



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

DEPARTAMENTO DE PAISAGEM, AMBIENTE E ORDENAMENTO

MESTRADO EM QUALIDADE E GESTÃO DO AMBIENTE
ESPECIALIZAÇÃO EM CLIMA, ENERGIA E QUALIDADE DO AMBIENTE

FITORREMEDIAÇÃO DE ÁGUAS CONTAMINADAS COM FÁRMACOS

CAROLINA MOURÃO CORREIA

Orientado por Professora Doutora Ana Vitória Martins Neves Barrocas Dordio

&

Co-orientado por Professora Doutora Dora Maria Fonseca Martins Ginja Teixeira

Dissertação apresentada na Universidade de Évora para obtenção do grau de Mestre em
Qualidade e Gestão do Ambiente

ÉVORA, ABRIL DE 2010



UNIVERSITY OF ÉVORA

DEPARTMENT OF LANDSCAPE, ENVIRONMENT AND PLANNING

MASTER IN QUALITY AND ENVIRONMENTAL MANAGEMENT
EXPERTISE IN CLIMATE, ENERGY AND ENVIRONMENTAL QUALITY

PHYTOREMEDIATION OF CONTAMINATED WATERS WITH PHARMACEUTICALS

CAROLINA MOURÃO CORREIA

ADVISOR: Dr. Ana Vitória Martins Neves Barrocas Dordio

&

CO-ADVISOR: Dr. Dora Maria Fonseca Martins Ginja Teixeira

Thesis presented at the University of Évora to obtain the degree of Master in Quality
and Environmental Management

ÉVORA, APRIL 2010

RESUMO

A presença de compostos farmacêuticos e seus metabolitos no ambiente aquático tornou-se nos últimos anos num problema ambiental emergente. Em particular, uma especial atenção tem vindo a ser dada aos antibióticos dada a sua ecotoxicidade e devido ao problema específico de desenvolvimento de estirpes bacterianas resistentes à sua acção. A baixa eficiência das ETARs na remoção da maior parte deste tipo de poluentes é uma das principais razões para a contaminação dos recursos hídricos e, portanto, é necessário o desenvolvimento de novos processos de tratamento que sejam eficientes na remoção de fármacos, mas se mantenham a níveis de custo aceitáveis. A utilização de leitos construídos de macrófitas (LCMs) tem surgido nas últimas décadas como um sistema de tratamento de efluentes líquidos de baixo custo e com elevadas eficiências na remoção de diversos poluentes orgânicos xenobióticos, incluindo alguns fármacos. Este trabalho teve como objectivo principal avaliar a eficiência de remoção de um antibiótico, a oxitetraciclina, por um microcosmos de LCM utilizando LECA 2/4 como matriz de suporte e plantado com *Phragmites australis*. Preliminarmente foi avaliada a capacidade de adsorção da oxitetraciclina pelo material LECA, a diversas concentrações iniciais, em água e num efluente recolhido após um tratamento secundário. A LECA mostrou elevada capacidade de remoção da oxitetraciclina, quer em água quer em efluente, embora neste último meio se tenha verificado uma ligeira diminuição na eficiência de remoção (4 a 8 %). A quantidade de oxitetraciclina adsorvida relacionou-se de uma forma linear com a quantidade inicial, tendo a LECA demonstrado estar ainda distante da saturação da sua capacidade de adsorção aos níveis de concentração testados (1.5 a 36 mg L⁻¹). Posteriormente foi avaliada a eficiência de remoção de oxitetraciclina alcançada pelo microcosmos de LCM, a qual se verificou ter sido muito elevada (> 99 %) podendo a maior parte da eficiência ser atribuída à matriz de suporte através de fenómenos de adsorção. No entanto, comparando as remoções alcançadas em leitos plantados e não-plantados verificou-se que as plantas permitiram acelerar significativamente o processo de remoção. A cinética de remoção caracterizou-se por um passo inicial rápido, em que nas primeiras 6 h foi removida cerca de 88 % da quantidade inicial de oxitetraciclina nos leitos plantados e 67 % nos leitos não plantados, e por um passo subsequente mais lento, com a quase total remoção do fármaco, tendo as concentrações de equilíbrio sido alcançadas ao fim de 120 h nos leitos plantados e 144 h nos leitos não plantados. O facto de não se ter detectado

oxitetraciclina em tecidos de folhas das plantas usadas nos ensaios sugere que o fármaco não é absorvido pelas plantas, ou, sendo absorvido, não é translocado para a parte aérea ou, então, sofre uma rápida metabolização/transformação (num período inferior a 48 h). Mesmo considerando a hipótese de não ser absorvido pelas plantas, é claro, pelos resultados, que estas têm um efeito positivo na sua remoção, podendo a influência das plantas dever-se a um estímulo do desenvolvimento dos microrganismos que se verificou serem capazes de biodegradar a oxitetraciclina e/ou à libertação de exsudados pelas raízes que poderão catalisar enzimaticamente a degradação deste antibiótico. Os resultados deste estudo apontam para a potencial utilização dos LCMs, tendo LECA como matriz de suporte e plantados com *Phragmites australis*, para a remoção de oxitetraciclina de efluentes contaminados com este antibiótico.

Palavras-chave: Águas residuais; Antibióticos; LCMs; LECA; Oxitetraciclina; *Phragmites australis*

ABSTRACT

The occurrence of pharmaceutical compounds and their metabolites in the aquatic environment has become an emergent environmental problem over the last years. A special attention is being given to antibiotics in particular, considering its ecotoxicity and the specific problem of the development of antibiotic resistant strains of bacteria. One of the main reasons for the contamination of water resources with pharmaceuticals is the low efficiency of wastewater treatment plants in removing most of these pollutants. Therefore, the development of efficient and cost-effective wastewater treatment processes is necessary to deal with this type of pollutants. The constructed wetlands systems (CWS) have become, over the last decades, a low cost and low maintenance wastewater treatment alternative which has already shown high efficiencies in the removal of several organic xenobiotic compounds, including some pharmaceuticals. The main objective of this work was to evaluate the removal efficiency of an antibiotic, oxytetracycline, by a microcosm of a CWS using LECA 2/4 as the support matrix and planted with *Phragmites australis*. In preliminary studies, the adsorption capacity of oxytetracycline by LECA was evaluated for several initial concentrations of oxytetracycline, in water and in a wastewater that was collected after secondary treatment. LECA has shown a high capacity for the removal of oxytetracycline, both in water and in wastewater, although some slight decrease in the removal efficiency (4 to 8 %) has been observed in latter. The adsorbed amounts of oxytetracycline presented a linear relationship with the initial amounts which showed that the adsorption capacity of LECA was still far from saturation at the concentration levels tested (1 – 36 mg L⁻¹). Following, assays were conducted in order to evaluate the oxytetracycline removal efficiency by the CWS microcosms. Results have shown high removal efficiencies (> 99 %) which could be attributed mostly due to adsorption processes occurring at the support matrix. Nevertheless, by comparing the removals attained in planted beds with those obtained by unplanted beds, it could be observed that the presence of plants led to a significant acceleration of the removal process. The removal kinetics was characterized by a fast initial step that was responsible, during the first 6 h, for the removal of about 88 % of the initial amounts of oxytetracycline in the planted beds and 67 % in the unplanted beds. A subsequent slower step allowed for the additional removal of almost all remaining pharmaceutical, and the equilibrium

concentrations were attained after 120 h and 144 h in the planted and unplanted beds respectively. The fact that no detectable amounts of oxytetracycline were found in leaf tissues of the plants used in the assays suggests that either the pharmaceutical is not taken up by the plants or, if it is, it is not translocated to aerial parts or it is quickly metabolized/transformed (within a period shorter than 48 h). Even considering the hypothesis that oxytetracycline is not taken up by the plants, it is quite clear that, considering the results obtained, plants have a positive effect in its removal. This contribution may consist of a stimulus for the development of microorganisms that were shown to be able to biodegrade oxytetracycline and/or the release of exudates that may enzymatically catalyze the degradation of this antibiotic. The results of this study point out the potential for the use of CWS, with LECA as support matrix and planted with *Phragmites australis*, for the removal of oxytetracycline from contaminated wastewaters.

Keywords: Antibiotics; Constructed Wetlands; LECA; Oxytetracycline; *Phragmites australis*; Wastewaters

ÍNDICE

I. Introdução	8
II. Metodologia Experimental	13
2.1 Equipamentos	13
2.2 Reagentes e Materiais	14
2.3 Métodos Analíticos	15
2.4 Estudos de conservação	19
2.5 Avaliação da capacidade de remoção da OTC pela LECA em solução aquosa	19
2.6 Avaliação da capacidade de remoção da OTC em microcosmos de LCM plantados com <i>Phragmites australis</i>	22
2.7 Análise estatística dos resultados	23
III. Resultados e Discussão	24
3.1 Optimização das metodologias analíticas	24
3.2 Estudo de estabilidade e conservação das amostras líquidas	34
3.3 Avaliação da capacidade de retenção da OTC pela LECA	36
3.4 Avaliação da capacidade de remoção da OTC em LCMs plantados com <i>Phragmites australis</i>	39
VI. Conclusões	43
Agradecimentos	45
Referencias Bibliográficas	45
Material Suplementar	
Anexo A	
A. Métodos Analíticos	57
Anexo B	
B. Fármacos no Ambiente	73
Anexo C	
C. Oxitetraciclina (OTC)	84
Anexo D	
D. Leitões Construídos de Macrofitas (LCM)	92

I. INTRODUÇÃO

Poluentes emergentes são quaisquer químicos sintéticos ou naturais ou quaisquer microrganismos, os quais não são, normalmente, monitorizados no ambiente mas que possuem potencial para atingir o ambiente e causar efeitos, conhecidos ou presumidos, que vão afectar adversamente os ecossistemas ou a saúde humana (USGS, 2010). A síntese de novas substâncias químicas ou mudanças no uso e descarte de produtos químicos existentes podem criar novas fontes de poluentes emergentes (USGS, 2010). Em alguns casos, certos poluentes emergentes só começam a ser identificados após o desenvolvimento de novas técnicas analíticas de detecção.

De entre as várias classes de poluentes emergentes, os produtos farmacêuticos são os que suscitam maior preocupação e têm sido tema de crescente interesse entre a comunidade científica internacional. A sensibilização para este problema ficou a dever-se em parte aos avanços nas técnicas analíticas desenvolvidas e disponibilizadas nos últimos anos, as quais reduziram significativamente os limites de detecção e quantificação de substâncias orgânicas em matrizes ambientais (ver Anexo A), permitindo assim a detecção e quantificação de uma vasta gama de compostos farmacêuticos activos presentes em baixas concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$ - ng L^{-1}) em amostras de águas naturais (superficiais e subterrâneas), de águas residuais urbanas e pecuárias e também em outras matrizes ambientais como solos e sedimentos (Halling-Sørensen, *et al.*, 1998; Daughton e Ternes, 1999; Kümmerer, 2001; Jones, *et al.*, 2001; Heberer, 2002a; Fent, *et al.*, 2006; Petrovic e Barceló, 2007; Nikolaou, *et al.*, 2007; Khetan e Collins, 2007; Aga, 2008; Kümmerer, 2008; Kümmerer, 2009b; Miège, *et al.*, 2009).

Os fármacos, após a sua administração em humanos ou animais, podem ser libertados no meio ambiente por várias vias. Estas substâncias, uma vez ingeridas, são apenas parcialmente absorvidas pelo organismo o que, em conjugação com as suas crescentes taxas de consumo global, resulta na introdução contínua de uma ampla variedade de fármacos e seus metabolitos no ambiente. As principais fontes destas substâncias no ambiente provêm de efluentes domésticos e hospitalares, explorações pecuárias, produção industrial e disposição em aterros (Heberer, 2002; Fent, 2006; Nikolaou, *et al.*, 2007; Petrovic e Barceló, 2007; Aga, 2008). No caso dos produtos farmacêuticos de uso veterinário, utilizados por administração directa a animais ou adicionados à sua alimentação, podem também ser libertados para o ambiente através

dos dejectos por depósito directo, ruptura ou vazamento de estruturas de armazenamento, para além da descarga feita por instalações de tratamento de efluentes (Matsui, *et al.*, 2008).

Vários estudos têm demonstrado que as estações de tratamento de águas residuais (ETARs) são importantes fontes para a presença de fármacos no ambiente (Fent, *et al.*, 2006; Nikolaou, *et al.*, 2007; Aga, 2008; Cooper, *et al.*, 2008; Gros, *et al.*, 2008). Tem sido verificado que os fármacos são apenas parcialmente removidos pelos processos convencionais de tratamento de águas residuais utilizados nas ETARs (Fent, *et al.*, 2006; Gros, *et al.*, 2006; Maurer, *et al.*, 2007; Cooper, *et al.*, 2008). De facto, os processos convencionais, usados tipicamente em ETARs, foram otimizados para a remoção dos poluentes que se encontram em maiores concentrações (sólidos suspensos, matéria orgânica facilmente biodegradável, microrganismos e nutrientes) e revelam-se, portanto, pouco eficazes para a remoção dos poluentes emergentes.

Muitos dos compostos que foram encontrados em águas naturais e águas residuais tratadas são, na sua maioria, da classe dos anti-inflamatórios, reguladores lipídicos, beta-bloqueadores ou drogas neuroactivas, encontrando-se ainda diversos antibióticos entre os compostos que não são eficazmente eliminados no tratamento das águas residuais (Anexo B) (Nikolaou, *et al.*, 2007; Aga, 2008; Miège, *et al.*, 2009). A presença dos antibióticos em águas superficiais deve-se também à dispersão de estrume em áreas de cultivo como correctivo agrícola (Valverde, *et al.*, 2007).

Após os resíduos atingirem o meio ambiente, podem ser adsorvidos, lixiviados, degradados, bioacumulados, ou os seus metabolitos podem até voltar a originar o composto inicial. É o caso da sulfametacina e do cloranfenicol, cujos principais metabolitos no estrume são decompostos pelas bactérias excretadas reactivando a droga mãe (Díaz-Cruz, *et al.*, 2007).

A frequente detecção de antibióticos em estudos de monitorização ambiental é um problema que se tem relevado particularmente preocupante no âmbito da contaminação ambiental com fármacos (Kümmerer, 2009a; Hernando, *et al.*, 2006b; Zuccato, *et al.*, 2005; Zorita, *et al.*, 2009; Arikan, *et al.*, 2008; Zhang e Zhou, 2007; Stamatelatou, *et al.*, 2003; Vieno, *et al.*, 2007b; Vanderford, *et al.*, 2003; Ternes, 1998; Schwab, *et al.*, 2005; Kümmerer, 2001; Santos, *et al.*, 2007; Khetan e Collins, 2007; Jones, *et al.*, 2005; Kishida, 2007). O desenvolvimento de estirpes bacterianas resistentes a antibióticos, resultantes da exposição continuada a estes fármacos, é considerado um problema particularmente grave com consequências que se estendem a um longo prazo (Halling-

Sørensen, *et al.*, 1998; Kim e Aga, 2007; Cooper, *et al.*, 2008; Kümmerer, 2009a). Em medicina veterinária, nos animais de explorações agrícolas, muitas vezes os antibióticos são aplicados para fins terapêuticos ou fins profiláticos, ou como promotores de crescimento (Matsui, *et al.*, 2008) gerando uma grande quantidade de resíduos destas substâncias que acabam por estar presentes nos efluentes destas explorações e que são potenciais contaminantes ambientais. Mesmo o consumo elevado deste tipo de fármacos em medicina humana tem sido responsável por uma substancial contaminação de efluentes domésticos, o que constitui também uma parcela importante da quantidade de antibióticos que se têm detectado em águas, solos e sedimentos de várias regiões do mundo (Halling-Sørensen, *et al.*, 1998; Kim e Aga, 2007; Cooper, *et al.*, 2008; Kümmerer, 2009a; Hernando, *et al.*, 2006; Kemper, 2008; Matsui, *et al.*, 2008; Cunningham, 2008).

Dentro da classe de antibióticos, as tetraciclinas representam uma das mais importantes famílias farmacológicas e, tendo em conta o seu largo espectro de acção antibacteriano, são usadas na medicina humana, como tratamento de primeira escolha, em diversas infecções bacterianas. São ainda frequentemente utilizadas em medicina veterinária, em nutrição animal e em aditivos alimentares destinados a uso pecuário (Sachan e Gupta 1980). Também têm sido encontrados na preservação de frutas e legumes, exterminando insectos e pragas (Valverde, *et al.*, 2007). Quimicamente, as tetraciclinas constituem um grupo de substâncias cristalinas de natureza anfotérica, que contêm um esqueleto comum, hidronaftacénico (Sachan e Gupta 1980).

A oxitetraciclina (OTC) é um antibiótico da família das tetraciclinas (Mamani, *et al.*, 2006). A OTC é um antibiótico de largo espectro, bastante activo, que é produzido por um processo de fermentação envolvendo a actinomiceta – *Streptomyces rimosus*. Pode ser encontrada sob a forma de composto base anfotérico (sal cloridrato) ou como um complexo quaternário de sal de amónio (ver mais detalhes em Anexo C). Trata-se de um dos antibióticos veterinários mais utilizados (Matsui, *et al.*, 2008). É comumente aplicado para tratar doenças em várias espécies de animais: vacas, aves, suínos, cães e gatos. No gado bovino é usado para tratar enterite, pneumonia, endometrite, septicemia, mastite e outras infecções bacterianas secundárias (Kaale, *et al.*, 2008). É também muito utilizada no tratamento infeccioso bacteriano em aquiculturas. Contudo, devido a elevados níveis de resíduos de antibióticos nos alimentos de origem animal, estes podem provocar reacções alérgicas em indivíduos com hipersensibilidade, comprometer o sistema imunitário humano e podem ainda levar a um problema de resistência

medicamentosa aos organismos patogénicos no corpo humano, sendo a monitorização da administração dos antibióticos de grande importância (Wang, *et al.*, 2008).

Existem vários estudos realizados por diversos autores que relatam a presença deste fármaco no ambiente, nomeadamente no meio aquático (Anexo B), tendo sido também constatado que a OTC é relativamente persistente em sedimentos anóxicos (Halling-Sørensen, *et al.*, 1998). A OTC é considerada, entre outros fármacos, perigosa para o meio aquático e consideravelmente tóxica para os organismos aquáticos (Carlsson, *et al.*, 2006).

Tendo em consideração a baixa eficiência que em geral as ETARs apresentam na remoção de fármacos das águas residuais e o potencial que estes apresentam para afectar negativamente o ambiente e até a saúde humana, existe uma crescente necessidade de processos alternativos para tratamento de águas residuais, de forma a remover os fármacos das águas, com maior eficiência e custos razoáveis de operação/manutenção.

Uma alternativa de baixo custo e fácil manutenção que tem vindo a ser crescentemente usada como um sistema de tratamento de efluentes líquidos alternativo ou complementar aos sistemas convencionais são os leitos construídos de macrófitas (LCMs) (USEPA e USDA-NRCS, 1995; Cooper, *et al.*, 1996; Vymazal, *et al.*, 1998; Sundaravadivel e Vigneswaran, 2001; Stottmeister, *et al.*, 2003; Haberl, *et al.*, 2003; Scholz e Lee, 2005; Kadlec e Wallace, 2009; Vymazal, 2009). Estes sistemas emulam os processos que são responsáveis pelas conhecidas capacidades depurativas das zonas húmidas naturais, mas são projectados e optimizados pelo homem para melhor explorar os ciclos biogeoquímicos que ocorrem normalmente nestes sistemas com a finalidade de tratar águas residuais. Os LCMs têm já sido amplamente estudados e utilizados para a remoção de compostos orgânicos xenobióticos de diversos tipos (pesticidas, PAHs, explosivos, corantes, solventes clorados, etc.) com elevadas eficiências (Williams, 2002; Haberl, *et al.*, 2003; Braskerud e Haarstad, 2003; Low, *et al.*, 2008; Davies, *et al.*, 2008; Imfeld, *et al.*, 2009; Vymazal, 2009; Moore, *et al.*, 2009; Tang, *et al.*, 2009). A sua aplicação para remoção de fármacos, embora menos estudada, tem já revelado alguns resultados também bastante promissores (Gross, *et al.*, 2004; Matamoros e Bayona, 2006; Matamoros, *et al.*, 2007a; Matamoros, *et al.*, 2007b; Conkle, *et al.*, 2008; Matamoros, *et al.*, 2008a; Matamoros, *et al.*, 2008b; Dordio, *et al.*, 2009a; Matamoros, *et al.*, 2009; Park, *et al.*, 2009; Dordio, *et al.*, 2010).

A depuração de águas residuais em LCMs é alcançada através da acção combinada de plantas, microrganismos e dos componentes da matriz de suporte sólida (Dordio, *et al.*, 2010) envolvendo uma grande variedade de processos físicos, químicos e biológicos (Anexo D). A maior parte dos estudos existentes tratam os LCMs como uma “caixa negra” sendo apenas avaliada a eficiência global de remoção, tendo sido ainda pouco estudada a contribuição de cada uma das componentes para os processos de remoção dos poluentes que ocorrem nestes sistemas. No entanto a eficiência dos LCMs na remoção de poluentes pode ser significativamente melhorada através de uma selecção dos componentes de forma a maximizar o papel desempenhado por cada um deles na remoção dos poluentes (ver Anexo D). Assim, uma selecção cuidadosa dos materiais a serem utilizados como matriz de suporte poderá permitir alcançar uma maior capacidade de retenção de contaminantes por fenómenos de adsorção ou troca iónica (Dordio, *et al.*, 2007; Dordio, *et al.*, 2009b). Estudos já efectuados com alguns materiais argilosos permitiram demonstrar que agregados de argila expandida (Light Expanded Clay Aggregates, LECA) apresentam uma elevada capacidade de adsorção de alguns fármacos de águas e efluentes (Dordio, *et al.*, 2007; Dordio, *et al.*, 2009b) demonstrando ser uma escolha adequada para ser utilizada como um meio filtrante ou matriz de suporte em LCMs.

A vegetação desempenha também um importante papel na retenção ou transformação/degradação dos poluentes num LCM (Anexo D). Entre outros efeitos podem-se apontar a sorção dos compostos nas raízes, a oxigenação da rizosfera que permite que processos microbianos aeróbicos mais eficientes na biodegradação de orgânicos decorram nessa região ou, ainda, a libertação de exsudados que estimulam o desenvolvimento de populações microbianas e, além disso, podem facilitar ou catalisar enzimaticamente a degradação dos compostos. Para além deste efeitos, há evidências de que algumas espécies podem intervir de forma mais directa absorvendo alguns poluentes orgânicos, translocando-os para a sua parte aérea e posteriormente acumulando-os ou metabolizando-os. Assim, a selecção da espécie vegetal e o estudo da sua intervenção no LCM é fundamental para a eficiência de todo o sistema. Estudos já efectuados demonstraram que a *Phragmites australis* (Anexo D), uma das espécies mais utilizadas em LCMs, apresenta uma elevada capacidade de remover vários compostos orgânicos xenobióticos, incluindo alguns fármacos, de águas contaminadas (Dordio, *et al.*, 2009a; Matamoros, *et al.*, 2005; Matamoros e Bayona 2006; Matamoros, *et al.*, 2007a; Matamoros, *et al.*, 2007b; Matamoros, *et al.*, 2008a; Matamoros, *et al.*, 2008b).

Quando cuidadosamente projectados e mantidos, os LCMs podem produzir, a custos relativamente baixos, um efluente reutilizável e simultaneamente proporcionar algumas oportunidades de reciclagem de nutrientes e para acolher animais selvagens (Rousseau, *et al.*, 2008).

O principal objectivo deste trabalho foi o de avaliar a eficiência de um microcosmos de LCM na remoção de OTC de efluentes contaminados com este antibiótico, utilizando LECA como matriz de suporte e plantados com *Phragmites australis*. Previamente estudou-se a capacidade de adsorção da LECA para este antibiótico em água e em efluente e procurou-se determinar o destino final da OTC na planta, avaliando a sua capacidade para absorver o composto, para o translocar para a parte aérea e possivelmente o acumular ou transformar. Um passo preliminar importante foi a optimização das metodologias analíticas para a quantificação da OTC em solução aquosa e em tecidos vegetais.

II. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

2.1 Equipamentos

Em amostras líquidas (água e efluente) os compostos foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) num equipamento Elite LaChrom, composto por uma bomba Hitachi L-2130, um detector UV/Vis Hitachi L-2400 e um amostrador automático Hitachi L-2200 ligado a um loop de amostra de 20 µL.

Em amostras sólidas (folhas de plantas) os compostos foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada com espectrometria de massa (MS), num equipamento composto por com espectrómetro de massa LCQ Advantage Thermofinnigan, com uma fonte de ionização por electrospray e utilizando um analisador de massa “*ion trap*”. Ao espectrómetro de massa encontra-se acoplado um sistema de HPLC com amostrador automático (Surveyor ThermoFinnigan) ligado a um loop de amostra de 20 µL.

Sempre que foi necessário secar amostras em vácuo foi utilizado um evaporador rotativo Büchi R-200, um banho termostaticado Büchi Heating Bath B-490 e uma bomba de vácuo Büchi vac V 500. Os valores de pH foram medidos num potenciómetro inoLab pH Level 1 da WTW.

2.2 Reagentes e Materiais

As características, grau de pureza e os fabricantes dos principais reagentes e materiais utilizados neste trabalho são apresentados nas Tabelas 2.1 e 2.2, respectivamente.

Tabela 2.1 – Características e fabricantes dos principais reagentes utilizados.

<i>Reagente</i>	<i>Fórmula química</i>	<i>Riscos e Segurança</i>	<i>Massa molar (g/mol)</i>	<i>Grau de Pureza (%)</i>	<i>Fabricante</i>
<i>Acetonitrilo</i>	C_2H_3N	R: 11-20/21/22-36	41.05	HPLC gradiente	VWR (Lisboa, Portugal)
<i>Ácido Oxálico</i>	HO_2CCO_2H	R: 21/22; S: 24/25	94.00	98	Aldrich
<i>OTC</i>	$C_{22}H_{24}N_2O_9$	R: 36-63; S: 26 36/37/39	460.43	98	Agrös organics (New Jersey, USA)
<i>Metanol</i>	CH_3OH	R: 11-23/24/25-39/23/24/25 S: 07-16-36/37-45	32.04	HPLC gradiente p.a	VWR (Lisboa, Portugal) Merck (Darmstadt, Germany)

Tabela 2.2 – Características e fabricantes dos materiais utilizados.

Material	Características	Fabricante
Filtro de membrana	de nylon com 0,45µm e diâmetro do filtro de 25mm	Wattman (Maidstone, Inglaterra)
Colunas SPE	Sep-Pak® Vac (500mg, 3mL)	Waters Corporation (Milford , MA, USA)
	OASIS® HLB (200mg, 6mL)	Waters Corporation (Milford , MA, USA)
	OASIS® MCX (200mg, 6mL)	Waters Corporation (Milford , MA, USA)
	LiChrolut® C18 (RP18) (500mg, 3mL)	VWR (Lisboa, Portugal)
	IST (Isolute FL) (500mg, 3mL)	VWR (Lisboa, Portugal)
LECA (Light Expanded Clay Aggregates)	Granulometria 2/4	Maxit
Areia	-	Recolhida na ilha de Faro, Portugal
Sílica (SiO ₂)	0.063-0.200 mm	Supelco Park; Supelclean LC-18

A água utilizada na preparação das soluções padrão e nas soluções usadas nas análises por HPLC, foi previamente destilada, bidestilada e depois desionizada através de um sistema Milli-Q (Simplicity® UV, Millipore Corp., France).

2.3 Métodos Analíticos

2.3.1 Preparação das soluções padrão de OTC

Prepararam-se soluções padrão *stock* de OTC em água com uma concentração de 100 mg L^{-1} . Para tal, pesou-se rigorosamente cerca de 0,1 g de OTC, dissolveu-se em 10 mL de metanol, transferiu-se para um balão volumétrico de 1000 mL e perfez-se com água Mili-Q.

Preparou-se uma solução padrão *stock* de OTC em metanol com uma concentração de 250 mg L^{-1} . Para tal, pesou-se rigorosamente cerca de 0,0025 g de OTC, dissolveu-se em metanol, transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL e perfez-se com metanol.

Estas soluções foram armazenadas no frigorífico a 4°C e no escuro para minimizar a ocorrência de degradação e/ou fotodegradação (Zhang, *et al.*, 2007; Reig, *et al.*, 2006).

2.3.2 Optimização das condições de quantificação da OTC por HPLC-UV em solução aquosa

Para se proceder ao doseamento da OTC em solução aquosa (água e efluente) por HPLC-UV utilizou-se uma coluna analítica de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies, Alemanha, com dimensões de $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$ e com tamanho das partículas de $5.0 \mu\text{m}$) e, como fase móvel, um sistema ternário de solventes: A- ACN, B- Metanol e C- Solução aquosa de ácido oxálico 10 mmol L^{-1} . O perfil cromatográfico foi gravado ao comprimento de onda 356 nm (Zhang, *et al.*, 2007) correspondendo ao máximo de absorvância do composto na gama UV/Vis. O volume de amostra injectado foi de $20 \mu\text{L}$ e a eluição ocorreu isocraticamente sendo a fase móvel constituída por 15% de acetonitrilo (eluyente A), 25% de metanol (eluyente B) e 60% da solução aquosa de ácido oxálico 10 mmol L^{-1} (eluyente C) (Smyrniotakis, *et al.*, 2007). Todas as análises foram feitas à temperatura ambiente. Realizaram-se três réplicas das

injecções de cada amostra, que foram previamente filtradas através de um filtro de 0.45 µm de membrana de nylon (VWR International, West Chester, USA;PA).

A quantificação da OTC foi feita pelo método da recta de calibração. Para construir as rectas de calibração da OTC preparou-se uma série de soluções padrão com concentrações 0.2, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 30 e 40 mg L⁻¹ por diluição da solução padrão de 100 mg L⁻¹ do fármaco, usando água *Milli-Q*. Fizeram-se 3 réplicas para cada solução padrão, as quais foram injectadas 5 vezes.

2.3.3 Optimização das condições de quantificação da OTC por HPLC-MS/MS nos tecidos vegetais

Para a quantificação da OTC em amostras sólidas (tecidos das folhas) por HPLC-MS/MS usaram-se as seguintes condições (Miao, *et al.*, 2004): temperatura do capilar – 320 °C, potencial do cone – 5.0 kV e corrente da fonte – 100.0 µA; potencial do capilar – 8.0 V em modo de ião positivo. A análise por MS foi efectuada em modo SRM (selected reaction monitoring) utilizando a transição mais intensa descrita para a OTC ($m/z = 461 \rightarrow 426$). Para a separação cromatográfica utilizou-se uma coluna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies, Alemanha, com dimensões de 150 mm × 2.1 mm e com tamanho das partículas de 3.5 µm) e aplicou-se um programa isocrático, sendo o acetonitrilo o eluente A, o metanol o eluente B a solução aquosa de ácido oxálico 10 mmol L⁻¹ o eluente C. A fase móvel foi constituída por 15% de A, 25% de B e 60% de C, com um fluxo de 0.2 mL min⁻¹.

Para a quantificação da OTC foram feitas duas rectas de calibração: uma em água com 10% de metanol e outra em extracto vegetal. O extracto vegetal foi preparado segundo o procedimento descrito em 2.3.7, utilizando-se apenas a areia como suporte sólido e o metanol como eluente. O extracto só foi dopado com OTC aquando do processo de redissolução, para se saber exactamente a concentração precisa do fármaco.

Em ambas as rectas, os padrões utilizados foram os seguintes: 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 mg L⁻¹ de OTC. Estes foram preparados em balões de 5mL a partir de volumes adequados da solução de trabalho (20 mg OTC L⁻¹ em metanol) (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 – Volumes utilizados na elaboração dos padrões a usar na construção das rectas de calibração.

	Concentração final do padrão (mg L ⁻¹)	Volume total (mL)	Volume da solução (mL)	Volume de H ₂ O (mL)	Volume de MeOH (mL)	Volume de extracto (mL)
Padrões para recta de calibração em H₂O	0.5	5.0	0.500	4.950	-	-
	1.0	5.0	0.100	4.900	-	-
	2.0	5.0	0.200	4.800	-	-
	3.0	5.0	0.300	4.700	-	-
	4.0	5.0	0.400	4.600	-	-
	5.0	5.0	0.500	4.500	-	-
	6.0	5.0	0.600	4.400	-	-
Padrões para recta de calibração em extracto de folha	0.5	5.0	0.125	1.320	0.055	3.5
	1.0	5.0	0.250	1.200	0.050	3.5
	2.0	5.0	0.500	0.960	0.040	3.5
	3.0	5.0	0.750	0.720	0.03	3.5
	4.0	5.0	1.000	0.480	0.02	3.5
	5.0	5.0	1.250	0.240	0.01	3.5
	6.0	5.0	1.500	0.000	0.00	3.5

2.3.4 Validação do método analítico

Os valores dos limites de detecção e quantificação instrumentais (LQI – Limite de Quantificação Instrumental e LDI – Limite de Detecção Instrumental) para as técnicas de HPLC-UV e HPLC-MS/MS foram obtidos a partir da determinação da concentração correspondente ao sinal do branco mais 3 ou 10 desvios padrão, respectivamente (Miller e Miller, 2000).

O limite de quantificação do método global (LOQ – limit of quantification) que inclui todos os procedimentos analíticos utilizados durante a preparação (SPE ou MSPD) e quantificação da amostra foi calculado através da seguinte equação (Vieno, *et al.*, 2006):

$$\text{LOQ} = (\text{LQI} \times 100) / (\text{Rec} (\%) \times C)$$

onde Rec (%) é a recuperação absoluta média na extracção da OTC nas amostras e C é o factor de concentração em SPE (C=1 em MSPD).

A repetibilidade e reprodutibilidade de cada equipamento, bem como todo o método analítico foram analisados. Assim, para a avaliação da repetibilidade efectuaram-se injecções consecutivas da mesma solução padrão mantendo as mesmas condições de operação. Para a avaliação da reprodutibilidade efectuaram-se injecções da mesma solução padrão em diferentes dias, usando diferentes lotes de solventes como fase

móvel. Foram calculados os desvios padrão relativos (%RSD) das áreas dos picos correspondentes a essas injeções (Vieno, *et al.*, 2006).

2.3.5 Optimização do método de SPE

Com o objectivo de otimizar a recuperação da OTC de uma solução aquosa dopada com o fármaco, testaram-se diferentes cartuchos de SPE: uma coluna mista de adsorventes poliméricos e de troca iónica (Oasis® MCX), uma coluna com características polares (Isolute® FL) e, entre as colunas de fase reversa, uma polimérica (Oasis® HLB) e duas C18 (Waters Sep-Pak® Vac e Merck Lichrolut® RP18).

Os cartuchos foram condicionados com 10 mL de metanol, seguido de 10 mL de água *Milli-Q*. Sem deixar secar as colunas foram adicionados 10 mL de amostra de trabalho acidificada (pH=2 ou pH=4), de seguida para algumas amostras testou-se também um passo de lavagem com 10 mL de água *Milli-Q* acidificada (pH=2). Depois os cartuchos foram secos em vácuo durante 15 minutos. A eluição dos fármacos foi efectuada com 5 mL de metanol (acidificado a pH=2 ou não acidificado). O metanol foi evaporado no rotavapor, a uma temperatura de cerca de 30°C, sendo em seguida redissolvido em 1 mL de uma mistura de ACN:H₂O (1:1) (v/v) (Babić, *et al.*, 2006). Foram feitas três réplicas para os vários cartuchos testados e para todas as condições experimentais usadas.

O procedimento de pré-concentração otimizado foi posteriormente testado com o efluente dopado e validado para diferentes volumes de amostra e concentração de analito.

2.3.6 Optimização do método de extracção do composto nos tecidos vegetais (*Phragmites australis*)

O método utilizado para a extracção da OTC de tecidos vegetais foi a dispersão de matriz em fase sólida (*Matrix Solid Phase Dispersion* - MSPD). Testaram-se dois tipos de materiais de suporte sólido, nomeadamente a sílica substituída com C₁₈ e areia do mar. Ambos foram inicialmente lavados: a sílica C₁₈ foi lavada três vezes com metanol e a areia foi várias vezes lavada com água desionizada e três vezes com metanol. A recuperação do método de extracção foi avaliada através da quantificação da percentagem de recuperação de 400 µL de solução de OTC de concentração de 50 mg

L⁻¹ em metanol (equivalente a 0.02 mg de OTC), a qual foi adicionada a 0.5 g de matéria vegetal (folha) do controlo. Colocaram-se no almofariz 0.5 g de matéria vegetal, 2 g sílica C₁₈ e, finalmente, 2 mL de n-hexano. Foi seguido o mesmo procedimento alterando o componente abrasivo para areia. Os preparados foram macerados após a adição de azoto líquido, por forma a ficarem mais homogéneos e adequados para o empacotamento nas seringas. Após 10 minutos de contacto com o fármaco, os preparados foram colocados em seringas de 5 mL de acordo com o procedimento descrito em Teixeira e Costa (2005).

A OTC foi extraída sob vácuo com 10 mL de 3 eluentes: metanol, acetonitrilo e mistura de metanol:H₂O destilada (7:3; v/v). Em seguida os extractos foram secos no rotavapor, para evaporação do solvente, a cerca de 30°C. O resíduo obtido foi redissolvido em 5 mL de uma mistura de água com ácido oxálico:metanol (10:1; v/v) e filtrado através de um filtro de 0.45 µm de membrana de nylon. Este ensaio foi repetido 3 vezes e foram realizadas três réplicas de cada extracto.

2.4 Estudos de conservação das amostras de OTC

Foram realizados testes de estabilidade e conservação do fármaco já que a estabilidade química dos fármacos é de grande importância de modo a que se possa fazer uma conservação adequada das amostras até à sua quantificação. Assim, utilizaram-se soluções com concentrações de 1 mg L⁻¹, para a análise da cinética de degradação do fármaco quando colocado sob diferentes condições de conservação. Prepararam-se 9 balões de 25 mL com solução aquosa de OTC com uma concentração de 1 mg L⁻¹ os quais foram colocados nas seguintes condições:

- à temperatura ambiente e exposto a luminosidade;
- à temperatura ambiente e no escuro;
- no frigorífico a uma temperatura de 4 °C e no escuro.

Foram feitas 3 réplicas para uma das condições estudadas. Foram efectuadas recolhas às 0, 24, 96, 168 e 240 horas, tendo sido feita a sua análise por HLPC-UV.

2.5 Avaliação da capacidade de remoção da OTC pela LECA em solução aquosa

Com o objectivo de se determinar a capacidade de retenção do fármaco presente em solução aquosa pelo material da matriz de suporte, realizaram-se ensaios em que se colocaram em contacto amostras do meio filtrante (LECA) com uma granulometria de 2/4, com soluções aquosas de diferentes concentrações de OTC preparadas em água e efluente. Os ensaios foram realizados em descontínuo e à escala laboratorial.

Como a LECA comercializada apresenta quantidades consideráveis de partículas finas, antes dos ensaios experimentais procedeu-se à sua lavagem com água destilada até não serem visíveis partículas em suspensão na água de lavagem. Posteriormente, foi seca na estufa até peso constante e só então foi utilizada nos ensaios. A lavagem da LECA é vantajosa, já que há uma diminuição das partículas finas em suspensão, o que facilita bastante o passo de recolha das amostras, particularmente no passo de filtração através de um filtro de 0.45 μm .

A razão entre o volume de solução (200 mL) e a massa do material (200 g) foi estabelecida de modo a que correspondesse a uma taxa de inundação de 100%, pois esta seria a situação verificada num contexto de aplicação prática, numa estação de tratamento, situação que permitiria um melhor contacto entre as soluções e o meio filtrante, e seria de esperar consequentemente uma melhor remoção dos compostos.

As quantidades removidas do composto estudado, foram determinadas pela diferença entre as concentrações iniciais e as respectivas concentrações em solução para cada um dos tempos de contacto considerados.

Salienta-se ainda que todos os ensaios foram realizados no escuro e sem agitação, de modo a evitar a fotodegradação do composto (uma vez que este se decompõe quimicamente por acção da luz) e de modo a conseguir uma boa simulação do comportamento hidráulico de um leito construído de macrófitas de fluxo sub-superficial, onde são normalmente usadas baixas velocidades de escoamento do efluente. Os ensaios foram feitos em triplicado para cada concentração e a uma temperatura ambiente de aproximadamente 20°C.

Foram estudadas as influências de certas condições experimentais na remoção da OTC da água, nomeadamente o tempo de contacto com a LECA, as concentrações iniciais da OTC (as quais variaram entre 1.5 mg L^{-1} e 36 mg L^{-1}) e a complexidade do meio líquido (i.e. interferências provenientes de compostos presentes no efluente). Para

este efeito, foi realizada uma montagem experimental na qual se utilizaram 12 recipientes contendo o material de suporte e uma solução aquosa de OTC em água. As concentrações testadas foram as seguintes: 1.5 mg L^{-1} , 7 mg L^{-1} , 13 mg L^{-1} e 36 mg L^{-1} , preparadas a partir de uma solução padrão de 100 mg L^{-1} .

A Figura 2.1 esquematiza a montagem simultânea dos ensaios de LECA 2/4 com a solução de OTC para as várias concentrações. Os ensaios foram realizados em simultâneo e nas mesmas condições experimentais.

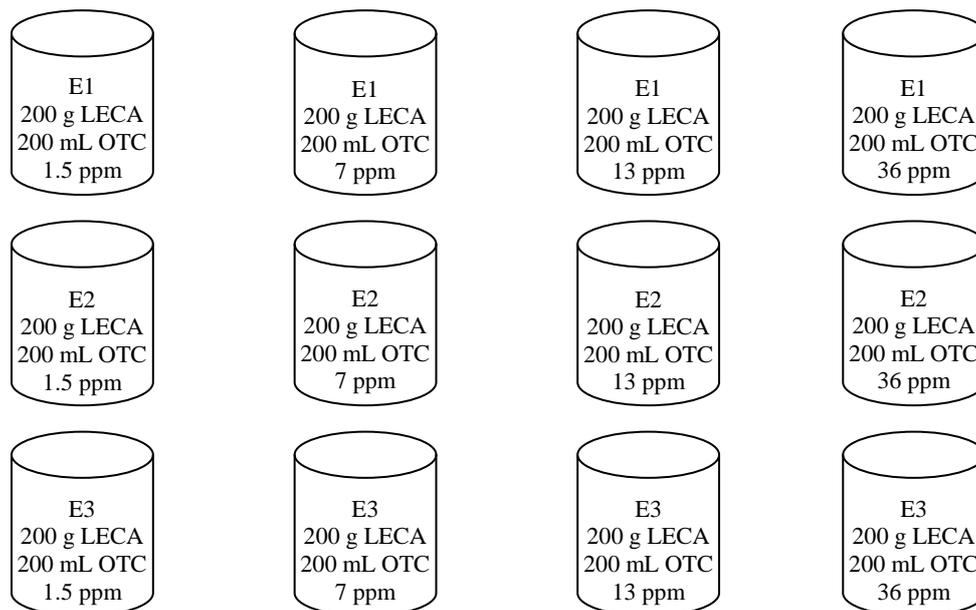


Figura 2.1 – Esquema dos ensaios para avaliação da capacidade de remoção da OTC (em água *Mili-Q/efluente*) pela LECA.

Para avaliar a influência da complexidade do meio líquido (interferências provenientes da composição do efluente) sobre a eficiência do sistema, foram ainda realizados ensaios em condições idênticas às descritas acima, mas usando efluente doméstico dopado com OTC. As concentrações testadas foram, à semelhança dos ensaios descritos acima, de 1.5 , 7 , 13 e 36 mg L^{-1} .

A determinação da quantidade de OTC removida foi feita recorrendo ao doseamento da concentração destes compostos na solução em contacto com o meio filtrante. Recorreu-se, para tal, à recolha e filtração de amostras de 1 mL referentes a cada uma das soluções, e posterior injeção no HPLC-UV, com registos dos valores das áreas dos picos obtidas e respectivas concentrações removidas do fármaco a cada 24 horas. A duração total dos ensaios foi de 168 horas, pois verificou-se que passado esse tempo não

se registava qualquer aumento da remoção dos compostos estudados. Deste modo, as leituras por HPLC-UV foram efectuadas às 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas.

Sempre que necessário fez-se pré-concentração da amostra utilizando-se o método de SPE otimizado.

2.6 Avaliação da capacidade de remoção de OTC em microcosmos de LCM plantados com *Phragmites australis*

Para avaliar a eficiência de um LCM para remoção de OTC de efluente domésticos foram utilizados 6 microcosmos de leitos construídos de macrófitas de fluxo sub-superficial em recipientes de PVC (0.6 m de largura x 0.5 m de comprimento e 0.4 m de fundo) utilizando como matriz de suporte a LECA 2/4 lavada com uma profundidade de 0.3 m. O nível de água foi mantido ligeiramente abaixo da superfície da LECA, correspondendo a uma taxa de inundação de aproximadamente 100%. Foram utilizados 3 leitos plantados com *Phragmites australis* (densidade das plantas = 20 plantas/m²) e utilizaram-se outros três não plantados.

Utilizaram-se também três recipientes adicionais, que foram cheios com a solução de efluente dopado com a OTC e sem conter quaisquer tipos de plantas ou materiais de suporte. Os ensaios com estes dois recipientes tiveram como objectivo principal avaliar a biodegradação da OTC em efluente.

Todos os sistemas descritos anteriormente foram cheios com efluente dopado com OTC. Esta solução utilizada nos ensaios foi preparada a partir de um efluente recolhido após a etapa de tratamento secundário numa ETAR que serve um pequeno aglomerado populacional rural. O efluente recolhido na ETAR foi dopado com OTC através da diluição de uma solução aquosa de OTC (100 mg L⁻¹) obtendo-se uma concentração final de 1.5 mg L⁻¹.

As experiências foram conduzidas em modo descontínuo, mantendo-se o volume inicial de solução e sem o escoamento/passagem de qualquer outro tipo de solução durante a realização do ensaio.

Durante o ensaio foram recolhidas amostras da solução de OTC ao fim dos períodos de 6 e 24 horas durante o primeiro dia e, posteriormente, com um dia de periodicidade durante um total de 168 horas de tempo de retenção. Durante os passos de amostragem a recolha do líquido foi feita, com recurso a uma pipeta graduada, até aproximadamente metade da profundidade de todos os recipientes e em pontos aleatórios da zona

superficial do líquido. Após a recolha, as amostras foram guardadas no frio e no escuro até ao momento da sua análise, a qual foi sempre feita após duas horas da sua recolha.

A evapotranspiração nos leitos foi controlada diariamente e os volumes de água perdidos nos leitos através da evapotranspiração foram repostos com água destilada antes da recolha das amostras.

As amostras foram pré-concentradas, sempre que necessário, utilizando as condições de SPE previamente optimizadas para o fármaco.

Com o objectivo de tentar esclarecer qual o destino final do fármaco no microcosmos de leitos construídos de macrófitas, recolheram-se aleatoriamente nos três leitos amostras de folhas de plantas para os tempos de retenção de 0, 48, 96, 168 e 408 h. As amostras de tecido vegetal foram congeladas em azoto líquido imediatamente após a recolha e armazenadas a -80°C para posterior análise. A quantificação da OTC nas folhas da *Phragmites australis* foi feita recorrendo à metodologia analítica optimizada referida no ponto 2.3.6.

2.6.1 Caracterização do efluente

O efluente utilizado nos ensaios foi caracterizado através da determinação dos seguintes parâmetros de qualidade de águas residuais, seguindo os procedimentos descritos em APHA-AWWA-WPCF (Clescerl, *et al.*, 1998): sólidos suspensos totais (SST), pH, carência química de oxigénio solúvel e total (CQO_s e CQO_t).

2.7 Análise estatística dos resultados

Todos os resultados apresentados, foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). No tratamento estatístico dos dados experimentais obtidos recorreu-se ao auxílio do programa Microsoft® EXCEL. Com o objectivo de avaliar a existência de diferenças significativas entre os valores experimentais obtidos recorreu-se à análise de variância (ANOVA). Neste trabalho, a ANOVA foi sempre efectuada com um nível de significância <0.05 , correspondente a um grau de confiança de 95%.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Otimização das metodologias analíticas

3.1.1. Quantificação da OTC em solução aquosa

Para quantificar OTC em soluções aquosas (água e efluente doméstico) foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por UV-Vis a um comprimento de onda de 356 nm que corresponde ao máximo de absorvância do composto (Figura 3.1).

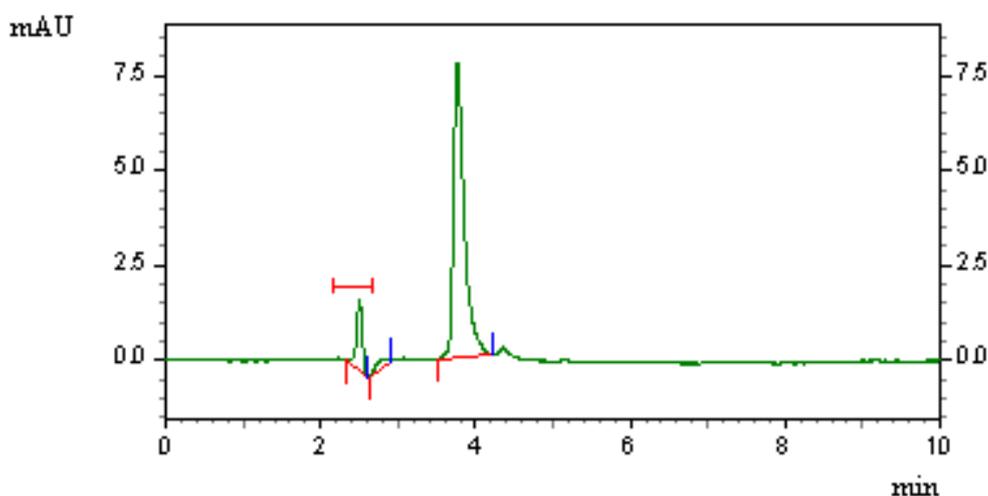


Figura 3.1 – Cromatograma de um padrão de OTC ($t_r = 3.8$ minutos).

Para diminuir o erro na quantificação da OTC e devido à diferente gama de concentrações utilizadas nos ensaios, foram construídas duas rectas de calibração abrangendo duas gamas de concentração diferentes de OTC ($0.2-5.0 \text{ mg L}^{-1}$ e $0.2-40.0 \text{ mg L}^{-1}$) (Figura 3.2).

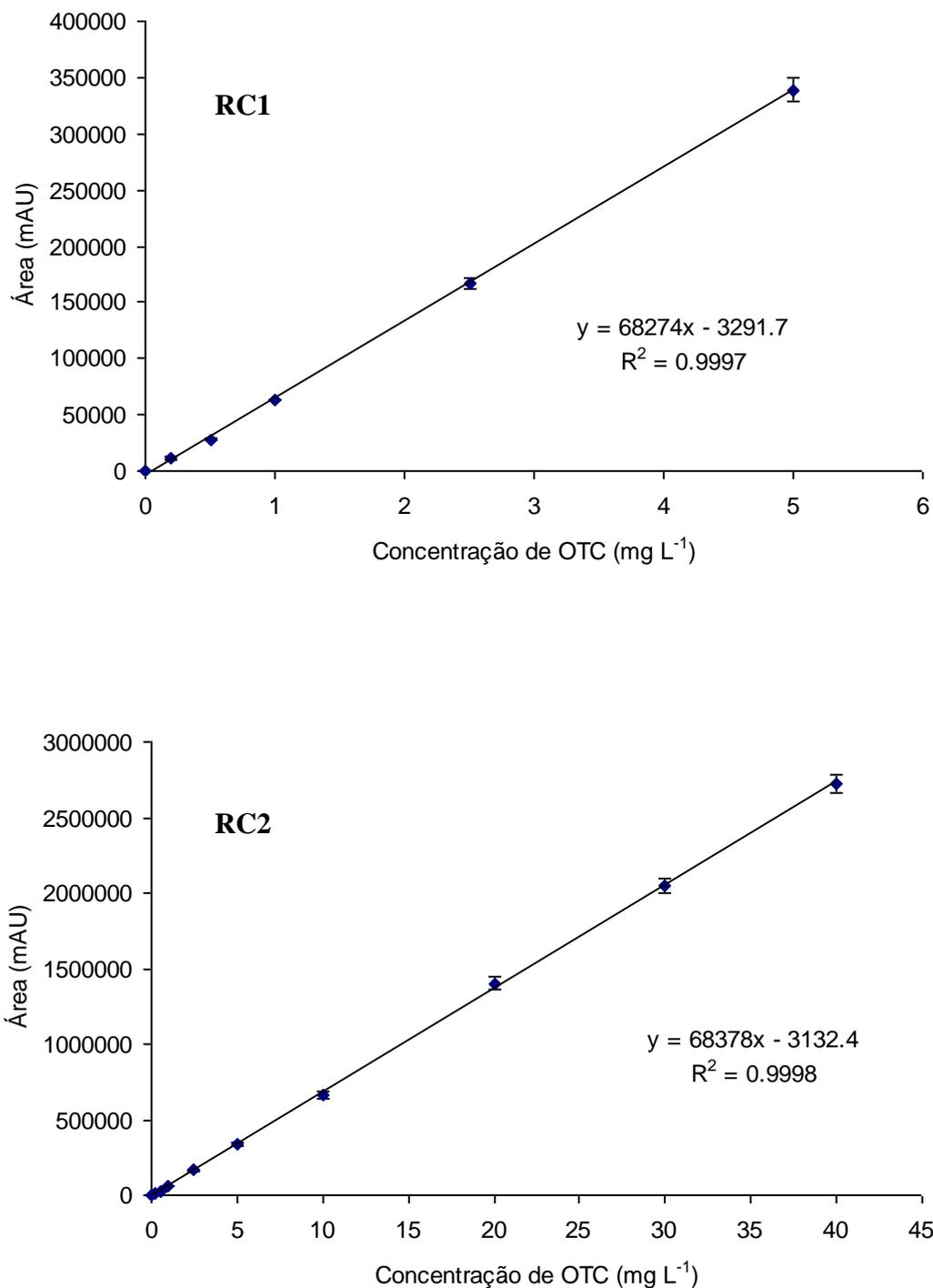


Figura 3.2 – Rectas de calibração utilizadas na quantificação da OTC em solução aquosa: a) RC1: recta de calibração para o intervalo de concentrações de 0,2 a 5,0 mg L⁻¹; b) RC2: recta de calibração para o intervalo de concentrações de 0,2 a 40 mg L⁻¹. As barras de erro verticais indicam \pm DP (n=15).

A metodologia desenvolvida e otimizada para a quantificação da OTC por HPLC/UV-Vis apresentou uma elevada reprodutibilidade e repetibilidade (RSD < 1,1 %) e, respectivamente para as rectas de calibração RC1 e RC2, limites de detecção instrumental (LDI) de 58 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 266 $\mu\text{g L}^{-1}$ e limites de quantificação (LQI) de 187 μg

L^{-1} e $888 \mu g L^{-1}$. Estes valores correspondem à concentração do analito cujo sinal é igual ao branco adicionado de, respectivamente, 3 e 10 vezes o desvio padrão (Miller e Miller, 2000). Para algumas amostras foi, no entanto, necessário recorrer a um método de pré-concentração de amostra sempre que se verificou que a amostra tinha uma concentração de OTC inferior ao LQI.

3.1.2 Optimização do método de SPE

Para a optimização do método foram testadas várias colunas de SPE: uma coluna mista de adsorventes poliméricos e de troca iónica (*Oasis® MCX*), uma coluna com características polares (*Isolute FL*), e dentro das colunas de fase reversa, uma polimérica (*Oasis® HLB*) e duas C18 (*Waters Sep-Pak® Vac* e *Merck Lichrolut® RP 18*) (Gros, *et al.*, 2006).

Foram testadas várias colunas de SPE porque, sendo a molécula da OTC bastante complexa pode assumir várias conformações, uma vez que apresenta três valores de pK_a ($pK_{a1}=4,5$ (Kemper, 2008); $pK_{a2}=7,5$ (Anderson, *et al.*, 2005); $pK_{a3}=8,9$ (Anderson, *et al.*, 2005)) e, além disso, sofre reacções de dimerização, ligações por ponte de hidrogénio, entre outras (Anderson, *et al.*, 2005), o que proporciona a aplicação de uma vasta gama de colunas de extracção de fase sólida, já que as partes mais apolares da molécula permitem ligações às colunas C18 ou a adsorventes poliméricos, e as partes mais polares permitem a aplicação a colunas de SPE de fase normal, tendo estas a vantagem da presença do grupo fenil. Além disso, os grupos aminopropil e NH_2 permitem a interacção entre a OTC e os diversos carbonilos, hidroxilos, aminoácidos em SPE com adsorventes polares (Anderson, *et al.*, 2005).

Segundo o que está descrito na bibliografia para as tetraciclinas, as recuperações obtidas para este tipo de antibióticos parecem ser superiores, se o pH da amostra aplicada à coluna de SPE for próximo, ou ligeiramente inferior, ao seu valor de pK_{a1} (pK_{a1} OTC = 4,5) (Gros, *et al.*, 2006). Neste sentido, o pH da solução de OTC aplicada nas colunas de SPE foi inicialmente ajustado a 4.

Inicialmente, as extracções foram realizadas com a solução padrão de OTC acidificada a pH 4, seguida de uma lavagem da coluna com água *Milli-Q* também a pH 4, e posterior eluição da OTC com metanol. A avaliação da eficiência das diferentes colunas de SPE foi efectuada com base na variação das áreas dos picos, correspondentes

à OTC, nos cromatogramas obtidos por HPLC-UV. Os resultados obtidos, depois do respectivo tratamento, são apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Avaliação da percentagem de recuperação e da precisão obtida para as diferentes colunas de SPE, na optimização do método de pré-concentração para a OTC

<i>Colunas SPE</i>	<i>Recuperação¹ (%) ± RSD</i>
Oasis® HLB	32,5 ^a ± 9,5
Isolute FL	9,9 ^b ± 4,9
Merck LiChrolut® RP18	60,8 ^c ± 13,7
Waters Sep-Pak® Vac	12,0 ^b ± 6,0
Oasis® MCX	3,4 ^d ± 1,1

¹Os valores representam a média de três réplicas de cada extração por SPE (três medidas cada). Médias com índices diferentes são significativamente diferentes (ANOVA: factor único Microsoft® Excel 2003, P≤0.05).

As percentagens de recuperação da OTC obtidas para as colunas *Isolute FL*, *Waters Sep-Pack® Vac* e *Oasis® MCX* foram em geral relativamente baixas. As melhores recuperações para a OTC foram obtidas com a coluna *Lichrolut® RP18*, em que se obteve uma recuperação de cerca de 60%. Tendo em conta que este valor não foi mesmo assim suficientemente elevado, tentou optimizar-se o método de SPE de forma a obter percentagens de recuperação mais próximas de 100%.

3.1.2.1 Avaliação do efeito do pH da amostra na recuperação da OTC

Alteraram-se as condições do método de SPE, com o objectivo de tentar aumentar a taxa de recuperação do fármaco, utilizando a coluna *Lichrolut® RP18*.

Em primeiro lugar, foi testado o efeito da diminuição do pH da amostra, utilizando um pH inferior ao pKa₁ da OTC (pH 2). Posteriormente, foram comparados os resultados obtidos para este valor de pH, com os obtidos a pH 4, para a mesma coluna de SPE, e mantidas as restantes condições do método.

Na Tabela 3.2 apresentam-se os resultados obtidos para as percentagens de recuperação da OTC, utilizando a coluna *LiChrolut® RP18*, para o pH da amostra ajustado a 2 e a 4.

Tabela 3.2 – Avaliação da percentagem de recuperação e da precisão obtidas para a coluna SPE LiChrolut® RP18

<i>pH</i>	<i>Recuperação¹ (%) ± RSD</i>
2	81,4 ^a ± 4,2
4	60,8 ^b ± 13,7

¹Os valores representam a média de três réplicas de cada extracção por SPE (três medidas cada). Médias com índices diferentes são significativamente diferentes (ANOVA: factor único Microsoft®Excel 2003, P≤0.05).

As recuperações foram obtidas pelo valor médio de três determinações, tendo-se obtido cerca de 82% e 61% (a pH 2 e a pH 4, respectivamente).

Esta análise permite constatar que a diminuição do pH da amostra implica um aumento significativo da percentagem de recuperação do fármaco.

3.1.2.2 Avaliação do efeito do pH do eluente na recuperação da OTC

Neste ponto foi testado o efeito do ajuste do pH do metanol, utilizado para a eluição, na recuperação do fármaco. Uma vez que se verificou que a diminuição do pH da amostra aumentou significativamente a recuperação da OTC, foi-se verificar se, alterando o pH do solvente utilizado na eluição para o mesmo valor (pH 2), a percentagem de recuperação do fármaco seguia a mesma tendência. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Avaliação da percentagem de recuperação e da precisão obtidas para a coluna SPE LiChrolut® RP18, pH da amostra 2, com e sem ajustar o valor de pH do metanol

<i>Método</i>	<i>Recuperação¹ (%) ± RSD</i>
Sem ajustar pH metanol	81,4 ^a ± 4,2
Metanol acidificado pH 2	60,8 ^b ± 13,7

¹Os valores representam a média de três réplicas de cada extracção por SPE (três medidas cada). Médias com índices diferentes são significativamente diferentes (ANOVA: factor único Microsoft®Excel 2003, P≤0.05).

A análise dos resultados obtidos permite constatar que, com a diminuição o pH do metanol para 2, verifica-se uma diminuição significativa da percentagem de recuperação da OTC. Esta diminuição pode dever-se ao facto do metanol ser um solvente forte e pouco selectivo, que ao ser acidificado, são alteradas características como a força iónica e constante dieléctrica do meio. Assim, confirma-se que estas alterações provocam uma diminuição da afinidade do eluente para com o fármaco, não conseguindo eluí-lo totalmente da coluna, ficando a maior parte ligada à fase estacionária.

3.1.2.3 Avaliação do efeito da lavagem da coluna de SPE na recuperação da OTC

Foi testado neste ponto o efeito da lavagem da coluna com água *MilliQ*, acidificada a pH 2, na recuperação do fármaco. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Avaliação da percentagem de recuperação e da precisão obtidas para a coluna SPE *LiChrolut® RP18*, pH da amostra 2, com e sem passo de lavagem da coluna e eluição com metanol sem ajuste de pH.

<i>Método</i>	<i>Recuperação¹ (%) ± RSD</i>
Com passo de lavagem	81,4 ^a ± 4,2
Sem passo de lavagem	95,6 ^b ± 3,7

¹Os valores representam a média de três réplicas de cada extracção por SPE (três medidas cada). Médias com índices diferentes são significativamente diferentes (ANOVA: factor único Microsoft® Excel 2003, P≤0.05).

A análise dos resultados obtidos permite constatar que, com introdução de um passo de lavagem da coluna após a aplicação da amostra, verifica-se uma diminuição significativa da percentagem de recuperação da OTC. Esta diminuição pode dever-se ao facto de parte da OTC ser logo eluída água *MilliQ* acidificada a pH 2, pois a solubilidade deste antibiótico é relativamente elevada em água.

Sintetizando, através dos resultados obtidos, foi demonstrado que o método de SPE mais eficiente foi aquele em que foi usada a coluna *LiChrolut RP18*, a amostra foi acidificada a pH 2, eluída com metanol sem ajuste de pH, e sem realização prévia de nenhum passo de lavagem.

3.1.2.4 Aplicação do método de SPE otimizado para a OTC em amostras do efluente

Após optimização do método de SPE para da OTC, este foi aplicado a amostras reais, com a finalidade de verificar se existiam alterações nas percentagens de recuperação do fármaco, na presença de uma matriz mais complexa. Sendo assim, foram feitas experiências em que se dopava o efluente recolhido com o padrão de OTC.

O efluente foi dopado com uma concentração 1 mg L⁻¹ em OTC, e aplicados 10 mL de amostra a uma coluna SPE *LiChrolut® RP18*, nas condições do método optimizado, sendo depois analisado por HPLC-UV.

Na Tabela 3.5 apresentam-se os resultados obtidos para as percentagens de recuperação, assim como os valores obtidos para a repetibilidade e reprodutibilidade do método de analítico de quantificação, desenvolvido neste trabalho para a OTC.

Tabela 3.5 – Avaliação da recuperação da OTC em efluente dopado, repetibilidade e reprodutibilidade do método analítico de quantificação

% Recuperação amostra dopada	93,98
RSD^a (%)	5,13
RSD^b (%)	10,23

a) Repetibilidade
b) Reprodutibilidade

Os resultados apresentados na Tabela 3.5 demonstram que a percentagem de recuperação obtida para a OTC na amostra de efluente diminuiu ligeiramente em relação ao valor obtido em solução aquosa. No entanto, esta diferença não foi significativa, e por isso, adoptou-se este método optimizado de SPE para realizar a pré-concentração das amostras de efluente no decurso do trabalho.

3.1.3 Quantificação da OTC em tecidos vegetais

3.1.3.1 Optimização do procedimento de extracção da OTC de tecidos vegetais

Foram testados diferentes procedimentos analíticos para a extracção da OTC em amostras de tecidos das folhas da *Phragmites australis* (Ponto 2.3.6 da Metodologia Experimental), para avaliar a eficiência de recuperação com o objectivo de seleccionar o procedimento mais adequado.

Avaliaram-se dois materiais de suporte: areia e sílica substituída com C₁₈, bem como vários solventes de eluição (metanol, acetonitrilo e mistura metanol:água destilada (7:3; v/v)), para a extracção quantitativa da OTC (Ponto 2.3.7 da Metodologia Experimental).

Da análise das eficiências de recuperação obtidas (Figura 3.3) verifica-se que a mistura metanol:água (7:3; v/v) foi o eluente mais eficiente para todos os procedimentos de extracção testados. Para o mesmo eluente, a eficiência de recuperação obtida para os 2 tipos de materiais de suporte estudados não foi significativamente diferente.

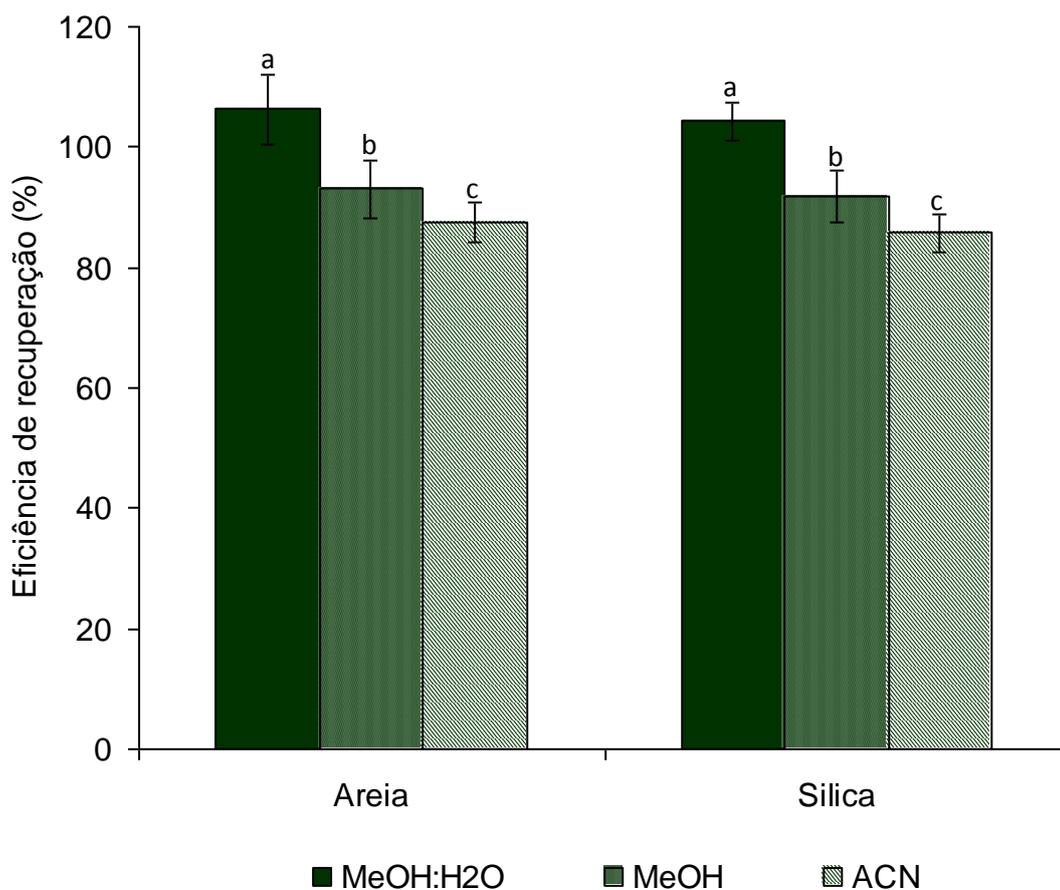


Figura 3.3 – Comparação dos diferentes procedimentos de extração da OTC nos tecidos da folha de *Phragmites australis*. As barras de erro verticais indicam \pm DP (n = 9). Diferentes letras significam valores significativamente diferentes para $P < 0.05$.

Estas observações são consistentes com resultados obtidos em trabalhos prévios onde o método SSDM (Sea Sand Disruption Method) mostrou também ser bastante eficiente na extração e muito reprodutível para diferentes compostos orgânicos e matrizes (Teixeira e Costa, 2005; Manhita, *et al.*, 2006). Assim foi seleccionado para material de suporte a areia do mar, que apresenta a vantagem de um menor custo em relação à sílica- C_{18} , e como eluente a mistura metanol:água (7:3; v/v).

Para otimizar as condições para a extração da OTC pelo método SSDM, foram também testados diferentes volumes de eluição (5, 10 e 15 mL) com a mistura metanol:água (7:3; v/v). Foram ainda testadas diferentes misturas metanol:água em diferentes proporções (1:10, 1:5 e 1:3; v/v) para redissolução da OTC extraída. As melhores condições para a extração da OTC dos tecidos vegetais consistiram na utilização de 10 mL de solvente e de uma mistura metanol:água na proporção 1:10 para

a redissolução da OTC extraída. Estes resultados estão em concordância com os obtidos por outros autores como Teixeira e Costa (2005).

Para o procedimento de extracção optimizado, a percentagem média de recuperação para a OTC foi de $106 \pm 6 \%$ com se pode observar na Figura 3.3.

3.1.3.2 Validação da metodologia LC-ESI-MS/MS

O estudo dos efeitos de matriz, percentagens de recuperação do analito no processo de extracção, a linearidade da recta de calibração e precisão foram os critérios considerados para a validação da metodologia analítica desenvolvida para a quantificação da OTC nos tecidos vegetais.

A análise quantitativa por HPLC-ESI-MS tem algumas limitações nomeadamente a da ocorrência de efeitos da matriz. Este efeito é causado pela elevada susceptibilidade da fonte ESI a outros componentes presentes na matriz, que podem dar origem a alguma supressão ou aumento de sinal, conduzindo a resultados erróneos. Várias estratégias podem ser adoptadas para reduzir estes efeitos, por exemplo a extracção selectiva, limpeza da amostra após a extracção, ou melhoria da separação cromatográfica. Contudo, estes procedimentos conduzem frequentemente a perdas de analito bem como a tempos de análise mais longos (Gros, *et al.*, 2006b; Kang, *et al.*, 2007). Outras estratégias efectivas descritas na literatura consistem no uso de técnicas analíticas como, a utilização de padrão interno, o método da adição de padrão, a diluição dos extractos da amostra e a construção de curva de calibração com padrões em matriz idêntica à das amostras (Kloepfer, *et al.*, 2005; Gros, *et al.*, 2006b; Kang, *et al.*, 2007).

O uso de padrão interno é uma técnica muito comum, no entanto padrões internos apropriados (compostos não marcados que sejam estruturalmente semelhantes ao analito ou padrões de analito marcados com isótopos) não estão normalmente disponíveis comercialmente ou são economicamente muito dispendiosos. Por outro lado, o método da adição de padrão é também um método muito utilizado mas trata-se de uma metodologia que consome um tempo de análise muito elevado. Por outro, a diluição do extracto de amostra pode conduzir a um decréscimo considerável na sensibilidade, o que é uma limitação importante a ter em conta.

De forma a avaliar os possíveis efeitos de matriz e em que extensão estes afectam a quantificação da OTC nos tecidos vegetais, foi analisada a alteração do sinal com o aumento da concentração de OTC para um conjunto de padrões preparados numa

mistura metanol:água (10:90) que foram utilizados como controlo (total ausência de efeito da matriz) e comparados com os mesmos padrões preparados com extractos de folha (de acordo com o procedimento SSDM otimizado e descrito anteriormente). As amostras de folha utilizadas foram retiradas de plantas de *Phragmites australis* não sujeitas a OTC, a fim de reproduzir apenas os efeitos de matriz.

A comparação dos declives das duas rectas permite concluir que estas não se encontram totalmente sobrepostas e paralelas, indicando que deverão ocorrer efeitos de matriz na quantificação da OTC (Figura 3.4). Como também se observa na Figura 3.4, o extracto vegetal dopado com OTC produz um declive inferior, indicando que a OTC nesta matriz é susceptível de sofrer uma supressão de sinal.

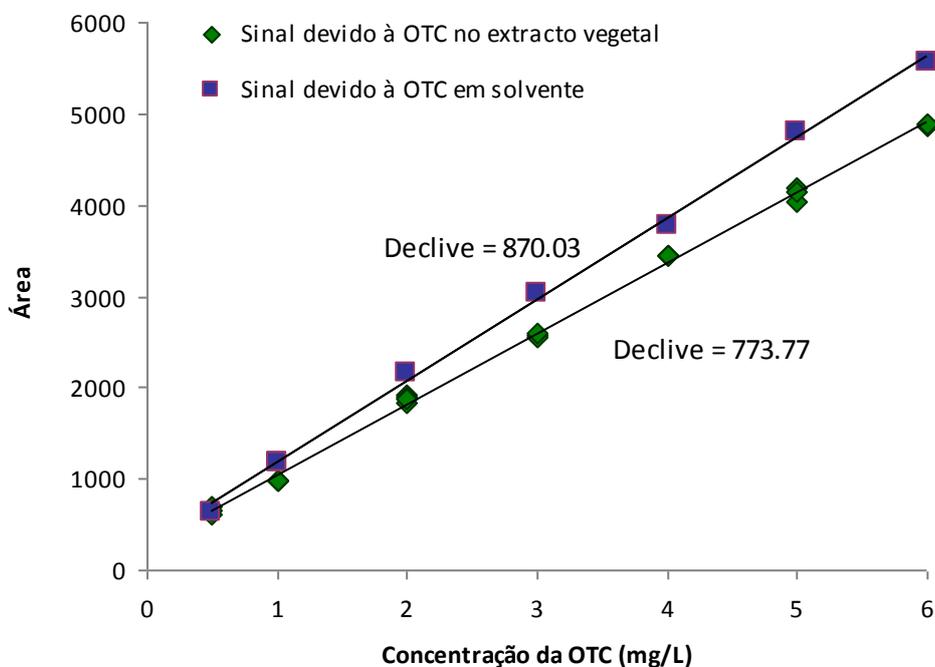


Figura 3.4 – Avaliação do efeito da matriz na quantificação da OTC.

Para minimizar o efeito de matriz observado, foi construída uma curva de calibração em que o padrão foi dissolvido em extractos obtidos a partir de folhas de *Phragmites australis* não sujeita a desenvolvimento na presença de OTC (*external matrix-matched calibration*). Esta curva de calibração, usada na quantificação da OTC em folhas de *Phragmites australis*, apresentou linearidade ($R^2 > 0.999$) na gama de concentrações usada (0.5 – 6.0 mg OTC L⁻¹).

A precisão da metodologia, expressa como o desvio padrão relativo das determinações de vários extractos de folhas dopados com OTC, foi avaliada em 4%.

3.2 Estudo de estabilidade e conservação das amostras líquidas

Vários poluentes orgânicos são susceptíveis de sofrer reacções de fotodegradação, tendo algumas classes de fármacos, em particular, sido já investigadas quanto à sua fotoestabilidade, embora para alguns fármacos sejam apenas conhecidas informações limitadas sem que tenham sido feitos estudos específicos e confirmatórios. No entanto, a fotólise por irradiação solar é considerada uma importante via de degradação de muitos antibióticos num ambiente aquático natural. Muitos destes compostos, como é o caso da OTC, possuem anéis aromáticos, heteroátomos e outros grupos funcionais que podem absorver radiação solar ou reagir com espécies transientes fotogeradas em águas naturais (e.g. espécies reactivas de oxigénio e matéria orgânica natural fotoexcitada). A fotoestabilidade dos compostos coloca questões importantes na sua quantificação relativamente à forma adequada de fazer o seu pré-tratamento e conservação das amostras quando as análises não podem ser efectuadas imediatamente após a colheita das amostras.

Neste âmbito, realizaram-se neste estudo ensaios com o objectivo de determinar a estabilidade das amostra e de necessidades de procedimentos especiais com vista à sua conservação, tendo-se colocado soluções de 1,5 mg L⁻¹ à luz, à temperatura ambiente (20°C); no escuro, à temperatura ambiente; e no frio (4°C), protegidos da luz.

Na Figura 3.5 observa-se, em comparação, a cinética de degradação da OTC sob o efeito ou na ausência de luz, mantendo a temperatura ambiente, e verifica-se, de facto, que ocorre uma degradação mais rápida da OTC por exposição à luz, demonstrando-se assim haver alguma foto-sensibilidade da OTC nas condições do ensaio.

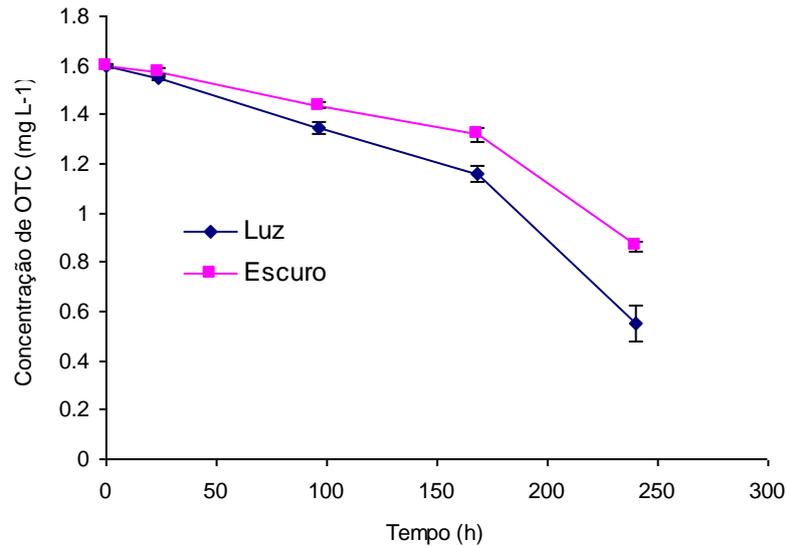


Figura 3.5 – Cinética de degradação da OTC sob o efeito da luz e no escuro, ambas à temperatura ambiente. Média \pm DP (n=9)

Por outro lado, comparando a cinética de degradação da OTC a duas temperaturas diferentes (Figura 3.6), verifica-se uma menor estabilidade da OTC à temperatura ambiente, observando-se em particular uma acentuada diminuição da concentração após as 168 h, enquanto à temperatura de 4 °C a concentração de OTC sofre apenas um ligeiro decréscimo durante este período.

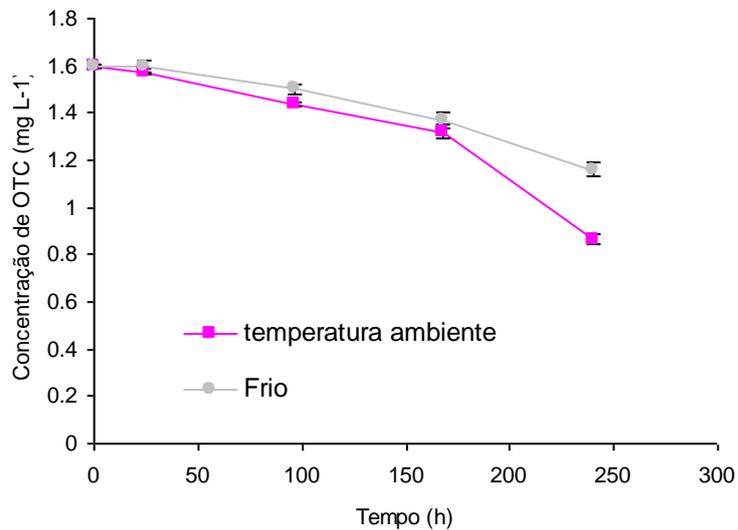


Figura 3.6 – Cinética de degradação da OTC a duas temperaturas diferentes e no escuro. Média \pm DP (n=9)

Dos resultados obtidos, concluiu-se que a conservação das amostras de OTC até à sua quantificação, sempre que necessária, deveria ser feita no frio e protegida da luz, e nunca deveria exceder um período de 168 h, devendo ser feita preferencialmente, dentro de um prazo de até 48 h.

3.3 Avaliação da capacidade de retenção de OTC pela LECA

Com o objectivo de seleccionar materiais para utilização como matriz de suporte em LCMs, foram, neste trabalho, realizados ensaios utilizando argila expandida (LECA 2/4) (Ponto 2.5 da Metodologia Experimental) e foi avaliada a sua capacidade para reter a OTC por adsorção. A LECA 2/4 foi escolhida para a realização destes ensaios porque estudos prévios mostraram que este material possui uma boa capacidade de remoção de outros compostos orgânicos (incluindo alguns fármacos), enquanto outros materiais frequentemente utilizados não demonstraram resultados tão satisfatórios (Dordio, *et al.*, 2009a; Dordio, *et al.*, 2007). Os critérios de selecção deste material foram então, além da sua elevada capacidade de retenção de diversos compostos orgânicos referida acima, também a sua elevada capacidade tampão e uma adequada condutividade hidráulica, aliados a um baixo custo de aquisição. A caracterização físico-química da LECA 2/4 utilizada nestes estudos encontra-se descrita no Anexo D.

Nas Figuras 3.7 e 3.8, apresentam-se as quantidades adsorvidas de OTC pela LECA ao longo de um período de 168 horas de contacto, para 4 diferentes concentrações iniciais de OTC (1.5 mg L^{-1} , 7 mg L^{-1} , 13 mg L^{-1} e 36 mg L^{-1}), em água e em efluente, respectivamente.

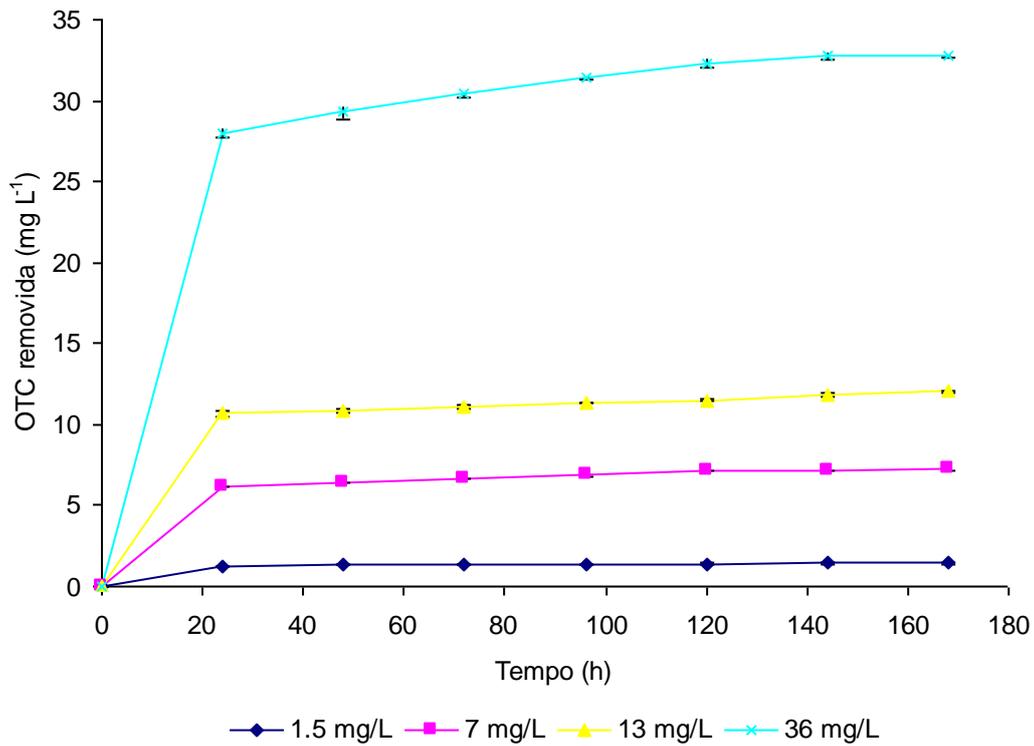


Figura 3.7 – Cinética de remoção da OTC pela LECA em solução aquosa. Média \pm DP (n=9)

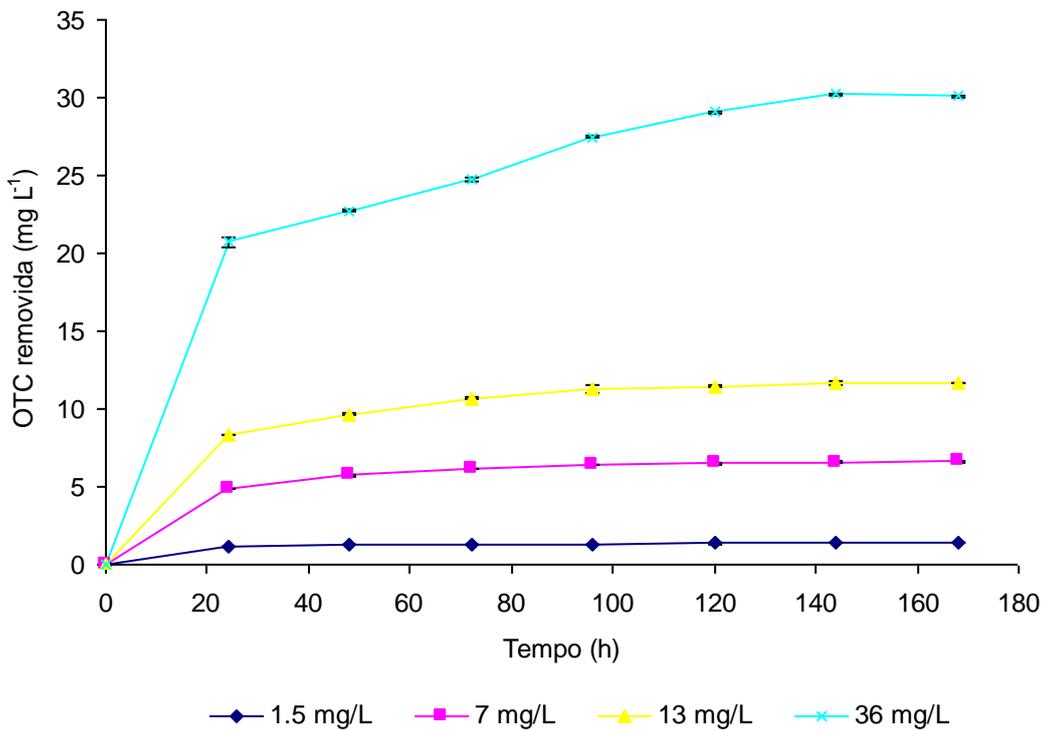


Figura 3.8 – Cinética de remoção da OTC pela LECA em efluente dopado. Média \pm DP (n=9).

Os resultados obtidos mostram que em todos os casos a remoção de OTC pela LECA decorre num passo inicial muito rápido, em que durante as primeiras 24 h de contacto é adsorvida a maior parte (> 70 %) da quantidade inicial de OTC presente em

solução. Posteriormente, alguma quantidade adicional de OTC é ainda adsorvida durante um segundo passo mais lento do processo, sendo em geral atingidas as concentrações de equilíbrio entre as 96 h e as 120 h de contacto.

As quantidades de OTC removidas relacionam-se com as concentrações iniciais de uma forma linear em toda a gama de concentrações testada (Figura 3.9), o que é indicativo de que a capacidade de adsorção da LECA ainda não se encontra esgotada a este nível de concentrações da OTC, quer no caso dos ensaios com água quer no caso dos ensaios com efluente.

Da observação da Figura 3.9 é também possível notar que a remoção, pela LECA, da OTC em efluente é menos eficiente, resultando um declive menor da relação entre quantidade de OTC removida e quantidade inicial neste caso do que no caso dos ensaios em água.

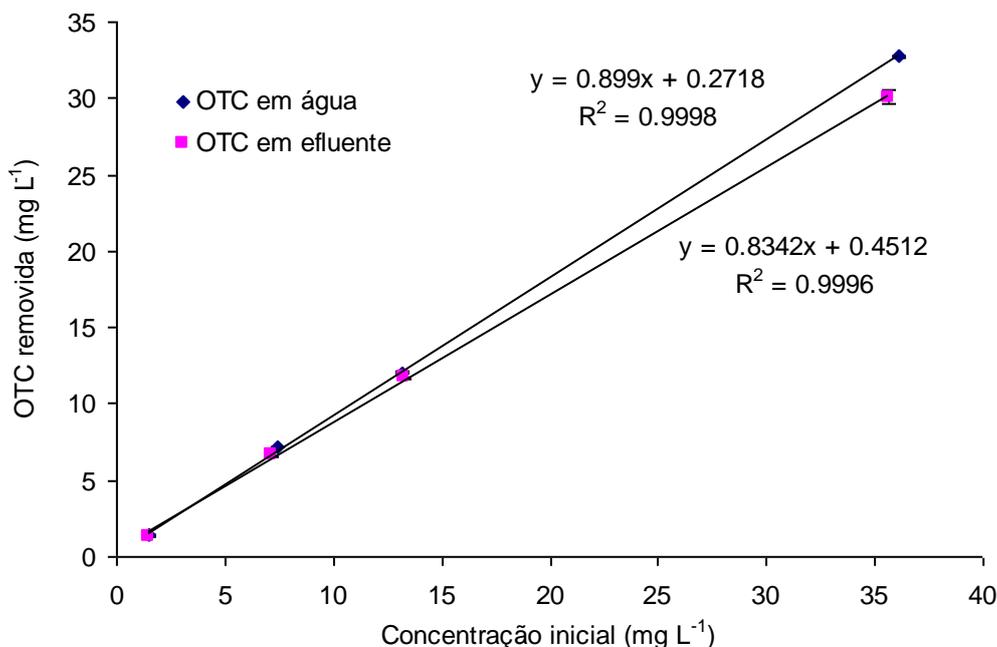


Figura 3.9 – Relação entre a quantidade de OTC removida e a concentração inicial deste composto em solução aquosa e em efluente.

As eficiências de remoção da OTC pela LECA obtidas ao fim dos ensaios (após 168 horas de contacto) foram, em geral, bastante elevadas, sendo superiores a 90% e 84%, respectivamente, nos ensaios efectuados em água e em efluente (Figura 3.10). Observou-se, assim, uma diminuição entre 4 a 8% da eficiência de remoção da OTC em efluente provavelmente devido à maior complexidade deste meio que poderá contribuir para uma maior solubilidade da OTC no líquido, desfavorecendo a transferência para a fase sólida, ou originar efeitos de competição pela adsorção de outros constituintes do

efluente. Alguns autores referem ainda que o desenvolvimento de biofilmes nas matrizes de suporte de leitos pode desfavorecer a adsorção de compostos ionizáveis, especialmente os ácidos, a superfícies minerais como a LECA (Matamoros, *et al.*, 2009).

A eficiência de remoção da OTC para as concentrações iniciais mais elevadas verificou-se ser menor do que para concentrações mais baixas, embora se observe, ainda assim, que estas menores eficiências correspondem a quantidades crescentes de composto removido quando consideradas em termos de quantidades absolutas.

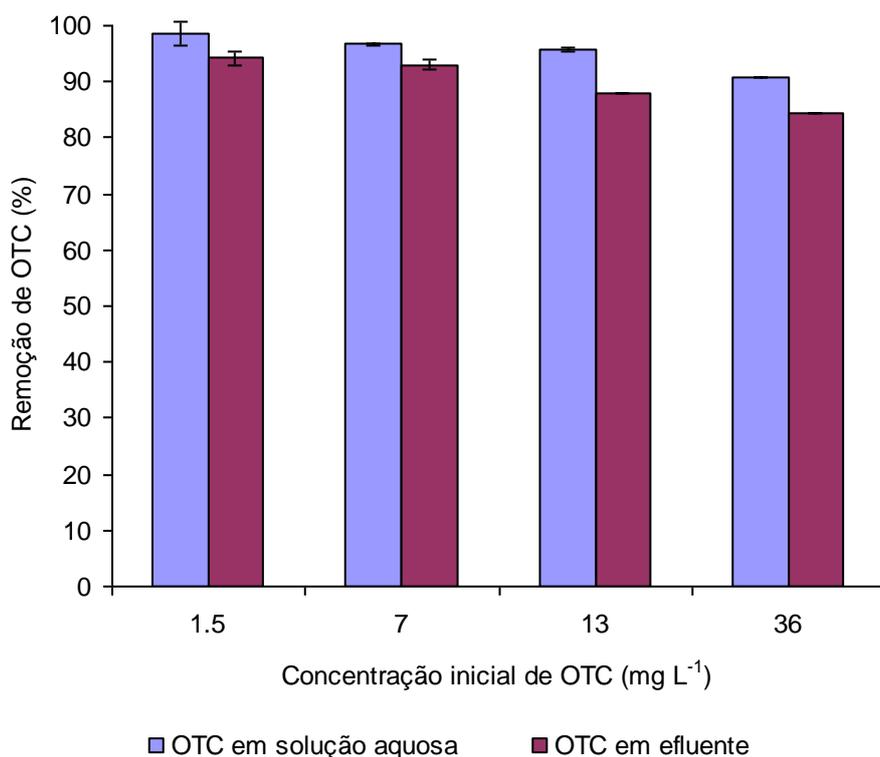


Figura 3.10 – Eficiências de remoção da OTC pela LECA para as diferentes concentrações iniciais do composto em água e em efluente, após 168 h de tempo de contacto. Média \pm DP (n=9).

3.4 Avaliação da capacidade de remoção da OTC em LCMs plantados com *Phragmites australis*

Dadas as elevadas eficiências de remoção da OTC obtidas com a LECA 2/4, procedeu-se então à avaliação da eficiência de LCMs para a remoção deste antibiótico de efluentes contaminados, realizando para esse efeito ensaios em microcosmos contendo este material como matriz de suporte e plantados com *Phragmites australis*.

3.4.1 Condições relevantes para a realização dos ensaios

O efluente usado nos ensaios foi recolhido após tratamento secundário numa estação de tratamento de águas residuais que serve um pequeno aglomerado populacional rural. O efluente foi recolhido no final do mês de Março.

Na Tabela 3.6, apresentam-se alguns dos parâmetros de caracterização qualitativa do efluente utilizado nos ensaios. Os valores de concentração de matéria orgânica, de concentração de sólidos suspensos totais e do pH encontravam-se na altura da recolha do efluente dentro dos valores limites de emissão de águas residuais domésticas nos recursos hídricos de acordo com o Decreto-Lei 236/98.

Tabela 3.6 – Condições de ensaio

Condições de Primavera		
Composição média do efluente	pH	7.8 ± 0.05
	SST (mg L ⁻¹)	15 ± 4
	COD _t (mg L ⁻¹)	97 ± 2
	COD _s (mg L ⁻¹)	58 ± 2
Temperatura média do ar durante os ensaios (°C)		16 ± 3
Altura média das plantas no início dos ensaios (cm)		10-15
pH da solução durante a realização dos ensaios	Leitos não plantados	7.95 ± 0.19
	Leitos plantados	7.43 ± 0.19
	Efluente só	7.79 ± 0.20
Perda de água (mL d ⁻¹)	Leitos não plantados	85 ± 17
	Leitos plantados	102 ± 12

Na altura dos ensaios as plantas dos microcosmos de LCMs encontravam-se em plena rebentação (Tabela 3.6), verificando-se durante o período de realização do ensaio um crescimento médio das plantas de cerca de 5 centímetros.

As taxas de evaporação/evapotranspiração para os vários leitos foram estimadas diariamente através da medição dos volumes de água necessários para reposição dos níveis iniciais de líquido nos leitos. Os valores médios encontram-se apresentados na Tabela 3.6.

Nos leitos não plantados a taxa de evaporação depende principalmente da temperatura e da humidade relativa do ar. Nos leitos plantados, além da evaporação, também a taxa de transpiração das plantas constitui uma importante contribuição para as perdas de água. O tipo de plantas e o seu estado vegetativo, é neste caso, determinante para as taxas de evapotranspiração.

3.4.2 Remoção de OTC pelos microcosmos de LCM

Com o objectivo de avaliar a influência de alguns factores que podem condicionar a eficiência dos LCMs na remoção da OTC de efluentes domésticos, foram realizados ensaios para estudar a importância dos seguintes factores: i) tempo de retenção no sistema; ii) degradação microbiana do composto iii) presença das plantas e sua capacidade para absorver, translocar e degradar ou acumular a OTC.

Os efeitos do tempo de contacto e da presença de vegetação (*Phragmites australis*) na remoção da OTC do efluente dopado podem ser avaliados pela observação dos resultados apresentados na Figura 3.11 e comparados com o comportamento em leitos de LECA não plantados.

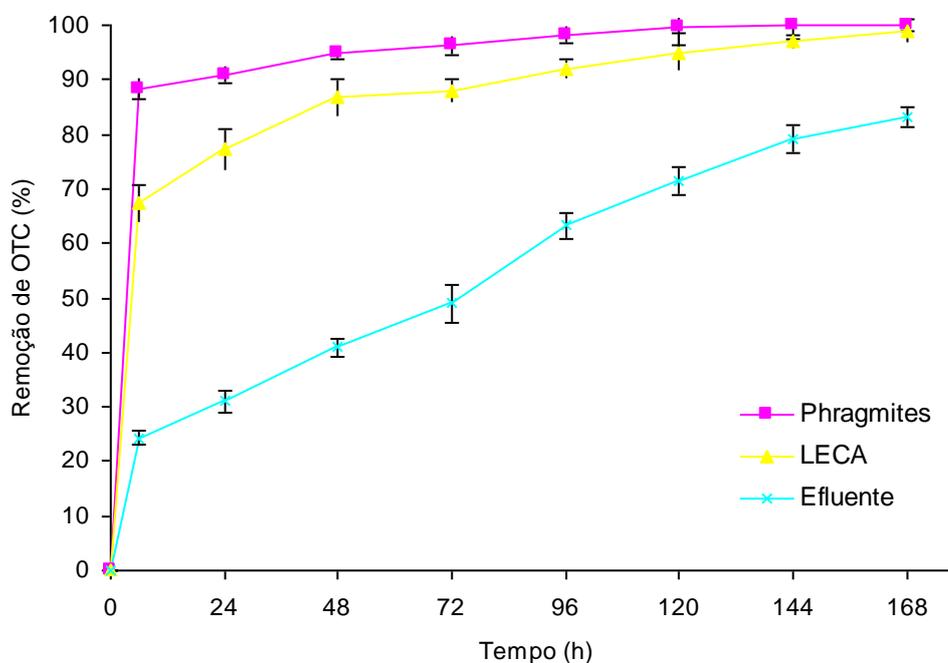


Figura 3.11 – Cinética de remoção da OTC em leitos plantados com *Phragmites australis*, em leitos de LECA e em efluente só. Média \pm DP (n = 9)

As cinéticas de remoção da OTC nos microcosmos de LCMs, plantados e não plantados caracterizaram-se (tal como já tinha sido verificado nos ensaios anteriores de remoção pela LECA) por um passo inicial rápido (primeiras 6 horas) devido principalmente à adsorção sobre a superfície da LECA (embora nos leitos plantados possa também ocorrer alguma adsorção às raízes das plantas). Neste passo, a maior parte da quantidade inicial da OTC (> 88% e > 67% nos leitos plantados e não plantados, respectivamente) é removida durante este curto período de tempo. Subsequentemente, um processo mais lento é responsável pela remoção adicional de OTC, cuja concentração estabiliza a tempos de equilíbrio que rondam as 96-120 h (leitos plantados) e 120-144 h (leitos não plantados). Nesta etapa, a remoção nos leitos de LECA não plantados é claramente mais lenta do que nos leito plantados.

A remoção é quase total nos leitos plantados ao fim de 120 h, enquanto nos leitos não plantados tal eficiência só é atingida no fim dos ensaios, após 168 h de contacto. Assim, a presença de plantas não apresenta uma significativa diferença de eficiência em relação aos leitos não plantados dado que a remoção é quase completa em ambos os sistemas, mas contribuem para uma significativa aceleração do processo, reduzindo o tempo de retenção necessário para as 96 h.

Na Figura 3.11, é também apresentada a cinética de biodegradação da OTC na água residual. Os resultados mostram uma elevada degradação da OTC no efluente, o que indica a sua biodegradabilidade. No entanto, o processo é bastante lento em comparação com a remoção nos leitos.

Dos resultados obtidos coloca-se a questão de saber se a melhor performance obtida nos leitos plantados se deve a uma contribuição mais directa das plantas através da absorção da OTC e possível translocação para a parte aérea e eventual metabolização ou sequestração, através da adsorção às suas raízes ou, de uma forma indirecta, estimulando o desenvolvimento dos microorganismos na rizosfera que biodegradam o composto ou catalisando enzimaticamente a degradação do composto por libertação de exsudados através das suas raízes. Assim, é interessante estudar o destino do fármaco no interior da planta após a sua remoção do meio líquido para se poder melhor elucidar estas questões. Com este objectivo foi efectuada a determinação de OTC em tecidos de folhas de *Phragmites australis* recolhidas nos leitos durante a realização dos ensaios, após tempos de contacto de 48 h, 96 h, 168 h e também a 408 h após o início dos ensaios.

Dos resultados obtidos da determinação de OTC em tecidos de folhas das plantas por HPLC-MS não foi possível observar a presença deste composto em quantidades superiores ao limite de detecção, podendo-se concluir pela não absorção pelas plantas, ou pela sua absorção sem translocação para a parte aérea ou, ainda, pela sua completa transformação em metabolitos num período inferior a 48 h.

VI. CONCLUSÕES

No presente estudo avaliou-se a eficiência de microcosmos de leitos construídos de macrófitas, utilizando a LECA como matriz de suporte e plantados com *Phragmites australis*, para a remoção de um antibiótico, oxitetraciclina (OTC), de efluentes domésticos, tendo-se obtido elevadas eficiências de remoção deste fármaco (> 99%), o que demonstrou o potencial deste tipo de sistemas para tratar efluentes com este tipo de poluentes. Verificou-se que a matriz de suporte, LECA 2/4, foi responsável pela remoção da maior parte da OTC presente no efluente, mas a presença das plantas contribuiu para que o processo de remoção se tornasse mais rápido nos leitos plantados. A cinética do processo de remoção caracterizou-se por um passo inicial rápido (primeiras 6 horas), devido principalmente à adsorção sobre a superfície da LECA, em que a maior parte da quantidade inicial da OTC (> 88% e > 67% nos leitos plantados e não plantados, respectivamente) foi removida. Subsequentemente, um processo mais lento foi responsável pela remoção quase completa de OTC, cuja concentração estabilizou a tempos de equilíbrio que rondam as 96-120 h (leitos plantados) e 120-144 h (leitos não plantados). Nesta etapa, a remoção nos leitos não plantados de LECA é claramente mais lenta do que nos leitos plantados.

Não foi possível detectar OTC em tecidos de folhas das plantas usadas nos ensaios, o que sugere que o fármaco não é absorvido pelas plantas, ou, em alternativa, é absorvido mas não é translocado para a parte aérea ou, então, sofre uma metabolização/transformação rápida em menos de 48 h. Mesmo considerando a hipótese de não ser absorvido pelas plantas, os resultados mostram claramente que estas têm uma influência positiva na remoção da OTC, podendo esta influência dever-se a um estímulo do desenvolvimento dos microrganismos (que, em ensaios em efluente dopado com OTC, se verificou serem capazes de biodegradar este fármaco) e/ou à libertação de

exsudados pelas raízes que poderão catalisar enzimaticamente a degradação do antibiótico.

Para a quantificação da OTC em dois tipos diversos de amostras, líquidas (soluções aquosas e efluentes) e sólidas (tecidos de plantas), foram desenvolvidas e otimizadas metodologias analíticas adequadas. A metodologia desenvolvida para amostras líquidas incluiu, sempre que necessário, um passo de pré-concentração por SPE (solid phase extraction), seguida de separação por cromatografia líquida de alta performance (HPLC – high performance liquid chromatography) e detecção por espectrometria UV/Vis. Para a pré-concentração da OTC testaram-se diferentes cartuchos de SPE (*LiChrolut® RP-18*, *IST (Isolute FL)*, *Sep-Pak® Vac*, *Oasis® MCX*, *Oasis® HLB*), a diferentes valores de pH da amostra e do metanol, e incluindo ou não um passo de lavagem. Após a análise estatística dos resultados, concluiu-se que os valores mais elevados de recuperação foram conseguidos com os cartuchos *LiChrolut® RP-18*, para amostras com um pH de 2.0 sem passo de lavagem e utilizando metanol não acidificado como eluente.

Para amostras sólidas, a metodologia desenvolvida para a quantificação de OTC em tecidos de folhas de planta consistiu na extracção deste composto pelo método de disrupção da amostra por areia (SSDM – sea sand disruption method), separação por cromatografia líquida e detecção e quantificação por espectrometria de massa (quadrupole ion trap). Para a extracção da OTC dos tecidos das folhas testaram-se dois materiais de suporte diferentes (sílica substituída com C₁₈ e areia) e vários solventes (metanol, acetonitrilo e mistura metanol:água a 7:3, v/v). Após a análise estatística dos resultados, concluiu-se que os valores mais elevados de recuperação foram conseguidos utilizando a areia como material de suporte e a mistura metanol:água como solvente.

Este trabalho constitui uma abordagem inicial à potencial utilização destes leitões para a remoção de antibióticos de efluentes. No entanto, a sua possível aplicação a uma escala real exige a realização de estudos adicionais destes sistemas em condições de campo e testar os efeitos de diversos parâmetros de operação. Para além disso será interessante analisar como se mantém a eficiência destes sistemas para a remoção de outros fármacos da classe dos antibióticos ou de outras classes farmacológicas. Outra questão importante a esclarecer será até que ponto estes sistemas conseguem manter uma elevada eficiência durante um longo prazo de operação.

Apesar da necessidade de esclarecer os pontos mencionados e outros que importa ainda aprofundar antes da real implementação destes sistemas, os resultados obtidos

neste trabalho permitem, no entanto, encarar com optimismo esta alternativa de tratamento de efluentes e sugerem a continuação do investimento no estudo deste tipo de sistemas.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Ana Vitória Martins Neves Barrocas Dordio e à Professora Doutora Dora Maria Fonseca Martins Ginja Teixeira agradeço pelos conhecimentos científicos transmitidos, pela orientação, incentivo, apoio, compreensão, dedicação e disponibilidade evidenciada durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Alfredo Palace Carvalho agradeço os conhecimentos transmitidos, o esclarecimento de dúvidas, a disponibilidade e apoio no decorrer do trabalho prático.

À Patrícia agradeço pela amizade, apoio e incentivo sempre demonstrados no decorrer deste trabalho.

À Mara, à Eunice e à Zita por toda a ajuda, compreensão, apoio e incentivo na realização do trabalho prático.

Ao Zé, que mais uma vez demonstrou toda a sua compreensão, paciência, amizade, apoio e incentivo ao longo de todo este percurso académico.

À minha mãe e à minha irmã por todo o apoio e incentivo que têm demonstrado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aga, D. S., 2008. Fate of Pharmaceuticals in the Environment and in Water Treatment Systems. CRC Press, Boca Raton, FL.

Anderson, C. R., Rupp, H. S., Wu, W., 2005. Complexities in tetracycline analysis – chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. Journal of Chromatography A, Vol. 1075, pp. 23-32.

Arikan, O. A., Rice, C., Codling, E., 2008. Occurrence of antibiotics and hormones in a major agricultural watershed. *Desalination*, Vol. 226, pp. 121–133.

Babić, S., Ašperger, D., Mutavdžić, D., Horvat, A. J. M., Kaštelan-Macan, M., 2006. Solid phase extraction and HPLC determination of veterinary pharmaceuticals in wastewater. *Talanta*, Vol. 70, pp. 732-738.

Braskerud, B. C., Haarstad, K., 2003. Screening the retention of thirteen pesticides in a small constructed wetland. *Water Sci. Technol.* 48, 267-274.

Carlsson, C., Johansson, A., Alvan, G., Bergman, K., Kühler, T., 2006. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. *Science of the Total Environment*, Vol. 364, pp. 67– 87.

Clescerl, L. S., Greenberg A. E., Eaton, A. D., 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Publisher: Washington, D.C.: APHA- AWWA- WEF. 20th ed.

Conkle, J. L., White, J. R., Metcalfe, C. D., 2008. Reduction of pharmaceutically active compounds by a lagoon wetland wastewater treatment system in Southeast Louisiana. *Chemosphere* 73, 1741-1748.

Cooper, E. R., Siewicki, T. C., Phillips, K., 2008. Preliminary risk assessment database and risk ranking of pharmaceuticals in the environment. *Sci. Total Environ.* 398, 26-33.

Cooper, P. F., Job, G. D., Green, M. B., Shutes, R. B. E., 1996. *Reed Beds and Constructed Wetlands for Wastewater Treatment*. WRc Publications, Medmenham, Marlow, UK.

Cunningham, V. L., 2008. Special characteristics of pharmaceuticals related to environmental fate, in: Kümmerer, K. (Ed.), *Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 23-34.

Daughton, C. G., Ternes, T. A., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environ. Health Perspect.* 107, 907-938.

Davies, L. C., Pedro, I. S., Ferreira, R. A., Freire, F. G., Novais, J. M., Martins-Dias, S., 2008. Constructed wetland treatment system in textile industry and sustainable development. *Water Sci. Technol.* 58, 2017-2023.

Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto. *Diário da República* 176/98 SERIE I-A. Ministério do Ambiente. Lisboa.

Díaz-Cruz, M. S., Barceló, D., 2007. Recent advances in LC-MS residue analysis of veterinary medicines in the terrestrial environment. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 26, No. 6.

Dordio, A., Candeias, E., A., Pinto, A., Teixeira da Costa, C., Palace Carvalho, A., 2009b. Preliminary media screening for application in the removal of clofibrac acid, carbamazepine and ibuprofen by SSF-constructed wetlands. *Ecological Engineering* vol. 35, pp 290–302.

Dordio, A., Carvalho, A. J. P., Teixeira, D. M., Dias, C. B., Pinto, A. P., 2010. Removal of pharmaceuticals in microcosm constructed wetlands using *Typha* spp. and LECA. *Bioresource Technology*, Vol. 101, pp. 886–892.

Dordio, A., Pinto, J., Pinto, A. P., da Costa, C. T., Carvalho, A., Teixeira, D. M., 2009a. Atenolol removal in microcosm constructed wetlands. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* in press.

Dordio, A. V., Teimão, J., Ramalho, I., Carvalho, A. J. P., Candeias, A. J. E., 2007. Selection of a support matrix for the removal of some phenoxyacetic compounds in constructed wetlands systems. *Science of the Total Environment*, Vol. 380, pp. 237–246.

Fent, K., Weston, A. A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76, 122-159.

Gros, M., Petrovic, M., Barceló D., 2008. Analysis of Emerging Contaminants of Municipal and Industrial Origin. *Hdb Env Chem Vol. 5, Part S/1: 37–104*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Gros, M., Petrović, M., Barceló, D. 2006. 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*, Vol. 70, pp. 678-690.

Gross, B., Montgomery-Brown, J., Naumann, A., Reinhard, M., 2004. Occurrence and fate of pharmaceuticals and alkylphenol ethoxylate metabolites in an effluent-dominated river and wetland. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 2074-2083.

Heberer, T., 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol. Lett.* 131, 5-17.

Haberl, R., Grego, S., Langergraber, G., Kadlec, R. H., Cicalini, A. R., Martins-Dias, S., Novais, J. M., Aubert, S., Gerth, A., Thomas, H., Hebner, A., 2003. Constructed Wetlands for the Treatment of Organic Pollutants. *J. Soil Sediment.* 3, 109-124.

Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H. C., Jørgensen, S. E., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. *Chemosphere* 36, 357-393.

Hernando, M. D., Mezcuca, M., Fernández-Alba, A. R., Barceló, D., 2006. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* 69, 334-342.

Imfeld, G., Braeckevelt, M., Kusch, P., Richnow, H. H., 2009. Monitoring and assessing processes of organic chemicals removal in constructed wetlands. *Chemosphere* 74, 349-362.

Jones, O. A. H., Voulvoulis, N., Lester, J. N., 2001. Human pharmaceuticals in the aquatic environment - A review. *Environ. Technol.* 22, 1383-1394.

Jones, O. A. H., Voulvoulis, N., Lester, J. N., 2005. Human Pharmaceuticals in Wastewater Treatment Processes. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 35, 401-427.

Kaale, E., Chambuso, M., Kitwala, J., 2008. Analysis of residual oxytetracycline in fresh milk using polymer reversed-phase column *Food chemistry*, Vol. 107, pp. 1289-1293.

Kadlec, R. H., Wallace, S. D., 2009. *Treatment Wetlands*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Kang, J., Hick, L. A., Price, W. E., 2007. Using calibration approaches to compensate for remaining matrix effects in quantitative liquid chromatography/electrospray ionization multistage mass spectrometric analysis of phytoestrogens in aqueous environmental samples. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 4065-4072.

Kemper, N., 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological indicators*, Vol. 8, pp. 1-13.

Khetan, S. K., Collins, T. J., 2007. Human pharmaceuticals in the aquatic environment: A challenge to green chemistry. *Chem. Rev.* 107, 2319-2364.

Kim, S., Aga, D. S., 2007. Potential Ecological and Human Health Impacts of Antibiotics and Antibiotic-Resistant Bacteria from Wastewater Treatment Plants. *J. Toxicol. Env. Health-Pt b-Crit. Rev.* 10, 559-573.

Kishida, K., 2007. Quantitation and confirmation of six sulphonamides in meat by liquid chromatography-mass spectrometry with photodiode array detection. *Food Control* 18, 301-305.

Kloepfer, A., Quintana, J. B., Reemtsma, T., 2005. Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples. *J. Chromatogr. A* 1067, 153-160.

Kümmerer, K., 2001. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - a review. *Chemosphere* 45, 957-969.

Kümmerer, K., 2008. *Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Kümmerer, K., 2009a. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part II. *Chemosphere* 75, 435-441.

Kümmerer, K., 2009b. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use - present knowledge and future challenges. *J. Environ. Manage.* In Press, Corrected Proof.

Low, D., Tan, K., Anderson, T., Cobb, G. P., Liu, J., Jackson, W. A., 2008. Treatment of RDX using down-flow constructed wetland mesocosms. *Ecol. Eng.* 32, 72-80.

Mamani, M. C. V., Farfán, J. A., Reyes Reyes, F. G., Rath, S., 2006, Simultaneous determination of tetracyclines in pharmaceuticals by CZE using experimental design, *Talanta*, Vol. 70, pp. 236-243.

Manhita, A. C., Teixeira, D. M., da Costa, C. T., 2006. Application of sample disruption methods in the extraction of anthocyanins from solid or semi-solid vegetable samples. *J. Chromatogr. A* 1129, 14-20.

Matamoros, V., Arias, C., Brix, H., Bayona, J. M., 2007a. Removal of Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) from Urban Wastewater in a Pilot Vertical Flow Constructed Wetland and a Sand Filter. *Environ. Sci. Technol.* 41, 8171-8177.

Matamoros, V., Arias, C., Brix, H., Bayona, J. M., 2009. Preliminary screening of small-scale domestic wastewater treatment systems for removal of pharmaceutical and personal care products. *Water Res.* 43, 55-62.

Matamoros, V., Bayona, J. M., 2006. Elimination of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Subsurface Flow Constructed Wetlands. *Environ. Sci. Technol.* 40, 5811-5816.

Matamoros, V., Caselles-Osorio, A., García, J., Bayona, J. M., 2008a. Behaviour of pharmaceutical products and biodegradation intermediates in horizontal subsurface flow constructed wetland. A microcosm experiment. *Sci. Total Environ.* 394, 171-176.

Matamoros, V., Garcia, J., Bayona, J. M., 2005. Behavior of selected pharmaceuticals in subsurface flow constructed wetlands: A pilot-scale study. *Environ. Sci. Technol.* 39, 5449-5454.

Matamoros, V., García, J., Bayona, J. M., 2008b. Organic micropollutant removal in a full-scale surface flow constructed wetland fed with secondary effluent. *Water Res.* 42, 653-660.

Matamoros, V., Puigagut, J., García, J., Bayona, J. M., 2007b. Behavior of selected priority organic pollutants in horizontal subsurface flow constructed wetlands: A preliminary screening. *Chemosphere* 69, 1374-1380.

Matsui, Y., Ozu, T., Inoue, T., Matsushita, T., 2008. Occurrence of a veterinary antibiotic in streams in a small catchment area with livestock farms. *Desalination*, Vol. 226, pp. 215–221.

Maurer, M., Escher, B. I., Richle, P., Schaffner, C., Alder, A. C., 2007. Elimination of beta-blockers in sewage treatment plants. *Water Res.* 41, 1614-1622.

Miao, X., Bishay, F., Chen, M., Metcalf, C. D., 2004. Occurrence of Antimicrobials in the Final Effluents of Wastewater Treatment Plants in Canada. *Environ. Sci. Technol.*, 38, 3533-3541.

Miège, C., Choubert, J. M., Ribeiro, L., Eusèbe, M., Coquery, M., 2009. Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants - Conception of a database and first results. *Environ. Pollut.* 157, 1721-1726.

Miller, J. N., Miller, J. C., 2000. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Prentice Hall, Harlow, UK.

Moore, M. T., Cooper, C. M., Smith, S., Cullum, R. F., Knight, S. S., Locke, M. A., Bennett, E. R., 2009. Mitigation of two pyrethroid insecticides in a Mississippi Delta constructed wetland. *Environ. Pollut.* 157, 250-256.

Nikolaou, A., Meric, S., Fatta, D., 2007. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1225-1234.

Park, N., Vanderford, B. J., Snyder, S. A., Sarp, S., Kim, S. D., Cho, J., 2009. Effective controls of micropollutants included in wastewater effluent using constructed wetlands under anoxic condition. *Ecol. Eng.* 35, 418-423.

Petrovic, M., Barceló, D., 2007. *Analysis, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands.

Reig, M., Mora, L., Navarro, J. L., Toldra, F., 2006. A chromatography method for the screening and confirmatory detection of dexamethasone. *Meat Science*, Vol. 74, pp. 676-680.

Rousseau, D. P. L., Lesage, E., Story, A., Vanrolleghem, P. A., De Pauw, N., 2008. Constructed wetlands for water reclamation. *Desalination*, Vol. 218, pp. 181-189.

Sachan, N. P., Gupta, C. M., 1980. Electroanalytical studies of complexes of tetracyclines with Cd(II), Pb(II) and Cu(II). *Talanta*, Vol. 27, pp. 457-459.

Santos, J. L., Aparicio, I., Alonso, E., 2007. Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater treatment plants. A case study: Seville city (Spain). *Environ. Int.* 33, 596-601.

Scholz, M., Lee, B. H., 2005. Constructed wetlands: a review. *Int. J. Environ. Stud.* 62, 421-447.

Schwab, B. W., Hayes, E. P., Fiori, J. M., Mastrocco, F. J., Roden, N. M., Cragin, D., Meyerhoff, R. D., D'Aco, V. J., Anderson, P. D., 2005. Human pharmaceuticals in US surface waters: A human health risk assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 42, 296-312.

Smyrniotakis, C. G. e Archontaki, H. A. 2007. C18 columns for the simultaneous determination of oxytetracycline and its related substances by reversed-phase high performance liquid chromatography and UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* , Vol. 43, pp. 506-514.

Stamatelatou, K., Frouda, C., Fountoulakis, M. S., Drillia, P., Kornaros, M., Lyberatos, G., 2003. Pharmaceuticals and health care products in wastewater effluents: the example of carbamazepine. *Water Recycl. Mediterr. Reg.* 3, 131-137.

Stottmeister, U., Wiessner, A., Kusch, P., Kappelmeyer, U., Kastner, M., Bederski, O., Muller, R. A., Moormann, H., 2003. Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnol. Adv.* 22, 93-117.

Sundaravadivel, M., Vigneswaran, S., 2001. Constructed wetlands for wastewater treatment. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 31, 351-409.

Tang, X., Eke, P. E., Scholz, M., Huang, S., 2009. Processes impacting on benzene removal in vertical-flow constructed wetlands. *Bioresour. Technol.* 100, 227-234.

Teixeira, D. M., Costa, C. T., 2005. Novel methods to extract flavanones and xanones from the root bark of *Maclura pomifera*. *J. Chromatogr. A* 1062, 175-181.

Ternes, T. A., 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* 32, 3245-3260.

USEPA, USDA-NRCS, 1995. *A Handbook of Constructed Wetlands. Volume 1: General Considerations.*

USGS – Toxic Substances Hydrology Program. *Emerging Contaminants*. <http://toxics.usgs.gov/regional/emc/index.html>, Acesso em: Março de 2010.

Valverde, R. S., Pérez, I. S., Franceschelli, F., Galera, M. M., García, M. D. G., 2007. Determination of photoirradiated tetracyclines in water by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection based reaction of rhodamine B with cerium (IV). *Journal of Chromatography A*, Vol. 1167, pp. 85-94.

Vanderford, B. J., Pearson, R. A., Rexing, D. J., Snyder, S. A., 2003. Analysis of endocrine disruptors, pharmaceuticals, and personal care products in water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 75, 6265-6274.

Vieno, N. M., Harkki, H., Tuhkanen, T., Kronberg, L., 2007b. Occurrence of Pharmaceuticals in River Water and Their Elimination in a Pilot-Scale Drinking Water Treatment Plant. *Environ. Sci. Technol.* 41, 5077-5084.

Vieno, N. M., Tuhkanen, T. e Kronberg, L., 2006. Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1134, pp. 101-111.

Vymazal, J., 2009. The use constructed wetlands with horizontal sub-surface flow for various types of wastewater. *Ecological Engineering*, Vol. 35, pp. 1–17.

Vymazal, J., Brix, H., Cooper, P. F., Green, M. B., Haberl, R., 1998. *Constructed wetlands for wastewater treatment in Europe*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.

Wang, L., Yang, H., Zhang, C., Mo, Y., Lu, X., 2008. Determination of oxytetracycline, tetracycline and chloramphenicol antibiotics in animal feeds using subcritical water extraction and high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 619, pp. 54–58.

Williams, J. B., 2002. Phytoremediation in wetland ecosystems: Progress, problems, and potential. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21, 607-635.

Zhang, Q., Li, X., 2007. Pharmacokinetics and residue elimination of oxytetracycline in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* *Aquaculture*, Vol. 272, pp. 140- 145.

Zhang, Z. L., Zhou, J. L., 2007. Simultaneous determination of various pharmaceutical compounds in water by solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1154, 205-213.

Zorita, S., Mårtensson, L., Mathiasson, L., 2009. Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. *Sci. Total Environ.* 407, 2760-2770.

Zuccato, E., Castiglioni, S., Fanelli, R., 2005. Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* 122, 205-209.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Anexo A

A. Métodos Analíticos

A.1. Métodos analíticos para a determinação de fármacos em amostras ambientais

A análise de fármacos em amostras biológicas e ambientais requer procedimentos analíticos altamente selectivos e sensíveis para a sua detecção e quantificação, dada a baixa concentração ambiental destes compostos ($\mu\text{g-ng L}^{-1}$) (Hao, *et al.*, 2007; Dordio, *et al.*, 2009a). A análise de fármacos em amostras ambientais compreende basicamente as etapas de preparação da amostra (extracção e pré-concentração do analito, eliminação de interferentes), separação, detecção e quantificação.

A.1.1. Preparação de amostras

Este procedimento, consiste essencialmente na conversão de uma matriz complexa numa amostra adequada para análise, provocando modificações nas interacções químicas do composto com o meio em que se encontra (Tura e Robards, 2002; Robards e Antolovich, 1997). Estas interacções afectam a aplicabilidade de diferentes técnicas para preparação de amostras e os métodos analíticos, bem como a sua eficiência e reprodutibilidade. Assim, para a preparação das amostras, é muito importante ter informações sobre as propriedades físicas e químicas do analito (Reemtsma e Quintana, 2006; Pavlovic *et al.*, 2007, Dordio, 2010).

A maioria dos fármacos tem carácter ácido e/ou básico e a sua taxa de ionização depende da constante de acidez (valores do pKa) e é controlada pelo pH da solução. Com este conhecimento, pode-se escolher as melhores condições para a extracção dos fármacos, por exemplo, o valor do pKa permite o ajuste do valor de pH da solução da amostra. Parâmetros como o $\log K_{ow}$ mostram também a afinidade dos compostos para a água ou meios apolares (Reemtsma e Quintana, 2006; Pavlovic, *et al.*, 2007).

A preparação da amostra pode ser conseguida utilizando uma grande variedade de técnicas, mas todos os métodos têm os mesmos objectivos principais (Smith, 2003; Pavlovic, *et al.*, 2007):

- remover potenciais interferências;
- aumentar a concentração de um analito;
- se necessário, converter um analito numa forma mais apropriada para a análise;
- obter um método robusto e reprodutivo que seja independente das variações na matriz da amostra.

A preparação da amostra deve também ser ajustada à análise final, considerando os métodos de quantificação e/ou identificação a usar e o grau de exactidão requerido, tanto quantitativo como qualitativo. Dado que a maioria dos fármacos estão presentes no ambiente em concentrações muito reduzidas, a utilização de técnicas que possibilitem a pré-concentração dos analitos é indispensável. Além disso, a selecção do procedimento a usar está dependente do tipo de matriz (líquida ou sólida) em que se encontram os analitos (Buchberger, 2007).

A.1.1.1. Extracção de fármacos de amostras aquosas

A extracção de fármacos de amostras aquosas (como águas superficiais ou residuais) deve ser o mais selectiva possível, de forma a minimizar a extracção de compostos da matriz que possam interferir na detecção do analito de interesse. O efeito de matriz pode ser definido como a influência das propriedades da amostra, sem a presença do analito, na eficiência de recuperação, e consequentemente, na quantidade desta extraída. Por exemplo, os fármacos podem adsorver a matéria orgânica presente nas amostras, fazendo com que a concentração detectada seja inferior à concentração real presente na amostra.

Extracção em fase sólida (SPE)

A extracção em fase sólida (SPE) é uma das técnicas de extracção mais usadas na preparação de amostras aquosas e tem sido muito utilizada na extracção e pré-concentração de fármacos ambientais em águas contaminadas (Hennion, 1999; Radjenovic, *et al.*, 2007; Fatta, *et al.*, 2007; Kostopoulou e Nikolaou, 2008). É um

método rápido, que requer baixo volume de solvente orgânico, apresenta uma boa selectividade, baixo risco de contaminação, pode ser usado em série e tem capacidade de automatização (Diaz-Cruz, *et al.*, 2003).

De um modo geral, a técnica pode ser descrita como um procedimento de preparação de amostra que recorre a um material sólido para a retenção de compostos específicos de uma solução. A retenção acontece por passagem da solução a analisar através de uma fase sólida porosa finamente dividida e contida numa pequena coluna, cartucho ou disco. Os compostos retidos podem depois ser libertados utilizando um eluente (Moldoveanu e David, 2002). É assim uma técnica vulgarizada, utilizada para extracção, concentração e limpeza do(s) analito(s) com interesse em diversos tipos de matrizes.

O manuseamento desta técnica, consiste num conjunto de passos que normalmente tem início na escolha do formato e capacidade do dispositivo para SPE, relacionada com o volume da amostra, selecção e quantidade (50-1000 mg) do enchimento adequado à natureza do meio e à retenção completa do(s) analito(s) em estudo. Um factor determinante na selecção e quantidade do enchimento é o volume de breakthrough durante a preparação das amostras, relacionado com a ineficiente retenção dos analitos ou com fenómenos de saturação do enchimento quando são eluídos grandes volumes de amostra, com o consequente prejuízo nas respectivas recuperações. Os actuais tipos de enchimentos sólidos devem ser assim seleccionados de acordo com os mecanismos de retenção pretendidos, podendo genericamente ser classificados como apolares (ex. octadecil, octil, fenil, etc.), polares (ex. cianopropil, diol, etc.), de troca-iónica (ex. trimetilaminopropil, carboximetil, etc.), adsorção (ex. sílica-gel, florisil, carvão grafitizado, etc.), covalentes (ex. ác. fenilborónico) ou múltiplos, baseados na interacção analito/enchimento ou somente na natureza do(s) analito(s) em estudo. Existem no mercado dois formatos de dispositivos ou invólucros para implementar a SPE, nomeadamente, em cartucho de polipropileno ou vidro e em disco, possuindo este último enchimento com tamanho de partícula inferior, genericamente compreendido entre 8 e 40 μm . Esta característica proporciona uma maior capacidade de retenção dos analitos alvo e consequentemente, maior reprodutibilidade com redução do tempo analítico quando são utilizados grandes volumes de amostra (Almeida, *et al.*, 2004).

As colunas utilizadas nas extracções realizadas neste trabalho foram as seguintes:

- Coluna LiChrolut® RP-18:

A extracção em fase sólida usando colunas LiChrolut® RP-18 é um método de preparação de amostra fiável para extrair selectivamente compostos de amostras complexas. Estão disponíveis adsorventes diferentes para fazer uma extracção em fase sólida não-polar: LiChro-lut® RP-18 *endcapped* e LiChrolut® RP-18. Os cartuchos LiChrolut® RP-18 são mais adequados para extrair compostos mais fortemente polares, enquanto os cartuchos LiChrolut® RP-18 *endcapped* são mais adequados para compostos não-polares na mesma amostra complexa.

Os cartuchos LiChrolut® EN foram desenvolvidos especialmente para aplicar nas análises ambientais, onde por um lado, existem amostras muito contaminadas e por outro, onde tem de ser analisados compostos orgânicos muito polares. Devido à sua superfície específica elevada (aproximadamente 1,200 m²/g de acordo com o método BET) a sua capacidade de adsorção substâncias orgânicas polares, como por exemplo, triazinas, compostos fenilureia, ácidos fenoxicarboxílicos, fenóis, compostos aromáticos azotados e anilinas é excelente.

Em comparação com os cartuchos LiChrolut® RP-18, os LiChrolut® EN tem uma capacidade 10x mais elevada. Assim, apenas 200 mg de adsorvente é suficiente para fazer extracções reproduzíveis e com taxas de recuperação elevadas. Os cartuchos LiChrolut® EN oferecem assim algumas vantagens: uso de solventes orgânicos comuns, soluções tampão, ácidos e bases dentro de todo o intervalo de pH; baixo consumo de solventes, é necessário uma pequena quantidade de solvente para condicionar e eluir o cartucho; diminuição do tempo necessário, uma vez que uma menor quantidade de adsorvente requer um menor tempo de condicionamento e de secagem; melhora a análise, uma menor quantidade de adsorvente para eluição leva a um menor grau de contaminação e a um aumento da sensibilidade da detecção.

➤ Colunas Oasis HLB Waters

Os cartuchos Oasis HLB Waters possuem um adsorvente equilibrado hidrofílico-lipofílico de fase reversa que permite extrair, de uma forma geral, todos os compostos de polaridades diferentes (ex. drogas e seus metabolitos polares). Em muitos dos métodos analíticos descritos na literatura, os compostos-alvo são analisados por um método multi-resíduo em simultâneo com outros medicamentos (muitas vezes com características físico-químicas diferentes). Esta análise simultânea de vários grupos de compostos geralmente exige um compromisso na selecção das condições experimentais,

no entanto, nem sempre significa a obtenção do melhor desempenho para cada um dos compostos. O potencial dos polímeros com ligações cruzadas, cartuchos Oásis® HLB (HLB) (equilíbrio hidrofílico-lipofílico), para extracção ácida, neutra e de compostos básicos de água, ao longo de um vasto leque de valores de pH, têm sido amplamente empregues. Este adsorvente oferece as melhores condições para a extracção dos compostos com uma vasta gama de polaridade. No entanto, para este tipo de análise, pode-se esperar algumas dificuldades (por exemplo, a mais baixa retenção de compostos polares) (Hernando, *et al.*, 2007b).

➤ **Waters SEP-PAK VAC**

Os produtos Sep-Pak®C₁₈ são usados para adsorver analitos que possuam uma hidrofobicidade fraca em soluções aquosas. São aplicados para amostras de drogas e seus metabolitos no serum, plasma ou urina, compostos orgânicos traço em amostras de água ambientais e ácidos orgânicos em bebidas. Tem um comportamento idêntico às colunas de fase reversa de HPLC.

Após escolha do tipo de enchimento, formato e dimensão do dispositivo para SPE, pode então dar-se início ao processo. O primeiro passo consiste no condicionamento do enchimento com a finalidade de o activar, sendo determinado pela natureza do analito, aplicando-se o princípio de "polar dissolve polar". Este passo permite a solvatação/desdobramento das cadeias alquilo da sílica, que se encontram inicialmente envolvidas entre si (Dean, 1998). Num segundo passo, a amostra cujo volume pode ser de alguns mililitros até algumas centenas de mililitros, é adicionada ao dispositivo de SPE podendo ainda ser vantajoso o controlo do pH ou da força iónica para a retenção mais efectiva do(s) analito(s) alvo no enchimento seleccionado. No caso de volumes significativos, a aplicação de vácuo torna-se numa ferramenta indispensável, sendo necessário controlar a velocidade do fluxo uma vez a mesma poder influenciar o fenómeno de retenção associado. Um terceiro passo é implementado para limpeza do enchimento com recurso a solventes adequados, no sentido de remover potenciais interferentes indesejáveis.

Após secagem, um quarto e último passo é implementado com o intuito de eluir ou remover os compostos alvo retidos no enchimento, sendo seleccionado um solvente com polaridade adequada, cujo volume pode ir de algumas centenas de microlitros a alguns mililitros, consoante o teor e as características de polaridade do(s) analito(s)

envolvido(s). Para uma melhor e mais eficiente eluição, é recomendado que o solvente eleito interaja com o enchimento durante um tempo mínimo necessário.

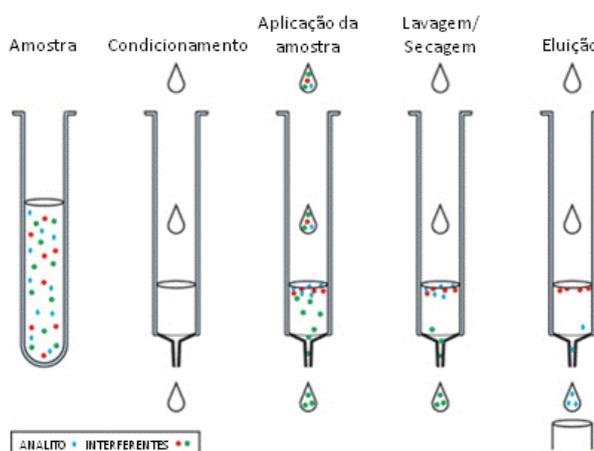


Figura A.1 – Principais passos associados à extração em fase sólida (Adaptado de Biotage, 2006)

Após concentração para eliminação do solvente no sentido de baixar os limites de detecção do(s) analito(s) em estudo, parte do extracto é então introduzido no sistema cromatográfico com recurso a microseringas (Almeida, *et al.*, 2004). A Figura A.1 ilustra os principais passos anteriormente enunciados para extração em fase sólida.

A técnica de SPE é uma técnica analítica muito poderosa quer do ponto de vista da selectividade quer mesmo da sensibilidade, muito versátil, combinando extração com limpeza e concentração de amostras líquidas, relativamente rápida, de baixo custo e que possibilita automatização *on-line* com instrumentação cromatográfica. Apresenta ainda a particularidade dos cartuchos ou discos poderem ser reutilizados em sistemas nos quais as amostras não sejam demasiado sujas.

A.1.1.2. Extração de fármacos de amostras sólidas

Os métodos clássicos de extração, como SLE (extração sólido líquido) ou a extração por *Soxhlet*, envolvem o uso de elevadas quantidades de solventes e a posterior concentração da amostra. Estes métodos, além de muito exaustivos e demorados, têm a desvantagem adicional de consumir grandes quantidades de solventes, que normalmente não são depois reutilizados. Estes procedimentos implicam,

além de um elevado custo, consequências elevadas para o meio ambiente (Reemtsma e Quintana, 2006).

Nos últimos anos têm sido realizados esforços no sentido do desenvolvimento de novos métodos de extracção que permitam uma maior rapidez de execução, optimização da quantificação (i.e. recuperações maiores, melhor reprodutibilidade e limites de detecção o mais baixos possível) e que consumam menor quantidade de solventes (Reemtsma e Quintana, 2006; Kristenson, *et al.*, 2006).

Dispersão de matriz em fase sólida (MSPD - *Matrix Solid Phase Dispersion*)

Dispersão da matriz em fase sólida é uma estratégia de preparação da amostra amplamente aplicada a sólidos, semi-sólidos ou amostras viscosas, incluindo tecidos de animais e alimentos com alto teor lipídico. O processo consiste na mistura da matriz para um suporte sólido, permitindo a ruptura da matriz celular e a subsequente extracção de analitos alvo por meio de um solvente de eluição adequado (Capriotti, *et al.*, 2010).

Mesmo que o MSPD tenha muitas características em comum com o SPE clássico (isto é, a distribuição das substâncias no material depende das interacções entre o solvente e suporte sólido, da dispersão de componentes da matriz da amostra, e dos solventes de eluição, bem como a dimensão molecular dos analitos), o mecanismo que rege os dois processos é bastante diferente. Seja qual for o mecanismo exacto, a selectividade do MSPD, depende estritamente tanto da natureza do material adsorvente como do solvente de eluição usado (Baker, *et al.*, 1989).

Esta técnica foi primeiramente desenvolvida e aplicada por Baker, *et al.* (1989, 1993, 2000 e 2007) em diferentes matrizes, tendo sido descrita por este, de uma forma bastante exhaustiva e em que foram enumeradas as aplicações da MSPD para o isolamento de uma variedade de classes de analitos, tais como medicamentos, pesticidas, bifenilos policlorados, antibióticos e anti-bacterianos, agentes activos (surfactantes) e compostos naturais, em diferentes tipos de matrizes (principalmente de origem animal, mas também plantas e amostras ambientais), apontando a atenção sobre o desempenho e as vantagens do MSPD sobre outras técnicas adequadas para extracção de amostras sólidas ou semi-sólidas.

As principais vantagens da extracção por MSPD são: requer apenas pequenas quantidades de amostra e solventes, é rápida, barata, e pode ser realizada em condições pouco exigentes (temperatura ambiente e pressão atmosférica) proporcionando

rendimento aceitável e selectividade. Além disso, a flexibilidade e versatilidade de MSPD permite a aplicação do processo a uma ampla variedade de analitos e matrizes biológicas e ambientais. Na verdade, MSPD demonstrou a sua viabilidade, não só para amostras sólidas ou semi-sólidas, mas também para amostras mais viscosas (leite, sangue, etc.) Por estas razões, o emprego de MSPD, introduzido pela primeira vez em 1989, ainda tem crescido nos últimos anos (Capriotti, *et al.*, 2010).

A dispersão de matriz em fase sólida combina tanto a homogeneização da amostra, assim como a limpeza preliminar do composto de interesse. Esta técnica é baseada na mistura da amostra com um suporte sólido de material abrasivo (normalmente sílica e areia), envolvendo um volume relativamente pequeno de solvente. A selectividade do método MSPD depende da utilização de uma combinação óptima adsorvente/solvente. Os adsorventes mais utilizados são materiais como sílicas derivatizadas particularmente C18. A sílica C18 (sílica octadecil) age como material abrasivo, produzindo corte e trituração e induz as forças que provocam a ruptura da estrutura da amostra. Os solventes de eluição auxiliam na completa ruptura e disrupção da amostra (Bogialli, *et al.*, 2005).

Actualmente, outros materiais têm sido usados como suportes sólidos, como a areia (*Sea sand disruption method - SSDM*) (Michael e Buszewski, 2004; Bogialli, *et al.*, 2004; Bogialli, *et al.*, 2003; Morzycka, 2002; Perret, *et al.*, 2002; Teixeira, *et al.*, 2005). Este método tem a vantagem de utilizar material abrasivo mais barato e tem sido aplicado para extracção de compostos fenólicos em plantas (Teixeira, *et al.*, 2006; Barker, 2007).

A preparação das amostras por MSPD consiste, essencialmente, em: colocar a amostra num almofariz e macerar juntamente com o suporte sólido, até atingir a homogeneização e dispersão completa da amostra no suporte sólido; após a homogeneização da mistura amostra-suporte sólido, esta é transferida para uma coluna vazia ou para uma coluna de SPE. A coluna é normalmente uma seringa normal ou um cartuxo, contendo um filtro de papel. Antes de proceder à compressão do material, com o êmbolo da seringa, um segundo filtro é colocado no topo. A eluição pode ser realizada de duas formas: os analitos de interesse são retidos na coluna e os compostos interferentes são eluídos com um primeiro solvente, sendo depois os compostos de interesse extraídos com um solvente diferente; ou então, os interferentes de matriz são retidos selectivamente na coluna, e os compostos que se pretendem extrair são eluídos

directamente com um solvente apropriado (Kristenson, *et al.*, 2006). Finalmente, se necessário, a amostra é filtrada, sendo posteriormente analisada (Figura A.2).

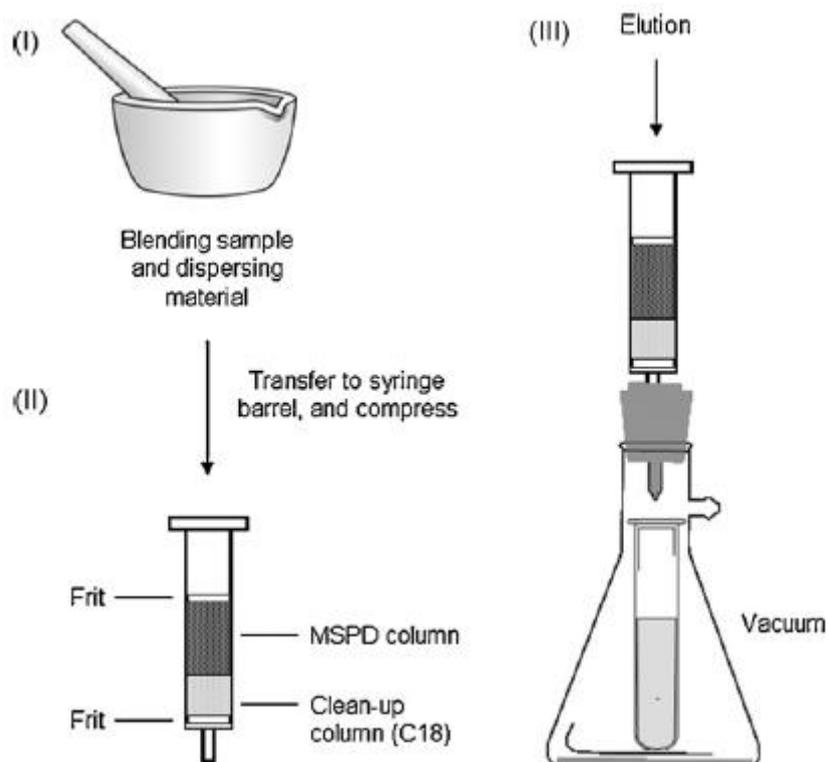


Figura A.2 – Passos de uma típica extração por MSPD. Etapas: (I) a amostra é misturada com o material dispersante, ou suporte sólido, num almofariz com um pilão; (II) o pó homogeneizado é transferido para uma seringa/cartucho; (III) eluição com solvente ou uma mistura adequada de solvente, é realizada com a ajuda de uma bomba de vácuo. (adaptado de Capriotti, *et al.*, 2010)

Existem vários factores a considerar na extração por MSPD, tais como: o efeito da dimensão média das partículas (partículas muito pequenas levam a um aumento do tempo de eluição e há necessidade de aumentar o fluxo ou pressão para obter um fluxo adequado); o tipo de suporte sólido; o melhor rácio de amostra para o suporte sólido (a maioria dos procedimentos mistura 2g de suporte sólido com 0.5g de amostra); a modificação da matriz química; a escolha do melhor solvente de eluição e a sequência da sua aplicação na coluna; o volume de eluição e o efeito da própria matriz na amostra (Barker, 2000).

Os extractos obtidos em MSPD estão geralmente prontos para análise, no entanto, em alguns casos são necessárias medidas adicionais para eliminar componentes da matriz (pode envolver um procedimento de SPE).

Neste trabalho recorreu-se à utilização de MSPD para extrair a OTC dos tecidos vegetais da *Phragmites australis*. Assim, utilizaram-se diferentes suportes sólidos: a

sílica C18 (MSPD) e a areia (SSDM). Esta última tem eficácias semelhantes ao MSPD e apresenta a vantagem de ser uma metodologia mais barata.

A.1.2. Detecção e quantificação dos fármacos por cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC)

A cromatografia é um método físico de separação em que os componentes a serem separados um do outro são distribuídos entre duas fases, uma das quais é estacionária (fase estacionária), enquanto a outra (a fase móvel) move-se numa direcção definida. Uma fase móvel é descrita como "um fluido que se infiltra através ou ao longo do leito fixo numa direcção definida" (Ardrey, 2003). Pode ser um gás, um gel ou um líquido. Se for um líquido, pode ser distribuído num sólido, que pode ou não contribuir para o processo de separação. Um sistema cromatográfico pode ser considerado como sendo composto por quatro componentes: um dispositivo para a introdução da amostra, a fase móvel, uma fase estacionária e um detector (Ardrey, 2003).

A detecção por HPLC é preferível à detecção por GC (Cromatografia gasosa) porque muitos fármacos, tais como as Tetraciclinas, são termolábeis.

Quanto aos detectores, não existe um que apresente todas as propriedades para que seja ideal para HPLC. Não são versáteis, ou universais, mas existem detectores que apresentam ampla faixa de aplicações. A sensibilidade de um detector é determinada a partir da relação entre o sinal produzido e a quantidade de amostra que gera este sinal. A linearidade é a faixa linear do sistema, onde o sinal do detector é directamente proporcional à concentração do soluto (Pinto, 2009).

A detecção por ultra-violeta (UV), espectrometria de massa (MS) e fluorescência, acopladas a HPLC, tem sido as técnicas mais usadas para a análise de drogas em matrizes ambientais sólidas e líquidas.

Inicialmente, a detecção por UV-Vis. foi bastante utilizada na análise de fármacos, mas tem vindo a ser gradualmente substituída pela detecção por espectrometria de massa. No entanto, apesar de sua maior sensibilidade e selectividade, a detecção por MS pode suscitar alguns problemas, como por exemplo devido do uso frequente de compostos não voláteis, tais como os ácidos oxálico ou cítrico, na fase móvel do LC para melhorar a resolução cromatográfica. Estas fases móveis, quando utilizadas em

HPLC-MS, podem causar o entupimento na interface e a acumulação de depósitos na fonte de iônica (Diaz-Cruz, *et al.*, 2003).

A espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida é uma técnica que combina sensibilidade e selectividade, o que a torna umas das técnicas de identificação e quantificação mais poderosas existentes no momento, além de atender à maioria das aplicações dentro da química ambiental, da indústria farmacêutica, de alimentos, entre outros. O desenvolvimento e optimização de métodos analíticos tendo como base a espectrometria de massa, para separação e identificação de compostos desconhecidos em matrizes complexas, de que se pode citar como exemplo a identificação de compostos orgânicos de arsénio e estanho em águas de estuários (Florêncio, *et al.*, 1997), de cloroanilinas e outros compostos emergentes poluentes, como os fármacos, em águas têm merecido interesse especial (Song, *et al.*, 2007; Matsui, *et al.*, 2008; Arikan, *et al.*, 2008; Chang, *et al.*, 2010; Gros, *et al.*, 2006; Kemper, 2008; Babić, *et al.*, 2006; Pailler, *et al.*, 2009).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, C., Rosário, P., Serôdio, P., and Nogueira, J. M. F. (2004). "Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica." *Química*, 95, 69-77.

Ardrey, R.E., 2003. *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An Introduction*. John Wiley & Sons, Chichester, UK.

Arikan, O. A., Rice, C., Codling, E., 2008. Occurrence of antibiotics and hormones in a major agricultural watershed. *Desalination*, Vol. 226, pp. 121–133.

Babić, S., Ašperger, D., Mutavdžić, D., Horvat, A. J. M., Kaštelan-Macan, M., 2006. Solid phase extraction and HPLC determination of veterinary pharmaceuticals in wastewater. *Talanta*, Vol. 70, pp. 732-738.

Barker, S.A., 2000. Matrix solid-phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, 885, 115-127.

Barker, S.A., 2007. Matrix solid phase dispersion (MSPD). *J. Biochem. Biophys. Methods* 70, 151-162.

Barker, S. A., Long, A. R., Short, C. R., 1989. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, 475, 353-361.

Barker, S.A., Long, A.R., Hines, M.E., 1993. Disruption and fractionation of biological materials by matrix solid-phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, 629, 23-34.

Biotage, 2006. "Analytical Sample Preparation Catalogue."

Bogialli, S., Bruno, M., Curini, R., Di Corcia, A., Lagana, A., Barbara, M., 2005. Simple assay for analyzing five microcystins and nodularin in fish muscle tissue: hot water extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, 53, 6586–92.

Bogialli, S., Bruno, M., Curini, R., Di Corcia, A., Nazzari, M., Samperi, R., 2003. A liquid chromatography-mass spectrometry assay for analyzing sulfonamide antibacterials in cattle and fish muscle tissues. *Anal Chem*, 75, 1798–804.

Bogialli, S., Capitolino, V., Curini, R., Di Corcia, A., Nazzari, M., Sergi, M., 2004. Simple and rapid liquid chromatography–tandem mass spectrometry confirmatory assay for determining amoxicillin and ampicillin in bovine tissues and milk. *J. Agric. Food. Chem.*, 52, 3286–91.

Buchberger, W. W., 2007. Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge. *Analytica Chimica Acta*, 593, 129-139.

Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Giansanti, P., Gubbiotti, R., Samperi, R., Lagana, A., 2010. Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2521–2532.

Chang, X. Meyer, M. T., Liu, X., Zhao, Q., Chen, H., Chen, J., Qiu, Z., Yang, L., Cao, J., Shu W., 2010. Determination of antibiotics in sewage from hospitals, nursery and

slaughter house, wastewater treatment plant and source water in Chongqing region of Three Gorge Reservoir in China. *Environmental Pollution*, Vol. 158, pp. 1444–1450.

Dean, J. R., 1998. "Solid phase extraction." In: *Extraction methods for environmental analysis*, John Wiley & Sons, West Sussex, 35-61.

Díaz-Cruz, M. S., López de Alda, M. J., Barceló, D., 2003. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 22, pp. 340-351.

Dordio, A., Pinto, J., Pinto, A. P., da Costa, C. T., Carvalho, A., Teixeira, D. M., 2009a. Atenolol removal in microcosm constructed wetlands. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* in press.

Dordio, A., Palace Carvalho, A. J., Teixeira, D. M., Dias, C. B., Pinto, A. P., 2010. Removal of pharmaceuticals in microcosm constructed wetlands using *Typha* spp. and LECA. *Bioresource Technology*, 101, 886–892.

Fatta, D., Nikolaou, A., Achilleos, A., Meric, S., 2007. Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. *Trac-Trends Anal. Chem.* 26, 515-533.

Florêncio, M. H., Duarte, M. F., Bettencourt, A. M., Gomes, M. L., Vilas Boas, L. F., 1997. Electrospray mass spectra of arsenic compounds. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 11, 469-473

Gros, M., Petrovic, M., Barceló, D., 2006a. Multi-residue analytical methods using LC-tandem MS for the determination of pharmaceuticals in environmental and wastewater samples: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 941-952.

Hao, C., Clement, R., Yang, P., 2007. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry of bioactive pharmaceutical compounds in the aquatic environment-a decade's activities. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1247-1257.

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

Hernando, M. D., Gómez, M. J., Agüera, A., Fernández-Alba, A. R., 2007b. LC-MS analysis of basic pharmaceuticals (beta-blockers and anti-ulcer agents) in wastewater and surface water. *TrAC – Trends Analytical Chemistry*, 26, 581-594.

Kemper, N., 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological indicators*, Vol. 8, pp. 1-13.

Kostopoulou, M., Nikolaou, A., 2008. Analytical problems and the need for sample preparation in the determination of pharmaceuticals and their metabolites in aqueous environmental matrices. *Trac-Trends Anal. Chem.* 27, 1023-1035.

Kristenson, E. M., Brinkman, U. A. T., Ramos, L., 2006. Recent advances in matrix solid-phase dispersion. *Trac-Trends Anal. Chem.* 25, 96-111.

Matsui, Y., Ozu, T., Inoue, T., Matsushita, T., 2008, Occurrence of a veterinary antibiotic in streams in a small catchment area with livestock farms, *Desalination*, Vol. 226, pp. 215–221.

Michel, M., Buszewski, B., 2004. Optimization of a matrix solid-phase dispersion method for the determination analysis of carbendazim residue in plant material. *J. Chromatogr. B* 800, 309-314.

Moldoveanu, S. C., e David, V., 2002. "Sorbent extraction." In: *Sample preparation in chromatography - Journal of Chromatography Library*, Vol. 65, Elsevier, Amsterdam, 341-373.

Morzycka, B., 2002. Simple method for the determination of trace levels of pesticides in honeybees using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *J. Chromatogr. A* 982, 267-273.

Pailler, J.-Y., Krein, A., Pfister, L., Hoffmann, L., Guignard, C., 2009. Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg. *Science of the Total Environment*, 407, 4736–4743

Pavlovic, D. M., Babic, S., Horvat, A. J. M., Kastelan-Macan, M., 2007. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. *Trac-Trends Anal. Chem.* 26, 1062-1075.

Perret, D., Gentili, A., Marchese, S., Sergi, M., D'Ascenzo, G., 2002. Validation of a method for the determination of multiclass pesticide residues in fruit juices by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after extraction by matrix solid-phase dispersion. *J. AOAC Int.* 85, 724-730.

Pinto, J., 2009. Avaliação da Eficiência de Remoção do Contaminante de Origem Farmacêutica Atenolol pela Planta *Phragmites australis* em Leitões Construídos de Macrófitas. Dissertação apresentada na Universidade de Évora para obtenção do grau de Mestre em Análises Químicas Ambientais. Évora.

Radjenovic, J., Petrovic, M., Barceló, D., 2007. Advanced mass spectrometric methods applied to the study of fate and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment. *Trac-Trends Anal. Chem.* 26, 1132-1144.

Reemtsma, T., Quintana, J. B., 2006. Analytical methods for polar pollutants, in: Reemtsma, T., Jekel, M. (Eds.), *Organic pollutants in the water cycle*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany.

Robards K. and Antolovich M: 1997. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. *Analyst*, 122 , 11R-34R.

Smith, R. M., 2003. Before the injection--modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography A*, 1000, 3-27.

Song, W., Huang, M., Rumbelha, W., Li, H., 2007. Determination of amprolium, carbadox, monensin, and tylosin in surface water by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21, 1944–1950.

Teixeira, D., Patão, R., Coelho, A., Costa, C., 2006. Comparison between sample disruption methods and solid–liquid extraction (SLE) to extract phenolic compounds from *Ficus carica* leaves. *Journal of Chromatography A*, 1103, 22-28.

Teixeira, D.M., Costa, C.T.d., 2005. Novel methods to extract flavanones and xanthenes from the root bark of *Maclura pomifera*. *Journal of Chromatography A*, 1062, 175-181.

Tura, D., Robards, K., 2002. Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. *Journal of Chromatography A*, 975, 71-93.

Anexo B

B. Fármacos no Ambiente

B. 1. Ocorrência de fármacos no ambiente

Os primeiros estudos de fármacos no ambiente datam da década de 70 e foram realizados por Garrison, *et al.* em 1976 e Hignite e Azarnoff em 1977. Estes detectaram a presença de ácido clofíbrico, metabolito activo do clofibrato e etofibrato, drogas extensamente usadas como reguladores lípidicos, em concentrações da ordem das $\mu\text{g L}^{-1}$ em efluentes urbanos nos Estados Unidos. Depois destes primeiros estudos foram realizadas várias pesquisas sobre a ocorrência de fármacos no meio hídrico em diversos países nomeadamente, o Brasil (Stumpf, *et al.*, 1999), Canadá (Lishman, *et al.*, 2006; Hão, *et al.*, 2006; Comeau, *et al.*, 2008), Reino Unido (Ashton, *et al.*, 2004; Zhang e Zhou, 2007; Kasprzyk-Hordern, *et al.*, 2008), França (Andreozzi, *et al.*, 2003; Rabiet, *et al.*, 2006; Leclercq, *et al.*, 2009), Alemanha (Ternes, 1998; Heberer, 2002; Weigel, *et al.*, 2004; Hernando, *et al.*, 2006b; Osenbrük, *et al.*, 2007), Grécia (Andreozzi, *et al.*, 2003; Koutsouba, *et al.*, 2003), Itália (Andreozzi, *et al.*, 2003; Zuccato, *et al.*, 2005), Espanha (Hernando, *et al.*, 2006b; Carballa, *et al.*, 2008; Kuster, *et al.*, 2008), Suécia (Andreozzi, *et al.*, 2003; Bendz, *et al.*, 2005; Zorita, *et al.*, 2009), E.U.A. (Stackelberg, *et al.*, 2004; Benotti e Brownawell, 2007; Palmer, *et al.*, 2008; Benotti, *et al.*, 2009), entre outros. Todos estes estudos demonstraram resultados preocupantes, pois estes compostos têm sido detectados nas mais diversas regiões do mundo, com condições hidrológicas e climatéricas muito distintas (Fent, *et al.*, 2006).

Os resíduos farmacêuticos mais comumente encontrados são apresentados na Tabela B.1, juntamente com a gama de concentrações reportada na literatura e o tipo de água onde são encontrados.

Tabela B.1 – Tipo e concentração de fármacos e seus metabolitos encontrados em amostras ambientais ($\mu\text{g L}^{-1}$).

Composto	Água superficial	Água subterrânea	Água potável	Efluentes de ETARs	Referências
Analgésicos e anti-inflamatórios					
Ibuprofeno	< 2	< 2	< 2	30	Lin, <i>et al.</i> , (2005)
	152	-	<12	6900	Hernando, <i>et al.</i> , (2006b)
	5850	-	510-1350	-	Loraine e Pettigrove, (2006)
	0.3-4.5	0.2-0.6	-	20-220	Rabiet, <i>et al.</i> , (2006)
	(28) 38	-	-	(65) 137	Kim, <i>et al.</i> , (2007)
	-	-	-	(0.8) 24.6	Miege, <i>et al.</i> , (2009)
	(22) 48	-	-	(236) 424	Kasprzyk-Hordern, <i>et al.</i> , (2009)
Cetoprofeno	30	< 2	< 2	< 2	Lin, <i>et al.</i> , (2005)
	< 26	-	< 26	< 75	Hernando, <i>et al.</i> , (2006a)
	2.8-15	2.8-15	-	20-1080	Rabiet, <i>et al.</i> , (2006)
	-	-	-	(0.21) 1.62	Miege, <i>et al.</i> , (2009)
Naproxeno	30	< 1	< 1	170	Lin <i>et al.</i> , (2005)
	70	-	-	630	Hernando, <i>et al.</i> , (2006a)
	(11) 18	-	-	(128) 483	Kim, <i>et al.</i> , (2007)
Diclofenac	-	< 2	< 2	< 2	Lin, <i>et al.</i> , (2005)
	72	< 7	-	1420	Hernando, <i>et al.</i> , (2006a)
	1.4-33	-	1.4-2.5	210-490	Rabiet, <i>et al.</i> , (2006)
	(3.0) 6.8	-	-	(40) 127	Kim, <i>et al.</i> , (2007)
Reguladores lipídicos do sangue					
Ácido clofíbrico	(66) 550	-	-	(360) 1600	Ternes, (1998)
	-	< 18	-	-	Sacher, <i>et al.</i> , (2001)
	35	-	< 17	107	Hernando, <i>et al.</i> , (2006a)
	(14.7) 118.5	-	-	-	Moder, <i>et al.</i> , (2007)
	-	-	-	(0.15) 0.23	Miege, <i>et al.</i> , (2009)
Gemfibrozil	(6.6) 9.1	-	-	(11.2) 17	Kim, <i>et al.</i> , (2007)
Bezafibrato	3100	-	-	(2200) 4600	Ternes, (1998)
	3100	-	-	-	Boxall, (2004)
	< 2	-	-	-	Hao, <i>et al.</i> , (2006)

Continuação Tabela B1

Composto	Água superficial	Água subterrânea	Água potável	Efluentes de ETARs	Referências
Beta-bloqueadores					
Atenolol	-	< 8.2	-	-	Sacher, <i>et al.</i> , (2001)
	10-60	-	-	160	Bendz, <i>et al.</i> , (2005)
	-	-	-	(0.15) 0.38	Miege, <i>et al.</i> , (2009)
	(63) 258	-	-	(2870) 7602	Kasprzyk-Hordern, <i>et al.</i> , (2009)
Metoprolol	-	-	-	10-390	Andreozzi, <i>et al.</i> , (2003)
	2.2	-	-	-	Boxall, (2004)
	30-70	-	-	190	Bendz, <i>et al.</i> , (2005)
Sotalol	-	560	-	-	Sacher, <i>et al.</i> , (2001)
Compostos neuroactivos					
Fluoxetina	1.7	-	-	-	Kim, <i>et al.</i> , (2007)
Carbamazepina	(250) 1100	-	-	(2100) 6300	Ternes, (1998)
	60-1500	-	258	-	Stackelberg, <i>et al.</i> , (2004)
	< 8	< 6	< 6	420 ^c	Lin, <i>et al.</i> , (2005)
	24.56	14-43	-	160-290	Rabiet, <i>et al.</i> , (2006)
	-	-	-	(0.52) 2.30	Miege, <i>et al.</i> , (2009)
(11) 27	-	-	(2499) 4596	Kasprzyk-Hordern, <i>et al.</i> , (2009)	
Cafeína	6	-	-	-	Boxall, (2004)
Antibióticos					
Sulfametoxazol	(20) 36	< 50	-	-	Stackelberg, <i>et al.</i> , (2004)
	10	-	-	70	Bendz, <i>et al.</i> , (2005)
	70	-	-	-	Weigel, <i>et al.</i> , (2004)
	-	-	-	(0.07) 0.32	Miège, <i>et al.</i> , (2009)
Ofloxacina	-	-	-	120-580	Andreozzi, <i>et al.</i> , (2003)
Tetracilina	280	-	-	-	Boxall, (2004)
	-	0,4	-	-	Krapac, <i>et al.</i> , (2005)
Ciprofloxacina	-	-	-	250	Zuccato, <i>et al.</i> , (2005)
Lincomicina	0.0211	-	-	-	Boxall, <i>et al.</i> , (2005)
Claritromicina	0.26	-	-	-	Kolpin, <i>et al.</i> , (2002)

Continuação Tabela B1

Composto	Água superficial	Água subterrânea	Água potável	Efluentes de ETARs	Referências
Eritromicina	0.0017	-	-	-	Hirsch, <i>et al.</i> , (1999)
Roxitromicina	0.56	-	-	-	Hirsch, <i>et al.</i> , (1999)
Tilosina	0.05	-	-	-	Ashton, <i>et al.</i> , (2004)
Sulfadiazina	0.00413	-	-	-	Boxall, <i>et al.</i> , (2005)
Sulfametazina		0.24	-	-	Hamscher, <i>et al.</i> , (2005)
Trimetoprim	0.02	-	-	-	Boxall, <i>et al.</i> , (2005)
Norfloxacina	0.12	-	-	-	Golet, <i>et al.</i> , (2001)
Oxitetraciclina	-	-	0.340	-	Bíla e Dezotti, (2003)
	0.032	-	-	-	Kay, <i>et al.</i> , (2005)
	0.007-0.338	-	-	-	Arikan, <i>et al.</i> , (2008)
	8.6-68	-	-	-	Matsui, <i>et al.</i> , (2008)
		0.0035	-	0.0041	Tong, <i>et al.</i> , (2009)
	0.10	-	-	0.07	Watkinson, <i>et al.</i> , (2009)
	-	-	-	0.015-0.041	Chang, <i>et al.</i> , (2010)
Clortetraciclina	0,69	-	-	-	Kolpin, <i>et al.</i> , (2002)

Existem já diversos artigos de revisão dedicados à ocorrência de fármacos nos diferentes compartimentos ambientais especialmente na água (Halling-Sørensen, *et al.*, 1998; Daughton e Ternes, 1999; Kümmerer, 2001; Jones, *et al.*, 2001; Heberer, 2002a; Fent, *et al.*, 2006; Petrovic e Barceló, 2007; Nikolaou, *et al.*, 2007; Khetan e Collins, 2007; Aga, 2008; Kümmerer, 2008; Kümmerer, 2009b). A maior parte dos compostos mais frequentemente são detectados em águas naturais e efluentes tratados pertencem às classes dos antibióticos, anti-inflamatórios, reguladores lipídicos ou beta-bloqueadores (Nikolaou, *et al.*, 2007; Aga, 2008; Miège, *et al.*, 2009).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andreozzi, R., Raffaele, M., Nicklas, P., 2003. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* 50, 1319-1330.

Aga, D. S., 2008. Fate of Pharmaceuticals in the Environment and in Water Treatment Systems. CRC Press, Boca Raton, FL.

Arikan, O. A., Rice, C., Codling, E., 2008. Occurrence of antibiotics and hormones in a major agricultural watershed. *Desalination*, Vol. 226, pp. 121–133.

Ashton, D., Hilton, M., Thomas, K. V., 2004. Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Sci. Total Environ.* 333, 167-184.

Bendz, D., Paxéus, N. A., Ginn, T. R., Loge, F. J., 2005. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Høje River in Sweden. *J. Hazard. Mater.* 122, 195-204.

Benotti, M. J., Brownawell, B. J., 2007. Distributions of Pharmaceuticals in an Urban Estuary during both Dry- and Wet-Weather Conditions. *Environ. Sci. Technol.* 41, 5795-5802.

Benotti, M. J., Trenholm, R. A., Vanderford, B. J., Holady, J. C., Stanford, B. D., Snyder, S. A., 2009. Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Compounds in U.S. Drinking Water. *Environ. Sci. Technol.* 43, 597-603.

Bila, D. M., Dezotti, M. (2003). Farmacos no meio ambiente. *Quim. Nova*, 26(4), 523-530.

Boxall, A. B. A. (2004). The environmental side effects of medication. *EMBO reports* 5 1110-1116.

Boxall, A. B. A., Fogg, L. A., Baird, D. J., Lewis, C., Telfer, T. C., Kolpin, D., Gravell, A., 2005. Targeted monitoring study for veterinary medicines in the UK environment. Final Report to the UK Environment Agency.

Carballa, M., Omil, F., Lema, J. M., 2008. Comparison of predicted and measured concentrations of selected pharmaceuticals, fragrances and hormones in Spanish sewage. *Chemosphere* 72, 1118-1123.

Chang, X., Meyer, M. T., Liu, X., Zhao, Q., Che, H., Chen, J., Qiu, Z., Yang, L., Cao, J., Shu, W., 2010. Determination of antibiotics in sewage from hospitals, nursery and slaughter house, wastewater treatment plant and source water in Chongqing region of Three Gorge Reservoir in China. *Environmental Pollution*, 158, 1444–1450.

Comeau, F., Surette, C., Brun, G. L., Losier, R., 2008. The occurrence of acidic drugs and caffeine in sewage effluents and receiving waters from three coastal watersheds in Atlantic Canada. *Sci. Total Environ.* 396, 132-146.

Daughton, C. G., Ternes, T. A., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environ. Health Perspect.* 107, 907-938.

Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76, 122-159.

Garrison, A. W., Pope, J. D., Allen, F. R., 1976. GC/MS analysis of organic compounds in domestic wastewaters, in: Keith, L.H. (Ed.), *Identification and Analysis of Organic Pollutants in Water*. Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, MI, USA, pp. 517-556.

Golet, E. M., Alder, A. C., Hartmann, A., Ternes, T. A., Giger, W., 2001. Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in solid-phase extraction urban wastewater by and liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Chem.* 73, 3632–3638.

Hamscher, G., Pawelzick, H.T., Hoper, H., Nau, H., 2005. Different behaviour of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilisation with liquid manure. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 861–868.

Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H.C., Jørgensen, S.E., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. *Chemosphere* 36, 357-393.

Hao, C.Y., Lissemore, L., Nguyen, B., Kleywegt, S., Yang, P., Solomon, K., 2006. Determination of pharmaceuticals in environmental waters by liquid chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 384, 505-513.

Heberer, T., 2002a. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol. Lett.* 131, 5-17.

Heberer, T., 2002b. Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *J. Hydrol.* 266, 175-189.

Hignite, C., Azarnoff, D. L., 1977. Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: Chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. *Life Sciences*, 20, 337-341.

Hernando, M. D., Heath, E., Petrovic, M., Barceló, D., 2006a. Trace-level determination of pharmaceutical residues by LC-MS/MS in natural and treated waters. A pilot-survey study. *Anal. Bioanal. Chem.* 385, 985-991.

Hernando, M.D., Mezcua, M., Fernández-Alba, A.R., Barceló, D., 2006b. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* 69, 334-342.

Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K.L., 1999. Occurrence of antibiotic in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.*, 225, 109-118.

Jones, O. A. H., Voulvoulis, N., Lester, J. N., 2001. Human pharmaceuticals in the aquatic environment - A review. *Environ. Technol.* 22, 1383-1394.

Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R. M., Guwy, A. J., 2008. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Res.* 42, 3498-3518.

Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R. M., Guwy, A. J., 2009. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Res.* 43, 363-380.

Kay, P., Blackwell, P.A., Boxall, A.B.A., 2005. Transport of veterinary antibiotics in overland flow following the application of slurry to arable land. *Chemosphere* 59, 951–959.

Khetan, S. K., Collins, T. J., 2007. Human pharmaceuticals in the aquatic environment: A challenge to green chemistry. *Chem. Rev.* 107, 2319-2364.

Kim, S. D., Cho, J., Kim, I. S., Vanderford, B. J., Snyder, S. A., 2007. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water Res.* 41, 1013-1021.

Kolpin, D., Furlong, E., Meyer, M., Thurman, E., Zaugg, S., Barber, L., Buxton, H., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202–1211.

Koutsouba, V., Heberer, T., Fuhrmann, B., Schmidt-Baumler, K., Tsipi, D., Hiskia, A., 2003. Determination of polar pharmaceuticals in sewage water of Greece by gas chromatography-mass spectrometry. *Chemosphere* 51, 69-75.

Kümmerer, K., 2001. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - a review. *Chemosphere* 45, 957-969.

Kümmerer, K., 2008. *Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks.* Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Kümmerer, K., 2009b. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use - present knowledge and future challenges. *J. Environ. Manage.* In Press, Corrected Proof.

Kuster, M., López de Alda, M.J., Hernando, M.D., Petrovic, M., Martín-Alonso, J., Barceló, D., 2008. Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *J. Hydrol.* 358, 112-123.

Leclercq, M., Mathieu, O., Gomez, E., Casellas, C., Fenet, H., Hillaire-Buys, D., 2009. Presence and Fate of Carbamazepine, Oxcarbazepine, and Seven of Their Metabolites at Wastewater Treatment Plants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 408-415.

Lin, W.C., Chen, H.C., Ding, W.H., 2005. Determination of pharmaceutical residues in waters by solid-phase extraction and large-volume on-line derivatization with gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1065, 279-285.

Lishman, L., Smyth, S. A., Sarafin, K., Kleywegt, S., Toito, J., Peart, T., Lee, B., Servos, M., Beland, M., Seto, P., 2006. Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogens by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada. *Sci. Total Environ.* 367, 544-558.

Loraine, G.A., Pettigrove, M.E., 2006. Seasonal variations in concentrations of pharmaceuticals and personal care products in drinking water and reclaimed wastewater in Southern California. *Environ. Sci. Technol.* 40, 687-695.

Matsui, Y., Ozu, T., Inoue, T., Matsushita, T., 2008. Occurrence of a veterinary antibiotic in streams in a small catchment area with livestock farms. *Desalination*, Vol. 226, pp. 215-221.

Miège, C., Choubert, J.M., Ribeiro, L., Eusèbe, M., Coquery, M., 2009. Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants - Conception of a database and first results. *Environ. Pollut.* 157, 1721-1726.

Moder, M., Braun, P., Lange, F., Schrader, S., Lorenz, W., 2007. Determination of endocrine disrupting compounds and acidic drugs in water by coupling of derivatization, gas chromatography and Negative Chemical ionization mass Spectrometry. *Clean-Soil Air Water* 35, 444-451.

Nikolaou, A., Meric, S., Fatta, D., 2007. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1225-1234.

Osenbrük, K., Gläser, H. R., Knöller, K., Weise, S. M., Möder, M., Wennrich, R., Schirmer, M., Reinstorf, F., Busch, W., Strauch, G., 2007. Sources and transport of selected organic micropollutants in urban groundwater underlying the city of Halle (Saale), Germany. *Water Res.* 41, 3259-3270.

Palmer, P. M., Wilson, L. R., O'Keefe, P., Sheridan, R., King, T., Chen, C. Y., 2008. Sources of pharmaceutical pollution in the New York City Watershed. *Sci. Total Environ.* 394, 90-102.

Petrovic, M., Barceló, D., 2007. Analysis, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle. Elsevier, Amsterdam, Netherlands.

Rabiet, M., Togola, A., Brissaud, F., Seidel, J. L., Budzinski, H., Elbaz-Poulichet, F., 2006. Consequences of Treated Water Recycling as Regards Pharmaceuticals and Drugs in Surface and Ground Waters of a Medium-sized Mediterranean Catchment. *Environ. Sci. Technol.* 40, 5282-5288.

Sacher, F., Lange, F.T., Brauch, H.J., Blankenhorn, I., 2001. Pharmaceuticals in groundwaters: Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *J. Chromatogr. A* 938, 199-210.

Stackelberg, P. E., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Zaugg, S. D., Henderson, A. K., Reissman, D. B., 2004. Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. *Sci. Total Environ.* 329, 99-113.

Stumpf, M., Ternes, T. A., Wilken, R. D., Silvana, V. R., Baumann, W., 1999. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Sci. Total Environ.* 225, 135-141.

Ternes, T.A., 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* 32, 3245-3260.

Tong, L., Li, P., Wang, Y., Zhu, K., 2009. Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. *Chemosphere*, 74, 1090–1097

Watkinson, A. J., Murby, E. J., Kolpin, D. W., Costanzo, S. D., 2009. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Science of the Total Environment*, 407, 2711-2723.

Weigel, S., Kallenborn, R., Hühnerfuss, H., 2004. Simultaneous solid-phase extraction of acidic, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1023, 183-195.

Zhang, Z. L., Zhou, J. L., 2007. Simultaneous determination of various pharmaceutical compounds in water by solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1154, 205-213.

Zorita, S., Mårtensson, L., Mathiasson, L., 2009. Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. *Sci. Total Environ.* 407, 2760-2770.

Zuccato, E., Castiglioni, S., Fanelli, R., 2005. Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* 122, 205-209.

Anexo C

C. Oxitetraciclina (OTC)

C.1. Informação geral

- **Nome IUPAC:** (4S,4aR,5S,5aR,6S,12aS)-4-(dimethylamino)-3,5,6,10,12,12a-hexahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydrotetracene-2-carboxamide
- Número de CAS: 79-57-2^a
- Fórmula molecular: C₂₂H₂₄N₂O₉
- Peso molecular (g mol⁻¹): 460,41
- Constante de Henry a 25°C (Pam³mol⁻¹): 1,7x10⁻²³ – 4,8x10⁻²²
- Constante de Ionização, pKa a 25°C: 4,5
- λ_{max} (absorção em água): 356 nm
- Solubilidade em água a 25°C (g L⁻¹): 0,2
- log K_{ow}: -1.22^b; -2.87^c

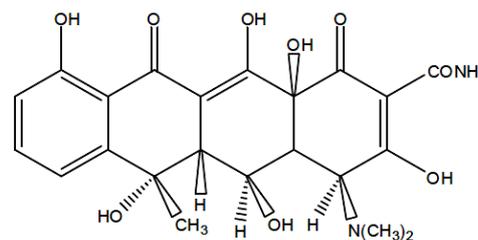


Figure A-1. Estrutura molecular da oxitetraciclina (adaptado de Li, et al. 2008)

^{a)} Pavlovic et al., (2007)

^{b)} Beausse, (2004)

^{c)} EPI Suite v3.12

A Oxitetraciclina (OTC) é um antibiótico da família das Tetraciclina (Mamani, *et al.*, 2006), é produzido por estirpes de *Streptomyces rimosus* e foi introduzida em 1950 (Kaale, *et al.*, 2008). A OTC pertence a um grande grupo de produtos clinicamente naturais e semisintéticos e é produzida industrialmente através da fermentação de *Streptomyces rimosus* (Maia, *et al.*, 2008). É dos mais comuns anti-microbianos utilizados na aquicultura, de acordo com um estudo de Lalumer (Díaz-Cruz, *et al.*, 2003). É o antibiótico mais utilizado na medicina veterinária com acção bacteriostático (Smyrniotakis e Archontaki, 2007). Os antibióticos bacteriostáticos actuam por inibição da síntese proteica dentro da célula bacteriana, sendo usados para controlar infecções bacterianas em seres humanos e animais (Maia, *et al.*, 2007). Este antibiótico é muito utilizado para tratar doenças em vários animais: vacas, aves, suínos, cães e gatos. Nas vacas é usado para tratar enterite, pneumonia, endometrite, septicemia, mastite, metrite e outras infecções bacterianas secundárias (Kaale, *et al.*, 2008). É também muito utilizado no tratamento infeccioso bacteriano na aquicultura. Tem sido utilizado para

efeitos imunossupressivos, mas os resultados de um estudo histológico indicam que pode causar danos hepáticos (Weifen, *et al.*, 2004).

A OTC é aplicada na prática veterinária também como aditivo alimentar para a promoção do crescimento dos animais, devido ao seu vasto leque de actividades contra as bactérias e ao seu baixo custo. Contudo, devido a elevados níveis de resíduos de antibióticos nos alimentos de origem animal, estes provocam reacções alérgicas e algumas hipersensibilidades nos indivíduos, o que pode comprometer o sistema imunitário humano. Mais importante ainda é a presença de baixos níveis de resíduos nos géneros (Mamani, *et al.*, 2006) alimentícios a longo prazo, o que pode levar a um problema de resistência medicamentosa aos organismos patogénicos no corpo humano (Wang, *et al.*, 2008). Por conseguinte, qualquer adição de antibióticos para alimentação animal deve ser sujeita a um controlo rigoroso. O rastreio deve ser exercido nos alimentos para animais e em todos os tipos de alimentos de consumo humano para detectar a sua eventual presença (Wang, *et al.*, 2008).

O antibiótico é geralmente distribuído por via oral, sendo a absorção digestiva da OTC rápida e importante, todavia diminui na presença de uma taxa elevada de cálcio nos alimentos (Ahmed e Kasraian, 2002). A difusão da OTC é rápida, e a concentração sanguínea mantém-se a um nível activo durante 6 a 8 horas após a última administração (o tempo de semi-vida é cerca de 9 horas). O grau de fixação das proteínas plasmáticas é de 30 a 35%. A difusão tissular é muito boa, atravessa a placenta, tem boa concentração nas mucosas e concentra-se no leite e na bÍlis. A eliminação é feita principalmente pelos rins e em grande parte sob a forma activa (Zoopan, 2010). De acordo com um estudo recente, os carneiros excretam quase 21% de uma dose oral de Oxitetraciclina, e os touros novos excretam aproximadamente 17-75% de clorotetraciclina (Kemper, 2008; Oliveira, 2008)

Existem alguns estudos que comprovam que a estabilidade química da OTC é sensível ao ar e à luz, podendo descolorar quando exposto ao ar e à luz. (Acros Organics, 2010). Halling-Sørensen (2000), realizaram testes de biodegradabilidade para alguns compostos, e as tetraciclina foram também objecto desse estudo. Foi verificado que as tetraciclina eram fotodegradáveis. Esta mesma conclusão já tinha sido obtida em estudos anteriores realizados por Oka, *et al.* (1989) e Eberlain, *et al.* (1992).

C.2. Ocorrência no ambiente

A ocorrência deste fármaco no ambiente é bastante variada, pois pode ser encontrada, nos solos, em sedimentos e lamas, assim como no meio aquático. Medicamentos humanos e veterinários são continuamente libertados no ambiente, principalmente como resultado de processos de fabricação, eliminação dos produtos não utilizados ou expirados, e excrementos (Díaz-Cruz, *et al.*, 2003; Wang, *et al.*, 2009; Gros, *et al.*, 2008; Kemper, 2008). Devido às suas propriedades físicas e químicas, muitas dessas substâncias ou seus metabolitos bioactivos acabam nos solos e sedimentos, onde se podem acumular e induzir efeitos adversos nos organismos terrestres ou aquáticos (Díaz-Cruz, *et al.*, 2003).

No caso da medicina humana a ocorrência da OTC acontece essencialmente a nível dos efluentes provenientes de ETARs, mas pode também ser detectado no leite materno de mães lactantes, cuja concentração é de aproximadamente 70% (Gideon e Martin, 1997).

Arikan, *et al.* (2008) e Matsui, *et al.* (2008) determinaram a ocorrência de antibióticos numa microbacia agrícola e verificaram a variabilidade sazonal em que estes fármacos eram encontrados. Constataram que a oxitetraciclina era um dos fármacos mais frequentemente detectados do grupo de antibióticos das Tetraciclinas.

A OTC pode também ser encontrada em produtos alimentares, como por exemplo no leite (incluindo produtos derivados), no peixe, nos vegetais e na carne, devido à administração deste fármaco nas explorações de gado, aquaculturas para prevenção de infecções e conseqüentemente nos solos, quando são usados adubos naturais como o esterco (Popadoyannis, *et al.*, 2000; Naoto, 1999; Boatto, *et al.*, 1999; Long, *et al.*, 1990; Schenck e Callery, 1998).

C.3. Medicamentos vendidos contendo OTC

Tabela 4 – Medicamentos que contém OTC

Medicina Humana				
Nome do Medicamento	Terapêutica	Apresentação	Categoria Farmacoterapêutica	
Terricil (contém 5mg/g) (a)	Infecções oculares externas (blefarites, conjuntivites, queratites, queratoconjuntivites e rosácea ocular); tracoma (a)	Pomada oftálmica, em bisnaga de 5 g, por unidade (a)	Antibacterianos (a)	
Corticil T (b)	Infecções cutâneas; piogênicas superficiais; piodermites; dermatites pustulosas; queimaduras; dermatites atópicas; eczemas; neurodermatites; pruridos; dermatite eczematóide; eczema alimentar e eczema infantil; dermatites de contacto devidas a plantas, medicamentos, cosméticos, tecidos; pruridos inespecíficos do ânus, vulva e escroto. (b)	Pomada para uso cutâneo, em bisnaga de 15 g, por unidade (b)	Antibacterianos e Antifúngicos (b)	
Geomicina (c)	Está indicado no tratamento de infecções oculares externas (c)	Pomada oftálmica, em bisnaga de 15 g (c)	Antibacterianos (c)	
Colircusi Oxitetracíclica (contém 5 mg/ml) (d)	Está indicado no tratamento de infecções oculares externas (d)	Colírio, pó e solvente para solução; Uso oftálmico; em blister de 37.4 mg, por unidade (d)	Antibacterianos (d)	
Oftalmolosa Cusi Oxitet. (contém 5mg/g) (e)	Está indicado no tratamento de infecções oculares externas (e)	Pomada oftálmica, Uso oftálmico, Bisnaga - 1 unidade(s) - 3 g (e)	Antibacterianos (i)	
Terramicina (f)	Gengivite ulcerativa necrotizante aguda (GUNA) (infecção de Vincent); brucelose; gonorréia; sífilis (g)	Uso Oral: Cápsula 500 mg; Xarope 125 mg/5 mL; Uso Injetável: 100 mg/2 mL (g)	Cloranfenicol e Tetraciclina (i)	
Terramicina Pomada Oftálmica (h)	Indicada no tratamento de infecções oculares superficiais, envolvendo a conjuntiva e/ou a córnea, devidas a microrganismos susceptíveis. (h)	Uso externo: Pomada Oftálmica, bisnaga com 3,5 gramas (h)	Antibacterianos (i)	
Medicina Veterinária				
Nome do medicamento	Terapêutica	Espécies	Apresentação	Categoria Farmacoterapêutica
Oxitetracíclica Injecção 200mg/ml (j)	Pneumonia; febre; conjuntivite; podridão do pé; difteria; enterite bacteriana; língua de madeira; leptospirose; infecções de feridas; metrite aguda	Gado de Corte, Gado Leiteiro, Bezerros, Suíno	Injetável: administração intramuscular, subcutânea ou intravenosa	Antibacterianos
Oxitetracíclica 100 Granular Premix (contém 220g/kg) (k)	Enterite bacteriana; rinite atrófica; stress; leptospirose; estimula o apetite; doença respiratória crónica; stress; enterites não específicas; Sinusite infecciosa (perus); enterotoxemia (bezerros)	Gado de Corte, Frangos, Gado Leiteiro, Ovelha, Suíno, Perus, Vitela, Bezerros	Granulado: administração oral	Antibacterianos
Oxitetracíclica 100 Lp (contém 100mg/ml) (l)	Pneumonia bacteriana, febre; mastites, metrites, enterite bacteriana, podridão do pé, difteria, leptospirose, carbúnculo maligno; peritonite	Gado de Corte; Gado Leiteiro; Ovelha; Suíno; Vitela	Injetável: administração intravenosa/intramuscular	Antibacterianos
Oxitetraciclina-343 (contém 102,4g) (m)	Sinovite infecciosa; doenças respiratórias crónicas (CRD) e infecções do saco de ar; cólera aviária; enterites bacterianas; pneumonia bacteriana; leptospirose	Frangos; Suíno; Perus	Em pó, para dissolver: administração oral	Antibacterianos

Continuação Tabela 1

Oxibiotico-200 (contém 200mg/ml) (n)	Pneumonia; febre; conjuntivite; podridão do pé; difteria; enterite; língua de madeira; leptospirose infecções de feridas; metrite aguda	Gado de Corte; Gado Leiteiro; Suíno	Injectável: administração intravenosa/intramuscular	Antibacterianos
Pó solúvel: Amtech Oxitetraclina (contém 10g) (o)	Sinovite; DRC; infecção do saco de ar; cólera (frangos e perus); enterites; pneumonia (gado); leptospirose (suíno)	Gado de Corte; Frangos; Gado Leiteiro; Ovelha; Suíno; Perus	Em pó, para dissolver: administração oral	Antibacterianos
Terramicina em pó (Oxitetraclina) (p)	Suplemento alimentar: proporcionam engorda e fortalecimento dos animais; aumenta a produção do leite e carne; infecções causadas por microorganismo; diarreias; acelera o crescimento, promove o ganho de peso, aumenta a resistência orgânica; reduz o stress	Gado de Corte; Gado Leiteiro; Ovelha; Suíno; Vitela	Em pó, para adicionar nas rações como suplemento alimentar: administração oral	Antibacterianos
(a)	http://www.infarmed.pt/infomed/detalhes.php?med_id=8399&dci=T3hpdGV0cmFjaWNsaW5h&nome_comer=&dosagem=&forma_farmac=&atc=&estado_aim=&pesquisa_titular=&pagina=1			
(b)	http://www.medicinanet.com.br/bula/5004/terra_cortril.htm			
(c)	http://www.infarmed.pt/infomed/detalhes.php?med_id=3899&dci=b3hpdGV0cmFjaWNsaW5h&nome_comer=&dosagem=&forma_farmac=&atc=&estado_aim=&pesquisa_titular=&pagina=1			
(d)	http://www.infarmed.pt/infomed/detalhes.php?med_id=2098&dci=b3hpdGV0cmFjaWNsaW5h&nome_comer=&dosagem=&forma_farmac=&atc=&estado_aim=&pesquisa_titular=&pagina=1			
(e)	http://www.infarmed.pt/infomed/detalhes.php?med_id=6357&dci=b3hpdGV0cmFjaWNsaW5h&nome_comer=&dosagem=&forma_farmac=&atc=&estado_aim=&pesquisa_titular=&pagina=1			
(f)	http://www.medicinanet.com.br/conteudos/medicamentos/422/oxitetraclina.htm			
(g)	http://www.bulas.med.br/p/terramicina+pomada+oftalmica-4640.html			
(h)	http://www.medicinanet.com.br/bula/5006/terramicina_pomada_ofthalmica.htm			
(i)	http://www.infarmed.pt/infomed/lista.php			
(j)	http://www.drugs.com/vet/oxytetracycline-injection-200-mg-ml.html			
(k)	http://www.drugs.com/vet/oxytetracycline-100-granular-premix-can.html			
(l)	http://www.drugs.com/vet/oxytetracycline-100-lp-can.html			
(m)	http://www.drugs.com/vet/oxytetracycline-343.html			
(n)	http://www.drugs.com/vet/oxybiotic-200.html			
(o)	http://www.drugs.com/vet/amtech-oxytetracycline-hcl-soluble-powder.html			
(p)	http://www.mfrural.com.br/detalhe.asp?cdp=12897&nmoca=terramicina-em-po-oxitetraclina-caixa-com-20-pacotes-de-1kg			

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acros Organics. *Material Safety Data Sheet Oxytetracycline*. [http://www.acros.com/DesktopModules/Acros_Search_Results/Acros_Search_Results.aspx?search_type=MSDS2&tg=29&search=\(field29.9=1022146+or+field29.4=79572\)+and+Field29.8=EN&for=acro2&sup=AcrosEU&lang=EN](http://www.acros.com/DesktopModules/Acros_Search_Results/Acros_Search_Results.aspx?search_type=MSDS2&tg=29&search=(field29.9=1022146+or+field29.4=79572)+and+Field29.8=EN&for=acro2&sup=AcrosEU&lang=EN) Acesso em: Março de 2010.

Ahmed, I., Kasraian, K., 2002. Pharmaceutical challenges in veterinary product development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 871-882.

Arikan, O. A., Rice, C., Codling, E., 2008. Occurrence of antibiotics and hormones in a major agricultural watershed. *Desalination*, Vol. 226, pp. 121–133.

Beausse, J., 2004. Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *Trac-Trends Anal. Chem.* 23, 753-761.

Boatto, G., Pau, A., Palomba, M., Arenare, L., Cerri, R., 1999. Monitoring of oxytetracycline in ovine milk by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 20, 321–326, 1999.

Díaz-Cruz, M. S., López de Alda, M. J., Barceló, D., 2003. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 22, pp. 340-351.

Eberlein, B., Bergner, T., Przybilla, B., 1992. Demonstration of olaquinox phototoxicity in vitro. *Photodermatol-Photoimmunol- Photomed.*, 9, 63–66.

EPI Suite™, v3.12,

<http://www.epa.gov/opptintr/exposure/pubs/episuitedl.htm>

Gideon, K., Martin, S. C. 1997. Special aspects of perinatal & pediatric pharmacology. In B. G. Katzung (Ed.), *Basic & clinical pharmacology* (6th ed., pp. 920–928). Norwalk, CT, USA: Appleton & Lange.

Gros, M., Petrovic, M., Barceló D., 2008. Analysis of Emerging Contaminants of Municipal and Industrial Origin – *Hdb Env Chem Vol. 5, Part S/1 (2008): 37–104*, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg; Published online: 8 March 2008.

Halling-Sørensen, B., 2000. Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming. *Chemosphere*, 40, 731–739

- Kaale, E., Chambuso, M., Kitwala, J., 2008. Analysis of residual oxytetracycline in fresh milk using polymer reversed-phase column Food chemistry, Vol. 107, pp. 1289-1293.
- Kemper, N., 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. Ecological indicators, Vol. 8, pp. 1-13.
- Long, A. R., Hsieh, L. C., Malbrough, M. S., Short, C. R., & Barker, S. A., 1990. Matrix solid-phase dispersion (mspd) isolation and liquid chromatographic determination of oxytetracycline and tetracycline and chlorotetracycline in milk. Journal – Association of Analytical Chemistry, 73, 379–384.
- Maia, P. P., Rath, S., Reyes, F. G. R., 2008. Determination of oxytetracycline in tomatoes by HPLC using fluorescence detection. Food Chemistry, 109, 212-218.
- Maia, P. P., Amaya-Farfán, J., Rath, S., Reyes Reyes, F. G., 2007. Simultaneous determination of streptomycin and oxytetracycline in agricultural antimicrobials by CZE after an experimental design Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 43, 450-456.
- Mamani, M. C. V., Amaya-Farfán, J. A., Reyes Reyes, F. G., Rath, S., 2006. Simultaneous determination of tetracyclines in pharmaceuticals by CZE using experimental design, Talanta, Vol. 70, pp. 236-243.
- Matsui, Y., Ozu, T., Inoue, T., Matsushita, T., 2008. Occurrence of a veterinary antibiotic in streams in a small catchment area with livestock farms. Desalination, Vol. 226, pp. 215–221.
- Naoto, F., 1999. Rapid liquid chromatographic determination of oxytetracycline in milk. Journal of Chromatography A, 839, 247–251.
- Oka, H., Ikai, Y., Kawamura, N., Yamada, M., Harada, K., Ito, S., Suzuki, M., 1989. Photodegradation products of tetracycline in aqueous solution. J. Agri. Food Chem., 37, 226–231.

Oliveira, N., 2008. Relatório de estágio, detecção de fármacos de origem veterinária em águas de uma exploração Bovina no Alentejo. Universidade de Évora, Évora.

Pavlovic, D.M., Babic, S., Horvat, A.J.M., Kastelan-Macan, M., 2007. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. *Trac-Trends Anal. Chem.* 26, 1062-1075.

Popadoyannis, I. N., Samanidou, V. F., & Kovatsi, L. A., 2000. A rapid high performance liquid chromatographic assay for the determination of oxytetracycline in commercial pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 23, 275–280.

Schenck, J. F., Callery, P. S., 1998. Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. *Journal of Chromatography A*, 812, 99–109.

Smyrniotakis, C. G., Archontaki, H. A. 2007. C18 columns for the simultaneous determination of oxytetracycline and its related substances by reversed-phase high performance liquid chromatography and UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* , Vol. 43, pp. 506-514.

Wang, Y., Tong, L., Li, P., Zhu, K., 2009. Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. *Chemosphere*, 74, 1090–1097.

Wang, L., Yang, H., Zhang, C., Mo, Y., Lu, X., 2008. Determination of oxytetracycline, tetracycline and chloramphenicol antibiotics in animal feeds using subcritical water extraction and high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 619, 54–58.

Weifen, W., Hong, L., Changhu, X., Jamil, K., 2004. Elimination of chloramphenicol, sulphamethoxazole and oxytetracycline in shrimp, *Penaeus chinensis* following medicated-feed treatment. *Environment International*, 30, 367-373.

Zoopan. <http://www.zoopan.com/?info=produtos/2/9/51>. [Acesso: Março de 2010]

Anexo D

D. Leitos Construídos de Macrófitas (LCM)

Os leitos construídos de macrófitas (LCMs) consistem em depressões escavadas no terreno, cujas dimensões dependem do tipo e quantidade do efluente a tratar (Figura D.1). O fundo dos leitos é impermeabilizado, e estes são parcialmente cheios com uma matriz de suporte, composta por um material permeável. A matriz é plantada com espécies seleccionadas de plantas adaptadas a ambientes saturados em água, e.g. espécies hidrófitas, geralmente designadas por macrófitas Dordio, *et al.* (2008).



Figura D.1 – Aspecto dos LCMs

A acção depurativa dos efluentes pelos LCMs caracteriza-se por uma interacção complexa de processos químicos, físicos e biológicos, e por uma acção concertada entre a matriz de suporte, os rizomas e raízes das plantas e os microrganismos adaptados à toxicidade do efluente (Figura D.2).

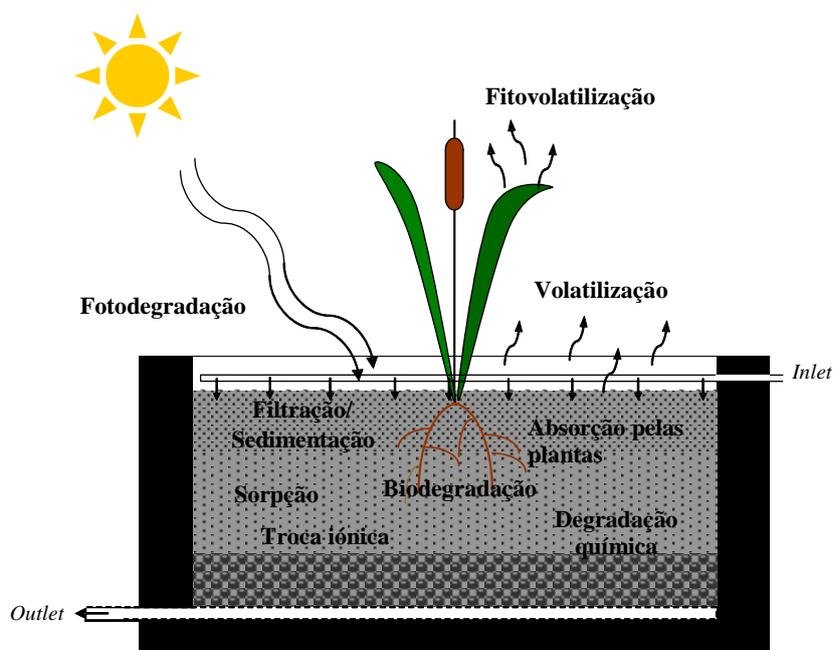


Figura D.2 – Sumário dos principais processos físicos, químicos e biológicos responsáveis pela remoção dos poluentes nos LCM (adaptado de Dordio, *et al.* (2008)).

Existem diferentes tipos de leitos construídos de macrófitas que podem ser classificados de acordo com vários critérios (Figura D.3). De acordo com a forma como o efluente percorre o sistema, os LCMs podem ser classificados em: sistemas com fluxo superficial (Figura D.3-A, D.3-B e D.3-C) e sistemas com fluxo sub-superficial vertical (Figura D.3-D) ou horizontal (Figura D.3-E). Podem também ser classificados de acordo com o tipo de vegetação, especialmente no que diz respeito à forma como a vegetação se fixa ao fundo do leito: LCMs com plantas flutuantes (Figura D.3-A) e plantas fixas emergentes (Figura D.3-C, D e E) ou submersas (Figura D.3-B).

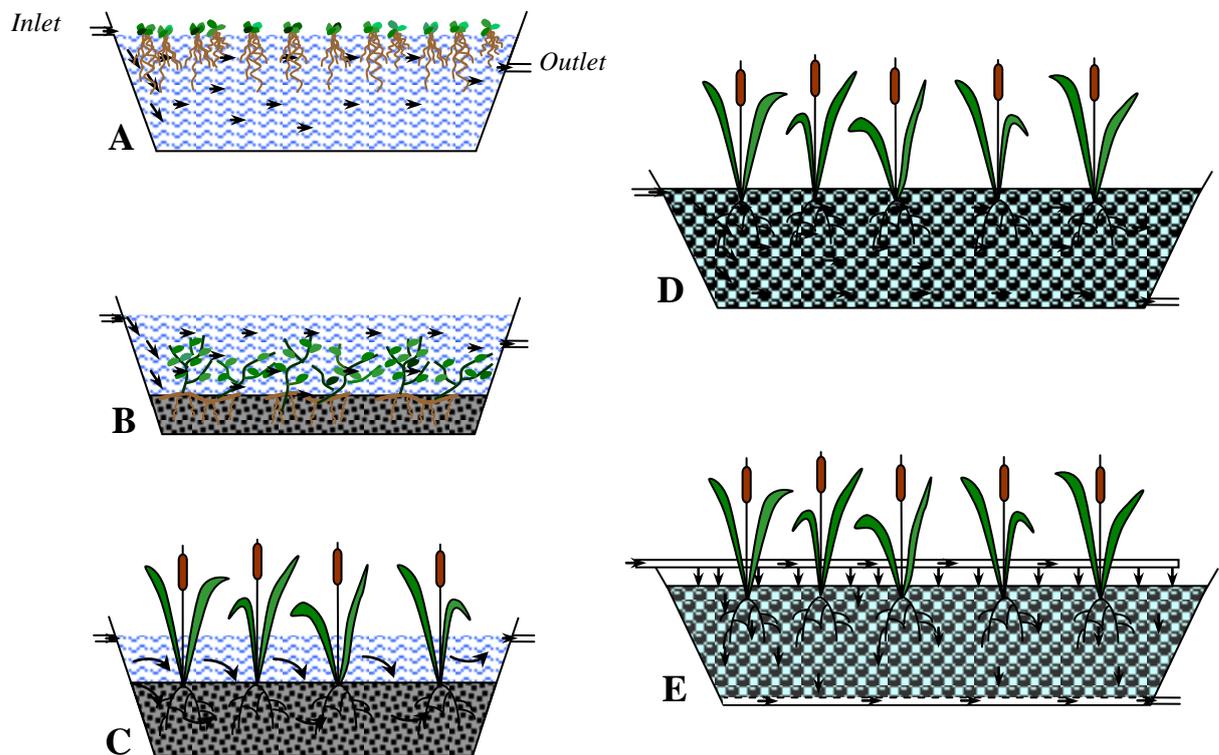


Figura D.3 – Diferentes tipos de LCMs (A, sistemas de fluxo superficial com plantas flutuantes; B, sistemas de fluxo superficial com plantas fixas submersas; C, sistemas de fluxo superficial com plantas fixas emergentes; D, sistemas de fluxo sub-superficial horizontal; E, sistemas de fluxo sub-superficial vertical) (adaptado de Dordio, *et al.* (2008)).

D.1. Componentes de LCMs

Os componentes essenciais dos LCM são a matriz de suporte, a vegetação e os microrganismos, que em conjunto são os responsáveis pelos processos de remoção de poluentes do sistema (Dordio, *et al.*, 2007). Como os LCMs são projectados para maximizar a capacidade depurativa que ocorre nos sistemas naturais, a construção e a

operação deste tipo de sistemas requer a conhecimento das características dos componentes presentes bem como das suas inter-relações.

Neste trabalho procurou-se avaliar principalmente o papel da matriz de suporte e das plantas na remoção da oxitetraciclina do efluente contaminado.

D.1.1. Matriz de suporte

A matriz de suporte utilizada nos LCMs condiciona a complexa variedade de processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem durante a depuração do efluente no sistema. Contribui também de uma forma indirecta para a depuração dos poluentes, proporcionando um substrato sólido para o crescimento das plantas e desenvolvimento da população microbiana (Davis, 1998; Sundaravadivel e Vigneswaran, 2001).

A matriz é caracterizada pela sua capacidade de troca iónica, área superficial específica, condutividade hidráulica, poder tampão de pH, textura, estrutura, capacidade de adsorção, entre outras propriedades que condicionam quer a permeabilidade e capacidade de drenagem do sistema, quer a sua eficiência na remoção de poluentes (Vymazal, *et al.*, 1998; Brix, *et al.*, 2001; Akrotos e Tsihrintzis, 2007; Kadlec e Wallace, 2009). Assim, a selecção dos materiais que a compõem deve ter em conta várias destas propriedades sob o ponto de vista dos objectivos que se pretendem atingir. Os tipos de matrizes tradicionalmente mais utilizados nos LCMs são a areia, a gravilha e solos orgânicos (USEPA, 1993b; USEPA e USDA-NRCS, 1995; Cooper, *et al.*, 1996; Vymazal, *et al.*, 1998; USEPA, 2000a; Kadlec e Wallace, 2009). No entanto actualmente são cada vez mais testados e utilizados materiais argilosos (ex. argila expandida, vermiculite, etc.) (Brix, *et al.*, 2001; Zhang, *et al.*, 2007; Calheiros, *et al.*, 2008; Tee, *et al.*, 2009; Carrizosa, *et al.*, 2001; Li, *et al.*, 2004; Abate e Masini, 2005; Sanchez-Martin, *et al.*, 2006; Dogan, *et al.*, 2007; Apreutesei, *et al.*, 2008). Estes materiais caracterizam-se por uma elevada porosidade, que lhes confere uma elevada área superficial para a adesão e desenvolvimento da população microbiana. Possuem também uma boa capacidade de adsorção de diversos compostos orgânicos e de troca iónica para além de uma boa condutividade hidráulica. Estas características são, sem dúvida, adequadas para a remoção de poluentes orgânicos como os fármacos e pesticidas (Yang, *et al.*, 1997; Thorstensen, *et al.*, 2001; Calheiros, *et al.*, 2008; Dordio, *et al.*, 2009a).

Neste trabalho foi testada como matriz de suporte uma argila expandida (Light Expanded Clay Aggregate – LECA) com a designação comercial de LECA 2/4 fornecida pela empresa Maxit Group Portugal.

A selecção da LECA como matriz de suporte teve em atenção, para além da sua capacidade de retenção de alguns fármacos e metabolitos (Dordio, 2007; Dordio, 2009b), também a sua elevada superfície específica, elevada porosidade e condutividade hidráulica, aliados a um baixo custo de aquisição. Estas características garantem um bom desenvolvimento microbiano, permitem um bom arejamento e um contacto efectivo entre o efluente e as partículas da matriz, factores importantes na adsorção das moléculas que se pretendem remover.

Descrição da LECA

A LECA é sintetizada a partir de argila natural com características expansivas que é colocada em fornos rotativos de secagem na presença de dolomite (CaCO_3 , MgCO_3) à temperatura de 1200°C . Através deste processo a argila transforma-se em grânulos esféricos com uma estrutura alveolar e uma superfície externa dura, porosa e de cor castanha (Figura D.4) (Johansson, 1997; Zhu, *et al.*, 1997; Brix, *et al.*, 2001).



Figura D.4 – Aspecto típico dos grânulos de LECA

Composição química da LECA

Composição química da LECA 2/4 usada nos ensaios (Dordio, 2009b):

Elemento	LECA (% em peso)
O	53.9 -39.2
Si	19.4 – 26.8
Mg	2.7 – 3.6
Fe	9.7 – 11.7
Al	9.8 – 13.0
K	4.5 – 5.7

Propriedades físico-químicas da LECA

A LECA é uma mistura de vários minerais, apresentando deste modo uma composição mineralógica bastante complexa, sendo no entanto um material altamente poroso com uma estrutura interna com muitos poros de diversos tamanhos. Tal como se pode visualizar na Figura D.5, a superfície externa apresenta uma menor rugosidade do que a superfície interna, a qual resulta da libertação de bolhas de gás durante o tratamento térmico que é efectuado na sua produção (Dordio, *et al.*, 2009b; Drizo, *et al.*, 1999; Brix, *et al.*, 2001).

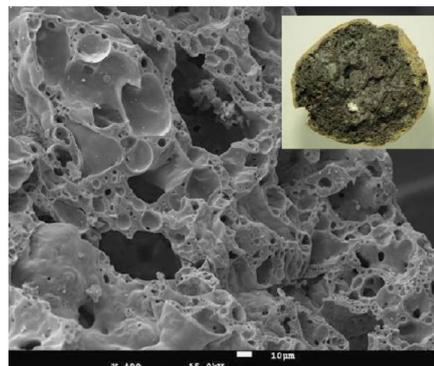


Figura D.5 – Imagem da LECA obtida através de microscópio electrónico de varrimento (Dordio, *et al.*, 2009a)

A LECA (2/4) usada nos ensaios apresenta ainda as seguintes propriedades físico-químicas (Dordio, 2009b):

Material	LECA 2/4
d ₁₀ (mm)	3.00
d ₆₀ (mm)	3.95
Coefficiente de uniformidade (U)	1.32
Porosidade aparente (%)	46 ± 1
Densidade (kg m ⁻³)	486 ± 7
K _s (m ³ m ⁻² s ⁻¹ x 10 ⁻³)	7.7
pH (em água)	9.93 ± 0.02
PZC	10.54 ± 0.03
Condutividade eléctrica a 20°C (mS cm ⁻¹)	537 ± 15

Classes Granulométricas Nominais

Dimensões disponíveis comercialmente:

Designação comercial	Classe nominal (mm)
Leca [®] Areia (0.5/3)	0.5-3
Leca [®] Godo (2/4)	1-5
Leca [®] Enchimento bombagem (3/8 F)	4-12.5
Leca [®] Enchimento manual (3/8 C)	10-20
Leca [®] Isolamento (8/16)	10-20
Leca [®] (10/20)	10-20
Referência bibliográfica	Maxit Portugal, 2010

Aplicações

A LECA é usada como material de enchimento de blocos de construção e como material de isolamento térmico e acústico. Recentemente tem tido uma utilização crescente em processos de tratamento de efluentes, nomeadamente como meio filtrante e como matriz de suporte em LCMs (Johansson, 1997; Zhu, *et al.*, 1997; Brix, *et al.*, 2001; Scholz e Xu, 2002; Heistad, *et al.*, 2006; Dordio, *et al.*, 2007; Calheiros, *et al.*, 2008; Albuquerque e Labrincha, 2008; Dordio, *et al.*, 2009b).

Distribuição em Portugal

Maxit-Argilas Expandidas, SA (MaxitGroup) (Portugal)

D.1.2. Vegetação

As plantas aquáticas são uma componente essencial dos LCM e contribuem directamente para a remoção/degradação de diversos tipos de poluentes presentes nos efluentes, nomeadamente os xenobioticos orgânicos, através de processos como a adsorção, absorção, acumulação, metabolização, volatilização, e exsudação de enzimas que ajudam na degradação de poluentes na rizosfera (Macek, *et al.*, 2000; Korte, *et al.*, 2000; Dietz e Schnoor, 2001; Susarla, *et al.*, 2002; Pilon-Smits, 2005; Collins, *et al.*, 2006). Também contribuem de uma forma indirecta para a depuração das águas residuais pois criam um fluxo contínuo de oxigénio até à matriz, libertando este gás através das suas raízes e rizomas. São, assim, geradas nesta região as condições de oxidação das quais depende a actividade metabólica de organismos aeróbios necessária para a depuração de efluentes contaminados com fármacos (Brix, 1994; Sundaravadivel e Vigneswaran, 2001; Cabral, 2004; Haberl, *et al.*, 2003; Kadlec e Wallace, 2009). Por outro lado, as plantas proporcionam uma elevada área superficial nas suas raízes para suportar o crescimento microbiano e permitem controlar o desenvolvimento de algas por restrição à penetração de luz. A utilização de plantas nos sistemas de tratamento apresenta, também, a vantagem de fornecer aos leitos uma boa integração paisagística (Costa, *et al.*, 2003).

A selecção do tipo de macrófitas a utilizar depende de vários parâmetros: a área de terreno disponível, a altura do leito, o tipo de fluxo, o tipo de plantas infestantes naturais da região e as características do efluente a tratar, nomeadamente a sua fitotoxicidade (Calheiros, *et al.*, 2008; Maine, *et al.*, 2009). É muito importante seleccionar uma ou várias espécies com capacidade para crescerem rapidamente no tipo de efluente que se pretende depurar. Devem ser resistentes a pragas e doenças e compatíveis com os factores hidrológicos do sistema, e por outro lado não devem ser muito vulneráveis à ocorrência de variações no seu habitat (Brisson e Chazarenc, 2008; Maine, *et al.*, 2009).

Entre as plantas mais utilizadas em LCMs para o tratamento de efluentes contaminados com xenobioticos orgânicos, incluindo os fármacos, encontram-se a *Phragmites australis* e a *Typha spp.* (Stottmeister, *et al.*, 2003; Amaya-Chavez, *et al.*, 2006; Hadad, *et al.*, 2006; Calheiros, *et al.*, 2008; Maine, *et al.*, 2009; Matamoros e Bayona, 2006; Matamoros, *et al.*, 2007a; Matamoros, *et al.*, 2008b; Dordio, 2009a; Park, *et al.*, 2009; Dordio, 2010). Estas espécies têm um crescimento rápido, são pouco vulneráveis a variações no seu habitat e existem estudos que comprovam a sua eficiência na remoção de fármacos (Matamoros, *et al.*, 2005; Matamoros e Bayona, 2006; Brisson e Chazarenc, 2008; Dordio, *et al.*, 2009a; Dordio, 2010). Neste estudo foi seleccionada uma destas espécies, a *Phragmites australis*, para avaliar a adequação das suas características para a remoção do fármaco estudado em LCMs.

Phragmites australis

Descrição

Phragmites é um género botânico pertencente à família *Poaceae*. A planta é comumente conhecida pelo nome de caniço-de-água ou simplesmente caniço. A *Phragmites australis* é uma gramínea perene que cresce até 6-12 metros de altura. Originalmente nativa da Eurásia e África encontra-se agora distribuída por todo o mundo (Figura D.6). Trata-se de uma planta lenhosa, rizomatosa, emersa ou parcialmente submersa, até 2 m de altura. As flores agrupam-se em



Figura D.6 – *Phragmites australis*

panículas amplas, com espiguetas que possuem duas a oito flores afastadas, e são vermelhas escuras com longos pêlos sedosos (Flora Portuguesa, 1988; Flora Vasculare de Andalucía Ocidental, 1987).

Na Tabela D.1 apresenta-se algumas das principais características fisiológicas desta espécie.

Tabela D.1 – Características fisiológicas da *Phragmites australis* (Flora Vasculare de Andalucía Ocidental, 1987; Flora Portuguesa, 1988; Atlas Classificatório de la flora de España Peninsular e Balear, 1996)

Espécie	<i>Phragmites australis</i>
Família	<i>Graminaea</i>
Nome comum	Caníço
Ocorrência	Margens dos rios, ribeiras e lagoas
Duração	Planta perene
Porte	Planta lenhosa, rizomatosa, emersa ou parcialmente submersa, até 2 m de altura. Caule sob a forma de colmo erecto. Folhas planas, linear-lanceoladas, com 0.8-3.5 cm de largura
Época de floração	Julho a Setembro
Reprodução	Semente ou propagação vegetativa
Indicador ecológico	Solos lodosos/arenosos

Habitat

É uma planta ripícola e por isso cresce à beira de ribeiras, rios, lagoas, pântanos e zonas de escorrença, distribuindo-se em várias regiões de Portugal. A sua propagação é essencialmente vegetativa. Algumas das características ambientais mais propícias ao desenvolvimento da espécie de macrófitas emergentes estudada neste trabalho são apresentadas na Tabela D.2.

Tabela D.2 – Principais características de algumas espécies de macrófitas emergentes (Cooper et al., 1996)

Espécie	Temperatura Desejada (°C)	Salinidade máx. tolerada (g L ⁻¹)	pH Óptimo	Taxa de crescimento 1º ano	Penetração típica das raízes (m)	Produção Anual Peso Seco (Kg)
<i>Phragmites</i> spp.	12-33	45	2.0-8.0	Muito rápida	>0.6	40

Distribuição em Portugal

A *Phragmites australis* tem uma distribuição cosmopolita (Figura D.7).



Jardim Botânico UTAD

Figura D.7 – Distribuição da *Phragmites australis* em Portugal (fonte: Flora Digital de Portugal)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amaya-Chavez, A., Martinez-Tabche, L., Lopez-Lopez, E., Galar-Martinez, M. (2006). Methyl parathion toxicity to and removal efficiency by *Typha latifolia* in water and artificial sediments. *Chemosphere* 63, 1124-1129.

Abate, G., Masini, J. C., 2005. Sorption of atrazine, propazine, deethylatrazine, deisopropylatrazine and hydroxyatrazine onto organovermiculite. *J. Braz. Chem. Soc.* 16, 936-943.

Akratos, C. S., Tsihrintzis, V. A., 2007. Effect of temperature, HRT, vegetation and porous media on removal efficiency of pilot-scale horizontal subsurface flow constructed wetlands. *Ecol. Eng.* 29, 173-191.

Albuquerque, C. M., Labrincha, J. A., 2008. Removal of contaminants from aqueous solutions by beds made of rejects of the lightweight aggregates production. *Ceram. Int.* 34, 1735-1740.

Apreutesei, R. E., Catrinescu, C., Teodosiu, C., 2008. Surfactant-modified natural zeolites for environmental applications in water purification. *Environ. Eng. Manage. J.* 7, 149-161.

Brisson, J., Chazarenc, F., 2008. Maximizing pollutant removal in constructed wetlands: Should we pay more attention to macrophyte species selection? *Science of the Total Environment*, em publicacao.

Brix, H., 1994. Functions of Macrophytes in Constructed Wetlands. *Water Sci. Technol.* 29, 71-78.

Brix, H., Arias, C.A., del Bubba, M., 2001. Media selection for sustainable phosphorus removal in subsurface flow constructed wetlands. *Water Sci. Technol.* 44, 47-54.

Cabral, U. (2004). Caracterização e optimização de sistemas de tratamento de águas residuais por leitos de macrófitas, no Distrito de Castelo Branco. Relatório do trabalho fim de curso, Escola Superior Agraria, Castelo Branco, Portugal.

Calheiros, C.S.C., Rangel, A.O.S.S., Castro, P.M.L., 2008. Evaluation of different substrates to support the growth of *Typha latifolia* in constructed wetlands treating tannery wastewater over long-term operation. *Bioresour. Technol.* 99, 6866-6877.

Carrizosa, M.J., Koskinen, W.C., Hermosin, M.C., Cornejo, J., 2001. Dicamba adsorption-desorption on organoclays. *Appl. Clay Sci.* 18, 223-231.

Costa, L. L., Ceballos, B. S. O., Meira, C. M. B. S., Cavalcanti, M. L. F., 2003. Eficiência de wetlands construídos com dez dias de detenção hidráulica na remoção de colifagos e bacteriófagos. *Revista de Biologia e Ciências da Terra* 3, 1-23.

Collins, C., Fryer, M., Grosso, A., 2006. Plant uptake of non-ionic organic chemicals. *Environ. Sci. Technol.* 40, 45-52.

Cooper, P. F., Job, G. D., Green, M. B., Shutes, R. B. E., 1996. *Reed Beds and Constructed Wetlands for Wastewater Treatment*. WRC Publications, Medmenham, Marlow, UK.

Davis, L., 1998. *Agricultural Wastewater; A Handbook of constructed wetlands* 1, 907-938.

Dietz, A. C., Schnoor, J. L., 2001. Advances in phytoremediation. *Environ. Health Perspect.* 109, 163-168.

Dogan, M., İzdemir, Y., Alkan, M., 2007. Adsorption kinetics and mechanism of cationic methyl violet and methylene blue dyes onto sepiolite. *Dyes and Pigments* 75, 701-713.

Dordio, A., Candeias, E., A., Pinto, A., Teixeira da Costa, C., Palace Carvalho, A., 2009b. Preliminary media screening for application in the removal of clofibric acid, carbamazepine and ibuprofen by SSF-constructed wetlands. *Ecological Engineering* vol. 35, pp 290–302.

Dordio, A., Carvalho, A. J. P., Pinto, A. P., 2008. Wetlands: Water "Living Filters"?, in: Russo, R.E. (Ed.), *Wetlands: Ecology, Conservation and Restoration*. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, USA, pp. 15-72.

Dordio, A., Pinto, J., Pinto, A.P., da Costa, C.T., Carvalho, A., Teixeira, D.M., 2009a. Atenolol removal in microcosm constructed wetlands. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* in press.

Dordio, A. V., Teimão, J., Ramalho, I., Carvalho, A. J. P., Candeias, A. J. E., 2007. Selection of a support matrix for the removal of some phenoxyacetic compounds in constructed wetlands systems. *Science of the Total Environment*, Vol. 380, pp. 237–246.

Dordio, A., Carvalho, A. J. P., Teixeira, D. M., Dias, C. B., Pinto, A. P., 2010. Removal of pharmaceuticals in microcosm constructed wetlands using *Typha* spp. and LECA. *Bioresource Technology*, Vol. 101, pp. 886–892.

Drizo, A., Frost, C. A., Grace, J., Smith, K. A., 1999. Physico-chemical screening of phosphate-removing substrates for use in constructed wetland systems. *Water Res.* 33, 3595–3602.

Flora Digital de Portugal – Jardim Botânico da UTAD, 2010. http://www.jb.utad.pt/pt/herbario/cons_reg_esp2.asp?especie=Phragmites+australis&Sumbmit2=Pesquisar&ID=373. (Acesso: Março de 2010).

Hadad, H., Maine, M. A., Bonetto, C., 2006. Macrophyte growth in a pilotscale constructed wetland for industrial wastewater treatment. *Chemosphere* 63, 1744- 1753.

Heistad, A., Paruch, A.M., Vrâle, L., Ádám, K., Jenssen, P.D., 2006. A high-performance compact filter system treating domestic wastewater. *Ecol. Eng.* 28, 374-379.

Johansson, L., 1997. The use of LECA (Light Expanded Clay Aggregates) for the removal of phosphorus from wastewater. *Water Science and Technology* 35: 87-93.

Kadlec, R. H., Wallace, S. D., 2009. *Treatment Wetlands*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Korte, F., Kvesitadze, G., Ugrekhelidze, D., Gordeziani, M., Khatisashvili, G., Buadze, O., Zaalishvili, G., Coulston, F., 2000. Organic toxicants and plants. *Ecotox. Environ. Safe.* 47, 1-26.

Li, H., Teppen, B.J., Laird, D.A., Johnston, C.T., Boyd, S.A., 2004. Geochemical modulation of pesticide sorption on smectite clay. *Environ. Sci. Technol.* 38, 5393-5399.

Macek, T., Macková, M., Káš, J., 2000. Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnol. Adv.* 18, 23-34.

Maine, M. A., Sune, N., Hadad, H., Sanchez, G., Bonetto, C., 2009. Influence of vegetation on the removal of heavy metals and nutrients in a constructed wetland. *Journal of Environmental Management*, 90, 355-363.

Matamoros, V., Arias, C., Brix, H., Bayona, J. M., 2007a. Removal of Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) from Urban Wastewater in a Pilot Vertical Flow Constructed Wetland and a Sand Filter. *Environ. Sci. Technol.*, 41, 8171-8177.

Matamoros, V., Garcia, J., Bayona, J. M., 2005. Behavior of selected pharmaceuticals in subsurface flow constructed wetlands: A pilot-scale study. *Environ. Sci. Technol.* 39, 5449-5454.

Matamoros, V., Bayona, J. M., 2006. Elimination of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Subsurface Flow Constructed Wetlands. *Environ. Sci. Technol.* 40, 5811-5816.

Matamoros, V., García, J., Bayona, J. M., 2008b. Organic micropollutant removal in a full-scale surface flow constructed wetland fed with secondary effluent. *Water Res.* 42, 653-660.

Maxit Portugal, 2010. Leca®. <http://www.maxit.pt/1366> (Acesso: Março de 2010).

Park, N., Vanderford, B. J., Snyder, S.A., Sarp, S., Kim, S. D., Cho, J., 2009. Effective controls of micropollutants included in wastewater effluent using constructed wetlands under anoxic condition. *Ecol. Eng.* 35, 418-423.

Pilon-Smits, E., 2005. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 15-39.

Rollan, M. G., 1996. Atlas Classificadorio de la Flora de España Peninsular Y Balear. Volume III. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentacion. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

Sampaio, G., 1988. Flora Portuguesa. Instituto Nacional de Investigacao Cientifica. 3a Edicao. Fac. simile. Porto

Sanchez-Martin, M.J., Rodriguez-Cruz, M.S., Andrades, M.S., Sanchez-Camazano, M., 2006. Efficiency of different clay minerals modified with a cationic surfactant in the adsorption of pesticides: Influence of clay type and pesticide hydrophobicity. *Appl. Clay Sci.* 31, 216-228.

Scholz, M., Xu, J., 2002. Comparison of constructed reed beds with different filter media and macrophytes treating urban stream water contaminated with lead and copper. *Ecol. Eng.* 18, 385-390.

Stottmeister, U., Wiessner, A., Kusch, P., Kappelmeyer, U., Kastner, M., Bederski, O., Muller, R.A., Moormann, H., 2003. Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnol. Adv.* 22, 93-117.

Sundaravadivel, M., Vigneswaran, S., 2001. Constructed wetlands for wastewater treatment. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 31, 351-409.

Susarla, S.; Medina, V. F.; McCutcheon, S. C., 2002. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering*, 18, 647–658.

Tee, H.C., Seng, C.E., Noor, A.M., Lim, P.E., 2009. Performance comparison of constructed wetlands with gravel- and rice husk-based media for phenol and nitrogen removal. *Sci. Total Environ.* 407, 3563-3571.

Thorstensen, C. W., Lode, O., Eklo, O. M., Christiansen, A., 2001. Sorption of Bentazone, Dichlorprop, MCPA and Propiconazole in Reference Soils from Norway. *Journal of Environmental Quality* 30, 2046-2052.

USEPA, 1993b. *Subsurface Flow Constructed Wetlands for Wastewater Treatment: A Technology Assessment*. EPA 832-R-93-008.

USEPA, 2000a. *Constructed Wetlands Treatment of Municipal Wastewaters*. EPA/625/R-99/010.

USEPA, USDA-NRCS, 1995. *A Handbook of Constructed Wetlands. Volume 1: General Considerations*.

Valdes, B., Talavera, S., Galiano, E. F., 1987. *Flora Vascular de Andalucía Occidental*, vol. III. Ketres Editora S.A. Barcelona.

Vymazal, J., Brix, H., Cooper, P. F., Green, M. B., Haberl, R., 1998. *Constructed wetlands for wastewater treatment in Europe*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.

Yang, M., Hubble, J., Lockett, A. D., Rathbone, R. R., 1997. Thermal Monitoring of Phenoxyacid Herbicide Adsorption on Granular Activated Carbon. *Water Research*, 31, 2356-2362.

Zhang, Z. L., Zhou, J. L., 2007. Simultaneous determination of various pharmaceutical compounds in water by solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1154, 205-213.

Zhu, T., Jenssen, P.D., Maehlum, T., Krogstad, T., 1997. Phosphorus sorption and chemical characteristics of lightweight aggregates (LWA) - Potential filter media in treatment wetlands. *Water Sci. Technol.* 35, 103-108.