



**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE**  
**PROCESSOS E TECNOLOGIAS**

ANÁLISE DOS FÁRMACOS ENALAPRIL, METFORMINA,  
PARACETAMOL, TETRACICLINA E SEUS PRODUTOS DE  
DEGRADAÇÃO POR UHPLC-MS/MS APÓS PROCESSO DE  
TRATAMENTO BIOLÓGICO ASSOCIADO A MEMBRANAS EM  
EFLUENTE HOSPITALAR

**Marilda Chiarello**

Orientador: Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Lademir Luiz Beal

Caxias do Sul, 2014

**Marilda Chiarello**

ANÁLISE DOS FÁRMACOS ENALAPRIL, METFORMINA,  
PARACETAMOL, TETRACICLINA E SEUS PRODUTOS DE  
DEGRADAÇÃO POR UHPLC-MS/MS APÓS PROCESSO DE  
TRATAMENTO BIOLÓGICO ASSOCIADO A MEMBRANAS EM  
EFLUENTE HOSPITALAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharias de Processos e Tecnologias - PGEPROTEC da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos e Tecnologias, orientada pelo Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva e co-orientada pelo Prof. Dr. Lademir Luiz Beal.

Caxias do Sul – 2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
UCS - BICE - Processamento Técnico

C532a Chiarello, Marilda, 1981-  
Análise dos fármacos enalapril, metformina, paracetamol, tetraciclina e seus produtos de degradação por UHPLC-MS/MS após processo de tratamento biológico associado a membranas em efluente hospitalar / Marilda Chiarello - 2014.  
83 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias, 2014.  
Apresenta bibliografia.  
“Orientação: Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva, coorientação: Prof. Dr. Lademir Luiz Beal”.

1. Resíduos de serviços de saúde. 2. Águas residuais – Purificação. 3. Farmacologia. I. Título.

CDU 2.ed.: 628.4.046

Índice para o catálogo sistemático:

1. Resíduos de serviços de saúde	628.4.046
2. Águas residuais – Purificação	628.3
3. Farmacologia	615.01

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária  
Carolina Meirelles Meroni – CRB 10/ 2187

"ANÁLISE DOS FÁRMACOS ENALAPRIL, METFORMINA,  
PARACETAMOL E TETRACICLINA E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO POR  
ESPECTOMETRIA DE MASSAS APÓS PROCESSO DE TRATAMENTO  
BIOLÓGICO ASSOCIADO À MEMBRANAS (MBR) EM EFLUENTES  
HOSPITAL."

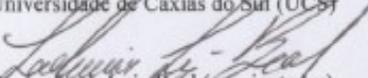
**Marilda Chiarello**

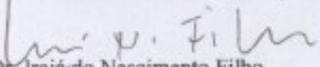
Dissertação de Mestrado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestra em Engenharia de Processos e Tecnologias, Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos e Produtos Industriais.

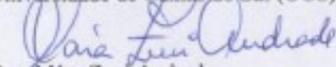
Caxias do Sul, 30 de Abril de 2014.

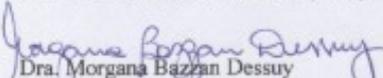
Banca Examinadora:

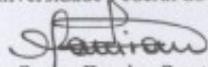
  
Dr. Sidnei Moura e Silva (orientador)  
Universidade de Caxias do Sul (UCS)

  
Dr. Lademir Luiz Beal (coorientador)  
Universidade de Caxias do Sul (UCS)

  
Dr. Irajá do Nascimento Filho  
Universidade de Caxias do Sul (UCS)

  
Dra. Mára Zeni Andrade  
Universidade de Caxias do Sul (UCS)

  
Dra. Morgana Bazzan Dessuy  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

  
Dr. Osmar Damian Prestes  
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

*“Se as coisas são inatingíveis... ora!  
Não é motivo para não querê-las...  
Que tristes os caminhos, se não fora  
A presença distante das estrelas!”*

*Mário Quintana*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por sempre ter me iluminado, por estar guiando meus passos, me dando forças em toda e qualquer caminhada.

À meu orientador professor Dr. Sidnei Moura e Silva, ao co-orientador prof. Dr. Lademir Luiz Beal pela oportunidade e acolhida em seus laboratórios, pelos conhecimentos ensinados, pela amizade e pela confiança que me foi depositada. Aos senhores, meus sinceros agradecimentos.

À Dra Luciane Minetto, pelo auxílio prestado nas atividades, pela atenção, pelo conhecimento transmitido, pela amizade, dedicação e disponibilidade.

Ao Dr. Saulo Della Giustina, pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho, pela dedicação e conhecimento compartilhado.

Aos meus queridos pais Graciano e Ilda pela vida, amor, carinho, apoio, orações, paciência e compreensão nas horas difíceis. Obrigada pelos ensinamentos, por sempre acreditarem em mim e terem me incentivado na busca dos meus objetivos. Eis aqui os meus eternos agradecimentos por tudo o que vocês fizeram e fazem por mim.

Ao meu noivo Márcio pelo companheirismo, amor, apoio e compreensão em todos os momentos. Principalmente pelo incentivo, por acreditar nos meus sonhos, me ajudando nas mais diversas ocasiões. A você, a minha gratidão.

Ao meus irmãos, cunhadas, sobrinhos e sobrinhas, pelo apoio, compreensão, incentivo e momentos de alegria proporcionados.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias e aos de outros programas por terem contribuído para a minha formação.

Em especial, aos amigos queridos que contribuíram diretamente para a realização deste trabalho: LBIOP e LATAM. Obrigada por todos os dias de dedicação, pelo auxílio, amizade, companheirismo e compreensão nos momentos difíceis. É uma grande realização poder contar com o empenho e carinho de vocês.

A todos os amigos que presentes ou distantes contribuíram com seu apoio.

A CAPES pela bolsa de estudos concedida.

À Universidade de Caxias do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias pela possibilidade de realização deste curso.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que me incentivaram e de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

# Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>19</b>
3.1	RESÍDUOS DE FÁRMACOS NO AMBIENTE.....	19
3.2	EFEITOS NOCIVOS DE RESÍDUOS DE FÁRMACOS EM ÁGUAS RESIDUAIS .....	23
3.3	CLASSES DE FÁRMACOS .....	26
3.3.1	TETRACICLINA .....	26
3.3.2	PARACETAMOL .....	29
3.3.3	ENALAPRIL.....	31
3.3.1	METFORMINA.....	33
3.4	MÉTODOS DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE FÁRMACOS EM EFLUENTES .....	34
3.4.1	MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS EM MATRIZES AMBIENTAIS .....	34
3.5	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS .....	38
3.6	RISCO E TOXICIDADE DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS NO MEIO AMBIENTE .....	39
3.7	ALGUNS TRATAMENTOS APLICADOS A DEGRADAÇÃO DE FÁRMACOS EM EFLUENTES.....	40
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>42</b>
4.1	MATERIAIS.....	42
4.1.1	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	42
4.1.2	EQUIPAMENTOS.....	42
4.2	MÉTODOS.....	43
4.2.1	ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	43
4.2.2	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA .....	43
4.2.3	CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	43
4.2.4	DETERMINAÇÃO DOS LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO .....	44
4.2.5	PREPARO DE AMOSTRA.....	44
4.2.6	EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE-SOLID PHASE EXTRACTION).....	44
4.2.7	MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO POR MICROTOF-QII .....	45
4.2.8	DESCRIÇÃO DO SISTEMA DE TRATAMENTO DE EFLUENTE SIMULADO EM ESCALA LABORATORIAL .....	46
4.2.9	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS .....	47
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
5.1	OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS.....	48
5.2	DETERMINAÇÃO DE ENA, MET, PAR E TC POR UHPLC-MS/MS.....	49
5.3	PREPARO DA AMOSTRA .....	53
5.3.1	TESTES DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM CARTUCHOS SPE STRATA™ X .....	53

5.3.2	EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA .....	54
5.3.3	FILTRAÇÃO DOS FÁRMACOS EM ESTUDO .....	55
5.4	EFLUENTE HOSPITALAR E LEGISLAÇÃO .....	56
5.5	AVALIAÇÃO DOS RISCOS ECOTOXICOLÓGICOS .....	57
5.6	PROCESSO COM CHOQUES DE FÁRMACOS .....	59
5.7	FRAGMENTAÇÃO DOS FÁRMACOS EM ESTUDO.....	62
5.8	PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO .....	65
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>SUGESTÕES.....</b>	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>69</b>
	<b>ANEXO 1 ANÁLISE DE METFORMINA (MET) EM CONCENTRAÇÕES DE CHOQUES DE FÁRMACOS E OS VALORES OBTIDOS.....</b>	<b>80</b>
	<b>ANEXO 2 ANÁLISE DE ENALAPRIL (ENA) EM CONCENTRAÇÕES DE CHOQUES DE FÁRMACOS E OS VALORES OBTIDOS .....</b>	<b>81</b>
	<b>ANEXO 3 ANÁLISE DE PARACETAMOL (PAR) EM CONCENTRAÇÕES DE CHOQUES DE FÁRMACOS E OS VALORES OBTIDOS.....</b>	<b>82</b>
	<b>ANEXO 4 ANÁLISE DE TETRACICLINA (TC) EM CONCENTRAÇÕES DE CHOQUES DE FÁRMACOS E OS VALORES OBTIDOS.....</b>	<b>83</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - FÁRMACOS DETECTADOS EM EFLUENTES .....	20
TABELA 2 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E NÚMERO DE CAS DA TETRACICLINA .....	27
TABELA 3 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E NÚMERO DE CAS DO PARACETAMOL .....	30
TABELA 4 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E NÚMERO DE CAS DO ENALAPRIL .....	32
TABELA 5 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E NÚMERO DE CAS DA METFORMINA.....	33
TABELA 6 - TÉCNICAS PARA QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS EM MATRIZES AMBIENTAIS .....	38
TABELA 7 - PARÂMETROS OTIMIZADOS PARA ESPETROMETRÔMETRO DE MASSAS DEPENDENTES DO ANALITO .....	49
TABELA 8 - CONDIÇÕES DA FONTE DE IONIZAÇÃO PARA OS FÁRMACOS EM ESTUDO .....	49
TABELA 9 - GRADIENTE DA FASE MÓVEL UTILIZADA .....	50
TABELA 10 - COEFICIENTES DE DETERMINAÇÃO ( $R^2$ ) DAS CURVAS ANALÍTICAS (MATRIZ), LIMITE DE DETECÇÃO INSTRUMENTAL ( $LOD_i$ ), LIMITE DE DETECÇÃO DO MÉTODO ( $LOD_m$ ) E LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO INSTRUMENTAL ( $LOQ_i$ ) E DO MÉTODO ( $LOQ_m$ ) DOS FÁRMACOS EM ESTUDO, EM EFLUENTE HOSPITALAR ...	50
TABELA 11 - DADOS DO PERCENTUAL DE FILTRAÇÃO DOS FÁRMACOS COM MEMBRANA DE NYLON E PVDF.....	55
TABELA 12 - COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS DO MONITORAMENTO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DAS AMOSTRAS DE EFLUENTE HOSPITALAR BRUTO E TRATADO, CONFORME OS LIMITES MÁXIMOS ESTABELECIDOS PELO CONSEMA 128/2006 E CONAMA 430/2011 .....	57
TABELA 13 - CONCENTRAÇÃO AMBIENTAL MEDIDA (MEC) E O QUOCIENTE DE RISCO (QR) DOS FÁRMACOS EM ESTUDO.....	58
TABELA 14 - POSSÍVEIS FRAGMENTAÇÕES DE CADA FÁRMACO, RAZÃO ISOTÓPICA E DIFERENÇA EM PPM.....	65

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	FLUXO DE MEDICAMENTOS NO AMBIENTE .....	22
FIGURA 2-	INTERAÇÕES DE FÁRMACOS E METABÓLITOS EM EFLUENTES.....	25
FIGURA 3-	ESTRUTURA QUÍMICA DA TETRACICLINA .....	26
FIGURA 4-	DEGRADAÇÃO DA TETRACICLINA POR OZÔNIO EM SOLUÇÃO AQUOSA.....	28
FIGURA 5-	ESTRUTURA QUÍMICA DO PARACETAMOL .....	29
FIGURA 6-	ESTRUTURA QUÍMICA DO ENALAPRIL .....	31
FIGURA 7-	ESTRUTURA QUÍMICA DA METFORMINA .....	33
FIGURA 8-	EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA CONCENTRAÇÃO DE AMOSTRAS .....	35
FIGURA 9-	PRINCÍPIO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE AMOSTRAS POR SPE.....	36
FIGURA 10-	SISTEMA DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS APLICADA A AMOSTRAS AMBIENTAIS.....	39
FIGURA 11-	IMAGEM FOTOGRÁFICA DO SISTEMA EXPERIMENTAL MBR.....	47
FIGURA 12-	CROMATOGRAMA DOS QUATRO ANALITOS OBTIDOS POR UHPLC-MS/MS. (1)METFORMINA, (2) PARACETAMOL, (3)TETRACICLINA E (4) ENALAPRIL. NA CONCENTRAÇÃO DE 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ PREPARADA COM ÁGUA ULTRAPURA.....	52
FIGURA 13-	CROMATOGRAMA COM ÍONS EXTRAÍDOS DOS FÁRMACOS EM ESTUDO. (1) ENALAPRIL, (2) TETRACICLINA, (3) METFORMINA E (4) PARACETAMOL. NA CONCENTRAÇÃO DE 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ PREPARADA COM ÁGUA ULTRAPURA .....	52
FIGURA 14-	PONTOS DE AMOSTRAGEM DO PROCESSO COM MBR EM EFLUENTE HOSPITALAR .....	59
FIGURA 15-	PERCENTUAL MÉDIO DE REMOÇÃO DOS FÁRMACOS EM ESTUDO, APÓS CHOQUE LONGO ...	60
FIGURA 16-	PERCENTUAL MÉDIO DE REMOÇÃO DOS FÁRMACOS EM ESTUDO, APÓS CHOQUE CURTO...	60
FIGURA 17-	ESPECTRO DE ENALAPRIL COM SUAS POSSÍVEIS FRAGMENTAÇÕES.....	62
FIGURA 18-	ESPECTRO DE METFORMINA COM SUAS POSSÍVEIS FRAGMENTAÇÕES .....	63
FIGURA 19-	ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÕES DO PARACETAMOL .....	63
FIGURA 20-	ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÕES DA TETRACICLINA .....	64
FIGURA 21-	ESPECTRO DE MASSA MS DA TETRACICLINA EM EFLUENTE HOSPITALAR.....	66
FIGURA 22-	ESPECTRO DE MASSA MS <sup>2</sup> DA TETRACICLINA EM EFLUENTE HOSPITALAR .....	66

## SIGLAS, TERMOS E ABREVIACOES

ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
APCI	- Ionizao química a pressão atmosférica, do inglês <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> ;
CAS	- Do inglês <i>Chemical Abstracts Service</i>
CID	- Dissociao Induzida por Colisão, do inglês <i>Collision Induced Dissociation</i> ;
CONAMA	- Conselho Nacional do meio ambiente;
EMEA	- Agência Europeia de Avaliao de Medicamentos (EMEA, do inglês <i>European Medicines Evaluation Agency</i> );
ENA	- Enalapril;
ESI:	- Ionizao por eletronebulizao, do inglês <i>Electrospray Ionization</i> ;
ETE	- Estaao de tratamento de Efluentes;
GC-MS/MS	- Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas em série; do inglês <i>Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i> ;
HILIC	- Cromatografia de interao hidrofílica, do inglês <i>Hydrophilic interaction chromatography</i> ;
HPLC	- Cromatografia líquida de alta eficiência;
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística ;
LC MS/MS	- Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em série, do inglês <i>Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry</i> ;
LOD	- Limite de Deteco, do inglês <i>Limit of Detection</i> ;
log K <sub>ow</sub>	- Coeficiente de Partiao Octanol-gua;
LOQ	- Limite de Quantificao, do inglês <i>Limit of Quantification</i> ;
m/z	- Relao massa/carga;
MBR	- Biorreator de membranas, do inglês <i>Membrane Bio Reactor</i> ;
MEC	- Concentrao Ambiental Mensurada, do inglês <i>Measured</i>

*Environment Concentration;*

MET	- Metformina;
MF	- Membrana de Microfiltração;
ND:	- Não detectado;
PAR	- Paracetamol;
P <sub>C</sub>	- Choque de fármaco em processo de tratamento de efluente denominado choque curto;
PD:	- Produtos de Degradação;
pKa	- Constante de Acidez;
P <sub>L</sub>	- Choque de fármaco em processo de tratamento de efluente denominado choque longo
PNEC	- Concentração Predita que Não Causa Efeito, do inglês <i>Predict No-Effect Environment Concentration</i>
PEC	- Concentração ambiental predita, do inglês <i>Predicted environmental concentrations;</i>
PVDF	- Fluoreto de poli (vinilideno);
QR	- Quociente de Risco;
R <sup>2</sup>	- Coeficiente de Regressão;
RDC	- Resolução da Diretoria Colegiada;
SBR	- Reator em batelada sequencial, do inglês <i>sequencing batch reactor;</i>
SNGPC	- Sistema nacional de produtos controlados;
SOP	- Síndrome dos ovários policísticos;
SPE	- Extração em Fase Sólida, do inglês <i>Solid Phase Extraction;</i>
TC	- Tetraciclina;
u	- Unidade de massa atômica
UHPLC-QqLIT	- Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas tipo quadrupolo linear, do inglês <i>Ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole linear ion trap tandem mass spectrometry;</i>
UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- Ultravioleta/Peróxido de hidrogênio.

## RESUMO

Efluentes hospitalares apresentam, dentre outras características, a presença de fármacos e seus possíveis produtos de degradação, bem como uma concentração elevada de microrganismos. Atualmente, órgãos ambientais tem se preocupado com o destino e a presença de fármacos em águas residuais, mesmo não tendo uma política clara de monitoramento e lançamento destes compostos.

Neste trabalho foi estudada a presença de alguns fármacos comumente utilizados na região da serra gaúcha, realizando testes de tratamento de efluente. Para a remoção dos fármacos do efluente hospitalar foi utilizado um processo de tratamento contendo um reator anóxico, um reator aeróbio e um tanque de membranas, sendo os choques realizados com os fármacos nas concentrações de  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $2000 \mu\text{g L}^{-1}$ , adicionados de maneira contínua e pulsada. Foi analisado o efluente hospitalar proveniente de hospital de categoria geral, e os analitos estudados foram enalapril (ENA), metformina (MET), paracetamol (PAR) e tetraciclina (TC).

A determinação dos fármacos foi realizada utilizando cromatografia líquida de ultra performance (UHPLC) acoplada à espectrometria de massas em série (MS/MS).

Para a determinação da concentração dos analitos, as amostras foram diluídas, e as que não foram possíveis de quantificar por diluição foi feito um método de pré-concentração com extração em fase sólida (SPE), tendo como sorvente fase polimérica reversa.

Observou-se que o processo é eficiente, removendo o fármaco com percentual médio de 99% para tetraciclina, 98% para paracetamol, 93% para enalapril, mostrou-se menos eficiente para metformina, com remoção de 50%. Com o processo de tratamento pode-se identificar a formação do metabólito/produto de degradação da tetraciclina com  $m/z$  462,29, o qual foi identificado através de MS/MS.

Resíduos de fármacos em efluentes tem chamado a atenção de pesquisadores ao redor do mundo, sendo um problema de saúde pública. Aqui descrevemos um método eficiente para a remoção dos fármacos testados, bem como métodos analíticos, sensíveis e seletivos.

Palavras-chave: fármacos; produtos de degradação, UHPLC-MS/MS e efluente hospitalar.

## ABSTRACT

The hospital effluents has, among other features, the presence of drugs and its possible degradation products, as well as, a high concentration of microorganisms. Currently, environmental agencies have been concerned with the fate and the presence of pharmaceuticals in wastewater, while not having a clear monitoring policy and release of these compounds.

In this work was studied the presence of some pharmaceuticals drugs, prescribed in the Serra Gaúcha region, in hospital effluent after treatment. To remove the drug from the hospital effluent treatment process containing an anoxic reactor, an aerobic reactor and tank membrane and shocks performed with drug concentrations of 500 mg L<sup>-1</sup>, 1000 mg L<sup>-1</sup> and 2000 mg L<sup>-1</sup> of continuous and pulsed manner from hospital effluent of general category hospital. The analytes studied were enalapril (ENA), metformin (MET), paracetamol (PAR) and tetracycline (TC).

The chemical characterization was performed through liquid chromatography ultra high performance (UHPLC) coupled with mass spectrometry (MS/MS).

To determine the concentration the samples were diluted, and those that were not possible quantify for dilution was done by a method of pre-concentration with solid phase extraction (SPE), with the sorbent polymer reverse phase.

It was observed that the process is efficient by removing the drug with mean percentage of 99% for tetracycline, 98% for paracetamol, 93% for enalapril, showed less efficient for metformin, in removing 50%. Using this treatment process it was identified the formation of metabolite/degradation product of the tetracycline with *m/z* 462.29, which was identified by MS/MS.

Residues of pharmaceuticals in wastewater have drawn the attention of researchers around the world, being a public health problem. Here we describe an efficient method for the removal of the evaluated drugs, as well as, sensitive and selective analytical methods.

**Key-words:** drugs, degradation products, UHPLC-MS/MS and hospital effluent.

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos séculos, o crescimento demográfico e a expansão industrial trouxeram como consequência quadros de contaminação atmosférica, do solo e dos recursos hídricos em todo o mundo. Por outro lado, tem havido uma maior conscientização quanto à deterioração do ambiente e a necessidade de se reverter ou minimizar este processo. Neste caminho, questões relacionadas à qualidade das águas têm sido discutidas, tendo em vista que este é um recurso natural imprescindível às atividades humanas, onde se destacam, entre outras, o abastecimento público e industrial, a irrigação agrícola, a produção de energia elétrica, atividades de lazer e recreação e a preservação da vida aquática (CETESB, 2014). Assim, diante dessa conjuntura, temas como reuso, minimização e tratamento de resíduos vêm ganhando cada vez mais importância.

Desde a década de 70, começou-se a enfatizar a preocupação com a presença de fármacos em ambientes aquáticos (GARRISON *et al.* 1976; HIGNITE & AZARNOFF, 1977). Diversos estudos revelam a presença de resíduos de fármacos em ambientes aquáticos em várias partes do mundo (SCHEURER *et al.*, 2012; YERGEAU *et al.*, 2012). A principal rota de aporte deste tipo de contaminante em águas superficiais é o lançamento do esgoto *in natura*, visto que em muitas localidades há um grande déficit de infraestrutura em saneamento (IBGE, 2000).

Outra fonte importante é o lançamento de efluentes de estações de tratamento de efluente hospitalar, uma vez que os fármacos são utilizados em grande proporção e são resistentes aos processos de tratamento utilizados (MOHAMMED *et al.*, 2013; SHARMA *et al.*, 2013; STALDER *et al.*, 2013). No entanto, a preocupação a respeito de tratamento de efluentes no Brasil ainda está focada em tratamento de esgotos domésticos que é deficitário. A contaminação aquática por medicamentos merece atenção especial, uma vez que os reais riscos à saúde humana e ao ambiente aquático ainda são totalmente desconhecidos. A preocupação quanto à preservação dos ecossistemas aquáticos e ao risco potencial de contaminação da água de abastecimento público tem incentivado estudos que objetivam identificar e quantificar esses resíduos para que se possa minimizar o descarte e desenvolver processos eficientes para removê-los.

O intuito deste trabalho foi analisar princípios ativos de fármacos amplamente utilizados pela população, como enalapril, metformina, paracetamol e tetraciclina em efluente de origem hospitalar. Para remoção destes resíduos em efluente hospitalar foram feitos testes via sistema microbiológico composto de reator anóxico, seguido de um reator aeróbio associado à membranas. A adição de fármacos foi realizada de forma pulsada e contínua. Para complementar os estudos, possíveis metabólitos e/ou produtos de degradação formados no decorrer do processo testado foram avaliados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

## **2. OBJETIVOS:**

### **2.1 - OBJETIVO GERAL**

Analisar de forma qualitativa e quantitativa os fármacos enalapril, metformina, paracetamol e tetraciclina, e os respectivos produtos de degradação e/ou metabólitos em efluente hospitalar após processo de tratamento biológico associado a membranas (MBR).

### **2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a eficiência do processo, quanto à remoção dos fármacos (enalapril, metformina, paracetamol e tetraciclina) do modelo de tratamento com membranas MBR.

- Estimar a toxicidade dos fármacos em estudo pela medição da concentração dos mesmos no efluente trabalhado e relacionando com a medição que não causa efeito (MEC/PNEC).

- Desenvolver e otimizar um método analítico adequado por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas em série, desde a etapa de extração/concentração, para quantificação e identificação dos princípios ativos estudados e seus metabólitos/produtos de degradação.

- Determinar possíveis estruturas químicas dos produtos de degradação formados no processo de tratamento com efluente hospitalar.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 RESÍDUOS DE FÁRMACOS NO AMBIENTE

Dentre os poluentes orgânicos, os produtos farmacêuticos tem sido a classe que mais tem chamado a atenção de pesquisadores atualmente devido ao crescente consumo de medicamentos e as implicações ambientais que estes poluentes podem causar (BILA & DEZOTTI, 2003; PETRIELLO *et al.*, 2014). Um exemplo deste aumento no consumo de medicamentos vem da Alemanha, onde o mesmo superou 100 toneladas por ano (SILVA & COLLINS, 2011). Quando avaliados por classe, os antibióticos continuam sendo os mais utilizados, no qual o consumo anual foi estimado em 210 toneladas para China (SHAO *et al.*, 2009), 110 toneladas na Dinamarca e 35 toneladas na Suécia (HALLING-SORENSEN *et al.*, 1998). No entanto, estes números devem estar subestimados, pois nesses dados não estão inclusos medicamentos adquiridos sem receituário médico ou ilegalmente. No Brasil, somente em 2007 com a publicação da RDC nº. 27/2007, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) implantou o Sistema nacional de produtos controlados (SNGPC) para justamente inspecionar o uso de medicamentos controlados e entorpecentes. No entanto, sobre o consumo de outros medicamentos não há dados disponíveis.

Segundo Kim *et al.* (2007) os primeiros relatos sobre a presença de fármacos no ambiente foram publicados na década de 70. Em estudo realizado por Garrison *et al.* (1976) e Hignite & Azarnoff (1977) foram detectadas a presença de ácido clorídrico, metabólito dos antilipêmicos clofibrato e etofibrato, na faixa de concentração de  $\mu\text{g L}^{-1}$ , em efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE) nos Estados Unidos. A principal rota de entrada de resíduos de fármacos no ambiente é o lançamento de esgotos domésticos, tratados ou não, em cursos de água. No entanto, também devem ser considerados os efluentes das indústrias farmacêuticas, efluentes hospitalares, efluentes rurais e a disposição inadequada de fármacos após expiração do prazo de validade (HEBERER 2002a; BILA & DEZOTTI, 2003), a qual pode formar produtos de degradação. A maior parte dos fármacos que chega às ETE é proveniente de excreção metabólica após prescrição na medicina humana ou veterinária (ABHILASH 2012; WEI *et al.*, 2003). Os resíduos seguem com o esgoto bruto para as ETE onde são, na maioria dos casos, submetidos a processos convencionais de tratamento (ZUPANC *et al.*, 2013).

Fármacos de diversas classes terapêuticas, como antimicrobianos, hormônios, antilipêmicos, anti-inflamatórios, analgésicos, entre outros, têm sido detectados em rios, esgoto doméstico, águas superficiais e subterrâneas, em concentrações na faixa de  $\text{ng L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$ , em várias partes do mundo. Alguns exemplos podem ser observados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Fármacos detectados em efluentes.

<b>Fármaco (classe terapêutica)</b>	<b>Concentração média (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Matriz Referência/País</b>	<b>Referência</b>
<b>Amoxicilina (antimicrobiano)</b>	0,013	Esgoto bruto/ Itália	Castiglioni <i>et al.</i> , 2006.
<b>Atenolol (<math>\beta</math>-bloqueador)</b>	0,49	Esgoto bruto/Itália	Castiglioni <i>et al.</i> , 2006.
	0,28	Efluente de ETE/Itália	Castiglioni <i>et al.</i> , 2006.
	0,050	Água superficial/ Itália	Calamari <i>et al.</i> , 2003.
	0,30	Esgoto bruto/Suécia	Bendz <i>et al.</i> , 2005.
<b>Diclofenaco (anti-inflamatório)</b>	0,16	Esgoto bruto/Suécia	Bendz <i>et al.</i> , 2005.
	0,12	Efluente de ETE/Suécia	Bendz <i>et al.</i> , 2005.
	0,33	Efluente de ETE/França	Andreozzi <i>et al.</i> , 2003.
	0,84	Efluente de ETE/Grécia	Andreozzi <i>et al.</i> , 2003.
	2,47	Efluente de ETE/Itália	Andreozzi <i>et al.</i> , 2003.
	0,35	Esgoto bruto/Finlândia	Lindqvist <i>et al.</i> , 2005.
	0,40	Esgoto bruto/Brasil	Stumpf <i>et al.</i> , 1999.
	0,020	Água superficial/Brasil	Stumpf <i>et al.</i> , 1999.
<b>Paracetamol (analgésico, antipirético)</b>	1,78	Afluente/Espanha	Ibanez <i>et al.</i> , 2013
	0,025	Efluente hospitalar/ Portugal	Santos <i>et al.</i> , 2013
	0,18	Efluente de ETE/ Estados Unidos	Yu & Wu, 2011
<b>Enalapril (anti-hipertensivo)</b>	0,25	Afluente/Espanha	Ibanez <i>et al.</i> , 2013
	0,0022	Rios/ Espanha	López-Serna <i>et al.</i> , 2012
	0,18	Efluente hospital/ Itália	Verlicchi <i>et al.</i> , 2012

Continuação da Tabela 1. Fármacos detectados em efluentes encontrados na literatura.

<b>Metformina (hipoglicemiante)</b>	81	Efluente ETE/ Alemanha	Oosterhuis <i>et al.</i> , 2013
	0,15	Águas de rios/ EUA	Kolpin <i>et al.</i> , 2002
	1	Águas de rio/ Alemanha	Scheurer <i>et al.</i> 2012
<b>Tetraciclina (antimicrobiano)</b>	0,11	Água natural/ EUA	Kolpin <i>et al.</i> , 2002
	2,7	Água superficial/ Alemanha	Mulroy 2001
	2	Efluente de ETE/ China	Shao <i>et al.</i> , 2009

Estudos mostram que o nível de concentração dos fármacos encontrados em ambientes aquáticos está relacionado com o padrão de consumo dos mesmos pela população, taxa de remoção nas ETE, tipo de efluente que aporta nas ETE e sazonalidade (TERNES, 1998; LINDQVIST *et al.*, 2005; CASTIGLIONI *et al.*, 2006).

Neste contexto, o lançamento de resíduos de fármacos em efluente é um tema relevante para saúde pública. No Brasil, a Resolução CONAMA nº 430/11, dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementando e alterando a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, estabelece alguns parâmetros quanto a disposição do efluente no corpo receptor. Assim, o efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de ecotoxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente previsto no Art. 18 desta resolução. Entre as exigências, pode-se citar:

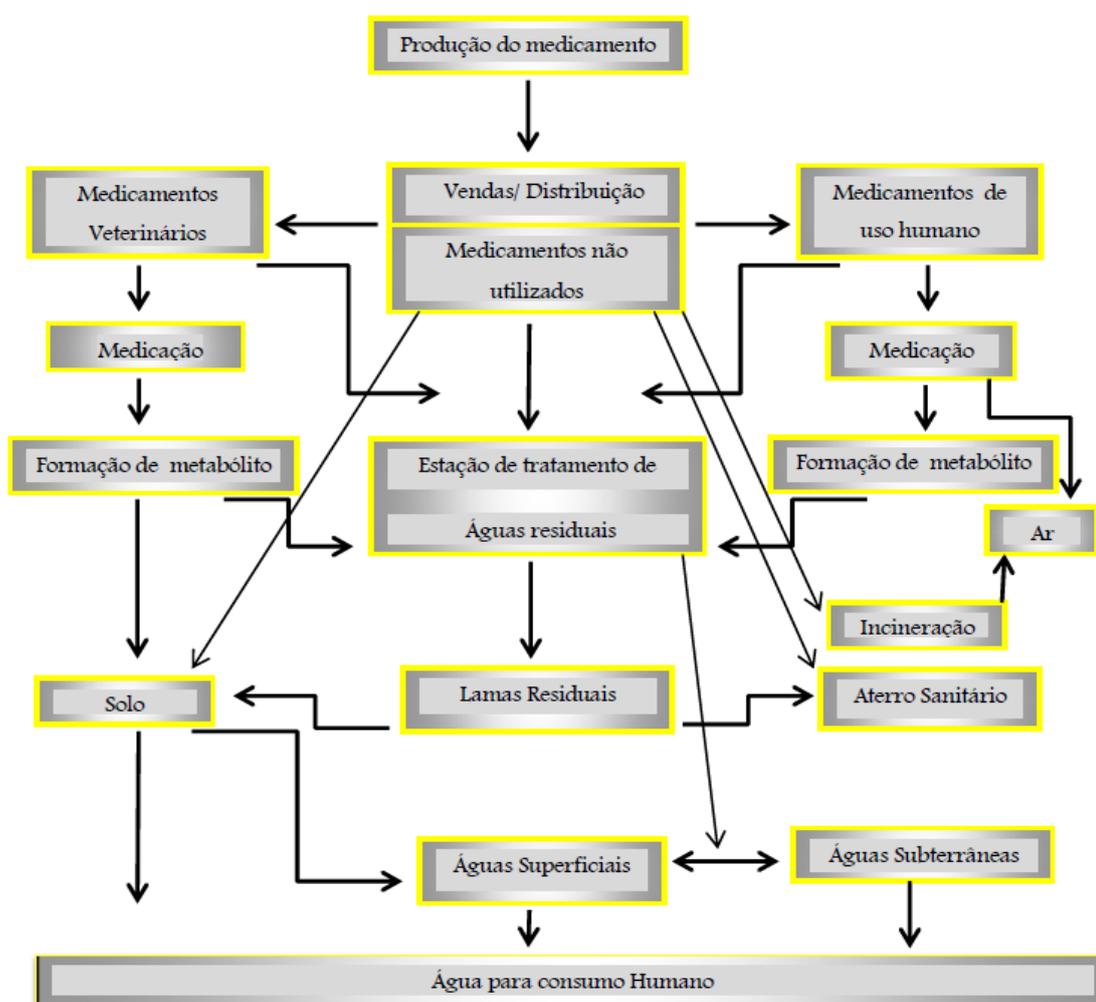
§ 1º Os critérios de ecotoxicidade previstos no *caput* deste artigo devem se basear em resultados de ensaios ecotoxicológicos aceitos pelo órgão ambiental, realizados no efluente, utilizando organismos aquáticos de pelo menos dois níveis tróficos diferentes.

§ 2º Cabe ao órgão ambiental competente a especificação das vazões de referência do efluente e do corpo receptor a serem consideradas no cálculo da Concentração do Efluente no Corpo Receptor-CECR, além dos organismos e dos métodos de ensaio a serem utilizados, bem como a frequência de eventual monitoramento.

§ 3º Na ausência de critérios de ecotoxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental para avaliar o efeito tóxico do efluente no corpo receptor, devem ser obedecidas as diretrizes correspondentes.

Assim, melhorias na área de tratamento de efluentes e a busca de novos métodos para tratamento de águas residuais têm sido realizados, como por exemplo, ozonização e osmose, buscando remover os contaminantes orgânicos eficientemente (PISARENKO *et al.*, 2012; SHEN *et al.*, 2013; DANG *et al.*, 2014). No entanto, devido ao alto custo, a maioria das estações de tratamento de efluentes não possuem estes processos na sua rotina. Por consequência, resíduos destas moléculas orgânicas nocivas podem ser encontradas em água potável (PEDROUZO *et al.*, 2011).

De forma a facilitar a compreensão das consequências ambientais induzidas pelos fármacos, o ciclo que os mesmos seguem até atingir o meio aquático é ilustrado na Figura 1.



**Figura1.** Fluxo de medicamentos no ambiente (Adaptado de BENGTTSSON *et al.*, 2006).

### 3.2 EFEITOS NOCIVOS DE RESÍDUOS DE FÁRMACOS EM ÁGUAS RESIDUAIS

Tavares (2000) relata a resistência bacteriana em relação a antimicrobianos lançados em efluentes. Esta resistência é variável entre os países, região e origem hospitalar. No entanto, algumas espécies apresentam resistência amplamente difundida em todo o mundo, por se tratar de processos codificados por diferentes mecanismos bioquímicos.

Niu *et al.* (2013), em suas análises observaram a degradação da tetraciclina por fotólise, sendo que os possíveis produtos de degradação foram avaliados na bactéria *Phosphoreum*, onde apresentaram maior toxicidade que o próprio fármaco. A fotólise demonstrou ser incompatível com o ambiente para degradação de tetraciclina, relacionando a avaliação de risco.

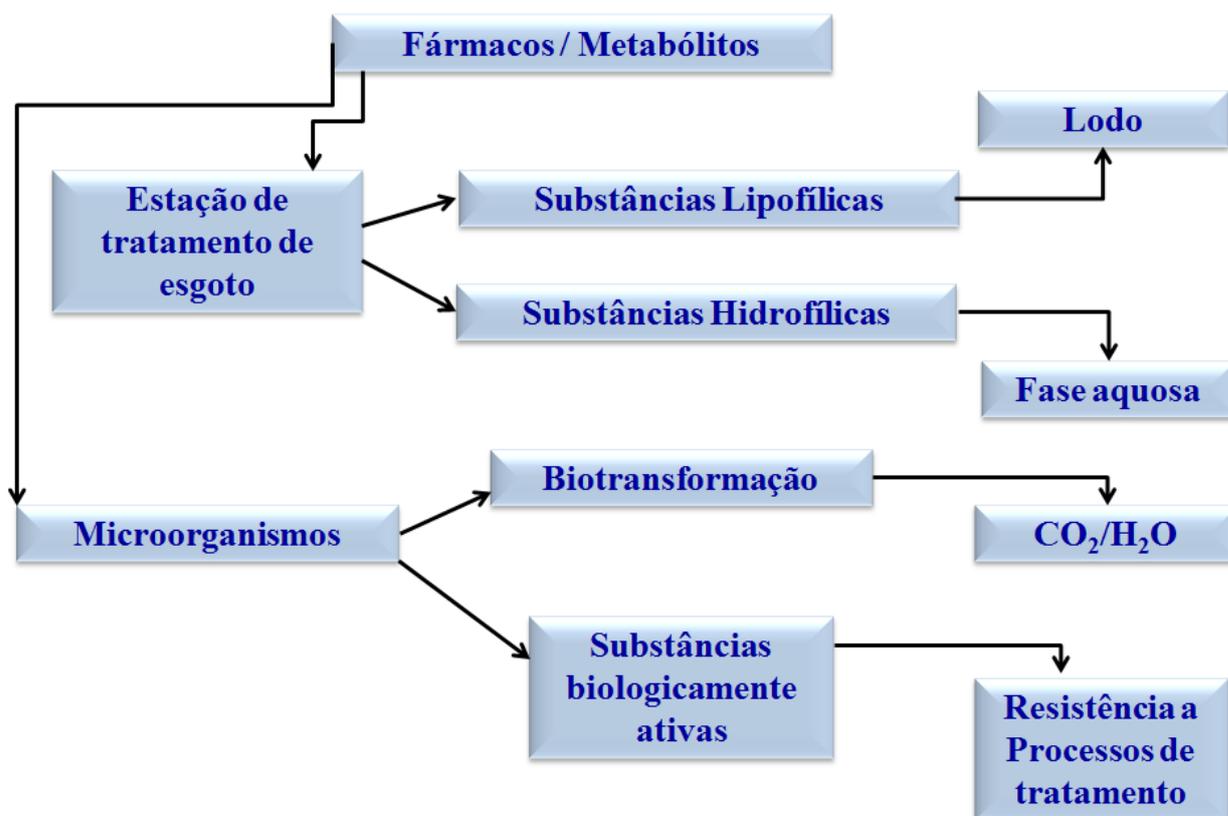
Fármacos são também considerados xenobióticos, ou seja, substâncias químicas estranhas ao organismo e ao sistema biológico, e muitos são amplamente metabolizados pelos seres humanos. No passado, as enzimas que metabolizavam xenobióticos eram conhecidas como enzimas metabolizadoras de fármacos, embora estejam envolvidas na metabolização de diversas substâncias químicas. Hoje, a maioria dos xenobióticos aos quais o ser humano está exposto é proveniente de poluição ambiental, aditivos alimentares, agroquímicos, produtos cosméticos, alimentos processados e fármacos. Esses compostos geralmente são substâncias lipofílicas que, se não fossem metabolizadas, poderiam acumular-se no organismo causando efeitos tóxicos. Então, o metabolismo atua convertendo essas substâncias químicas hidrofóbicas em derivados que possam ser eliminados na urina (GOODMAN & GILMAN, 2006). O metabolismo desempenha um importante papel na eliminação de fármacos e impede que estes compostos permaneçam por tempo indefinido no organismo (LOW *et al.*; 1998).

A presença de fármacos residuais na água pode causar efeitos adversos à saúde, seja humana ou mesmo de organismos presentes neste ecossistema, como os peixes. Alguns pesquisadores avaliaram efeitos causados no sistema reprodutivo de organismos aquáticos, bem como identificaram compostos químicos responsáveis por perturbações do sistema endócrino destes (BILA & DEZOTTI, 2003). Kang *et al.*(2002) e Gimeno *et al.*(1998) examinaram o efeito do estrogênio natural, 17- $\beta$ -estradiol, no sistema reprodutor dos peixes. Este composto afetou a fecundidade e a fertilidade dos peixes, sendo que estes apresentaram elevados níveis plasmáticos de vitelogenina, proteína feminina, e a inibição da espermatogênese, alterando o comportamento sexual do peixes machos. Sumpter (1998)

descreveu a feminilização de peixes machos expostos a estrogênios lançados nos rios através dos efluentes de ETE.

Quando administrados por humanos e outros animais (no caso de medicamentos veterinários), os princípios ativos de fármacos são excretados na urina e fezes, grande parte destes sem sofrer transformações, retendo assim as suas atividades farmacológicas. No entanto, muitos são excretados na forma de produtos de biotransformação e a partir daí adquirem maior ou menor potencial de ação tóxica (BENGTSSON *et al.*,2006).

Fármacos e metabólitos presentes no esgoto, ao atingirem as estações de tratamento podem adquirir padrões de comportamento, como: substâncias hidrofílicas (formadas após metabolização), que permanecem na fase aquosa do tratamento e substâncias lipofílicas que são total ou parcialmente retidas no lodo presente nas estações de tratamento. Fármacos e metabólitos que possuem características de degradação, em contato com microorganismos poderão sofrer biotransformação, transformando-se em dióxido de carbono e água, os fármacos e metabólitos com atividades biologicamente ativas são resistentes ao processo de tratamento de efluentes (JORGENSEN & HALLING-SORENSEN, 2000). A figura 2 demonstra as possíveis interações dos fármacos nas estações de tratamento.



**Figura 2** – Interações de fármacos e metabólitos em efluente. Fonte: O autor.

Os fármacos, após atuarem no organismo, podem ser excretados como metabólitos, hidrolisados ou na forma inalterada no ambiente aquático, trazendo riscos para a saúde humana, vegetal e animal (FARRÉ *et al.*, 2007b). Podem ainda estar conjugados com moléculas polares na forma de glicuronídeos. No entanto, esses conjugados são facilmente hidrolisados disponibilizando substâncias farmacêuticas ativas nos esgotos domésticos (HEBERER, 2002b; FENT & WESTON, 2006). A taxa de excreção da forma inalterada é dependente do fármaco, da dose e do indivíduo. De modo geral, 40 a 90% da dose administrada é excretada em sua forma original (MULROY, 2001; CALAMARI *et al.*, 2003; BENDZ *et al.*, 2005). Uma vez no ambiente, o destino dos fármacos depende de suas características estruturais e propriedades físico-químicas, como fotossensibilidade, biodegradabilidade, lipofilicidade, etc. Em águas naturais, a presença de substâncias húmicas (SH) e íons nitrato podem contribuir para a degradação de fármacos residuais, uma vez que, sob exposição à irradiação solar, estas podem gerar espécies altamente reativas como oxigênio singlete e radicais hidroxila (ZEPP *et al.*, 1985; ZEPP *et al.*, 1987). Por outro lado, as substâncias húmicas absorvem uma extensa faixa da radiação, podendo reduzir a quantidade de energia livre para as outras moléculas orgânicas, funcionando como um filtro e evitando a

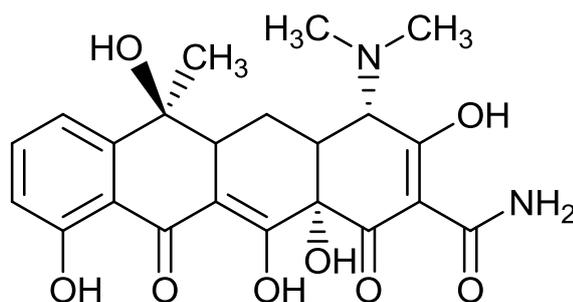
fotólise direta (ZEPP *et al.*, 1985). O efeito total da presença de substâncias húmicas depende do balanço entre suas contribuições opostas, sendo que para cada substância alvo de degradação tal efeito pode ser diferente (GARRISON *et al.*, 1976).

### 3.3 – CLASSES DE FÁRMACOS

De acordo com o uso regional e entre as diversas classes de fármacos disponíveis no mercado, as quatro classes escolhidas para serem avaliadas nesse trabalho foram: Antimicrobianos, antiinflamatório, hipertensivos e hipoglicemiantes. Sendo representante de cada classe, respectivamente, tetraciclina, paracetamol, enalapril e metformina.

#### 3.3.1 – TETRACICLINA

O primeiro membro da família das tetraciclinas foi descoberto em 1945 por Benjamin Duggar, a clortetraciclina, a qual é um produto natural da fermentação de uma bactéria do solo, *Streptomyces aureofaciens*. Após a descoberta foi dada ênfase a pesquisa e obtenção de novas tetraciclinas. Assim, de 1950 a 1970, vários membros da família das tetraciclinas foram desenvolvidos, a partir de produtos naturais e produtos semissintéticos. Durante este período, as tetraciclinas estavam entre os antibióticos mais usados nos Estados Unidos (SPEER *et al.*, 1992; SHLAES 2006). Em outro contexto, por apresentarem um baixo custo, foram largamente utilizadas na medicina veterinária como promotores de crescimento animal, sendo então, proibido o uso na Europa em 2006. As tetraciclinas (TC) não são facilmente absorvidas no organismo, sendo eliminadas intactas via fezes e urina (SKRASKOVA *et al.*, 2013). Quando absorvidas, sua absorção ocorre no estômago e no intestino delgado superior (ZHANEL *et al.*, 2004). A Figura 3 apresenta a forma estrutural da tetraciclina e Tabela 2 suas propriedades.



**Figura 3** – Estrutura química da tetraciclina.

**Tabela 2** - Propriedades físico-químicas e número de CAS da tetraciclina

Propriedades	Características	Referências
Formula molecular	$C_{22}H_{24}N_2O_8$	Zhou <i>et al.</i> , 2012 Wan <i>et al.</i> , 2010
CAS	60-54-8	Zhou <i>et al.</i> , 2012
Peso molecular ( $g\ mol^{-1}$ )	444,0	Kamel <i>et al.</i> , 1999 Spisso <i>et al.</i> , 2009 Skrásková <i>et al.</i> , 2013
$pK_{a1}^*$	3,3	Pamreddy <i>et al.</i> , 2013 Wan <i>et al.</i> , 2010
$pK_{a2}$	7,8	Pamreddy <i>et al.</i> , 2013
$pK_{a3}$	9,6	Pamreddy <i>et al.</i> , 2013
Log $K_{ow}$	-1,3	Zhou <i>et al.</i> , 2012

\* Constante de acidez

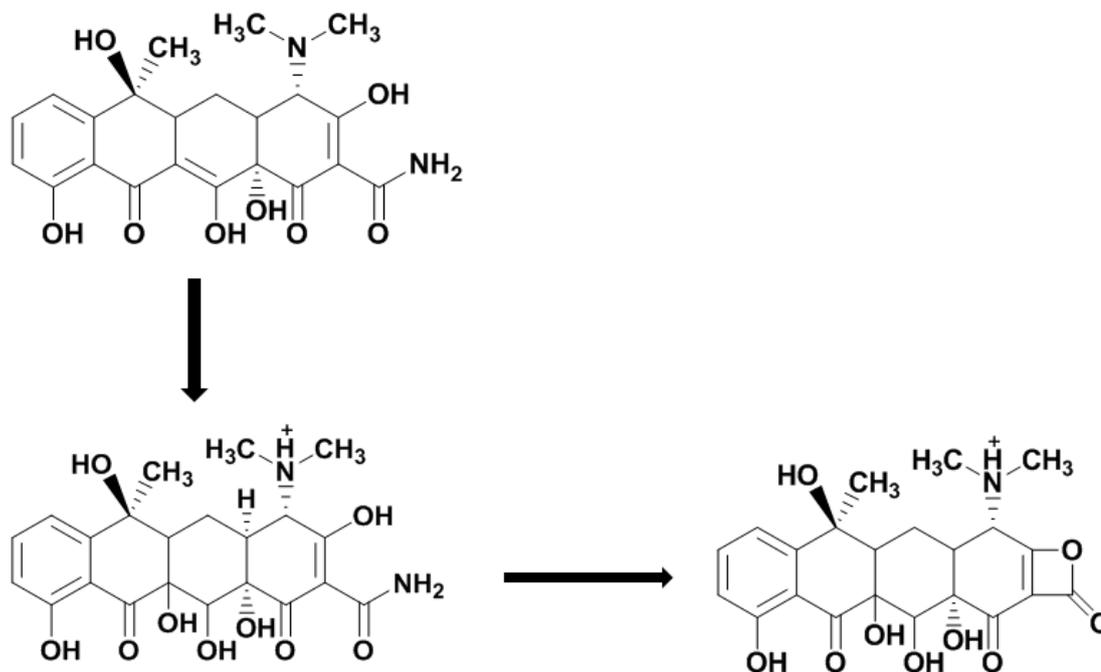
As tetraciclinas (TC) são agentes bacteriostáticos e sua atividade se estende a organismos Gram-positivos e Gram-negativos, organismos anaeróbios e protozoários, como a *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli* e *Toxoplasma gondii* (ZHANEL *et al.*, 2004). Sua grande utilização tem conduzido a populações resistentes a diversas bactérias, provocando um risco potencial sanitário e ambiental (JIAO *et al.*, 2008), no entanto, nos usos para tetraciclinas surgiram descobertas para tratamentos de doenças como câncer e artrite reumatóide, entre outras (KIM *et al.*, 2009; RICHARDSON *et al.*, 2005).

As TC possuem três diferentes valores da constante de dissociação de ácido ( $pK_a$ ), são ionizadas em meio ambiente a valores de pH de 3 a 8, suas soluções são bastante estáveis a valores de pH na forma neutra ou fracamente ácidos, mas instáveis em pH alcalino (REEMTSMA & JEKEL, 2006).

Garcia-Rodríguez *et al.* (2013) estudaram o efeito da vegetação aquática (*Spirogyra sp.* e *Zannichellia palustris*), com exposição à luz de amostras de águas residuais e efluentes tratados do nordeste da Espanha, bem como a eficiência de remoção de seis antibióticos (sulfonamidas e tetraciclinas) em reatores de escala laboratorial. Após 20 dias de tratamento, a eliminação de TC variou entre 83% e 97% nos reatores expostos a luz. No entanto, nos reatores mantidos no escuro apenas 15% de TC foi eliminada. Estes resultados sugerem que a TC foi removida principalmente pela fotodegradação na presença de algas, o que destaca o importante papel desempenhado na eliminação de antibióticos em estações de tratamento.

Seu poder de adsorção em algas e na presença de luz, conforme testado por Garcia-Rodríguez *et al.* (2013), mostrou que o fármaco é biodegradado pelo processo utilizando reatores com lâmpadas fluorescentes de 36 W, a temperatura de 20 °C e pH 8. A adsorção ocorre devido às propriedades hidrofóbicas do composto. A degradação de um intermediário da TC em processo experimental de reatores contendo algas na presença de luz testado por Garcia-Rodríguez *et al.* (2013) apresentou-se eficiente e a presença de luz pode efetivamente remover tetraciclina de águas e efluentes.

Wang *et al.* (2011) investigaram o mecanismo de degradação da tetraciclina (Figura 4), por reação de ozonólise, empregando ozônio na presença de algas. As experiências foram realizadas em escala laboratorial em que foram avaliados o efeito do pH, taxa de fluxo, concentração de ozônio e concentração de peróxido de hidrogênio. Os resultados indicaram que a taxa de degradação de tetraciclina aumenta com o aumento do pH, concentração de ozônio e taxa de fluxo. A adição de peróxido de hidrogênio teve pouco efeito sobre a degradação da tetraciclina. O produto formado pela degradação da tetraciclina apresentou maior toxicidade do que o próprio fármaco.



**Figura 4** - Degradação da tetraciclina por ozônio em solução aquosa (adaptada WANG *et al.*, 2011).

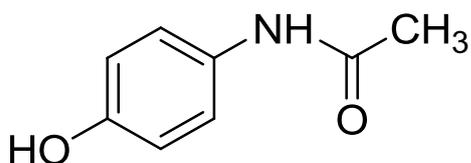
Grandes quantidades de tetraciclina produzidas, importadas, e utilizadas em Hong Kong (China) (RICHARDSON *et al.*; 2005), são prejudiciais não apenas a meio aquático, mas

também ao solo e ao ar. Diversos processos têm sido testados para a eliminação destes poluentes. Entre os mais usados estão os processos de oxidação avançada para o tratamento de antimicrobianos em água, tais como UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kim *et al.*, 2009), eletro-Fenton (SÍRES *et al.*, 2007), métodos eletroquímicos (ZHANG *et al.*, 2009) e ozonização (WANG *et al.*, 2011).

Os principais produtos intermediários da tetraciclina foram identificados por cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas com fonte de fotoionização a pressão atmosférica (APCI). A toxicidade aguda e a biodegradabilidade da tetraciclina em solução também foram avaliadas durante o processo de ozonização e foi observada a mortalidade de *Daphnia* (microcrustáceos) de acordo com OECD 2004. A degradação da tetraciclina foi calculada em 99% com 15 minutos de ozonização (WANG *et al.*, 2011).

### 3.3.2 – PARACETAMOL

O paracetamol (Figura 5), também conhecido como acetaminofeno, é um fármaco p-aminofenólico derivado da anilina, com propriedades analgésicas e antipiréticas. É um dos fármacos mais utilizados, principalmente por pacientes alérgicos ao ácido acetilsalicílico. Se degrada facilmente sob condições ácidas, possui estabilidade a luminosidade, umidade e temperatura. Através das enzimas microssomais hepáticas este fármaco é biotransformado no organismo (GUIMARÃES *et al.*; 2006).



**Figura 5** – Estrutura química do paracetamol.

Na tabela 3 estão descritas as propriedades físico-químicas do fármaco paracetamol.

**Tabela 3** - Propriedades físico-químicas e número de CAS do paracetamol

<b>Propriedades</b>	<b>Características</b>	<b>Referências</b>
<b>Formula molecular</b>	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	Villaescusa <i>et al.</i> , 2011 Santos <i>et al.</i> ; 2013
<b>CAS</b>	103-90-2	Koreje <i>et al.</i> , 2012 Santos <i>et al.</i> ; 2013
<b>Massa molecular (g mol<sup>-1</sup>)</b>	151,16	Villaescusa <i>et al.</i> , 2011 Jia Zahn <i>et al.</i> , 2012 Koreje <i>et al.</i> , 2012 Santos <i>et al.</i> ; 2013
<b>pKa</b>	9,5	Grung <i>et al.</i> ; 2008 Santos <i>et al.</i> ; 2013
<b>Log K<sub>ow</sub></b>	0,46	Villaescusa <i>et al.</i> , 2011; Grung <i>et al.</i> ; 2008 Santos <i>et al.</i> ; 2013

Segundo Parolini *et al.* (2009), o paracetamol pode ser detectado em águas superficiais, estações de tratamento de águas residuais e águas de consumo humano, em concentrações na ordem de  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Em análise de reservatórios de água potável ao longo do rio Lague no sul da França, foram encontrados contaminantes orgânicos, dentre eles o paracetamol (FARRÉ *et al.*, 2008). Na Europa, Canadá e Estados Unidos foram realizados estudos onde um dos fármacos mais encontrados em amostras de águas de consumo, residuais e rios foi o paracetamol, provavelmente por ser largamente utilizado no tratamento da dor amena e crônica (FARRÉ *et al.*, 2008).

Stackelberg *et al.*, (2007) e Focazio *et al.*, (2008) analisaram amostras de águas residuais nos Estados Unidos e evidenciaram que o máximo de concentração de paracetamol encontrada em águas antes da passagem por processo de tratamento foi de  $0,12 \mu\text{g L}^{-1}$ , sendo que após o processo não detectaram a presença deste fármaco.

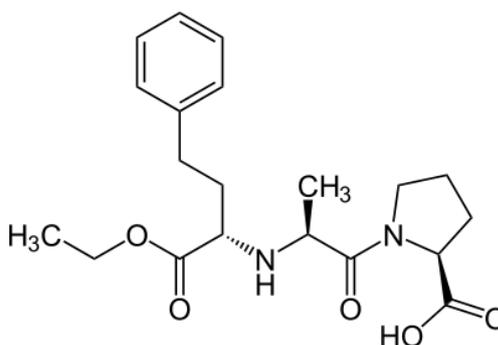
Segundo Heberer (2002a), o paracetamol é facilmente degradado e removido nas estações de tratamento de águas. No entanto, encontra-se amplamente disperso no ambiente aquático.

Ao analisar efluentes de esgotos e águas de rios da Alemanha, Heberer (2002a) detectou a concentração máxima de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de paracetamol em efluentes de esgoto. No entanto não foi detectado nas águas de rio.

Zhang *et al.* (2013) avaliaram a degradação do analgésico paracetamol por meio aeróbio com a presença de três espécies microbianas do gênero *Stenotrophomas* e *Pseudomonas*. As três espécies microbianas resultaram em uma degradação significativa do fármaco, em torno de 87,1%. Dois metabólitos foram detectados a partir da biodegradação do paracetamol, o 4-aminofenol e a hidroquinona.

### 3.3.3- ENALAPRIL

O enalapril (Figura 6) pertence à classe terapêutica de drogas cardiovasculares (CASTIGLIONI *et al.*, 2005). É um medicamento anti-hipertensivo, pró-fármaco da enzima conversora angiotensina de longa ação, sendo hidrolisado no fígado a enalaprilato, o qual é o metabólito ativo (DIEGO *et al.*, 2011; MAGUREANU *et al.*, 2013; STANISZ *et al.*, 2003). Segundo Sharma *et al.* (2001) o enalapril também pode ser degradado ou hidrolisado ao respectivo enalaprilato em pH inferior a 5,0. A tabela 4 traz as propriedades físico-químicas do fármaco ENA.



**Figura 6** – Fórmula química do enalapril

**Tabela 4** - Propriedades físico-químicas e número de CAS do enalapril

Propriedades	Características	Referências
Fórmula Molecular	$C_{20}H_{28}N_2O_5$	Sigma-Aldrich (2014)*
Massa Molecular ( $g\ mol^{-1}$ )	376, 45	Sigma-Aldrich (2014)*
CAS	75847-73-3	López-Serna <i>et al.</i> (2012)
pKa	4,18	Celiz <i>et al.</i> (2009)
Log $K_{ow}$	4,22	Stuer-Lauridsen <i>et al.</i> (2000)

\*[www.chemspider.com/chemied-structure](http://www.chemspider.com/chemied-structure); <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich>

Enalapril é usado para o tratamento de hipertensão arterial essencial e da insuficiência cardíaca congestiva, sendo altamente administrado em hospitais. É administrado oralmente como sal de maleato de enalapril e sofre, *in vivo*, hidrólise para produzir enalaprilato, seu metabólito. A estabilidade química e física do enalapril tem sido extensivamente estudada por diferentes técnicas analíticas como, ultravioleta (UV), fluorescência molecular e cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) (MAGUREANU *et al.*, 2013).

A estabilidade química e física do enalapril foi referida em vários trabalhos (AL-OMARI *et al.*, 2001; MARTA *et al.* 2013). Relata-se ser bastante estável quando armazenado em recipientes fechados, mas mostra instabilidade em recipientes abertos e quando exposto a alta temperatura e umidade (BHARDWAJ & SINGH; 2008).

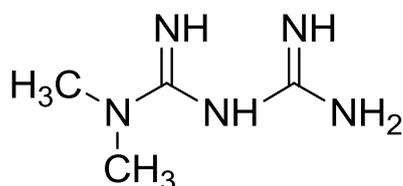
Valdés *et al.* (2014) selecionaram quinze compostos de diferentes classes terapêuticas de produtos farmacêuticos e hormônios esteróides, com o objetivo de verificar a ocorrência e bioacumulação em peixes. Entre os compostos avaliados oito foram detectados, sendo um deles o anti-hipertensivo enalapril, detectado em amostras de águas de rio, da região de Córdoba (Argentina). O enalapril esteve presente nas amostras de água avaliadas no período de estiagem e de chuvas, em concentrações na faixa de 0,6-8,8  $ng\ L^{-1}$ , porém o potencial de bioacumulação não foi avaliado para este fármaco.

O estudo de estabilidade de enalapril também foi realizado em plasma sanguíneo por método cromatográfico em cromatografia líquida (HPLC). Amostras de sangue de voluntários (idade 22-28 anos) saudáveis, não fumantes, que não faziam uso de medicação, foram coletadas. Doses do medicamento foram administradas aos voluntários e coletas de sangue foram realizadas 0,5 horas antes e em um intervalo de 0,5 a 50 horas após. O fármaco foi

determinado por cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC) e as recuperações das amostras foram de 100%, o fármaco manteve-se estável (SIDDIQUI *et al.*, 2013).

### 3.3.4 – METFORMINA

Metformina (Figura 7) é um antidiabético oral da classe das biguanidas, amplamente utilizada como hipoglicemiante oral no tratamento do diabetes mellitus tipo II (GOODMAN & GILMAN, 2006; EGGEN *et al.*, 2011; FENT *et al.*, 2006). A tabela 5 mostra as propriedades físico-químicas do fármaco MET.



**Figura 7** – Fórmula química da metformina.

**Tabela 5** - Propriedades físico-químicas e número de CAS da metformina

Propriedades	Características	Referências
Fórmula Molecular	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub>	Bueno <i>et al.</i> , 2012
Massa Molecular (g mol <sup>-1</sup> )	129,10	Bueno <i>et al.</i> , 2012
CAS	657- 24-9	Eggen <i>et al.</i> , 2011
pKa <sub>1</sub>	3,11	Eggen <i>et al.</i> , 2011 Viollet <i>et al.</i> , 2012
pKa <sub>2</sub>	12,25	Eggen <i>et al.</i> , 2011 Viollet <i>et al.</i> , 2012
Log K <sub>ow</sub>	-0,92	Bueno <i>et al.</i> , 2012

A metformina (MET) também tem sido relatada como medicamento utilizado para restaurar a função ovariana em síndrome dos ovários policísticos (SOP), reduzir a gordura do fígado, e para diminuir complicações microvasculares e macrovasculares associada com diabetes tipo II. Recentemente seu uso foi sugerido como tratamento para câncer e diabetes gestacional (VIOLLET *et al.*; 2012) e para aumentar a neurogênese, a formação da memória espacial e reduzir o risco de doença de Parkinson (ADEDEJI *et al.*, 2014).

O primeiro fármaco do grupo das biguanidas (fenformina) foi retirado do mercado nos Estados Unidos e na Europa por apresentar aumento da acidose láctica, com efeito colateral letal. A biguanida MET tem sido largamente utilizada na Europa, sem apresentar efeitos significativos (GOODMAN & GILMAN, 2006). É também o antidiabético mais usado no Brasil e nos Estados Unidos (onde foi prescrita aproximadamente 35 milhões de vezes em 2006, como medicamento genérico).

Walker (2013) realizou investigações associando a MET como medicamento para tratamento de câncer (de pâncreas, colo-retal, ovário, mama, próstata, bexiga, fígado, laringe e pulmão) em um total de 13.008 pacientes com diabetes tipo II. A análise demonstrou que o tratamento associado com MET reduziu 34% o risco de morte.

Wols *et al.* (2013) selecionaram alguns fármacos para análise de acordo com sua toxicidade e presença no meio ambiente. A MET foi incluída no estudo devido ao elevado consumo, a persistência no ambiente e propriedades químicas (composto com baixo peso molecular e fortemente hidrofílico). A determinação dos fármacos foi realizada por UHPLC-MS/MS. Para separar os componentes muito polares como MET, utilizaram cromatografia de interação hidrofílica (HILIC), porém a MET não apresentou degradação.

Há poucos dados disponíveis sobre a ocorrência ambiental de MET, mas concentrações de  $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$  (Estados Unidos) (KOLPIN *et al.*, 2002) e  $1,7 \mu\text{g L}^{-1}$  (Alemanha) (SCHEURER *et al.*, 2009) foram encontrados em águas superficiais. Concentrações na faixa de  $101-129 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $2,2-21 \mu\text{g L}^{-1}$  foram encontradas em estações de tratamento de afluentes e efluentes na Alemanha (SCHEURER *et al.*, 2009). Metformina foi encontrada em amostras de lodo de esgoto em concentrações elevadas de  $500-1600 \mu\text{g kg}^{-1}$  em peso seco (EGGEN *et al.*, 2011). Apresenta bioacumulação maior que a encontrada em lodo ( $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $1,6 \text{ mg kg}^{-1}$ ) nas raízes e folhas, como testes realizados em nabo silvestre, cevada e trigo (EGGEN *et al.*, 2011). A eliminação estimada da MET é de 80-98 %, em três ETE na Alemanha (SCHEURER *et al.*, 2009).

Dez compostos farmacêuticos frequentemente usados, como a MET, foram investigados quanto à toxicidade aguda com *Daphnia* e algas verdes *Desmodesmus subspicatus* por Carlsson *et al.*, (2006). Além disso, a toxicidade crônica foi avaliada na planta aquática *Lemna minor*, no entanto a MET não apresentou resultados considerados representativos para efeitos tóxicos ao ambiente (CARLSSON *et al.*, 2006).

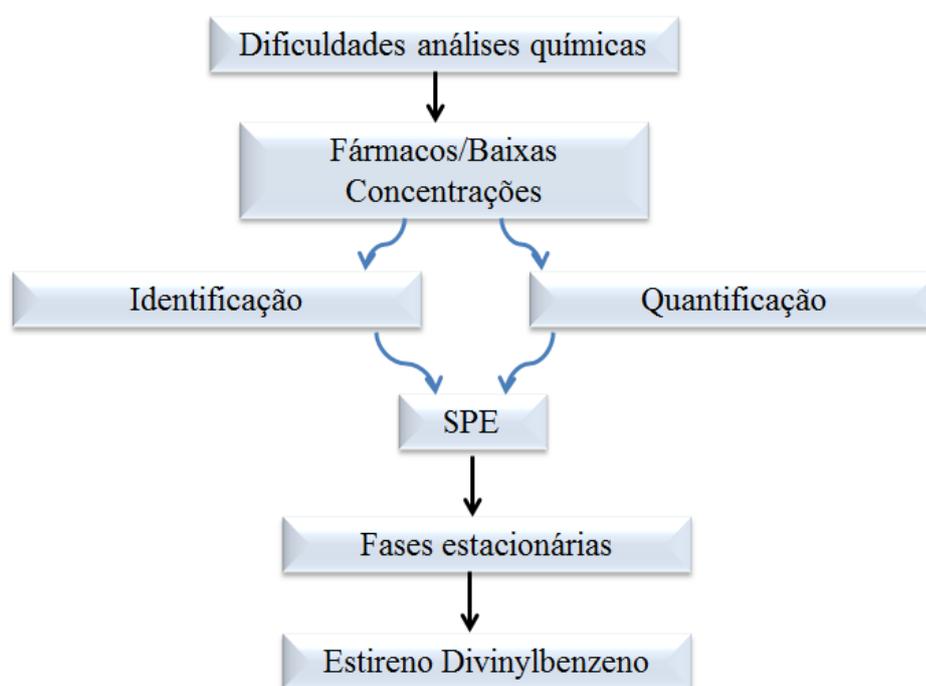
### 3.4. MÉTODOS DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE FÁRMACOS EM EFLUENTES

#### 3.4.1 – MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS EM MATRIZES AMBIENTAIS

Diversas classes de fármacos têm sido detectadas em efluentes. No entanto, seu efeito prejudicial ao meio ambiente e ao ser humano vem sendo investigado por vários pesquisadores, cujos dados ainda são insuficientes para tal comprovação (BILA & DEZOTTI, 2003).

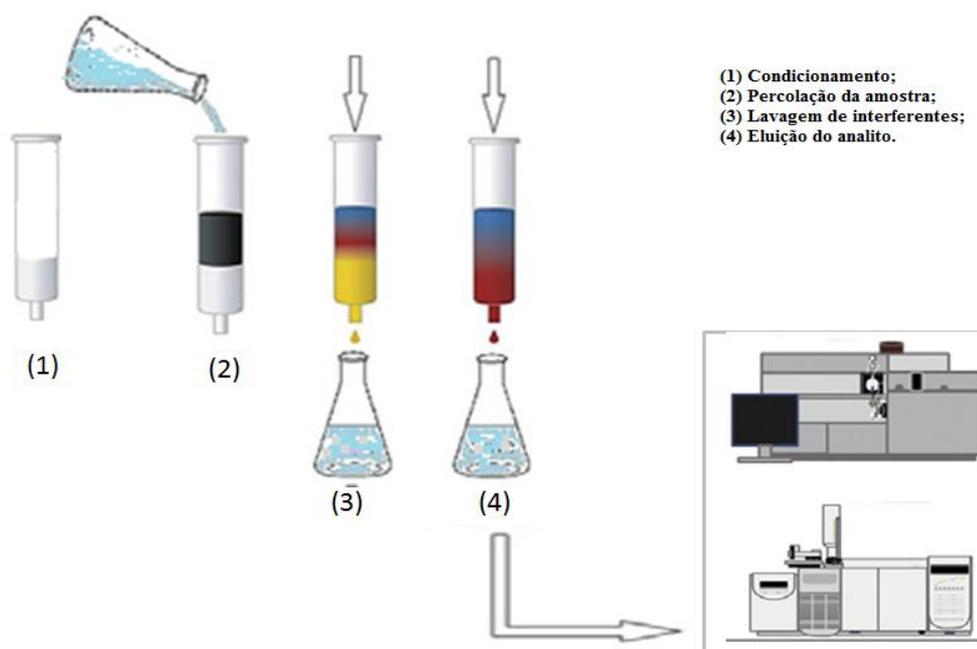
Uma das dificuldades para análise química dos princípios ativos de fármacos em efluentes são as baixas concentrações dos mesmos. As concentrações das substâncias ativas nas matrizes ambientais estão em níveis muito baixos, podendo chegar a  $\text{ng L}^{-1}$ . Assim, dificilmente são detectadas sem um pré-tratamento da amostra (PETROVIC *et al.*, 2005).

Na literatura são propostos diferentes métodos para melhor identificação e quantificação das substâncias de interesse, entre eles: evaporação, filtração, centrifugação, troca iônica e extração em fase sólida (SPE), sendo o método de SPE o mais utilizado no meio científico devido a sua eficiência para tal finalidade (PETROVIC *et al.*, 2005; HERNANDEZ *et al.*, 2007). A figura 8 mostra a importância da concentração de matrizes ambientais cuja concentração de fármacos é baixa.



**Figura 8** – Extração em fase sólida para concentração de amostras. Fonte: O autor

No método de extração em fase sólida, como ilustrado na figura 9, após escolha da fase polimérica ideal, o cartucho passa pela etapa (1) de condicionamento desta fase, onde o solvente é conduzido através dos grupos funcionais presentes na fase estacionária assegurando interação com a amostra. O solvente de condicionamento deve apresentar polaridade semelhante a amostra para a máxima retenção do analito. Em seguida a amostra é percolada pelo cartucho de SPE (2) para retenção do analito de interesse. Na próxima etapa (3) é realizada a lavagem dos interferentes da amostra e posterior eluição do analito (4) com um solvente que possua interação com o mesmo (SIGMA-ALDRICH, 2007) para posterior análise (BAKER & KASPRZYK-HORDERN, 2011).



**Figura 9** – Princípio de extração e purificação de amostras por SPE (adaptada LATORRE *et al.* 2013).

O método de pré-concentração e pré-tratamento com SPE é um dos métodos mais utilizados para o preparo de amostras complexas para análise. Cartuchos de SPE são disponibilizados com diferentes fases estacionárias, as quais levam a diferentes desempenhos de acordo com os grupos funcionais presentes nas substâncias químicas (MARINO *et al.*, 2010).

Gros *et al.* (2013) utilizaram os cartuchos SPE Oasis HLB (fase lipofílica e hidrofílica) e Oasis MCX (adsorvente misto de troca catiônica) em modo *on-line* automático acoplado a

cromatografia líquida de ultra alta performance com espectrometria de massas tipo quadrupolo linear *ion trap* (UHPLC-QqLIT), sendo determinados 53 antibióticos e seus metabólitos, entre eles tetraciclina, em efluente hospitalar e águas de rio.

A SPE também foi utilizada por Shao *et al.*, (2009) para quantificação de 76 fármacos correspondentes a 9 classes farmacêuticas na região de Pequim (China), onde foram analisadas águas residuais, de rios e efluentes próximos a um matadouro. Para a extração dos fármacos os autores testaram diversos cartuchos como: Oasis HLB e SepPack C18 da Waters<sup>®</sup>, GCB (ENVI-carb grafite carbon black) da Supelco<sup>®</sup> e Bond Elut Plexa da Varian<sup>®</sup>. De acordo com os resultados, os autores relataram que o mais eficiente foi o Oasis HLB. Após o método de extração os analitos foram avaliados por LC-MS/MS.

Nebot *et al.* (2007) utilizaram cartuchos SPE Strata<sup>™</sup> X, fase estacionária de estireno divinilbenzeno modificado, para a determinação de paracetamol e mais 8 fármacos em amostras de águas de rio, água de torneira e água do mar, onde detectaram uma concentração entre 0,03-0,96 ng L<sup>-1</sup> do fármaco paracetamol.

Buchberger (2011) evidencia o uso de SPE nos métodos de análise realizados nos últimos anos. Novos sorventes poliméricos melhoraram a retenção de compostos polares. Fármacos de hidrofobicidade razoável podem ser facilmente pré-concentrados por SPE utilizando qualquer material de fase reversa, tal como sílica modificada ou poli(estireno-divinilbenzeno). Porém, podem ser necessários ajustes adequados do pH da amostra para evitar desprotonação de compostos ácidos, melhorando a eficiência de extração dos analitos. A mistura de materiais com propriedades hidrofóbicas e troca iônica tem-se mostrado uma ótima alternativa para análise de diferentes classes de fármacos em amostras de águas e efluentes.

Desta forma, a extração em fase sólida adquire lugar de grande importância na quantificação e identificação de fármacos em diferentes matrizes ambientais, como os exemplos apresentados na tabela 6.

**Tabela 6:** Técnicas e métodos para quantificação e identificação de fármacos em matrizes ambientais.

<b>Amostra</b>	<b>Extração/purificação</b>	<b>Análises</b>	<b>Referência</b>
Efluente de estações de tratamento. (Itália)	SPE Strata X	HPLC com UV	Patrolecco <i>et al.</i> , 2013
Efluente industrial; Água de rio. (China)	SPE Oasis HLB( <i>hydrophilic-lipophilic balance</i> ) SepPack C18; Envi-Carb (Supelco); Bond Elut Plexa.	LC-MS/MS	Shao <i>et al.</i> ; 2009
Efluente hospitalar. (Suíça)	Reator anóxico, aeróbico e MBR (biorretor de membranas). SPE Oasis HLB (Waters, Milford, MA, USA).	LC MS/MS	Kovalova <i>et al.</i> ; 2012
Efluente hospitalar, água de rio. (Eslovênia)	SPE Strata X (60 mg/3 mL)	(GC-MS)	Cuderman & Heath, 2007
Água superficial. (noroeste de Ohio Estados unidos)	Strata X	LC-MS/MS	Wu <i>et al.</i> , 2008
Efluente de ETE municipal. (Sul da Finlândia)	Strata X	UHPLC-TOF/MS	Nurmi <i>et al.</i> , 2012

### 3.5 – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E ESPECTROMETRIA DE MASSA

A presença de fármacos e seus produtos de degradação no ambiente têm chamado a atenção dos pesquisadores. Para quantificar e identificar a presença destes contaminantes em matrizes ambientais complexas, a técnica que mais vem sendo utilizada é a espectrometria de massas associada a cromatografia líquida. Essa técnica tem mostrado grande eficiência devido sua alta sensibilidade em confirmar a identidade de compostos (FATTA *et al.*, 2007; FARRÉ *et al.*, 2008b; KOSJEK *et al.*, 2007).

A cromatografia líquida é muito usada para técnicas analíticas de separação, devido as sua detectabilidade e sua adaptabilidade as determinações quantitativas com exatidão (HOLLER *et al.*, 2009).

O espectrômetro de massas é um instrumento que produz íons e os separa de acordo com sua razão massa/carga ( $m/z$ ). Existem diversos tipos de espectrômetros de massas como, por exemplo, triplo quadrupolos, que são utilizados para quantificação de compostos

conhecidos, sendo monitoradas as transições de massas específicas (KOSJET *et al.* 2007). No sistema MS/MS o íon é separado no primeiro quadrupolo Q<sub>1</sub>, no segundo quadrupolo Q<sub>2</sub> ocorre a colisão entre as moléculas e o íon é fragmentado através de um gás inerte, geralmente nitrogênio. No terceiro quadrupolo Q<sub>3</sub> fragmentos são separados de acordo com sua *m/z* e encaminhados para detecção (SKOOG *et al.*, 2002), como demonstrado na figura 10.



**Figura 10** – Sistema de espectrometria de massas aplicada a amostras ambientais.

Nos equipamentos de espectrometria de massas tipo tempo de voo (TOF, do inglês, *time-of-flight*), os íons positivos ou negativos são produzidos periodicamente por bombardeamento da amostra com pulsos de elétrons, dispersando os íons no tubo devido a velocidade que varia com suas massas, ou seja, as partículas mais leves chegam primeiro ao detector. Estes instrumentos permitem etapas de fragmentação consecutivas, o que é importante na identificação de compostos (HOLLER *et al.*, 2009).

### 3.6 - RISCO E TOXICIDADE DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS NO MEIO AMBIENTE

Com a finalidade de suavizar impactos ambientais, estudos avaliam o risco que determinada substância apresenta como possível contaminação no ambiente. A União Européia de Medicamentos (EMA) propôs metodologias para a avaliação do risco ambiental de determinadas substância em estudo (EMA, 2006). Substâncias que apresentam um aumento em sua exposição ambiental são inclusas no grupo de substâncias com risco ambiental

potencial. Até o momento tem sido pouco estudado o risco de toxicidade de produtos farmacêuticos presentes em efluentes hospitalares.

Para avaliar-se o risco ambiental para determinada substância faz-se, segundo EMEA (2006), o uso da relação da concentração ambiental medida (MEC) com a concentração ambiental que não causa efeito (PNEC). O quociente de risco (QR) geralmente é calculado a partir de uma concentração ambiental predita (ou medida) (PEC ou MEC, respectivamente) em relação a PNEC e, 1 (um) foi o valor estipulado como sendo o limite máximo, este valor estima qual a concentração em que a substância pode ser encontrada no ambiente sem trazer perigo (ESCHER *et al.*, 2011). Um critério comum de classificação de risco foi aplicado. Quando  $QR < 0,1$ , risco mínimo para organismos aquáticos,  $0,1 \leq QR < 1$ , risco médio;  $QR \geq 1$ , de alto risco (EMEA, 2006).

Uma substância é considerada sem risco ao meio ambiente quando o valor obtido for inferior a  $10 \text{ ng L}^{-1}$ , de acordo com a dose prescrita para humanos. Se o valor obtido for igual ou superior, então passa a ser avaliada a toxicidade da substância ao ambiente, seus efeitos e seu destino (GRUNG *et al.*, 2008).

O risco de compostos muito lipofílicos ( $\log K_{ow} > 5$ ) muitas vezes dependem de seu potencial de bioacumulação e não em efeitos agudos devido à exposição de curto tempo. O  $\log K_{ow}$  é a constante de partição entre n-octanol e a água e serve como parâmetro para indicar a lipofilicidade de cada substância e, por conseguinte, seu potencial para bioacumulação. Para estes compostos, a exposição via fase aquosa é dada por concentrações dissolvidas. Uma vez que as moléculas são principalmente ligadas a partículas suspensas e sedimentos. Portanto, o enfoque baseado na concentração dissolvida provavelmente subestima o risco destes compostos (VON DER OHE *et al.*, 2011).

Nos últimos anos o risco ambiental representado pelas substâncias farmacêuticas encontradas em efluentes hospitalares e águas residuais de ETEs tem sido avaliado em diferentes níveis tróficos, dentre os mais testados são, algas, *Daphnias* e peixes (SANTOS *et al.*, 2013; GRUNG *et al.*, 2008; GROS *et al.*, 2010; ESCHER *et al.*, 2011).

### **3.7 – ALGUNS TRATAMENTOS APLICADOS À DEGRADAÇÃO DE FÁRMACOS EM EFLUENTES**

Diversos tratamentos têm sido utilizados para degradação de fármacos em efluentes. Ozonização, Foto-Fenton e osmose reversa apresentaram eficácia para a remoção de

antimicrobianos em águas residuais (MBOULA *et al.*, 2012). No entanto, consomem um nível elevado de energia, exigem instalações caras e não removem completamente os antimicrobianos (MBOULA *et al.*, 2012).

A literatura traz estudos recentes de pesquisas sobre a degradação de fármacos em tratamento de efluente com uso de reatores anóxicos, aeróbios, processos com lodo ativado e membranas (AVILA *et al.*, 2013; CARBALLA *et al.*, 2006; DVORAK *et al.*, 2013; SHI *et al.*, 2014).

Amorim *et al.* (2014) utilizaram sistema de reator de batelada sequencial (SBR) para processo de lodos ativados com água residual, com alimentação de concentrações (9 e 32  $\mu\text{M}$ ) de fluoroquinolonas ao processo. O sistema foi operado com proteção a luz, a fim de evitar degradação fotolítica e crescimento de algas. Os autores não obtiveram evidência de biodegradação dos fármacos, mas observaram que os compostos ficaram adsorvidos ao lodo no sistema aeróbio.

Membranas de ultrafiltração, carvão ativado e irradiação de ultrassom foram utilizados por Secondes *et al.* (2014) com intuito de avaliar a remoção de fármacos em efluentes. A eficiência do processo com membranas de ultrafiltração foi intensificada com a adição de carvão ativado, obtendo remoção de 99% e com a aplicação de ultrassom a remoção foi em torno de 100%.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

Os experimentos deste trabalho foram realizados no Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM) e na Central Analítica do Instituto de Biotecnologia, ambos localizados na Universidade de Caxias do Sul – UCS.

#### 4.1.1 Reagentes e soluções

As soluções-padrão de todos os analitos avaliados, enalapril com pureza 99,8% (anti-hipertensivo), metformina 100% (hipoglicemiante), paracetamol 97,8% (analgésico) e tetraciclina 98,7% (antimicrobiano), foram preparadas com princípio ativo padrão (*Sigma-aldrich*<sup>®</sup>). As soluções-padrão foram preparadas na concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup> em solução de metanol e água ultrapurificada (1:9), sendo posteriormente diluídas de acordo com a necessidade. Estas soluções foram mantidas sob refrigeração (4 °C), por no máximo 10 dias.

Demais reagentes e solventes utilizados foram de grau cromatográfico:

- Água purificada em sistema Milli-Q<sup>®</sup>
- Metanol, pureza 99,9%, Merck<sup>®</sup>
- Acetonitrila, pureza 99,9%, Merck<sup>®</sup>
- Acetato de amônio P.A., Vetec<sup>®</sup>
- Ácido fórmico, pureza 98-100%, Merck<sup>®</sup>

#### 4.1.2 Equipamentos

Cromatógrafo a líquido de ultra eficiência (UHPLC) Shimadzu (Japão), equipado por bomba LC-20ADXR, amostrador automático SIL-20AXR, detector SPD-20 UV-Vis 254 nm, forno CTO-20 a temperatura de 30°C.

Espectrômetro de massas Shimadzu, modelo 8030, com fonte de ionização *eletrospray* (ESI).

Espectrômetro de massas micrOTOF-QII com fonte *eletrospray* (ESI), Bruker.

Sistema de purificação de água Milli-Q<sup>®</sup>, marca Millipore.

Balança analítica AUX 220 Shimadzu, com precisão de quatro casas decimais.

## 4.2 MÉTODOS

Na realização dos experimentos os seguintes processos foram adotados.

### 4.2.1 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Para otimização das análises, primeiramente foram avaliadas soluções padrões em separado de cada um dos quatro analitos, na concentração de  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  no modo de injeção em fluxo, usando como fase móvel acetonitrila:água com 0,1% de ácido fórmico (1:1), vazão de  $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ , com volume de injeção de  $1 \mu\text{L}$ . Para avaliar a fragmentação de cada composto, os parâmetros como energia de colisão (EC), gás de secagem (argônio), gás de nebulização, temperatura de interface e temperatura linha de dessolvatação (DL) foram testados.

### 4.2.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Para análise cromatográfica foi utilizando sistema UHPLC-MS/MS Shimadzu. A coluna utilizada foi Shim-pack XR-ODSII,  $2,2 \mu\text{m}$ ,  $3,0 \times 100 \text{ mm}$  marca Shimadzu, com um gradiente binário contendo 0,1% de ácido fórmico em água (fase aquosa) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (fase orgânica), a uma vazão de  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$  e volume de injeção de  $5 \mu\text{L}$  (adaptado ZHOU *et al.*, 2012; ZHOU & KANG, 2013).

### 4.2.3 CURVA DE CALIBRAÇÃO

As curvas analíticas foram preparadas através da diluição de volumes adequados da solução intermediária nas concentrações de 5, 10, 30, 70,  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  para paracetamol e metformina; 5, 10, 20, 30,  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  para enalapril e 25, 50, 75, 100,  $125 \mu\text{g L}^{-1}$  para tetraciclina, de acordo com a faixa de linearidade do método com a concentração necessária para identificação e quantificação dos compostos em efluente hospitalar.

As soluções para a curva foram preparadas a partir de soluções intermediárias de uma solução estoque com concentração  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ , as mesmas foram preparadas no momento da análise.

#### **4.2.4 DETERMINAÇÃO DOS LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO**

Para determinação dos limites de detecção e quantificação foi realizada a análise da relação sinal/ruído (S/N), sendo que o mínimo para detecção é S/N 3 e para quantificação S/N 10 (INMETRO, 2011). Diferentes amostras dos padrões foram injetadas até se obter a relação desejada.

#### **4.2.5 PREPARO DA AMOSTRA**

Após passagem por tratamento de efluente realizado em bancada, as amostras da fase líquida coletadas no final do processo foram mantidas sob-refrigeração a  $\pm 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise cromatográfica.

As amostras foram homogeneizadas, filtradas em filtro de poli (fluoreto de vinilideno) (PVDF) ( $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ ) marca Millipore, e analisadas em UHPLC-MS/MS para determinar a concentração dos fármacos utilizados no processo simulado de tratamento de efluente. Inicialmente as amostras foram diluídas 50 vezes para análise, tendo em vista que no processo de choques de fármacos a concentração utilizada foi alta ( $500 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ ;  $1000 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  e  $2000 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ ). As amostras que não foram quantificadas pelo processo de diluição, foram submetidas a etapa de pré-concentração para verificação do percentual de degradação ocorrido.

#### **4.2.6 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE – *SOLID PHASE EXTRACTION*)**

Foi utilizado sistema de SPE para as etapas de pré-concentração e *clean-up* das amostras.

Assim, para este método as melhores condições foram investigadas a partir de dados retirados da literatura. A extração em fase sólida foi baseada no método de Bisceglia *et al.* (2010) e Yu & Wu. (2011), com algumas modificações. Para tanto, foram usados cartuchos poliméricos de fase reversa (*Polymeric Reversed Phase*), Strata<sup>TM</sup>X  $33 \text{ }\mu\text{m}$  (Phenomenex<sup>®</sup>),

6 mL, 200 mg, diâmetro de poro de 90 Å e tamanho médio de partículas de 31 µm. Os solventes testados foram acetonitrila e metanol, todos de alta pureza, amostras de solução padrão com caráter básico e ácido foram testadas.

Uma alíquota de 100 mL de amostra acidificada com ácido fórmico até pH 3 foi passada através do cartucho SPE. Os cartuchos foram condicionados (pré-ativados) com 5 mL de água Mili-Q e 5 mL de metanol. Após a passagem da solução, os cartuchos foram lavados com 5 mL de água Milli-Q para retirada de interferentes da amostra, em seguida passaram por processo de secagem com fluxo de ar. Para a eluição do composto, foi utilizado 1 mL (500 µL + 500 µL) de solução metanol com 10 mmol L<sup>-1</sup> de acetato de amônio, posteriormente a amostra foi injetada no UHPLC-MS/MS.

O fluxo utilizado para percolar as amostras foi em torno de 2 mL min<sup>-1</sup>, o que segundo Lanças (2004), permite uma boa pré-concentração na maioria dos casos com uso de SPE.

#### **4.2.7 – MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO POR MICROTOF-QII**

A separação cromatográfica foi feita com o uso de UHPLC com injetor automático modelo SIL 20A, controlador CBM-20A e bomba LC-20AD. A coluna utilizada foi Shim-pack XR-ODSII, 2,2 µm, 3,0×100 mm marca Shimadzu. A fase móvel utilizada foi água com 0,1% ácido fórmico, e, acetonitrila com 0,1% ácido fórmico, no modo gradiente. A vazão utilizada foi 300 µL min<sup>-1</sup> e o volume de injeção foi de 5 µL. O tempo de separação cromatográfica foi ajustado em 10 minutos. O *software* utilizado para controle e aquisição de dados foi TOFcontrol (Bruker® Scientific)

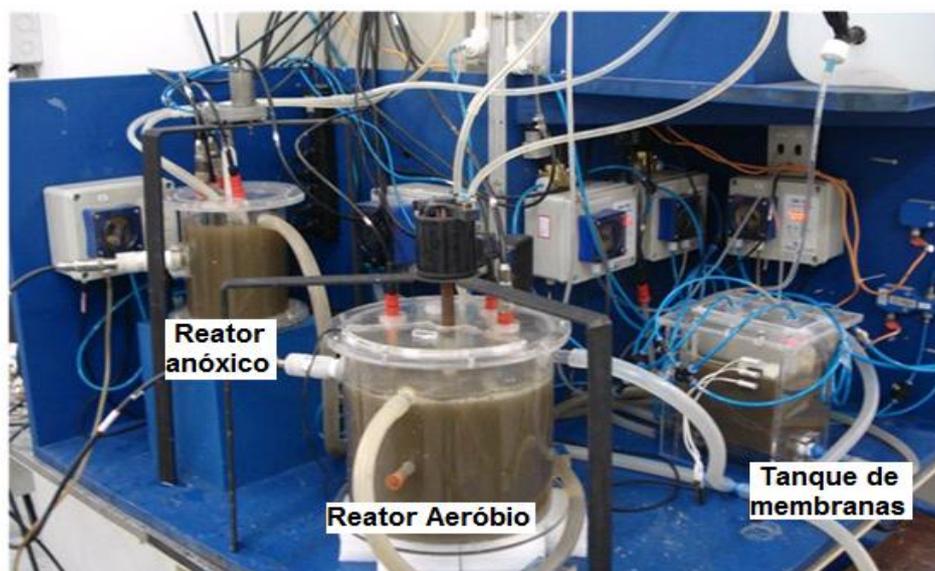
Os compostos foram analisados em modo MS e MS<sup>2</sup> por Espectrômetro de massas micrOTOF-QII com fonte de ionização por *eletrospray* (ESI) (Bruker® Scientific) em modo positivo. A faixa de intervalo de massas foi de 50 a 500 *m/z* com dois *scans* por segundo, com resolução de 50.000 (FWHM). Foi usado nitrogênio como gás de colisão, o fluxo de gás de secagem foi de 10 L min<sup>-1</sup>, temperatura de secagem de 200 °C, a energia de ionização foi de 3.0 eV, a energia de colisão da cela de colisão de 8 eV.

#### 4.2.8 DESCRIÇÃO DO SISTEMA DE TRATAMENTO DE EFLUENTE SIMULADO EM ESCALA LABORATORIAL

O experimento foi realizado no Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM) da Universidade de Caxias do Sul por Della Giustina (2014), doutorando em recursos hídricos e saneamento ambiental na Universidade Federal de Rio Grande do Sul.

Os experimentos foram realizados em um sistema MBR, o qual é composto por um reator anóxico com volume de 3 L, um reator aeróbio com volume de 10 L seguido por um tanque de membranas com volume de 4L. As membranas utilizadas são de fibra oca, microfiltração (MF), com tamanho de poro médio de 0,2  $\mu\text{m}$ , confeccionadas em PVDF. O sistema pode ser observado na figura 11, o qual foi alimentado com efluente hospitalar por bomba peristáltica.

O efluente hospitalar utilizado foi proveniente de hospital de categoria geral. Sendo este efluente bruto, ou seja, a coleta foi realizada antes do efluente passar por qualquer tratamento.



**Figura 11:** Imagem fotográfica do sistema experimental MBR (DELLA GIUSTINA; 2014)

O controle da vazão de ar que alimenta o reator foi realizada por uma válvula proporcional e um medidor de vazão na linha de suprimento de ar. Ambos os reatores anóxico e aeróbio possuem sistema de controle de pH, onde as válvulas dosadoras de ácido e base são acionadas por válvulas piloto.

Os parâmetros de controle do Reator Biológico Associado a Membranas (MBR) foram:

- pH dos reatores aeróbio: 7,5;
- Temperatura: 24 °C;
- OD reator aeróbio: 2 mgO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>;
- SSTA: 8.000 a 10.000 mg L<sup>-1</sup>;
- Membranas:
  - Pressão máxima de sucção do sistema de membranas: -420 mBar;
  - Retrolavagens: 30s / 60 min de operação;
  - Solução de retrolavagem: água destilada;
  - Frequência de operação da bomba de retrolavagem: 75%;

Com objetivo de avaliar choques de fármacos (alta concentração de fármacos) e remoção dos mesmos no processo de tratamento, foram realizados testes denominados de choque longo e choque curto. Para choque longo, soluções padrão de um fármaco específico com concentração 500 mg L<sup>-1</sup> foram adicionadas ao recipiente contendo efluente bruto até atingir a concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup>; 1,0 mg L<sup>-1</sup>; 2,0 mg L<sup>-1</sup> que em seguida passou pelos reatores, onde o fármaco foi adicionado em uma única etapa. Os reatores operaram com vazão (Q) de 1L h<sup>-1</sup> e, ficaram em agitação por 30 minutos após adição da solução contendo fármaco. As amostras foram coletadas no final do processo após 3, 6 e 9 horas de teste. Para o método de teste denominado choque curto, partindo da solução padrão foram realizados choques de fármaco nas mesmas concentrações citadas no choque longo (0,5 mg L<sup>-1</sup>; 1,0 mg L<sup>-1</sup>; 2,0 mg L<sup>-1</sup>), onde a solução foi adicionada gradativamente em cada reator, com coletas realizadas conforme especificado no método de choque longo.

#### **4.2.9 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS**

Para caracterização do efluente bruto foram determinados os seguintes parâmetros físico-químicos: alcalinidade (2320 B), demanda química de oxigênio (APHA 5220 B), nitrogênio amoniacal (4500 NH<sub>3</sub>C), pH (4500 H), sólidos suspensos voláteis (2540 G), sólidos suspensos totais (2540 D) e sólidos suspensos fixos (2540E). Estes procedimentos foram realizados conforme *Standard Methods For Examination of Water and Wastewater*.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

A partir dos espectros de massas, dentre os fragmentos obtidos para cada composto, foram escolhidos os dois mais intensos, sendo um usado para quantificação e o outro para confirmação. Os resultados obtidos pela otimização dos parâmetros de massas são mostrados nas tabelas 7 e 8.

Para o enalapril (ENA), temos o íon precursor de  $m/z$  377, o qual é proveniente da ionização do analito ENA de massa 376 u, associado a um hidrogênio  $[M + H]^+$ . Enquanto isso, a fragmentação deste íon gera como mais intensos os fragmentos com massa,  $m/z$  234 e  $m/z$  117, o que está de acordo com Garcia-Ac *et al.* (2009), sendo estes os usados para as análises.

A metformina (MET) tem como íon precursor a  $m/z$  130,2, o qual é proveniente da ionização da sua massa de 129,1 u, associado a um hidrogênio  $[M + H]^+$ . Enquanto isso, os produtos de fragmentação da MET que apresentam íons mais abundantes possuem  $m/z$  71,1 e  $m/z$  60,1. O que está de acordo com o encontrado por Scheurer *et al.* (2009) e Bueno *et al.* (2012).

O paracetamol (PAR) tem como íon precursor a  $m/z$  152, o qual é proveniente da ionização da sua massa de 151,1 u, mais um hidrogênio  $[M + H]^+$ . Seus produtos de fragmentação que apresentam maior razão  $m/z$  são 110 e 93, que também foram descritos por Gracia-Lor *et al.* (2011).

A tetraciclina (TC) tem como íon precursor o  $m/z$  445  $[M + H]^+$ , proveniente da ionização do seu íon molecular (444 u) somado a um hidrogênio. Os produtos de fragmentação que apresentam maiores intensidades são os íons com  $m/z$  410 e  $m/z$  154 como descritos por Jia *et al.* (2009). Pamreddy *et al.* (2013) encontraram íons produto 410 e 150 e, os íons produtos encontrados por Zhenfeng *et al.* (2006) foram 410 e 427,2.

Os respectivos íons moleculares, fragmentos e energias de colisões otimizadas para cada analito estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Parâmetros otimizados para o espectrômetro de massas dependentes do analito.

<b>Analito</b>	<b>Íon Precursor (<i>m/z</i>)</b>	<b>Íon Produto (<i>m/z</i>)</b>	<b>Energia de colisão (<i>eV</i>)</b>
ENA	377,3	234,3	20
		116,9	40
MET	130,2	71,1	15
		60,1	25
PAR	151,9	110,0	15
		93,0	15
TC	445,0	410,0	10
		154,0	20

A ionização dos analitos mostrou-se mais adequada no modo positivo  $[M + H]^+$  com fonte de ionização *eletronspray*. As condições são apresentadas na tabela 8.

**Tabela 8.** Condições da fonte de ionização para os fármacos em estudo.

<b>Parâmetros</b>	<b>Otimização</b>
Temperatura de interface	350 °C
Temperatura DL	300 °C
Fluxo Gás de nebulização	3 L min <sup>-1</sup>
Fluxo gás de secagem	20 L min <sup>-1</sup>

## 5. 2 DETERMINAÇÃO DE ENA, MET, PAR E TC POR UHPLC-MS/MS

Para obtenção de um método mais adequado, foram testadas várias condições de fases móveis e gradientes. Dentre estas, algumas foram descartadas como, por exemplo, o uso do aditivo formiato de amônio, pois foi observado que interfere na resolução do pico da TC e tempo de retenção do PAR, que elui junto da TC. Após os testes, a melhor condição foi com um tempo de corrida (7 min), utilizando fase móvel 0,1% de ácido fórmico em água (Fase A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (Fase B). Na tabela 9 observa-se o gradiente de fase móvel mais adequado.

**Tabela 9.** Gradiente de fase móvel utilizada.

Tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0,01	98	2
1,00	98	2
1,10	85	15
4,00	85	15
4,50	50	50
5,00	20	80
5,50	20	80
5,51	98	2
7,00	98	2

A curva analítica foi determinada dentro da faixa de linearidade do método com concentração necessária para identificação e quantificação dos compostos. Para os limites de detecção e quantificação foram utilizadas concentrações na faixa de 0,5 a 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A tabela 10 mostra as curvas analíticas obtidas, bem como os limites de detecção e quantificação.

**Tabela 10.** Coeficientes de determinação ( $r^2$ ) das curvas analíticas (matriz), limite de detecção instrumental ( $\text{LOD}_i$ ), limite de detecção do método ( $\text{LOD}_m$ ) e quantificação instrumental ( $\text{LOQ}_i$ ) e do método ( $\text{LOQ}_m$ ) dos fármacos em estudo, em efluente hospitalar.

Composto	Coefficiente de determinação	Equação da reta	$\text{LOD}_i$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$\text{LOQ}_i$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$\text{LOD}_m$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$\text{LOQ}_m$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
ENA	0,9990	$y = 6.656,5 \times + 11.493,1$	$0,13 \pm 0,03$	$0,4 \pm 0,1$	$0,13 \pm 0,03$	$0,4 \pm 0,1$
MET	0,9998	$y = 2.811,4 \times + 517,3$	$0,6 \pm 0,03$	$1,6 \pm 0,4$	$0,6 \pm 0,03$	$1,6 \pm 0,4$
PAR	0,9985	$y = 976,6 \times - 1.591,7$	$0,9 \pm 0,4$	$2,8 \pm 0,5$	$0,018 \pm 0,008$	$0,056 \pm 0,001$
TC	0,9937	$y = 158,5 \times + 595,5$	$5,3 \pm 0,5$	$18,7 \pm 1,2$	$0,106 \pm 0,01$	$0,374 \pm 0,02$

A curva analítica construída para o ENA apresentou coeficiente de correlação semelhante a Lee *et al.* (2003) e López-Serna *et al.* (2012), em seus estudos com o fármaco encontraram coeficiente de relação 0,997 e 1.

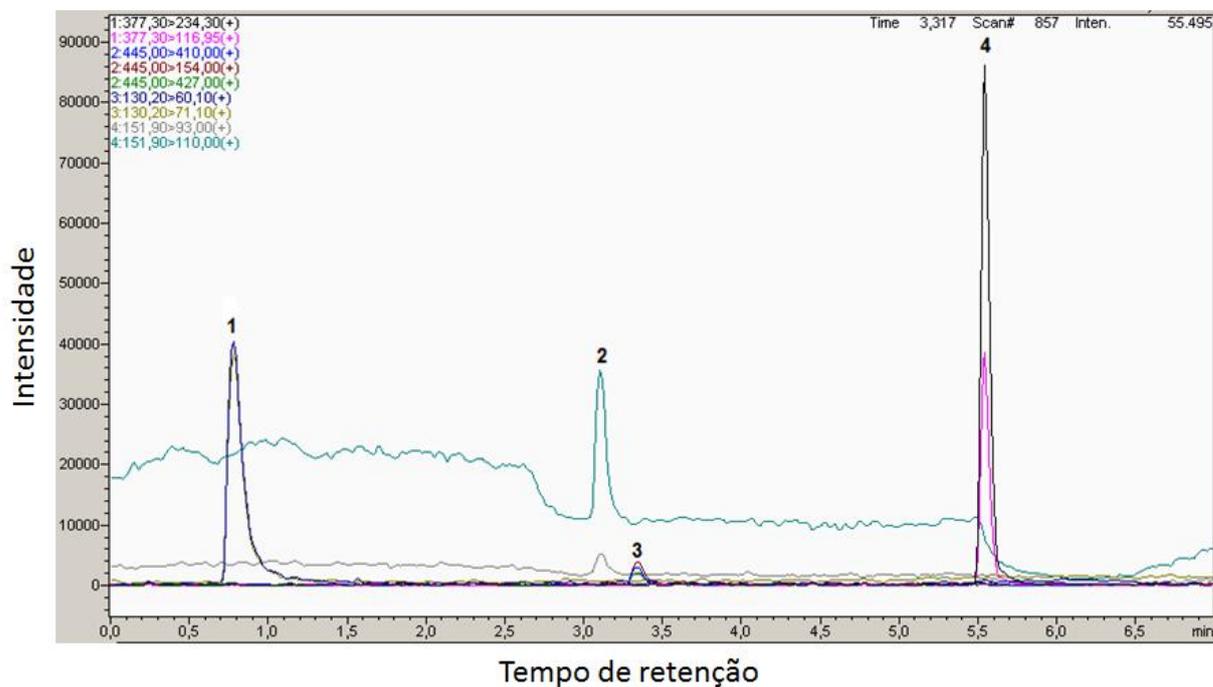
Hamdan *et al.* (2010) e Porta *et al.* (2008) determinam coeficiente de correlação de 0,99 e, Mroziak & Stefanska (2013) obtiveram coeficiente de correlação 0,97 para a metformina.

Deconinck *et al.* (2011) em seus experimentos com o fármaco paracetamol constatou como coeficiente de correlação ( $r^2$ ) 0,9998.

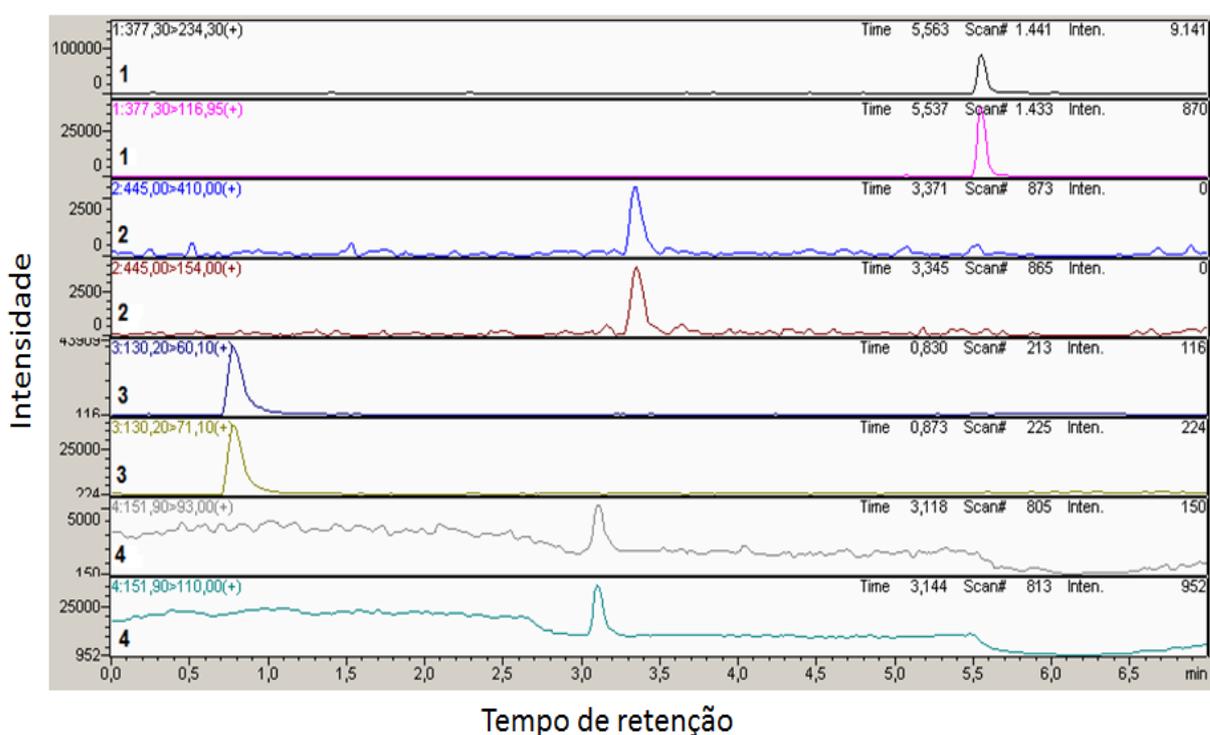
Para a tetraciclina Wu *et al.* (2011) apresentou coeficiente de correlação de 0,9960, LOD de 3,169  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e LOQ de 10,630  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

Conforme López-Serna *et al.* (2012) em seus estudos de determinação e validação de método analítico em cromatografia de fluxo turbulento acoplada a espectrometria de massa (TFC-LC-ESI-MS/MS) para fármacos, os autores determinaram os limites de detecção e quantificação de acordo com a razão sinal/ruído, sendo 3 para detecção e 10 para quantificação. Entre os 58 fármacos detectados em amostras de águas residuais, o paracetamol e o enalapril foram analisados. Os LOD foram inferiores a 5  $\text{ng L}^{-1}$  para 73% dos compostos e para 75% dos analitos os LOQ foram inferiores a 10  $\text{ng L}^{-1}$ . O método apresentou sensibilidade suficiente para as análises de fármacos deste tipo de amostras, no entanto, a tecnologia TFC foi considerada inadequada para amostras mais complexas tal como efluente bruto.

Nas figuras 12 e 13 tem-se o cromatograma dos respectivos compostos, em solução-padrão, na concentração 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  preparada com água ultrapura, onde podem ser observados os tempos de retenção de cada composto e seus fragmentos para quantificação e confirmação.



**FIGURA 12.** Cromatograma dos quatro analitos obtidos por UHPLC-MS/MS. (1) Metformina, (2) paracetamol, (3) tetraciclina e (4) enalapril. Na concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  preparada com água ultrapura.



**FIGURA 13.** Cromatograma com íons extraídos dos fármacos em estudo. (1) enalapril, (2) tetraciclina, (3) metformina e (4) paracetamol. Na concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  preparada com água ultrapura.

## 5.3 PREPARO DA AMOSTRA

### 5.3.1 Testes de pré-concentração em cartuchos SPE Strata™ X

A partir da solução padrão do princípio ativo de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  foram preparadas soluções intermediárias com água ultrapura, inicialmente solução de  $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  seguida por solução de  $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ . Os testes de pré-concentração foram realizados em triplicata.

No primeiro teste o cartucho SPE foi condicionado com 5 mL de metanol e 5 mL de água Milli-Q, em seguida foi pré concentrada a amostra de  $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  do fármaco tetraciclina em 100 vezes, ou seja, 100 mL da solução de  $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  foi passada pelo cartucho para concentração. Após foi efetuada a lavagem dos interferentes com 5 mL de água milli-Q, foi aplicado um fluxo de ar com seringa manual para retirada do solvente de lavagem, em seguida foi eluído o fármaco com  $2 \times 500 \text{ } \mu\text{L}$  de metanol utilizando método para melhor interação do metanol com a fase estacionária do cartucho e o fármaco.

No segundo teste o Cartucho SPE foi condicionado com 5 mL de metanol e 5 mL de água Milli-Q, em seguida foi pré concentrada a amostra de  $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  do fármaco tetraciclina em 100 vezes, anteriormente acidificada com solução de ácido fórmico 10%. Após foi efetuada a lavagem dos interferentes com 5mL de água milli-Q, foi aplicado fluxo de ar com seringa manual para retirada do solvente de lavagem, em seguida foi eluído o fármaco com  $2 \times 500 \mu\text{L}$  de metanol.

No terceiro teste, o Cartucho SPE foi condicionado com 5 mL de metanol e 5 mL de água Milli-Q, em seguida foi pré concentrada a amostra de  $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  do fármaco tetraciclina em 100 vezes, anteriormente acidificada com solução de ácido fórmico 10% levando-a a pH 3. Após foi efetuado a lavagem dos interferentes com 5 mL de água milli-Q, foi aplicado fluxo de ar com seringa manual para retirada do solvente de lavagem, em seguida foi eluído o fármaco com  $2 \times 500 \text{ } \mu\text{L}$  de metanol.

No quarto teste, o Cartucho SPE foi condicionado com 5 mL de metanol e 5 mL de água Milli-Q, em seguida foi pré concentrada a amostra de  $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  do fármaco tetraciclina em 100 vezes, anteriormente acidificada com solução de ácido fórmico 10% levando-a a pH 3. Após foi efetuado a lavagem dos interferentes com 5 mL de água milli-Q, foi aplicado fluxo de ar com seringa manual para retirada do solvente de lavagem, em seguida foi eluído o fármaco com  $2 \times 500 \text{ } \mu\text{L}$  de metanol com acetato de amônio  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ .

No quinto teste, o Cartucho SPE foi condicionado com 5 mL de metanol e 5 mL de água Milli-Q, em seguida foi pré concentrada a amostra de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  do fármaco tetraciclina em 100 vezes anteriormente acidificada com solução de ácido fórmico 10% levando-a a pH 3. Após foi efetuada a lavagem dos interferentes com 5 mL de água milli-Q, foi aplicado fluxo de ar com seringa manual para retirada do solvente de lavagem, em seguida foi eluido o fármaco com  $2 \times 500 \mu\text{L}$  de solução água/ acetonitrila (50:50) com  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de acetato de amônio.

Para todos os testes de pré-concentração em SPE foram feitas curvas analíticas para quantificação, sendo que as mesmas correspondem a faixa de concentração de 25 a  $125 \mu\text{g L}^{-1}$ . Dentre os testes de pré-concentração do fármaco tetraciclina, o que apresentou melhor resultado foi o teste quatro, com 105% de recuperação, já o primeiro teste não apresentou recuperação, o segundo 25%, o terceiro 42% e o quinto 48 % de recuperação.

Nos testes com o fármaco paracetamol também seguiram o mesmo modo de pré-concentração que os testes realizados com tetraciclina, porém todas as soluções pré-concentradas partiram da solução de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ . Sendo observado o melhor resultado no teste quatro com 93% de recuperação, onde a amostra foi acidificada com ácido fórmico até atingir pH 3 e a eluição do fármaco foi feita utilizando  $2 \times 500 \mu\text{L}$  de metanol com acetato de amônio  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ . A recuperação para o primeiro teste foi de 0%, para o segundo 63%, para o terceiro 35% e para o quinto teste recuperação foi de 32%. Da mesma forma, curvas de calibração com concentrações entre 5 a  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  foram realizadas para observar qual seria o melhor resultado dos testes.

Partindo do melhor resultado nos testes iniciou-se a pré-concentração das amostras dos choques de fármacos em efluente hospitalar, ressaltando que apenas as amostras que não foram quantificadas pelo método de diluição passaram pelo processo de concentração em SPE.

### 5.3.2 Extração em fase sólida

Por ser uma matriz complexa, o efluente hospitalar possui interferentes que dificultam a análise de fármacos. Portanto, para eliminação destes interferentes em amostras cuja concentração não foi detectada por UHPLC-MS/MS, optou-se pelo método de extração em fase sólida, utilizando cartuchos de SPE Strata<sup>TM</sup> X, fase estacionária do cartucho estireno

divinilbenzeno modificado, como descrito no item 5.3.1, onde se obteve 105% de recuperação para TC e 93% para PAR, com tal procedimento.

Essa técnica foi considerada necessária para pré-concentração e *clean-up* das amostras de TC e PAR após choque de fármacos em sistema de tratamento de efluente com biorreator de membranas.

Estudos sobre a determinação de fármacos utilizaram SPE para a extração destes (BISCEGLIA et al., 2010; YU & WU., 2011), sendo assim, foram efetuadas adequações de solventes e extrator de fase sólida para o método de extração SPE apresentar resultados satisfatórios.

### 5.3.3 Filtração dos fármacos em estudo

Foram feitos testes de filtração com as soluções padrão e o efluente, após passagem pelo sistema de tratamento de efluente com choque de fármaco. Os filtros utilizados foram os filtros de Nylon<sup>®</sup> (VRAKAS et al., 2008; GRACIA-LOR et al., 2010) e os filtros de membrana de PVDF (YU et al., 2012), para retirada de impurezas que poderiam interferir na análise. Após a filtração as amostras foram submetidas a análise em UHPLC-MS/MS. Na tabela 11 observa-se que o filtro de Nylon<sup>®</sup> reteve aproximadamente 40% do analgésico paracetamol e 95% do anti-hipertensivo enalapril, já o filtro de PVDF não possui poder de adsorção destes fármacos. Para o antimicrobiano tetraciclina e o hipoglicemiante metformina o filtro de Nylon<sup>®</sup> não apresentou adsorção. Sendo assim, o filtro de membrana de PVDF foi o que apresentou melhores resultados e foi o utilizado para filtrar as amostras.

**Tabela 11** - Dados do percentual de filtração dos fármacos com membrana de Nylon e PVDF.

Analito	Área			Recuperação (%)	
	Solução Sem Filtrar	Filtro Nylon	Filtro PVDF	Filtro Nylon	Filtro PVDF
PAR	2344072	1402002	2372355	59,8	101,2
TC	15699	15619	15778	99,5	100,5
MET	493609	525006	478064	106,4	96,9
ENA	632148	30105	629998	4,8	99,7

Han *et al.*, (2012) também observaram que o filtro de Nylon<sup>®</sup> removeu fármacos, o filtro removeu o hormônio estrona devido as interações do hidrogênio ao grupo OH do estrona e o carbono nucleofílico ligando ao grupos amida do Nylon<sup>®</sup>. Os autores verificaram a retenção do hormônio estrógeno ao avaliarem um sistema de microfiltração com filtros de polifluoreto de vinilideno (PVDF), politetrafluoretileno (PTFE) e Nylon<sup>®</sup>, seguido de análise da amostra de concentração 5 µg L<sup>-1</sup> em HPLC com coluna C18 e detector UV λ= 205 nm, como fase móvel utilizaram acetonitrila e água deionizada 45/55 (v/v).

#### **5.4-EFLUENTE HOSPITALAR E LEGISLAÇÃO**

Efluentes hospitalares são resíduos mais complexos do que esgotos domésticos (PAIVA *et al.*, 2009), por possuírem variados xenobióticos. Estes compostos farmacêuticos, oriundos diretamente ou indiretamente dos fármacos, acabam tendo como destino o ambiente, sejam eles fármacos ou seus produtos de degradação (GIL & MATHIAS, 2005).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) dispõe da Resolução (RDC) nº 306/04 que regulamenta o descarte de resíduos de serviços de saúde, onde permite que o descarte dos efluentes sanitários hospitalares seja feito em redes de esgoto, desde que os parâmetros atendam os limites ambientais estabelecidos.

A resolução nº 128/2006 do Conselho Estadual de Meio Ambiente – CONSEMA, da Secretaria do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul dispõe sobre a fixação de Padrões de Emissão de Efluentes Líquidos para fontes de emissão que lancem seus efluentes em águas superficiais no Estado do Rio Grande do Sul. A Resolução CONAMA 430/2011 dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes no Brasil. Os parâmetros físico-químicos avaliados (Tabela 12) do efluente hospitalar utilizado no processo de tratamento com choque de fármacos estão de acordo com os limites estabelecidos pelas normas. Porém estas não possuem regulamentação quanto a limites de fármacos em efluente.

**Tabela 12.** Comparação entre os resultados obtidos no monitoramento de parâmetros físico-químicos das amostras de efluente hospitalar bruto e tratado, conforme os limites máximos estabelecidos pelo CONSEMA 128/2006 e CONAMA 430/2011.

Parâmetro	Efluente Hospitalar bruto	Efluente tratado	Limites
DQO <sub>s</sub> (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	212,12	99,99	≤ 180
DQO <sub>total</sub> (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	685,0	49,54	≤ 400
Nitrogênio amoniacal (mg L <sup>-1</sup> )	52,52	11,13	20
Alcalinidade (mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	226,05	76,05	-
Sólidos Suspensos (mg L <sup>-1</sup> )	155,0	56,30	≤ 180
pH	7,0	7,6	5-9
Temperatura média (°C)	-	24	< 40

Nas análises realizadas com o efluente bruto foi detectado 7,5 µg L<sup>-1</sup> para PAR, 2,0 µg L<sup>-1</sup> para MET e 1,0 µg L<sup>-1</sup> para ENA, TC não foi detectada. Santos *et al.* (2011) analisando efluente hospitalar de categoria geral detectaram uma média 0,025 µg L<sup>-1</sup> de paracetamol, 1,35 µg L<sup>-1</sup> de metformina. Tetraciclina não foi detectada.

Em análises de efluente hospitalar Lin & Tsai (2009) detectaram paracetamol na concentração de 62,25 µg L<sup>-1</sup> e tetraciclina 0,089 µg L<sup>-1</sup>.

Verlicchi *et al.* (2012) detectaram a presença de fármacos em efluente hospitalar em concentração média para enalapril 0,18 µg L<sup>-1</sup>, para paracetamol 2,39 µg L<sup>-1</sup>, para tetraciclina 0,015 µg L<sup>-1</sup>, avaliando a presença dos fármacos em todas as estações do ano.

## 5.5- AVALIAÇÃO DE RISCOS ECOTOXICOLÓGICOS

O risco potencial para os fármacos em estudo foi avaliado por meio de seu quociente de risco (RQ), calculado como a razão entre MEC e PNEC. Valores de PNEC obtidos da literatura com base em dados de toxicidade relatada por vários organismos aquáticos, como: bactérias,

algas, invertebrados e peixes. Sendo que, espécies aquáticas apresentam sensibilidade para estudos de toxicidade a compostos como fármacos.

Uma análise de risco foi realizada com o efluente hospitalar trabalhado, analisando o percentual de concentração dos fármacos em estudo presentes no mesmo antes do processo de tratamento biológico associado a membranas, utilizando-se o quociente entre MEC/PNEC, tal como um marcador de risco para organismos aquáticos, como peixes e dáfias. Na tabela 13 são apresentados os valores de MEC obtidos com análise do efluente bruto, o PNEC reportado da literatura em análises com os mesmos compostos, porém em água superficial, e o risco ambiental de cada fármaco, no presente estudo.

**Tabela 13.** Concentração ambiental medida (MEC) e o quociente de risco (QR) dos fármacos em estudo.

Composto	MEC <sub>En</sub> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	PNEC ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	QR <sub>En</sub> (MEC/PNEC)
Ena	1,0 $\pm$ 0,4	346 <sub>c</sub>	0,003
Met	2,0 $\pm$ 0,7	130 <sub>c</sub>	0,01
Par	7,5 $\pm$ 0,1	9,2 <sub>a,b,c</sub>	0,815
TC	-	0,09 <sub>a,c</sub>	-

aGrung *et al.*, 2008; b Stuer-Lauridsen *et al.*, 2000; c Carlsson *et al.*, 2006

Comparando os resultados obtidos com o risco de toxicidade foi obtido que ENA e MET apresentam riscos mínimos aos organismos aquáticos. Já o PAR apresenta risco médio, já que seu quociente de relação foi maior que 0,1, conforme dados na literatura (ZHAO *et al.*, 2010).

Grung *et al.* (2008) avaliaram onze fármacos em amostras de efluentes de hospitais Noruegueses, em relação ao seu risco ambiental. No qual a ciprofloxacina, diclofenaco, etinilestradiol, sulfametoxazole e tetraciclina resultaram em valores de quociente de risco superiores a 1, apresentando risco de toxicidade ao meio ambiente.

## 5.6 PROCESSO COM CHOQUES DE FÁRMACOS

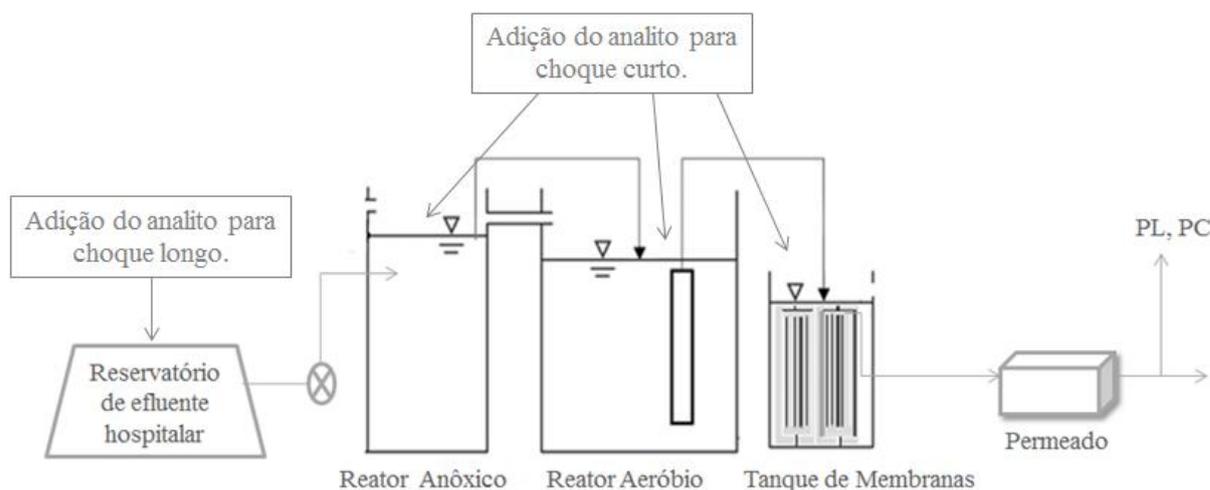
O processo de choque de fármacos avaliado neste trabalho ocorreu conforme descrito no item 4.2.8, de duas formas diferentes. No primeiro foi realizado teste de longa duração, onde o fármaco foi adicionado no início do processo ao reservatório contendo efluente bruto, sendo a concentração final alcançada de forma gradativa pela adição da solução padrão. No segundo, foi realizado teste de curta duração (pulso), pela adição de uma solução contendo toda a concentração do fármaco adicionada aos reatores de uma só vez. Para ambos os testes foram coletadas amostras nos pontos PL e PC.

Descrição dos pontos de coleta de amostras designados pelos seguintes códigos:

PL- Ponto de coleta de amostra no final do processo de tratamento de efluente após adição de fármaco no efluente bruto (choque longo).

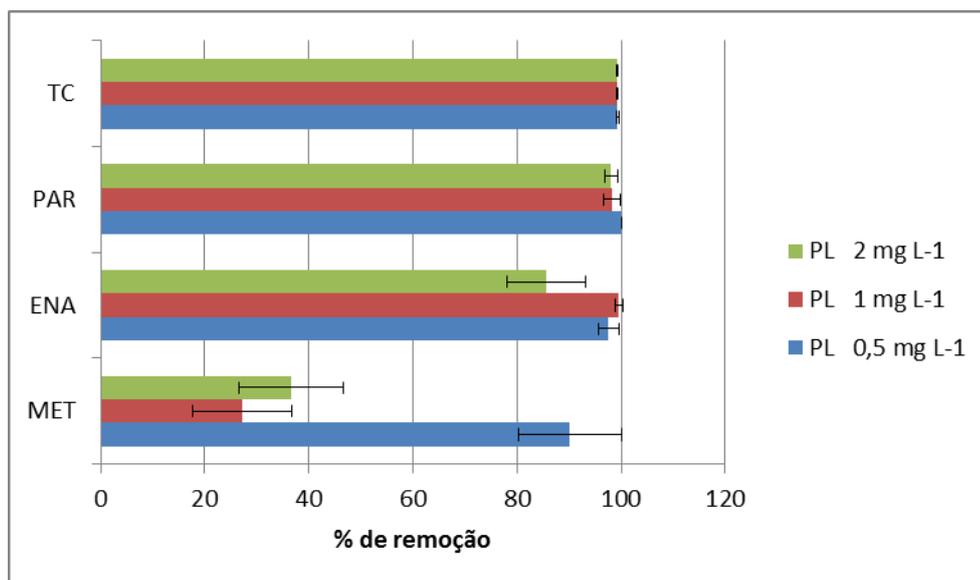
PC- Ponto de coleta de amostra no final do processo de tratamento de efluente após choque de fármaco realizado em todos os reatores ao mesmo tempo (choque curto).

A figura 14 apresenta os pontos de amostragem dos testes realizados.

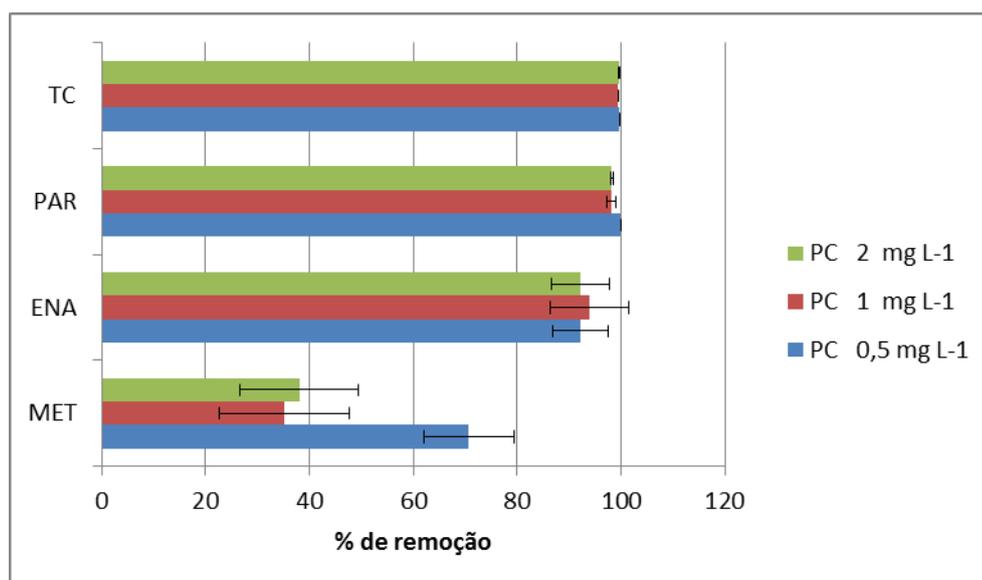


**Figura 14** – Pontos de amostragem do processo com MBR em efluente hospitalar.

De acordo com as figuras 15 e 16 pode ser observado o percentual médio da remoção de cada fármaco pelo sistema de tratamento experimental.



**Figura 15** – Percentual médio de remoção dos fármacos em estudo, após choque longo.



**Figura 16** – Percentual médio de remoção dos fármacos em estudo, após choque curto.

Os anexos 1, 2, 3 e 4 trazem as concentrações obtidas de cada fármaco após tratamento de efluente com MBR e análise realizada em triplicata no UHPLC-MS/MS, bem como, o percentual de remoção dos mesmos.

No processo experimental de tratamento de efluente hospitalar com choque de fármacos, a presença de interferentes pode ser considerada oriunda da degradação microbiológica (GUSSEME *et al.*, 2011; PAIVA *et al.*, 2011), facilidade de adsorção do lodo (MONSALVO *et al.*, 2014), exposição à luz (GARCIA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2013), os quais são prováveis fatores que influenciam na variação dos resultados.

A fim de avaliar a eficiência de tratamento de efluentes hospitalares em remoção de produtos farmacêuticos, tendo em vista que a matriz é altamente complexa, desenvolveu-se um estudo utilizando lodo ativado associado à biorreator de membranas (MBR). O processo de tratamento de efluente mostrou eficiência quanto à remoção de produtos farmacêuticos em efluente hospitalar. Sendo que, para o fármaco enalapril a remoção foi de 94,3% para teste com choque longo de fármaco e 92,8% no teste de fármaco com choque curto. Para metformina a remoção apresentou menor eficiência, foi de 57,4% ao choque longo e 49,8% no choque curto, a tetraciclina apresentou remoção de 99,4% no choque longo e 99,6% no choque curto e o paracetamol foi removido 98,8% em choque longo e 98,8% em choque curto, conforme tabelas em anexo, páginas 80,81,82 e 83.

Relacionando os resultados obtidos por Celiz *et al.* (2009) para o fármaco enalapril e os representados nas figuras 15 e 16, podemos concluir que os resultados apresentados são semelhantes, sendo que para os dois processos as membranas utilizadas foram de fibras ocas, havendo somente uma variação no tamanho do poro, a utilizada por Celiz e colaboradores possuía tamanho de poro de 0,4  $\mu\text{m}$ .

Para os demais fármacos avaliados o percentual de remoção apresentou pequenas variações quanto ao detalhado na literatura, considerando processos de tratamento de efluente (GARCIA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2013; MONSALVO *et al.*, 2014).

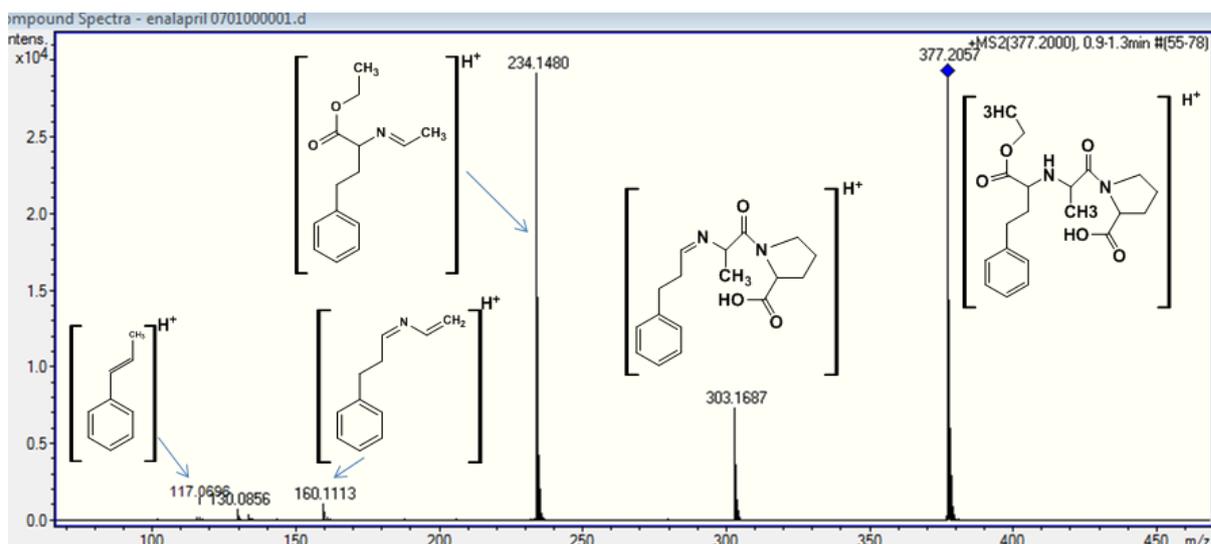
Monsalvo *et al.* (2014) estudaram a remoção de traços de compostos orgânicos após processo de tratamento de efluente com biorreator de membranas alimentado com lodo e água residual, e concentração inicial de 400 a 2400  $\text{ng L}^{-1}$  de compostos orgânicos dosados no processo. O resultado de remoção foi de 90% para 9 dos 38 compostos em análise, enquanto que 23 compostos apresentaram um percentual de remoção de 50% ou menos. Entre os compostos detectados, o processo apresentou eficiência em remoção de 36,6% de enalapril, 58,1% de paracetamol e 99,0% de metformina.

Carballa *et al.* (2006) estudaram a eficiência de um pré-tratamento térmico e alcalino sobre o comportamento de fármacos e produtos de higiene pessoal durante processo de digestão anaeróbia do lodo de esgoto. Adicionaram concentrações de 4 a 400  $\mu\text{g L}^{-1}$  de substâncias pertencentes a diferentes classes terapêuticas e avaliaram o percentual de remoção no final do processo, sendo que, o maior percentual de remoção no processo de tratamento anaeróbio foi alcançado pelos antimicrobianos e estrógenos naturais (>80 %).

Um estudo com lodo ativado e biorreator de membranas (MBR) foi avaliado quanto à remoção de produtos farmacêuticos em águas residuais, onde as análises foram realizadas por cromatografia a líquido e espectrometria de massas com triplo quadrupolo. Entre os fármacos investigados, o enalapril foi removido pelo sistema MBR no percentual de 95%. Em geral, os resultados indicaram que MBR tem uma maior eficiência na remoção de alguns fármacos polares em águas residuais (CELIZ *et al.*, 2009).

## 5.7 FRAGMENTAÇÃO DOS FÁRMACOS EM ESTUDO

A fragmentação dos fármacos enalapril, metformina, paracetamol e tetraciclina foi verificada após análises com injeção direta do fármaco em solução aquosa no equipamento MicroTOF-QII, em diferentes energias de colisão (5 a 40 eV), gerando os produtos de fragmentação de cada composto. O íon é induzido a colidir com o gás para promover a sua dissociação química (CID), os produtos dessa dissociação são transferidos para MS<sup>2</sup>, onde são separados por  $m/z$  (Ham, 2008). Sob essas energias aplicadas ao íon ionizado ocorreram as fragmentações que podem ser observadas nas figuras 17, 18, 19, 20. Entre as energias de colisões aplicadas para a dissociação do íon, obteve-se a melhor fragmentação nas energias de 20 eV e 25 eV. Na figura 17 pode ser observado a fragmentação do enalapril.

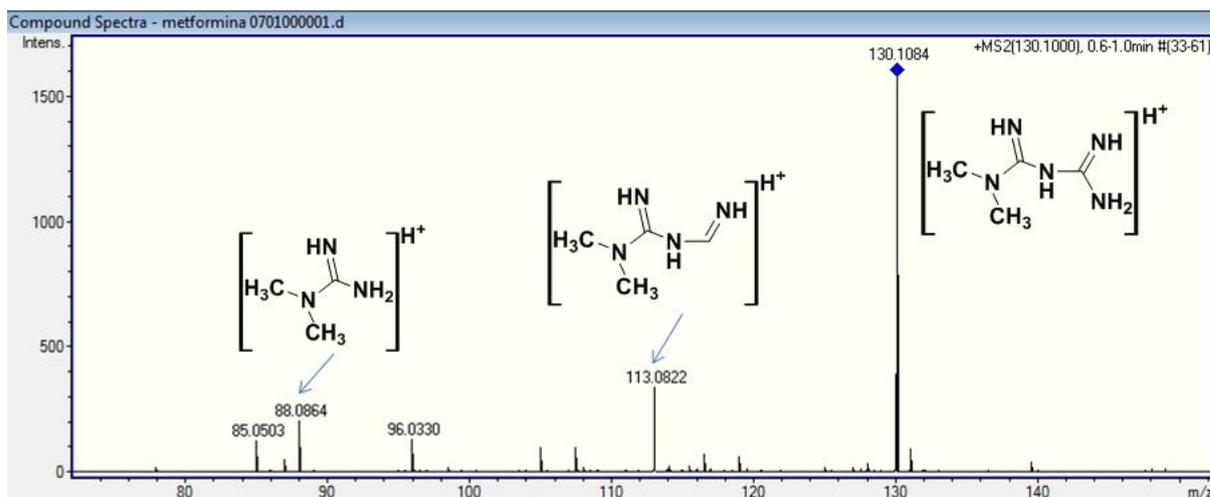


**Figura 17** – Espectro de enalapril com suas possíveis fragmentações.

Lee *et al.* (2003) quantificaram o fármaco enalapril em amostras de plasma humano utilizando método de pré-concentração em cartuchos SPE Oasis HLB, seguido de análise em

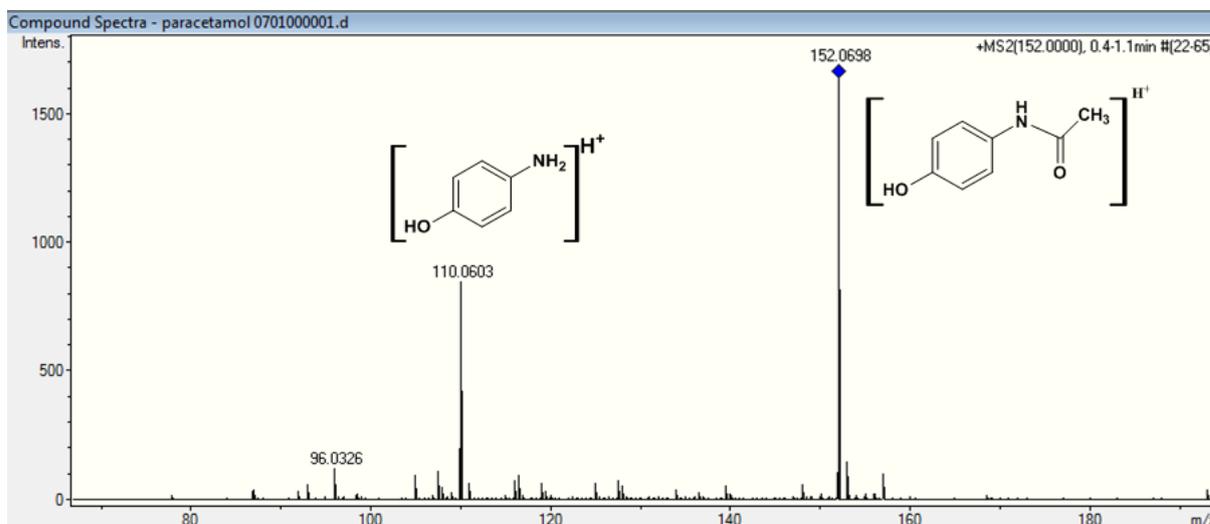
UHPLC-MS/MS e Espectrômetro de massa triplo quadrupolo, obtendo espectro semelhante ao encontrado neste trabalho com o mesmo fármaco analisado.

Para a metformina a possível fragmentação pode ser observada na figura 18. Esta fragmentação é semelhante a citada por Trautwein & Kummerer (2011) em testes de fotodegradação e biodegradação de MET, analisados por UHPLC-MS/MS.



**Figura 18** – Espectro da metformina com suas possíveis fragmentações.

Li *et al.* (2014) analisaram o fármaco paracetamol por LC-MS/MS para verificar sua presença em solo, bem como sua transformação. Encontraram oito produtos intermediários e, entre eles, os fragmentos apresentados na figura 19. O fármaco paracetamol também foi estudado por Kawabata *et al.* (2012) por meio de fotodegradação. Os autores obtiveram algumas fragmentações como as obtidas neste trabalho e apresentadas na figura 19.



**Figura 19** – Espectro de fragmentação do paracetamol.



**Tabela 14** - Possíveis fragmentações de cada fármaco, razão isotópica e diferença de ppm.

Íon Precursor m/z %	Razão Isotópica %	Composto elementar	Diferença ppm	Massa molar/ Fragmentação %
<b>ESI-MS (+)</b>				
377, 2057	378,2088 (20,61) 379,2108 (3,08)	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	5,16	303,1687 [M+H-C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> (25); 234,1480 [M+H-C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> (100); 160.1113 [M+H-C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>5</sub> ] <sup>+</sup> (3,56); 117,0696 [M+H-C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>+</sup> (0,50)
130,1084	131,1137 (5,79)	C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub>	6,69	130,1084 [M+H] <sup>+</sup> (100); 113,0822 [M+H-NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> (21,2); 88,0864 [M+H-CH <sub>2</sub> N <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> (12,8);
152,0698	153,0760 (1,04)	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>2</sub>	4,29	152,0698 [M+H] (100); 110,0603 [M+H-CH <sub>3</sub> CO] <sup>+</sup> (51,56);
445,1592	446,1620 (20,27) 447,1651 (4,25)	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	4,25	445,15,92 [M+H] <sup>+</sup> (100); 427,1478 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> (32,76); 410,1223 [M+H-H <sub>2</sub> O-NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> (87,24); 154,0496 [M+H-C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>5</sub> ] <sup>+</sup> (7,16)

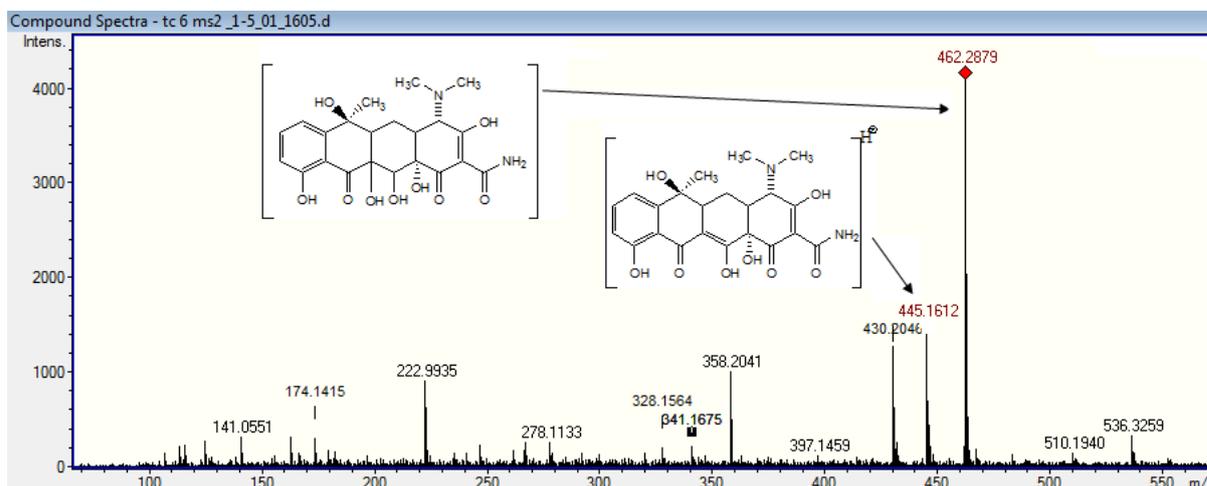
No espectro de massas o íon molecular apresenta-se em maior percentual, devido à forma ionizada do composto. Os fragmentos deste composto são responsáveis pelas demais fragmentações presentes no espectro com percentual menor (LEE 1998), como pode ser observado na tabela 14, onde o íon molecular apresenta percentual de fragmentação 100% e os demais fragmentos apresentam percentuais menores. Ainda pode ser observado na tabela a descrição da quebra/perda do composto.

## 5.8 PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

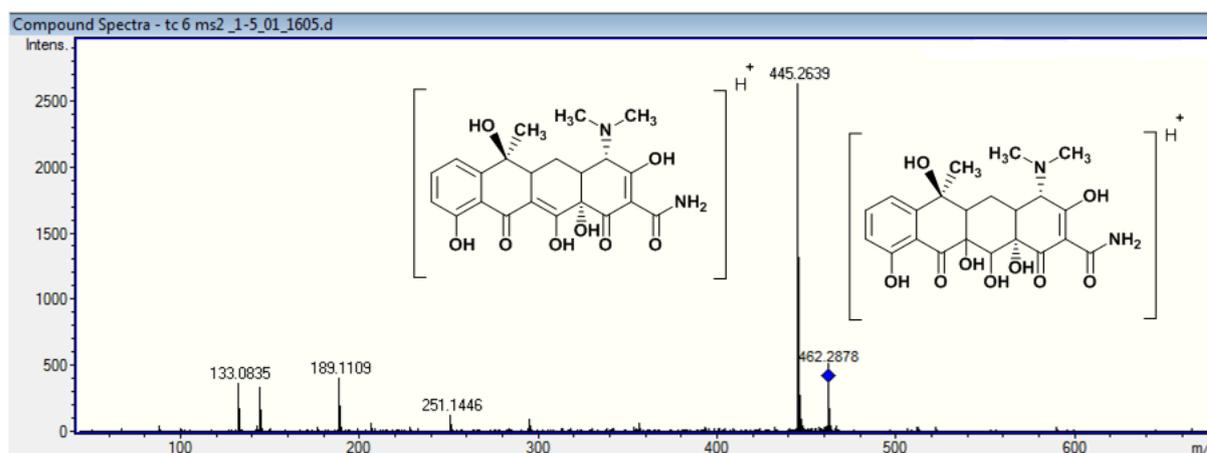
Para verificação dos produtos de degradação foram realizadas análises das amostras de efluente hospitalar após choque de fármacos. As amostras foram coletadas no final do processo (PL, PC), filtradas, diluídas e/ou pré-concentradas conforme identificação, posteriormente injetadas em UHPLC acoplado ao espectrômetro de massa MicroTOF-QII, com intuito de verificar possíveis produtos de degradação de cada fármaco. As amostras foram avaliadas em modo MS e MS<sup>2</sup>, para melhor confirmação do possível produto de degradação.

Ao analisar os espectros gerados, foi identificado que os fármacos enalapril, metformina e paracetamol não apresentavam produtos de degradação que tivessem o mesmo perfil de fragmentação de acordo com a solução padrão de cada composto que foi infundido, bem como de acordo com dados da literatura (PEREZ *et al.*, 2007; TRAUTWEIN & KUMMERER 2011; ZHANG *et al.*, 2013).

O metabólito/produto de degradação da tetraciclina de  $m/z$  462,29 foi encontrado na amostra de efluente, após choque de fármaco, com tempo de retenção de 6,2 min. Este composto, segundo Niu *et al.* (2013), é oriundo da hidroxilação da TC. Como proposto na figura 21 e 22, pode-se verificar o possível produto da tetraciclina obtido com energia de colisão de 20 eV.



**Figura 21.** Espectro de massa de MS da tetraciclina em efluente hospitalar.



**Figura 22** – Espectro de massa  $MS^2$  da tetraciclina em efluente hospitalar.

## 6. CONCLUSÕES

O método desenvolvido para a determinação por UHPLC-MS/MS e *clean-up*/pré-concentração de TC, PAR, ENA e MET em efluente hospitalar mostrou-se adequado e satisfatório. A validação mostrou que as faixas de recuperação variaram de 93 a 105%.

A análise de ENA, MET, PAR e TC em amostras do efluente hospitalar evidenciou a ocorrência destes fármacos no efluente na ordem de  $\mu\text{g L}^{-1}$ , exceto para TC, que não foi detectada.

A avaliação de risco de exposição ao ambiente (MEC/PNEC) mostrou que para ENA e MET o QR representa grau de risco baixo ao meio ambiente, e PAR apresenta risco médio. Através destes valores fica evidenciada a necessidade da realização de processos adequados de tratamento para efluente hospitalar, sendo que o mesmo apresenta vasta gama de xenobióticos.

O processo experimental de tratamento de efluente com sistema biológico associado a membranas mostrou-se eficiente quanto à remoção dos fármacos. Para o ENA a remoção foi de 94,3% em choque longo e 92,8% em choque curto. A remoção de MET no sistema de tratamento apresentou menor eficiência, a remoção foi 57,4% para choque longo e 49,8% para choque curto. PAR foi removido 98,8% em choque longo e choque curto, e a remoção de TC foi 99,4% para choque longo e 99,6% para choque curto.

Na análise de produtos de degradação detectou-se um possível produto da TC com  $m/z$  462. Não foi possível a determinação de compostos de degradação dos demais fármacos em estudo.

O lançamento de fármacos no ambiente, por meio do efluente hospitalar, merece atenção, para tanto, soluções de remediação devem ser tomadas.

## 7. SUGESTÕES

Este trabalho sugere para estudos futuros, pesquisas com a finalidade de explicar ainda melhor os resultados obtidos em trabalhos utilizando sistemas de tratamento de efluentes com choques de fármacos:

- buscar novos processos de tratamento de efluentes;
- estudar toxicidade dos compostos, bem como dos intermediários ou produtos de degradação formados;
- realizar testes de adsorção em lodo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABHILASH, T. N.; Pharmaceuticals in Environment: A review on its effect. **Research Journal of Chemical Science**, 2, 103-105, 2012.

ADEDEJI, H.A.; ISHOLA, I.O.; ADEYEMI, O.O.; Novel action of metformin in the prevention of haloperidol-induced catalepsy in mice: Potential in the treatment of Parkinson's disease? **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, 48, 245–251, 2014.

AL-OMARI, M.M.; ABDELAH, M.K.; BADWAN, A.A.; JABER, A.M.Y.; Effect of the drug-matrix on the stability of enalapril maleate in tablet formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 25, 893–902, 2001.

AMORIM, L.C., MAIA, S.A., MESQUITA, B.R.R., RANGEL, O.S.S.A., VAN LOOSDRECHT, C.M.M., TIRITAN, E.M., CASTRO, M.L.P., Performance of aerobic granular sludge in a sequencing batch bioreactor exposed to ofloxacin, norfloxacin and ciprofloxacin. **Water Research**, 50, 101-113, 2014.

ANDREOZZI, R.; MAROTTA, R.; PAXÉUS, N.; Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. **Chemosphere**, 50, 1319-1330, 2003.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 27/2007, de 30 de março de 2007**. Disponível em: [www.anvisa.gov.br/sngpc/relatorio\\_2009](http://www.anvisa.gov.br/sngpc/relatorio_2009) Acesso em: 04/02/14.

ÁVILA, C.; REYES, C.; BAYONA, J. M.; GARCÍA J.; Emerging organic contaminant removal depending on primary treatment and operational strategy in horizontal subsurface flow constructed wetlands: Influence of redox. **Water research**, 47, 315-325, 2013.

BAKER, D.R.; KASPRZYK-HORDERN, B.; Critical evaluation of methodology commonly used in sample collection, storage and preparation for the analysis of pharmaceuticals and illicit drugs in surface water and wastewater by solid phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1218, 8036–8059, 2011.

BENDZ, D.; PAXÉUS, N. A.; GINN, T. R.; LOGE, F. J.; Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Hoje River in Sweden. **Journal of Hazardous Materials**, 122, 195-204, 2005.

BENGTSSON, B. E.; BERGQVIST J.; BJORLENIUS B.; BREITHOLTZ M.; CASTENSSON S.; FICK J.; FORLIN L.; GEE D.; GUNNARSOON B.; JAHANSOON N.; KALLENBORN R.; LARSSON J.; LUNDGREN A.; MOLIBY R.; NORRGREN L.; TYSKLIND M.; WAHLBERG C.; WENNMALM A.; **Environment and Pharmaceuticalls**. 2006.

BHARDWAJ, S.P.; SINGH, S.; Study of forced degradation behavior of enalapril maleate by LC and LC–MS and development of a validated stability-indicating assay method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 46, 113–120, 2008.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M.; Fármacos no Meio Ambiente. **Química Nova**, 26, 523-530, 2003.

BISCEGLIA, K.J.; YU, J.T.; COELHAN, M.; BOUWER, E.J.; ROBERTS, A.L.; Trace determination of pharmaceuticals and other wastewater-derived micropollutants by solid phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1217, 558–564, 2010.

BUCHBERGER, W.W., Current approaches to trace analysis of pharmaceuticals and personal care products in the environment. **Journal of Chromatography A**, 1218, 603-618, 2011.

BUENO, M.J.M.; ULASZEWSKA, M.M.; M.J. GOMEZ, M.J.; HERNANDO, M.D.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R.; Simultaneous measurement in mass and mass/mass mode for accurate qualitative and quantitative screening analysis of pharmaceuticals in river water. **Journal of Chromatography A**, 1256, 80–88, 2012.

CALAMARI, D.; ZUCCATO, E.; CASTIGLIONI, S.; BAGNATI, R.; FANELLI, R.; Strategic Survey of Therapeutic Drugs in the Rivers Po and Lambro in Northern Italy. **Environmental Science Technology**, 37, 1241-1248, 2003.

CARBALLA, M.; OMIL, F.; ALDER, A.C.; LEMA, J.M.; Comparison between the conventional anaerobic digestion of sewage sludge and its combination with a chemical or thermal pre-treatment concerning the removal of pharmaceuticals and personal care products. **Water Science & Technology**, 8, 109-117, 2006.

CARLSSON, C.; JOHANSSON, A-K.; ALVAN, G.; BERGMAN, K.; KUHLE, T.; Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. **Science of the Total Environment**, 364, 67– 87, 2006.

CASTIGLIONI, S.; BAGNATI, R.; CALAMARI, D.; FANELLI, R.; ZUCCATO, E.; A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. **Journal of Chromatography A**, 1092, 206–215, 2005.

CASTIGLIONI, S.; BAGNATI, R.; FANELLI, R.; POMATI, F.; CALAMARI, D.; ZUCCATO, E.; Removal of Pharmaceuticals in Sewage Treatment Plants in Italy. **Environmental Science Technology**, 40, 357-363, 2006.

CELIZ, M.D.; PÉREZ, S.; BARCELÓ, D.; AGA, D.S.; Trace Analysis of Polar Pharmaceuticals in Wastewater by LC–MS–MS: Comparison of Membrane Bioreactor and Activated Sludge Systems. **Journal of Chromatographic Science**, 47, 2009.

CERMOLA, M.; DELLAGRECA, M.; IESCE, M. R.; PREVITERA, L.; RUBINO, M.; TEMUSSI, F.; BRIGANTE, M.; Phototransformation of fibrates drugs in aqueous media. **Environmental Chemistry Letter**, 3, 43-47, 2005.

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Disponível: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/informacoes.asp>. Acesso:15/01/2014.

CONAMA – Conselho Nacional do meio ambiente. Resolução nº 430-2011. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646> Acesso em: 20/01/2014.

CONSEMA – Conselho Estadual do Meio Ambiente, Rio Grande do Sul. Resolução nº 128/2006.

CUDERMAN, P.; HEATH, E.; Determination of UV filters and antimicrobial agents in environmental water samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 387, 1343–1350, 2007.

DANG, H.Q.; NGHIEM, L.D.; PRICE, W.E.; Factors governing the rejection of trace organic contaminants by nanofiltration and reverse osmosis membranes. **Desalination and Water Treatment**, 52, 4-6, 2014.

DECONINCK, E.; SACRE, P.Y.;BAUDEWYNS, S.; COURSELLE, P.; DE BEER, J.; A fast ultra high pressure liquid chromatographic method for qualification and quantification of pharmaceutical combination preparations containing paracetamol, acetyl salicylic acid and/or antihistaminics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 56, 200–209, 2011.

DELLA GIUSTINA, S.; Avaliação respiratória de reatores biológicos associados à membranas no tratamento de efluentes hospitalares sob condições de choque de fármacos. (Doutorado em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

DIEGO, M.; GODOY, G.; MENNICKENT, S.; GODOY, R.; Chemical stability of enalapril maleate drug substance and tablets by a stability-indicating liquid chromatographic method. **Química Nova**, 34, 450-454, 2011.

DING Y.X.; HONG C.J.; LIU Y.; GU L.Z.; XING K.L.; ZHU A.J.; CHEN W.L.; SHI L.S.; ZHANG Q. Pharmacokinetics, tissue distribution, and metabolites of a polyvinylpyrrolidone-coated norcantharidin chitosan nanoparticle formulation in rats and mice, using LC-MS/MS. **International Journal of Nanomedicine**, 7, 1723-1735, 2012.

DVORÁK, L.; SVOJITKA, J.; WANNER, J.; WINTGENS, T.; Nitrification performance in a membrane bioreactor treating industrial wastewater. **Water Research**, 47, 4412-4421, 2013.

EGGEN, T.; ASP, T. N.; GRAVE, K.; HORMAZABAL, V.; Uptake and translocation of metformin, ciprofloxacin and narasin in forage and crop plants. **Chemosphere**, 85, 26-33, 2011.

EMA – Europe Medicines Agency, 2006. Committee for medicinal products for human use (CHMP). Doc. Ref. EMA/CHMP/SWP/4447/00. [www.ema.europa.eu/pdfs/human/swp/444700en.pdf](http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/swp/444700en.pdf). Acesso: 14/01/2014

EMA/MRL/023/95. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Committee for Veterinary Medicinal Products. Oxytetracycline, Tetracycline, chlortetracycline, Summary Report (3), [http://www.ema.europa.eu/pdfs/vet/mrls/Tetracyclines\(3\)02395.pdf](http://www.ema.europa.eu/pdfs/vet/mrls/Tetracyclines(3)02395.pdf). Acesso: 21/01/2014.

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

FARRÉ, M.; PÉREZ, S.; KANTIANI, L.; BARCELÓ D.; Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment, **Trends in Analytical Chemistry**, 27, 991-1007, 2008b.

FARRÉ, M.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D.; Recently developed GC/MS and LC/MS methods for determining NSAIDs in water samples. **Analytical & Bioanalytical Chemistry**, 387, 1203-1204, 2007b.

FARRÉ, M.; PETROVIC, M.; GROS, M.; KOSJEK, T.; MARTINEZ, E.; HEATH, E.; OSVALD, P.; LOOS, R.; LE MENACH, K.; BUDZINSKI, H.; DE ALENCASTRO, F.; MULLER, J.; KNEPPER, T.; FINK, G.; TERNES, T.A.; ZUCCATO, E.; KORMALI, P.; GANS, O.; RODIL, R.; QUINTANA, J.B.; PASTORI, F.; GENTILI, A.; BARCELO, D.; First interlaboratory exercise on non-steroidal anti-inflammatory drugs analysis in environmental samples. **Talanta**, 76, 580-590, 2008.

FATTA, D.; NIKOLAOU, A.; ACHILLEOS, A.; MERIC, S.; Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. **Trends in Analytical Chemistry**, 26, 6, 2007.

FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D.; Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, 76, 122-159, 2006.

FOCAZIO, M.J.; KOLPIN, D.W.; BARNES, K.K.; FURLONG, E.T.; MEYER, M.T.; ZAUGG, S.D.; BARBER, L.D.; THURMAM, M.E.; A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States – II) Untreated drinking water sources, **Science of the Total Environment**, 402, 201-216, 2008.

GARCIA-AC, A.; SEGURA, P.A.; VIGLINO, L.; FÜRTÖS, A.; GAGNON, C.; PRÉVOST, M.; SAUVÉ, S.; On-line solid-phase extraction of large-volume injections coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the quantitation and confirmation of 14 selected trace organic contaminants in drinking and surface water. **Journal of Chromatography A**, 1216, 8518-8527, 2009.

GARCIA-RODRÍGUEZ, A.; MATAMOROS, V.; FONTÀS, C.; SALVADÓ, V.; The influence of light exposure, water quality and vegetation on the removal of sulfonamides and tetracyclines: A laboratory-scale study. **Chemosphere**, 90, 2297-2302, 2013.

GARRISON, A. W.; POPE, J. D.; ALLEN, F. R.; Identification and Analysis of Organic Pollutants in Water; Keith, C. H., ed.; Ann Arbor Science Publishers: Ann Arbor, 30, 1976.

GIL, E. S.; MATHIAS, R. O.; Classificação e riscos associados aos resíduos químicos – farmacêuticos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, 2, 87-93, 2005.

GIMENO, S.; KOMEN, H.; JOBLING, S.; SUMPTER, J.; BOWMER, T.; Demasculinisation of sexually mature male common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during Spermatogenesis. **Aquatic Toxicology**, 43, 93-109, 1998.

GOODMAN & GILMAN, As bases Farmacológicas da Terapêutica. **McGraw-Hill**, Rio de Janeiro, 2006.

GRACIA-LOR, E.; SANCHO, V. J.; HERNÁNDEZ F.; Simultaneous determination of acidic, neutral and basic pharmaceuticals in urban wastewater by ultra high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1217, 622–632, 2010.

GROS, M.; PETROVIĆ, M.; BARCELÓ, D.; Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. **Talanta**, 70, 678–690, 2006.

GROS, M.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D.; Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.072>.

GROS, M.; PETROVIĆ, M.; GINEBREDA, A.; BARCELÓ, D.; Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. **Environment International**, 36,15–26, 2010.

GRUNG, M.; KALLQVIST, T.; SAKSHAUG, S.; SKURTVEIT, S.; THOMAS, K.V.; Environmental assessment of Norwegian priority pharmaceuticals based on the EMEA guideline. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 71, 328–340, 2008.

GUIMARÃES, S.; MOURA, D.; SILVA, P.; Terapêutica Medicamentosa e suas bases farmacológicas, Porto, **Porto editora**, 2006.

GUSSEME, B.D.; VANHAECKE, L.; VERSTRAETE, W.; BOON, N.; Degradation of acetaminophen by *Delftia tsuruhatensis* and *Pseudomonas aeruginosa* in a membrane bioreactor. **Water Research**, 45, 1829-1837, 2011.

HALLING-SORENSEN, B.; NIELSEN, S. N.; LANZKY, P. F.; INGERSLEV, F.; HOLTEN-LUTZHOFT, H. C.; JORGENSEN, S. E.; Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment-A Review. **Chemosphere**, 36, 357-393, 1998.

HAM, B.M. Even Electron Mass Spectrometry with biomolecules Applications. **WileyBlackwell**, England, 2008.

HAMDAN, I.I; BANI JABER, A.K.B.; ABUSHOFFA, A.M.; Development and validation of a stability indicating capillary electrophoresis method for the determination of metformin hydrochloride in tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 53, 1254–1257, 2010.

HAN, J.; QIU, W.; HU, J.; GAO, W.; Chemisorption of estrone in nylon microfiltration membranes: Adsorption mechanism and potential use for estrone removal from water. **Water Research** 46, 873-881, 2012.

HEBERER, T.; Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. **Toxicology Letters**,131, 5-17, 2002<sub>a</sub>.

HEBERER, T.; Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. **Journal of Hydrology**, 266, 175-189, 2002<sub>b</sub>.

HERNANDEZ, F.; SANCHO, J.V.; GUERRERO, M.I.C.; Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. **Trends in Analytical Chemistry**, 26,466, 2007.

HIGNITE, C.; AZARNOFF, D. L.; Drugs and Drug Metabolites as Environmental Contaminants: Chlorophenoxyisobutyrate and Salicylic Acid in Sewage Water Effluent. **Life Sciences**, 20, 337-342, 1977.

HOLLER, F.J.; SKOOG, A.D.; CROUCH, R.S.; Princípios de Análise Instrumental. 6ed. Porto Alegre, **Bookman**, 11, 296-316,2009.

HU, L.; YANG, X.; WANG,X.; ZHU, J.; TONG, S.; CAO, G.; Rapid LC-APCI-MS-MS Method for Simultaneous Determination of Phenacetin and Its Metabolite Paracetamol in Rabbit Plasma. **Chromatographia**, 70, 3-4, 2009.

HUERTA-FONTELA, M; GALCERAN T.M.; MARTIN-ALONSO, J.; VENTURA F.; Occurrence of psychoactive stimulatory drugs in wastewaters in north-eastern Spain **Science of the Total Environment**, 397, 31-40, 2008.

IBGE– Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. Disponível: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoodevida/pnsb2008/PNSB\\_2008](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoodevida/pnsb2008/PNSB_2008). Acesso: 06/04/2013.

IBÁÑEZ, M.; GRACIA-LOR, E.; BIJLSMA, L.; MORALES, E.; PASTOR, L.; HERNÁNDEZ, F.; Removal of emerging contaminants in sewage water subjected to advanced oxidation with ozone. **Journal of Hazardous Materials**, 260, 389–398, 2013.

INMETRO Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; Orientação sobre validação de métodos analíticos, 4ª ed., 2011. Disponível: [http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8\\_04.pdf](http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf). Acesso:18/05/13.

JIA, A.; XIAO, Y.; HU, J.; ASAMI, M.; KUNIKANE, S.; Simultaneous determination of tetracyclines and their degradation products in environmental waters by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1216, 4655–4662, 2009.

JIAO, S.; ZHENG, S.; YIN, D.; WANG, L.; CHEN, L.; Aqueous photolysis of tetracycline and toxicity of photolytic products to luminescent bacteria. **Chemosphere**, 73, 377–382, 2008.

JORGENSEN, S.E.; HALLING-SORENSEN, B.; Drug in the environment. **Chemosphere**, 40, 691-699, 2000.

KAMEL, A.M.; BROWN, P.R.; MUNSON, B.; Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Tetracycline, Oxytetracycline, Chlorotetracycline, Minocycline, and Methacycline. **Analytical Chemistry**, 71, 968-977, 1999.

KAMEL, M.A.; FOUUDA, G.H.; Mass Spectral Characterization of Tetracyclines by Electrospray Ionization, H/D Exchange, and Multiple Stage Mass Spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, 13, 543–557, 2002.

KANG, I. J.; YOKOTA, H.; OSHIMA, Y.; TZURUDA, Y.; YAMAGUCHI, T.; MAEDA, M.; IMADA, N.; TADOKORO, H.; HONJO, T.; Effect of 17  $\beta$ -estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Chemosphere**, 47, 71-80, 2002.

KAWABATA, K.; SUGIHARA, K.; SANOH, S.; KITAMURA, S.; OHTA, S.; Ultraviolet-photoproduct of acetaminophen: Structure determination and evaluation of ecotoxicological effect. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry** 249, 29–35, 2012.

KIM, S.D.; CHO, J.; KIM, I.S.; VANDERFORD, B.J.; SNYDER, S.A.; Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. **Water Research**, 41, 1013–1021, 2007.

KIM, I.; YAMASHITA, N.; TANAKA, H.; Performance of UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> processes for the removal of pharmaceuticals detected in secondary effluent of a sewage treatment plant in Japan, **Journal of Hazardous Materials**, 166, 1134–1140, 2009.

KOLPIN, D. W.; FURLOG, E. T.; MEYER, M. T.; THURMAN, E. M.; ZAUGG, S. D.; BARBER, L. B.; BUXTON, H. T.; Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. **Environmental Science & Technology**, 36, 1202-1211, 2002.

KOVALOVA, L.; SIEGRIST, H.; SINGER, H.; WITTMER, A.; MCARDELL, C.S.; Hospital Wastewater Treatment by Membrane Bioreactor: Performance and Efficiency for Organic Micropollutant Elimination. **Environmental Science & Technology**, 46, 1536–1545, 2012.

KÓREJE, K.O.; DEMEESTERE, K.; DE WISPELAERE, P.; VERGEYNST, L.; DEWULF, J.; LANGENHOVE, H.V.; From multi-residue screening to target analysis of pharmaceuticals in water: Development of a new approach based on magnetic sector mass spectrometry and application in the Nairobi River basin, Kenya. **Science of the Total Environment**, 437, 153–164, 2012.

KOSJEK, T.; HEATH, E.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D.; Mass spectrometry for identifying pharmaceutical biotransformation products in the environmental. **Trends in Analytical Chemistry**, 26, 1076-1085, 2007.

LACORTE, S.; FERNANDEZ-ALBA, A.R.; Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food. **Mass Spectrometry Reviews**, 25, 866-880, 2006.

LAM, M. W.; MABURY, S. A.; Photodegradation of the pharmaceuticals atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole in natural waters. **Aquatic Sciences**, 67, 177-188, 2005.

LANÇAS, F. M.; Validação de métodos cromatográficos de análise. São Carlos, SP: Ede. Acta, 2004.

LATORRE, C.H.; GARCÍA, J.B.; MARTÍN, S.G.; CRECENTE, R.M.P.; Solid phase extraction for the speciation and preconcentration of inorganic selenium in water samples: A review. **Analytica Chimica Acta**, 804, 37–49, 2013.

LEE, A.T.; A Beginner's Guide to Mass Spectral Interpretation. Middle Tennessee State University, Department of Chemistry, Murfreesboro, USA, pag.1-4, 1998.

LEE, H-W.; PARK, W-S.; CHO, S-H.; KIM, M-H.; SEO, J-H.; KIM, Y-W.; KIM, S-S.; LEE, Y-S.; LEE, K-T.; A liquid chromatography/positive ion tandem mass spectrometry method for the determination of cilazapril and cilazaprilat in human plasma. **Talanta**, 71 62–67, 2007.

LI, J.; YE, Q.; GAN, J.; Degradation and transformation products of acetaminophen in soil. **Water Research** 49, 44-52, 2014.

LIN, A.Y.-C.; TSAI, Y.-T.; Occurrence of pharmaceuticals in Taiwan's surface waters: impact of waste streams from hospitals and pharmaceutical production facilities. **Science of the Total Environment**, 407, 3793–3802, 2009.

LINDQVIST, N.; TUHKANEN, T.; KRONBERG, L.; Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters. **Water Research**, 39, 2219-2228, 2005.

LÓPEZ-SERNA, R.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D.; Direct analysis of pharmaceuticals, their metabolites and transformation products in environmental waters using on-line TurboFlow<sup>TM</sup> chromatography–liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1252, 115–129, 2012.

LOW, L. K. Em Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry; Delgado, J. N.; Remers, W. A., eds.; **Lippincott Williams & Wilkins**: Philadelphia, 1998.

MAGUREANU, M.; DOBRIN, D.; MANDACHE, N.B.; BRADU, C.; MEDVEDOVICI, A.; PARVULESCU, V.I.; The Mechanism of Plasma Destruction of Enalapril and Related Metabolites in Water. **Plasma Processes and Polymers**, 10, 459–468, 2013.

MARIÑO G. I.; QUINTANA B. J.; RODRÍGUEZ I.; CELA R.; Determination of drugs of abuse in water by solid-phase extraction, derivatisation and gas chromatography–ion trap–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 2010, 1748–1760.

MARTA, C.; JOSE, A.; JESUS, L.M.; Physicochemical stability of captopril and enalapril extemporaneous formulations for pediatric patients. **Pharmaceutical development and technology**, 1-8, 2013.

MBOULA, V.M.; HEQUET, V.; GRU, Y.; COLIN, R.; ANDRES, Y.; Assessment of the efficiency of photocatalysis on tetracycline biodegradation. **Journal of Hazardous Materials**, 209, 355–364, 2012.

MOHAMMED, B.; AMINA, D.; SAMIRA, G.; Global Approach and Targeted Approach in the Management of Hospital Effluents. **Journal of Materials Science and Engineering B**, 3, 214–225, 2013.

MONSALVO, V.M.; MCDONALD, J.A.; KHAN, S.J.; LE-CLECH, P.; Removal of trace organics by anaerobic membrane Bioreactors. **Water Research**, 49, 103–112, 2014.

MROZIK, W.; STEFANSKA, J.; Adsorption and biodegradation of antidiabetic pharmaceuticals in soils. **Chemosphere**, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.09.012>

MULROY, A.; When the cure is the problem. **Water Environmental & Technology**, 13, 32–36, 2001.

NEBOT, C.; GIBB, S.W.; BOYD, K.G.; Quantification of human pharmaceuticals in water samples by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 598, 87–94, 2007.

NIU, J.; LI, Y.; WANG, W.; Light-source-dependent role of nitrate and humic acid in tetracycline photolysis: Kinetics and mechanism. **Chemosphere**, 92, 1423–1429, 2013.

NURMI, J.; PELLINEN, J.; RANTALAINEN, A-L.; Critical evaluation of screening techniques for emerging environmental contaminants based on accurate mass measurements with time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, 47, 303–312, 2012.

OOSTERHUIS, M.; SACHER, F.; LAAK, T.L.; Prediction of concentration levels of metformin and other high consumption pharmaceuticals in wastewater and regional surface water based on sales data. **Science of the Total Environment**, 442, 380–388, 2013.

PAIVA, F.V.; SOUZA, N.C.; VAN HAANDEL, A.C.; Identificação de compostos orgânicos e farmacêuticos em esgoto hospitalar utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. Artigo Técnico: **Engenharia Sanitária Ambiental**, 16, 37–44, 2011.

PAMREDDY, A.; HIDALGO, M.; HAVEL, J.; SALVADÓ, V.; Determination of antibiotics (tetracyclines and sulfonamides) in biosolids by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1298, 68–75, 2013.

PAROLINI, M.; BINELLI, A.; COGNI, D.; RIVA, C.; PROVINI, A.; An in vitro biomarker approach for the ecotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), **Toxicology in Vitro**, 23, 935–942, 2009.

PATROLECCO, L.; ADEMOLLO, N.; GRENNI, P.; TOLOMEI, A.; CARACCIOLO, A.B.; CAPRI, S.; Simultaneous determination of human pharmaceuticals in water samples by solid phase extraction and HPLC with UV-fluorescence detection. **Microchemical Journal**, 107, 165–171, 2013.

PEDROUZO M.; BORRUL F.; POCURULL E.; MARCE M. R.; Drugs of abuse and their metabolites in waste and surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal de Separation Science**, 34, 1091–1101, 2011.

PÉREZ, S.; EICHHORN, P.; BARCELÓ, D.; Structural Characterization of Photodegradation Products of Enalapril and Its Metabolite Enalaprilat Obtained under Simulated Environmental Conditions by Hybrid Quadrupole-Linear Ion Trap-MS and Quadrupole-Time-of-Flight-MS. **Analytical Chemistry**, 79, 21-1, 2007.

PETRIELLO, M.C.; NEWSOME, B.J.; DZIUBLA, T.D.; HILT, J.Z.; BHATTACHARYYA, D.; HENNIG, B.; Modulation of persistent organic pollutant toxicity through nutritional intervention: Emerging opportunities in biomedicine and environmental remediation. **Science of the Total Environment**, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.109>

PETROVIC, M.; CRUZ, H.M.S.; BARCELÓ, D.; Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. **Journal of Chromatography A**, 1067,1-14, 2005.

PISARENKO, A.N.; STANFORD, B.D.; YAN, D.; GERRITY, D.; SNYDER, S.A.; Effects of ozone and ozone/peroxide on trace organic contaminants and NDMA in drinking water and water reuse applications. **Water Research**, 46, 316 -326, 2012.

PORTA, V.; SCHRAMM, S.G.; KANO, E.K.; KOONO, E.E.; ARMANDO, Y.P.; FUKUDA, K.; SERRA, C.H.R.; HPLC-UV determination of metformin in human plasma for application in pharmacokinetics and bioequivalence studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 46, 143–147, 2008.

RICHARDSON, B.J.; LAM, P.K.S.; MARTIN, M.; Emerging chemicals of concern: pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Asia, with particular reference to Southern China. **Marine Pollution Bulletin**, 50, 913–920, 2005.

ROBERTS, P.H.; THOMAS, K.V.; The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. **Science of the Total Environmental**, 356,143-153, 2005.

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

SANTOS, H.M.L.M.L.; PAÍGA, P.; ARAÚJO, A.N.; PENA, A.; DELERUE-MATOS, C.; MONTENEGRO, B.S.M.M.C.; Development of a simple analytical method for the simultaneous determination of paracetamol, paracetamol-glucuronide and p-aminophenol in river water. **Journal of Chromatography B**, 930, 75–81, 2003.

SCHEURER, M.; SACHER, F.; BRAUCH, H-J.; Occurrence of the antidiabetic drug metformin in ewage and surface waters in Germany. **Journal of Environmental Monitoring**, 11, 1608-1613, 2009.

SCHEURER, M.; MICHEL, A.; BRAUCH, H-J.; RUCK, W.; SACHER, F.; Occurrence and fate of the antidiabetic drug metformin and its metabolite guanylurea in the environment and during drinking water treatment. **Water Research**, 46, 4790-4802, 2012.

SECONDES, N.F.M.; NADDEO, V.; BELGIORNO, V.; BALLESTEROS, JR.F.; Removal of emerging contaminants by simultaneous application of membrane ultrafiltration, activated carbon adsorption, and ultrasound irradiation. **Journal of Hazardous Materials**, 264, 342–349, 2014.

SHAO, B.; CHEN, D.; ZHANG, J.; WU, Y.; SUN, C.; Determination of 76 pharmaceutical drugs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry in slaughterhouse wastewater. **Journal of Chromatography A**, 1216, 8312–8318, 2009.

SHARMA, A.; SHARMA, S.; LAL, S.; DHARI, J.; SHARMA, O.; Stability Study of Enalapril Maleate in Tablet Form Using High Performance Liquid Chromatography Techniques. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, 611, 2-4, 2011.

- SHARMA, P.; KUMAR, M.; MATHUR, N.; SINGH, A.; BHATNAGAR, P.; SOGANI, M.; Health care industries: potential generators of genotoxic waste. **Environmental Science and Pollution Research**, 20, 5160–5167, 2013.
- SHEN, J.; HUANG, J.; RUAN, H.; WANG, J.; VAN DER BRUGGEN, B.; Techno-economic analysis of resource recovery of glyphosate liquor by membrane technology. **Desalination**, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2013.11.041>.
- SHI, X., LEFEBVRE, O., KWANG, NG. K., YONG, NG. H., Sequential anaerobic– aerobic treatment of pharmaceutical wastewater with high salinity. **Bioresource Technology**, 153, 79–86, 2014.
- SHLAES, D. M.; An update on tetracyclines. **Current Opinion in Investigational Drugs**, 7, 167-171, 2006.
- SIDDIQUI, F.A.; SHER, N.; SHAFI, N.; BAHADUR, S.S.; Simultaneous Determination of metformin, captopril, lisinopril, and enalapril: its application to Pharmacokinetics. **Arabian Journal of Chemistry**, 2013.
- SIGMA-ALDRICH (2007). Overview of SPE Technology/Method Development & New Trends in Sample Preparation. [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/General\\_Information/spe\\_basics.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/General_Information/spe_basics.pdf). Acesso em 13 de fevereiro de 2014
- SILVA C. G.; COLLINS C H.; Aplicação de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, 34, 665-676, 2011.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, A.T.; Análise instrumental. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.
- SKRASKOVA, K.; SANTOS, L.H.M.L.M.; SATINSKY, D.; PENA, A.; MONTENEGRO, M.C.B.S.M.; SOLICH, P.; NOVAKOVA, L.; Fast and sensitive UHPLC methods with fluorescence and tandem mass spectrometry detection for the determination of tetracycline antibiotics in surface waters. **Journal of Chromatography B**, 927, 201–208, 2013.
- SPEER, B. S.; SHOEMAKER, N. B.; SALYER A. A.; Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. **Clinical Microbiology**, 5, 387-99, 1992.
- SPISSO, B.F.; GONC, M.A.; ARAÚJO JÚNIOR, A.; MONTEIRO, M.A.; LIMA, A.M.B.; PEREIRA, M.U.; LUIZ, R.A.; NÓBREGA, A.W.; A liquid chromatography–tandem mass spectrometry confirmatory assay for the simultaneous determination of several tetracyclines in milk considering keto–enol tautomerism and epimerization phenomena. **Analytica Chimica Acta**, 656, 72–84, 2009.
- STACKELBERG, P.E.; GIBS, J., FURLONG, E. T., MEYER, M. T., ZAUGG, S.D., LIPPINCOTT, R.L.; Efficiency of conventional drinking-water-treatment processes in removal pharmaceuticals and other organic compounds. **Science of the Total Environment**, 377, 255-272, 2007.
- STALDER, T.; ALRHMOUN, M.; LOUVET, J-N.; CASELLAS, M.; MAFTAH, C.; CARRION, C.; PONS, M-N.; PAHL, O.; PLOY, M-C.; DAGOT, C.; Dynamic Assessment of the Floc Morphology, Bacterial Diversity, and Integron Content of an Activated Sludge Reactor Processing Hospital Effluent. **Environmental Science & Technology**, 47, 7909–7917, 2013.
- STANISZ, B.; Evaluation of stability of enalapril maleate in solid phase. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 31, 375-380, 2003.
- STUER-LAURIDSEN, F.; BIRKVED, M.; HANSEN, L.P.; HOLTEN LUTZHOFT, H.C.H.; HALLING-SÜRENSEN, B.; Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use. **Chemosphere**, 40, 783-793, 2000.
- SUMPTER, J. P.; Xenoendocrine disrupters-environmental impacts. **Toxicology Letters**, 337, 102-103, 1998.
- STUMPF, M.; TERNES, T. A.; WILKEN, R.-D.; RODRIGUES, S. V.; BAUMANN, W.; Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Science of the Total Environment**, 225, 135-141, 1999.

TOGUNDE P.O.; CUDJOE E.; OAKES D. K.; MIRNAGHI S.F.; SERVOS R.M.; PAWLISZYN J.; Determination of selected pharmaceutical residues in wastewater using an automated open bed solid phase microextraction system. **Journal of Chromatography A**, 1262, 34–42, 2012.

TAVARES, W.; Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 33, 281-301, 2000.

TERNES, T. A.; Occurrence of Drugs in German Sewage Treatment Plants and Rivers. **Water Research**, 32, 3245-3260, 1998.

TRAUTWEIN, C.; KÜMMERER, K.; Incomplete aerobic degradation of the antidiabetic drug Metformin and identification of the bacterial dead-end transformation product Guanylurea. **Chemosphere**, 85, 765–773, 2011.

VALDÉS, M.E.; AMÉ, M.V.; BISTONI, M.A.; WUNDERLIN, D.A.; Occurrence and bioaccumulation of pharmaceuticals in a fish species inhabiting the Suquía River basin (Córdoba, Argentina). **Science of the Total Environment**, 472, 389–396, 2014.

VERLICCHI, P.; AUKIDY, M.A.; GALLETI, A.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D.; Hospital effluent: Investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. **Science of the Total Environment**, 430, 109–118, 2012.

VILLAESCUSA, I.; FIOL, N.; POCH, J.; BIANCHI, A.; BAZZICALUPI, C.; Mechanism of paracetamol removal by vegetable wastes: The contribution of  $\pi$ - $\pi$  interactions, hydrogen bonding and hydrophobic effect. **Desalination**, 270, 135–142, 2011.

VIOLLET, B.; GUIGA, B.; GARCIA, N.S.; LECLERC, J.; FORETZ, M.; ANDREELLI, F.; Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. **Clinical Science**, 122, 253–270, 2012.

VON DER OHE, P.C.; DULIO, V.; SLOBODNIK, J.; DE DECKERE, E.; KÜHNE, R.; EBERT, R-U.; GINEBRED, A.; DE COOMAN, W.; SCHÜÜRMAN, G.; BRACK, W.; A new risk assessment approach for the prioritization of 500 classical and emerging organic microcontaminants as potential river basin specific pollutants under the European Water Framework Directive. **Science of the Total Environment**, 409, 2064–2077, 2011.

VRAKAS, D.; GIAGINIS C.; TSANTILI-KAKOULIDOU.; Electrostatic interactions and ionization effect in immobilized artificial membrane retention A comparative study with octanol–water partitioning. **Journal of Chromatography A**, 1187, 67–78, 2008.

WALKER, T.; <http://formularyjournal.modernmedicine.com/formulary-journal/news/metformin-improves-outcomes-cancer-patients-type-2-diabetes>, 6, 2013. Acesso em 10 de janeiro de 2014.

WAN, Y.; BAO, Y.; ZHOU, Q.; Simultaneous adsorption and desorption of cadmium and tetracycline on cinnamon soil. **Chemosphere**, 80, 807–812, 2010.

WANG, Y.; ZHANG, H.; ZHANG, J.; LU, C.; HUANG, Q.; WU, J.; LIU, F.; Degradation of tetracycline in aqueous media by ozonation in an internal loop-lift reactor. **Journal of Hazardous Materials**, 192, 35–43, 2011.

WEI, L.; XIAO-NONG, Y.; QUN, L.; HUA, Y.; YI-KE, D.; WAN-YOU, W.; Clinical medication and interaction of drugs in animal medical science. **Journal of southwest University for Nationalities(Natural Science Edition)** 29, 709-712, 2003.

WOLS, B.A.; HOFMAN-CARIS, C.H.M.; HARMSSEN, D.J.H.; BEERENDONK, E.F.; Degradation of 40 selected pharmaceuticals by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Water Research**, 1-13, 2013.

WU, C.; SPONGBERG, A.L.; WITTER, J.D.; Use of solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for simultaneous determination of various pharmaceuticals in surface water. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, 88, 1033-1048, 2008.

YERGEAU, E.; SANSCHAGRIN, S.; WAISER, M.J.; LAWRENCE, J.R.; GREER, C.W.; Sub-inhibitory concentrations of different pharmaceutical products affect the meta-transcriptome of river biofilm communities cultivated in rotating annular reactors. **Environmental Microbiology Reports**, 4, 350–359, 2012.

YU, K.; LI, B.; ZHANG, T.; Direct rapid analysis of multiple PPCPs in municipal wastewater using ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry without SPE pre-concentration. **Analytica Chimica Acta**, 738, 59–68, 2012.

YU Y.; WU L.; Comparison of four extraction methods for the analysis of pharmaceuticals in wastewater. **Journal of Chromatography A**, 1218, 2483-2489, 2011.

ZEPP, R.G.; SCHIOTZHAUER, P.F.; SLNK, R.M.; Photosensitized Transformations Involving Electronic Energy Transfer in Natural Waters: Role of Humic Substances. **Environmental Science & Technology**, 19, 74-81, 1985.

ZEPP, R. G.; HOIGNÉ, J.; BADER, H.; Nitrate-Induced Photooxidation of Trace Organic Chemicals in Water. **Environmental Science & Technology**, 21, 443-450, 1987.

ZHAN, J.; ZHONG, Y-Y.; YU, X-J.; PENG, J-F.; CHEN, S.; YIN, J-Y.; ZHANG, J-J.; ZHU, Y.; Multi-class method for determination of veterinary drug residues and other contaminants in infant formula by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, 138, 827–834, 2013.

ZHANEL, G. G.; HOMENUIK, K.; NICHOL, K.; NOREDDIN, A.; VERCAIGNE, L.; EMBIL, J.; GIN, A.; KARLOWSKY, J. A.; HOBAN, D. J.; The Glycylcyclines: A Comparative Review with the Tetracyclines. **Drugs**, 64, 63-88, 2004.

ZHANG, H.; LIU, F.; WU, X.G.; ZHANG, J.H.; ZHANG, D.B.; Degradation of tetracycline in aqueous medium by electrochemical method. **Asia-pacific journal of chemical engineering**, 4, 568–573, 2009.

ZHANG, L.; HU J.; ZHU R.; ZHOU Q.; CHEN J., Degradation of paracetamol by pure bacterial cultures and their microbial consortium. **Environmental Biotechnology**, 97, 3687-3698, 2013.

ZHAO, J-L.; YING, G-G.; LIU, Y-S.; CHEN, F.; YANG, J-F.; WANG, L.; YANG, X-B.; STAUBER, J.L.; WARNE, M. S<sub>T</sub>J.; occurrence and a screening-level risk assessment of human pharmaceuticals in the pearl river system, south china. **Environmental toxicology and chemistry**, 29, 1377–1384, 2010.

ZHAO, J-L.; YING, G-G.; LIU, Y-S.; CHEN, F.; YANG, J-F.; WANG, L.; YANG, X-B.; STAUBER, J.L.; WARNE, M.S.T.J.; Removal of selected pharmaceuticals from domestic wastewater in an activated sludge system followed by a horizontal subsurface flow bed — Analysis of their respective contributions. **Science of the Total Environment**, 454–455, 411–425, 2013.

ZHOU, J.L.; MASKAOUI, K.; LUFADJEU, A.; Optimization of antibiotic analysis in water by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 731, 32–39, 2012.

ZHENFENG, Y.; YUEMING, Q.; XIUYUN, L.; CAINI, J.; Determination of Multi-Residues of Tetracyclines and Their Metabolites in Milk by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Positive-ion Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, 34, 1255–1259, 2006.

ZUPANC, M.; KOSJEK, T.; MARTIN PETKOVSEK, M.; DULAR, M.; KOMPARE, B.; SIROK, B.; BLAZEKA, Z.; HEATH, E.; Removal of pharmaceuticals from wastewater by biological processes, hydrodynamic cavitation and UV treatment. **Ultrasonics Sonochemistry**, 20, 1104–1112, 2013.

# ANEXOS

## Anexo1

### ANÁLISE DA METFORMINA (MET) EM CONCENTRAÇÕES DE CHOQUES DE FÁRMACOS E OS VALORES OBTIDOS.

Tempo	Concentração Medida $\mu\text{g L}^{-1}$	% de remoção	Desvio padrão
<b>Amostra 1 - PL MET – choque longo 0,5 mg L<sup>-1</sup></b>			
3h	106,59	78,68	$\pm 12,8$
6h	22,47	95,51	$\pm 8,8$
9h	19,04	96,19	$\pm 8,1$
<b>Amostra 2 – PL MET – choque longo 1 mg L<sup>-1</sup></b>			
3h	697,61	30,24	$\pm 9,7$
6h	668,49	33,15	$\pm 9,9$
9h	519,90	48,01	$\pm 8,9$
<b>Amostra 3 – PL MET – choque longo 2 mg L<sup>-1</sup></b>			
3h	1309,33	34,53	$\pm 11,2$
6h	1079,52	46,02	$\pm 10,8$
9h	909,55	54,52	$\pm 8,1$

Tempo	Concentração Medida $\mu\text{g L}^{-1}$	% de remoção	Desvio Padrão
<b>Amostra 1 – PC MET – choque curto 0,5 mg L<sup>-1</sup></b>			
3h	519,90	65,34	$\pm 7,9$
6h	508,74	66,08	$\pm 8,7$
9h	289,77	80,68	$\pm 9,3$
<b>Amostra 2 – PC MET – choque curto 1 mg L<sup>-1</sup></b>			
3h	2188,30	27,06	$\pm 11,2$
6h	1684,23	43,86	$\pm 12,7$
9h	1456,17	51,46	$\pm 13,6$
<b>Amostra 3 – PC MET – choque curto 2 mg L<sup>-1</sup></b>			
3h	4356,97	27,38	$\pm 11,4$
6h	3785,17	36,91	$\pm 12,8$
9h	3000,11	49,99	$\pm 9,9$

## Anexo 2

**ANÁLISE DE ENALAPRIL (ENA) EM CONCENTRAÇÕES DE CHOQUES DE FÁRMACOS E OS VALORES OBTIDOS.**

Tempo	Concentração Medida $\mu\text{g L}^{-1}$	% de remoção	Desvio Padrão
<b>Amostra 1 – PL ENA – choque longo 0,5 mg L<sup>-1</sup></b>			
3h	18,57	96,28	$\pm 1,7$
6h	16,46	96,71	$\pm 2,3$
9h	0,81	99,83	$\pm 1,8$
<b>Amostra 2 – PL ENA – choque longo 1 mg L<sup>-1</sup></b>			
3h	13,73	98,63	$\pm 1,1$
6h	0,41	99,96	$\pm 0,7$
9h	0,25	99,97	$\pm 0,5$
<b>Amostra 3 – PL ENA – choque longo 2 mg L<sup>-1</sup></b>			
3h	408,29	79,58	$\pm 7,9$
6h	338,65	83,07	$\pm 8,3$
9h	115,98	94,20	$\pm 6,7$

Tempo	Concentração Medida $\mu\text{g L}^{-1}$	% de remoção	Desvio padrão
<b>Amostra 1 – PC ENA – choque curto 0,5 mg L<sup>-1</sup></b>			
3h	200,76	86,62	$\pm 4,7$
6h	105,76	92,95	$\pm 6,1$
9h	42,24	97,18	$\pm 5,1$
<b>Amostra 2 – PC ENA – choque curto 1 mg L<sup>-1</sup></b>			
3h	441,42	85,29	$\pm 8,9$
6h	91,91	96,94	$\pm 8,1$
9h	10,79	99,64	$\pm 5,8$
<b>Amostra 3 – PC ENA – choque curto 2 mg L<sup>-1</sup></b>			
3h	816,34	86,39	$\pm 9,6$
6h	448,10	92,53	$\pm 4,2$
9h	144,83	97,59	$\pm 3,1$

## Anexo 3

**ANÁLISE DE PARACETAMOL (PAR) EM CONCENTRAÇÕES DE CHOQUES DE FÁRMACOS E OS VALORES OBTIDOS.**

Tempo	Concentração Medida $\mu\text{g L}^{-1}$	% de remoção	Desvio Padrão
<b>Amostra 1 – PL PAR – choque longo 0,5 mg L<sup>-1</sup></b>			
3h	nd*	100	0
6h	nd*	100	0
9h	nd*	100	0
<b>Amostra 2 – PL PAR – choque longo 1 mg L<sup>-1</sup></b>			
3h	36,83	96,32	$\pm 3,1$
6h	9,94	99,00	$\pm 1,8$
9h	5,04	99,49	$\pm 0,3$
<b>Amostra 3 – PL PAR – choque longo 2 mg L<sup>-1</sup></b>			
3h	58,14	97,09	$\pm 1,9$
6h	48,60	97,57	$\pm 1,2$
9h	11,70	99,41	$\pm 0,6$

\*nd – não detectado

Tempo	Concentração Medida $\mu\text{g L}^{-1}$	% de remoção	Desvio Padrão
<b>Amostra 1 – PC PAR – choque curto 0,5 mg L<sup>-1</sup></b>			
3h	nd*	100	0
6h	nd*	100	0
9h	nd*	100	0
<b>Amostra 2 – PC PAR – choque curto 1 mg L<sup>-1</sup></b>			
3h	77,79	97,41	$\pm 1,2$
6h	65,74	97,81	$\pm 0,9$
9h	28,48	99,05	$\pm 0,4$
<b>Amostra 3 – PC PAR – choque curto 2 mg L<sup>-1</sup></b>			
3h	113,36	98,11	$\pm 0,2$
6h	112,20	98,13	$\pm 0,2$
9h	93,74	98,44	$\pm 0,1$

\*nd – não detectado

## Anexo 4

**ANÁLISE DE TETRACICLINA (TC) EM CONCENTRAÇÕES DE CHOQUES DE FÁRMACOS E OS VALORES OBTIDOS.**

Tempo	Concentração Medida $\mu\text{g L}^{-1}$	% de remoção	Desvio Padrão
<b>Amostra 1 – PL TC – choque longo <math>0,5 \text{ mg L}^{-1}</math></b>			
3h	4,92	99,01	$\pm 0,3$
6h	2,73	99,45	$\pm 0,3$
9h	2,46	99,51	$\pm 0,2$
<b>Amostra 2 – PL TC – choque longo <math>1 \text{ mg L}^{-1}</math></b>			
3h	7,74	99,23	$\pm 0,4$
6h	7,28	99,27	$\pm 0,3$
9h	7,09	99,29	$\pm 0,2$
<b>Amostra 3 – PL TC – choque longo <math>2 \text{ mg L}^{-1}</math></b>			
3h	16,94	99,15	$\pm 0,6$
6h	14,00	99,30	$\pm 0,2$
9h	13,35	99,33	$\pm 0,3$

Tempo	Concentração Medida $\mu\text{g L}^{-1}$	% de remoção	Desvio padrão
<b>Amostra 1 – PC TC – choque curto <math>0,5 \text{ mg L}^{-1}</math></b>			
3h	4,60	99,69	$\pm 0,7$
6h	3,62	99,75	$\pm 0,3$
9h	2,59	99,82	$\pm 0,2$
<b>Amostra 2 – PC TC – choque curto <math>1 \text{ mg L}^{-1}</math></b>			
3h	16,23	99,46	$\pm 0,8$
6h	16,19	99,46	$\pm 0,1$
9h	14,84	99,50	$\pm 0,4$
<b>Amostra 3 – PC TC – choque curto <math>2 \text{ mg L}^{-1}</math></b>			
3h	31,53	99,47	$\pm 0,9$
6h	20,50	99,66	$\pm 0,6$
9h	17,39	99,71	$\pm 0,2$