



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**UMA METODOLOGIA RÁPIDA, DE BAIXO CUSTO E
AMBIENTALMENTE AMIGÁVEL PARA O
MONITORAMENTO MULTICLASSE DE COMPOSTOS
FARMACÊUTICOS EM EFLUENTE HOSPITALAR
UTILIZANDO DPX COM FASE EXTRATORA ALTERNATIVA
E HPLC-DAD/FLD**

VANESSA MENEZHINI

Florianópolis
Novembro/2019

Vanessa Meneghini

**UMA METODOLOGIA RÁPIDA, DE BAIXO CUSTO E
AMBIENTALMENTE AMIGÁVEL PARA O
MONITORAMENTO MULTICLASSE DE COMPOSTOS
FARMACÊUTICOS EM EFLUENTE HOSPITALAR
UTILIZANDO DPX COM FASE EXTRATORA ALTERNATIVA
E HPLC-DAD/FLD**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio II (QMC 5512)

Eduardo Carasek da Rocha

Gabriela Corazza

Florianópolis
Novembro/2019

Aos meus pais e meus irmãos pelo incentivo e apoio.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais, Carmem e Valdecir, por todo apoio e incentivo ao estudo.

Aos meus irmãos, Vanderson, Vandrize e Viviana pelos puxões de orelha, pelas risadas e companheirismo.

À minha família, avós, tios, primos que sempre me incentivam e torcem por mim.

Aos meus colegas de curso, em especial meus amigos Dagwin, Felipe, Bruna, Maria Eduarda, Ana, Thaís pelos momentos de festa e alegria e pelo ombro amigo nas horas difíceis.

Aos meus amigos, em especial Caio, Cami, Lenize que torceram por mim e mandaram orações.

Aos colegas do Cromaa, pelas conversas e pela parceria, em especial a Gabi Corazza e Lucas Morés pela coorientação e conhecimento compartilhado.

Ao meu orientador, Eduardo Carasek da Rocha, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, que além de ser um professor incrível é um grande amigo.

Aos professores ao longo da graduação, que compartilharam seu conhecimento e contribuíram para minha formação.

À UFSC, pelo ensino público, gratuito e de qualidade.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Contaminantes Emergentes.....	3
2.2 Fármacos.....	3
2.3 Efluentes hospitalares.....	5
2.4 Preparo de amostra.....	6
2.4.1 Extração em Fase Sólida (SPE).....	6
2.4.2 Extração em Ponteira Descartável (DPX).....	8
2.4.2.1 Fases extratoras alternativas.....	10
3 OBJETIVOS.....	13
3.1 Objetivo Geral.....	13
3.2 Objetivos específicos.....	13
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1 Reagentes e Materiais.....	14
4.2 Instrumentação e condições cromatográficas.....	14
4.3 Otimização do procedimento de DPX.....	15
4.3.1 Avaliação da fase extratora.....	15
4.3.2 Otimização do solvente de dessorção.....	15
4.3.3 Otimização da etapa de extração.....	16
4.3.4 Otimização da etapa de dessorção.....	17
4.3.5 Avaliação do pH e efeito <i>salting-out</i>.....	18
4.4 Parâmetros analíticos de mérito e análise de amostras de efluentes hospitalares.....	19
4.5 Segurança no Laboratório e Tratamento de Resíduos.....	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5.1 Separação cromatográfica.....	22
5.2 Otimização do procedimento de DPX	23
5.2.1 Avaliação da fase extratora.....	23

5.2.2 Otimização do solvente de dessorção.....	24
5.2.3 Otimização da etapa de extração.....	25
5.2.4 Otimização da etapa de dessorção.....	27
5.2.5 Avaliação do pH e efeito <i>salting-out</i>	27
5.3 Parâmetros analíticos de mérito e análise de amostras de efluentes hospitalares.....	29
6 CONCLUSÃO	36
7 REFERÊNCIAS	37

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Etapas envolvidas no procedimento de SPE: condicionamento (A), extração (B), limpeza (C) e dessorção (D). Adaptado de NASCIMENTO *et al*, 2018.....7
- Figura 2.** Etapas envolvidas no procedimento de DPX: condicionamento (A), extração (B), dessorção (C). Adaptado de MAFRA *et al*, 2018.....9
- Figura 3.** Estrutura molecular do material $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$10
- Figura 4.** Estrutura molecular do monômero de polipirrol.....11
- Figura 5.** Cromatograma da separação dos analitos obtido no detector de fluorescência na condição de gradiente de solventes otimizada. Comprimentos de onda de excitação e emissão para: FLU (230/290), LOS (248/410), NAP (284/352) e EE2 (280/310). Injeção de 20 μL de uma solução 5 mg L^{-1}23
- Figura 6.** Cromatograma da separação dos analitos obtido no detector de arranjo de diodos na condição de gradiente de solventes otimizada. Comprimento de onda de 280 nm para CBZ e DCL. Injeção de 20 μL de uma solução 5 mg L^{-1}23
- Figura 7.** Avaliação univariada das fases extratoras $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$, PPy.Cl e PPy.CTAB utilizando no procedimento de DPX para extração de CBZ, DCL, NAP, FLU, LOS e EE2. A extração foi realizada com 20 mg de cada material; 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito; 5 ciclos de extração com 800 μL de amostra em cada ciclo e 15 s de tempo de extração; 5 ciclos de dessorção com 100 μL de ACN:MeOH , 1:1 v/v (mesma alíquota) e 15 s de tempo de dessorção.....24
- Figura 8.** Superfície triangular para avaliação do solvente de dessorção. A extração foi realizada com 20 mg de $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$; 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito; 5 ciclos de extração com 800 μL de amostra em cada ciclo e 15 s de tempo de extração; 5 ciclos de dessorção com 100 μL de cada solvente e/ou mistura de solventes e 15 s de tempo de dessorção.....25
- Figura 9.** Superfície de resposta obtida para o planejamento composto central. Em (A) avaliação do número de ciclos de extração *versus* a massa da fase extratora (mg) e em (B) avaliação do volume da amostra (μL) *versus* o número de ciclos de

extração. As extrações foram realizadas com $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito; 15 s de tempo de extração e dessorção; e 5 ciclos de dessorção com $100 \mu\text{L}$ de ACN.....26

Figura 10. Superfície resposta obtida a partir do planejamento *Doehlert* para o volume de ACN e número de ciclos de dessorção. A extração foi realizada com 20 mg de $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$; $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito; 6 ciclos de extração com $700 \mu\text{L}$ de amostra em cada ciclo e 15 s de tempo de extração; 5 ciclos de dessorção com $100 \mu\text{L}$ de ACN e 15 s de tempo de dessorção.....27

Figura 11. Superfície resposta obtida a partir do planejamento *Doehlert* para a avaliação do pH da amostra e % de NaCl (m/v). A extração foi realizada com 20 mg de $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$; $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito; 6 ciclos de extração com $700 \mu\text{L}$ de amostra em cada ciclo e 15 s de tempo de extração; 3 ciclos de dessorção com $100 \mu\text{L}$ de ACN e 15 s de tempo de dessorção.....28

Figura 12. Gráfico de Lenth para a avaliação da robustez do método desenvolvido com base no procedimento $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$ -DPX otimizado. Fatores: P1 - Sal %; P2 - pH da amostra; P3 - Volume de amostra; P4 - Números de ciclos de extração; P5 - Volume de ACN – dessorção; P6 - Número de ciclos de dessorção e P7 - Massa fase extratora.....32

Figura 13. Comparação entre as extrações realizadas no efluente hospitalar B sem adição dos analitos (linha rosa) e com adição dos analitos (linha azul). Em (A) comparação usando o detector de FLD e amostra fortificada com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de 1-FLU, 2-LOS, 3-NAP e 4-EE2. Em (B) comparação usando o detector de DAD no comprimento de onda de 280 nm e amostra fortificada com $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de 5-CBZ e 6-DCL.....35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura, classe e propriedades dos fármacos em estudo.....	4
Tabela 2. Matriz do planejamento <i>Simplex-Lattice</i> para a otimização do solvente de dessorção.....	16
Tabela 3. Matriz planejamento composto central para a otimização do número de ciclos de extração, volume de amostra e massa de fase extratora.....	17
Tabela 4. Matriz planejamento <i>Doehlert</i> para a otimização do número de ciclos de dessorção e volume de solvente.....	18
Tabela 5. Matriz planejamento <i>Doehlert</i> para a otimização do pH da amostra e % de NaCl adicionado na amostra.....	19
Tabela 6. Parâmetros avaliados, condição nominal e variações para o teste de Youden para avaliação da robustez do método.....	20
Tabela 7. Experimentos realizados considerando a combinação dos parâmetros (variação menor e maior) para o teste de Youden para avaliação da robustez do método.....	20
Tabela 8. Gradiente de solventes para a separação cromatográfica obtido a partir da injeção de 20 μL de uma solução 5 mg L^{-1} contendo FLU, LOS, CBZ, EE2, NAP e DCL.....	22
Tabela 9. Equação linear, faixa linear, coeficientes de correlação, limites de detecção e quantificação obtidos para os compostos farmacêuticos em efluente hospitalar utilizando o procedimento $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$ -DPX otimizado.....	29
Tabela 10. Recuperação relativa, precisões intra e inter-dia para os compostos farmacêuticos em efluente hospitalar usando o procedimento $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$ -DPX otimizado.....	30
Tabela 11. Comparação entre o procedimento $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$ -DPX e outros métodos reportados na literatura para os mesmos analitos.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

ACE - Acetona

ACN – Acetonitrila

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AINEs – Anti-inflamatórios Não Esteroidais

CBZ – Carbamazepina

CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente

CTAB - Brometo de Cetiltrimetilamônio

DAD – Detector por Arranjo de Diodos

DCL - Diclofenaco

DPX - Extração em ponteira descartável, do inglês *Disposable Pipette Extraction*

d-SPE - Extração em fase sólida dispersiva, do inglês *Solid Phase Extraction dispersive*

EE2 - 17 α -etinilestradiol

ETE – Estação de Tratamento de Esgoto

FLD – Detector por Fluorescência

FLU - Fluoxetina

GO-PANI - Nanocompósito em óxido de grafeno-polianilina

HLB - Balanço hidrofóbico-lipofílico

HPA – Hidrocarboneto Policíclico Aromático

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ISRS - Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina

LLE - Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*

LOD – Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*

LOQ – Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

LOS – Losartana

MeOH – Metanol

NAP - Naproxeno

Ni:ZnS-AC - Níquel: nanopartículas de sulfeto de zinco carregadas em carvão ativado

RDSE - Extração de Sorção com disco rotatório, do inglês *Rotating Disk Sorptive Extraction*

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

SBSE - Extração por sorção em barra de agitação, do inglês *Stir Bar Sorptive Extraction*

Si3Py⁺Cl⁻ - [cloreto de 3-n-propil (3-metilpiridínio) silsesquioxano]

SLE - Extração Sólido-Líquido, do inglês *Solid-Liquid Extraction*

SME - Margem de Erro Simultânea, do inglês *Simultaneous Margin of Error*

SPE - Extração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

RESUMO

Neste estudo, foi desenvolvida uma nova metodologia baseada em DPX usando fase extratora alternativa para extração e determinação de 6 fármacos (carbamazepina, diclofenaco, naproxeno, fluoxetina, losartana e 17 α -etinilestradiol) que representam cinco classes distintas com o objetivo de investigar sua ocorrência e monitorá-los em efluentes hospitalares por HPLC-DAD/FLD. Três materiais com potencial para extração dos compostos farmacêuticos em estudo foram avaliados para uso no dispositivo de DPX. A otimização dos principais parâmetros que podem influenciar a eficiência de extração pelo procedimento de DPX foi realizada através de abordagens univariadas e multivariadas. As condições ótimas obtidas foram o uso de 20 mg de fase extratora Si3Py⁺Cl⁻; 6 ciclos de extração com 700 μ L de amostra em cada ciclo e 15 s de tempo de extração; 3 ciclos de dessorção com 100 μ L de ACN (mesma alíquota) e 15 s de tempo de dessorção; pH ajustado em 3,5 e adição de 15% (m/v) de NaCl na amostra. A metodologia proposta apresentou aspectos ambientalmente amigáveis, com a utilização de apenas 100 μ L de solvente orgânico e 20 mg de fase extratora. Além disso, a fase extratora empregada é de fácil síntese, baixo custo e estável em solvente orgânico. O método também apresentou uma boa frequência analítica com tempo de extração de apenas 6,5 min. Os parâmetros analíticos de mérito foram obtidos utilizando efluente hospitalar e os valores foram muito satisfatórios, considerando a complexidade da matriz. Os coeficientes de correlação foram maiores que 0,9710. Os limites de detecção e quantificação variaram de 0,030 μ g L⁻¹ a 1,510 μ g L⁻¹ e 0,10 μ g L⁻¹ a 5,00 μ g L⁻¹, respectivamente. A recuperação relativa variou de 80 a 127% e a precisão intra-dia (n = 3) e inter-dia (n = 9) foram inferiores a 19%. Além disso, a robustez foi avaliada pelo teste de Youden e o método se mostrou robusto de acordo com o gráfico de Lenth.

Palavras-chave: efluente hospitalar, DPX, preparo de amostra, fase extratora alternativa, fármacos.

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento da população, o consumo de fármacos pertencentes à classes terapêuticas têm crescido, dentre as quais se destacam os anti-inflamatórios, contraceptivos, antidepressivos, anticonvulsivo e anti-hipertensivos. O uso destes pode ser feito sem prescrição médica e/ou de forma contínua, sendo excretado na urina e nas fezes. Outras fontes de contaminação provêm do descarte incorreto de medicamentos e da descarga de efluente hospitalar. Embora haja um tratamento adequado para a maioria dos efluentes, o efluente hospitalar apresenta muitos compostos farmacêuticos que não são completamente removidos nas estações de tratamento e, portanto, acabam sendo descartados no meio ambiente.

Uma vez que os fármacos são classificados como contaminantes emergentes, é importante que eles sejam continuamente monitorados através da aplicação de metodologias analíticas adequadas para o desenvolvimento e implantação de procedimentos mais eficientes de tratamento. Quantificar analitos em matrizes complexas é um grande desafio na química analítica e se tratando de amostras ambientais, a complexidade e a baixa concentração dos analitos geralmente requer uma etapa de preparo da amostra antes da análise instrumental.

Sendo uma variação da SPE (Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*) convencional, a DPX (Extração em Ponteira Descartável, do inglês *Disposable Pipette Extraction*) é uma técnica de preparo de amostra que apresenta vantagens em relação às técnicas convencionais. Existem diversas fases extratoras sólidas disponíveis comercialmente para a DPX com variados mecanismos de extração e como diferencial, é possível testar fases extratoras alternativas tendo em vista o aumento da seletividade e a eficiência da extração.

Com base na problemática apresentada sobre compostos farmacêuticos em efluentes hospitalares, foram selecionados seis fármacos que representam classes terapêuticas distintas com o objetivo de investigar a ocorrência e monitorar compostos farmacêuticos em efluentes hospitalares. Foi desenvolvido um método utilizando DPX como técnica de preparo de amostra com fase extratora alternativa. Foram selecionados os materiais $\text{Si}3\text{Py}^+\text{Cl}^-$, PPy.Cl e PPy.CTAB , com potencialidade de extração dos analitos através de múltiplas interações e que já foram utilizados em trabalhos anteriores a fim de ampliar sua aplicabilidade a outros analitos e matrizes.

Após a etapa de preparo da amostra, a separação e a detecção foram realizadas em HPLC-DAD/FLD.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Contaminantes Emergentes

A Resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) (nº 420, 2009, Art. 6º – V) define contaminação como a presença de substâncias químicas no ar, água ou solo, decorrentes de atividades humanas, em concentrações tais que restrinjam a utilização desse recurso ambiental com base na avaliação de risco à saúde humana.¹ Muitos contaminantes são denominados “emergentes” e esse termo se refere à preocupação que esses compostos têm trazido em razão de seus impactos reais e potenciais.² Embora estes tenham entrado no meio ambiente por muitos anos, as investigações sobre seus efeitos adversos ao meio ambiente e à saúde humana começaram há pouco tempo.³

Atualmente, os contaminantes emergentes não possuem regulamentação, mas há algumas tentativas na União Europeia e na América do Norte de fazer uma lista de prioridades e reduzir sua liberação no meio ambiente. Porém, acredita-se que a estratégia mais eficaz para controlar a contaminação seja através de uma legislação e da modificação das tecnologias atuais de tratamento de efluentes.⁴

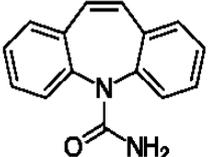
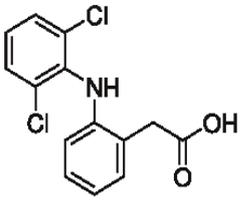
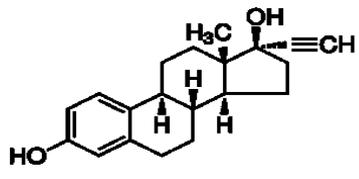
Os compostos classificados como contaminantes emergentes podem ser de origem industrial, de efluentes domésticos, agrícolas e hospitalares. Cada classe tem um comportamento diferente no meio ambiente, logo, cada um pode apresentar um impacto ambiental diferente. A lista desses compostos é grande, incluindo produtos de higiene pessoal, nanomateriais, inseticidas, herbicidas e compostos farmacêuticos.^{3,5}

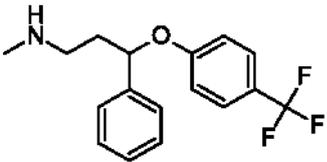
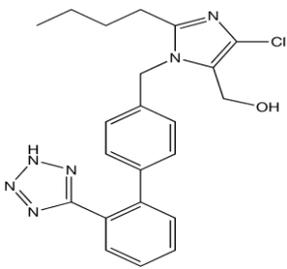
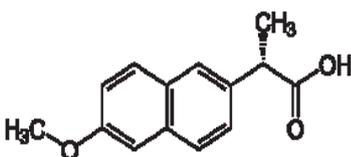
2.2 Fármacos

Fármaco, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é o componente farmacologicamente ativo destinado ao emprego em medicamento.⁶ Ainda, segundo as definições oficiais que regulamentam a área de saúde no Brasil, conforme Portaria ministerial nº 3.916/MS/GM do Ministério da Saúde, fármaco é o princípio ativo do medicamento. Portanto, o medicamento é o fármaco beneficiado em doses ou concentrações terapêuticas, com finalidade de curar ou demais ações relacionadas à saúde do paciente.⁷

Dentre os fármacos classificados como contaminantes emergentes, há alguns que são frequentemente consumidos devido ao uso contínuo e à venda sem prescrição médica.⁸ O naproxeno (NAP) e o diclofenaco (DCL) são anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), podendo ser adquiridos sem prescrição médica para tratar dores musculares e inflamações.⁹ Dentre os fármacos de uso contínuo que podem ser vendidos sem receita médica destacam-se as pílulas contraceptivas contendo 17 α -etinilestradiol (EE2), um receptor de estrogênio altamente potente e análogo sintético do estradiol¹⁰ e o losartana (LOS), aplicado no tratamento da hipertensão arterial, proteção dos rins e insuficiência cardíaca;¹¹ Os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), como a fluoxetina (FLU) que é indicada para o tratamento de depressão e ansiedade é utilizada de modo contínuo e a carbamazepina (CBZ) é empregada no tratamento de crises convulsivas e algumas doenças neurológicas, podendo ser de uso contínuo ou não.¹² Na Tabela 1 estão descritas algumas propriedades importantes para o estudo destes fármacos, como o pKa e o log Kow.

Tabela 1: Estrutura, classe e propriedades dos fármacos em estudo.

Fármaco	Estrutura	Classe Terapêutica ¹³	pKa ¹⁴	log Kow ¹⁴
CBZ		antiepiléptico	15,96	2,77
DCL		antiinflamatório	4,00	4,26
EE2		contraceptivo	10,33	3,90

FLU		antidepressivo	9,80	4,17
LOS		anti-hipertensivo	5,85	5,00
NAP		antiinflamatório	4,19	2,99

Os compostos farmacêuticos são considerados pseudo-persistentes devido a sua recarga contínua no ambiente aquático por meio de águas residuais.¹⁵ Após o consumo, eles são excretados na urina e fezes contaminando o efluente doméstico. Além disso, devido à ampla quantidade e diversidade de fármacos utilizados em hospitais e pessoas que o frequentam, uma atenção cada vez maior tem sido dada aos seus efluentes como fonte de poluição ambiental.¹⁶

2.3 Efluentes hospitalares

Com o intuito de caracterizar química e fisicamente as águas residuais, o efluente hospitalar passou a ser estudado e pesquisado em varias partes do mundo.^{11,17,18,19} Embora estudos apontem que as concentrações de fármacos são maiores no efluente hospitalar, não há legislação que defina como tratar e gerenciar esse efluente antes do seu descarte para uma ETE (Estação de Tratamento de Esgoto) ou rios.²⁰

Normalmente é feito um tratamento convencional que consiste em clarificação primária, processo de lodo e, às vezes, desinfecção. Infelizmente, há uma

resistência ao tratamento convencional e um amplo espectro de micropoluentes incluindo os fármacos, não é removido com eficiência. É necessário, portanto, o monitoramento do efluente hospitalar para garantir um tratamento seguro/adequado para esse tipo de água residual.^{20, 21}

Os compostos farmacêuticos são encontrados em baixas concentrações no ambiente, de modo que métodos analíticos sensíveis e seletivos são necessários para a detecção.²² O potencial risco causado por esses compostos no meio ambiente foi relatado em poucos estudos em peixes^{23,24,25} e essa falta de dados pode ser atribuída à ausência de um método padrão ou multiclasse para a análise de resíduos farmacêuticos em matrizes ambientais.

O efluente hospitalar é uma matriz complexa, assim como a maioria das amostras ambientais, nas quais há impurezas e interferentes em concentrações possivelmente mais altas do que as dos próprios contaminantes.²⁶ Sendo assim, na maioria das vezes é necessário uma etapa de preparo da amostra.

2.4 Preparo de amostra

Ao planejar um procedimento analítico, busca-se a análise direta da amostra. Entretanto, a compatibilidade da matriz da amostra com a instrumentação analítica e a necessidade de alta sensibilidade e seletividade, surgem como dificuldade para procedimentos simples e rápidos.²⁷ Para superar essa dificuldade, é realizada uma etapa de preparo da amostra com o objetivo de extrair os analitos da matriz da amostra, diminuindo os interferentes; transferir os analitos para uma solução compatível com a instrumentação analítica e pré-concentrar os analitos para alcançar LODs e LOQs adequados.^{28, 29}

Muitas técnicas de preparo de amostra estão disponíveis e para escolha adequada é necessário o conhecimento das propriedades químicas dos analitos e da fase extratora. Técnicas clássicas de extração têm sido empregadas em laboratórios para análise de rotina como a LLE (Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) e a SLE (Extração Sólido-Líquido, do inglês *Solid-Liquid Extraction*). Porém, a LLE apresenta como desvantagens a utilização de grande quantidade de solvente orgânico tóxico, formação de emulsão e perdas de analitos que possuem grande afinidade com a água, o que diminui a eficiência da extração. A

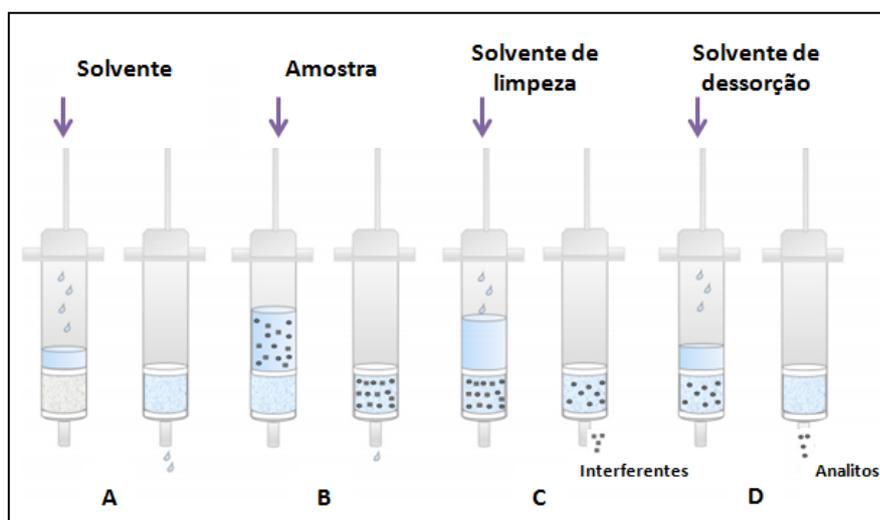
SLE apresenta as desvantagens de longos tempos de extração, utilização de grande volume de solvente orgânico tóxico e a necessidade de uma etapa de secagem do solvente pra concentrar os analitos. Dessa forma, surgiram novas técnicas para superar essas limitações, como a SPE.³⁰

2.4.1 Extração em Fase Sólida – SPE

Inserida para suprir as desvantagens da LLE e da SLE, a SPE emprega o uso de fases sólidas, denominadas sorventes, onde um cartucho contém a fase extratora compactada. Possui um vasto campo de aplicação como análises de fármacos, alimentos e matrizes ambientais, além de aplicações nas áreas de bioquímica e de química orgânica.³¹⁻³³

No procedimento de extração o solvente e a amostra são aspirados com vácuo ou pressionando o êmbolo de uma seringa, de forma a penetrar no cartucho. As etapas envolvidas são: I) condicionamento da fase extratora com solvente adequado para ativação dos sítios; II) introdução da amostra, quando ocorre a retenção dos analitos, podendo também ocorrer a retenção de alguns interferentes; III) limpeza do cartucho para retirar os interferentes menos retidos que o analito; e IV) eluição com solvente adequado para recuperação dos analitos.^{30,34} A Figura 1 ilustra o procedimento de extração descrito

Figura 1. Etapas envolvidas no procedimento de SPE: condicionamento (A), extração (B), limpeza (C) e dessorção (D). Adaptado de NASCIMENTO *et al*, 2018.



Em comparação com a LLE e a SLE, a SPE apresenta menor consumo de solvente orgânico, a não formação de emulsões, altas porcentagens de recuperação do analito e capacidade de aumentar seletivamente a concentração do analito. Porém, esta técnica possui como desvantagens o tempo elevado para o procedimento de extração, utilização de grande massa de fase extratora, além da dificuldade de selecionar a fase extratora adequada para a aplicação desejada.³⁰ Além disso, os cartuchos geralmente são utilizados uma vez e depois são descartados, o que aumenta a geração de resíduos e encarece a análise.

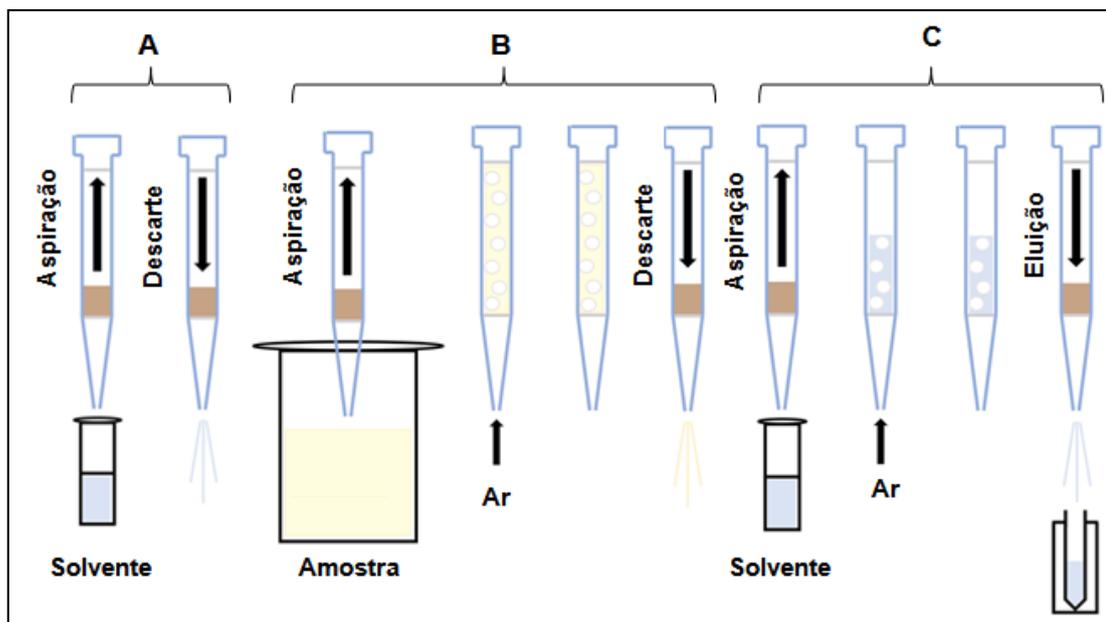
Nos últimos anos, novas estratégias de preparo de amostra visando à simplificação, à miniaturização e à minimização do uso de solventes orgânicos e fases extratoras foram desenvolvidas, avaliadas, validadas e comercializadas. Dentre essas técnicas destaca-se a DPX.

2.4.2 Extração em Ponteira Descartável – DPX

Sendo uma variante da SPE, o dispositivo de DPX consiste em uma ponteira com capacidade de 1 ou 5 mL, preenchida com material sorvente disperso entre dois filtros. As principais áreas de aplicação para DPX são as análises forenses (drogas de abuso)³⁵ e de contaminantes de alimentos (principalmente os pesticidas)^{36,37}. Porém, essa técnica já foi reportada na literatura para análise de fármacos em matrizes aquosas e biológicas, principalmente devido à possibilidade de variação da fase extratora.³⁸⁻⁴⁰

No procedimento da DPX, primeiramente é feito um condicionamento da fase extratora para ativação dos sítios sorventes utilizando um solvente adequado. Depois é realizada a aspiração da amostra e em seguida a aspiração de ar para que ocorra a mistura dinâmica entre amostra e fase extratora, que favorece o equilíbrio rápido de sorção do analito. Em seguida pode ser realizada uma etapa de limpeza com um solvente mais fraco para remoção de interferentes. Por fim, é realizada a dessorção dos analitos através da aspiração do solvente mais adequado para romper a interação analito-fase extratora.⁴¹ O procedimento descrito pode ser observado na Figura 2..

Figura 2. Etapas envolvidas no procedimento de DPX: condicionamento (A), extração (B), dessorção (C). Adaptado de MAFRA *et al*, 2018.



Quando comparada à SPE, a DPX tem como vantagens o uso de menor massa de fase extratora, menores volumes de amostra e de solvente orgânico. Dispensa a utilização de vácuo e menores tempos de extração são necessários já que a fase extratora está dispersa dentro da ponteira, aumentando a frequência analítica. Além disso, tem a possibilidade de utilização de fases extratoras alternativas diminuindo os custos. Devido a essas características a DPX é considerada uma técnica mais ambientalmente amigável e de alto rendimento.^{41, 42}

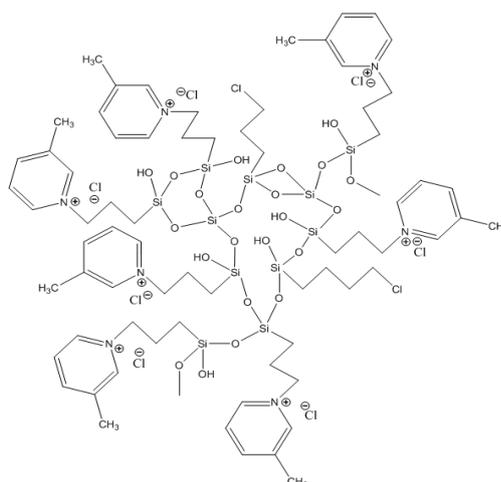
Diferentes fases extratoras sólidas estão disponíveis comercialmente para DPX, com variados mecanismos de extração para classes específicas de compostos, dentre elas: as ponteiras de fase reversa forte, DPX-RP, indicadas para a extração de compostos não polares e levemente polares; as ponteiras de troca catiônica, DPX-WCX e DPX-SCX, indicadas para a extração de compostos básicos e as ponteiras de troca aniônica; DPX-WAX e DPX-SAX indicadas para a extração de compostos ácidos. Também estão disponíveis ponteiras indicadas para procedimentos rápidos de *clean-up*, como por exemplo, a DPX-C18 e a DPX-SI. Além disso, é possível adquirir ponteiras de DPX sem material extrator, chamadas DPX-branco, indicadas para o desenvolvimento de métodos analíticos utilizando fases extratoras alternativas.⁴¹

2.4.2.1 Fases extradoras alternativas

De modo geral, a avaliação de fases extradoras alternativas tem por objetivo melhorar a seletividade do método e a capacidade sortiva, reduzir custos e aumentar a velocidade de análise, uma vez que o equilíbrio de extração pode ser atingido mais rapidamente.

O $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$ [cloreto de 3-n-propil (3-metilpiridínio) silsesquioxano] é um material híbrido já sintetizado e caracterizado em trabalhos anteriores^{43,44} que foi aplicado com sucesso para a extração e determinação de compostos desreguladores endócrinos fenólicos em amostras ambientais aquosas.⁴³ Na Figura 3 é possível observar sua estrutura molecular.

Figura 3. Estrutura molecular do material $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$.⁴⁴

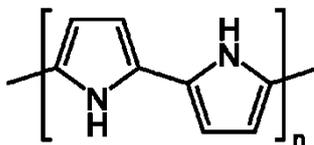


O material possui grupos silanóis (Si-OH) que podem interagir fortemente com os analitos através de interações de hidrogênio e grupos piridínicos que podem interagir através de interações π - π com analitos que possuem anéis aromáticos em sua estrutura. Através da avaliação da superfície da fase extradora $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$ por MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura), foi observado que o material se apresenta com partículas de diferentes tamanhos e formas e se encontra como um pó fino, o que auxilia na dispersão da fase extradora na DPX, aumentando a superfície de contato da amostra com a fase extradora.⁴³

Os nanocompósitos PPy.Cl (polipirrol) e PPy.CTAB (polipirrol modificado com o brometo de cetiltrimetilamônio) foram sintetizados e caracterizados em trabalhos anteriores.^{45,46} Após, foram utilizados como fase extradora alternativa para a extração

e determinação de hormônios e HPA's (Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos) em amostra de água de rio utilizando a técnica de DPX.⁴⁵ Na Figura 4 é possível observar a estrutura molecular do monômero do polipirrol.

Figura 4. Estrutura molecular do monômero de polipirrol.⁴⁷



Esses compostos também apresentam grupos piridínicos que podem interagir através de interações π - π com o anel aromático dos analitos e interações de hidrogênio com o grupo amina. A avaliação da superfície do PPy.Cl através de MEV, apresenta aglomerados esféricos e granulares de tamanhos diferentes, partículas formadas de tamanhos semelhantes e superfície de alta porosidade. Com adição do surfactante CTAB, os aglomerados ficaram mais densos, com partículas compactadas. Essas características podem favorecer a transferência de massa dos analitos da amostra para a fase extratora.⁴⁵

Os três materiais citados são de fácil obtenção, com baixo custo, apresentam estabilidade nos solventes orgânicos geralmente utilizados em técnicas de microextração e a aplicabilidade na técnica de DPX já foi demonstrada. Além disso, possuem grupos que podem interagir fortemente com os fármacos selecionados para esse estudo. Assim, são promissores de serem empregados como fases extratoras alternativas na técnica de DPX para a extração de fármacos de efluentes hospitalares.

Tendo em vista que os fármacos são uma das principais fontes de contaminação dos efluentes hospitalares, estão presentes como misturas complexas de diferentes classes e que a maioria dos métodos de monitoramento desses compostos é descrita na literatura para classes específicas, é necessário o desenvolvimento de métodos multiclasse, com limites de detecção e quantificação adequados para o monitoramento desses compostos em efluentes hospitalares antes do seu descarte no meio ambiente. Assim, esse trabalho propôs a utilização de um material alternativo como fase extratora na técnica de DPX para o

desenvolvimento de um método rápido e ambientalmente amigável para a extração e monitoramento multiclasse de fármacos em efluente hospitalar.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar fases extratoras alternativas para serem empregadas na técnica de DPX para posterior desenvolvimento de metodologia analítica multiclasse para o monitoramento de fármacos em amostras de efluente hospitalar e utilização de HPLC-DAD/FLD para a separação e quantificação.

3.2 Objetivos específicos

- I. Otimizar a separação cromatográfica por HPLC-DAD/FLD;
- II. Avaliar a fase extratora mais adequada ($\text{Si}_3\text{Py}^+\text{Cl}^-$, PPyCl e/ou PPy.CTAB) para a extração dos fármacos: carbamazepina, diclofenaco, 17α -etinilestradiol, fluoxetina, losartana e naproxeno;
- III. Otimizar os parâmetros que influenciam a extração e a dessorção por DPX: massa da fase extratora, número de ciclos de extração, volume de amostra, força iônica e pH da amostra, solvente de dessorção, volume de solvente de dessorção e número de ciclos de dessorção;
- IV. Determinar os principais parâmetros analíticos de mérito: coeficientes de correlação, faixa linear, LODs e LOQs, exatidão, precisão e robustez do método;
- V. Analisar amostras de efluente hospitalar de clínicas e hospitais da Grande Florianópolis-SC.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes e materiais

Os padrões analíticos de fluoxetina (FLU), carbamazepina (CBZ), losartana (LOS), naproxeno (NAP), 17 α -etinilestradiol (EE2) e diclofenaco (DCL) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, EUA). A partir dos padrões analíticos foram preparadas soluções estoque a 1000 mg L⁻¹ em metanol (MeOH) e a partir das soluções estoque foi preparada uma solução de trabalho contendo uma mistura dos analitos na concentração de 30 mg L⁻¹ em MeOH. Acetonitrila (ACN), MeOH e Acetona (ACE) grau HPLC foram fornecidos por JT Baker (Mallinckrodt, NJ, EUA). O ácido clorídrico utilizado para o ajuste do pH, o cloreto de sódio utilizado para avaliação do efeito de *salting-out* e o ácido fórmico utilizado para ajuste do pH da fase móvel foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). A água foi purificada em um sistema de água ultrapura (Mega Pureza, Billerica, EUA). Ponteiras de DPX de 1 mL sem material sorvente (DPX-Branco) foram adquiridas da DPX Labs (Columbia, SC, EUA). As amostras de efluente hospitalar foram fornecidas pela empresa JR Hidroquímica e coletadas nas saídas das estações de tratamento de esgotos de hospitais e clínicas de Florianópolis-SC.

4.2 Instrumentação e condições cromatográficas

A análise cromatográfica foi realizada num sistema de HPLC da série Shimadzu Prominence LC 20AT (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com um detector de fluorescência (série RF 20A) e um detector de arranjo de diodos (série RF 20A). O volume de injeção foi de 20 μ L utilizando um injetor manual Rheodyne 7725i (Rohnert Park, CA, EUA). A vazão da fase móvel foi de 1 mL min⁻¹ no modo gradiente. O modo gradiente foi iniciado com 40% da fase móvel A (ACN acidificada com 0,1% v/v de ácido fórmico) e 60% da fase móvel B (água ultrapura acidificada com 0,1% v/v de ácido fórmico), esta condição foi mantida até 17 min. Em seguida, a fase móvel A foi aumentando de 40% para 70% de 17 para 25 min. Por fim, a condição inicial da fase móvel foi retomada e mantida até 30 min. As separações cromatográficas foram realizadas no modo de fase reversa utilizando uma coluna C18 (ZORBAX Eclipse XDB, 250 mm x 4,6 mm i.d., 5 mm de espessura de filme, Agilent, CA, EUA). Os analitos CBZ e DCL foram detectados em detector de arranjo de diodos (DAD) no comprimento de onda de 280 nm. Os outros analitos foram

detectados no detector de fluorescência (FLD) no comprimento de onda (em nm) de excitação e emissão adequado: FLU (230/290), LOS (248/410), NAP (284/352) e EE2 (280/310). Os dados cromatográficos foram avaliados com o software LCsolution (Shimadzu, Kyoto, Japão).

4.3 Otimização do procedimento DPX

O procedimento de DPX foi extensamente otimizado para obter as melhores condições de extração para os analitos. Para isso, foram utilizadas abordagens univariadas e multivariadas e os dados obtidos a partir das abordagens multivariadas foram processados no software Statistica 8.0 (STATSOFT, EUA).

4.3.1 Avaliação da fase extratora

Inicialmente foi avaliado o melhor material para a extração dos analitos de modo univariado. Foram pesadas dentro da ponteira DPX-Branco 20 mg de cada material: $\text{Si}_3\text{Py}^+\text{Cl}^-$, PPy e PPy.CTAB. As extrações foram realizadas em água UP fortificada com $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito; o pH foi ajustado em 4 com base nos valores de pKa dos analitos; os parâmetros de extração foram fixados em 5 ciclos de $800 \mu\text{L}$ de amostra (utilizando uma nova alíquota em cada ciclo) e 15 s de tempo de extração por ciclo. Os parâmetros de dessorção foram fixados em 5 ciclos de $100 \mu\text{L}$ de ACN:MeOH (1:1 v/v) (usando a mesma alíquota em todos os ciclos) e 15 s de tempo de dessorção por ciclo.

4.3.2. Otimização do solvente de dessorção

Em seguida, foi avaliado o melhor solvente para a dessorção dos analitos, considerando um planejamento *Simplex-Lattice* com 9 experimentos (incluindo a triplicata no ponto central), como mostra a Tabela 2. Para esta otimização foram utilizados ACN, MeOH, ACE e misturas destes solventes. A superfície de resposta triangular foi gerada usando a média geométrica das áreas dos picos cromatográficos dos analitos. Além disso, para essa otimização foi utilizada a melhor fase extratora e os demais parâmetros do procedimento de DPX foram fixados conforme descrito anteriormente.

Tabela 2. Matriz do planejamento *Simplex-Lattice* para a otimização do solvente de dessorção.

Experimento	ACN prop. (v/v)	MeOH prop. (v/v)	ACE prop. (v/v)
1	1,000	0,000	0,000
2	0,000	1,000	0,000
3	0,000	0,000	1,000
4	0,500	0,000	0,500
5	0,500	0,500	0,000
6	0,000	0,500	0,500
7	0,333	0,333	0,333
8	0,333	0,333	0,333
9	0,333	0,333	0,333

4.3.3 Otimização da etapa de extração

A etapa de extração foi otimizada de acordo com o planejamento composto central contendo 17 experimentos (incluindo a triplicata no ponto central), apresentado na Tabela 3. Foram avaliadas a massa da fase extratora (5 a 30 mg), o volume de amostra (200 a 810 μL) e o número de ciclos de extração (1 a 9). Os tempos de extração e dessorção não foram avaliados, pois foi observado na literatura que esses parâmetros não influenciam o processo de extração e dessorção no procedimento de DPX. Isso é devido às características dessa técnica, como o solvente disperso na ponteira DPX e a mistura dinâmica que ocorre com a aspiração de ar, atingindo rapidamente o equilíbrio.^{40,43} Então, os tempos de extração e dessorção foram fixados em 15 s em todos os experimentos.

Tabela 3. Matriz planejamento composto central para a otimização do número de ciclos de extração, volume de amostra e massa de fase extratora.

Experimento	Ciclos de extração	Volume de amostra (µL)	Massa de fase extratora (mg)
1	3	320	8
2	3	680	23
3	8	680	8
4	8	320	23
5	5	505	18
6	3	680	8
7	3	320	23
8	8	320	8
10	5	505	18
11	1	505	18
12	10	505	18
13	5	505	5
14	5	505	30
15	5	200	18
16	5	810	18
17	5	505	18

4.3.4 Otimização da etapa de dessorção

Nessa etapa, foram otimizados o número de ciclos e o volume de solvente de dessorção necessário para se obter uma dessorção efetiva dos analitos da fase extratora. Para isso foi utilizado um planejamento *Doehlert* com 9 experimentos (incluindo a triplicata do ponto central), como representado na Tabela 4. O tempo de dessorção foi fixado em 15 s.

Tabela 4. Matriz planejamento *Doehlert* para a otimização do número de ciclos de dessorção e volume de solvente.

Experimento	Ciclos de dessorção	Volume de solvente (μL)
1	3	100
2	1	200
3	3	300
4	5	200
5	5	200
6	5	200
7	7	100
8	7	300
9	9	200

4.3.5 Avaliação do pH da amostra e efeito *salting-out*

Outros parâmetros importantes a serem avaliados são o pH da amostra e o efeito *salting-out*. Para esta avaliação foi utilizado um planejamento *Doehlert* com 9 experimentos (incluindo a triplicata no ponto central), como mostrado na Tabela 5. A faixa de pH estudada foi de 2 a 7 com base nos valores de pKa dos analitos e o efeito *salting-out* foi avaliado através da adição de NaCl na solução da amostra na concentração de 0 a 25% m/v.

Tabela 5. Matriz planejamento *Doehlert* para a otimização do pH da amostra e % de NaCl adicionado na amostra.

Experimento	pH	NaCl (%)
1	2	15
2	3	0
3	3	25
4	4	15
5	4	15
6	4	15
7	6	25
8	6	0
9	7	15

4.4 Parâmetros analíticos de mérito e análise de amostras de efluentes hospitalares

As curvas de calibração foram obtidas fortificando uma amostra de efluente hospitalar com os analitos em diferentes concentrações: para CBZ e DCL 5 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, para NAP 0,1 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, para FLU 1 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, para LOS 0,5 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ e para EE2 0,5 a 25 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os coeficientes de correlação (r) foram calculados com base nas curvas de calibração. Os limites de quantificação (LOQs) foram adotados como sendo o primeiro nível de concentração da faixa linear e os limites de detecção (LODs) foram obtidos dividindo-se o LOQ por 3,3. A exatidão do método foi avaliada em três níveis de concentração através das recuperações relativas. A precisão do método foi avaliada através dos ensaios intra-dia ($n=3$) em três níveis de concentração e ensaios inter-dia ($n=9$) em um nível de concentração.

Além disso, a robustez do método foi avaliada através do teste de Youden. Seis principais fatores que podem influenciar a extração do método foram selecionados e seus efeitos foram avaliados por pequenas variações feitas simultaneamente para valores maiores e menores do que a condição definida como

ótima. Os resultados foram expressos através do gráfico de Lenth. Na Tabela 6 estão apresentados os parâmetros avaliados e as condições de variação e na Tabela 7 estão apresentados os experimentos realizados considerando a combinação dos parâmetros e variações. Os resultados foram expressos através do gráfico de Lenth.

Tabela 6. Parâmetros avaliados, condição nominal e variações para o teste de Youden para avaliação da robustez do método.

Parâmetro	Nominal	Variação	Condição ótima
Sal %	A 12%	a 18%	15%
pH da amostra	B 3,0	b 4,0	3,5
Volume de amostra	C 680 µL	c 720 µL	700 µL
Números de ciclos de extração	D 5	d 7	6 ciclos
Volume de ACN – dessorção	E 80 µL	e 120 µL	100 µL
Número de ciclos de dessorção	F 2	f 4	3 ciclos
Massa fase extratora	G 18 mg	g 22 mg	20 mg

Tabela 7. Experimentos realizados considerando a combinação dos parâmetros (variação menor e maior) para o teste de Youden para avaliação da robustez do método

Efeito	Combinação dos parâmetros							
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7	Exp. 8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	A
B/b	B	B	b	b	B	B	b	B
C/c	C	c	C	c	C	c	C	C
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E

F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	G
Resultado	Área							

Duas amostras de efluente hospitalar foram analisadas. As amostras foram coletadas nas saídas de estações de tratamento de efluente de hospitais e clínicas de Florianópolis-SC e foram armazenadas a 4°C até a análise. Antes das análises, as amostras foram deixadas decantando e o sobrenadante foi submetido ao procedimento de DPX otimizado.

4.5 Segurança no Laboratório e Tratamento de Resíduos

O procedimento experimental abordado neste trabalho não traz muitos riscos à segurança do analista e do laboratório. No entanto, alguns cuidados foram tomados, como o uso de jalecos e sapatos fechados, imprescindível para qualquer procedimento realizado em laboratório, seja ele de alta periculosidade ou não e o uso de luvas, necessário para manipulação de solventes orgânicos, ácidos e amostras. Além da proteção, esses acessórios evitam possíveis fontes de contaminação. Os resíduos gerados no preparo da amostra e nas análises cromatográficas foram separados no laboratório e encaminhados para a empresa responsável pelo tratamento de resíduos da UFSC.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização Cromatográfica

Um dos itens mais importantes para uma separação cromatográfica eficiente e que pode determinar a qualidade da detecção dos analitos é a composição da fase móvel. A otimização cromatográfica teve como base estudos anteriores contendo os analitos deste estudo⁴¹ e a eluição foi feita no modo gradiente. Os solventes selecionados foram ACN e água ultrapura acidificados com 0,1% v/v de ácido fórmico. A adição de ácido fórmico é necessária para que o pH da solução fique em torno de 2,5, garantindo que os analitos estejam na forma neutra. Variando-se a proporção entre os solventes durante a corrida cromatográfica foi possível obter o gradiente representado na Tabela 8.

Tabela 8. Gradiente de solventes para a separação cromatográfica obtido a partir da injeção de 20 μL de uma solução 5 mg L^{-1} contendo FLU, LOS, CBZ, EE2, NAP e DCL.

Tempo (min)	ACN acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (%)	Água acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (%)
0,01 - 17,00	40	60
17,01 - 25,00	70	30
25,01 - 30,00	40	60

Nos cromatogramas das Figuras 5 e 6 é possível observar a separação de todos os analitos efetuada no FLD e no DAD, respectivamente.

Figura 5. Cromatograma da separação dos analitos obtido no detector de fluorescência na condição de gradiente de solventes otimizada. Comprimentos de onda de excitação e emissão, em nm, para: FLU (230/290), LOS (248/410), NAP (284/352) e EE2 (280/310). Injeção de 20 μL de uma solução 5 mg L^{-1} .

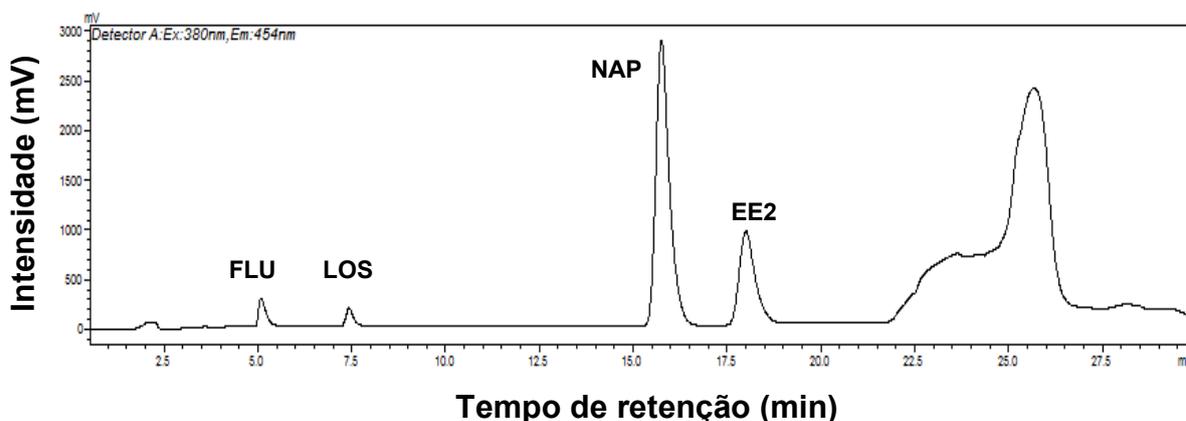
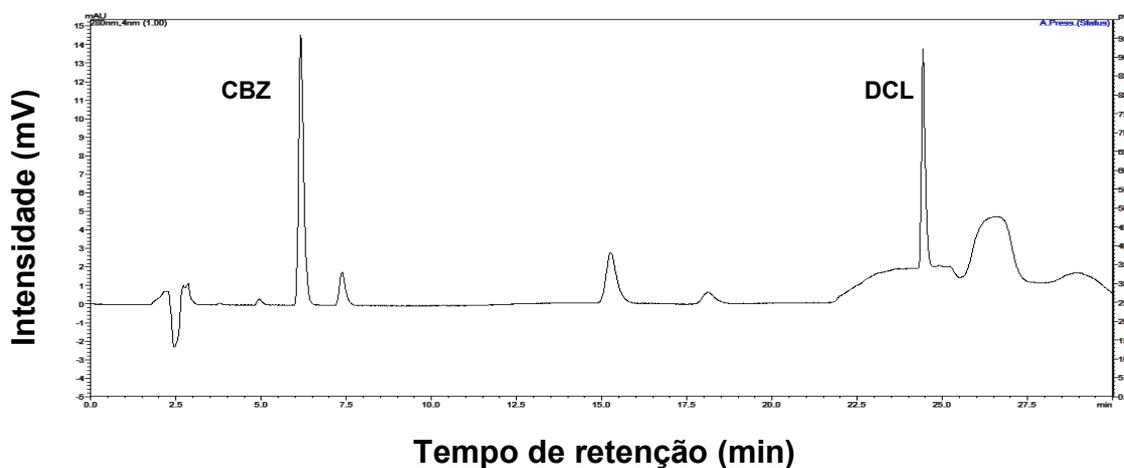


Figura 6. Cromatograma da separação dos analitos obtido no detector de arranjo de diodos na condição de gradiente de solventes otimizada. Comprimento de onda de 280 nm para CBZ e DCL. Injeção de 20 μL de uma solução 5 mg L^{-1} .



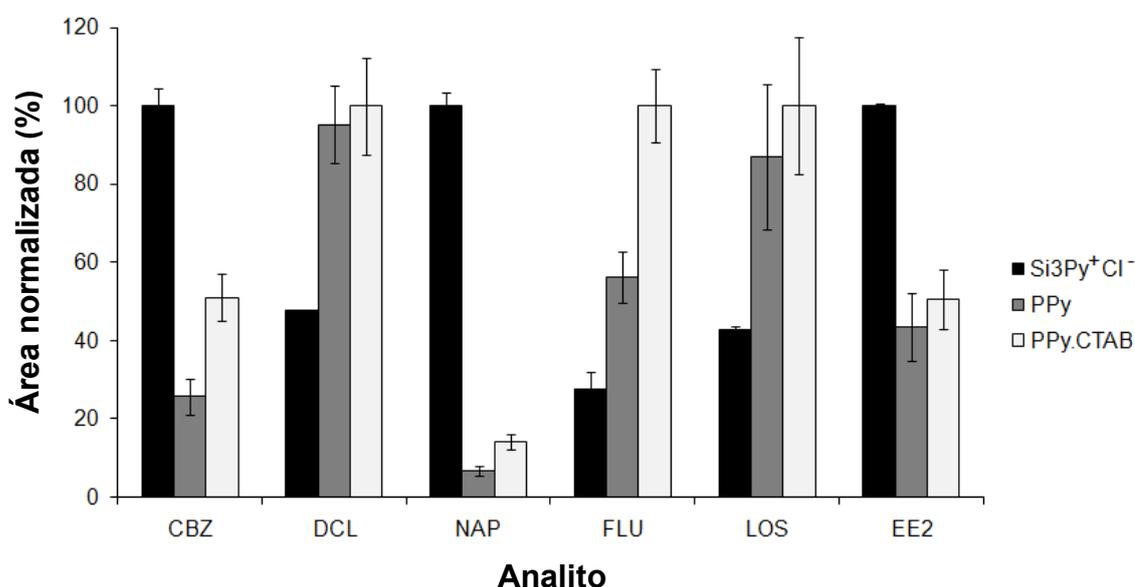
5.2 Otimização do procedimento de DPX

5.2.1 Avaliação da fase de extração

A seleção da fase extratora é um passo determinante para o sucesso do método. Para obter boa eficiência de extração, é necessário escolher uma fase extratora com certas características, tais como: grupos funcionais que podem interagir com os analitos, além de um material com facilidade de dispersão no

dispositivo de DPX, para se obter uma mistura dinâmica satisfatória. Os três materiais selecionados, $\text{Si}_3\text{Py}^+\text{Cl}^-$, $\text{PPy}\cdot\text{Cl}$ e $\text{PPy}\cdot\text{CTAB}$, possuem essas características. A avaliação foi realizada de forma univariada e a eficiência de extração dos materiais foi comparada no gráfico de barras da Figura 7.

Figura 7. Avaliação univariada das fases extratoras $\text{Si}_3\text{Py}^+\text{Cl}^-$, $\text{PPy}\cdot\text{Cl}$ e $\text{PPy}\cdot\text{CTAB}$ utilizando no procedimento de DPX para extração de CBZ, DCL, NAP, FLU, LOS e EE2. A extração foi realizada com 20 mg de cada material; $100\ \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito; 5 ciclos de extração com $800\ \mu\text{L}$ de amostra em cada ciclo e 15 s de tempo de extração; 5 ciclos de dessorção com $100\ \mu\text{L}$ de $\text{ACN}:\text{MeOH}$, 1:1 v/v (mesma alíquota) e 15 s de tempo de dessorção.



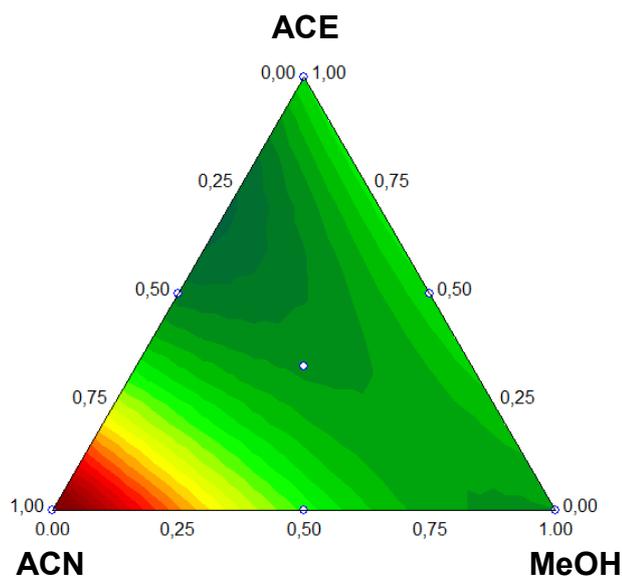
Como pode ser observado na Figura 7, para CBZ, NAP e EE2 o material $\text{Si}_3\text{Py}^+\text{Cl}^-$ apresentou melhor eficiência de extração. Contudo, para DCL, FLU e LOS, os nanocompósitos apresentaram melhor eficiência de extração. No entanto, para o NAP a diferença na eficiência de extração é muito significativa, além disso, os desvios padrões foram menores quando a fase extratora $\text{Si}_3\text{Py}^+\text{Cl}^-$ foi usada. Assim, o material $\text{Si}_3\text{Py}^+\text{Cl}^-$ foi selecionado como fase extratora e usado para os próximos experimentos.

5.2.2 Otimização do solvente de dessorção

A escolha do solvente de dessorção mais adequado é importante para assegurar a dessorção apropriada dos analitos da fase extratora e evitar efeito de

memória. A Figura 8 apresenta a superfície resposta triangular obtida para essa avaliação.

Figura 8. Superfície triangular para avaliação do solvente de dessorção. A extração foi realizada com 20 mg de $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$; $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito; 5 ciclos de extração com $800 \mu\text{L}$ de amostra em cada ciclo e 15 s de tempo de extração; 5 ciclos de dessorção com $100 \mu\text{L}$ de cada solvente e/ou mistura de solventes e 15 s de tempo de dessorção.

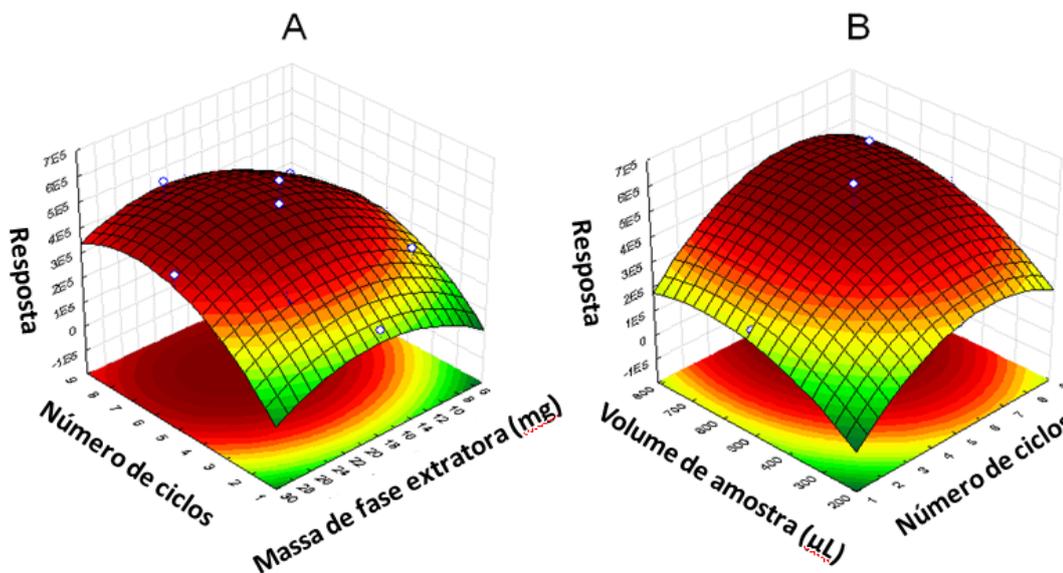


Como pode ser observado, quando foi utilizado 100% de ACN, foram obtidas as melhores respostas cromatográficas. Assim, esse solvente apresentou a melhor capacidade de romper as interações analito-fase extratora e foi selecionado para os próximos experimentos.

5.2.3 Otimização da etapa de extração

O procedimento DPX possui muitos parâmetros que precisam ser otimizados. Com a intenção de reduzir o número de experimentos, reagentes, material e tempo, e também avaliar a correlação dos parâmetros, um planejamento composto central com 17 experimentos foi empregado para avaliar o número de ciclos de extração (1 a 9); volume da amostra (200 a $810 \mu\text{L}$) e massa da fase extratora (5 a 30 mg). As superfícies obtidas estão apresentadas nas Figuras 9A e 9B.

Figura 9. Superfície de resposta obtida para o planejamento composto central. Em (A) avaliação do número de ciclos de extração *versus* a massa da fase extratora (mg) e em (B) avaliação do volume da amostra (μL) *versus* o número de ciclos de extração. As extrações foram realizadas com $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito; 15 s de tempo de extração e dessorção; e 5 ciclos de dessorção com $100 \mu\text{L}$ de ACN.

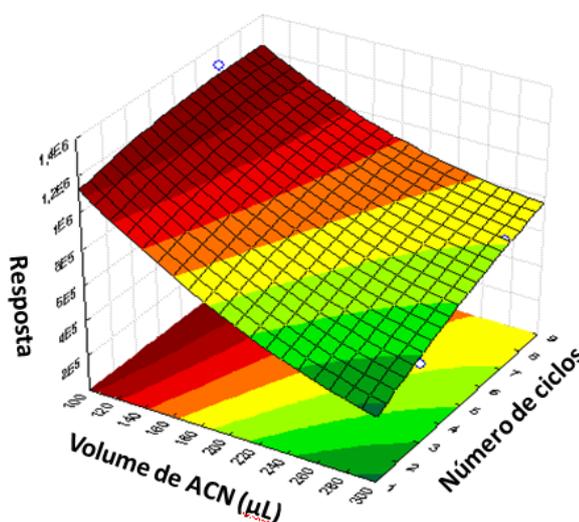


De acordo com a Figura 9A, a resposta cromatográfica usando menor quantidade de massa de fase extratora não foi satisfatória, bem como usando quantidades elevadas. Isso pode ser explicado porque grande quantidade de fase extratora dificulta a mistura dinâmica da amostra e da fase extratora. Assim, a melhor resposta foi obtida com 20 mg de $\text{Si}_3\text{Py}^+\text{Cl}^-$. De acordo com a Figura 9B, pode-se observar que o aumento do volume da amostra aumentou a resposta cromatográfica. No entanto, o tamanho da ponteira de DPX (1 mL) limita o volume da amostra. No caso deste planejamento, 700 μL de amostra foi o volume ideal para o procedimento de DPX. Em relação ao número de ciclos de extração, pode-se observar nas Figuras 9A e B que 6 ciclos foram suficientes para a extração dos analitos. Portanto, para melhorar a frequência analítica do método, 6 ciclos foram selecionados para os próximos experimentos. Assim, as condições retiradas desse planejamento foram o uso de 20 mg de $\text{Si}_3\text{Py}^+\text{Cl}^-$, 6 ciclos de extração e 700 μL de amostra em cada ciclo.

5.2.4 Otimização da etapa de dessorção

O planejamento *Doehlert* foi utilizado para avaliar o número de ciclos de dessorção e o volume de solvente de dessorção. Pode-se observar na Figura 10 a superfície resposta obtida.

Figura 10. Superfície resposta obtida a partir do planejamento *Doehlert* para o volume de ACN e número de ciclos de dessorção. A extração foi realizada com 20 mg de $\text{Si}_3\text{Py}^+\text{Cl}^-$; $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito; 6 ciclos de extração com $700 \mu\text{L}$ de amostra em cada ciclo e 15 s de tempo de extração; 5 ciclos de dessorção com $100 \mu\text{L}$ de ACN e 15 s de tempo de dessorção.



Como pode ser observada na Figura 10, a melhor resposta cromatográfica foi obtida com $100 \mu\text{L}$ de ACN, provavelmente devido a uma maior pré-concentração dos analitos. Com relação ao número de ciclos de dessorção, esse não apresentou influência, sendo assim selecionado 3 ciclos com $100 \mu\text{L}$ de ACN (mesma alíquota) para a dessorção dos analitos.

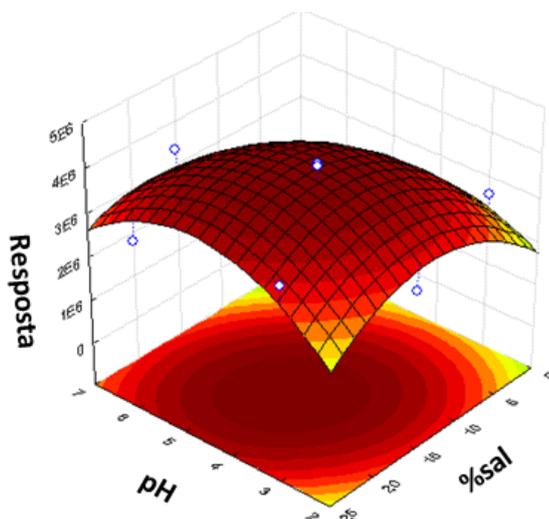
5.2.5 Avaliação do pH da amostra e efeito *salting-out*

Outros parâmetros que podem afetar a extração usando o procedimento de DPX são o pH da amostra e a adição de sal. Para avaliar esses parâmetros foi utilizado um planejamento *Doehlert* com 9 experimentos. Para a melhor interação entre o analito e a fase extratora é preferível que os analitos estejam na forma neutra. Para compostos ácidos, o pH deve ser 1,5 unidades menor que o pK_a dos analitos.⁴² Os pK_a 's dos analitos em estudo são, 4,00, 4,19, 9,80, 5,85, 10,33 e

15,96 para DCL, NAP, FLU, LOS, EE2 e CBZ, respectivamente. Como o DCL tem um valor menor de pKa, o pH da amostra foi avaliado de 2 a 7.

A adição de sal pode influenciar a massa do analito extraído da amostra devido ao efeito *salting-out*. Um aumento no teor de sal pode diminuir a solubilidade dos analitos na amostra aquosa, facilitando a migração para a fase extratora. Este efeito é mais pronunciado em compostos polares.⁴⁸ No caso dos analitos em estudo pode-se observar que eles possuem características de não polar a média polaridade com valores de log Kow de 2,77, 2,99, 3,90, 4,17, 4,26 e 5,00 para CBZ, NAP, EE2, DCL, FLU e LOS, respectivamente. Assim, este parâmetro foi avaliado de 0 a 25% m/v de NaCl. A superfície resposta obtida é mostrada na Figura 11.

Figura 11. Superfície resposta obtida a partir do planejamento *Doehlert* para a avaliação do pH da amostra e % de NaCl (m/v). A extração foi realizada com 20 mg de Si3Py⁺Cl⁻; 100 µg L⁻¹ de cada analito; 6 ciclos de extração com 700 µL de amostra em cada ciclo e 15 s de tempo de extração; 3 ciclos de dessorção com 100 µL de ACN e 15 s de tempo de dessorção.



Como pode ser observado na Figura 11, as melhores respostas cromatográficas foram obtidas numa ampla faixa de pH e % de NaCl (m/v). Como a resposta obtida é um compromisso para todos os analitos, o pH 3,5 foi selecionado visto que o pKa do DCL é 4,00 e devido a maioria dos analitos estarem na forma neutra, o que favorece a interação com a fase extratora. Com relação à adição de NaCl, pode-se observar que não é necessário um maior teor de sal, sendo 15%

(m/v) de NaCl a condição ideal para esta variável. Isso pode ser devido aos analitos apresentarem média polaridade

Assim, após a otimização, a condição ideal identificada foi a utilização de 20 mg de fase extratora Si3Py⁺Cl⁻; 6 ciclos de extração com 700 µL de amostra em cada ciclo e 15 s de tempo de extração; 3 ciclos de dessorção com 100 µL de ACN (mesma alíquota) e 15 s de tempo de dessorção; pH da amostra ajustado em 3,5 e adição de 15% (m/v) de NaCl na amostra.

5.3 Parâmetros analíticos de mérito e análise de amostras de efluentes hospitalares

As curvas de calibração foram obtidas fortificando uma amostra de efluente hospitalar com os analitos em seis níveis diferentes de concentração. As extrações/dessorções foram realizadas utilizando o procedimento Si3Py⁺Cl⁻-DPX otimizado e os resultados são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9. Equação linear, faixa linear, coeficientes de correlação, limites de detecção e quantificação obtidos para os compostos farmacêuticos em efluente hospitalar utilizando o procedimento Si3Py⁺Cl⁻-DPX otimizado.

Analito	Equação Linear	Faixa linear (µg L ⁻¹)	Coefficiente de Correlação (r)	LOD (µg L ⁻¹)	LOQ (µg L ⁻¹)
CBZ	$y = 645,03x - 731,96$	5 - 100	0,9996	1,510	5,00
DCL	$y = 760,09x - 2089,9$	5 - 100	0,9990	1,510	5,00
NAP	$y = 262281x - 21877$	0,1 - 10	0,9996	0,030	0,10
FLU	$y = 9805,6x + 3435$	1 - 50	0,9710	0,303	1,00
LOS	$y = 11535x - 5496,7$	0,5 - 100	0,9991	0,151	0,50
EE2	$y = 101441x - 13706$	0,5 - 25	0,9994	0,151	0,50

Os coeficientes de correlação (r) obtidos foram satisfatórios, variando de 0,9710 a 0,9996 indicando boa correlação da resposta instrumental (y) e da

concentração do analito (x).⁴⁹ Os valores de LOD variam de 0,030 $\mu\text{g L}^{-1}$ para NAP a 1,510 $\mu\text{g L}^{-1}$ para CBZ e DCL e os valores de LOQ variam de 0,10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para NAP a 5,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ para CBZ e DCL.

Através de amostra fortificada com os analitos em três níveis de concentração foi avaliada a exatidão do método através da porcentagem da recuperação relativa. A precisão do método foi avaliada através do ensaio intra-dia (n=3) em três níveis de concentração e ensaios inter-dia (n=9) em um nível de concentração, calculadas através do desvio padrão relativo (RSD). Os resultados são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10. Recuperação relativa, precisões intra e inter-dia para os compostos farmacêuticos em efluente hospitalar usando o procedimento $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$ -DPX otimizado.

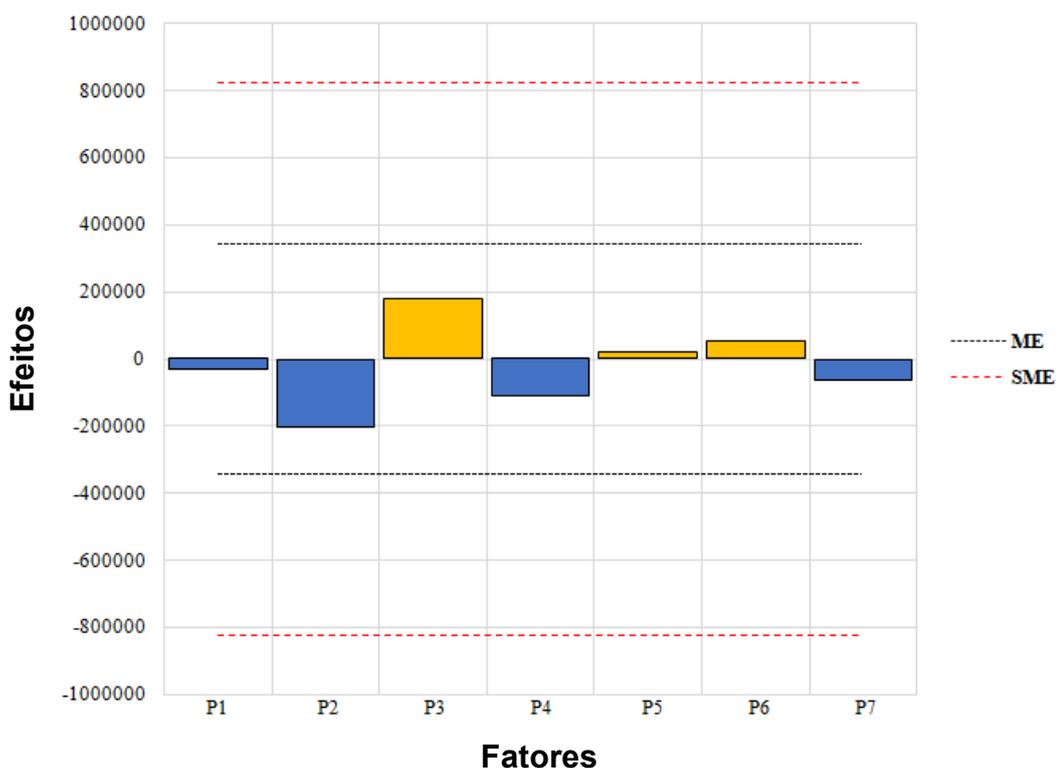
Analito	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação Relativa (%, n=3)	Precisão (RSD, %)	
			Intra-dia (n=3)	Inter-dia (n=9)
CBZ	5	118	6	15
	25	127	13	
	100	97	13	
DCL	5	86	8	19
	25	94	19	
	100	86	7	
NAP	0,10	110	19	
	1	113	18	
	5	117	7	18
FLU	1	83	5	
	5	98	4	10
	25	115	7	

	0,50	120	1	
LOS	5	108	6	19
	100	80	12	
	0,5	97	13	
EE2	5	118	12	17
	25	109	15	

Como observado na Tabela 10, a recuperação relativa variou de 80 a 127% E as precisões intra e inter-dia foram inferiores a 19%. A maioria dos resultados está de acordo com as diretrizes de validação⁵⁰, apenas para CBZ na concentração de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ é possível observar uma recuperação maior que a aceitável (127%). Isso pode ser explicado pela complexidade da matriz utilizada. No entanto, esses resultados destacam a aplicabilidade do método desenvolvido para o monitoramento de compostos farmacêuticos de diferentes classes em efluentes hospitalares.

O teste de Youden foi realizado para avaliar a robustez do método desenvolvido. Pequenas variações nos principais parâmetros que podem afetar a extração pelo procedimento $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$ -DPX foram feitas simulando uma aplicação de rotina para valores maiores e menores que a condição definida como ótima⁵¹. Os parâmetros e variações foram: massa de $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$ (18 a 22 mg), % de NaCl (12 a 18%), pH da amostra (3,0 a 4,0), volume da amostra (680 a 720 μL), número de ciclos de extração (5 a 7), volume de ACN para dessorção (80 a 120 μl) e número de ciclos de dessorção (2 a 4). Os resultados foram expressos através do gráfico de Lenth representado na Figura 12.

Figura 12. Gráfico de Lenth para a avaliação da robustez do método desenvolvido com base no procedimento $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$ -DPX otimizado. Fatores: P1 - Sal %; P2 - pH da amostra; P3 - Volume de amostra; P4 - Números de ciclos de extração; P5 - Volume de ACN – dessorção; P6 - Número de ciclos de dessorção e P7 - Massa fase extratora.



Como múltiplos efeitos foram avaliados, a margem de erro simultânea (SME) é a linha de referência e devem ser considerada.^{52,53} Como pode ser observado, nenhum parâmetro excedeu este limite, assim o método pode ser considerado robusto.

Além disso, foi realizada uma comparação entre o método proposto $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$ -DPX e outros métodos reportados na literatura para os mesmos analitos, apresentada na Tabela 11.

Tabela 11. Comparação entre o procedimento Si3Py⁺Cl⁻-DPX e outros métodos reportados na literatura para os mesmos analitos.

Método	Analito	Fase extratora	Matriz	Faixa linear (µg L ⁻¹)	LOQ (µg L ⁻¹)	Tempo de preparo de amostra	Volume de solvente
	CBZ			5-100	5		
Este trabalho DPX e HPLC-DAD/FLD	DCL			5-100	5	6,5 min	100 µL
	NAP	20 mg de	Efluente	0,1-10	0,1		
	FLU	Si3Py ⁺ Cl ⁻	Hospitalar	1-50	1		
	LOS			0,5-100	0,5		
	EE2			0,5-25	0,5		
LLE e HPLC-UV ⁵⁴	DCL	40 mL de	Efluente	300-10000	12	-	42 mL
	NAP	clorofórmio	Hospitalar		8		
SBSE e HPLC-UV ⁵⁵	LOS	50 mg de Ni:ZnS-AC	Urina	0,4-50	0,38	Aprox. 32 min	280 µL
RDSE e GC-MS ⁵⁶	DCL	40 mg de	Água potável e águas naturais (poço e rio)	0,1- 100	0,12	Aprox. 115 min	10 mL
	EE2	Oasis® HLB			0,21		
SPE e HPLC-DAD ⁵⁷	DCL	200 mg de	Estuário e água do mar	100-5000	0,036	-	16 mL
	NAP	Oasis® HLB			0,025		

DSPE e HPLC-DAD ⁵⁸	CBZ	43 mg de GO-PANI	ETEs	-	1,12	Aprox. 21 min	3,5 mL
	DCL				0,36		
	NAP				0,15		
SPE e HPLC-MS ⁵⁹	CBZ	60 mg de Oasis® HLB	Águas superficiais e efluentes	0,297-100	0,891	Aprox. 112 min	21 mL

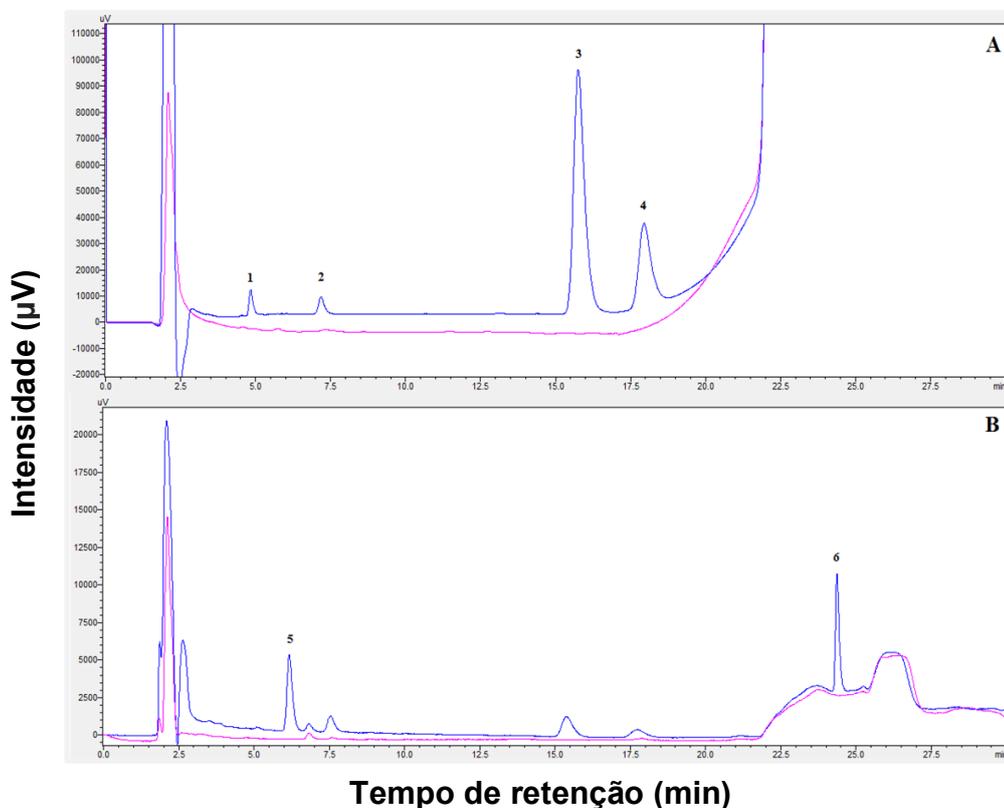
Como pode ser observado na Tabela 11, neste trabalho o volume de solvente orgânico e fase extratora é menor em relação a outros métodos reportados, apenas 100 µL e 20 mg de Si3Py⁺Cl⁻, respectivamente. Os demais métodos utilizaram 280 µL a 41 mL de solvente orgânico e 40 a 200 mg de fase extratora. Esses valores mostram os aspectos ambientalmente amigáveis da metodologia desenvolvida. Outro fator importante é o tempo de preparo da amostra. Neste trabalho foi necessário apenas 6,5 min para todas as etapas, incluindo ajuste de pH e adição de NaCl na amostra. Para os outros métodos citados foram necessários 21 min a quase 2 h para o preparo da amostra. Isso destaca o aspecto de alto rendimento do método proposto.

Em relação aos LOQs, este método apresentou valores comparáveis ou menores para os analitos analisados no detector de FLD (NAP e LOS) do que os métodos que utilizam o detector de DAD para os mesmos analitos.⁵⁴⁻⁵⁶ Além disso, pode-se observar que para o EE2, o LOQ obtido neste trabalho é comparável ao valor obtido em uma metodologia que usa GC-MS para análise.⁵⁶ Portanto, os LOQs obtidos com a metodologia proposta são satisfatórios considerando-se que a instrumentação utilizada é relativamente simples em comparação com a utilização de detectores de massa.

Duas amostras de efluente hospitalar denominadas A e B, foram utilizadas para avaliar o método proposto com relação ao monitoramento de compostos farmacêuticos em efluentes hospitalares. LOS e FLU foram identificados abaixo do LOQ no efluente B. Nenhum analito foi identificado no efluente A. Na Figura 13 está

apresentada a comparação entre os cromatogramas obtidos a partir da extração do efluente hospitalar B sem adição de analito (linha rosa) e com adição dos analitos (linha azul).

Figura 13. Comparação entre as extrações realizadas no efluente hospitalar B sem adição dos analitos (linha rosa) e com adição dos analitos (linha azul). Em (A) comparação usando o detector de FLD e amostra fortificada com 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de 1-FLU, 2-LOS, 3-NAP e 4-EE2. Em (B) comparação usando o detector de DAD no comprimento de onda de 280 nm e amostra fortificada com 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de 5-CBZ e 6-DCL.



6 CONCLUSÃO

Neste estudo, foi desenvolvido um método ambientalmente amigável baseado no procedimento de DPX usando fase extratora alternativa. As vantagens do método foram o volume de solvente orgânico empregado (apenas 100 μL) e o alto rendimento, uma vez que as extrações foram realizadas em apenas 6,5 min. Três materiais foram avaliados para a extração dos analitos e o material $\text{Si}_3\text{Py}^+\text{Cl}^-$ apresentou melhor desempenho. Este material é fácil de sintetizar e de baixo custo, tornando o método desenvolvido acessível para ser empregado em outros laboratórios. O método proposto foi extensamente otimizado através de abordagens univariadas e multivariadas e os parâmetros analíticos de mérito obtidos foram muito satisfatórios, com LOQs aceitáveis e comparáveis a outras metodologias reportadas. Também foi demonstrada a aplicabilidade do método $\text{Si}_3\text{Py}^+\text{Cl}^-$ -DPX para a análise de efluentes hospitalares e monitoramento de diversos fármacos de diferentes classes terapêuticas utilizando uma instrumentação analítica mais simples. Além disso, foi ampliada a aplicabilidade do material $\text{Si}_3\text{Py}^+\text{Cl}^-$ para outros analitos e foi demonstrado o bom desempenho deste material para extrair analitos de matrizes mais complexas.

7 REFERÊNCIAS

- ¹ CONAMA, Resolução Nº 420/2009 - "Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas." - Data da legislação: 28/12/2009 - Publicação DOU nº 249, de 30/12/2009.
- ² Revista RQI. **Contaminantes Emergentes**. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/rqi/2013/738/RQI-738-pagina4-Contaminantes-Emergentes.pdf>>. Acesso em: 25 out. 2019.
- ³ GOGOI, Anindita et al. Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review. **Groundwater For Sustainable Development**, [s.l.], v. 6, p.169-180, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gsd.2017.12.009>.
- ⁴ TAHERAN, Mehrdad et al. Emerging contaminants: Here today, there tomorrow!. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, [s.l.], v. 10, p.122-126, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enmm.2018.05.010>.
- ⁵ SAUVÉ, S.; DESROSIERS, M. A review of what is an emerging contaminant. *Chemical Central Journal*. V. 8, n. 5. 2014.
- ⁶ ANVISA. **Conceitos e definições de medicamentos**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/medicamentos/conceitos-e-definicoes>>. Acesso em: 25 out. 2019.
- ⁷ BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. PORTARIA Nº 3.916, DE 30 DE OUTUBRO DE 1998. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt3916_30_10_1998.html>. Acesso em: 25 out. 2019.
- ⁸ SOUZA, F & FÉRIS, L. Hospital and Municipal Wastewater: Identification of Relevant Pharmaceutical Compounds. *Water Environment Research*, Volume 88, Number 9, 2016.
- ⁹ MÁRTA, Zoltán et al. Simultaneous determination of ten nonsteroidal anti-inflammatory drugs from drinking water, surface water and wastewater using micro UHPLC-MS/MS with on-line SPE system. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 160, p.99-108, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2018.07.016>.
- ¹⁰ SZABÓ, Lili et al. Investigation of the sorption of 17 α -ethynylestradiol (EE2) on soils formed under aerobic and anaerobic conditions. **Chemosphere**, [s.l.], v. 240, p.124817, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124817>.
- ¹¹ BABARAHIMI, Vida et al. Validated determination of losartan and valsartan in human plasma by stir bar sorptive extraction based on acrylate monolithic polymer, liquid chromatographic analysis and experimental design methodology. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 153, p.204-213, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2018.02.030>.

- ¹² OFOEGBU, Pearl U. et al. Effects of low concentrations of psychiatric drugs (carbamazepine and fluoxetine) on the freshwater planarian, *Schmidtea mediterranea*. **Chemosphere**, [s.l.], v. 217, p.542-549, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.198>.
- ¹³ CLINICALC. **Drug List by Therapeutic Category**. Disponível em: <<https://clinicalcalc.com/Downloads/Top250Drugs-DrugList.pdf>>. Acesso em: 25 out. 2019.
- ¹⁴ CHEMICALIZE. **Calculation**. Disponível em: <<https://chemicalize.com/#/calculation>>. Acesso em: 11 jun. 2019.
- ¹⁵ XIANG, Jiajia et al. The fate and risk assessment of psychiatric pharmaceuticals from psychiatric hospital effluent. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [s.l.], v. 150, p.289-296, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.049>.
- ¹⁶ DAOUK, Silwan et al. Prioritization methodology for the monitoring of active pharmaceutical ingredients in hospital effluents. **Journal Of Environmental Management**, [s.l.], v. 160, p.324-332, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.06.037>.
- ¹⁷ AZUMA, Takashi et al. Environmental fate of pharmaceutical compounds and antimicrobial-resistant bacteria in hospital effluents, and contributions to pollutant loads in the surface waters in Japan. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 657, p.476-484, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.433>.
- ¹⁸ AL-MAADHEED, Shuaa et al. Antibiotics in hospital effluent and domestic wastewater treatment plants in Doha, Qatar. **Journal Of Water Process Engineering**, [s.l.], v. 28, p.60-68, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.01.005>.
- ¹⁹ PAPAGEORGIOU, Myrsini et al. Comprehensive investigation of a wide range of pharmaceuticals and personal care products in urban and hospital wastewaters in Greece. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 694, p.133565, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.371>.
- ²⁰ VERLICCHI, P.; AUKIDY, M. Al; ZAMBELLO, E.. What have we learned from worldwide experiences on the management and treatment of hospital effluent? — An overview and a discussion on perspectives. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 514, p.467-491, maio 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.020>.
- ²¹ BOGER, et. al. Micropoluentes emergentes de origem farmacêutica em matrizes aquosas do Brasil: uma revisão sistemática. *Ciência e Natura*, Santa Maria, v. 37 n. 4 set-dez. 2015, p. 725-739.
- ²² AL-QAIM, Fouad F. et al. Multi-residue analytical methodology-based liquid chromatography-time-of-flight-mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in surface water and effluents from sewage treatment plants and hospitals.

Journal Of Chromatography A, [s.l.], v. 1345, p.139-153, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.025>.

²³ OMAR, T.f.t. et al. Occurrence and level of emerging organic contaminant in fish and mollusk from Klang River estuary, Malaysia and assessment on human health risk. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 248, p.763-773, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.060>.

²⁴ NKOOM, Matthew et al. Bioconcentration of the antiepileptic drug carbamazepine and its physiological and biochemical effects on *Daphnia magna*. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [s.l.], v. 172, p.11-18, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.061>.

²⁵ GUILOSKI, Izonete Cristina et al. Effects of environmentally relevant concentrations of the anti-inflammatory drug diclofenac in freshwater fish *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [s.l.], v. 139, p.291-300, maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.01.053>.

²⁶ MONTAGNER, Cassiana C.; VIDAL, Cristiane; ACAYABA, Raphael. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. *Química Nova*, [s.l.], v. 9, n. 40, p.1094-1110, 11 jul. 2017. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170091>.

²⁷ CHISVERT, Alberto; CÁRDENAS, Soledad; LUCENA, Rafael. Dispersive micro-solid phase extraction. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 112, p.226-233, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.005>.

²⁸ CARASEK, Eduardo; MORÉS, Lucas; MERIB, Josias. **Trends In Environmental Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.1-2, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.teac.2018.e00060>.

²⁹ RAMOS, Lourdes. Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1221, p.84-98, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.11.011>.

³⁰ JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, Campinas, v. 2, n. 1, p.13-25, 2010.

³¹ HASHEMI, Beshare; ZOHRABI, Parvin; SHAMSIPUR, Mojtaba. Recent developments and applications of different sorbents for SPE and SPME from biological samples. **Talanta**, [s.l.], v. 187, p.337-347, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2018.05.053>.

³² MUSILE, Giacomo et al. Development of an in-house mixed-mode solid-phase extraction for the determination of 16 basic drugs in urine by High Performance Liquid Chromatography-Ion Trap Mass Spectrometry. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1560, p.10-18, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2018.05.019>

³³ WINBORN, Jessica; KERRIGAN, Sarah. Quantitative analysis of desomorphine in blood and urine using solid phase extraction and gas chromatography-mass

spectrometry. **Journal Of Chromatography B**, [s.l.], v. 1106-1107, p.43-49, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.12.022>.

³⁴ NASCIMENTO, Ronaldo Ferreira do et al. **Cromatografia gasosa: Aspectos teóricos e práticos**. Fortaleza: Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará, 2018.

³⁵ ELLISON, S. T.; BREWER, W. E.; MORGAN, S. L.. Comprehensive Analysis of Drugs of Abuse in Urine Using Disposable Pipette Extraction. **Journal Of Analytical Toxicology**, [s.l.], v. 33, n. 7, p.356-365, 1 set. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jat/33.7.356>.

³⁶ OENNING, Anderson Luiz; MERIB, Josias; CARASEK, Eduardo. An effective and high-throughput analytical methodology for pesticide screening in human urine by disposable pipette extraction and gas chromatography – mass spectrometry. **Journal Of Chromatography B**, [s.l.], v. 1092, p.459-465, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.06.047>.

³⁷ SONG, Shiming et al. Simultaneous determination of neonicotinoid insecticides and insect growth regulators residues in honey using LC–MS/MS with anion exchanger-disposable pipette extraction. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1557, p.51-61, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2018.05.003>.

³⁸ JAKIMSKA, Anna; KOT-WASIK, Agata; NAMIEŚNIK, Jacek. The Current State-of-the-Art in the Determination of Pharmaceutical Residues in Environmental Matrices Using Hyphenated Techniques. **Critical Reviews In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 44, n. 3, p.277-298, abr. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10408347.2013.835244>.

³⁹ CHAVES, Andréa R. et al. The development of a new disposable pipette extraction phase based on polyaniline composites for the determination of levels of antidepressants in plasma samples. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1399, p.1-7, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.04.027>.

⁴⁰ MAFRA, Gabriela et al. Expanding the applicability of cork as extraction phase for disposable pipette extraction in multiresidue analysis of pharmaceuticals in urine samples. **Journal Of Chromatography B**, [s.l.], v. 1102-1103, p.159-166, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.10.021>.

⁴¹ PINTO, Mônia Aparecida Lemos; QUEIROZ, Maria Eugênia Costa. Extração em ponteiros descartáveis: fundamentos teóricos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.101-108, 2015. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.4322/sc.2015.019>.

⁴² BORDIN, Dayanne Cristiane Mozaner et al. Disposable pipette tips extraction: Fundamentals, applications and state of the art. **Journal Of Separation Science**, [s.l.], v. 39, n. 6, p.1168-1172, 25 fev. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201500932>.

⁴³ CORAZZA, Gabriela et al. A hybrid material as a sorbent phase for the disposable pipette extraction technique enhances efficiency in the determination of phenolic

endocrine-disrupting compounds. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1513, p.42-50, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.050>.

⁴⁴ MAGOSSO, H.a. et al. Synthesis, characterization and metal adsorption properties of the new ion exchanger polymer 3-n-propyl(4-methylpyridinium) silsesquioxane chloride. **Journal Of Colloid And Interface Science**, [s.l.], v. 303, n. 1, p.18-24, nov. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2006.07.014>.

⁴⁵ TURAZZI, Francielle Crocetta et al. A rapid and environmentally friendly analytical method based on conductive polymer as extraction phase for disposable pipette extraction for the determination of hormones and polycyclic aromatic hydrocarbons in river water samples using high-performance liquid chromatography/diode array detection. **Journal Of Environmental Chemical Engineering**, [s.l.], v. 7, n. 3, p.103156-103159, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2019.103156>.

⁴⁶ RAMÔA, Sílvia D.a.s. et al. Production of montmorillonite/polypyrrole nanocomposites through in situ oxidative polymerization of pyrrole: Effect of anionic and cationic surfactants on structure and properties. **Applied Clay Science**, [s.l.], v. 104, p.160-167, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2014.11.026>.

⁴⁷ PIRES, Isabelle Caroline et al. Influência do polipirrol e dos níveis de salinidade na formação de biofilme em *Aeromonas* spp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s.l.], v. 38, n. 8, p.1528-1536, ago. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5374>.

⁴⁸ PAWLISZYN, Janusz. **Handbook of Solid Phase Microextraction**. Ontario: Elsevier, 2011. 496 p.

⁴⁹ BARWICK, Vicki. **Preparation of Calibration Curves: A Guide to Best Practice**. Lgc, 2003. 30 p.

⁵⁰ AOAC, Official Methods of Analysis. **Guidelines for Standard Method Performance Requirements**, 2016. 18 p. Disponível em: http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf

⁵¹ MULHOLLAND, M.; WATERHOUSE, J.. Investigation of the limitations of saturated fractional factorial experimental designs, with confounding effects for an HPLC ruggedness test. **Chromatographia**, v. 25, n. 9, p.769-774, set. 1988.

⁵² BOKOR, Ilonka; SDRAULIG, Sandra; SANAGOU, Masoumeh. Robustness testing of an in-situ caesium extraction unit. **Journal Of Environmental Radioactivity**, [s.l.], v. 178-179, p.426-429, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvrad.2017.05.014>.

⁵³ HUND, E. et al. Comparison of several criteria to decide on the significance of effects in a robustness test with an asymmetrical factorial design. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 404, n. 2, p.257-271, jan. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0003-2670\(99\)00716-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0003-2670(99)00716-3).

⁵⁴ ASHFAQ, Muhammad et al. Determination of Commonly Used Pharmaceuticals in Hospital Waste of Pakistan and Evaluation of Their Ecological Risk

Assessment. **Clean - Soil, Air, Water**, [s.l.], v. 45, n. 6, p.1500392, 18 abr. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/clen.201500392>.

⁵⁵ PEBDANI, Arezou Amiri et al. Application of modified stir bar with nickel: zinc sulphide nanoparticles loaded on activated carbon as a sorbent for preconcentration of losartan and valsartan and their determination by high performance liquid chromatography. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1437, p.15-24, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.02.004>.

⁵⁶ ARISMENDI, Daniel et al. Simultaneous determination of multiresidue and multiclass emerging contaminants in waters by rotating-disk sorptive extraction–derivatization-gas chromatography/mass spectrometry. **Talanta**, [s.l.], v. 201, p.480-489, ago. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2019.03.120>.

⁵⁷ NGUBANE, Ncebakazi Primrose et al. Determination of naproxen, diclofenac and ibuprofen in Umgeni estuary and seawater: A case of northern Durban in KwaZulu–Natal Province of South Africa. **Regional Studies In Marine Science**, [s.l.], v. 29, p.100675, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rsma.2019.100675>.

⁵⁸ RASHVAND, Masoumeh; VOSOUGH, Maryam. Graphene oxide–polyaniline nanocomposite as a potential sorbent for dispersive solid-phase extraction and determination of selected pharmaceutical and personal care products in wastewater samples using HPLC with a diode-array detector. **Analytical Methods**, [s.l.], v. 8, n. 8, p.1898-1907, 2016. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c5ay03182f>.

⁵⁹ MATONGO, Solomon et al. Pharmaceutical residues in water and sediment of Msunduzi River, KwaZulu-Natal, South Africa. **Chemosphere**, [s.l.], v. 134, p.133-140, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.09>.