança analítica, modelo AUW 220D (Shimadzu, Japão);
- ✓ Balança analítica, modelo UX-420H (Shimadzu, Japão);
- ✓ Balança analítica, modelo APX-200 (Denver Instruments, EUA);
- ✓ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand – Alemanha e Eppendorf - Canadá);
- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q Direct 3UV<sup>®</sup> (Millipore, França);
- ✓ Sistema UHPLC-MS/MS equipado com:
  - Cromatógrafo líquido Agilent Technologies (EUA) modelo 1290, com bomba binária e amostrador automático;
  - Pré-coluna analítica Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18 (2,1 x 5 mm, 2,7 µm);
  - Coluna analítica Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18 (2,1 x 50 mm, 1,9 µm);
  - Espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo, Agilent Technologies (EUA) modelo 6470, com interface/fonte de ionização por eletronebulização (*electrospray*) com tecnologia *JetStream*;
  - Gerador de nitrogênio PEAK NM32LA (Peak Scientific, Escócia);
  - Sistema de injeção com agulha de poliéter-éter-cetona (PEEK) dentro da agulha de aço (EUA);
  - Sistema de controle e aquisição de dados através do *software MassHunter Workstation Quantitative Analysis v. 10.0* (Agilent Technologies, EUA);

- ✓ Ultrassom Unique, modelo USC-1400 (Brasil);
- ✓ Bomba a vácuo TE-058 (Tecnal, Brasil);
- ✓ Sistema de *manifold* para SPE (Varian, EUA);
- ✓ pHmetro modelo pH 500 series Cole Parmer equipado com eletrodo de vidro combinado (Vernon Hills, EUA);
- ✓ Centrífuga refrigerada Solab, modelo SL 703, com rotação máxima de 15000 rpm (Brasil).

### 3.2 MATERIAIS, REAGENTES E SOLVENTES

- ✓ Frascos de vidro (*vial*) de 2 mL;
- ✓ Frascos de vidro de 4 mL;
- ✓ Tubos tipo Eppendorf de 2 mL;
- ✓ Mangueiras de politetrafluoretileno;
- ✓ Vidrarias comuns de laboratório;
- ✓ Cartuchos SPE Oasis<sup>®</sup> HLB 60 mg/3 mL (Waters, EUA);
- ✓ Cartuchos SPE Strata<sup>™</sup>-X 60 mg/3 mL (Phenomenex);
- ✓ Cartuchos SPE Bond Elut 200 mg/3 mL (Agilent, EUA);
- ✓ Metanol grau HPLC (J.T. Baker, EUA);
- ✓ Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct 3UV<sup>®</sup> (resistividade de 18,2 MΩ cm);
- ✓ Formiato de amônio (Sigma Aldrich, EUA);
- ✓ Hidróxido de amônio 28-30% (Sigma Aldrich, EUA);
- ✓ Ácido fórmico ≥ 98% (Sigma Aldrich, EUA);
- ✓ Ácido etilenodiaminotetraacético dihidratado (EDTA dissódico) (Merck, Alemanha);
- ✓ PSA sílica, tamanho de partícula de 50 μm (Supelco, Alemanha);
- ✓ Celite<sup>®</sup>, tamanho de partícula de 16,4 μm (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Florisil<sup>®</sup>, tamanho de partícula de 200 μm (Agilent Technologies, EUA);
- ✓ Zeólita, tamanho de partícula de até 240 μm (Inlab, Brasil);
- ✓ Terra Diatomácea, tamanho de partícula de 120 μm (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Alumina (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Sílica (Sigma-Aldrich, EUA).

### 3.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

As soluções estoque individuais de cada fármaco foram preparadas na concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup> a partir dos padrões sólidos, considerando a pureza de cada um. Tanto a solução de mistura dos fármacos como a solução de mistura dos padrões de controle foram preparadas em metanol, ambas com concentração final de 10 mg L<sup>-1</sup>. As soluções foram armazenadas em temperaturas abaixo de -10 °C.

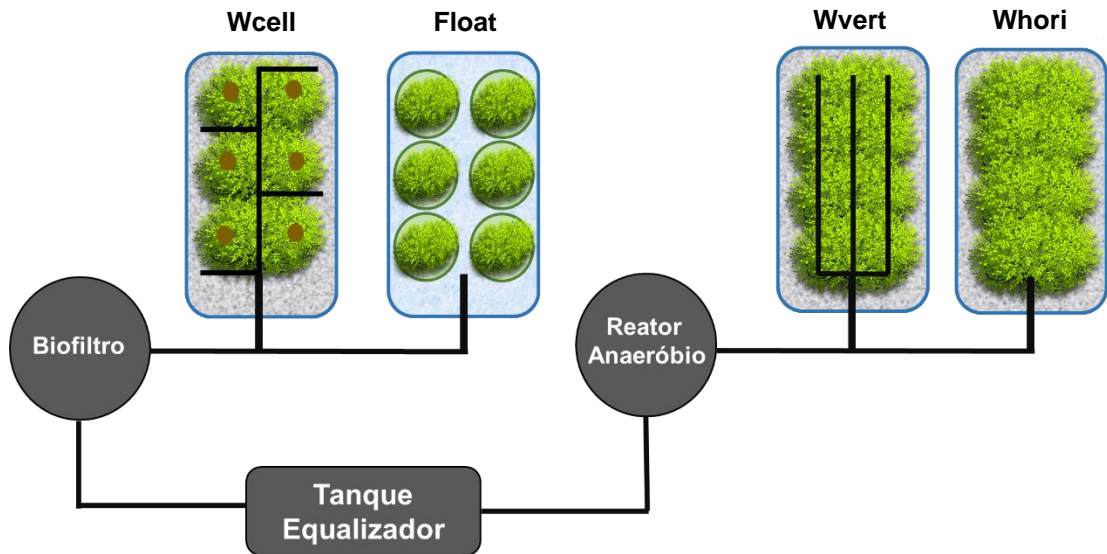
### 3.4 FÁRMACOS SELECIONADOS

Para este estudo, foram selecionados fármacos de diferentes classes: analgésicos e anti-inflamatórios, hormônios, antibióticos, β-bloqueadores, antiparasitários e antiepilépticos adquiridos das empresas Sigma-Aldrich, Fluka, e LGC Standards, com pureza maior que 90%.

### 3.5 COLETA DE AMOSTRA

As amostras de efluente foram coletadas na estação de tratamento de efluentes da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), antes e depois de passarem pelos sistemas de tratamento empregando *wetlands* construídos, conforme representado na Figura 5. As coletas foram realizadas em dias pré-determinados quando o sistema era recarregado.

Figura 5 - Configuração do sistema Wetlands construídos avaliados.



Fonte: O autor.

O sistema dispõe de um tanque equalizador que recebe os efluentes dos sanitários da universidade, do tanque equalizador o efluente é transferido, com uso de uma bomba hidráulica, para um reator anaeróbio e outro tanque chamado de biofiltro ambos com um tempo de detenção hidráulica de 1 semana.

O reator anaeróbio é um tanque fechado de 1100 L onde o efluente passa em um fluxo ascendente e é transferido, via gravidade, de forma paralela para dois tanques de 1000 L de volume total preenchidos com areia, terra e cascalhos, resultando em um volume útil de 360 L cada um (COLARES *et al.*, 2019; DELL'OSBEL *et al.*, 2020).

No sistema chamado de "Wvert" o fluxo é vertical, com um sistema de distribuição de canos por cima da caixa e a saída embaixo dela, além do preenchimento com areia, terra e cascalhos, o sistema ainda conta com diferentes espécies de plantas como *Hymenachne grumosa* e *Chrysopogon zizanioides*.

Na outra caixa chamada de "Whori" o fluxo é horizontal, com o efluente entrando na lateral superior e saindo do outro lado na parte de baixo da caixa, além do preenchimento, o sistema conta com as espécies *Hymenachne grumosa*, *Cyperus papyrus* e *Chrysopogon zizanioides*.

O biofiltro é um tanque fechado que externamente é semelhante ao reator anaeróbio, porém possui um volume útil de 1450 L e internamente conta com uma camada de algas que possuem o potencial de reduzir as cargas do efluente. Depois



de passar pelo biofiltro o efluente é transferido para duas caixas como as utilizadas no sistema anterior, contendo outras duas configurações de *wetlands* construídos, sendo uma com preenchimento de areia, terra e cascalhos e a outra sem preenchimento (COLARES *et al.*, 2019; DELL’OSBEL *et al.*, 2020):

Um dos sistemas é chamado de “WCell”, assemelha-se ao sistema “Wvert”, porém conta com cinco espécies de plantas, *Hymenachne grumosa*, *Chrysopogon zizanioides*, *Canna generalis*, *Equisetum hyemale L* e *Cyperus papyrus nanus* além de células eletrolíticas que buscam gerar energia elétrica, resultante da diferença de potencial gerada pela reação redox que ocorre no sistema.

Figura 6 - Sistema *Wetlands* construídos avaliados.



Fonte: O autor.

### 3.6 PREPARO DA AMOSTRA

As amostras foram coletadas na UNISC em frascos âmbar de vidro, transportadas em caixas térmicas e mantidas sob refrigeração ( $< 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) até iniciar o

preparo. Foram previamente filtradas em filtro de papel (~15µm) e posteriormente em filtro de membrana de nylon de 0,45 µm de porosidade e 47 mm de diâmetro.

No preparo da amostra foram realizados testes preliminares com modificações na SPE com água ultrapura, água da torneira e posteriormente com o efluente bruto para determinar as condições com maior eficiência de extração. Após encontrar o método mais eficiente, desenvolveu-se uma etapa de d-SPE a fim de melhorar a limpeza do extrato final da SPE, para remover coextrativos provenientes da matriz (BERNARDI *et al.*, 2020).

### **3.6.1 Seleção do sorvente no SPE**

Inicialmente foram avaliados três sorventes poliméricos de diferentes marcas em água ultrapura. Foram utilizados cartuchos dos sorventes Strata™-X (60 mg / 3 mL), Oasis® HLB (60 mg / 3 mL) e Bond Elut Plexa (200 mg / 3 mL).

### **3.6.2 Ajuste do pH da amostra**

Simultaneamente a escolha do sorvente de extração foi realizado o teste para escolher o melhor pH para percolação da amostra em três diferentes valores (2,5; 5,0 e 7,0) e o ajuste foi feito com soluções aquosas de ácido fórmico (1% v/v) e hidróxido de amônio (0,1 mol L<sup>-1</sup>) após a aferição do volume de amostra e antes da percolação no cartucho SPE.

### **3.6.3 Adição de EDTA**

A adição de EDTA foi avaliada uma vez que diversos trabalhos na literatura demonstraram melhores resultados obtidos com a adição do complexante para alguns fármacos, principalmente antibióticos, pois eles tendem a se ligarem aos íons metálicos e não ficam retidos nos sorventes poliméricos durante a SPE. Assim, foi avaliada a adição de soluções aquosas de EDTA (10% v/v) para concentrações finais de 0,005, 0,01, 0,05 e 0,1% (v/v) nos testes com água da torneira (DASENAKI; THOMAIDIS, 2015; OPRIŞ *et al.*, 2017; PUGAJEVA *et al.*, 2017; SHRAIM *et al.*, 2017).

### 3.6.4 Desenvolvimento de método de limpeza do extrato empregando d-SPE

Buscando melhorar a limpeza do extrato após a extração, avaliou-se uma etapa de limpeza do extrato obtido por SPE empregando-se d-SPE com sete diferentes sorventes (PSA, sílica, alumina, Florisil®, Celite®, terra diatomácea e zeólita), utilizando-se 50 mg para 1 mL de extrato. Posteriormente foram avaliadas outras quantidades para obter as melhores condições.

O método consistiu em transferir 1 mL do extrato obtido na eluição da SPE para um tubo *ependorf* contendo o sorvente e agitar em vórtex por 1 min. Após, o tubo foi centrifugado a 5.000 rpm por 5 min. e a solução foi filtrada em filtro de nylon 0,22 µm. O extrato filtrado foi diluído na proporção 1:4 (v/v) em água ultrapura previamente para a análise por UHPLC-MS/MS.

Os sorventes foram avaliados considerando os resultados de recuperação dos analitos e análise de co-extrativos por cromatógrafo líquido de alta performance com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) na região do UV ( $\lambda = 260$  a 380 nm).

### 3.7 CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS DO SISTEMA LC-MS/MS

O desenvolvimento da separação cromatográfica foi realizado utilizando uma coluna Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18 (2,1 x 50 mm, 1,9 µm), uma pré-coluna Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18 (2,1 x 5 mm, 2,7 µm), água como fase móvel A e metanol como fase móvel B, foram testados diferentes concentrações de formiato de amônio (0,5, 1 e 5 mmol L<sup>-1</sup>) e ácido fórmico (0,01; 0,05 e 0,1%) em ambas as fases móveis como modificadores, além de diferentes temperaturas na coluna, a fim de melhorar a separação, o formato e a intensidade dos picos cromatográficos.

Os parâmetros relacionados ao espectrômetro de massas em série, como condições operacionais da fonte de íons, íons precursores e íons produto, além da tensão aplicada ao fragmentador e energia de colisão adequada para a formação dos íons produto também foram otimizados com a infusão de um mix contendo os fármacos a serem avaliados na concentração de 1 mg L<sup>-1</sup> e pelo software *MassHunter Optimazer* (Agilent Technologies, EUA).

As melhores condições para a determinação de fármacos com o sistema UHPLC-MS/MS foram fixadas para os estudos desenvolvidos ao longo deste trabalho e estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Condições instrumentais do sistema UHPLC-MS/MS.

<b>Parâmetro</b>	<b>Condição</b>
Voltagem do capilar	2,5 kV (+) e 2,0 kV (-)
Temperatura de dessolvatação	320 °C
Vazão do gás de dessolvatação (N <sub>2</sub> )	11 L min <sup>-1</sup>
Temperatura do gás de bainha ( <i>sheath gas</i> ) (N <sub>2</sub> )	400 °C
Vazão do <i>sheath gas</i> (N <sub>2</sub> )	12 L min <sup>-1</sup>
Pressão do gás nebulizador	30 psi
Temperatura da coluna	35 °C
Volume de injeção	3 µL

### 3.7.1 Utilização de padrão interno (PI) e padrão de controle (PC)

O padrão interno (PI) e o padrão de controle (PC) são substâncias adicionadas em concentrações conhecidas nas amostras e no extrato final. A presença destas substâncias tem a finalidade de verificar a execução correta do método analítico e a estabilidade da análise cromatográfica, auxiliando na localização de fontes de erros (SANTE, 2019).

Como PC foi utilizado uma solução de ácido nalidíxico-d<sub>5</sub> e albendazol-d<sub>3</sub> (10 mg L<sup>-1</sup>, preparada em acetonitrila). Estes compostos foram adicionados às amostras antes de se iniciar a extração como forma de avaliação da etapa de extração (70-120%) e adicionados também nas mesmas concentrações dos outros analitos na etapa de validação (0,025; 0,1; 0,25 e 1 µg L<sup>-1</sup>). Como PI foi utilizado o trifenilfosfato na concentração de 20 µg L<sup>-1</sup> (adição de 2 µL de uma solução 10 mg L<sup>-1</sup>, preparada em acetonitrila) para verificar a execução correta da análise cromatográfica, sendo aceito variações de área de até 20% (SANTE, 2019).

## 3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação foi realizada conforme critérios do INMETRO (2020) e guia SANTE (2019), utilizando o método de adição padrão e sendo feita uma curva extraída na

amostra para avaliar os critérios de linearidade, seletividade, efeito matriz, precisão, precisão intermediária, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação conforme Tabela 8.

Tabela 8 - Parâmetros avaliados na validação do método.

Parâmetro	Aplicação	Critério	Referência
Faixa linear	Injeção em triplicata das soluções analíticas preparadas de acordo com o item 3.6.3. Avaliação do coeficiente de determinação ( $r^2$ ).	$r^2 \geq 0,990$	INMETRO, 2020
Efeito Matriz	Comparação entre as inclinações das curvas analíticas dos padrões no solvente (acetonitrila) e aquelas obtidas com soluções analíticas preparadas no extrato da matriz.	EM $\geq 20\%$	SANTÉ, 2019
Limite de quantificação	Menor concentração que, fortificada na matriz (n=6), apresente resultados aceitáveis de exatidão e precisão.	Recuperações 70 - 120% e RSD $\leq 20\%$ .	INMETRO, 2020; SANTÉ, 2019
Limite de detecção	Calculado a partir do limite de quantificação.	-	INMETRO, 2020
Exatidão	Ensaio de recuperação, fortificando a matriz em 4 níveis de concentração (0,025; 0,1; 0,25 e 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (n=6). Avaliada em termos de recuperação (%).	70 – 120%	INMETRO, 2020; SANTÉ, 2019
Precisão	Ensaio de recuperação, fortificando a matriz em 4 níveis de concentração (0,025; 0,1; 0,25 e 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (n=6). Avaliada em termos de RSD.	RSD $\leq 20\%$	INMETRO, 2020; SANTÉ, 2019

Durante a etapa de desenvolvimento do método observou-se que a amostra que seria utilizada para a validação do método não estava livre dos compostos em estudo, assim, para validação do método foi utilizado uma curva de adição padrão, onde foram adicionados a amostra, diferentes concentrações dos analitos previamente a etapa de extração. A partir de respostas lineares na faixa de concentração utilizada é possível encontrar a concentração dos analitos presentes, as amostras são derivadas por extrapolação desde que sejam encontradas respostas lineares na faixa de concentração utilizada (SANTÉ, 2019).

### 3.9 APLICAÇÃO NAS AMOSTRAS COLETADAS NO SISTEMA DE TRATAMENTO POR *WETLANDS*

Após o desenvolvimento do método cromatográfico e do método de extração, foram coletadas amostras na planta piloto de *wetlands* na UNISC. Foram avaliadas quatro configurações do sistema e coletados cinco vezes num período de cinco semanas. O tempo total de detenção hidráulica do efluente no sistema foi de duas semanas, ficando por uma semana em cada etapa após o tanque de equalização.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS

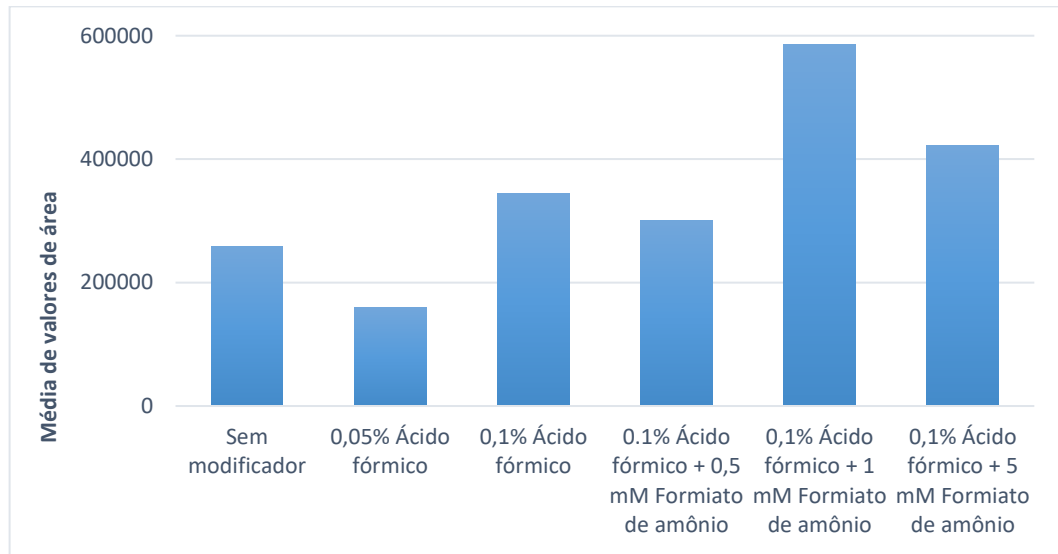
A composição da fase móvel utilizada consistiu em: (A) água e (B) metanol, ambas contendo formiato de amônio  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  e ácido fórmico  $0,1\%$  (v/v), utilizando o gradiente descrito na Tabela 9. O tempo total de análise cromatográfica foi de 5 min. mantendo vazão constante de  $0,4 \text{ mL min}^{-1}$  e temperatura de  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Tabela 9 - Gradiente da fase móvel utilizado para determinação de fármacos em efluente no sistema UHPLC-MS/MS.

Tempo (min)	%A	%B
Inicial	95	5
0,5	95	5
4,0	0	100
4,8	0	100
4,9	95	5
5,0	95	5

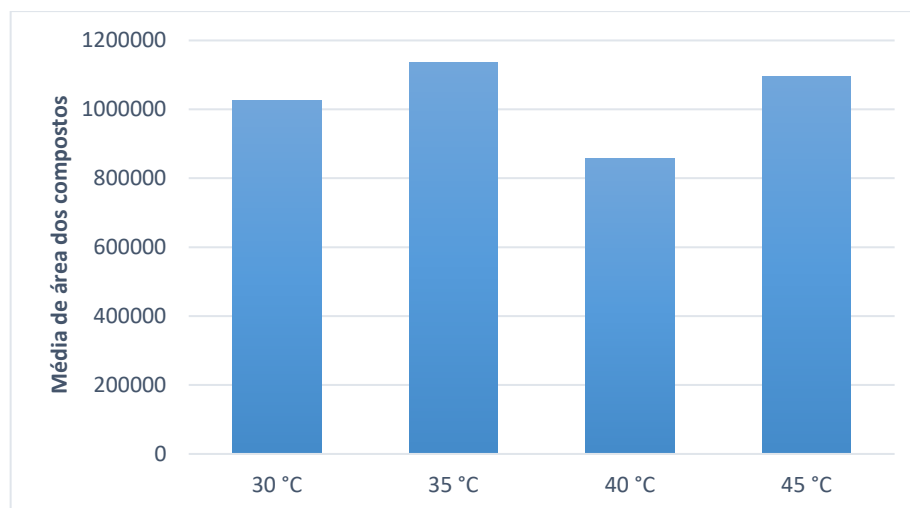
Após serem testadas as duas concentrações de ácido fórmico ( $0,05\%$  e  $0,1\%$ ), pode-se observar que a adição de  $0,1\%$  (v/v) apresentou a melhor resposta dos compostos (BRUNSCH *et al.*, 2018; PAIGA; SANTOS; DELARUE-MATOS, 2017; PUGAJEVA *et al.*, 2017), assim, a partir desta condição foi avaliado a adição de formiato de amônio ( $0,5$ ;  $1$  e  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e observou-se que a concentração de  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  do sal apresentou os maiores valores médios de área dos compostos avaliados conforme Figura 7 (PETRIE *et al.*, 2016).

Figura 7 - Gráfico comparativo de avaliação do uso de modificadores na fase móvel.



A temperatura também foi avaliada pois sabe-se que influencia diretamente na eficiência da separação, no formato dos picos e na resposta dos analitos (HEIDORN, 2016) como pode-se observar na Figura 8, houve uma diferença de aproximadamente 30% nas respostas dos compostos avaliados entre a temperatura com o melhor (35 °C) e o pior (40 °C) resultado considerando a média das áreas dos compostos (ZHANG *et al.*, 2020).

Figura 8 - Gráfico demonstrando a média das áreas de acordo com a temperatura da coluna.



No cromatograma de íons totais (TIC, do inglês *Total ion chromatogram*) apresentados na Figura 9 é possível observar a separação cromatográfica obtida com as condições instrumentais selecionadas. A análise é rápida, com tempo total de análise cromatográfica de 5 min, e os compostos estão distribuídos de forma



adequada permitindo uma determinação mais eficiente pelo espectrômetro de massas em série utilizando o modo de aquisição MRM (PRIETO-SANTIAGO *et al.*, 2022). Os tempos de retenção, energias de colisão e íons de fragmentação estão apresentados na Tabela 10.

Figura 9 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por UHPLC-MS/MS para uma mistura dos analitos na concentração de 20 µg L<sup>-1</sup>.

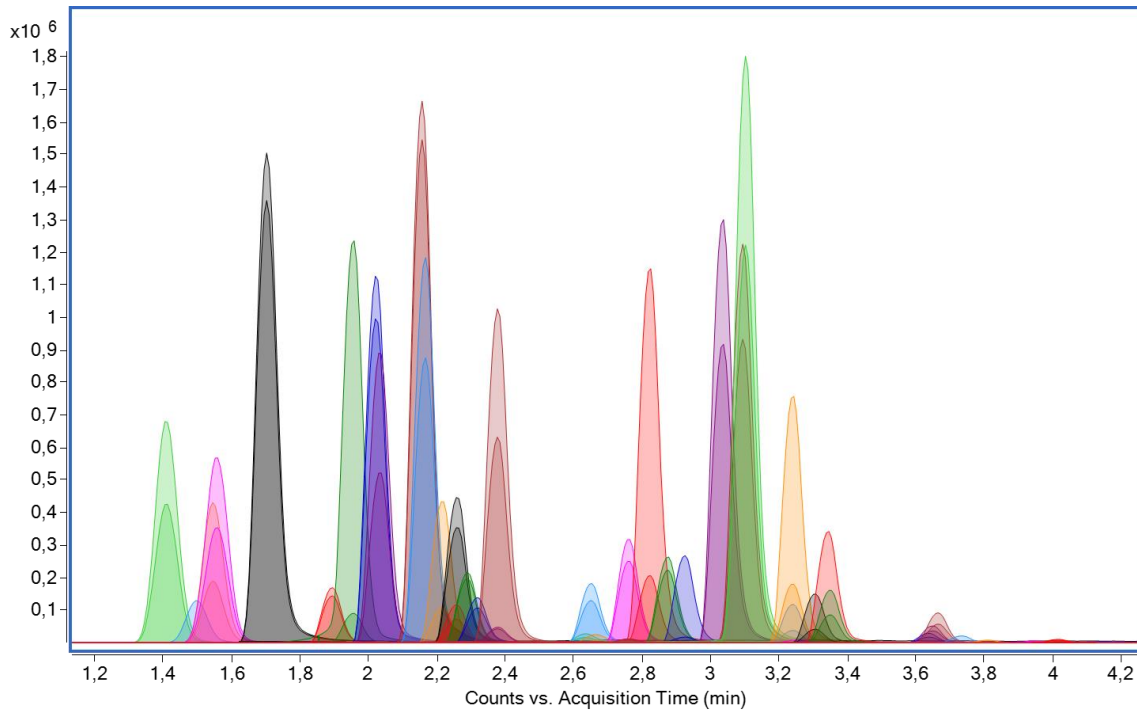


Tabela 10 - Transições de monitoramento de reações múltiplas (MRM) usadas para os fármacos, padrão de controle (PC) e padrão interno (PI).

Compostos	t <sub>R</sub> (min)	EF (eV)	1ª Transição Quantificação	EC (eV)	2ª Transição Identificação	EC (eV)	ESI
5-OH-tiabendazol	2,05	120	218,0 → 147,1	40	218,0 → 191,0	40	+
Ácido nalidíxico	3,12	89	233,0 → 215,0	13	233,0 → 186,9	29	+
Ácido nalidíxico-d5 (PC)	3,11	106	238,0 → 220,0	13	238,0 → 188,0	29	+
Ácido oxolínico	2,84	114	262,1 → 244,1	12	262,1 → 216,0	28	+
Ácido salicílico	2,81	100	136,8 → 93,0	15	136,8 → 65,0	25	-
Albendazol	3,35	155	266,1 → 234,1	16	266,1 → 191,0	32	+
Albendazol-d3 (PC)	3,35	120	269,0 → 234,0	20	-	-	+
Albendazol amino	1,92	100	240,2 → 198,0	20	240,2 → 133,1	20	+
Albendazol sulfona	2,77	120	298,1 → 159,0	40	298,1 → 266,1	20	+

Compostos	t <sub>R</sub> (min)	EF (eV)	1ª Transição Quantificação	EC (eV)	2ª Transição Identificação	EC (eV)	ESI
Albendaz. sulfóxido	2,66	100	282,2 → 208,0	20	282,2 → 191,0	20	+
Androstenediona	3,65	150	287,2 → 97,1	20	287,2 → 109,1	40	+
Atenolol	1,59	140	267,0 → 190,1	20	267,0 → 145,1	20	+
Carbamazepina	3,25	120	237,3 → 194,1	20	237,3 → 192,2	25	+
Ciprofloxacino	2,28	150	332,1 → 314,1	20	332,1 → 231,1	40	+
Clindamicina	2,94	145	425,1 → 126,0	29	425,1 → 377,2	20	+
Cloranfenicol	2,68	110	320,9 → 152,0	9	320,9 → 256,9	17	-
Dipirona	2,39	110	312,4 → 155,8	20	312,4 → 157,0	20	+
Eritromicina	3,27	155	734,4 → 158,0	29	734,4 → 576,3	17	+
Espiramicina	2,65	100	422,0 → 101,0	10	422,0 → 142,0	10	+
Fenbendazol	3,67	156	300,1 → 159,0	36	300,1 → 268,1	20	+
Haloperidol	3,05	150	376,1 → 123,0	40	376,1 → 165,1	20	+
Ibuprofeno	3,25	120	238,3 → 195,1	20	238,3 → 194,1	35	+
Levamisol	1,72	141	205,1 → 91,1	44	205,1 → 178,1	20	+
Lincomicina	1,97	148	407,1 → 126,1	33	407,1 → 359,1	21	+
Lomefloxacino	2,34	100	352,1 → 308,1	15	352,1 → 334,1	15	+
Mebendazol	3,31	150	296,2 → 104,9	30	296,2 → 264,2	30	+
Metronidazol	1,43	98	172,1 → 128,0	12	172,1 → 82,1	24	+
Norfloxacino	2,23	150	320,1 → 302,1	20	320,1 → 231,1	40	+
Ofloxacino	2,18	140	362,0 → 318,1	21	362,0 → 261,0	29	+
Paracetamol	1,52	150	152,1 → 110,1	20	152,1 → 65,0	40	+
Praziquantel	3,66	128	313,2 → 203,1	12	313,2 → 83,1	24	+
Progesterona	4,02	150	315,2 → 97,1	20	315,2 → 109,1	40	+
Propranolol	2,89	150	260,2 → 116,1	20	260,2 → 56,0	40	+
Sulfaclopiridazina	2,27	108	285,0 → 156,0	12	285,0 → 92,1	24	+
Sulfadoxina	2,39	126	311,1 → 156,0	16	311,1 → 92,1	32	+
Sulfametoxazol	2,30	108	254,1 → 92,1	24	254,1 → 156,0	12	+
Testosterona	3,74	146	289,2 → 109,1	28	289,2 → 97,1	20	+
Tiabendazol	2,17	130	202,0 → 175,0	24	202,0 → 131,0	36	+
Trifenilfosfato (PI)	2,41	160	327,0 → 152,1	35	327,0 → 215,0	30	+
Trimetoprima	2,04	151	291,2 → 230,1	20	291,2 → 123,1	24	+

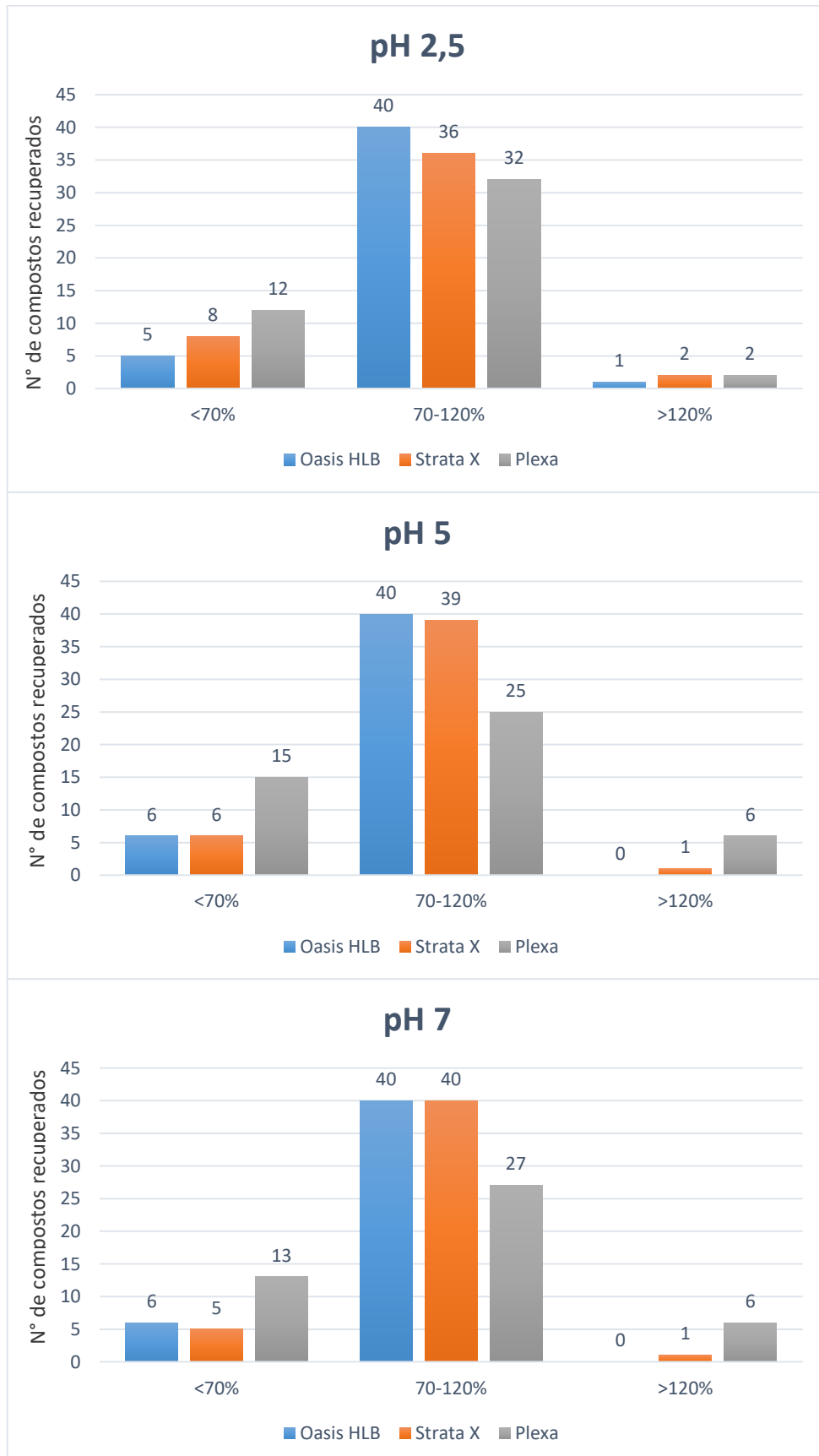
PC: Padrão de Controle; PI: Padrão Interno.

## 4.2 DESENVOLVIMENTO DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)

A primeira etapa no desenvolvimento do preparo da amostra foi a escolha do sorvente da SPE. Foram utilizados três cartuchos de sorventes poliméricos semelhantes, de três marcas diferentes: Strata™-X (60 mg / 3 mL), Oasis® HLB (60 mg / 3 mL) e Bond Elut Plexa (200 mg / 3 mL). Os sorventes poliméricos permitem, em geral, a retenção adequada de compostos com uma ampla faixa de polaridade (GÓMEZ-CANELA *et al.*, 2019).

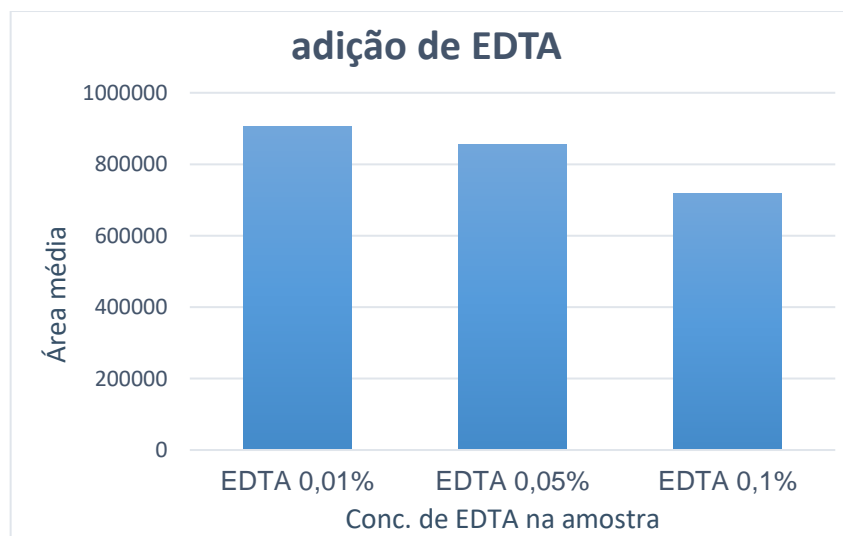
Primeiramente os três sorventes poliméricos foram testados em 50 mL de água ultrapura e em 3 diferentes valores de pH (2,5, 5 e 7) conforme estudos descritos na literatura (BAENA-NOGUERAS *et al.*, 2016; OPRIŞ *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2020) sendo eluídos com metanol. É possível observar na Figura 10 que os valores de pH 5 e 7 apresentaram os melhores resultados, com maior número de compostos com recuperação na faixa de 70 a 120%, para Strata™-X e Oasis® HLB que apresentaram valores semelhantes, porém enquanto o Strata™-X possui melhores resultados para o atenolol, o Oasis® HLB apresentou melhores resultados para o ácido salicílico, metronidazol e paracetamol.

Figura 10 - Comparação do número de compostos para cada faixa de recuperação obtidas em diferentes valores de pH.



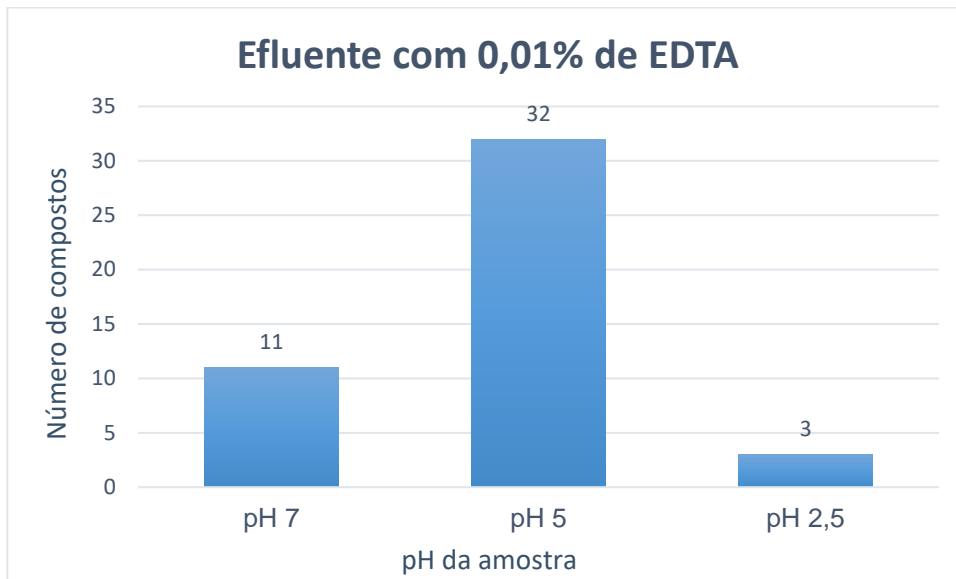
Para avaliar a utilização de EDTA foi utilizada a água da torneira por conter íons que podem influenciar na recuperação de alguns compostos, como algumas classes de antibióticos que complexam com os íons presentes e não ficam retidos nos sorventes durante a etapa de percolação, diferentemente da água ultrapurificada onde tem-se uma alta resistividade  $>18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$  demonstrando a baixa presença de íons (DASENAKI; THOMAIDIS, 2015; OPRIŞ *et al.*, 2017; PUGAJEVA *et al.*, 2017; SHRAIM *et al.*, 2017). Para este teste foi escolhido o pH 7 e o sorvente Oasis<sup>®</sup> HLB pois apresentou o mesmo número de compostos do pH 5 (Figura 10) porém não necessita de acidificação. Entre as concentrações de EDTA avaliadas (0,01, 0,05 e 0,1% m/v), a concentração de 0,01% (m/v) apresentou os melhores resultados nestas condições para a maioria dos compostos avaliados (Figura 12).

Figura 11 - Área média dos compostos após extração SPE com adição de diferentes concentrações de EDTA.



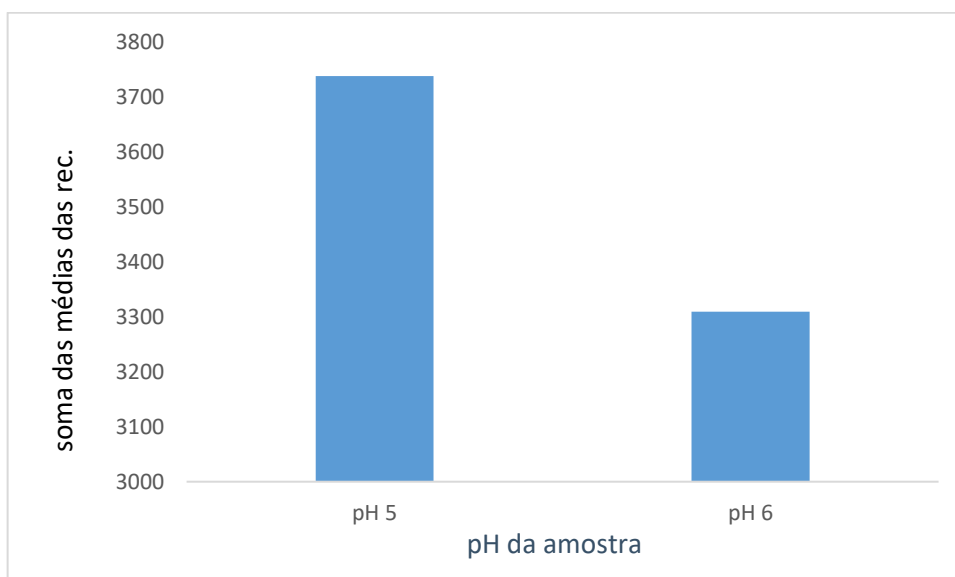
Devido as diferentes espécies que o EDTA forma de acordo com o pH do meio em que está dissolvido, após encontrar a melhor concentração foi realizado um teste para comparar os diferentes pH analisados inicialmente (2,5, 5 e 7), agora com a presença do EDTA e utilizando o efluente bruto. Assim, observou-se que na presença da amostra contendo 0,01% (m/v) de EDTA, o sorvente Oasis<sup>®</sup> HLB apresenta melhores recuperações para um maior número de compostos em pH 5, conforme a Figura 12.

Figura 12 - Número de compostos com recuperações adequadas entre os diferentes valores de pH testados com efluente contendo 0,01% (m/v) de EDTA.



Como a recuperação do maior número de compostos foi em pH 5 foi observado que a formação da espécie ionizada majoritária de EDTA tende a estar em pH 6 na condição de maior concentração em relação ao pH 5 e 7 (ANEXO A). Assim, realizou-se um teste adicional com o efluente bruto em pH ajustado a pH 6. Os resultados comparativos das recuperações podem ser observados na Figura 13.

Figura 13 - Comparativo entre pH 5 e 6 considerando a soma das recuperações dos compostos avaliados.



#### 4.3 DESENVOLVIMENTO DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DISPERSIVA (D-SPE)

A segunda etapa no desenvolvimento do método de preparo de amostra foi a limpeza do extrato eluído do cartucho de SPE, devido a coloração amarela forte característica dos coextrativos, como os ácidos húmicos presentes no efluente e que podem interferir na análise, afetando a eficiência da separação cromatográfica, bem como a ionização e conseqüentemente a resposta dos analitos. O desenvolvimento desta etapa iniciou-se com a escolha do sorvente mais apropriado para a retirada dos coextrativos sem reduzir a recuperação final dos analitos.

A d-SPE permite a limpeza de extratos de uma forma bastante rápida e eficiente, com pequenas quantidades de sorventes. É um procedimento bastante utilizado, principalmente associado ao método QuEChERS (CABRERA *et al.*, 2012). Assim, o uso de sorventes junto aos cartuchos de SPE pode apresentar melhores resultados na limpeza e extração de fármacos em amostras líquidas (CABAN *et al.*, 2019).

A avaliação por comparação visual dos sete sorventes para os testes de limpeza (PSA, sílica, alumina, Florisil®, Celite®, terra diatomácea e zeólita) permitiu observar que PSA e alumina foram os que apresentaram os melhores resultados de limpeza (Figura 14), resultado este que pode ser corroborado pela comparação dos cromatogramas obtidos por HPLC-DAD após a limpeza dos extratos (Figura 15).

Figura 14 - Comparação visual da limpeza com diferente sorventes testados antes (efluente) e após a etapa de limpeza por d-SPE.

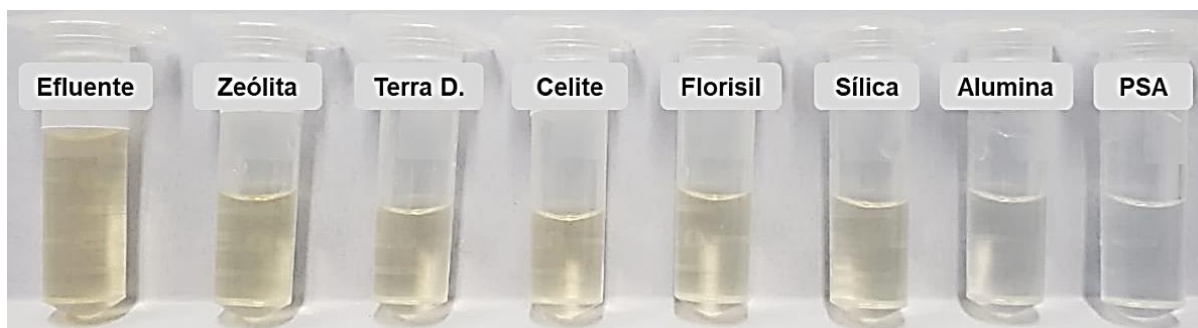
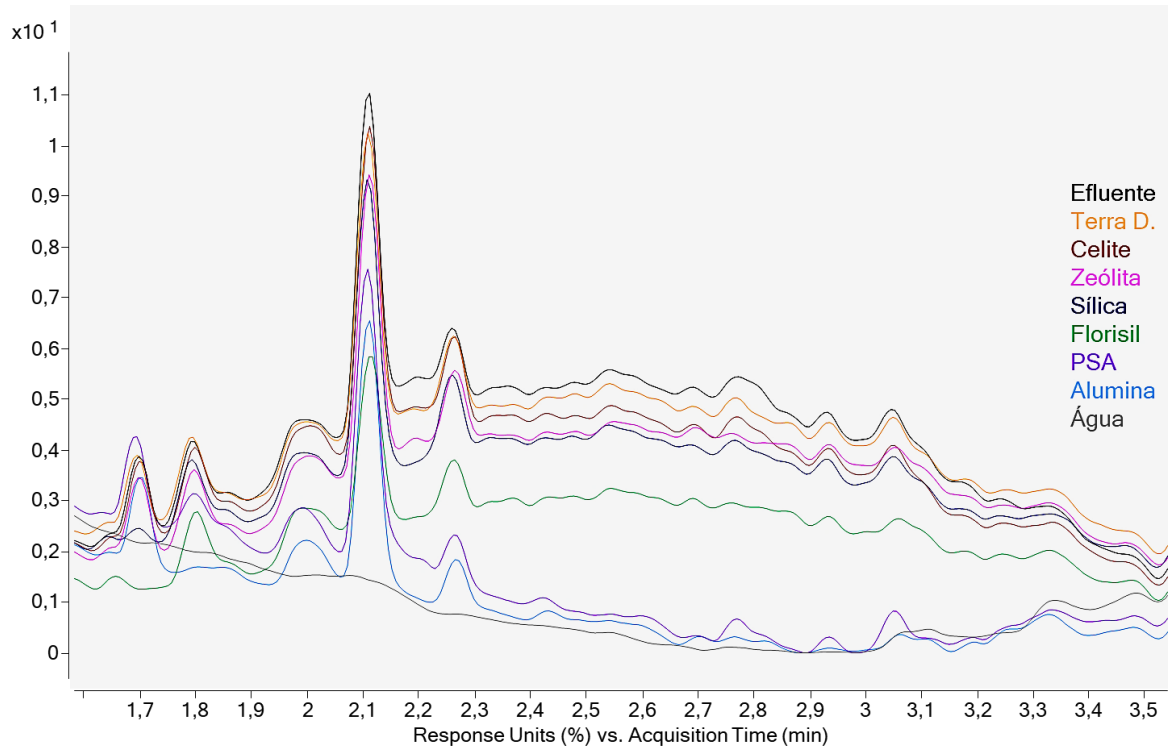


Figura 15 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD ( $\lambda = 260$  a  $380$  nm) comparando o efluente após a SPE mas sem limpeza (efluente) e com os sete sorventes testados em d-SPE.

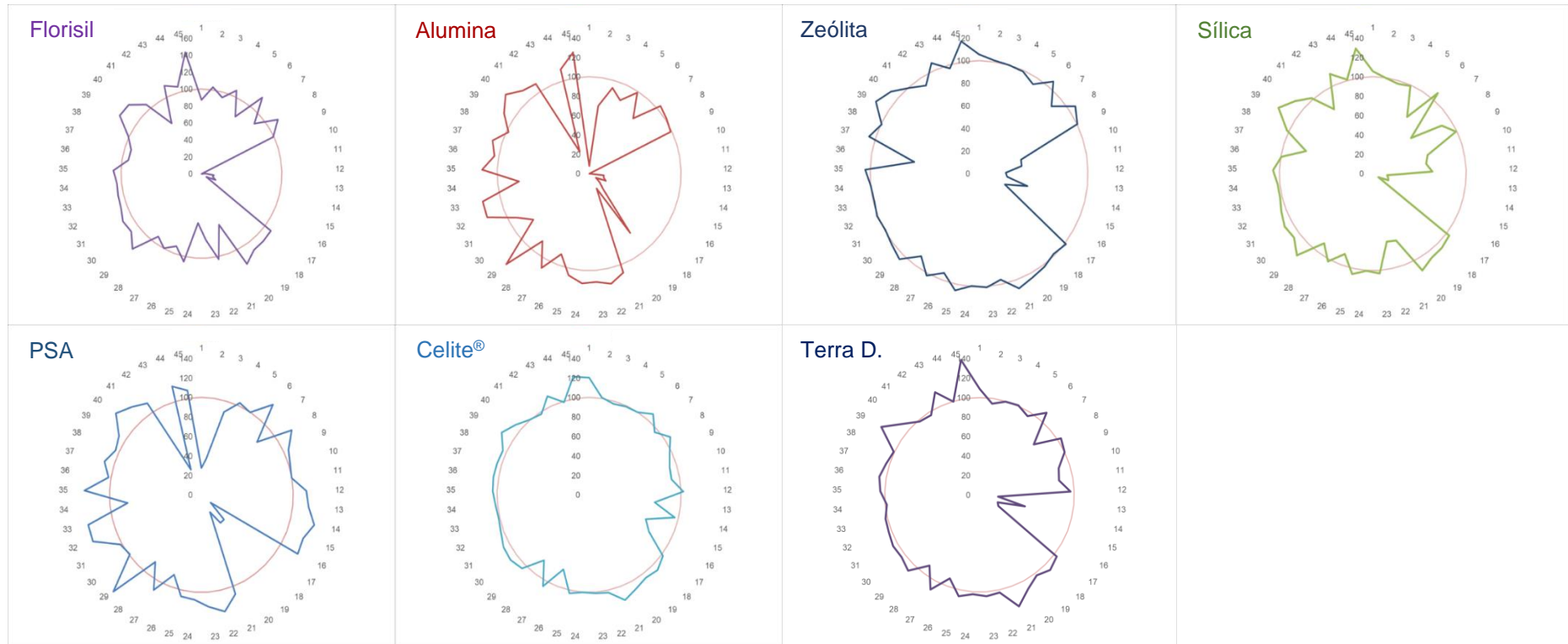


Como pode ser observado na Figura 14 e Figura 15 os sorventes PSA e alumina apresentaram maior retenção de coextrativos e conseqüentemente tornaram o extrato eluído mais limpo entre os sorventes avaliados, o que pode ser observado pelos cromatogramas da Figura 15 onde estes apresentaram menor absorção principalmente na faixa de 2,2 e 3,4 min.

Para a escolha do melhor sorvente além da análise da limpeza do extrato por comparação visual (Figura 14) e pelos cromatogramas obtidos por HPLC-DAD na região do UV (Figura 15) foi considerado principalmente a recuperação dos analitos em cada um dos sorventes obtidos por UHPLC-MS/MS (Figura 16).



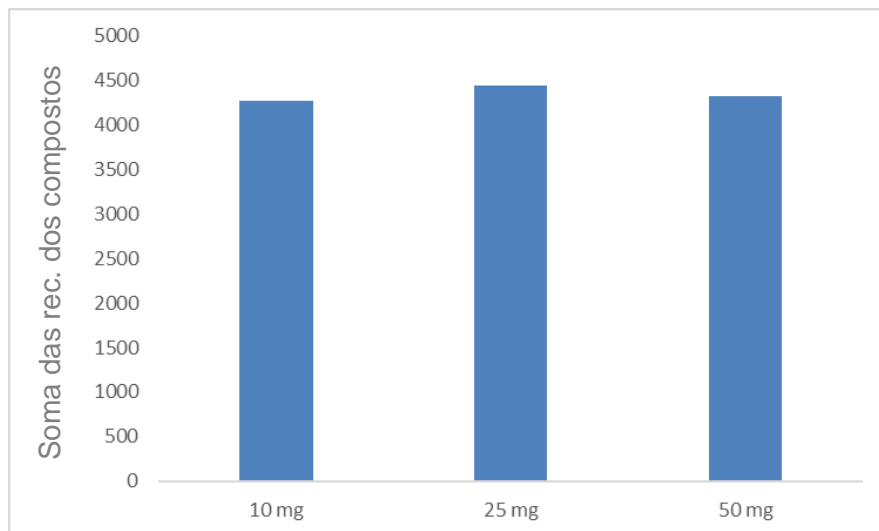
Figura 16 - Gráfico tipo "radar" das recuperações dos compostos avaliados, comparando os sorventes testados.



1 - Ácido Salicílico; 2 – Dipirona; 3 – Cloranfenicol; 4 – Clindamicina; 5 – Eritromicina; 6 – Lincomicina; 7 – Espiramicina; 8 – Trimetoprima; 9 – Praziquantel; 10 - Ácido Nalidíxico; 11 - Ácid Nalidíxico - ds; 12 - Ácido Oxolínico; 13 – Ciprofloxacino; 14 – Lomefloxacino; 15 – Norfloxacino; 16 – Ofloxacino; 17 – Sulfacloropiridazina; 18 – Sulfadiazina; 19 – Sulfadoxina, 20 – Sulfametoxazol; 21 – Atenolol; 22 – Propranolol; 23 - Bisfenol A; 24 – Cafeína 25 - Androstenediona 26 – Etisterona; 27 – Progesterona; 28 – Testosterona; 29 - 5-OH-Tiabendazol; 30 - Albendazol Amino; 31 - Albendazol Sulfóxido; 32 – Albendazol; 33 - Albendazol-d<sub>3</sub>; 34 - Albendazol sulfona; 35 – Fenbendazol; 36 – Fluquinconazol 37 – Levamisol; 38 – Mebendazol; 39 Metronidazol; 40 – Tiabendazol; 41 – Carbamazepina; 42 – Haloperidol; 43 – Diclofenaco; 44 – Ibuprofeno; 45 -Paracetamol.

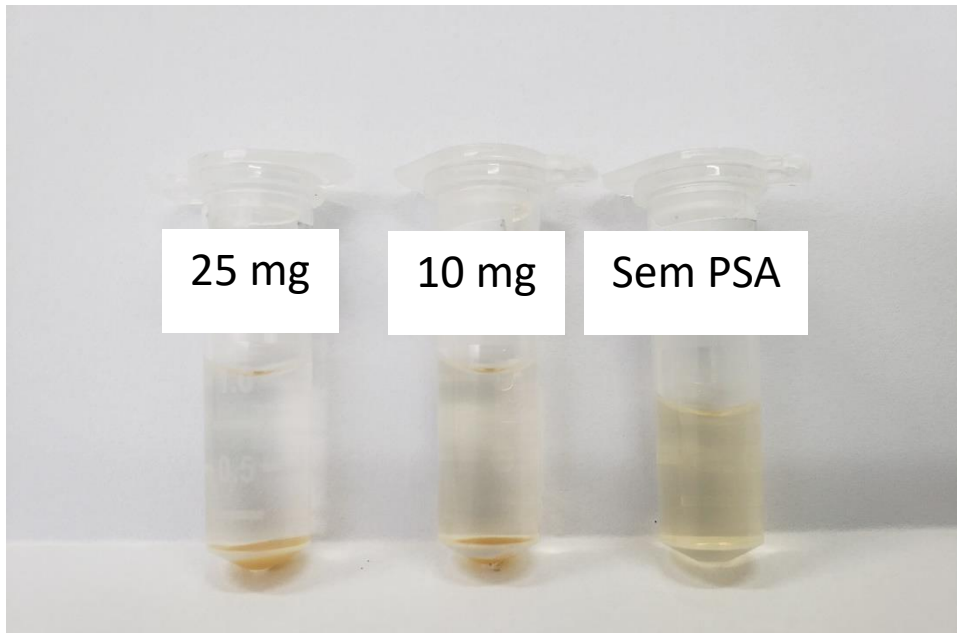
Apesar de apresentar recuperações baixas para alguns compostos, como o grupo das sulfonamidas, o sorvente PSA apresentou melhores recuperações em relação à alumina, ambos sorventes com as melhores limpezas. Sorventes como Celite® e terra diatomácea, apresentaram bons resultados nas recuperações dos compostos, porém com baixa remoção de coextrativos, ou seja, há pouca interação destes sorventes com o meio. Após escolher o PSA como sorvente da d-SPE, foi avaliada a quantidade de sorvente adicionado ao extrato. Além da quantidade de 50 mg/mL utilizada para os testes dos sorventes, foram testadas ainda as massas de 10 e 25 mg/mL de extrato (Figura 17).

Figura 17 - Comparativo entre as diferentes quantidades do sorvente PSA considerando a soma das recuperações dos compostos.



A limpeza do extrato ficou visualmente igual para 25 e 50 mg de PSA, enquanto que para 10 mg foi possível observar uma leve coloração resultado de coextrativos que permaneceram no extrato (Figura 18). O maior valor da soma das recuperações dos compostos e a limpeza do extrato avaliada visualmente, foram utilizadas como fatores determinantes para a escolha da quantidade de sorvente entre 25 e 50 mg. Assim, a proporção de 25 mg de PSA/mL de extrato foi escolhida para a limpeza do extrato após a etapa de SPE.

Figura 18 – Comparativo entre os extratos após a SPE com adição de 25 e 10 mg de PSA e sem adição de sorvente.



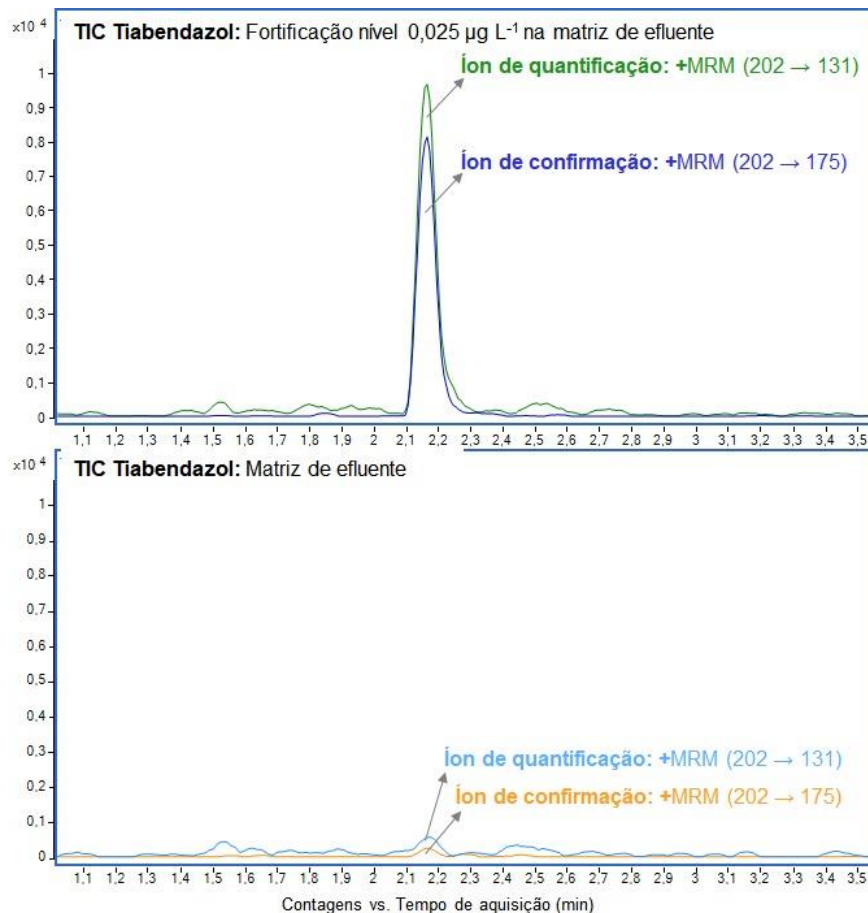
## 4.4 VALIDAÇÃO

### 4.4.1 Seletividade

A seletividade do método proposto foi atendida tanto para os compostos que não foram detectados na amostra utilizada neste estudo como para os compostos presentes na matriz, pois considerando que a amostra real de efluente foi utilizada na validação, praticamente não existe amostra isenta para todos os compostos analisados. Assim, o cromatógrafo a líquido com espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo, possui seletividade e especificidade suficiente quando utilizado o modo MRM (SANTE, 2019). A Figura 19 apresenta o cromatograma de íons totais do tiabendazol fortificado no nível do seu LQ ( $0,025 \mu\text{g L}^{-1}$ ) sobreposto a amostra (matriz do efluente) sendo possível observar que a matriz estava de fato isenta deste fármaco.

Os compostos encontrados na matriz utilizada para validação foram: Ácido salicílico, albendazol amino, albendazol sulfoxido, albendazol sulfona, albendazol, atenolol, carbamazepina, ciprofloxacino, ibuprofeno, norfloxacino, ofloxacino, propranolol, sulfametoxazol, tiabendazol e trimetoprima. No entanto, mesmo estando presente na matriz, a seletividade foi garantida pelo método de detecção utilizado.

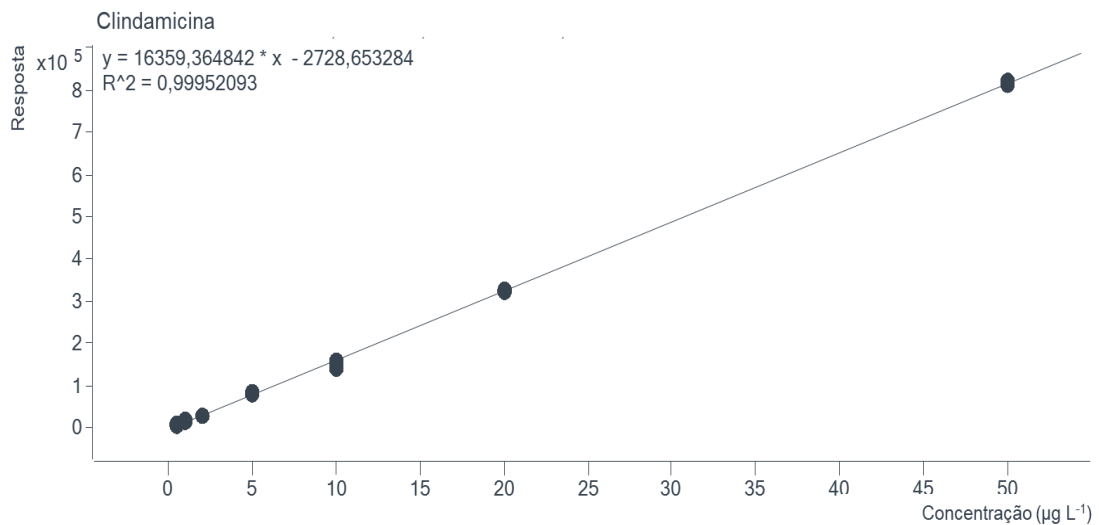
Figura 19 - Cromatograma de íons totais do tiabendazol no nível de fortificação de 0,025  $\mu\text{g L}^{-1}$  sobreposto ao branco.



#### 4.4.2 Linearidade e faixa linear

O método de adição padrão foi utilizado para corrigir as interferências causadas pela presença dos compostos (previamente citados no item 4.4.1) no efluente devido a não haver uma matriz “branco” para as amostras avaliadas (CANTWELL, 2019; SANTE, 2019). Devido a presença de alguns analitos nas amostras utilizadas como referência para desenvolvimento e validação do método analítico, a linearidade foi avaliada a partir da curva analítica extraída obtida através da amostra fortificada em 5 níveis de concentração e em triplicata em cada nível, sendo o extrato final diluído na proporção 1:4 (v/v) em água para a determinação por UHPLC-MS/MS. A Figura 20 apresenta a curva analítica obtida para a clindamicina, a qual apresentou faixa linear de 0,5 a 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ , e coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de 0,9995 (Tabela 11).

Figura 20 - Curva analítica do composto clindamicina.



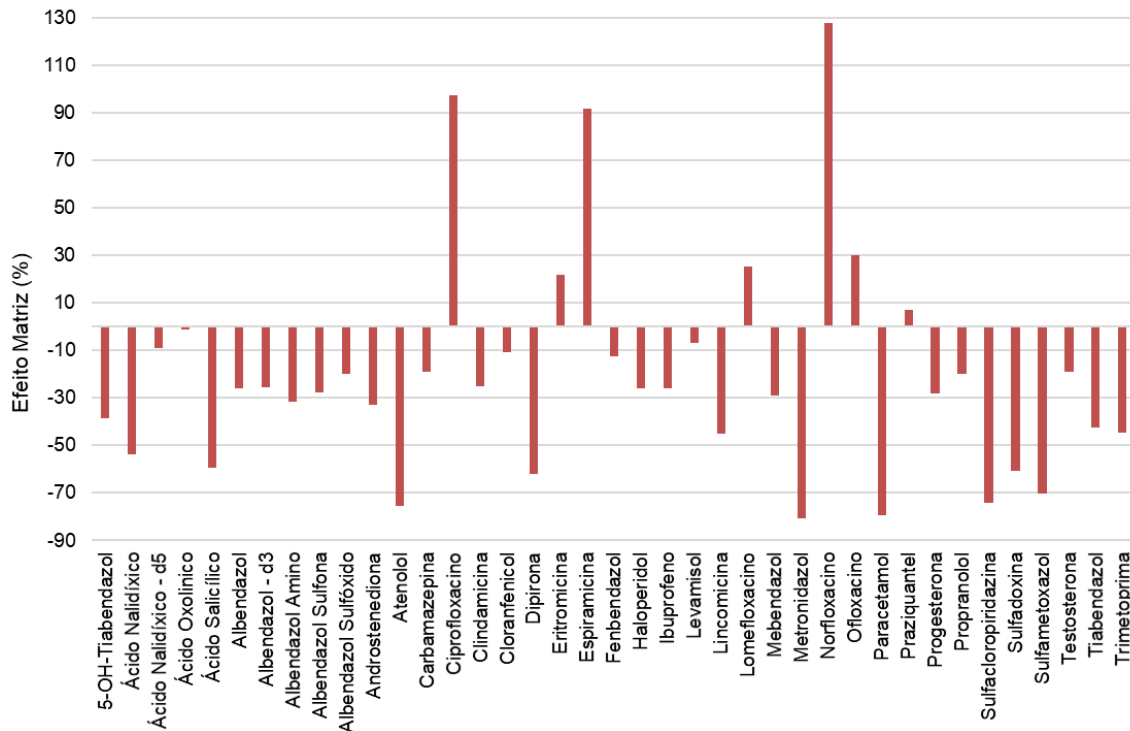
Para os demais compostos, os valores da faixa linear variaram entre 0,5 e 2  $\mu\text{g L}^{-1}$  como pontos mínimos e 20 e 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  como pontos máximos como pode ser observado na Tabela 11. A partir dos resultados obtidos, verificou-se que a linearidade de todos os compostos em estudo foi adequada, uma vez que todos apresentaram  $r^2 > 0,990$ .

#### 4.4.3 Efeito Matriz

O efeito matriz foi significativo (maior que  $\pm 20\%$ ) para a maioria dos compostos variando de -80,9 a 127,8%, o que indica a necessidade da realização da curva analítica na mesma condição das amostras reais. Assim, a curva analítica foi obtida utilizando-se uma mistura de amostras de efluentes. No entanto, esta mistura não era totalmente isenta dos analitos em estudo.

Para os analitos que já apresentavam alguma concentração na mistura de efluentes foi realizada uma curva de adição padrão e para a determinação da concentração nas amostras reais foi plotado uma curva de regressão linear no programa Excel<sup>®</sup>, desconsiderando o valor de área dos demais pontos da curva obtido na mistura de efluentes (SANTE, 2019).

Figura 21 - Efeito matriz calculado para os analitos em estudo.



O efeito matriz (EM) encontrado no método de evaporação sem etapa de limpeza desenvolvido por Asimakopoulou e colaboradores (2017), para diversos compostos entre eles atenolol e carbamazepina, foi um pouco menor para atenolol (52%), porém muito maior para carbamazepina (68%) quando comparado ao método desenvolvido neste estudo. Há de se observar um comportamento parecido para a maioria dos compostos, sendo a maioria com EM negativo indicando a supressão do sinal.

O método de SPE desenvolvido por Pugajeva e colaboradores (2017) também apresentou efeito matriz semelhantes para ciprofloxacino, atenolol, paracetamol e sulfametoxazol, sendo o EM positivo para ciprofloxacino um pouco menor (30% de EM), enquanto os compostos atenolol, paracetamol e sulfametoxazol apresentaram supressão de sinal em níveis próximos. Já na análise de fármacos em efluentes por injeção direta realizado por Campos-Mañas e colaboradores (2017), o efeito matriz para as quinolonas (ciprofloxacino e ofloxacino) foi negativo.

#### 4.4.4 Exatidão e Precisão

A exatidão (recuperação) e a precisão (repetibilidade) do método foram avaliadas a partir da análise de quatro níveis de fortificação (0,025, 0,1, 0,25 e 1  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) com seis repetições cada nível ( $n=6$ ), utilizando os cálculos de recuperação (R) e desvio padrão relativo (RSD), respectivamente. A Tabela 11 apresenta os resultados referentes aos ensaios de exatidão (recuperação) e da precisão (RSD).

Os ensaios de exatidão e precisão forneceram resultados satisfatórios para todos os compostos avaliados em pelo menos três dos quatro níveis de fortificação, visto que as recuperações variaram entre 76 e 120% com  $\text{RSD} \leq 16\%$ . Alguns compostos não foram detectados no nível mais baixo de fortificação.

Os resultados da precisão intermediária, avaliado em 2 dias diferentes, foram satisfatórios, uma vez que os valores de recuperação se mantiveram entre 71 e 119%, com  $\text{RSD} \leq 19\%$  para todos os compostos. Desta forma, os resultados de validação do método desenvolvido mostraram-se satisfatórios para análise dos fármacos selecionados em efluente empregando SPE seguido da limpeza do extrato com sorvente para o preparo de amostra e determinação por UHPLC-MS/MS.

#### 4.4.5 Limite de detecção e limite de quantificação do método

Neste trabalho, o LOQ do método foi estabelecido a partir do menor nível de fortificação que apresentou recuperações entre 70 e 120% com  $\text{RSD} \leq 20\%$ . Levou-se ainda em consideração os fatores de diluição, sendo o volume de amostra percolado de 100 mL, o volume de eluição de 1 mL e a diluição de cinco vezes do extrato final em água ultrapura para a análise, de modo que o fator de concentração final do método foi de 20 vezes. Assim, 23 compostos apresentaram LOQ de 0,025  $\mu\text{g L}^{-1}$  e para 16 compostos o LOQ foi de 0,100  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Tabela 11). O LOD do método, calculado a partir da divisão do LOQ por 3,33, foi de 0,008  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a maioria dos compostos e 0,030  $\mu\text{g L}^{-1}$  para os demais (Tabela 11).



Tabela 11 - Resultados de validação do método para linearidade ( $r^2$ ), faixa linear, efeito matriz, limite de quantificação (LOQ), limite de detecção (LOD), exatidão (recuperação, %) e precisão (repetibilidade e precisão intermediária, RSD %).

Compostos	$r^2$	Faixa Linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Efeito Matriz (%)	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recuperação % (Repetibilidade, RSD %)				Recuperação % (Precisão Intermediária, RSD %)			
						Níveis de Fortificação ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )							
						Níveis de Fortificação ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )				Níveis de Fortificação ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )			
						0,025	0,1	0,25	1	0,025	0,1	0,25	1
5-OH-tiabendazol	0,9987	0,5 - 20	-38,7	0,025	0,008	83 (10)	106 (7)	110 (7)	104 (5)	86 (11)	108 (7)	102 (4)	101 (2)
Ácido nalidíxico	0,9994	0,5 - 20	-53,7	0,025	0,008	106 (3)	108 (7)	112 (4)	104 (5)	93 (16)	117 (2)	87 (6)	92 (6)
Ácido nalidíxico-d5	0,9985	0,5 - 20	-9,1	0,025	0,008	119 (2)	109 (5)	110 (2)	106 (4)	98 (9)	113 (3)	86 (6)	86 (6)
Ácido oxolínico	0,9980	0,5 - 20	-1,2	0,025	0,008	98 (7)	104 (5)	107 (6)	103 (2)	89 (14)	110 (4)	93 (3)	93 (3)
Ácido salicílico	0,9902	2 - 50	-59,5	0,100	0,030	-	103 (9)	112 (5)	117 (6)	-	107 (15)	99 (10)	83 (8)
Albendazol	0,9982	0,5 - 50	-25,8	0,025	0,008	77 (9)	85 (11)	103 (8)	106 (4)	107 (8)	111 (10)	111 (6)	116 (3)
Albendazol-d3	0,9987	0,5 - 50	-25,6	0,025	0,008	81 (7)	98 (6)	102 (9)	108 (3)	116 (5)	113 (4)	102 (5)	104 (2)
Albendazol amino	0,9968	0,5 - 20	-31,7	0,025	0,008	113 (13)	105 (6)	110 (8)	107 (2)	108 (5)	111 (6)	114 (2)	114 (3)
Albendazol sulfona	0,9969	0,5 - 20	-27,6	0,025	0,008	110 (7)	109 (5)	114 (2)	107 (1)	95 (19)	114 (6)	110 (3)	111 (2)
Albendazol sulfóxido	0,9968	0,5 - 20	-19,7	0,025	0,008	98 (15)	107 (16)	120 (6)	105 (3)	80 (14)	106 (14)	108 (7)	113 (4)
Androstenediona	0,9975	2 - 50	-33,0	0,100	0,030	-	92 (14)	107 (10)	102 (2)	-	108 (10)	107 (9)	112 (4)
Atenolol	0,9933	2 - 50	-75,5	0,100	0,030	-	76 (13)	114 (5)	95 (10)	-	75 (14)	106 (16)	98 (3)
Carbamazepina	0,9973	0,5 - 20	-19,2	0,025	0,008	108 (3)	102 (7)	109 (7)	105 (2)	80 (18)	115 (6)	112 (6)	116 (2)
Ciprofloxacino	0,9977	0,5 - 20	97,3	0,025	0,008	97 (6)	110 (7)	117 (3)	106 (3)	71 (12)	107 (10)	85 (4)	100 (2)
Clindamicina	0,9995	0,5 - 50	-25,1	0,025	0,008	116 (5)	107 (6)	110 (5)	106 (2)	117 (4)	114 (5)	112 (4)	112 (3)

Compostos	r <sup>2</sup>	Faixa Linear (µg L <sup>-1</sup> )	Efeito Matriz (%)	LOQ (µg L <sup>-1</sup> )	LOD (µg L <sup>-1</sup> )	Recuperação % (Repetibilidade, RSD %)				Recuperação % (Precisão Intermediária, RSD %)			
						Níveis de Fortificação (µg L <sup>-1</sup> )							
						Níveis de Fortificação (µg L <sup>-1</sup> )				Níveis de Fortificação (µg L <sup>-1</sup> )			
						0,025	0,1	0,25	1	0,025	0,1	0,25	1
Cloranfenicol	0,9958	0,5 - 20	-10,7	0,025	0,008	90 (16)	105 (2)	112 (5)	103 (4)	106 (12)	114 (8)	113 (11)	110 (5)
Dipirona	0,9988	2 - 50	-61,8	0,100	0,030	-	103 (8)	96 (9)	102 (5)	-	117 (3)	118 (13)	105 (8)
Eritromicina	0,9973	2 - 50	21,7	0,100	0,030	-	110 (7)	114 (6)	117 (2)	-	84 (15)	104 (17)	116 (9)
Espiramicina	0,9970	2 - 50	91,9	0,100	0,030	-	111 (5)	113 (6)	98 (5)	-	115 (5)	115 (6)	111 (3)
Fenbendazol	0,9913	2 - 50	-12,5	0,100	0,030	-	97 (13)	100 (5)	112 (4)	-	102 (16)	92 (8)	106 (2)
Haloperidol	0,9991	0,5 - 50	-26,1	0,025	0,008	88 (7)	98 (8)	108 (4)	106 (2)	117 (2)	116 (4)	108 (6)	107 (3)
Ibuprofeno	0,9971	0,5 - 50	-25,8	0,025	0,008	71 (7)	89 (14)	109 (6)	109 (7)	95 (17)	111 (9)	106 (7)	106 (3)
Levamisol	0,9991	0,5 - 50	-6,9	0,025	0,008	87 (6)	102 (6)	110 (5)	109 (2)	111 (4)	113 (3)	102 (4)	101 (3)
Lincomicina	0,9987	0,5 - 20	-45,2	0,025	0,008	108 (6)	105 (5)	110 (5)	107 (3)	107 (7)	113 (4)	115 (5)	117 (2)
Lomefloxacino	0,9985	2 - 50	25,1	0,100	0,030	-	106 (6)	113 (4)	103 (6)	-	92 (9)	83 (6)	89 (5)
Mebendazol	0,9962	2 - 50	-28,8	0,100	0,030	-	96 (10)	107 (8)	110 (4)	-	118 (2)	114 (3)	108 (3)
Metronidazol	0,9961	2 - 50	-80,9	0,100	0,030	-	83 (16)	111 (8)	111 (8)	-	78 (14)	101 (10)	102 (8)
Norfloxacino	0,9982	0,5 - 20	127,8	0,025	0,008	106 (10)	113 (4)	115 (6)	105 (4)	108 (17)	113 (5)	98 (5)	105 (5)
Ofloxacino	0,9993	0,5 - 20	30,3	0,025	0,008	102 (10)	111 (4)	113 (4)	104 (5)	84 (17)	119 (5)	100 (3)	101 (3)
Paracetamol	0,9960	2 - 50	-79,2	0,100	0,030	-	87 (7)	103 (5)	112 (2)	-	98 (11)	96 (11)	111 (9)
Praziquantel	0,9990	2 - 50	7,2	0,100	0,030	-	101 (11)	107 (7)	106 (4)	-	107 (10)	105 (10)	104 (4)
Progesterona	0,9964	2 - 50	-28,0	0,100	0,030	-	108 (7)	104 (11)	111 (4)	-	112 (11)	101 (19)	116 (4)
Propranolol	0,9986	0,5 - 20	-19,7	0,025	0,008	93 (12)	101 (8)	108 (7)	102 (2)	79 (19)	111 (7)	107 (5)	111 (3)
Sulfacloropiridazina	0,9935	2 - 50	-74,2	0,100	0,030	-	81 (13)	91 (14)	105 (10)	-	111 (9)	85 (12)	78 (10)

Compostos	r <sup>2</sup>	Faixa Linear (µg L <sup>-1</sup> )	Efeito Matriz (%)	LOQ (µg L <sup>-1</sup> )	LOD (µg L <sup>-1</sup> )	Recuperação % (Repetibilidade, RSD %)				Recuperação % (Precisão Intermediária, RSD %)			
						Níveis de Fortificação (µg L <sup>-1</sup> )							
						Níveis de Fortificação (µg L <sup>-1</sup> )				Níveis de Fortificação (µg L <sup>-1</sup> )			
						0,025	0,1	0,25	1	0,025	0,1	0,25	1
Sulfadoxina	0,9992	0,5 - 50	-60,8	0,025	0,008	82 (4)	97 (5)	107 (3)	108 (5)	116 (4)	117 (4)	114 (5)	111 (3)
Sulfametoxazol	0,9952	2 - 50	-70,1	0,100	0,030	-	82 (5)	97 (7)	112 (3)	-	112 (8)	118 (8)	107 (9)
Testosterona	0,9936	2 - 50	-19,2	0,100	0,030	-	109 (6)	100 (11)	112 (3)	-	119 (10)	115 (9)	109 (11)
Tiabendazol	0,9978	0,5 - 20	-42,6	0,025	0,008	101 (5)	107 (5)	111 (5)	104 (2)	97 (5)	115 (4)	114 (3)	113 (1)
Trimetoprima	0,9980	0,5 - 20	-44,5	0,025	0,008	112 (6)	110 (4)	112 (3)	105 (3)	90 (8)	116 (3)	113 (5)	115 (2)

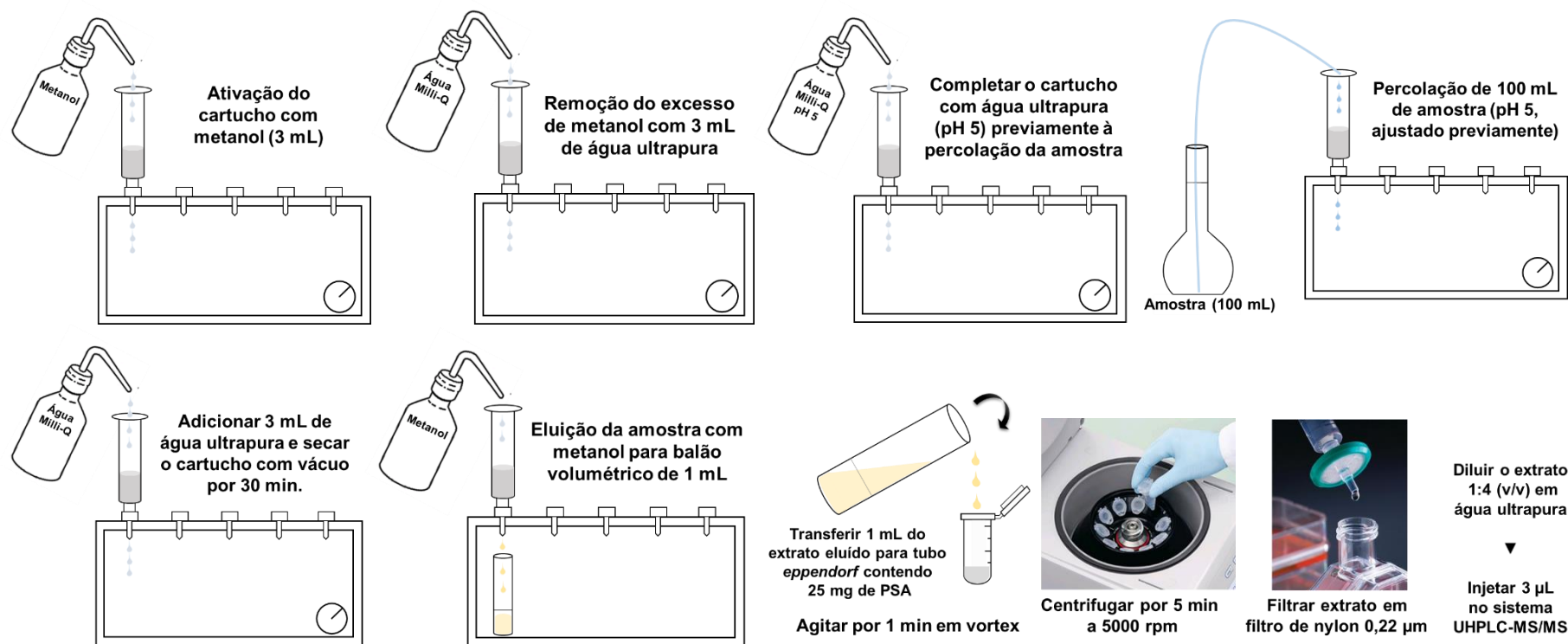
#### 4.5 MÉTODO VALIDADO

No método proposto e validado foram empregadas as técnicas SPE e d-SPE em sequência para concentração dos analitos e limpeza do extrato, respectivamente. As amostras de efluentes foram previamente filtradas em membrana com porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$  e transferidas para balões volumétricos de 100 mL. Adicionou-se às amostras 200  $\mu\text{L}$  de solução de EDTA 5% (m/v) e 20  $\mu\text{L}$  de padrão de controle (albendazol- $\text{d}_3$  e ácido nalidíxico- $\text{d}_5$ ) com concentração de 10  $\text{mg L}^{-1}$  e tiveram o pH ajustado para 5,0 utilizando soluções aquosas de ácido fórmico 5% (v/v) ou hidróxido de amônio 1% (v/v).

Utilizando um *manifold* com bomba de vácuo, os cartuchos de SPE Oasis<sup>®</sup> HLB (60 mg/3 mL) foram fixados no sistema e foi realizado o condicionamento dos cartuchos da seguinte forma: adição de 3 mL de metanol deixado interagir por 1 min, seguido da adição de 3 mL de água ultrapura e mais 3 mL de água ultrapura pH 5,0. Após cada adição os solventes foram descartados dos cartuchos deixando percolar. Posteriormente foi acoplada a tubulação de PTFE para a transferência da amostra do balão volumétrico de 100 mL e percolação pelo cartucho. Ajustou-se a vazão de percolação para aproximadamente 1  $\text{mL min}^{-1}$ . Após o término da percolação da amostra, adicionou-se 3 mL de água ultrapura para limpeza do cartucho e os mesmos foram secos no *manifold* sob vácuo por aproximadamente 30 min.

A eluição da amostra foi realizada utilizando metanol e recolhida em balão volumétrico de 1 mL. A adição do solvente no cartucho SPE foi efetuada até completar o menisco do balão. O extrato foi transferido para um tubo Eppendorf contendo 25 mg do sorvente PSA. O tubo foi agitado em vórtex por 1 min, centrifugado por 5 min a 5000 rpm e filtrado com filtro de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ . O extrato foi então diluído 1:4 (v/v) em água ultrapura, foi adicionado 2  $\mu\text{L}$  de padrão interno (trifenilfosfato 10  $\text{mg L}^{-1}$ ) e analisado por UHPLC-MS/MS. O procedimento proposto pode ser visualizado na Figura 22.

Figura 22 - Fluxograma do procedimento de preparo de amostra realizado para determinação de fármacos em efluentes empregando SPE e d-SPE.



#### 4.6 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS

Após desenvolvido e validado o método de análise foi aplicado às amostras coletadas em um total de sete pontos do sistema *wetlands*, após cada uma das etapas do processo de tratamento. Nas amostras coletadas semanalmente, dos 37 compostos validados no método, foram encontrados 15 compostos no efluente bruto ou durante o tratamento (Tabela 12). Destes, as maiores concentrações encontradas foram de paracetamol ( $108 \mu\text{g L}^{-1}$ ), atenolol ( $6,7 \mu\text{g L}^{-1}$ ), ácido salicílico ( $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e ciprofloxacino ( $0,998 \mu\text{g L}^{-1}$ ) no efluente bruto, destacando também a concentração de  $1,7 \mu\text{g L}^{-1}$  de sulfametoxazol no reator anaeróbio e de  $2,8 \mu\text{g L}^{-1}$  de atenolol no biofiltro.

Os altos valores encontrados em média para o paracetamol ( $54,489 \mu\text{g L}^{-1}$ ), explica-se pelo uso generalizado por parte da população. Este composto é encontrado em diversos países, tanto em ETEs, como em rios e outros recursos hídricos (BOTERO-COY *et al.*, 2018; BROWN; WONG, 2018; RIVERA-JAIMES *et al.*, 2018). Já o atenolol é facilmente encontrado em ETEs devido à baixa absorção pelo organismo e ser, em sua maior parte, excretado na urina (AUVINEN *et al.*, 2017; BALAKRISHNA *et al.*, 2017).

Comparando os quatro sistemas observa-se que os sistemas contendo materiais de enchimento apresentaram melhores resultados em termos de redução da concentração média dos compostos encontrados. Sistemas hidropônicos como observados no sistema *Float* apresentam uma grande absorção dos compostos pelas raízes das plantas, porém esta absorção não é proporcional a concentração dos fármacos nos efluentes, demonstrando que não é o principal mecanismo de degradação dos fármacos no sistema (HIJOSA-VALSERO *et al.*, 2016). Sistemas contendo materiais de enchimento tem maior adsorção no substrato de moléculas hidrofóbicas, no entanto esta acaba não sendo a principal via de degradação.

Tabela 12 - Concentrações ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) dos fármacos e alguns metabólitos encontrados nas amostras coletadas na ETE da UNISC.

Compostos	LOQ/LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Bruto			R. Anaeróbio			Wet Vert			Wet Horiz			Biofiltro			WCell			Float		
		Média <sup>a</sup>	Min.	Máx.	Média <sup>a</sup>	Min.	Máx.	Média <sup>a</sup>	Min.	Máx.	Média <sup>a</sup>	Min.	Máx.	Média <sup>a</sup>	Min.	Máx.	Média <sup>a</sup>	Min.	Máx.	Média <sup>a</sup>	Min.	Máx.
Ácido salicílico	0,100/0,030	<b>0,958</b>	0,262	2,507	<b>0,051</b>	n.d.	0,253	<b>n.d.</b>	n.d.	n.d.	<b>n.d.</b>	n.d.	n.d.	<b>0,675</b>	n.d.	1,551	<b>n.d.</b>	n.d.	n.d.	<b>0,057</b>	n.d.	0,286
Alben. amino	0,025/0,008	<b>0,025</b>	n.d.	0,044	<b>0,027</b>	<LOQ	0,041	<b>0,031</b>	0,022	0,051	<b>0,014</b>	n.d.	0,028	<b>0,034</b>	0,024	0,044	<b>0,045</b>	0,038	0,052	<b>0,031</b>	n.d.	0,061
Alben. sulfóxido	0,025/0,008	<b>0,016</b>	n.d.	0,041	<b>0,030</b>	n.d.	0,090	<b>0,053</b>	0,039	0,075	<b>0,020</b>	n.d.	0,045	<b>0,055</b>	n.d.	0,213	<b>0,041</b>	n.d.	0,078	<b>0,053</b>	0,025	0,105
Alben. sulfona	0,025/0,008	<b>0,004</b>	n.d.	0,013	<b>0,015</b>	0,012	0,017	<b>0,109</b>	0,059	0,194	<b>0,134</b>	0,072	0,226	<b>0,008</b>	n.d.	0,012	<b>0,087</b>	0,057	0,113	<b>0,018</b>	<LOQ	0,021
Albendazol	0,025/0,008	<b>0,134</b>	n.d.	0,349	<b>0,258</b>	0,185	0,295	<b>0,057</b>	n.d.	0,169	<b>0,048</b>	n.d.	0,101	<b>0,200</b>	0,111	0,281	<b>0,150</b>	0,138	0,173	<b>0,218</b>	0,168	0,287
Atenolol	0,100/0,030	<b>4,278</b>	n.d.	6,712	<b>1,533</b>	0,935	2,240	<b>0,327</b>	n.d.	1,636	<b>0,020</b>	n.d.	0,102	<b>2,240</b>	1,776	2,797	<b>0,189</b>	n.d.	0,350	<b>2,088</b>	1,567	2,700
Carbamazepina	0,025/0,008	<b>0,106</b>	n.d.	0,189	<b>0,110</b>	0,058	0,149	<b>0,095</b>	0,066	0,141	<b>0,060</b>	n.d.	0,090	<b>0,083</b>	n.d.	0,135	<b>0,093</b>	0,075	0,118	<b>0,080</b>	n.d.	0,154
Ciprofloxacino	0,025/0,008	<b>0,287</b>	n.d.	0,998	<b>0,089</b>	0,063	0,123	<b>0,014</b>	n.d.	0,069	<b>n.d.</b>	n.d.	n.d.	<b>0,111</b>	0,081	0,149	<b>n.d.</b>	n.d.	n.d.	<b>0,086</b>	0,053	0,118
Ibuprofeno	0,025/0,008	<b>0,104</b>	n.d.	0,189	<b>0,107</b>	0,055	0,160	<b>0,089</b>	n.d.	0,140	<b>0,071</b>	0,053	0,094	<b>0,076</b>	n.d.	0,127	<b>0,093</b>	0,077	0,111	<b>0,081</b>	n.d.	0,156
Norfloxacino	0,025/0,008	<b>0,006</b>	n.d.	0,021	<b>0,005</b>	n.d.	0,015	<b>n.d.</b>	n.d.	n.d.	<b>n.d.</b>	n.d.	n.d.	<b>0,002</b>	n.d.	0,011	<b>n.d.</b>	n.d.	n.d.	<b>0,009</b>	n.d.	0,019
Ofloxacino	0,025/0,008	<b>0,006</b>	n.d.	0,029	<b>0,022</b>	0,015	0,034	<b>n.d.</b>	n.d.	n.d.	<b>n.d.</b>	n.d.	n.d.	<b>0,015</b>	n.d.	0,028	<b>n.d.</b>	n.d.	n.d.	<b>0,018</b>	<LOQ	0,027
Paracetamol	0,100/0,030	<b>54,589</b>	9,477	108,830	<b>3,810</b>	n.d.	10,503	<b>6,465</b>	n.d.	31,542	<b>n.d.</b>	n.d.	n.d.	<b>24,782</b>	n.d.	45,376	<b>n.d.</b>	n.d.	n.d.	<b>4,943</b>	n.d.	18,322
Propranolol	0,025/0,008	<b>0,141</b>	n.d.	0,305	<b>0,115</b>	0,088	0,151	<b>0,015</b>	n.d.	0,065	<b>0,008</b>	n.d.	0,021	<b>0,088</b>	0,063	0,122	<b>0,017</b>	n.d.	0,035	<b>0,090</b>	0,077	0,105
Sulfametoxazol	0,100/0,030	<b>0,056</b>	n.d.	0,209	<b>0,375</b>	n.d.	1,674	<b>0,016</b>	n.d.	0,047	<b>n.d.</b>	n.d.	n.d.	<b>0,334</b>	0,027	0,962	<b>0,074</b>	n.d.	0,192	<b>0,376</b>	n.d.	0,805
Trimetoprima	0,025/0,008	<b>n.d.</b>	n.d.	n.d.	<b>0,021</b>	n.d.	0,104	<b>n.d.</b>	n.d.	n.d.	<b>n.d.</b>	n.d.	n.d.	<b>0,005</b>	n.d.	0,024	<b>n.d.</b>	n.d.	n.d.	<b>0,011</b>	n.d.	0,041

n.d = Não detectado;

<sup>a</sup> n = 5

Apesar de serem encontrados diversos compostos no efluente bruto, é possível observar a redução parcial ou até total dos compostos após passarem pelas etapas de tratamento. O paracetamol e o ácido salicílico foram quantificados em todas as amostras do efluente bruto analisadas, enquanto os outros 13 compostos encontrados não foram detectados em pelo menos uma das amostragens realizadas.

O paracetamol foi o composto encontrado na maior concentração entre os compostos avaliados. O mesmo é facilmente encontrado em rios e efluentes e a concentração média encontrada no efluente bruto ( $54,6 \mu\text{g L}^{-1}$ ) pode ser observada em estudos em outras partes do mundo tanto em efluentes urbanos como efluentes hospitalares (BOTERO-COY *et al.*, 2018; SHRAIM *et al.*, 2017; SUBEDI *et al.*, 2017). Mesmo assim, as altas concentrações não são um problema para sistemas de tratamento do tipo *wetlands* que facilmente remove do meio a partir de processos como a biodegradação aeróbica e adsorção, chegando a 99% de remoção em alguns casos (BROWN; WONG, 2018; CHEN *et al.*, 2016).

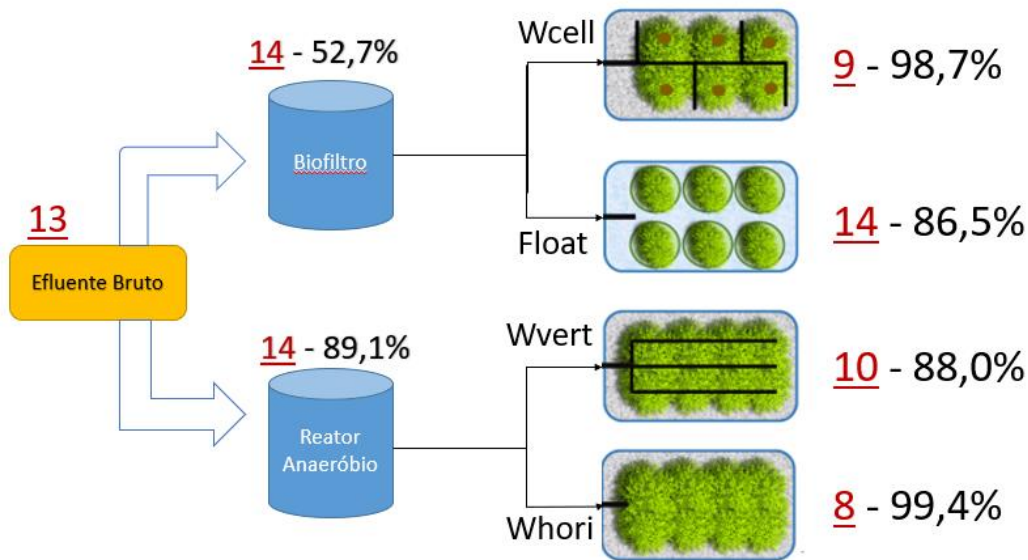
Como pode ser observado na Tabela 12, o paracetamol chegou a ser encontrado na concentração de  $108 \mu\text{g L}^{-1}$ , ficando com média de  $54,589 \mu\text{g L}^{-1}$  entre as amostras avaliadas. Porém nos sistemas Wcell e Whori o paracetamol não foi detectado em nenhuma das replicatas analisadas, já nos sistemas de Wvert e *Float* não foi detectado na maioria das amostras, entretanto, tiveram algumas amostras com altas concentrações de  $31,5 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $18,3 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente.

Além do paracetamol, nos sistemas Wcell e Whori não foram detectados outros cinco compostos: ácido salicílico, ciprofloxacino, norfloxacino, ofloxacino e trimetoprima. Sendo este último não detectado no efluente bruto, porém encontrado na segunda etapa do sistema nas duas configurações, tanto no biofiltro como no reator anaeróbico em baixas concentrações, próximos ao limite de quantificação do método e somente em algumas amostragens.

Como pode ser observado na Figura 23, os sistemas Wcell e Whori apresentaram o menor número de compostos detectados, além do maior percentual de remoção dos 14 compostos encontrados durante o tratamento.



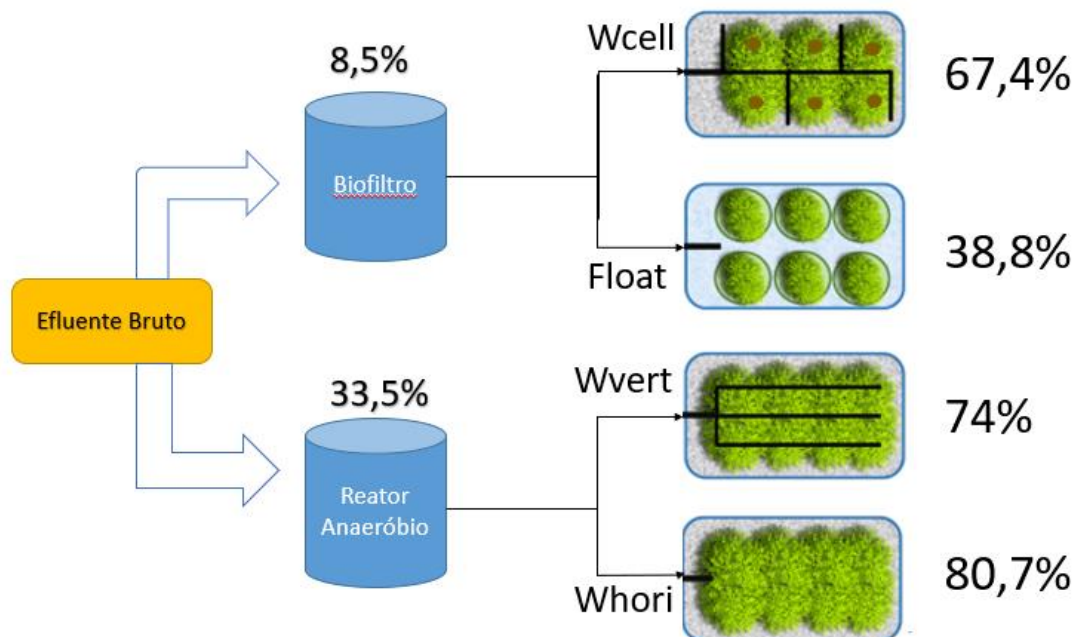
Figura 23 – Número de compostos encontrados em cada etapa do tratamento seguido do percentual de remoção em relação ao efluente bruto.



**XX** – Número de compostos encontrados; **XX,X%** - Percentual de remoção total em relação a concentração do efluente bruto.

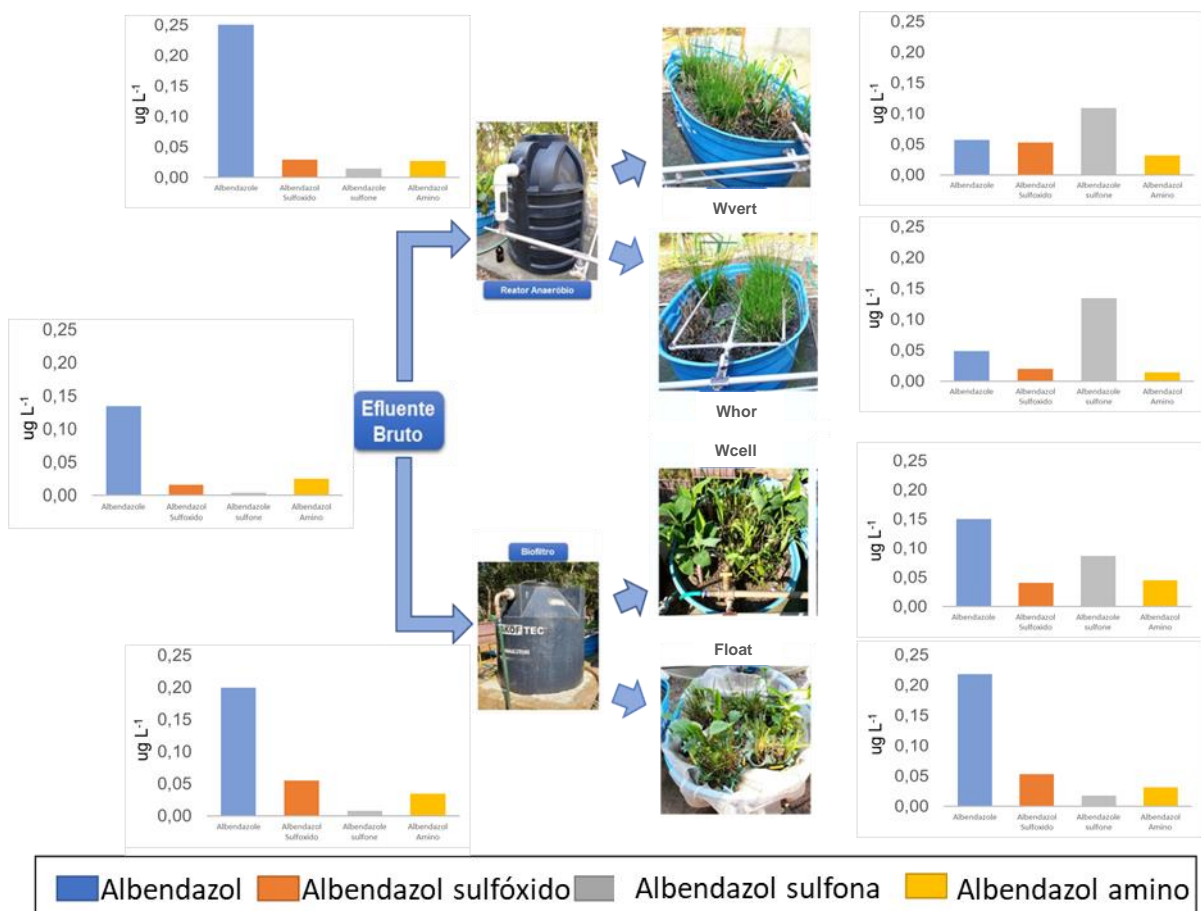
Grande parte da remoção observada na Figura 23, deve-se principalmente ao paracetamol e ao atenolol, moléculas com as maiores concentrações entre os compostos analisados (Tabela 12). Quando desconsiderados as remoções destas duas moléculas conforme Figura 24, observa-se que o valor percentual de remoção dos sistemas diminuem, principalmente os sistemas biofiltro e reator anaeróbio.

Figura 24 – Percentual de remoção total dos compostos após cada uma das etapas de tratamento, sem considerar o atenolol e o paracetamol.



No caso do albendazol foram analisados ainda outros 3 metabólitos que em algumas etapas do processo de tratamento foram encontrados valores maiores que na etapa anterior, isso pode ser resultado da degradação da molécula pelo sistema de tratamento. Em relação ao efluente bruto, no geral pode-se observar uma diminuição da concentração da molécula original após os tratamentos e um aumento dos metabólitos em relação à concentração inicial, conforme Figura 25.

Figura 25 - Comparação entre as etapas de tratamento para o albendazol e os 3 metabólitos.

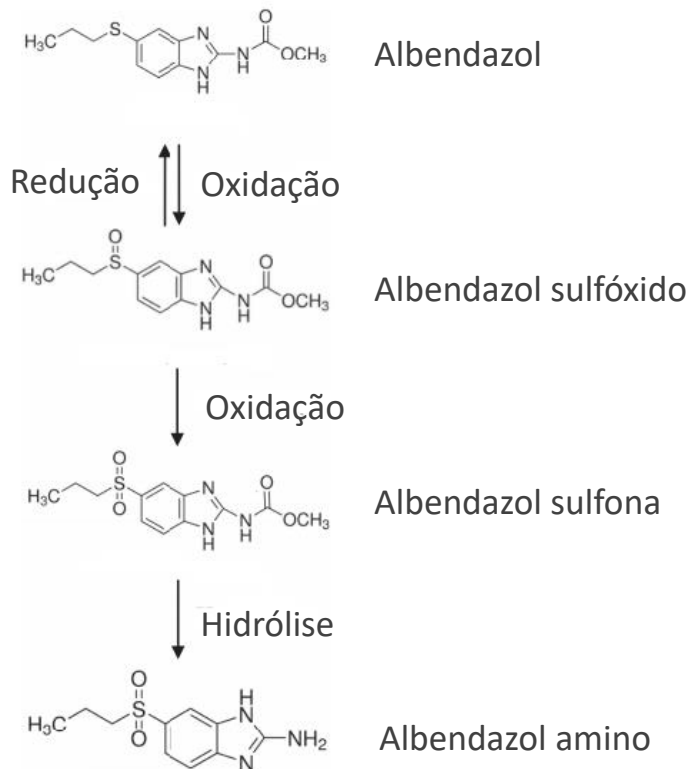


Observa-se que o metabólito de albendazol sulfona, foi encontrado em maiores concentrações nos *wetlands* preenchidos com material como pedras e cascalhos (Wcell, Wvert e Whori). Este aumento pode ser explicado devido à característica das reações de oxi-redução destes sistemas degradarem o albendazol encontrado em maiores concentrações nas etapas anteriores, já que o biofiltro, o reator anaeróbio e o sistema *float* possuem ambientes mais anaeróbicos com menor potencial de oxidação.

De acordo com Zhang e colaboradores (2020), o albendazol é praticamente todo metabolizado no fígado e seu metabólito sulfóxido é mais facilmente encontrado no sangue após a metabolização. Conforme a Figura 26 é possível observar que o metabólito pode se reduzir e voltar a forma inicial ou se converter a albendazol sulfona.

Os metabólitos albendazol sulfóxido e albendazol amino apresentaram pequenas diferenças entre as configurações de tratamento, sendo encontrados principalmente nos sistemas contendo substrato. Cabe destacar que a degradação do albendazol pode levar a formação de outros metabólitos que não foram incluídos neste estudo pela falta de padrão disponível.

Figura 26 - Principais vias metabólicas do fármaco albendazol.



Fonte: Adaptado de Zhang e colaboradores (2020).

No caso do atenolol a concentração média de  $4,278 \mu\text{g L}^{-1}$  é quase dez vezes maior que a encontrada no estudo de Asimakopoulos e colaboradores (2017), porém próximo a concentração encontrada por Shraim e colaboradores (2017) em efluentes urbanos. A concentração de atenolol chega a ser em média 30 vezes maior que a de propranolol, outro beta-bloqueador avaliado, ficando com a proporção próxima a

encontrada por Subedi e colaboradores (2017) em efluentes urbanos na Índia, onde o atenolol é o anti-hipertensivo mais receitado por médicos. Apesar de ser o composto com a segunda maior concentração encontrada neste estudo, o atenolol teve um grande percentual de degradação pelos sistemas que possuíam materiais de enchimentos como pedras e areia (Wcell, Wvert e Whori) enquanto o sistema sem material de enchimento *Float*, praticamente não apresentou redução em relação ao sistema biofiltro, etapa anterior ao seu. Isto pode ser devido aos diferentes processos bioquímicos criados pelos sistemas com substrato ou as diferentes espécies de plantas em cada sistema (CHEN *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2018).

Utilizando um sistema do tipo *float* aerado Auvinem e colaboradores (2017) alcançaram mais de 75% de remoção do atenolol em um efluente hospitalar com a concentração média ( $8,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ) quase duas vezes maior que a concentração encontrada no efluente bruto (Tabela 12). Isto demonstra que sistemas aeróbicos tem maior potencial de degradação em relação a sistemas anaeróbios (como o sistema *float*) para o atenolol (POMIÈS *et al.*, 2015).

O mesmo sistema apresentou baixa remoção para a carbamazepina, fármaco conhecido por ser altamente resistente a biodegradação. No estudo de Asimakopoulos e colaboradores (2017), a concentração média de carbamazepina encontrada em uma estação de tratamento de efluentes ( $0,088 \mu\text{g L}^{-1}$ ) foi próxima ao efluente bruto avaliado ( $0,106 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e não apresentou redução após passar pela planta de tratamento, enquanto que o tratamento por wetlands construídos avaliado teve uma eficiência de até 40% de remoção para o sistema de Whori que apresentou o maior percentual de remoção entre os sistemas avaliados, percentual de remoção próximo ao encontrado por Auvinem e colaboradores (2017) em um sistema de wetlands de fluxo sub-superficial aerado.

Apesar da carbamazepina ter o  $\log K_{ow}$  de 2,45 tornando mais facilmente absorvida pela planta e podendo ser encontrada em altas concentrações nas folhas em relação a outros compostos com menores valores de  $\log K_{ow}$  como o ofloxacino (0,89) (YAN *et al.*, 2016), nos sistemas de wetlands construídos avaliados apenas o sistema Whori apresentou significativa redução no efluente final demonstrando que o sistema de substrato pode ter maior relevância na redução da molécula no efluente do que o processo de absorção e assimilação realizados pelas plantas (HE *et al.*, 2018). Esta adsorção da carbamazepina pelo substrato acontece devido a sua alta

polarizabilidade levando a fortes ligações de *van der Waals* na interação com o meio (YAN *et al.*, 2016).

No sistema desenvolvido por Hijosa-Valsero e colaboradores (2016), o ibuprofeno não apresentou valores consideráveis de remoção no sistema de wetlands, assim como observado neste estudo (Tabela 12), o sistema com plantas em caixas sem material de enchimento apresentou as maiores remoções, o coeficiente de partição  $\log K_{ow}$  do ibuprofeno (3,79) pode ser a explicação, uma vez que moléculas com  $\log K_{ow}$  entre 1 e 4 tendem a ser melhor absorvidas pelas raízes das plantas ou permanecerem dissolvidas, enquanto moléculas com  $\log K_{ow} > 4$  tendem a ficar adsorvidas no sistema. A baixa remoção do ibuprofeno no sistema de tratamento pode ser devido a uma saturação do sistema, visto que sistemas insaturados com condições oxidantes elevadas e alimentação intermitente, podem apresentar remoções praticamente totais do fármaco (ÁVILA *et al.*, 2015). Outro modo de remoção do ibuprofeno do meio é a partir da fitoextração por algumas espécies de plantas, como *Typha angustifolia* que translocam as moléculas absorvidas pelas raízes até suas folhas (LI *et al.*, 2016).

O ácido salicílico é um hormônio vegetal que desenvolve o crescimento da planta e pode ser naturalmente encontrado em plantas em concentrações de até  $1 \mu\text{g g}^{-1}$ . Quando adicionado de fonte exógena, forma seu metabólito metilado que é rapidamente absorvido pelas plantas (HIJOSA-VALSERO *et al.*, 2016). No sistema de tratamento dos wetlands ele é facilmente removido em todos os sistemas com material de enchimento e apenas o sistema *Float* apresentou sinais do fármaco, ainda que em baixas concentrações (VERLICCHI; ZAMBELLO, 2014).

Alguns compostos como ofloxacino e sulfametoxazol apresentam o balanço de massa negativo entre a concentração média do efluente bruto comparando uma ou mais etapas de tratamento. Isto pode ter duas explicações: o composto já acumulou em determinada etapa do tratamento e passa por dissolução subsequente devido a processos bióticos ou abióticos, ou o composto chega à estação no efluente bruto na forma conjugada e/ou como metabólito e não é detectado, assim após passar pelo processo de tratamento pode ser desconjugado ou transformado em composto parenteral novamente (ARCHER *et al.*, 2017; AUVINEN *et al.*, 2017).

Apesar de alguns estudos encontrarem remoções de sulfametoxazol de até 87% da concentração inicial em efluentes tratados por wetlands construídos (HIJOSA-

VALSERO *et al.*, 2016), outros estudos apresentam um balanço de massa negativo (AUVINEN *et al.*, 2017; BREITHOLTZ *et al.*, 2012). Nas quatro diferentes configurações do sistema *wetlands* avaliadas, foi possível observar a redução na concentração final em relação a concentração no efluente bruto, no entanto, a concentração média encontrada durante o tratamento, após o biofiltro e o reator anaeróbio foi maior do que a encontrada no efluente inicial ou final podendo ser fruto de um acúmulo no sistema ou de transformação da forma do composto durante o tratamento (ARCHER *et al.*, 2017; AUVINEN *et al.*, 2017).

## 5. CONCLUSÕES

O método de extração desenvolvido e validado demonstrou que para alguns tipos de efluentes, os métodos tradicionais de SPE não são capazes de atingir a limpeza necessária do extrato para a análise cromatográfica, podendo levar ao aumento das manutenções e limpezas periódicas do equipamento. Apesar do método de SPE ser capaz de concentrar os analitos reduzindo os limites de detecção e quantificação, há de se considerar a limpeza do extrato após a concentração para matrizes tão complexas como o caso dos efluentes de ETEs.

A análise por UHPLC-MS/MS além de ser rápida, de apenas 5 min, demonstrou boa sensibilidade para as moléculas avaliadas. O uso de modificadores adequados na fase móvel e a temperatura da coluna cromatográfica também ajudaram a obter melhores respostas. A alta seletividade e sensibilidade do detector triplo quadrupolo permitiu atingir valores de LD e LQ do método adequados para a determinação dos fármacos em efluente bruto e tratado.

A presença dos medicamentos no efluente analisado demonstra a importância do controle nos efluentes que estão sendo descartados nos corpos hídricos e a importância de utilizar sistemas de tratamento que sejam efetivos. O uso de sistemas de tratamento únicos e simples como um reator anaeróbico ou biofiltro, como os utilizados na etapa intermediária do tratamento, demonstra que sozinhos não são capazes de tratar efetivamente o efluente.

Os sistemas de *wetlands* construídos avaliados apresentaram bons resultados na redução dos medicamentos encontrados no efluente bruto, principalmente para compostos encontrados em altas concentrações como o paracetamol e o atenolol. O uso dos substratos demonstrou sua devida relevância no tratamento, sendo os processos de degradação, remoção ou adsorção ainda não muito bem explicados.

Apesar dos bons resultados na remoção dos medicamentos, a avaliação dos metabólitos do albendazol demonstrou que além do controle dos medicamentos encontrados no efluente bruto, deve-se avaliar o controle dos metabólitos formados após o tratamento, que em alguns casos podem ser mais difíceis de serem biodegradados por corpos hídricos receptores dos efluentes pós-tratamento.

## REFERÊNCIAS

AFONSO-OLIVARES, C.; ČADKOVÁ, T.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J. J.; NOVÁKOVÁ, L. Simplified solid-phase extraction procedure combined with liquid chromatography tandem–mass spectrometry for multiresidue assessment of pharmaceutical compounds in environmental liquid samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1487, p. 54-63, 2017.

ANDRÉS-COSTA, M. J.; CARMONA, E.; PICÓ, Y. Universal method to determine acidic licit and illicit drugs and personal care products in water by liquid chromatography quadrupole time-of-flight. **MethodsX**, v. 3, p. 307-314, 2016.

ARCHER, E.; PETRIE, B.; KASPRZYK-HORDERN, B.; WOLFAARDT, G. M. The fate of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs), endocrine disrupting contaminants (EDCs), metabolites and illicit drugs in a WWTW and environmental waters. **Chemosphere**, v. 174, p. 437-446, 2017.

ARIS, A. Z.; SHAMSUDDIN, A. S.; PRAVEENA, S. M. Occurrence of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. **Environment International**, v. 69, p. 104-119, 2014.

ASIMAKOPOULOS, A. G.; KANNAN, P.; HIGGINS, S.; KANNAN, K. Determination of 89 drugs and other micropollutants in unfiltered wastewater and freshwater by LC-MS/MS: an alternative sample preparation approach. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, p. 6205-6225, 2017.

AUGUSTO, F.; HANTAO, L. W.; NOROSKA, G.; MOGOLLON, S.; SORAIA, C.; BRAGA, G. N. New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 14-23, 2013.

AUVINEN, H.; HAVRAN, I.; HUBAU, L.; VANSEVEREN, L.; GEBHARDT, W.; LINNEMANN, V.; OIRSCHOT, D. V.; LAING, G. D.; ROUSSEAU, D. P. L. New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction. **Ecological Engineering**, v. 100, p. 157-164, 2017.

AZIZ, K. H. H.; MIESSNER, H.; MUELLER, S.; KALASS, D.; MOELLER, D.; KHORSHID, I.; RASHID, M. A. M. Degradation of pharmaceutical diclofenac and ibuprofen in aqueous solution, a direct comparison of ozonation, photocatalysis, and non-thermal plasma. **Chemical Engineering Journal**, v. 313, p. 1033-1041, 2017.

BAENA-NOGUERAS, R. M.; PINTADO-HERRERA, M. G.; GONZÁLEZ-MAZO, E.; LARA-MARTÍN, P. A. Determination of pharmaceuticals in coastal systems using solid phase extraction (SPE) followed by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Current Analytical Chemistry**, v. 12, p. 183-201, 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.

BAILE, P.; VIDALS, L.; CANALS, A. A modified zeolite/iron oxide composite as a sorbent for magnetic dispersive solid-phase extraction for the preconcentration of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in water and urine samples. **Journal of chromatography A**, v. 1603, p. 33-43, 2019.

BERNARDI, G.; KEMMERICH, M.; ADAIME, M. B.; PRESTES, O. P.; ZANELLA, R. Miniaturized QuEChERS method for determination of 97 pesticide residues in wine by ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 21, p. 2682-2692, 2020.

BILAL, M.; MEHMOOD, S.; RASHEED, T.; IQBAL, H. M. N. Antibiotics traces in the aquatic environment: persistence and adverse environment impact. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, v. 13, p. 68-74, 2020.

BOTERO-COY, A. M.; MARTÍNEZ-PACHÓN, D.; BOIX, C.; RINCÓN, R. J.; CASTILLO, N.; ARIAS-MARÍN, L. P.; MANRIQUE-LOSADA, L.; TORRES-PALMA, R.; MONCAYO-LASSO, A.; HERNÁNDEZ, F. An investigation into the occurrence and removal of pharmaceuticals in Colombian wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 642, p. 842-853, 2018.

BREITHOLTZ, M., NÄSLUND, M.; STRÅE, D.; BORG, H.; GRABIC, R.; FICK, J. An evaluation of free water surface wetlands as tertiary sewage water treatment of micropollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 78, p. 63–71, 2012

BROWN, A. K.; WONG, C. S. Distribution and fate of pharmaceuticals and their metabolite conjugates in a municipal wastewater treatment plant. **Water Research**, v. 144, p. 774-783, 2018.

BRUNSCH, A. F.; TER LAAK, T. L.; CHRISTOFFELS, E.; RIJNAARTS, H.; LANGENHOFF, A. A. M.; Retention soil filter as post-treatment step to remove micropollutants from sewage treatment plant effluent. **Science of the Total Environment**, v. 637-638, p. 1098-1107, 2018a.

BRUNSCH, A. F.; TER LAAK, T. L.; RIJNAARTS, H.; CHRISTOFFELS, E. Pharmaceutical concentration variability at sewage treatment plant outlets dominated by hydrology and other factors. **Environmental Pollution**, v. 235, p. 615-624, 2018b.

CABAN, M.; LIS, H.; KOBYLIS, P.; STEPNOWSKI, P. The triple-sorbents solid-phase extraction for pharmaceuticals and estrogens determination in wastewater samples. **Microchemical Journal**, v. 149, p. 103965, 2019.

CABRERA, L. C.; MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 227-240, 2012.

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, p.1604-1617, 2011.

CAMPOS-MAÑAS, M. C.; PLAZA-BOLAÑOS, P.; SÁNCHEZ-PEREZ, J. A.; MALATO, S.; AGÜERA, A. Fast determination of pesticides and other contaminants of emerging concern in treated wastewater using direct injection coupled to highly sensitive ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, v. 1507, p. 84-94, 2017.

CANTWELL, H. **Blanks in Method Validation - Supplement to Eurachem Guide The Fitness for Purpose of Analytical Methods**, 1 ed. 2019. Disponível em: [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org).

CARRANZA-DIAZ, O.; SHULTZE-NOBRE, L.; MOEDER, M.; NIVALA, J.; KUSCHK, P.; KOESER, H. Removal of selected organic micropollutants in planted and unplanted pilot-scale horizontal flow constructed wetlands under conditions of high organic load. **Ecological Engineering**, v. 71, p. 234-245, 2014.

CARVALHO, R. N.; CERIANI, L.; IPPOLITO, A.; LETTIERI, T. Development of the First Watch List Under the Environmental Quality Standards Directive. **JRC Science Hub**. 2015.

CHEN, Y.; VYMAZAL, J.; BŘEZINOVÁ, T.; KOŽELUH, M.; KULE, L.; HUANG, J.; CHEN, Z. Occurrence, removal and environmental risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in rural wastewater treatment wetlands. **Science of the Total Environment**, v. 566-567, p. 1660-1669, 2016.

CHISVERT, A.; CÁRDENAS, S.; LUCENA, R. Dispersive micro-solid phase extraction. **Chemosphere**, v. 112, p. 226-233, 2019.

COLARES, G. S.; CELENTE, G. S.; SILVA, F. P.; LORETO, A. C.; LUTTERBECK, C. A.; KIST, L T.; MACHADO, E. L. Combined system for the treatment and reuse of urban wastewater: the efficiency of anaerobic reactors + hybrid constructed wetlands + ozonation. **Water Science & Technology**, v. 80, p. 254-264, 2019.

DANIELE, G.; FIEU, M.; JOACHIM, S.; BADO-NILLES A.; BEAUDOUIN, R.; BAUDOIN, P.; JAMES-CASAS, A.; ANDRES, S.; BONNARD, M.; BONNARD, I.; GEFFARD, A.; VULLIET, E. Determination of carbamazepine and 12 degradation products in various compartments of an outdoor aquatic mesocosm by reliable

analytical methods based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 16893-16904, 2017.

DASENAKI, M. E.; THOMAIDIS, N. S. Multianalyte method for the determination of pharmaceuticals in wastewater samples using solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 4229-4245, 2015.

DAUGHTON, C. G.; TERNES, T. A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, p. 907-938, 1999.

DONATO, F. F.; BANDEIRA, N. M. G.; SANTOS, G. C.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Evaluation of the rotating disk sorptive extraction technique with polymeric sorbent for multiresidue determination of pesticides in water by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1516, p. 54-63, 2017.

EL-SHEIKH, A. H.; QAWARIQ, R. F.; ABDELGHANI, J. I. Adsorption and magnetic solid-phase extraction of NSAIDs from pharmaceutical wastewater using magnetic carbon nanotubes: Effect of sorbent dimensions, magnetite loading and competitive adsorption study. **Environmental Technology and Innovation**, v. 16, p. 100496, 2019.

FERNÁNDEZ, M.; FERNÁNDEZ, M.; LACA, A.; LACA, A.; DÍAZ, M. Seasonal occurrence and removal of pharmaceutical products in municipal wastewaters. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, p. 495-502, 2014.

FEKADU, S.; ALEMAYEHU, E.; DEWIL, R.; VAN DER BRUGGEN, B. Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: A comparison of the African and European challenge. **Science of the Total Environment**, v. 654, p. 324-337, 2019.

GÓMEZ-CANELA, C.; SALA-COMORERA, T.; PUEYO, V.; BARATA, C.; LACORTE, S. Analysis of 44 pharmaceuticals consumed by elderly using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 168, p. 55-63, 2019.

GONZÁLEZ-MARIÑO, I.; CASTRO, V.; MONTES, R.; RODIL, R.; LORES, A.; CELA, R.; QUINTANA, J. B. Multi-residue determination of psychoactive pharmaceuticals, illicit drugs and related metabolites in wastewater by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1569, p. 91-100, 2018.

GUO, B.; CHEN, B.; LIU, A.; ZHU, W.; YAO, S. Liquid chromatography-mass spectrometric multiple reaction monitoring-based strategies for expanding targeted profiling towards quantitative metabolomics. **Current Drug Metabolism**, v. 13, p. 1226-1243, 2012.

HE, Y.; SUTTON, N. B.; LEI, Y.; RIJNAARTS, H. H. H.; LANGENHOFF, A. A. M. Fate and distribution of pharmaceutically active compounds in mesocosm constructed wetlands. **Journal of Hazardous Materials**, v. 357, p. 198-206, 2018.

HEIDORN, M. The Role of Temperature and Column Thermostatting in Liquid Chromatography, **Thermo Fisher Scientific**, White Paper 71499, p. 1-6, 2016.

HERMES, N.; JEWELL, K. S.; WICK, A.; TERNES, T. A. Quantification of more than 150 micropollutants including transformation products in aqueous samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using scheduled multiple reaction monitoring. **Journal of Chromatography A**, v. 1531, p. 64-73, 2018.

HIJOSA-VALSERO, M.; REYES-CONTRERAS, C.; DOMÍNGUEZ, C.; BÉCARES, E.; BAYONA, J.M. Behaviour of pharmaceuticals and personal care products in constructed wetland compartments: Influent, effluent, pore water, substrate and plant roots. **Chemosphere**, v. 145, p. 508-517, 2016.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS. DOQ-CGCRE-008, revisão 09, 2020.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.

KIDD, K. A.; BLANCHFIELD, P. J.; MILLS, K. W.; PALACE, V. P.; EVANS R. E.; LAZORCHAK, J. M.; FLICK, R. W. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 8897-8901, 2007.

KIRSCHNER, N.; DIAS, A. N.; BUDZIAK, D.; SILVEIRA, C. B. MERIB. J.; CARASEK, E. Novel approach to high-throughput determination of endocrine disruptors using recycled diatomaceous earth as a green sorbent phase for thin-film solid-phase microextraction combined with 96-well plate system. **Analytica Chimica Acta**, v. 996, p.29–37, 2017.

KOSMA, C. I.; LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Investigation of PPCPs in wastewater treatment plants in Greece: Occurrence, removal and environmental risk assessment. **Science of The Total Environment**, v. 466–467, p. 421–438, 2014.

KRZEMINSKI, P.; TOMEI, M. C.; KARAOLIA, P.; LANGENHOFF, A.; ALMEIDA, M. R.; FELIS, E.; GRITTEN, F.; ANDERSEN, H. R.; FERNANDES, T.; MANAIA, C. M.; RIZZO, L.; FATTA-KASSINOS, D. Performance of secondary wastewater treatment methods for the removal of contaminants of emerging concern implicated in crop uptake and antibiotic resistance spread: a review. **Science of the Total Environment**, v. 648, p. 1052-1081, 2019.

KÜMMERER K. Antibiotics in the aquatic environment-a review--part I. **Chemosphere** v. 75, n.4, p. 417-34, 2009.

LEEB, M.; Antibiotics: a shot in the arm. **Nature**, v. 431, p. 892-893. 2004

LI, Y.; ZHANG, J.; ZHU, G.; LIU, Y.; WU, B.; NG, W. J.; APPAN, A.; TAN, S. K. Phytoextraction, phytotransformation and rhizodegradation of ibuprofen associated with *Typha angustifolia* in a horizontal subsurface flow constructed wetland. **Water Research**, v. 102, p. 294-304, 2016.

LI, L.; IQBAL, J.; LI, H.; ZHANG, Y.; SUN, L.; ZHU, Y.; CHEN, W.; XI, Y.; WU, T.; DU, Y. On-chip solid phase extraction and in situ optical detection. **Talanta**, v. 197, p. 299–303, 2019.

LINDBERG, R. H.; ÖSTMAN, M.; OLOFSSON, U.; GRABIC, R.; FICK, J. Occurrence and behaviour of 105 active pharmaceuticals ingredients in sewage waters of a municipal sewer collection system. **Water research**, v. 58, p. 221-229, 2014.

LIU, D.; WU, S.; XU, H.; ZHANG, Q.; ZHANG, S.; SHI, L.; YAO, C.; LIU, Y, CHENG, J. Distribution and bioaccumulation of endocrine disrupting chemicals in water, sediment and fishes in a shallow Chinese freshwater lake: implications for ecological and human health risks. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 140, p. 222-229, 2017.

LIU, J. L.; WONG, M. H. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): a review on environmental contamination in China. **Environment International**, v. 59, p. 208–224, 2013.

LIU, J.; SUN, Q.; ZHANG, C.; LI, H.; SONG, W.; ZHANG, N.; JIA, X.; Removal of typical antibiotics in the advanced treatment process of productive drinking water. **Desalination and Water Treatment**, v. 57, p. 11386-11391, 2016.

LIU, X.; ZHANG, G.; LIU, Y.; LU, S.; QIN, P.; GUO, X.; BI, B.; WANG, L.; XI, B.; WU, F.; WANG, W.; ZHANG, T. Occurrence and fate of antibiotics and antibiotic resistance genes in typical urban water of Beijing, China. **Environmental Pollution**, v. 246, p. 163-173, 2019.

LUTTERBECK, C. A.; KIST, L. T.; LOPEZ, D. R.; ZERWES, F. V.; MACHADO, Ê. L. Life cycle assessment of integrated wastewater treatment systems with constructed wetlands in rural areas. **Journal of Cleaner Production**. v. 148, p. 527-536, 2017.

MACHADO, A. I.; BERETTA M.; FRAGOSO R.; DUARTE E. Overview of the state of the art of constructed wetlands for decentralized wastewater management in Brazil. **Journal of Environmental Management**, v. 187, p. 560–570, 2016.

MACHADO, Ê. L.; LOURENÇO, A. M.; KIST, L. T.; SCHNEIDER, R. C. S.; KERN, D.; LOBO, E. A. A.; LUTTERBECK, C. A.; SILVEIRA, D. D.; HORN, T. B.; ZERWES, F. V. Constructed Wetlands Integrated with Advanced Oxidation Processes in Wastewater Treatment for Reuse. **The Handbook of Environmental Chemistry**. 1ed.: Springer International Publishing, 2015, v. 45, p. 197-222.

MACKULAK, T.; ČERNANSKÝ, S.; FEHÉR, M.; BIROŠOVA, L.; GÁL, M. Pharmaceuticals, drugs, and resistant microorganisms — environmental impact on population health. **Current Opinion in Environmental Science & Health**. v. 9. p. 40-48. 2019.

MILAKOVIĆ, M.; VESTERGAARD, G.; GONZÁLEZ-PLAZA, J. J.; PETRIĆ, I.; KOSIĆ-VUKŠIĆ, J.; SENTA, I.; KUBLIK, S.; SHLOTTER, M.; UDIKOVIĆ-KOLIĆ, N. Effects of industrial effluents containing moderate levels of antibiotic mixtures on the abundance of antibiotic resistance genes and bacterial community composition in exposed creek sediments. **Science of the Total Environment**. v. 706, p. 1-9. 2020.

MULLEN, R. A.; WIGGINTON, K. R.; NOE-HAYS, A.; NACE, K.; LOVE, N. G.; BOTT, C. B.; AGA, D. S. Optimizing extraction and analysis of pharmaceuticals in human urine, struvite, food crops, soil, and lysimeter water by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 9, p. 5952-5962, 2017.

OPRIŞ, O.; SORAN, M. L.; LUNG, I.; TRUŞCĂ, M. R. C.; SZOKE-NAGY, T.; COMAN, C. The optimization of the antibiotics extraction from wastewaters and manure using Box–Behnken experimental design. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 14, p. 473-480, 2017.

PAÍGA, P.; SANTOS, L. H. M. L. M.; DELERUE-MATOS, C. Development of a multi-residue method for the determination of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in aqueous environmental matrices by SPE-UHPLC–MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 135, p. 75-86, 2017.

PAPAGEORGIU, M.; ZIORIS, I.; DANIS, T.; BIKIARIS, D.; LAMBROPOULOU, D. Comprehensive investigation of a wide range of pharmaceuticals and personal care products in urban and hospital wastewaters in Greece. **Science of The Total Environment**, v. 694, p. 133565, 2019.

PARK, J.; CHO, K. H.; LEE, E.; LEE, S.; CHO, J. Sorption of pharmaceuticals to soil organic matter in a constructed wetland by electrostatic interaction. **Science of the Total Environment**, v. 635, p. 1345-1350, 2018.

PAROLINI, M. Toxicity of the non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) acetylsalicylic acid, paracetamol, diclofenac, ibuprofen and naproxen towards freshwater invertebrates: a review. **Science of the Total Environmental**, v. 740, n. 140043, p. 1-15, 2020.

PENG, Y.; GAUTAM, L.; HALL, S. W. The detection of drugs of abuse and pharmaceuticals in drinking water using solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 223, p. 438-447, 2019.

PETRIE, B.; YOUDAN, J.; BARDEN, R.; KASPRZYK-HORDERN, B. Multi-residue analysis of 90 emerging contaminants in liquid and solid environmental matrices by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1431, p. 64-78, 2016.

PHENOMENEX. 4 Simple steps to cleaner samples. Solid Phase Extraction (SPE) Method Development Guide. 2015. Disponível em: [http://www.bvr.by/kscms/uploads/editor/file/tverdofaznaya\\_ekstrakciya.pdf](http://www.bvr.by/kscms/uploads/editor/file/tverdofaznaya_ekstrakciya.pdf). Acesso em: 02 dez.19.

PŁOTKA-WASYLKA, J.; SZCZEPAŃSKA, N.; DE LA GUARDIA, M.; NAMIEŚNIK, J. Modern trends in solid phase extraction: new sorbent media. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 77, p. 23-43, 2016.

POMIÈS, M.; CHOUBERT, J. M.; WISNIEWSKI, C.; MIÈGE, C.; BUDZINSKI, H.; COQUERY, M. Lab-scale experimental strategy for determining micropollutant partition coefficient and biodegradation constants in activated sludge. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 6, p. 4383–4395, 2015.

PRIETO-SANTIAGO, V.; CAVIA, M. M.; BARBA, F. J.; ALONSO-TORRE, S. R.; CARILLO, C. Multiple reaction monitoring for identification and quantification of oligosaccharides in legumes using a triple quadrupole mass spectrometer. **Food Chemistry**, v. 368, n. 130761, p. 1-10, 2022.

PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; ESCARRONE, A. L. V. Multi-residue analytical methods for the determination of pesticides and PPCPs in water by LC-MS/MS: a review. **Central European Journal of Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 876-899, 2012.

PUGAJEVA, I.; RUSKO, J.; PERKONS, I.; LUNDANES, E.; BERTKEVICS, V. Determination of pharmaceutical residues in wastewater using high performance liquid chromatography coupled to quadrupole-Orbitrap mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 133, p. 64-74, 2017.

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.

RIZZETI, T. M.; SOUZA, M. P.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Optimization of sample preparation by central composite design for multi-class determination of veterinary drugs in bovine muscle, kidney and liver by ultra-high-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 246, p. 404-413, 2018.

SANTE, EUROPEAN COMMISSION. Guidance document in analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. **Document n° SANTE/12682/2019**. 01 jan. 2020.

SHRAIM, A.; DIAB, A.; ALSUHAIMI, A.; NIAZY, E.; METWALLY, M.; AMAD, M.; SIOUD, S.; DAWOUD, A. Analysis of some pharmaceuticals in municipal wastewater of Almadinah Almunawarah. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. 719-729, 2017.

SCHWAIGER, J.; FERLING, H.; MALLOW, U.; WINTERMAYR, H.; NEGEL, R. D. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. **Aquatic Toxicology**, v. 68, p. 141-150, 2004.

SERI (Samsung Economic Research Institute). **Active pharmaceutical ingredients in China**; 2012.

SGROI, M.; PELISSARI, C.; ROCCARO, P.; SEZERINO, P. H.; GARCÍA, J.; VAGLIASINDI, F. G. A.; ÁVILA, C. Removal of organic carbon, nitrogen, emerging contaminants and fluorescing organic matter in different constructed wetland configurations. **Chemical Engineering Journal**, v. 332, p. 619-627, 2018.

SILVA, R. O.; MENEZES, G. G. M.; CASTRO, R. C.; NOBRE, C. A.; MILHOME, M. A. L.; NASCIMENTO, R. F. Efficiency of ESI and APCI ionization sources in LC-MS/MS systems for analysis of 22 pesticide residues in food matrix. **Food Chemistry**, v. 297, n. 124934, p. 1-7, 2019.

SONG, H-L.; ZHANG, S.; GUO, J.; YANG, Y-L.; ZHANG, L-M.; LI, H.; YANG, X-L.; LIU, X. Vertical up-flow constructed wetlands exhibited efficient antibiotic removal but induced antibiotic resistance genes in effluent. **Chemosphere**, v. 203, p. 434-441, 2018.

SUBEDI, B.; BALAKRISHNA, K.; JOSHUA, D. I.; KANNAN, K. Mass loading and removal of pharmaceuticals and personal care products including psychoactives, antihypertensives, and antibiotics in two sewage treatment plants in southern India. **Chemosphere**, v. 167, p. 429-437, 2017.

SUN, X.; WANG, M.; PENG, J.; YANG, L.; WANG, X.; WANG, F.; ZHANG, X.; WU, Q.; CHEN, R.; CHENG, J. Dummy molecularly imprinted solid phase extraction of climbazole from environmental water samples. **Talanta**, v. 196, p. 47-53, 2019.

ŠIMATOVIĆ, A.; UDIKOVIĆ-KOLIĆ, N. Antibiotic resistance in pharmaceutical industry effluents and effluent-impacted environments. **The Handbook of Environmental Chemistry**. v. p. 1-22. 2019.



SZEKERES, E.; BARICZ, A.; CHIRIAC, C. M.; FARKAS, A.; OPRIS, O.; SORAN M-L.; ANDREI, A-S.; RUDI, K.; BALCÁZAR, J. L.; DRAGOS, N.; COMAN, C. Abundance of antibiotics, antibiotic resistance genes and bacterial community composition in wastewater effluents from different Romanian hospitals. **Environmental Pollution**, v. 225, p. 304–315, 2017.

TERNES, T. A.; BONERZ, M.; HERRMANN, N.; TEISER, B.; ANDERSEN, H. R. Irrigation of treated wastewater in Braunschweig, Germany: an option to remove pharmaceuticals and musk fragrances. **Chemosphere**, v. 66, p. 894–904, 2007.

TRAN, N. H.; HU, J.; ONG, S. L. Simultaneous determination of PPCPs, EDCs, and artificial sweeteners in environmental water samples using a single-step SPE coupled with HPLC–MS/MS and isotope dilution. **Talanta**, v. 113, p. 82-92, 2013.

VERLICCHI, P.; AI AUKIDY, M.; ZAMBELLO, E. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review. **Science of the Total Environment**, v. 429, p. 123-155, 2012.

VERLICCHI, P.; ZAMBELLO, E. How efficient are constructed wetlands in removing pharmaceuticals from untreated and treated urban wastewaters? A review. **Science of the Total Environment**, v. 470-471, p. 1281-1306, 2014.

VON SPERLING, M. **Princípio do tratamento biológico de águas residuárias – introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. Belo Horizonte: DESA, v. 1, 2005.

VYMAZAL, J. Constructed Wetlands for Wastewater Treatment. **Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences**. 2018.

VYMAZAL, J.; BREZINOVA, T. D.; KOZELUH, M.; KULE, L. Occurrence and removal of pharmaceuticals in four full-scale constructed wetlands in the Czech Republic – the first year of monitoring. **Ecological Engineering**, v. 98, p. 354-364, 2017.

YAN, Q.; GAO X.; HUANG, L.; GAN, X-M.; ZHANG, Y-X.; CHEN, Y-P.; PENG, X-Y.; GUO, J-S. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the largest municipal wastewater treatment plant in Southwest China: Mass balance analysis and consumption back-calculated model. **Chemosphere**, v. 99, p. 160-170, 2014.

YAN, Q.; FENG, G.; SUN, C.; GUO, J-S.; ZHU, Z. Removal of pharmaceutically active compounds (PhACs) and toxicological response of *Cyperus alternifolius* exposed to PhACs in microcosm constructed wetlands. **Journal of Hazardous materials**, n. 301, p. 566-575, 2016.

YAN, M.; XU, C.; HUANG, Y.; NIE, H.; WANG, J. Tetracyclines, sulfonamides and quinolones and their corresponding resistance genes in the Three Gorges Reservoir, China. **Science of The Total Environment**, v. 631-632, p. 840-848, 2018.

YANG, Y.; OK, Y. S.; KIM, K-H.; KWON, E. E.; TSANG, Y. F. Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: a review. **Science of the Total Environment**, n. 596–597, p. 303–320, 2017.

YUAN, H-L.; ZHAO, Y-L.; QIN, X-J.; LIU, Y-P.; YU, H-F.; ZHU, P-F.; JIN, Q.; YANG, X-W.; LUO, X-D. Anti-inflammatory and analgesic activities of *Neolamarckia cadamba* and its bioactive monoterpenoid indole alkaloids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 260, p. 1-10, 2020.

XU, Y.; RADJENOVIC, J.; YUAN, Z.; NI, B-J. Biodegradation of atenolol by an enriched nitrifying sludge: Products and pathways. **Chemical Engineering Journal**, v. 312, 2017, p. 351-359.

WANG, M.; ZHANG, D. G.; DONG, J. W.; TAN, S. K. Constructed wetlands for wastewater treatment in cold climate – A review. **Journal of Environmental Sciences**, v. 57, p. 293-311, 2017.

WANG, Y.; YIN, T.; KELLY, B. C.; GIN, K. Y-H. Bioaccumulation behaviour of pharmaceuticals and personal care products in a constructed wetland. **Chemosphere**, v. 222, p. 275-285, 2019.

WOLKOWICZ, I. H.; SVARTZ, G. V.; ARONZON, C. M.; COLL, C. P. Developmental toxicity of bisphenol A diglycidyl ether (Epoxide Resin BADGE) during the early life cycle of a native amphibian species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, p. 3031-3038, 2016.

ZHANG, C., FENG, Y., LIU, Y., CHANG, H., LI, Z., XUE, J. Uptake and translocation of organic pollutants in plants: a review. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 16, p. 1659–1668, 2017.

ZHANG, D.; LUA, J.; LEE, Z. M. P.; MASPOLIM, Y.; GERSBERG, R. M.; LIU, Y.; TAN, S. K.; NG, W. J. Characterization of bacterial communities in wetland mesocosms receiving pharmaceutical-enriched wastewater. **Ecological Engineering**, v. 90, p. 215-224, 2016.

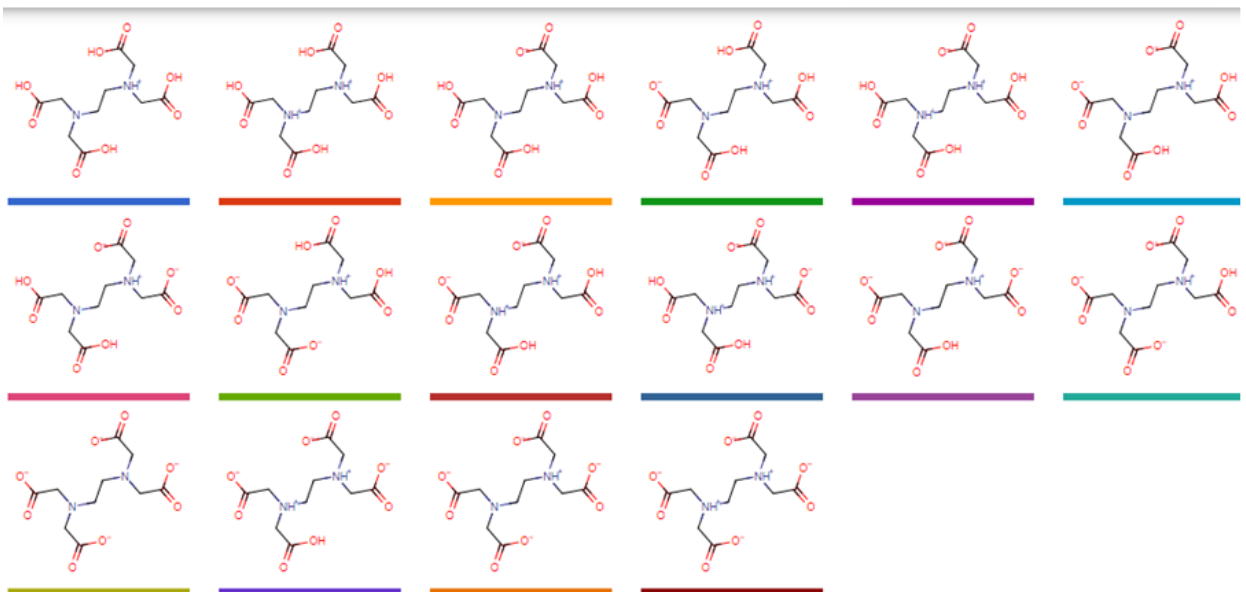
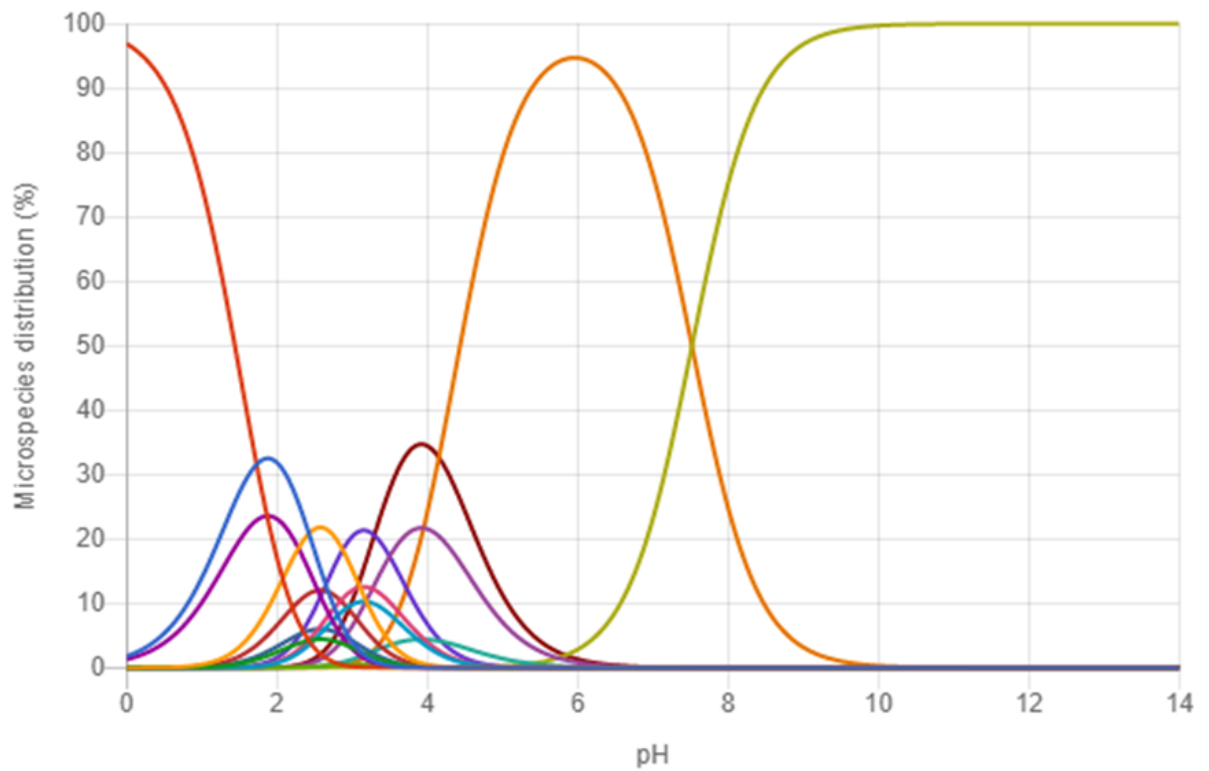
ZHANG, D. Q.; GERSBERG, R. M.; ZHU, J.; HUA, T.; JINADASA. K. B. S. N.; TAN, S. K. Batch versus continuous feeding strategies for pharmaceutical removal by subsurface flow constructed wetland. **Environmental Pollution**, v. 167, p. 124-131, 2012.

ZHANG, D. Q.; HUA, T.; GERSBERG, R. M.; ZHU, J.; NG, W. J.; TAN, S. K. Carbamazepine and naproxen: Fate in wetland mesocosms planted with *Scirpus validus*. **Chemosphere**, v. 91, p. 14-21, 2013.

ZHANG, X.; JING, R.; FENG, X.; DAI, Y.; TAO, R.; VYMAZAL, J.; CAI, N.; YANG, Y. Removal of acidic pharmaceuticals by small-scale constructed wetlands using different design configuration. **Science of the Total Environment**, v. 639, p. 640-647, 2018.

ZHANG, Y.; DUAN, L.; WANG, B.; LIU, C. S.; JIA, Y.; ZHAI, N.; BLANEY, L.; YU, G. Efficient multiresidue determination method for 168 pharmaceuticals and metabolites: Optimization and application to raw wastewater, wastewater effluent, and surface water in Beijing, China. **Environmental Pollution**, v. 261, p. 114113, 2020.

## ANEXO A – Distribuição das espécies de EDTA formadas de acordo com o pH do meio.



Fonte: chemicalize.com