



Universidade de Évora
Departamento de Química

**Avaliação da Eficiência de Remoção do
Contaminante de Origem Farmacêutica Atenolol
pela Planta *Phragmites australis* em Leitões
Construídos de Macrófitas**

José Manuel Romão Vieira Pinto

Dissertação apresentada na Universidade de Évora para obtenção do grau de
Mestre em Análises Químicas Ambientais

Orientadora: Professora Doutora Dora Maria Fonseca Martins Ginja Teixeira
Co-orientador: Professor Doutor Alfredo Jorge Palace Carvalho

Évora
2009

**Avaliação da Eficiência de Remoção do Contaminante
de Origem Farmacêutica Atenolol pela Planta
Phragmites australis em Leitos Construídos de
Macrófitas**

José Manuel Romão Vieira Pinto



Dissertação apresentada na Universidade de Évora para obtenção do grau de Mestre em
Análises Químicas Ambientais.

Orientadora: Professora Doutora Dora Maria Fonseca Martins Ginja Teixeira
Co-orientador: Professor Doutor Alfredo Jorge Palace Carvalho

Évora

2009

Agradecimentos

À Professora Doutora Dora Maria Fonseca Martins Ginja Teixeira e ao Professor Doutor Alfredo Palace Carvalho pelos conhecimentos científicos transmitidos, pela orientação, incentivo, apoio, compreensão, dedicação e disponibilidade evidenciada durante a realização deste trabalho.

À Eng.^a Ana Vitória Dordio agradeço os conhecimentos transmitidos, o esclarecimento de dúvidas, as inúmeras sugestões, a disponibilidade e apoio no decorrer do trabalho prático.

À Dra. Ana Manhita, pela amizade, disponibilidade, apoio, ajuda e incentivo sempre demonstrados no decorrer deste trabalho.

Aos meus pais por toda a ajuda, pela compreensão, apoio e incentivo que sempre me transmitiram.

À minha irmã, pelo seu entusiasmo, apoio, ajuda e incentivo sempre presentes.

A todos os/as colegas e amigos/as que me acompanharam ao longo do curso de mestrado, agradeço o apoio e a amizade manifestados ao longo deste trabalho.

Resumo

O atenolol é um fármaco β -bloqueador normalmente encontrado em águas residuais devido à incapacidade que os processos convencionais de tratamento destas águas têm em removê-lo. Neste trabalho foram utilizados microcosmos de leitos construídos de macrófitas de fluxo sub-superficial utilizando uma matriz de argila expandida (LECA) e plantados com *Phragmites australis* para avaliar a sua capacidade em remover atenolol das águas residuais. Para a detecção e quantificação do atenolol em soluções aquosas (águas e efluentes) desenvolveu-se e optimizou-se uma metodologia analítica usando separação cromatográfica por HPLC e detecção espectrofotométrica por *diode array* (HPLC-DAD) ou por ultravioleta visível (HPLC-UV-Vis). Desenvolveu-se também um procedimento de limpeza e concentração de amostra por extracção em fase sólida (SPE), o qual foi utilizado sempre que as concentrações do analito se encontraram abaixo dos limites de quantificação do equipamento. A utilização desta metodologia de HPLC, combinada com uma eficaz pré-concentração por SPE, resultou num método analítico com um limite de quantificação muito reduzido (9 ngmL^{-1}) e elevada reprodutibilidade ($\text{RSD} < 4\%$). A eficiência de remoção de atenolol pelos sistemas de macrófitas estudados foi de 93% após um tempo de retenção de 4 dias. Foram testados leitos só com LECA e com LECA e plantas para remoção do atenolol. Nos leitos só com LECA, a cinética de remoção foi caracterizada por um rápido passo inicial (uma remoção de aproximadamente 75% após apenas 24 h), o qual é frequentemente atribuído à adsorção na matriz de LECA. A remoção de atenolol nos leitos de LECA continuou a aumentar de forma constante até ao final do ensaio (8 dias), sendo contudo cerca de 5-10% mais baixo do que o valor observado nos leitos das plantas após os 4 primeiros dias. Para o tempo de retenção de 4 dias a maioria do atenolol é removido pela matriz de LECA, porém um acréscimo de cerca de 12-14% relativamente à eficiência de remoção global pode ser atribuído às plantas (*Phragmites australis*), o que está de acordo com trabalhos anteriormente publicados. Apesar de ser necessário realizar mais testes utilizando sistemas em larga escala, de modo a conseguir avaliar totalmente o comportamento do atenolol num sistema de leitos construídos de macrófitas, o presente estudo apresenta a possibilidade de aplicar este tipo de sistemas, relativamente baratos, no tratamento de águas residuais contaminadas com atenolol.

Atenolol removal efficiency in microcosm constructed wetlands by *Phragmites australis*

Abstract

Atenolol is a β -blocker drug commonly found in wastewaters due to the inability of the conventional wastewater treatment processes to remove it. In this study, subsurface flow constructed wetland microcosm systems have been established with a matrix of light expanded clay aggregates (LECA) and planted with *Phragmites australis* in order to evaluate their ability to remove atenolol from wastewater. For the detection and quantification of atenolol in aqueous solutions (water and wastewater), an adequate analytical methodology was developed and optimized using chromatographic separation by HPLC and diode array (DAD) or UV-Vis spectrophotometric detection. A sample clean-up and preconcentration procedure by solid phase extraction (SPE) was also developed for use whenever the concentration levels of the analyte were below the instrument's limit of quantification. Combined with an efficient SPE concentration step, the use of HPLC yielded an analytical method for atenolol quantification with very low LOQ (9 ngmL^{-1}) and high reproducibility ($\text{RSD} < 4\%$). Overall atenolol removal efficiency of 93% was achieved after a retention time of only 4 days with the microcosm systems planted with *Phragmites australis*. The removal kinetics was characterized by an initial fast step (removal of about 75% after just 24h) which is mainly attributable to adsorption on the LECA matrix. Atenolol removal in LECA beds continues to increase in a steady pace up to the end of the assay (8 days) being nevertheless about 5-10% lower than those observed in the planted beds after the first 4 days. For the retention time of 4 days most of the atenolol is removed by the LECA matrix but an additional 12-14% to the overall removal efficiency can be attributed to the *Phragmites* plants, which comes in agreement with other published reports. Despite the fact that further tests using larger-scale systems are required to fully evaluate the atenolol behavior in a constructed wetland system, this study points out to the possible application of these low-cost wastewater systems to treat atenolol contaminated wastewater.

Abreviaturas

- ANOVA – Análise de variância (*Analysis of variance*)
- APCI – Ionização química à pressão atmosférica (*Atmospheric pressure chemical ionization*)
- API – Ionização à pressão atmosférica (*Atmospheric pressure ionization*)
- CBO₅ – Carência bioquímica de oxigénio a cinco dias
- c.d.o. – Comprimento de onda
- CFA – Compostos farmacêuticos activos
- COT – Carbono orgânico total
- CQO – Carência química de oxigénio
- CQO_s – Carência química de oxigénio solúvel
- CQO_t – Carência química de oxigénio total
- CT – Carbono total
- DAD – Detector de foto-díodos (*Diode-array detector*)
- EPA – Agência de protecção ambiental (*Environment protection agency*)
- ESSH – escoamento sub-superficial horizontal
- ESI – Ionização por electrospray (*Electrospray ionization*)
- ESSV – escoamento sub-superficial vertical
- ETA – Estação de tratamento de água
- ETAR – Estação de tratamento de águas residuais
- GC – Cromatografia gasosa (*Gas Chromatography*)
- HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (*High-performance liquid chromatography*)
- LC – Cromatografia líquida (*Liquid chromatography*)
- LCFSS – Leitões construídos de macrófitas com fluxo sub-superficial
- LCM – Leitões construídos de macrófitas
- LECA – Matriz de argila expandida (*Light expanded clay aggregates*)
- LLE – Extracção líquido-líquido (*Liquid-liquid extraction*)
- LM – Leito de macrófitas
- LM-ESSH – Leitões de macrófitas de sistema de escoamento sub-superficial horizontal

LM-ESSV – Leitos de macrófitas de sistema de escoamento sub-superficial vertical
LM-ESSM – Leitos de macrófitas de sistema de escoamento sub-superficial misto
LOD – Limite de detecção (*Limit of detection*)
LOQ – Limite de quantificação (*Limit of quantification*)
mAU – Miliunidades de absorvância
MeOH – Metanol
MS – Espectrometria de massa (*Mass spectrometry*)
MS-MS – Espectrometria de massa *tandem*
PC – Cromatografia em papel (*Paper chromatography*)
PCZ – Ponto de carga zero
RSD – Desvio-padrão relativo (*Relative standard deviation*)
SD – Desvio-padrão (*Standard deviation*)
SPE – Extração em fase sólida (*Solid-phase extraction*)
SSFCW – Leitos construídos de fluxo sub-superficial (*Subsurface flow constructed wetlands*)
SST – Sólidos suspensos totais
SSV – Sólidos suspensos voláteis
TOF – Tempo de voo (*Time-of-flight*)
 t_r – Tempo de retenção
UV ou UV-Vis – Ultravioleta-visível

Índice Geral

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract	III
Abreviaturas	IV
Índice Geral	VI
Índice de Figuras	X
Índice de Tabelas	XIII
Introdução	2
I - Revisão Bibliográfica	6
1.1. Compostos de origem farmacêutica	6
1.1.1. Ocorrência e destino de fármacos no meio ambiente.....	8
1.1.2. A situação em Portugal.....	16
1.1.3. β -bloqueadores	17
1.1.3.1. Atenolol.....	18
1.1.3.1.1. Propriedades físico-químicas do atenolol	21
1.2. Processos de remoção de fármacos das águas residuais.....	22
1.3. Processos de tratamento por leitos de macrófitas.....	25
1.3.1. Tipos de sistemas.....	28
1.3.1.1. Escoamento superficial	29
1.3.1.2. Escoamento sub-superficial	30
1.3.1.3. Componentes do sistema com escoamento sub-superficial	32
1.3.1.3.1. Meio de enchimento.....	32
1.3.1.3.2. Vegetação.....	34
1.3.1.3.2.1. <i>Phragmites australis</i>	36

1.4.	Métodos analíticos utilizados na separação e análise de fármacos	38
1.4.1.	Extracção em fase sólida (<i>Solid-phase extraction, SPE</i>).....	40
1.4.2.	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>HPLC- High Performance liquid Chromatography</i>)	45
1.4.2.1.	Detecção em HPLC	47
1.4.2.1.1.	Detecção ultravioleta-visível (UV-Vis) e diode-array (DAD)	47
1.4.2.1.2.	Outros tipos de detectores.....	48
1.4.3.	Métodos para a determinação do atenolol	49
II.	 Materiais e Métodos	53
2.1.	Equipamentos	53
2.2.	Reagentes e materiais	53
2.3.	Fármaco Estudado (atenolol).....	54
2.4.	Procedimento Experimental	55
2.4.1.	Métodos Analíticos.....	55
2.4.1.1.	Caracterização das águas residuais	55
2.4.1.2.	Preparação das soluções-padrão de atenolol	56
2.4.1.3.	Optimização das condições de quantificação espectrofotométrica	56
2.4.1.4.	Optimização do método de SPE.....	56
2.4.1.5.	Quantificação do atenolol e validação do método analítico.....	57
2.4.1.5.1.	Construção das rectas de calibração do atenolol	57
2.4.1.5.2.	Limites Instrumentais de detecção e quantificação	57
2.4.1.5.3.	Quantificação do atenolol por HPLC-DAD e HPLC-UV	58
2.4.1.5.3.1.	Condições utilizadas na quantificação do atenolol	59
2.4.1.5.4.	Validação do método analítico, reprodutibilidade, repetibilidade..	59
2.4.2.	Remoção do atenolol pelos microcosmos de leitos construídos de macrófitas	60

2.4.2.1.	Colheita e aclimatização da Planta (<i>Phragmites australis</i>).....	60
2.4.2.2.	Estudos de conservação e estabilidade do atenolol.....	61
2.4.2.2.1.	Ensaio Vidro vs Plástico.....	62
2.4.2.2.2.	Ensaio Frigorífico vs Congelador.....	62
2.4.2.2.3.	Ensaio Luminosidade vs Escuridão.....	64
2.4.2.3.	Estudos de adsorção da matriz de suporte (LECA).....	65
2.4.2.3.1.	Caracterização física e química da matriz de suporte.....	65
2.4.2.3.2.	Preparação do meio de suporte (LECA 2/4).....	66
2.4.2.3.3.	Ensaio de remoção do atenolol através da LECA.....	66
2.4.2.3.3.1.	Influência do tempo de contacto e concentração inicial na remoção do atenolol da água pela LECA.....	67
2.4.2.4.	Montagem e Optimização dos ensaios de SSFCW.....	70
2.4.2.5.	Operação dos microcosmos de leitos construídos de macrófitas e recolha de amostras.....	71
III -	Apresentação e Discussão de Resultados.....	74
3.1.	Método analítico para detecção e quantificação do atenolol.....	74
3.1.1.	Optimização das condições de quantificação espectrofotométrica.....	74
3.1.2.	Análise cromatográfica.....	74
3.1.3.	Quantificação do atenolol.....	77
3.1.2.1.	Rectas de Calibração.....	78
3.1.2.2.	Parâmetros de validação do método para o HPLC-DAD e HPLC-UV.....	79
3.2.	Optimização do método de SPE.....	81
3.2.1.	Influência do volume de amostra e da concentração na percentagem de recuperação do atenolol em amostras de águas residuais dopadas.....	84
3.2.2.	Tratamento Estatístico.....	85
3.3.	Remoção do atenolol pelos microcosmos de leitos construídos de macrófitas.....	86

3.3.1.	Estudos de Estabilidade e Conservação	86
3.3.1.1.	Ensaio vidro vs plástico	87
3.3.1.2.	Ensaio luz vs escuridão	88
3.3.1.3.	Ensaio frigorífico vs congelador	92
3.3.2.	Estudos de retenção do atenolol na matriz de suporte (LECA).....	94
3.3.2.1.	Caracterização física e química da matriz sólida e da água residual ...	95
3.3.2.2.	Eficiência de remoção do fármaco atenolol pelo meio de suporte (LECA 2/4).....	97
3.3.2.2.1.	Eficiência de remoção do meio de suporte (LECA 2/4) quando em contacto com soluções de água dopadas com atenolol.....	97
3.3.2.2.2.	Eficiência de remoção do meio de suporte (LECA 2/4) em contacto com efluente dopado com atenolol.....	102
3.3.3.	Cinéticas de remoção do atenolol nos leitos.....	107
3.3.4.	Eficiência de remoção do atenolol pelos sistemas microcosmos SSFCW	109
IV -	Conclusões e Perspectivas Futuras.....	115
V -	Bibliografia	119
VI -	Anexos.....	A1
	Anexo 1 - Publicações/comunicações no âmbito deste trabalho.....	A2
	Anexo 2 - Rectas de calibração do padrão atenolol.....	A18
	Anexo 3 - Estudos de optimização de SPE	A24
	Anexo 4 - Validação do método analítico	A32
	Anexo 5 - Ensaios de estabilidade e conservação do atenolol.....	A38
	Anexo 6 - Ensaios de avaliação da capacidade de remoção de atenolol pela LECA.....	A40
	Anexo 7 - Eficiência de remoção do atenolol em LCMs	A42

Índice de Figuras

Figura 1 – Possíveis rotas de fármacos no meio ambiente.....	12
Figura 2 – Três tipos de receptores adrenérgicos β	17
Figura 3 – Estrutura química do atenolol.....	18
Figura 4 – Leito construído de Macrófitas.....	26
Figura 5 – Leito de macrófitas utilizado como sistema terciário.....	27
Figura 6 – Leito de macrófitas utilizado como sistema secundário.....	27
Figura 7 – Esquema de um leito com fluxo superficial.....	30
Figura 8 – Representação esquemática de um LM-ESSH.....	31
Figura 9 – Representação esquemática de um LM-ESSV descendente.....	31
Figura 10 – Representação esquemática da formação de biofilme.....	32
Figura 11 – Representação esquemática da formação do biofilme aderido ao material filtrante e nas raízes.....	32
Figura 12 – <i>Phragmites australis</i>	37
Figura 13 – Colunas de SPE utilizadas no trabalho.....	43
Figura 14 – Principais passos associados à extracção em fase sólida.....	44
Figura 15 – Rebentos de plantas de <i>Phragmites australis</i> utilizadas nos ensaios.....	61
Figura 16 – Leitos de LECA plantados com <i>Phragmites australis</i>	61
Figura 17 – Esquema dos ensaios (Vidro vs Plástico) para uma solução de atenolol 10 mgL ⁻¹ e 50 mgL ⁻¹	62
Figura 18 – Ensaio de conservação da solução atenolol (10 mgL ⁻¹ e 50 mgL ⁻¹) - Frigorífico vs Congelador.....	63
Figura 19 – Ensaio de Estabilidade da solução atenolol (10 mgL ⁻¹ e 50 mgL ⁻¹) - Luminosidade vs Escuridão.....	64
Figura 20 – Esquema da montagem dos ensaios da LECA com atenolol em solução aquosa.....	68
Figura 21 – Esquema da montagem dos ensaios da LECA com atenolol em efluente.....	69
Figura 22 – Diagrama esquemático da montagem experimental usada nos ensaios de remoção do atenolol.....	70

Figura 23 – Leitões construídos de macrófitas de fluxo sub-superficial utilizados no trabalho	71
Figura 24 – Espectro de absorção de uma solução de atenolol com uma concentração de 10 mgL ⁻¹	74
Figura 25 – Cromatograma obtido por HPLC – DAD para uma solução padrão de atenolol 10mgL ⁻¹ ..	76
Figura 26 – Cromatograma obtido por HPLC – DAD para uma solução padrão de atenolol 60mgL ⁻¹ ..	76
Figura 27 – Cromatograma obtido por HPLC – UV para uma solução padrão de atenolol 10mgL ⁻¹ ..	77
Figura 28 – Cromatograma obtido por HPLC – UV para uma solução padrão de atenolol 60mgL ⁻¹ ..	77
Figura 29 – Influência dos diferentes materiais constituintes das colunas de SPE, ajustes de pH (7 e 12) e do passo de lavagem na recuperação de atenolol a partir de amostras de água.....	83
Figura 30 - Concentração de solução atenolol 10 mgL ⁻¹ em contacto com vidro e plástico em função do tempo (h).....	87
Figura 31 - Concentração de solução atenolol 50 mgL ⁻¹ em contacto com vidro e plástico em função do tempo (h).....	87
Figura 32 – Esquema da fotodegradação do atenolol a pH 7,4.....	90
Figura 33 - Concentração de solução atenolol 10 mgL ⁻¹ na luz e na escuridão em função do tempo.	90
Figura 34 - Concentração de solução atenolol 50 mgL ⁻¹ na luz e na escuridão em função do tempo.	90
Figura 35 – Cromatograma obtido para uma solução de atenolol 10 mgL ⁻¹ por HPLC-DAD no dia 10/07/2008 (Início do ensaio).	91
Figura 36 – Cromatograma obtido para uma solução de atenolol 10 mgL ⁻¹ por HPLC-DAD no dia 16/07/2008 (ao fim de 144 h).....	91
Figura 37 – Concentração de solução atenolol 10 mgL ⁻¹ acondicionadas no frigorifico e no congelador em função do tempo (h).....	93
Figura 38 – Concentração de solução atenolol 50 mgL ⁻¹ acondicionadas no frigorifico e no congelador em função do tempo (h).....	93

Figura 39 – Imagem da LECA obtida através de microscópio electrónico de varrimento.	96
Figura 40 – Efeito do tempo de contacto e concentrações iniciais na eficiência de remoção de atenolol na água.	98
Figura 41 – Quantidades removidas de atenolol da água pela LECA 2/4, para concentrações iniciais de 1, 10, 35 e 50 mgL ⁻¹ em função do tempo de duração do ensaio.	99
Figura 42 – Percentagens de Remoção de atenolol para diferentes concentrações (1, 10, 35, 50 mgL ⁻¹) em função do tempo (h).....	100
Figura 43 – Remoção de atenolol (mg atenolol/g de LECA) para diferentes concentrações (1, 10, 35, 50 mgL ⁻¹) em função do tempo (h).....	101
Figura 44 – Efeito do tempo de contacto e concentrações iniciais nas eficiências de remoção de atenolol no efluente pela LECA.....	102
Figura 45 - Quantidades removidas de atenolol do efluente pela LECA 2/4, para concentrações iniciais de 1, 10, 35 e 50 mgL ⁻¹	104
Figura 46 – Verificação de um perfil de cinética de 1ª ordem (entre as 6 e as 96 h) para os ensaios da LECA com efluente.....	105
Figura 47 – Percentagens de Remoção de atenolol para diferentes concentrações (1, 10, 35, 50 mgL ⁻¹) em função do tempo (h).....	106
Figura 48 – Remoção de atenolol (mg atenolol/g de LECA) para diferentes concentrações (1, 10, 35, 50 mgL ⁻¹) em função do tempo (h).....	106
Figura 49 – Cinética de remoção do atenolol pelos leitos plantados com <i>Phragmites</i> e leitos não plantados (apenas LECA). Representação da cinética da biodegradação do atenolol somente no efluente.....	108
Figura 50 – Cinética da remoção do atenolol (log C vs Tempo (h)), até às 96 h.....	108
Figura 51 – Gráfico que relaciona a taxa de remoção do atenolol com a evolução temporal (h) do ensaio para o leito plantado com <i>Phragmites</i> , leito não plantado (LECA) e efluente.	110
Figura 52 – Eficiências de remoção de atenolol nos leitos plantados com <i>Phragmites</i> , nos leitos de LECA e no efluente após 96 h de tempo de retenção.	111

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Consumo (toneladas/ano) anual de diferentes classes de fármacos em diferentes países.....	9
Tabela 2 - Tipo e concentração de fármacos e seus metabolitos encontrados em amostras ambientais (μgL^{-1}).....	14
Tabela 3 – Solubilidade do atenolol em diferentes solventes a 25°C.....	21
Tabela 4 – Valores de pKa do atenolol.....	22
Tabela 5 – Características e fabricantes dos materiais utilizados.....	53
Tabela 6 – Fórmula química, riscos e segurança, grau de pureza, massa molar e fabricantes dos reagentes utilizados.	54
Tabela 7 – Propriedades físico-químicas relevantes do atenolol.....	55
Tabela 8 – Soluções padrão de atenolol (mgL^{-1}) preparadas para construção das rectas de calibração.....	57
Tabela 9 – Rectas de calibração ($y = ax + b$), LOD e LOQ relativamente ao atenolol, para os dois equipamentos de HPLC – VALORES BAIXOS.	79
Tabela 10 – Rectas de calibração ($y = ax + b$), LOD e LOQ relativamente ao atenolol, para os dois equipamentos de HPLC – VALORES ALTOS.	79
Tabela 11 – Parâmetros de validação do método para o HPLC-DAD.....	80
Tabela 12 – Parâmetros de validação do método para o HPLC-UV.....	80
Tabela 13 – Valores das percentagens de recuperação, desvio padrão e desvio padrão relativo, obtidos para os diferentes métodos e utilizando as diferentes colunas de SPE...	84
Tabela 14 – Influência do volume de amostra e concentração na taxa de recuperação do atenolol em águas residuais dopadas obtidas utilizando cartuchos LiChrolut ® C ₁₈	85
Tabela 15 – Propriedades físico-químicas do efluente utilizado nos ensaios.....	97
Tabela 16 – Eficiências de remoção do atenolol nos ensaios com leitos plantados com <i>Phragmites</i> , em leitos não plantados de LECA e em efluente, após 96 h de tempo de retenção.....	111

Introdução

Introdução

A contaminação dos meios aquáticos com resíduos de fármacos tem vindo a destacar-se recentemente como uma das questões-chave em química ambiental. Devido 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, têm-se ultimamente conduzido numerosos estudos de monitorização, os quais revelaram uma vasta gama de compostos farmacêuticos activos (CFAs) presentes em baixas concentrações (μgL^{-1} - ngL^{-1}) em águas naturais e em efluentes (Daughton e Ternes 1999; Fent *et al.* 2006; Hernando *et al.* 2007; Nikolaou *et al.* 2007).

Na sociedade moderna, um número crescente de fármacos é usado no tratamento e na prevenção de várias doenças. As drogas ingeridas são apenas parcialmente absorvidas pelo organismo o que, em adição às suas crescentes taxas de consumo global, resulta na introdução contínua de uma ampla variedade de fármacos e seus metabolitos nos sistemas de tratamento de águas residuais. Os estudos têm demonstrado que os CFAs são apenas parcialmente removidos pelos processos convencionais de tratamento de águas residuais utilizados nas estações de tratamento de águas residuais (ETARs), resultando na descarga de efluentes contaminados nos meios receptores hídricos (Fent *et al.* 2006; Gros *et al.* 2006; Maurer *et al.* 2007).

Os β -bloqueadores como o atenolol são utilizados no tratamento da pressão arterial elevada, assim como na recuperação de ataques cardíacos. Em vários estudos foram detectados vestígios destas substâncias em águas superficiais, subterrâneas e residuais, indicando assim a sua incompleta degradação em ETARs (Gros *et al.* 2006; Hernando *et al.* 2007; Maurer *et al.* 2007; Palmer *et al.* 2008; Snyder 2008). Para além das baixas concentrações detectadas, esses estudos também mostram alguns dos efeitos prejudiciais destes compostos em ecossistemas aquáticos.

Tendo em vista o aumento da eficiência das ETARs na remoção de CFAs tais como o atenolol, têm-se tentado optimizar os processos convencionais de tratamento de águas residuais, como por exemplo através do aumento dos tempos de residência das lamas. Algumas tecnologias avançadas têm também sido avaliadas, nomeadamente

processos oxidativos avançados, adsorção com carvão activado, filtração por membrana e bio-reactores de membrana (Benner *et al.* 2008; Esplugas *et al.* 2007; Fent *et al.* 2006; Kim *et al.* 2007; Radjenovic *et al.* 2007; Snyder *et al.* 2007). Porém, apesar das, por vezes, elevadas eficiências de remoção atingidas, a relação custo-eficácia destes processos é desfavorável em larga escala (Fent *et al.* 2006). Consequentemente, existe uma necessidade crescente de encontrar novos sistemas de tratamento de águas residuais para a remoção de CFAs das águas e que possuam maior eficácia a um custo razoável de operação/manutenção (Lens *et al.*, 2001; Sezerino *et al.*, 2004).

Os sistemas de leitos construídos de macrófitas com fluxo sub-superficial (LCFSS) são sistemas de tratamento de águas residuais com baixo custo de operação e manutenção, consistindo em leitos vegetais inundados, projectados para tirar partido da bem conhecida capacidade depurativa dos leitos naturais (Vymazal *et al.* 1998). Estes sistemas têm sido cada vez mais utilizados para providenciar uma forma de tratamento secundário ou terciário de águas residuais e já foram aplicados com sucesso na remoção de alguns compostos orgânicos recalcitrantes de águas contaminadas, como pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) ou explosivos (Haberl *et al.* 2003; Williams 2002). Contudo, até ao momento, apenas um pequeno número de estudos foi realizado abordando o tema da remoção de resíduos de fármacos por estes sistemas (Dordio *et al.* 2007; Gross *et al.* 2004; Matamoros *et al.* 2005; Matamoros *et al.* 2007; Matamoros *et al.* 2008a; Matamoros *et al.* 2008b), provavelmente devido à apenas recente sensibilização e preocupação com estes contaminantes aquáticos.

A depuração de águas residuais em LCFSSs é alcançada pela acção conjunta entre rizomas de plantas, microorganismos e componentes da matriz de suporte. A eficiência dos LCFSSs pode ser significativamente melhorada através da optimização das condições de operação e da selecção do tipo de matriz de suporte e plantas a usar. Assim, quando se projecta um LCFSS é importante seleccionar uma matriz com elevada capacidade de sorção, a qual vai depender das propriedades físico-químicas do material escolhido. Estudos anteriores demonstraram que os agregados de argilas expandidas à luz (*Light Expanded Clay Aggregates*, LECA) são capazes de remover da água, por sorção, outros fármacos (Dordio *et al.* 2007; Dordio *et al.* 2009b). No que respeita à vegetação, as plantas aquáticas desempenham um papel central nos mecanismos de depuração que

ocorrem num LCFSS uma vez que proporcionam suporte para o crescimento de microorganismos e promovem a remoção de uma variedade de poluentes por adsorção nas raízes, absorção ou degradação (Brix 1997; Vymazal *et al.* 1998). A vegetação emergente mais frequentemente utilizada em LCFSSs inclui várias espécies de macrófitas tais como a tábua (*Typha* spp.) e o caniço (*Phragmites australis*) (Vymazal *et al.* 1998; Turgut 2007; Cooper *et al.* 1996).

O objectivo principal do presente trabalho foi avaliar a eficiência de microcosmos de leitos construídos de macrófitas na remoção de atenolol de águas residuais contaminadas, utilizando LECA como matriz de suporte e plantados com *Phragmites australis*. Pretendeu-se também desenvolver e otimizar uma metodologia analítica adequada para a detecção e quantificação do atenolol em amostras aquosas (águas e efluentes), utilizando separação cromatográfica por HPLC e detecção espectrofotométrica (UV-Vis e DAD). Considerando a possibilidade de, em algumas amostras, as concentrações do analito se encontrarem abaixo dos limites de quantificação dos equipamentos, pretendeu-se também desenvolver um procedimento de limpeza e pré-concentração de amostra por extracção em fase sólida (SPE).

O presente trabalho está dividido em quatro partes principais: na primeira parte faz-se uma breve revisão bibliográfica sobre as perspectivas gerais associadas à ocorrência, presença, destino e persistência de fármacos no ambiente, os β -bloqueadores, com especial destaque para o fármaco que se pretende remover (atenolol), os processos de remoção de fármacos e tratamento das águas e os métodos de extracção e análise destes compostos; a segunda parte do trabalho corresponde à descrição dos materiais e métodos utilizados; na terceira parte apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos, e, por último, na quarta parte do trabalho tecem-se algumas conclusões e perspectivam-se possíveis trabalhos futuros para complementar o estudo efectuado.

I - Revisão Bibliográfica

I - Revisão Bibliográfica

1.1. Compostos de origem farmacêutica

Hoje em dia estão registadas 100.000 substâncias químicas diferentes na União Europeia, dos quais 30.000 destes produtos são comercializados em quantidades maiores que 1 tonelada (Giger, 2002). Entre eles, estão os compostos farmacêuticos, que nos últimos anos foram classificados como contaminantes ambientais emergentes (Bila e Dezotti, 2003).

Por fármaco entende-se qualquer substância biologicamente activa, de origem externa ao organismo, capaz de modificar o metabolismo das células sobre as quais vai actuar. No campo da medicina utilizam-se com fins terapêuticos, de diagnóstico ou preventivos (Daughton e Ternes, 1999). O constante progresso da medicina faz com que novas drogas com novas substâncias activas sejam disponibilizadas no mercado para diversos tratamentos. Os produtos farmacêuticos representam mais de 4.000 moléculas em 10.000 especialidades diferentes (Beausse, 2004).

Os fármacos são assim considerados contaminantes ambientais devido a serem compostos bio-activos geralmente desenvolvidos e sintetizados de acordo com alguns requisitos rígidos, de modo a desempenharem plenamente o seu papel no diagnóstico, profilaxia e tratamento de doenças. Deste modo são desenhados e produzidos de modo a permitirem uma boa bio-disponibilidade, uma alta actividade farmacológica, uma baixa incidência de efeitos secundários, e um modo de administração simples (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Daughton e Ternes, 1999; Jones *et al.*, 2002; Miao *et al.*, 2002).

À excepção dos antibióticos e dos anti-neoplásicos, o objectivo da maior parte das classes de fármacos é simplesmente controlar os sintomas e não curar realmente as doenças. Como tal, muitos fármacos são tomados por períodos muito longos, por vezes, durante boa parte da vida do utilizador (Daughton e Ternes, 1999).

De modo a estarem coniventes com estas necessidades gerais, os fármacos possuem normalmente características comuns, tais como actividades biológicas específicas e resistência relativa à bio-transformação. Contudo, essas características comuns são também responsáveis pela maioria das preocupações ambientais associadas

aos fármacos, uma vez que, uma grande quantidade farmacológica pode conduzir a uma actividade biológica noutras espécies presentes no ambiente. Concomitantemente, a resistência à bio-transformação implica que os fármacos sejam de alguma forma, resistentes à degradação e isto pode levar a um certo grau de persistência ambiental. (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Daughton e Ternes, 1999; Jones *et al.*, 2002; Miao *et al.*, 2002).

O efeito dos fármacos no ambiente e na saúde humana deve então ser analisado de maneira ordenada e qualitativa tendo em consideração as preocupações especiais e as necessidades da sociedade dentro das classes e produtos (Melo *et al.*, 2009).

Muitos acreditam que, de todos os poluentes emergentes, os antibióticos são os mais preocupantes, já que as suas emissões no ambiente podem para além de contaminar os recursos hídricos aumentar a ocorrência de bactérias resistentes na natureza. O aumento do uso e tipos de antibióticos durante as últimas cinco décadas resultou numa selecção genética de bactérias resistentes, com efeito a longo prazo e provavelmente irreversível (Sanderson *et al.*, 2004).

Contudo, outros compostos emergentes, especialmente os polares, tais como os fármacos ácidos, os pesticidas ácidos e os metabolitos ácidos de surfactantes não-iónicos, também merecem particular atenção (Daughton e Ternes, 1999).

Sanderson *et al.* (2004), estudando a toxicidade de fármacos, demonstraram que as hormonas sexuais encontram-se entre os mais tóxicos para uma série de organismos aquáticos. Essas hormonas sintéticas são compostos que actuam como sinais e desencadeiam as suas funções mesmo em concentrações extremamente baixas (na ordem dos nanogramas), portanto representam um perigo potencial para a biota aquática residente nos locais de despejo de efluentes ou esgotos *in natura* (Filho *et al.*, 2001).

Os metabolitos e os produtos de transformação fisico-química, como por exemplo aqueles que resultam da dissociação ou da fotodegradação do fármaco, podem ter maior ou menor actividade fisiológica que o composto inicial (Daughton e Ternes, 1999).

Ao estudar a contaminação de ambientes aquáticos através de fármacos, têm que ser considerados vários factores que podem gerar confusão. Os resíduos de fármacos na natureza não estão restritos a medicamentos receitados, e um elevado número de fármacos é também utilizado em veterinária. Para além disto, outras drogas podem ser

usadas para consumo ilegal, e não podem ser seguidas através dos circuitos comerciais habituais, deixando de ser elegíveis para monitorização uma vez que é impossível ter estatísticas oficiais de uso/consumo. Além da contaminação devida aos compostos primários, os produtos de degradação e os metabolitos destes compostos são também um problema ambiental adicional. A actividade biológica de alguns destes metabolitos é semelhante à actividade farmacológica descrita para os compostos primários, não o sendo para outros. A avaliação toxicológica em pacientes humanos também pode ser diferente da toxicidade exibida em modelos utilizando animais, e as correlações entre dados para toxicidade humana e animal são escassas e mal compreendidas (Olson *et al.*, 2000).

Os efeitos de toxicidade costumam ser observados somente em concentrações acima de $1 \mu\text{gL}^{-1}$, no entanto, é importante salientar que os bioensaios de toxicidade focam efeitos agudos, quando na realidade os organismos são expostos a baixas concentrações de forma contínua e, portanto, efeitos crónicos são mais prováveis (Melo *et al.*, 2009). Para a maioria dos fármacos, os valores de EC50 (concentração máxima efectiva de meia vida) variaram entre 10 e 100mgL^{-1} (toxicidade moderada) (Melo *et al.*, 2009).

Ainda que actualmente não se conheçam bem os seus riscos, uma das prioridades actuais está assim relacionada com a presença destes fármacos residuais na água e já se começou a investigar quais são os potenciais efeitos adversos para a saúde humana, animal e de organismos aquáticos e a forma de eliminá-los no meio ambiente (Daughton e Ternes, 1999).

1.1.1. Ocorrência e destino de fármacos no meio ambiente

A ocorrência de fármacos nas águas naturais e residuais representa actualmente um importante tópico internacional. Algumas toneladas de medicamentos são produzidas por ano e aplicados na medicina humana e veterinária (Bila e Dezotti, 2003).

Os fármacos são projectados para atingirem órgãos ou rotas metabólicas e moleculares específicas tanto nos humanos como em animais, mas também possuem frequentemente efeitos colaterais importantes. A presença desses múltiplos compostos no ambiente pode assim interferir significativamente na fisiologia, no metabolismo e no

comportamento das espécies e além de causar efeitos secundários, os quais podem alterar a defesa imunológica de organismos tornando-os mais susceptíveis á presença de parasitas e doenças (Petrovic *et al.*, 2003).

O consumo mundial de fármacos é assim bastante significativo, um exemplo disso pode ser visto na União Europeia (UE) onde aproximadamente 3.000 diferentes substâncias são usadas em medicamentos para consumo humano como analgésicos e antiinflamatórios, antibióticos, β -bloqueadores, reguladores de lipídicos, e muitos outros (Ponezi *et al.*, 2006). A Tabela 1 apresenta o consumo de alguns fármacos em vários países da Europa em diferentes anos.

Tabela 1 – Consumo (toneladas/ano) anual de diferentes classes de fármacos em diferentes países (Fent *et al.*, 2006; Infarmed, 2009).

Composto	Alemanha (2001)	Áustria (1997)	Portugal (2006)	Austrália (1998)	Inglaterra (2000)	Itália (2001)	Suíça (2004)
Analgésicos, Antipiréticos e Anti-inflamatórios							
Paracetamol	621,65	35,08	40,34	295,90	390,90	-	95,20
Naproxeno	-	4,63	-	22,80	35,07	-	1,70
Ibuprofeno	344,89	6,70	28,90	14,20	162,20	1,90	25,00
Diclofenac	85,80	6,14	17,43	-	26,12	-	4,50
β - bloqueadores							
Atenolol	-	-	25,67	-	28,98	22,07	3,20
Metoprolol	92,97	2,44	-	-	-	-	3,20
Antiepilépticos							
Carbamazepina	87,60	6,33	7,82	9,97	40,35	-	4,40
Diazepam	-	-	-	0,21	-	-	0,05

Datas: representam o ano de amostragem.

Estudos demonstram que o nível de concentração dos fármacos encontrados em ambientes aquáticos está relacionado com o padrão de consumo dos mesmos pela população, pela taxa de remoção nas ETARs, pelo tipo de efluente que aporta nas ETARs e pela sazonalidade (Ternes *et al.*, 1998; Lindqvist *et al.*, 2005; Castiglioni *et al.*, 2006; Melo *et al.*, 2009).

Embora alguns fármacos não sejam persistentes, a sua entrada continua no ambiente aquático pode conduzir à descoberta de níveis residuais. Os agentes

terapêuticos podem assim ser considerados como a maior classe de compostos químicos caracterizada pelo seu uso contínuo e indiscriminado e pela sua actividade biológica. (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Daughton e Ternes, 1999; Jones *et al.*, 2002; Miao *et al.*, 2002).

Verifica-se assim que os efluentes das ETARs são a principal fonte de introdução de fármacos e seus metabolitos em ecossistemas aquáticos, tendo sido detectados e quantificados uma enorme variedade de fármacos em efluentes provenientes de ETARs de diversas cidades Europeias (Daughton e Ternes, 1999; Ternes *et al.*, 2002; Petrovic *et al.*, 2003; Carballa *et al.*, 2004; Larsen *et al.*, 2004; Stackelberg *et al.*, 2004).

Para além dos fármacos de uso humano, um sem número de outros compostos têm sido libertados no ambiente como consequência do seu uso. Entre estes, os fármacos para veterinária/agricultura e os produtos de higiene pessoal são de extrema importância, uma vez que representam uma elevada carga de compostos inimigos do ambiente, despejados em grandes quantidades nos ecossistemas aquáticos. As concentrações destes resíduos até ao momento não supõem um risco para a saúde humana. O que preocupa os especialistas e investigadores é que em cada litro de água não só poderá haver um fármaco isolado, como também muitos outros fármacos que poderão interagir entre eles. Outro factor a ter em conta é, deste modo, o efeito acumulativo no ecossistema (Melo *et al.*, 2009).

Largos esforços têm sido dedicados nas últimas décadas ao aumento progressivo na eficácia de eliminação de vários compostos pelas ETARs.

No entanto o aumento incontestável na capacidade das ETARs em lidar com os poluentes convencionais (nutrientes, micróbios), não contemplou certos compostos químicos naturais ou sintéticos, tais como os fármacos seus metabolitos e compostos de degradação, uma vez que estes compostos são libertados em elevado número e são geralmente resistentes à biodegradação. Têm sido publicados diversos estudos estabelecendo uma ligação entre resíduos de fármacos nas águas residuais e sua consequente presença na natureza, onde exercem efeitos nocivos nos organismos aquáticos. Para além da simples questão ambiental, a presença de resíduos de fármacos no ciclo da água também pode ser uma questão de saúde humana, uma vez que é de absoluta importância a obtenção de padrões de qualidade da água adequados para uso humano e para consumo (Petrovic *et al.*, 2003). A presença de fármacos em ambientes

aquáticos, evidenciada em numerosos estudos, encontra-se reportada num artigo de revisão por Daughton e Ternes (1999).

As unidades hospitalares também são obviamente uma fonte de resíduos de fármacos que, para além da sua actividade biológica intrínseca, também podem conter compostos organo-halogenados adsorvíveis, que são tóxicos para humanos e outros organismos, sendo ainda persistentes no ambiente e possivelmente bioacumulados nas cadeias alimentares (Kummerer *et al.*, 1998). As águas residuais provenientes de instalações hospitalares podem também ser responsáveis pela introdução de substâncias mutagénicas/carcinogénicas no ambiente, tais como o agente antineoplásico ciclofosfamida, como demonstrado por Steger-Hartmann (1997).

Uma outra fonte de contaminação ambiental resulta da deposição de resíduos provenientes de indústrias farmacêuticas em aterros sanitários, contaminando as águas de subsolo nas proximidades do aterro (Bila e Dezotti, 2003).

Vários autores relataram assim que as principais vias de exposição destas substâncias no ambiente provêm de efluentes hospitalares, produção industrial, efluente doméstico e também da deposição em aterros e excreções animais como por exemplo, os promotores de crescimento utilizados em aquicultura ou da aplicação no campo de excremento de animais tratados com drogas (Ternes *et al.*, 2002; Beausse, 2004; Sanderson *et al.*, 2004; Fent *et al.*, 2006).

De acordo com Richardson e Bowron (Richardson e Bowron, 1985), nas ETARs há três destinos possíveis para qualquer fármaco individual:

1. Pode ser biodegradado, ou seja, mineralizado a gás carbónico e água, como por exemplo, o ácido acetilsalicílico;
2. Pode passar por algum processo metabólico ou ser degradado parcialmente, como as penicilinas;
3. Pode ser persistente.

Apesar de tudo, ainda pouco se conhece sobre as rotas dos fármacos no meio ambiente. A Figura 1 apresenta um esquema que sugere possíveis rotas para os fármacos, quando libertados no meio ambiente (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Hirsch *et al.*, 1998; Heberer *et al.*, 2002; Bila e Dezotti, 2003).

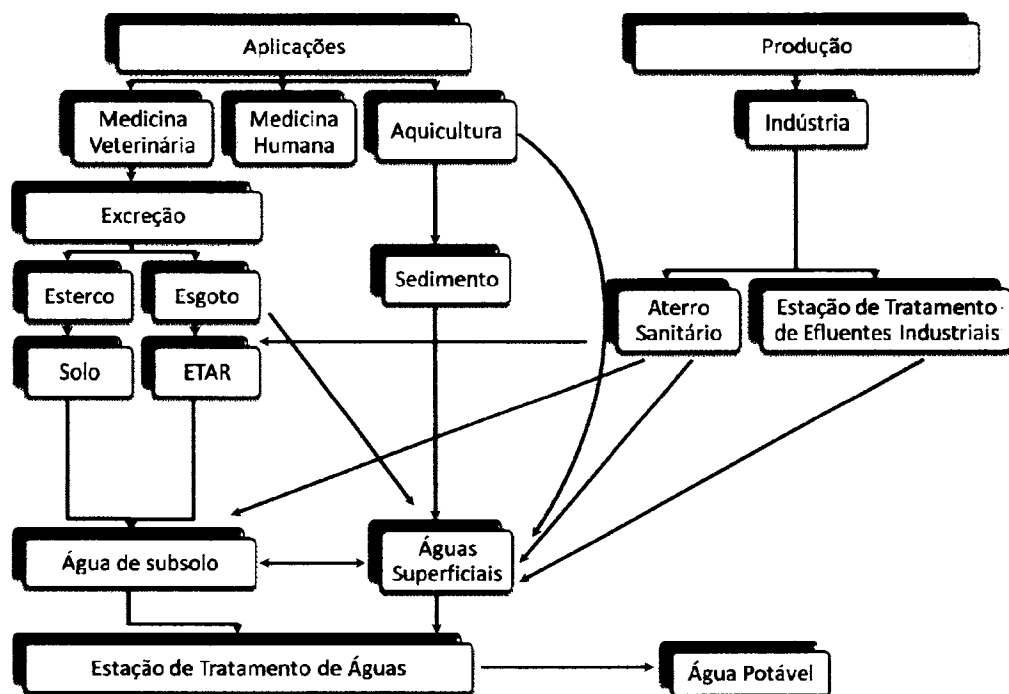


Figura 1 – Possíveis rotas de fármacos no meio ambiente; adaptado de (Bila e Dezotti, 2003).

Um grande problema é que os fármacos não são prontamente degradados durante o tratamento de efluentes e são lançados nos corpos de água, resultando na contaminação de rios, lagos, estuários, oceanos e em poucos casos em águas subterrâneas. As lamas geradas no processo são por vezes lançadas em campos agrícolas, estas podem causar contaminação do solo, águas superficiais e percolação para águas subterrâneas. O mesmo pode ocorrer com substâncias utilizadas no uso veterinário (Bila e Dezotti, 2003).

Os fármacos são habitualmente eliminados na urina ou nas fezes, geralmente quando são químicos mais solúveis em água, quando comparados a compostos semelhantes. O aumento da solubilidade na água é de grande importância, uma vez que é a causa da presença dos fármacos e/ou dos seus metabolitos no meio ambiente. Para além disso, os tratamentos de efluentes que utilizam plantas que existem actualmente, não estão significativamente preparados nem foram concebidos para tratar os químicos inertes e os compostos estáveis tais como alguns fármacos. Esta lacuna na depuração de alguns fármacos da água dos esgotos conduz a uma capacidade de eliminação geralmente baixa (Petrovic *et al.*, 2003). As metodologias de tratamento utilizadas na actualidade revelam

assim frequentemente ineficiências cruciais e eficiências de eliminação insatisfatórias as quais conduzem à entrada continua destes compostos no meio ambiente (Nunes, 2006).

A segurança para os consumidores está protegida por legislação que obriga a indústria farmacêutica a prolongados estudos para avaliar possíveis reacções adversas dos medicamentos nos seus utilizadores. Em contraste pouco se sabe sobre os possíveis efeitos destes compostos nos organismos aquáticos ou terrestres que possam acidentalmente entrar em contacto com eles, ou sobre os efeitos que estes possam provocar no meio ambiente (Fent *et al.*, 2006).

Actualmente, um ponto crítico neste tema é saber se existe um nível elevado de fármacos no meio ambiente, que sejam suficientes para exercer efeitos adversos em seres vivos. Esta questão estimula o desenvolvimento de estudos de impacto ambiental causado por diferentes fármacos presentes no meio ambiente. Dados ecotoxicológicos têm sido levantados por pesquisadores, para se identificarem fármacos que são potencialmente perigosos para o meio ambiente, porém, os dados disponíveis na literatura são escassos e insuficientes. A ocorrência desses fármacos residuais em águas superficiais e subterrâneas demonstra uma necessidade de estudos que determinem os efeitos tóxicos desses fármacos relativamente ao meio ambiente (Bila *et al.*, 2003).

Trabalhos de pesquisas no campo de análises químicas tem relatado a presença de fármacos em efluentes de (ETARs), águas de abastecimento (ETAs) e em outras matrizes ambientais tais como solos, sedimentos e águas naturais em concentrações na faixa de μgL^{-1} e ngL^{-1} , em várias partes do mundo (Vree, 1994; Ternes *et al.*, 1998; Ternes, 2001).

Vieno *et al.* (2006), desenvolveram um método analítico que permitiu a detecção e quantificação de β -bloqueadores em águas residuais provenientes de estações de tratamento e obtiveram uma recuperação de atenolol em quantidades muito superiores ao esperado inicialmente, constituindo desta forma uma preocupação ambiental, pois é utilizado em grandes quantidades, não é facilmente removido em estações de tratamento e pode causar efeitos negativos e irreversíveis em ambientes aquáticos.

Calcula-se, que em média se encontrem, nas águas residuais mais de 20 fármacos de composição distinta, segundo o país e o nível de consumo. O anti-depressivo Prozac (fluoxetina) foi encontrado em lagos e rios do Canadá e dos Estados Unidos. Na Suécia um estudo revelava em meados de 2005 que as águas do rio Høje transportavam

diclofenac, um anti-inflamatório de uso comum, para além disso continham também o antiepiléptico carbamazepina, propranolol, atenolol (β -bloqueadores para a insuficiência cardíaca) e antibióticos. Em Espanha um trabalho do concelho superior de investigações científicas foi o primeiro que deu o alerta em 2005. Foram rastreados os resíduos farmacológicos em 18 pontos distintos do rio Ebro. Em todos apareceram resíduos de medicamentos sendo que os maiores níveis foram encontrados em vários pontos da província de Saragoça e Navarra. Entre os fármacos encontrados em maior proporção salienta-se um regulador do colesterol: o ácido clofibrico, os analgésicos naproxeno e diclofenac, o anti-inflamatório ibuprofeno, o antiepiléptico carbamazepina e o atenolol (Sanchez, 2007).

Na Tabela 2 são apresentados exemplos de alguns fármacos frequentemente detectados em águas naturais e efluentes de ETAR.

Tabela 2 - Tipo e concentração de fármacos e seus metabolitos encontrados em amostras ambientais (μgL^{-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 and 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)
	(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	(Miège <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)

Tabela 2 (continuação)

Composto	Água superficial	Água subterrânea	Água potável	Efluentes de ETARs	Referências
Reguladores lipídicos do sangue					
Ácido clofibríco	(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	(Miège <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 <i>et al.</i> , 2004)
	< 2	-	-	-	(Hao <i>et al.</i> , 2006)
Beta-bloqueadores					
Atenolol	-	< 8,2	-	-	(Sacher <i>et al.</i> , 2001)
	10-60	-	-	160	(Bendz <i>et al.</i> , 2005)
	-	-	-	(0,15) 0,38	(Miège <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)
	30-70	-	-	190	(Bendz <i>et al.</i> , 2005)
Sotalol	-	560	-	-	(Sacher <i>et al.</i> , 2001)
Compostos neuroactivos					
Fluoxetina	1,7	-	-	Não disponível	(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	(Lin <i>et al.</i> , 2005)
	24,56	14-43	-	160-290	(Rabiet <i>et al.</i> , 2006)
	(25) 61	-	-	(226) 729	(Kim <i>et al.</i> , 2007)
	-	-	-	(0,52) 2,30	(Miège <i>et al.</i> , 2009)
(11) 27	-	-	(2499) 4596	(Kasprzyk-Hordern <i>et al.</i> , 2009)	
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)
Ciprofloxacina	-	-	-	250	(Zuccato <i>et al.</i> , 2005)

O comportamento e destino de fármacos e seus metabolitos no ambiente aquático ainda não é bem conhecido, assim não está claro quais os organismos que são afectados e em que grau. A baixa volatilidade destes compostos indica que a distribuição no ambiente

acontecerá principalmente por transporte aquoso, mas também pela cadeia alimentar e dispersão. A grande preocupação ambiental não é necessariamente o volume de produção de um fármaco mas sua persistência no ambiente e sua actividade biológica (por exemplo: toxicidade, bioacumulação dentre outros) (Steger-Hartmann *et al.*, 1997; Buser e Muller, 1998).

1.1.2. A situação em Portugal

Em Portugal, ainda não são conhecidos estudos que permitam conhecer a verdadeira situação em que se encontram os recursos hídricos nacionais em termos de contaminação por fármacos. No entanto, muitos dos compostos já detectados em águas superficiais e subterrâneas bem como em efluentes de ETARs em todo o Mundo são também comercializados em Portugal e por isso mesmo, este problema de contaminação ambiental é também certamente um problema no nosso país. Portugal gasta mais em medicamentos do que a maioria dos países da OCDE – (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico), em termos de consumo *per capita*.

A região do Alentejo apresenta características que a torna particularmente vulnerável a este problema de contaminação ambiental:

- População envelhecida e com uma taxa elevada de consumo de fármacos;
- Zona de produção agrícola com um elevado efectivo animal;
- Algumas zonas com escassez de recursos hídricos.

Os idosos portugueses tomam em média sete medicamentos por dia e, em alguns casos, chegam aos dezassete. Esta é a conclusão alarmante de um estudo recente promovido pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. Os jovens e os adultos também consomem estes cocktails de fármacos, mas no caso dos seniores a situação agrava-se, pois o metabolismo em termos de absorção e eliminação, não funciona tão bem (Barbosa, 2008). Os actuais sistemas de tratamento de águas ainda não prevêem a contaminação residual dos fármacos, sendo que esta situação que não é exclusiva de Portugal, mas que se passa um pouco por todo o mundo. Deste modo será de esperar que se verifique a situação de a população portuguesa estar continuamente a ingerir resíduos de fármacos presentes na água para abastecimento público.

1.1.3. β -bloqueadores

Os β -bloqueadores constituem os princípios activos dos medicamentos utilizados no tratamento da hipertensão arterial, da angina de peito, de situações disríticas e na prevenção secundária de enfarte do miocárdio. Os bloqueadores adrenérgicos β inibem a acção das catecolaminas, adrenalina e noradrenalina, sobre os receptores adrenérgicos β e parte do sistema nervoso simpático (Dahlof *et al.*, 1991; Goodman e Gilman, 2006; Castro, 2006).

Existem três subtipos de receptores adrenérgicos β , genética e farmacologicamente diferentes designados por β_1 , β_2 e β_3 . Como mostra a Figura 2, a estrutura destes receptores apresentam algumas semelhanças, nomeadamente uma cadeia polipeptídica em ziguezague, que atravessa sete vezes a bicamada lipídica da membrana celular, apresentando três alças intracelulares com um grupo carboxílico (COOH) terminal e três extracelulares terminando com um grupo amina (NH₂). Cada subtipo de receptor adrenérgico β tem a sua localização específica: o β_1 localiza-se essencialmente no coração; o β_2 no tracto gastrointestinal, pulmões, fígado e pâncreas; e o β_3 no intestino e tecido adiposo (Emilien e Maloteaux, 1998; Lopez-Sendon *et al.*, 2005).

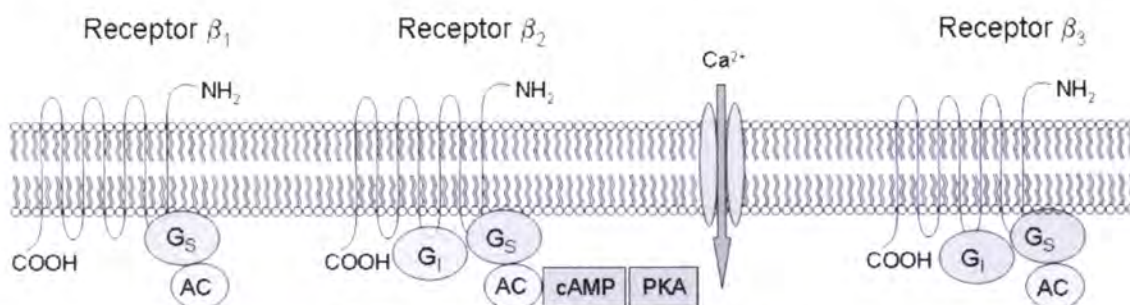


Figura 2 – Três tipos de receptores adrenérgicos β (Castro, 2006).

Estimulados pela adrenalina, os receptores adrenérgicos β_1 desencadeiam efeitos cronotrópicos e ionotrópicos, aumentando a velocidade de condução cardíaca e automaticidade. Os receptores adrenérgicos β_2 , quando estimulados, induzem a relaxação do tecido muscular liso, resultando em vasodilatação e noutras acções que provocam o tremor no tecido muscular esquelético (Goodman e Gilman, 2006).

Os bloqueadores adrenérgicos β podem ser específicos ou inespecíficos para os receptores adrenérgicos β_1 . Todos os bloqueadores adrenérgicos β apresentam uma parte estrutural comum, o grupo oxi-amino-hidroxi, e uma outra, que difere de composto para composto (Castro, 2006).

1.1.3.1. Atenolol

O atenolol (4-[2-hidroxi-3-[(1-metiletil)amino]propoxil]-benzoacetamida), é um bloqueador adrenérgico selectivo β_1 hidrofílico, de fórmula molecular $C_{14}H_{22}N_2O_3$, que tem sido utilizado no tratamento da hipertensão (controla a tensão arterial elevada), angina de peito (aguda e crónica) e arritmia cardíaca, uma vez que é um medicamento muito utilizado por doentes que possuem perturbações do ritmo cardíaco. Pode ainda ser benéfico em situações de enxaqueca e de tremor. Apesar de ser um dos fármacos mais vendidos em todo o mundo, existem poucos dados sobre a sua estrutura no estado sólido (Castro, 2006).

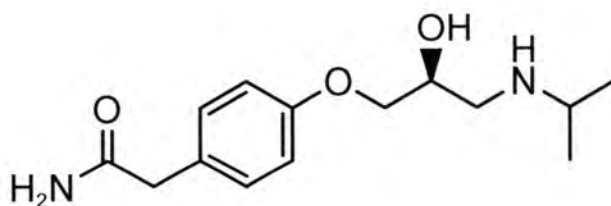


Figura 3 – Estrutura química do atenolol

A existência de um carbono quiral no atenolol confere à molécula a possibilidade de se apresentar nas duas formas enantioméricas, formando compostos com actividade óptica positiva ou negativa e misturas racémicas. O polimorfismo é uma característica comum em compostos orgânicos, sendo espectável a existência de polimorfismo nos bloqueadores adrenérgicos beta. O atenolol é um antagonista de longa duração de acção dos receptores adrenérgicos, possuindo relativa cardioselectividade β_1 , sem actividade simpatomimética intrínseca ou estabilizadora de membrana, que ocorre com alguns medicamentos anti-hipertensivos (Korolkovas *et al.*, 1993; Reynolds e Baron, 1996; USP, 2000; Munson, 2002). Exerce actividade cronotrópica e inotrópica negativa pela inibição dos receptores β_1 adrenérgicos do miocárdio (McEvoy, 1994).

É eficaz e geralmente bem tolerado em pacientes com todos graus de hipertensão, sendo que a administração oral de atenolol reduz significativamente a pressão sanguínea sistólica e diastólica de repouso e atenua o aumento da pressão sanguínea induzida por exercícios (Wadworth *et al.*, 1991).

Dados de estudos comparativos mostram que quando administrado oralmente reduz a pressão sanguínea em proporções similares a doses terapêuticas usuais de outros antagonistas β adrenérgicos, inibidores da enzima conversora de angiotensina, antagonistas do cálcio. Há evidências de redução da mortalidade por distúrbios cardiovasculares durante a terapia prolongada com atenolol em pacientes com hipertensão (Wadworth *et al.*, 1991).

Para o controle da hipertensão, a dosagem inicial para adultos é de 25 a 50 mg uma vez ao dia. A dosagem oral pode ser aumentada para 100 mg diárias para a resposta óptima. O efeito total é usualmente estabelecido dentro de duas semanas. A maioria dos pacientes hipertensos responde a uma dosagem diária de 50 a 100 mg. O atenolol geralmente é administrado uma vez ao dia (McEvoy, 1994; Munson, 2002).

Em Portugal pode ser encontrado sob a forma de comprimidos de 25, 50, bem como 100 mg, e em farmácias hospitalares sob a forma de cápsulas nas concentrações prescritas pelos médicos (Castro, 2006).

As formulações gastro-resistentes demonstraram menor bio-disponibilidade do que formas de libertação imediata, em estudos comparativos entre cápsulas de libertação prolongada e comprimidos de libertação imediata. A presença de comida no estômago pode actuar como um reservatório para as formas de libertação imediata, aumentando a sua bio-disponibilidade. A sua absorção é rápida nos organismos, porém é incompletamente absorvido pelo tracto gastrointestinal (Rouge *et al.*, 1998a).

Em relação à farmacocinética do atenolol, a literatura relata que para indivíduos saudáveis apenas 50 % a 60 % da dose é absorvida pelo trato gastrointestinal após a administração oral. Uma vez atingida a corrente circulatória, o atenolol é rapidamente distribuído para os tecidos devido à sua baixa ligação às proteínas plasmáticas (aproximadamente 6 a 16 %). O pico de concentração plasmática igual a $1-2 \mu\text{g mL}^{-1}$ é alcançado 2 a 4 h após a administração oral (Wadworth *et al.*, 1991; Korolkovas *et al.*, 1993; McEvoy, 1994; Reynolds e Baron, 1996). O efeito de atenolol na taxa cardíaca tem

início após 1 h, alcança o pico em 2 a 4 h e persiste 24 h após a administração oral do fármaco. O efeito anti-hipertensivo e bloqueio β adrenérgico de uma dose oral de 50 a 100 mg persistem por 24 h (McEvoy, 1994).

O atenolol é assim amplamente distribuído na maioria dos tecidos excepto no sistema nervoso central, embora sejam relatadas pequenas fracções da dose administrada atravessando a barreira hemato-encefálica (Wadworth *et al.*, 1991; Korolkovas *et al.*, 1993).

Uma vez que o composto se dissolve muito bem em água, a eliminação do atenolol é predominantemente renal, sendo que a fracção da dose absorvida é recuperada na urina dentro de aproximadamente 48 h (Mason *et al.*, 1979; Wadworth *et al.*, 1991; Leite *et al.*, 2006). Em pacientes com função renal normal, o atenolol tem uma meia-vida de 6 a 8 h. A eliminação é cerca de 6 Lh^{-1} (100 mLmin^{-1}). O metabolismo hepático é mínimo. Aproximadamente 40 a 50 % de uma dose oral é excretada inalterada na urina. O restante é excretado inalterado nas fezes, principalmente como fármaco não absorvido. Cerca de 1 a 12 % é removível por hemodiálise. O fármaco tem muito baixa solubilidade lipídica (Wadworth *et al.*, 1991; Korolkovas *et al.*, 1993; McEvoy, 1994; USP, 2000).

Os efeitos adversos mais frequentemente relatados durante a terapia oral de atenolol para hipertensão, angina de peito e arritmias são: bradicardia, extremidades frias, sintomas gastrointestinais, fadiga, fraqueza, pesadelos, alucinações, distúrbios do sono, dor de cabeça, depressões, distúrbios sexuais. Em geral, esses efeitos são moderados, usualmente tornando-se menos frequentes com a terapia continuada. Os β -bloqueadores podem ainda provocar aumento dos triglicéridos, redução dos níveis de colesterol, e hiperglicemia, e podem mascarar os sintomas habitualmente associados a crises hipoglicémicas.

Deste modo a sua utilização deve sempre estar sujeita a indicação médica e na maioria dos casos estudados, foi necessário suspender o tratamento em apenas 3 a 6 % dos pacientes (Wadworth *et al.*, 1991).

Devido aos elevados consumos do fármaco a nível mundial e a sua frequente detecção em águas superficiais e subterrâneas, nas águas destinadas ao consumo humano e nos efluentes das ETARs, o atenolol foi seleccionado para o presente estudo de remoção por sistemas de leitos construídos de macrófitas, dado que os factos referidos o

tornam num problema ambiental real e preocupante (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Daughton e Ternes, 1999; Azevedo *et al.*, 2000; Lacorte *et al.*, 2001; Heberer, 2002; Heberer *et al.*, 2002; Laganá *et al.*, 2002; Cerejeira *et al.*, 2003; Ferrari *et al.*, 2003; Packer *et al.*, 2003; Vieno *et al.*, 2006).

1.1.3.1.1. *Propriedades físico-químicas do atenolol*

O atenolol é um fármaco de elevada importância sob o ponto de vista farmacêutico e económico entre os bloqueadores adrenérgicos β . No entanto os dados que se encontram na literatura, relativos à sua caracterização estrutural, são escassos e resumem-se essencialmente à determinação de propriedades correntes de caracterização físico-química.

Uma das propriedades do atenolol, que já foi objecto de estudo por vários investigadores, é a solubilidade. Na Tabela 3 são indicados os valores publicados para a solubilidade do atenolol em diferentes solventes.

Tabela 3 – Solubilidade do atenolol em diferentes solventes a 25°C; adaptado de (Castro, 2006).

Solvente	Solubilidade/mg L ⁻¹
Clorofórmio	3,00
Etanol	3,40
Dimetilsulfóxido	18,00
Água	13,30
Sol, HCl 1N	300,00

Dada a sua constituição química, o atenolol é bastante solúvel em água e em solventes polares e menos solúvel em solventes não polares. O valor da sua solubilidade nestes últimos solventes é, todavia, apreciável. A solubilidade elevada em meio de ácido clorídrico deve-se à formação do sal (Castro, 2006).

Dos grupos polares do atenolol o único que apresenta comportamento ácido-base em solução aquosa é o grupo amina. Os valores publicados para a constante de dissociação como ácido são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Valores de pKa do atenolol; adaptado de (Castro, 2006).

Composto	pK _a
	9,60
(R,S)-atenolol	9,57
	9,56
	9,40

O valor encontrado para a constante de equilíbrio mostra que em solução aquosa o grupo aminico encontra-se protonado para valores de pH inferiores aproximadamente 8,5, e na forma de base para valores de pH superiores aproximadamente 10,5.

A primeira síntese do atenolol foi patenteada em diversos países por Barrett *et al.*, da Imperial Chemical House Limited, em 1970 (Barrett *et al.*, 1970; Castro, 2006). Desde então, têm aparecido mais patentes relacionadas com o processo de síntese do composto, sendo também de registar o esforço para se conseguir sintetizar o enantiómero *S*-atenolol por se tratar da forma activa (Bose e Narsaiah, 2005).

O espectro na região do ultra violeta (UV) do composto (*R,S*)-atenolol dissolvido em metanol mostra máximos de absorção a 230, 275 e 283 nm, os quais indicam que o único cromóforo detectável por esta técnica é o grupo fenilo (Burger *et al.*, 1999; Castro, 2006).

Através de estudos efectuados por Castro e Ceresole verificou-se que o atenolol era relativamente estável no estado sólido, não sofrendo degradação, no entanto verificou-se que era instável no estado líquido, sendo o grupo amina a parte mais vulnerável da molécula, tal como seria de esperar (Ceresole *et al.*, 2006; Castro, 2006).

1.2. Processos de remoção de fármacos das águas residuais

O tratamento de águas residuais tem como principal objectivo a remoção da sua carga poluente, manifestada pelas suas características físicas, químicas e biológicas, de forma a produzir um efluente final de qualidade conforme as normas de descarga ou de

reutilização impostas pela legislação vigente e pelos objectivos de qualidade definidos para o meio receptor ou para futuras aplicações (Oliveira, 2008).

A eficácia do tratamento de águas residuais encontra-se intrinsecamente ligada a determinados parâmetros. As massas hídricas, dependendo das suas características bióticas, apresentam uma capacidade natural de auto depuração que lhes podem permitir recuperar dos efeitos da incorporação de massas poluentes num período de tempo limitado. Contudo, a descarga de substâncias que, pela sua composição ou quantidade, alterem profundamente as características da água, podem torná-la incompatível com a vida aquática e com a utilização humana (Sezerino, 2006).

Entre os poluentes de maior preocupação encontram-se os compostos consumidores de oxigénio (e.g. poluentes de origem orgânica) que interferem, essencialmente, com os ciclos naturais do azoto e do fósforo, e substâncias persistentes e bio acumuláveis que podem causar mortalidade, morbilidade, perturbações genéticas e outros efeitos nos organismos vivos, ou mesmo desequilibrar de forma significativa os ecossistemas (Oliveira, 2008).

Recentemente, a monitorização de fármacos residuais no meio ambiente vem ganhando grande interesse devido ao facto de muitas dessas substâncias serem frequentemente encontradas em efluentes de ETARs e águas naturais, em concentrações na faixa de μgL^{-1} e ngL^{-1} (Stumpf *et al.*, 1999).

A presença de fármacos em efluentes de ETARs é reflexo da baixa eficiência de remoção de alguns destes compostos pelos processos convencionais de tratamento utilizados nas ETARs o que leva à contaminação dos meios receptores hídricos. Na tentativa de remover este tipo de poluentes das águas (como o atenolol), o desenvolvimento e aplicação de novas tecnologias de tratamento que permitam a remoção ou diminuição desses compostos têm sido objecto de interesse na área do saneamento ambiental (Filho *et al.*, 2001). Um dos principais objectivos dessas tecnologias é assim melhorar a eficiência do tratamento de resíduos através de processos que consumam menos recursos, especificamente no que respeita à energia e aos materiais (Galvão *et al.*, 2005).

A remoção ou a redução significativa da carga poluente veiculada pelas águas residuais numa ETAR envolve a combinação de operações e processos unitários, que se

distribuem por diferentes níveis de tratamento (preliminar, primário, secundário, terciário e de afinação e o tratamento de lamas). A remoção de sólidos grosseiros e sedimentáveis é conseguida através de processos físicos de separação, como gradagem, tamisação e decantação. A remoção da carga orgânica na forma solúvel e/ou coloidal é, no essencial, realizada por microrganismos, através de processos que privilegiam biomassa fixa, em suspensão ou mista. Uma vez que a prevenção da entrada de fármacos nos ecossistemas aquáticos pode ser a melhor estratégia para enfrentar possíveis problemas ambientais, e dado as ETARs constituírem importantes fontes de contaminação, é necessário aumentar a informação disponível acerca do comportamento dos fármacos e o seu destino final nas ETARs (Castiglioni *et al.*, 2006).

Alguns investigadores recomendam a separação das águas do esgoto das demais para serem especificamente tratadas e disponibilizadas. Porém, após estudos regulares que venham a ser implementados, algumas modificações menores talvez possam ser já adoptadas nas ETARs operantes, como tentativa de se alcançar uma maior eficiência na remoção de fármacos. Por exemplo, o aumento do tempo de retenção hidráulica e consequente aumento de produção de lamas (maior envelhecimento da lama) pode trazer resultados positivos no decréscimo de alguns fármacos, devido ao incremento da actividade microbiana (Metcalf *et al.*, 2003a; Metcalf *et al.*, 2003b).

Actualmente, é possível recorrer a vários processos de afinação para remoção/redução de poluentes refractários como alguns fármacos das águas, cuja eficiência, está dependente das características do poluente, das características da água, do destino a dar às águas tratadas, sejam residuais ou para consumo humano, e da disponibilidade orçamental da entidade que pretende depurar a água. Alguns dos processos avançados de tratamento que têm sido testados neste âmbito incluem processos de membranas, oxidação catalítica e adsorção em carvão activado (Filho *et al.*, 2001).

Dentro do complexo panorama sanitário nacional, parece claro que as tecnologias indicadas como próximas às ideais para remoção deste tipo de poluentes são inviáveis de serem adoptadas pelos órgãos responsáveis pelo saneamento, devido ao elevado custo de implantação principalmente dos tratamentos terciários ou de afinação (Filho *et al.*, 2001).

A implementação de leitos construídos de macrófitas como complemento às unidades de tratamento convencional tem vindo a ser há algum tempo avaliada como uma

alternativa viável (relação custo-benefício) para a redução de compostos orgânicos xenobióticos como os pesticidas. Embora os estudos da eficiência destes sistemas para a remoção de fármacos sejam ainda escassos, Matamoros e Bayona (2006) comprovaram já a viabilidade desses sistemas naturais para a remoção de alguns destes poluentes. De qualquer forma, além da procura de soluções que propiciem a redução/eliminação da carga de produtos farmacêuticos, é essencial a utilização de ensaios de toxicidade específicos na detecção de actividade farmacodinâmica nas águas que são encaminhadas para as ETARs (Metcalf *et al.*, 2003a; Metcalf *et al.*, 2003b).

1.3. Processos de tratamento por leitos de macrófitas

Os leitos construídos de macrófitas também designados por zonas húmidas construídas têm recebido cada vez mais atenção por parte da comunidade científica mundial (Bastian e Benforado, 1983; Reddy e Smith, 1987; Reed *et al.*, 1988; Hammer, 1989; Cooper e Findlater, 1990; Etnier e Guterstam, 1991; Vymazal *et al.*, 1998; Kadlec *et al.*, 2000; Andreozzi, 2003; Njau *et al.*, 2003). Este facto parece dever-se ao crescente interesse em tecnologias ecológicas mais consistentes com a conservação de recursos, protecção do ambiente e maior fiabilidade deste tipo de processos ecológicos em detrimento de processos de tratamento consumidores de mais energia, produtos químicos e utilizadores de meios mecânicos mais intensivos (Bastian e Hammer, 1993).

Os leitos construídos de macrófitas (Figura 4) são sistemas de tratamento biológico de águas residuais em superfície livre (as de escoamento superficial) ou por filtração em meio poroso (as de escoamento sub-superficial), previamente projectados para permitir o tratamento de efluentes por optimização dos processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem nas zonas húmidas naturais. Estes sistemas consistem em depressões escavadas no terreno com fundo impermeável, cheias com materiais drenantes, onde se desenvolvem microrganismos e espécies de plantas hidrófilas, características de terrenos encharcados, as macrófitas (Cabral, 2004).

A remoção de poluentes é obtida pela acção concertada da população microbiana, vegetação e matriz de suporte, sendo principalmente influenciada pelo tipo de fluxo do

leito, pelo tipo de plantas, pelos materiais que constituem a matriz de suporte e pelas características da água residual a ser tratada (Oliveira, 2008).



Figura 4 – Leito construído de Macrófitas.

Os leitos construídos de macrófitas mimetizam assim os processos que ocorrem em sistemas naturais, mas de uma forma controlada de modo a optimizá-los com o objectivo de serem usados para o tratamento de diversos tipos de efluentes (IWA, 2000). De facto, os leitos construídos de macrófitas são, hoje em dia, considerados como uma alternativa a ter em conta na depuração de efluentes domésticos (especialmente os de pequenas comunidades), de actividades industriais e agrícolas, lixiviados de aterros sanitários, de actividades mineiras e de escorrências de estradas (IWA 2000).

A sua utilização no tratamento de águas residuais industriais tem sido confinado a efluentes biodegradáveis (e.g. indústria de processamento de fruta, matadouros e lagares de azeite) ou que não apresentem toxicidade para a população microbiana e plantas. (Davies *et al.*, 1990). Os estudos mais recentes centram-se no estudo da remoção de elementos específicos como pesticidas (Azevedo *et al.*, 2000; Cerejeira *et al.*, 2003, Teimão, 2005; Dordio *et al.*, 2007), corantes produzidos na indústria têxtil (Husband, 2000) ou metais pesados na indústria de curtumes (Calheiros *et al.* 2007; Calheiros *et al.* 2008).

Dependendo das características do efluente a depurar, os leitos construídos de macrófitas são normalmente utilizados como tratamento secundário ou terciário (Figuras 5 e 6).



Figura 5 – Leito de macrófitas utilizado como sistema terciário (Oliveira, 2008).



Figura 6 – Leito de macrófitas utilizado como sistema secundário (Oliveira, 2008).

Entre as principais vantagens dos leitos de macrófitas destacam-se (EPA, 1993; Kadlec *et al.*, 2000; Cabral, 2004):

- Custos de construção e operação relativamente baixos comparativamente com os sistemas convencionais (e.g. lamas activadas ou leitos percoladores);
- Necessidade de menores áreas para implantação que os sistemas de lagunagem de estabilização (sem plantas);
- Fácil operação e manutenção;
- Elevadas eficiências de remoção de matéria orgânica, matéria sólida, nutrientes (azoto e fósforo) e metais pesados;
- Tolerância a variações de cargas hidráulicas, orgânicas e inorgânicas;
- Reduzida emissão de odores (em sistemas com escoamento sub-superficial);
- Dispensa a utilização de químicos;
- Gastos de energia relativamente baixos;
- Possibilidade de reutilização do efluente final;
- Obtenção de benefícios adicionais, nomeadamente, espaços verdes, habitats naturais e áreas de recreio ou educacionais.

Como principais desvantagens destacam-se (EPA, 1993; Relvão, 1999; Kadlec *et al.*, 2000; Cabral, 2004):

- Necessidade de maiores áreas para implantação que os sistemas convencionais como as lamas activadas ou leitos percoladores;
- Colmatação do leito devido à presença de elevadas concentrações de matéria orgânica e matéria sólida;
- As eficiências de tratamento mais elevadas podem só ser atingidas dois a três anos após o início da exploração (i.e., após um bom desenvolvimento das plantas);
- Apresenta eficiências sazonais, influenciadas pelas épocas vegetativas e não vegetativas;
- Possível aparecimento de roedores e insectos, nomeadamente mosquitos;

Para minimizar algumas das desvantagens apontadas é, portanto, necessário ter alguns cuidados quando se procede ao seu dimensionamento, tendo em atenção as características do afluente após o tratamento primário, o tipo de enchimento, o tipo de planta para colonização e a variação das condições climatéricas que pode influenciar o ciclo hidrológico. Destaca-se que estes sistemas incorporam acções naturais de depuração dos efluentes e, conseqüentemente, estão directamente submetidos às condições climáticas locais, sendo necessários estudos regionalizados para que os mecanismos e a performance de tratamento sejam mantidos ao longo do tempo (Sezerino, 2006).

1.3.1. Tipos de sistemas

Existem diversos tipos de configurações de leitos de macrófitas que se podem classificar de acordo com as seguintes características (EPA, 1993; Vymazal *et al.*, 1998; Haberl, 1999; Kadlec *et al.*, 2000):

- De acordo com o tipo de macrófita aquática dominante (submersa, emergente ou flutuante);

- De acordo com o tipo de configuração dos leitos (sistemas híbridos, de uma passagem ou com recirculação);
- De acordo com o tipo de afluente a tratar (doméstico, industrial, agrícola, lixiviados de aterros sanitários ou de actividades mineiras e escorrências de estradas ou de actividades agrícolas);
- De acordo com o nível de tratamento exigido (secundário, terciário ou de afinação);
- De acordo com o tipo de meio de enchimento (brita, areia ou areão grosso, seixo rolado, argila expandida ou material sintético);
- De acordo com o tipo de carga (contínuo ou descontínuo);

A classificação mais comum refere-se à distinção entre tipos de escoamento:

- ❖ Sistemas de escoamento superficial;
- ❖ Sistemas de escoamento sub-superficial: horizontal e vertical
- ❖ Sistemas mistos ou híbridos.

1.3.1.1. Escoamento superficial

Os sistemas com escoamento superficial (Figura 7) apresentam uma superfície líquida acima do meio de enchimento e permitem boas condições para a formação de biofilmes. De acordo com a configuração do leito, a altura no nível do líquido, as características do efluente e da planta usada, a temperatura e outras condições ambientais, podem predominar mecanismos de remoção aeróbios, anaeróbios e anóxicos.

Estes leitos podem ter a configuração de bacias ou canais impermeabilizados, com profundidade entre 0,3 a 1,0 m e declives de fundo entre 0,5% a 1,5%. Por vezes, são providos de uma camada que suporta a vegetação emergente, de espessura reduzida (entre 0,10 m e 0,20 m), à base de brita e/ou areão, e um corpo de água geralmente pouco profundo (0,6 a 1 m) (Lacorte *et al.*, 2001).

Os inconvenientes destes sistemas estão associados à proliferação de insectos e odores desagradáveis, que se desenvolvem devido ao contacto do efluente com a atmosfera.

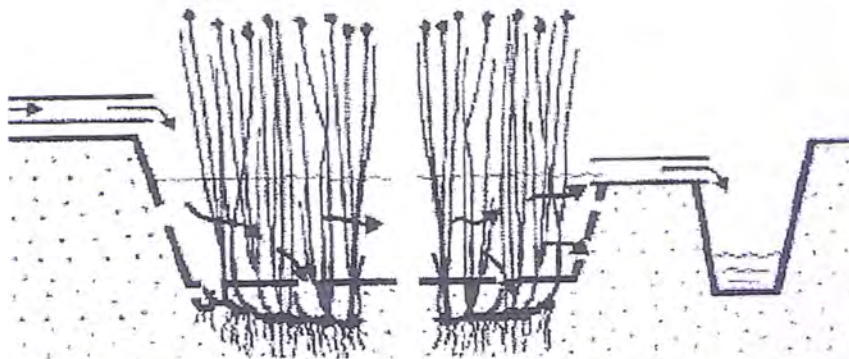


Figura 7 – Esquema de um leito com fluxo superficial (Dias *et al.*, 2000).

1.3.1.2. *Escoamento sub-superficial*

No sistema de escoamento sub-superficial o nível do líquido mantém-se abaixo da superfície do leito, podendo a sua profundidade variar de 0,3 a 1,0 m, sendo 0,6 m a mais vulgar (Dias *et al.*, 2000). As vantagens destes sistemas prendem-se com a menor ocorrência de odores e de insectos e também com o menor risco de contacto das pessoas com a água residual, uma vez que esta é mantida abaixo da superfície do leito.

Consoante o tipo de alimentação, é possível distinguir-se os sistemas de escoamento sub-superficial horizontal (LM-ESSH) e os de escoamento sub-superficial vertical (LM-ESSV).

O sistema LM-ESSH (Figura 8) é o mais usual no nosso País (Oliveira, 2008) e na maioria dos países europeus. O afluente é distribuído à entrada do leito ao longo de toda a sua largura, deslocando-se horizontalmente, penetrando através do meio poroso e da rizosfera, não existindo, portanto, escoamento superficial. Enquanto ocorre a passagem do líquido pela rizosfera sucedem-se mecanismos de adsorção, precipitação e degradação microbiana. O efluente tratado é recolhido no extremo oposto à entrada, para ser descarregado num destino final, normalmente em linha de água (Oliveira, 1995).

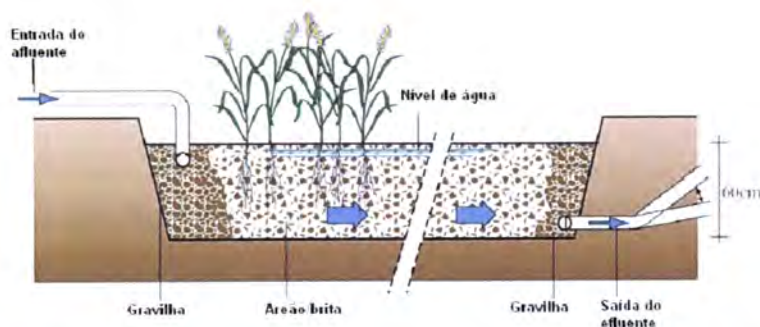


Figura 8 – Representação esquemática de um LM-ESSH (Iweme *et al.*, 2005).

Nos sistemas do tipo LM-ESSV existem dois sentidos de escoamento, o vertical descendente (Figura 9), mais comum, e o vertical ascendente. Nos sistemas descendentes, a água residual passa verticalmente pela superfície do leito, infiltrando-se rapidamente, até ser recolhida inferiormente junto à base do leito. Nos sistemas ascendentes o escoamento ocorre por contra-corrente e por capilaridade, normalmente com a utilização de sistemas mecanizados. A eficiência de remoção de poluentes nestes sistemas depende da capacidade de arejamento do solo e, portanto, das propriedades do material de enchimento. A maioria dos leitos de macrófitas com escoamento sub-superficial que se construíram na Europa foram projectados para aglomerados populacionais com menos de 500 pessoas.

No entanto, existem exemplos de sistemas projectados para aglomerados populacionais de muita pequena dimensão (menos de 50 pessoas) e exclusivamente para uma habitação (Kadlec *et al.*, 2000). Podem ainda, coexistir a associação de sistemas ESSV e ESSH, denominados sistemas mistos ou híbridos.

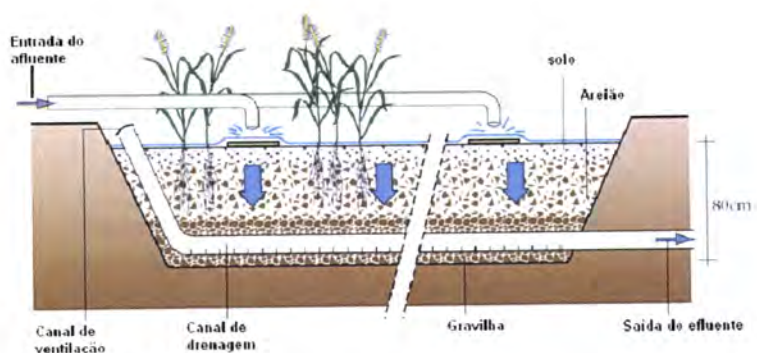


Figura 9 – Representação esquemática de um LM-ESSV descendente (Iweme *et al.*, 2005).

1.3.1.3. Componentes do sistema com escoamento sub-superficial

1.3.1.3.1. Meio de enchimento

Nos sistemas de escoamento sub-superficial a matriz de suporte é de importância fundamental para o desenvolvimento do biofilme (conjunto de microrganismos fixados sobre uma superfície sólida, Figura 10 e 11) e a ancoragem das plantas. No material de enchimento, raízes e rizomas, coabitam uma grande variedade de microrganismos, nomeadamente bactérias, fungos, algas, protozoários e vírus que utilizam os poluentes para obterem carbono, nutrientes e energia para as suas actividades de crescimento e manutenção (Yang *et al.*, 1997).

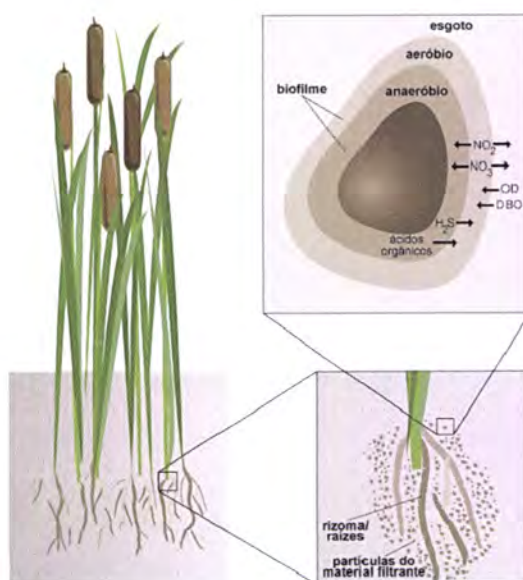


Figura 10 – Representação esquemática da formação de biofilme (Olijnyk, 2008).

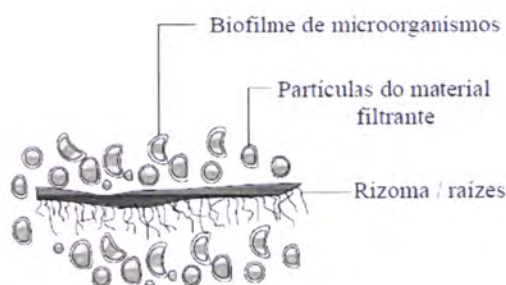


Figura 11 – Representação esquemática da formação do biofilme aderido ao material filtrante e nas raízes (Olijnyk, 2008).

A eficiência de remoção de poluentes nestes sistemas biológicos pode também ser significativamente melhorada através da utilização de um meio filtrante com uma elevada capacidade de reter os contaminantes através de fenómenos de sorção, troca iónica ou outros processos físico-químicos (Yang *et al.*, 1997)

A matriz de suporte é, normalmente, constituída por camadas de material natural (normalmente gravilha, mas podem também ser utilizados solo arenoso, areia ou areão grosso e seixo rolado), reciclado (e.g. geopolímeros e compósitos de argila expandida e lamas residuais) ou sintético (e.g. poliestireno), de profundidade tipicamente inferior a um metro, podendo levar em toda a superfície uma estreita camada de solo arável que suporta o crescimento das plantas (Relvão, 1999; Kadlec *et al.*, 2000; Albuquerque, 2003). A constituição do leito pode incluir camadas de granulometria crescente, normalmente no sentido ascendente, até camadas homogéneas do mesmo tipo de material.

O material usado como matriz de suporte deve apresentar uniformidade e porosidade e condutividade hidráulica adequadas, pois estas características podem afectar o escoamento e o desempenho do sistema (Relvão, 1999; EPA, 1999; IWA, 2000). A uniformidade é importante devido ao facto de partículas mais pequenas poderem ocupar os poros e diminuir o volume disponível para o escoamento e transporte de solutos, além de contribuir para uma mais rápida colmatação do leito (Oliveira, 2008). A condutividade hidráulica deve ser suficientemente elevada para permitir que o escoamento seja sub-superficial, evitando o escoamento superficial e caminhos preferenciais no interior do leito, susceptíveis de provocar a diminuição do rendimento do sistema (Calheiros *et al.*, 2007; Oliveira, 2008). A condutividade hidráulica vai sendo alterada ao longo do tempo de operação, devido ao desenvolvimento dos rizomas e das raízes, pela formação de precipitados e pela acumulação de partículas contidas nas águas residuais afluentes (Sezerino, 2006).

A matriz de suporte é particularmente útil na remoção de sólidos em suspensão e de microrganismos patogénicos, sendo aconselhável, nestas circunstâncias, a utilização de um material com baixa granulometria. Os leitos mais finos permitem uma maior eliminação de partículas em suspensão e uma melhor adsorção dos poluentes, contudo exigem áreas mais extensas. Pelo contrário, leitos mais permeáveis, à base de gravilha,

não são tão eficazes no desenvolvimento das plantas nem na remoção de poluentes e microrganismos, mas permitem a aplicação de cargas hidráulicas mais elevadas e oferecem menores riscos de colmatação, aspecto particularmente importante nos dois primeiros anos de funcionamento. Nos sistemas de leito com gravilha, podem admitir-se cargas hidráulicas (caudal por unidade de área do meio) variando entre $2,5 \times 10^{-2}$ a $6,0 \times 10^{-2} \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (Sezerino, 2006; Calheiros *et al.*, 2007; Oliveira, 2008). A espessura da camada porosa pode variar entre 0,4 m e 1,0 m, sendo mais frequente e recomendável o valor de 0,6 m (Relvão, 1999; Kadlec *et al.*, 2000).

Recentemente, têm surgido materiais alternativos, à base de elementos reciclados ou argila expandida, cujas características parecem beneficiar o funcionamento do sistema, nomeadamente através de uma elevada capacidade de sorção de diversos tipos de poluentes (Dordio *et al.*, 2009b).

No que diz respeito à estanquicidade do leito, há que garantir, por um lado, a protecção dos solos e dos recursos hídricos subterrâneos e, por outro lado, assegurar uma alimentação adequada para irrigação das plantas ao longo de todo o ano. Deste modo, é recomendável que se proceda à impermeabilização do fundo e taludes do leito, com uma camada de cerca de 0,2 m de argila compactada, ou com uma membrana de polietileno de alta densidade (Relvão, 1999; Kadlec *et al.*, 2000). Apenas em solos muito argilosos se pode dispensar a utilização de impermeabilização do leito (Relvão, 1999).

O fundo do leito deverá ter uma ligeira inclinação, da entrada para a saída, que pode variar de 0,2% a 3%, embora se recomendem valores de 0,5% a 1,5% (EPA, 1993; Relvão, 1999; Kadlec *et al.*, 2000). Poderão adoptar-se diversas configurações para os leitos, de forma a adaptá-los à topografia e geologia do terreno, sem prejuízo de se assegurarem os critérios mínimos de funcionalidade (e.g., velocidades de escoamento).

1.3.1.3.2. Vegetação

As plantas aquáticas são componentes essenciais dos leitos cultivados e contribuem para a remoção/degradação de diversos tipos de poluentes presentes nos efluentes. Também contribuem de uma forma indirecta para a depuração das águas residuais pois permitem criar na rizosfera um meio rico em oxigénio devido à libertação

deste gás através das suas raízes e rizomas, gerando nesta região condições de oxidação que estimulam a decomposição aeróbia da matéria orgânica e o crescimento das bactérias nitrificantes, bem como o desenvolvimento de biofilme (Relvão 1999, Cabral 2004, Carvalho, 2008).

No tratamento de águas residuais, dependendo do tipo de sistema e escoamento a utilizar, podem ser utilizadas várias espécies de plantas macrófitas. As macrófitas, plantas macroscópicas que incluem macroalgas, líquenes, briófitos, pteridófitos e plantas superiores, são plantas hidrófitas por estarem fisiologicamente ligadas à água, pelo menos durante parte do seu ciclo de vida, ou por existirem em ambientes húmidos ou encharcados que toleram a submersão em períodos mais ou menos longos. Na verdade, estas plantas têm características que lhes permitem um maior desenvolvimento em terrenos encharcados, sem que sofram asfixia radicular, possuindo maiores concentrações internas de oxigénio e, conseqüentemente, um potencial maior para a sua libertação para a rizosfera (Oliveira, 2008).

A importância do oxigénio libertado na rizosfera na remoção de carbono orgânico e azoto (nomeadamente amónio e nitrato) não está muito bem estudado (Randerson *et al.*, 2005), nem a variação das condições de oxidação-redução na rizosfera (Kayser *et al.*, 2003). Contudo, acredita-se que, como o oxigénio é consumido rapidamente, criam-se zonas sobrepostas aeróbias, anaeróbias e anóxicas na matriz do solo em torno da raiz que permitem a ocorrência de reacções de oxidação-redução, responsáveis pela remoção de carbono, de azoto e fósforo, catalisadas por enzimas segregadas por microorganismos de natureza diversificada (autotróficos nitrificantes e desnitrificantes e heterotróficos nitrificantes e desnitrificantes) (Randerson *et al.*, 2005).

Na generalidade, as macrófitas são plantas robustas e muitos estudos mostraram não só a sua capacidade para aguentar elevadas concentrações de poluentes orgânicos, como também a sua grande capacidade de remoção desses mesmos compostos, quando estes se encontram presentes nas águas residuais (Williams, 2002, Haberl *et al.*, 2003; Amaya-Chávez *et al.*, 2006; Kong *et al.*, 2007; Dordio *et al.*, 2009a ; Dordio *et al.*, 2009b). Devido a estas características, estas plantas são as principais escolhidas para serem aplicadas em leitos construídos de tratamento de águas residuais.

De acordo com Etnier e Guterstam (1991), EPA (1993), Kadlec e Knight (1996), Vymazal *et al.* (1998), Kadlec *et al.* (2000) e Korkusuz (2005), existem vários grupos de plantas macrófitas, destacando-se os seguintes:

- **Macrófitas emergentes** – plantas enraizadas no solo com a maior parte dos caules e folhas fora de água, como por exemplo o caniço (*Phragmites australis*), as espadanas (*Typha latifolia*), os juncos do pântano ou lírios do pântano (*Íris pseudocorus*), e o junco (*Scirpus lacustris*). Encontram-se geralmente nas margens dos cursos e massas de água.
- **Macrófitas flutuantes** – plantas que flutuam à superfície da água, não estando enraizadas no leito, como por exemplo, o jacinto-aquático (*Eichhornia crassipes*), as lentilhas-de-água (*Lemna spp.*) e a azola (*Azolla filiculoides*). Têm a maior parte dos caules e folhas emersos.
- **Macrófitas enraizadas com folhas flutuantes** – plantas enraizadas ou ancoradas ao leito mas que têm a maioria das folhas à superfície, como por exemplo de a pinheirinha de água (*Myriophyllum aquaticum*), e os nenúfares (*Nymphaea sp.* e *Nuphar sp.*);
- **Macrófitas submersas** – plantas enraizadas ou ancoradas ao leito ou em suspensão na água, que têm as partes vegetativas abaixo da superfície da água embora, muitas vezes, os órgãos reprodutores estejam à superfície ou acima dela. Alguns exemplos são o limo mesto (*Potamogeton pectinatus* e *Elodea canadensis*).

1.3.1.3.2.1. *Phragmites australis*

A *Phragmites australis* (Figura 12) é a espécie de macrófitas emergentes mais utilizada nas instalações de leitos construídos de macrófitas para o tratamento de águas residuais no nosso País (Relvão, 1999), sendo também amplamente utilizada em toda a Europa. É conhecida popularmente como caniço – *common reed* (*Phragmites australis*) e é normalmente a mais escolhida devido aos melhores resultados que apresenta ao nível da

adaptação ao clima, do desenvolvimento de rizomas e da facilidade de manutenção, comparativamente com as outras espécies (Kadlec *et al.*, 2000; Bandeiras, 2006).

Esta planta pode ser encontrada em quase todo o mundo, uma vez que pode desenvolver-se em muitos habitats diferentes sendo os mais comuns nas margens dos rios e dos lagos. É conhecida por ter impactos ecológicos e biogeoquímicos significativos, sendo altamente resistente e produtiva. É uma planta altamente competitiva produzindo uma biomassa superficial tipicamente por volta dos 1000g de peso seco m⁻², tendo sido publicados valores consideravelmente elevados de 7700g de peso seco m⁻² (Soetaert *et al.*, 2004).

No seu ambiente natural é tipicamente uma planta de água doce, mas a sua tolerância ao sal permite-lhes invadir ambientes marinhos (Soetaert *et al.*, 2004).

Esta espécie de plantas providencia extensas superfícies para a formação de biofilmes aquáticos, sendo que o sucesso da remoção dos poluentes está como se sabe directamente dependente da composição e actividade das comunidades constituintes desse biofilme (Rusznyak *et al.*, 2007).



Figura 12 – *Phragmites australis* (Gubanov *et al.*, 2002).

A colonização do leito pode realizar-se por transplantação de pés jovens ou de caules providos de raízes. A fase de crescimento inicia-se em Fevereiro, em regiões quentes e em Abril em regiões frias. A planta apresenta um crescimento muito rápido e extremamente denso (Cooper *et al.*, 1996).

Trata-se de uma espécie que não resiste a cortes abundantes e prolongados, podendo estes ser efectuados na fase de crescimento, contudo, para se obter o máximo de produção, não deve ser cortado mais de 50% do peso obtido neste período. Devem, também, ser periodicamente podadas para que os nutrientes incorporados nos tecidos não sejam devolvidos à água após decomposição (Corregidor e Parejo, 1999).

1.4. Métodos analíticos utilizados na separação e análise de fármacos

Os fármacos ou outro tipo de químicos só são considerados como contaminantes ambientais emergentes mediante a existência de métodos analíticos que os consigam detectar (Snow *et al.*, 2007).

Os principais métodos descritos na literatura são baseados na extracção de fase sólida (SPE), em alguns casos derivatização da substância ácida e subsequentemente determinação do derivado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS) ou cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) (Palmgren *et al.*, 2006). Uma grande dificuldade encontrada é a ausência de métodos validados para muitas destas substâncias (Ponezi *et al.*, 2006). Vários métodos analíticos têm sido publicados no que respeita à determinação e análise de fármacos e seus metabolitos em amostras biológicas como o sangue, soro humano ou urina, à escala μgL^{-1} , sendo que algumas modificações nesses métodos podem ser suficientes para algumas amostras ambientais. No entanto, quando se passa para amostras a nível ambiental, os baixos limites de detecção (na ordem dos ngL^{-1}) tornam essencial a utilização de técnicas e procedimentos analíticos mais avançados (Bila e Dezotti, 2003).

O desenvolvimento e implementação de novas técnicas analíticas mais precisas e sensíveis tornou possível a detecção em meios receptores hídricos em pouco por todo o mundo de fármacos de várias classes, bem como alguns dos seus metabolitos. O aparecimento de novas técnicas de extracção e separações associadas aos avanços instrumentais providenciou a sensibilidade e especificidade para as detecções e quantificações que eram necessárias. Os métodos que utilizam a espectrometria de massa, tornaram-se rapidamente os mais utilizados na análise de contaminantes emergentes, uma vez que permitem assegurar a identificação das substâncias, sendo que a técnica de LC-

MS é especialmente utilizada na detecção deste tipo de compostos devido às características químicas dos mesmos (Snow *et al.*, 2007).

De modo a permitir a quantificação da maioria dos fármacos nas águas à escala dos ngL^{-1} , Ternes (2001) resumiu os conhecimentos existentes acerca das metodologias analíticas nesta área de investigação, tomando em conta as características gerais dos fármacos. Os autores dividiram os resíduos por categorias (drogas ácidas, β -bloqueadores e α_2 -simpatomiméticos, fármacos neutros, antibióticos, estrogénios, anti-inflamatórios, reguladores lipídicos, anti-epilépticos, vasodilatadores) e elaboraram protocolos analíticos dedicados a cada uma das categorias mencionadas.

Técnicas como o uso combinado de extracção em fase sólida (SPE), derivatização, detecção e identificação por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) e GC-MS-MS, cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) ou cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa *tandem* com ionização por *electrospray* (LC-ESI-MS-MS) provaram a sua eficácia. A técnica de LC-MS-MS foi a metodologia escolhida por Vieno *et al.* (2006) para detectar fármacos neutros e básicos (β -bloqueadores) em águas para consumo humano, águas superficiais e em efluentes. Recentemente tem sido o método mais utilizado neste tipo de análises principalmente devido à sua versatilidade, especificidade, e selectividade uma vez que proporciona detecções na ordem dos ngL^{-1} .

No entanto as técnicas de HPLC-DAD e HPLC-UV, que foram utilizadas neste trabalho podem ser uma excelente alternativa às outras técnicas analíticas uma vez que apresentam bons resultados e menores custos para a determinação de compostos orgânicos vestigiais tais como fármacos.

Contudo, os autores referem que a gama de aplicabilidade destes procedimentos analíticos pode ser criticamente reduzida na presença de amostras fortemente contaminadas, como as lamas, e um passo de purificação deverá ser incluído (durante a preparação de amostra) ou deverá ser feita dopagem com um padrão substituto apropriado, antes da concentração por SPE (Hirsch *et al.*, 1998).

Durante a implementação de métodos cromatográficos, estão genericamente associadas diversas etapas prévias para preparação das amostras, podendo incluir matrizes gasosas (e.g. ar, misturas de gases, emissões de plantas, etc.), líquidas (e.g. água,

misturas de solventes, fluidos biológicos, etc.) ou sólidas (e.g. sedimentos, produtos farmacêuticos, polímeros, etc.), consoante o(s) tipo(s) de analito(s) em estudo, nomeadamente, compostos voláteis, semi-voláteis ou não-voláteis. Estas etapas contemplam fundamentalmente a extracção ou enriquecimento dos analitos da matriz, mas também limpeza ou fraccionamento, concentração e em certos casos derivatização, tendo em conta todas as vantagens analíticas inerentes a cada sistema em particular, podendo estes procedimentos envolver até cerca de 80 % do tempo analítico despendido. O principal objectivo dos métodos de preparação de amostras é transferir os analitos com interesse da matriz original, numa forma mais adequada para introdução na instrumentação cromatográfica, podendo a análise ser directa no caso de estarmos em presença de teores significativos ou com recurso a estratégias para o enriquecimento de traços vestigiais, no sentido de ganho de sensibilidade (Almeida *et al.*, 2004).

As duas técnicas tradicionais, como a extracção líquido-líquido (LLE) e a extracção de fase sólida (*Solid Phase Extration* - SPE) têm sido amplamente aplicadas para o tratamento prévio das amostras líquidas ou na limpeza de alguns extractos para posterior análise de fármacos (Wang *et al.*, 2008).

1.4.1. Extracção em fase sólida (*Solid-phase extraction*, SPE)

A década de 1970 constituiu um período de rápido crescimento e desenvolvimento para a técnica de SPE. No entanto, nesta fase, ainda não tinha o nome que hoje possui. As partículas sólidas como o carvão activado e as resinas poliméricas porosas eram conhecidas como sorventes para os micro-poluentes orgânicos encontrados nas amostras de água. As colunas preenchidas com um sorvente sólido eram designadas por colunas de acumulação (Fritz, 1999). Durante as décadas do seu desenvolvimento a SPE era encarada, durante a maior parte do tempo, como uma técnica apenas experimental, ao invés da extracção líquido-líquido (*liquid-liquid extraction*, LLE), na altura aceite como técnica-padrão na análise de águas. Contudo, a situação alterou-se completamente. Actualmente, a SPE é amplamente aceite e reconhecida como ferramenta-padrão no manuseamento de amostras de água antes da análise a micro-poluentes orgânicos (Liska, 2000).

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 de 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 conseqüente 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 (e.g. octadecil, octil, fenil, etc.), polares (e.g. cianopropil, diol, etc.), de troca iónica (e.g. trimetilaminopropil, carboximetil, etc.), adsorção (e.g. sílica-gel, florissil, carvão grafitizado, etc.), covalentes (p. e.g. ác. fenilborónico) ou múltiplos, baseados na interacção analito/enchimento ou somente na natureza do(s) analito(s) em estudo. Recentemente têm-se utilizado polímeros novos nas colunas da técnica de SPE que permitem excelentes recuperações de analitos polares e conseguem extrair simultaneamente um vasto número de analitos com diferentes funcionalidades (Williams *et al.*, 2006).

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 conseqüentemente, maior reprodutibilidade com redução do

tempo analítico quando são utilizados grandes volumes de amostra (Almeida *et al.*, 2004).

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

❖ **Merck LiChrolut® RP-18**

A coluna Merck LiChrolut® RP-18 é uma coluna de fase reversa C₁₈ apolar e bastante selectiva (a pH < 2 hidrolisam). É uma coluna que se degrada facilmente, mas tem a vantagem de separar compostos diferentes e pode usar solventes como a água, metanol ou acetonitrilo (Muller *et al.*, 1999).

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: LiChrolut® RP-18 *endcapped* e LiChrolut® RP-18. Os cartuchos LiChrolut® RP-18 são mais adequados para extrair compostos mais fortemente polares enquanto que os cartuchos LiChrolut® RP-18 *endcapped* são mais adequados para compostos não-polares na mesma amostra complexa (Merck, 2006).

❖ **Oasis® HLB Waters**

Os cartuchos Oasis® HLB Waters possuem um adsorvente equilibrado hidrofílico-lipofílico de fase reversa para todos os compostos (e.g. drogas e seus metabolitos polares).

O potencial dos polímeros com ligações cruzadas dos cartuchos Oasis® HLB para extracção ácida, neutra e de compostos básicos de água, ao longo de um vasto leque de pHs, 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.*, 2007).

❖ Waters Sep-Pak® Vac

Os cartuchos Sep-pak® Vac (Sep-pak) podem ser utilizados na fase normal, fase reversa ou para troca iônica. Na cromatografia com fase normal os cartuchos Sep-Pak, têm material de empacotamento apolar, sílica, florisil, NH₂ ou alumina, podendo assim, ser aplicados solventes polares como eluente. Para realizar a cromatografia de fase reversa, o gradiente de solvente tem de ser fortemente polar com um empacotamento apolar C₁₈. Na cromatografia de troca iônica com cartuchos Sep-Pak, tem de ser aplicado um gradiente de pH ou de força iônica, e como material de embalagem é usado o NH₂ (Muller *et al.*, 1999).

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 (Muller *et al.*, 1999).



Figura 13 – Colunas de SPE utilizadas no trabalho: A) Waters Sep-Pak® Vac, B) Oasis® HLB e C) Merck LiChrolut® RP-18.

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.

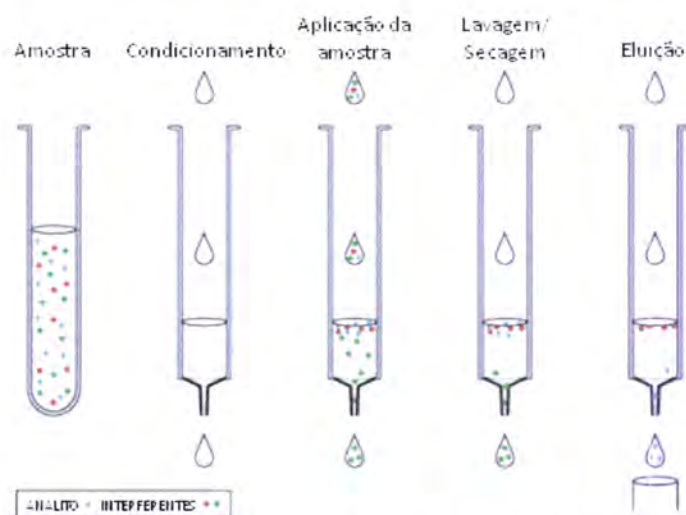


Figura 14 – Principais passos associados à extração em fase sólida; adaptado de (Biotage, 2006).

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 14 ilustra os principais passos anteriormente enunciados para extracção em fase sólida.

A SPE é uma técnica analítica muito poderosa quer do ponto de vista da selectividade quer mesmo da sensibilidade, muito versátil, combinando extracção com limpeza e concentração, relativamente rápida, de baixo custo e que possibilita automatização *on-line* (e.g. Gilson, Zymark, etc.) com instrumentação cromatográfica. Apresenta ainda a particularidade dos cartuchos ou discos poderem ser reutilizados em sistemas no qual as amostras não sejam demasiado sujas.

1.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC- *High Performance liquid Chromatography*)

A cromatografia é um processo físico de separação, no qual os componentes a serem separados distribuem-se em duas fases: fase estacionária e fase móvel. A fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido dispostos sobre um suporte sólido com grande área superficial. A fase móvel, que pode ser gasosa, líquida ou ainda um fluido supercrítico, passa sobre a fase estacionária, arrastando consigo os diversos componentes da mistura. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) desenvolveu-se muito nos últimos anos, recebendo o nome de cromatografia líquida por que a sua fase móvel é um solvente (Peres, 2002; Teixeira, 2006).

As técnicas convencionais de cromatografia em papel (PC- *Paper chromatography*), de camada fina (TLC- *Thin-layer chromatography*) e de coluna (CC- *Column chromatography*) não providenciam a sensibilidade e resolução necessárias para separar com eficiência, as quantidades mínimas de compostos que queremos analisar. Assim, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma das técnicas mais utilizadas actualmente na análise de fármacos. As vantagens de HPLC incluem não só uma melhoria substancial na separação, mas também um aumento da velocidade com que a separação é efectuada. Separações que podiam demorar dias, utilizando as técnicas convencionais, por HPLC podem demorar menos de uma hora (Harborne e Dey, 1993). A versatilidade da técnica de HPLC é também devida à possibilidade de utilização de diferentes modos de separação e detecção (Tsao e Deng, 2004; Teixeira, 2006).

Os sistemas de fase normal apresentam o problema de os compostos mais polares poderem ficar irreversivelmente retidos na coluna, o que pode resultar numa alteração gradual das características da separação. Assim, as colunas de fase reversa (RPC- *Reverse phase column*) são normalmente escolhidas para separar fármacos. Usualmente são utilizadas colunas C₈ ou C₁₈ e fases móveis aquosas com modificadores orgânicos como metanol ou acetonitrilo (Robards e Antolovich, 1997; Teixeira, 2006).

A coluna cromatográfica é feita de um material inerte que resiste a todas as pressões em que ela vai ser usada. A capacidade da coluna é determinada pelo comprimento, diâmetro e pelo material de recheio. As colunas geralmente utilizadas são: octadecil (C₁₈, RP₁₈, ODS), octil (C₈, RP₈), CN (cianopropil) e NH₂ (amina). A fase móvel deve ser compatível com o detector empregado e, também possuir polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra. A eluição isocrática também tem sido utilizada, particularmente para separar compostos de uma família específica. Os sistemas mais comuns para separar compostos de origem farmacêutica incluem uma eluição isocrática binária de solventes, em que um dos solventes é normalmente água acidificada ou com aditivos (solvente A), e o outro é geralmente constituído por metanol ou acetonitrilo, puros ou acidificados (solvente B). A separação normalmente é feita utilizando um fluxo de 1,0-1,5 mLmin⁻¹. Em fase reversa, os compostos mais polares são geralmente eluídos em primeiro lugar (Robards e Antolovich, 1997).

O isolamento de compostos por HPLC também é possível através da utilização de colunas semi-preparativas, que permitem a injeção de maiores quantidades de amostra. Normalmente, os compostos são obtidos através de injeções e recolhas sucessivas no modo isocrático (Costa, 1999; Teixeira, 2006).

Actualmente, existe um grande número de referências bibliográficas sobre a identificação e quantificação de compostos de origem farmacêutica por HPLC nas mais diversas matrizes, o que prova a grande aplicabilidade desta técnica ao estudo destes compostos (Castiglioni *et al.*, 2005; Nikolai *et al.*, 2006; Vieno *et al.*, 2006; Dordio *et al.*, 2009a; Dordio *et al.*, 2009b);

A cromatografia por HPLC nas suas diferentes variantes (diferentes fases móveis e estacionárias, colunas e tipos de detecção) pode, hoje em dia, ser seguramente

considerada uma das técnicas de eleição para separar fármacos e os seus produtos de degradação (Tsao e Deng, 2004; Teixeira, 2006; Dordio *et al.*, 2009a).

1.4.2.1. Detecção em HPLC

Quanto aos detectores, não existe um que apresente todas as propriedades para que ele 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 (Teixeira, 2006).

Os detectores mais utilizados em HPLC são os de espectrometria de massa (MS), espectrofotometria ultravioleta visível (UV-Vis), *diode-array* (DAD), índice de refração, fluorescência e electroquímicos (Hanai, 1999).

1.4.2.1.1. Detecção ultravioleta-visível (UV-Vis) e diode-array (DAD)

A detecção de compostos β -bloqueadores em HPLC pode ser realizada com um detector UV, pois a maioria destes compostos possuem duplas ligações conjugadas ou sistemas aromáticos, que absorvem radiação desta região do espectro electromagnético. No entanto, a introdução nos anos 80 de espectrofotómetros de *diode-array* como detectores para HPLC melhorou substancialmente a análise destes compostos, porque este tipo de detectores permitem, não só obter as características de retenção, como os espectros UV-Vis de cada um dos compostos. Em HPLC-DAD pode-se obter o espectro UV-Vis à medida que o eluente cromatográfico chega ao detector. Os espectros de cada pico, obtidos online, são gravados e podem depois ser comparados com bibliotecas de espectros. Este tipo de detector permite também a gravação simultânea dos cromatogramas a comprimentos de onda (c.d.o.) diferentes, permitindo assim, a detecção selectiva de diferentes grupos nos seus c.d.o. máximos de absorvância. Esta característica dos detectores de DAD aumenta também as possibilidades de quantificação, uma vez que a sensibilidade pode ser ampliada com a escolha adequada dos c.d.o., o que pode tornar a quantificação de um determinado composto possível, mesmo que a resolução dos picos

não seja muito boa. O ruído e as flutuações da linha de base dos cromatogramas podem também ser corrigidos, subtraindo ao cromatograma do c.d.o. escolhido para a gravação, o obtido a um c.d.o. de referência onde o composto praticamente não absorva. Além disso, com os detectores de DAD pode ser obtida alguma informação acerca do grau de pureza dos picos: examinando os espectros UV-Vis obtidos ao longo do pico e calculando as razões entre absorvâncias a diferentes c.d.o.; se estas razões forem constantes ao longo de todo o pico pode-se assumir que o pico está puro, a não ser que dois compostos com exactamente o mesmo espectro tenham co-eluído naquele pico (Teixeira, 2006).

1.4.2.1.2. Outros tipos de detectores

A espectrometria de massa é uma técnica que permite obter a massa molecular do analíto em estudo e também alguma informação estrutural sobre a molécula. Esta técnica tem-se demonstrado muito útil na identificação de compostos de origem farmacêutica, e a sua principal vantagem é a quantidade mínima de composto que é necessária para a análise (Gros *et al.*, 2006; Teixeira, 2006; Lee *et al.*, 2007).

O desenvolvimento das interfaces de ionização à pressão atmosférica (API-*Atmospheric pressure ionization*) possibilitaram enormes avanços na análise destes compostos, uma vez que permitiram incorporar a utilização da detecção por espectrometria de massa, com a separação por HPLC. A combinação da capacidade de separação da cromatografia líquida, que permite a introdução de compostos “puros” no espectrómetro de massa, com a capacidade de identificação da espectrometria de massa é muito vantajosa, particularmente porque compostos com tempos de retenção iguais ou semelhantes têm normalmente espectros de massa muito diferentes e podem assim ser diferenciados. A combinação destas duas técnicas permite portanto, uma identificação mais definitiva e a determinação quantitativa de compostos, que não se encontram completamente resolvidos cromatograficamente (Teixeira, 2006).

As duas interfaces mais utilizadas na análise de compostos farmacêuticos por LC-MS (*Liquid-chromatography mass-spectrometry*) são APCI (*Atmospheric pressure chemical ionization*) e ESI (*Electrospray ionization*). Apesar de não existir uma divisão inequívoca, a ionização por ESI é mais utilizada para compostos iónicos ou polares, e a ionização por APCI para compostos não iónicos e menos polares. Em ambos os tipos de

ionização os espectros de massa podem ser obtidos em modo positivo ou negativo (Ardrey, 2003; Hernando *et al.*, 2004).

Existem vários tipos de analisadores de massa mas os mais frequentemente utilizados em LC-MS são os analisadores de quadrupólo, de armadilha de iões (Radjenovic *et al.*, 2008), de sector de dupla focagem e de tempo de voo (TOF-*Time-of-flight*). A espectrometria de massa *tandem* é também uma ferramenta importante para a quantificação de analitos, pois muitos compostos possuem igual massa molecular o que torna a determinação por MS pouco específica, principalmente em matrizes muito complexas. Existem vários tipos de instrumentos que permitem realizar experiências de MS-MS como sejam o triplo quadrupólo, o espectrómetro de massa híbrido, o analisador TOF *tandem* MS, o TOF quadrupólo e *ion trap tandem* MS, entre outros. O processamento dos resultados em LC-MS pode ser realizado em vários modos, mas os mais comuns são o cromatograma de corrente iónica total (TIC – *Total ion current*), a monitorização do ião seleccionado (SIM – *Single ion monitoring*) e a monitorização da reacção seleccionada (SRM – *Selected reaction monitoring*) (Ardrey, 2003; Lee *et al.*, 2007).

O detector de massa é, portanto, uma ferramenta fundamental para identificação e quantificação de compostos orgânicos, devido à complexidade e variedade de estruturas destes compostos e às baixas concentrações em que estes se encontram muitas vezes no ambiente. A detecção electroquímica, de fluorescência e de índice de refração são exemplos de outros tipos de detecção que também podem ser utilizados em HPLC, apesar da sua utilização para a análise de compostos farmacêuticos, ser menos comum que os detectores DAD e de massa (Teixeira, 2006).

1.4.3. Métodos para a determinação do atenolol

Diversas metodologias têm sido propostas para a determinação de fármacos β bloqueadores como atenolol e propranolol, e o principal foco têm sido nas metodologias envolvendo cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), isoladamente, ou em combinação com outros métodos. A técnica de HPLC foi descrita na farmacopeia americana como metodologia para o doseamento tanto do fármaco quanto de

comprimidos de atenolol (USP, 2000). Esta técnica foi utilizada para quantificação de atenolol simultaneamente a antagonistas do cálcio, com eluição em condições isocráticas (Patel *et al.*, 1998).

Uma outra tendência é a busca de metodologias para a determinação simultânea de diferentes fármacos em associação, ou otimização de metodologias para uma mesma classe de fármacos (Argekar e Powar, 2000).

A farmacopeia europeia apresenta como método de doseamento para o atenolol a titulação potenciométrica em meio não aquoso, utilizando ácido perclórico como titulante (Yang *et al.*, 1997). O mesmo método de doseamento em meio não aquoso é apresentado na monografia do fármaco na farmacopeia britânica (BP, 2000). Não há método farmacopeico para o doseamento de cápsulas de atenolol.

Para os comprimidos, a farmacopeia britânica apresenta o método da espectrometria de absorção no ultravioleta utilizando uma solução contendo 0,01 % de atenolol analisada nos comprimentos de onda de 235 e 275 nm (BP, 2000).

Para a completa resolução e determinação do atenolol e as suas principais impurezas foi desenvolvido um método cromatográfico. O método permite a determinação precisa das impurezas e da potência do atenolol, na forma de fármaco puro ou em comprimidos. A técnica utiliza uma coluna C-18 de aço inoxidável com 300 x 3,9 mm e fase móvel contendo metanol, di-hidrogeno-ortofosfato de potássio (Rouge *et al.*, 1998b) com 0,06 % (v/v) dibutilamina (20:80, v/v) pH 3. Foi usado um fluxo de 1 mLmin⁻¹ e detecção em comprimento de onda 226 nm. A aplicação do método a comprimidos de 50 e 100 mg proveu recuperação de 99 % e reprodutibilidade de 1,1 e 0,52 %, respectivamente (Pawlak e Clark, 1992).

A análise de amostras comerciais de comprimidos e cápsulas de β -bloqueadores inclusive atenolol e propranolol foi descrita utilizando as técnicas de HPLC e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS). O conteúdo de uma única cápsula ou de um único comprimido foi diluído, colocado no aparelho de ultra-sons aproximadamente meia hora e foram recolhidas amostras para análise (Abdel-Hamid, 2000).

Foram deste modo validadas diversas metodologias analíticas usando HPLC com detecção ultravioleta para a quantificação de β -bloqueadores, demonstrando

proporcionalidade, precisão e exactidão. O uso de apenas um tipo de coluna de fase reversa e fase móvel para todos β -bloqueadores permite a análise de um grande número de amostras em pouco tempo (Modamio *et al.*, 1996). O tipo de coluna e a composição da fase móvel influenciam a separação cromatográfica. Uma selecção inapropriada das condições cromatográficas pode levar a falhas na detecção, separação incompleta e resultados erróneos (Abdel-Hamid, 2000).

A polaridade da fase móvel tem um efeito dominante sobre o comportamento cromatográfico de solutos em HPLC. Assim, a retenção de β -bloqueadores em diferentes concentrações de acetonitrilo em tampão fosfato (10 mM, pH 3,0) foi averiguada. O aumento da concentração de acetonitrilo em tampão fosfato reduz os factores de capacidade dos β -bloqueadores por causa da diminuição da polaridade da fase móvel. O fármaco atenolol não é adequadamente separado por uma fase móvel contendo 30 % de acetonitrilo por causa de sua alta hidrofiliabilidade e a adição de alquil sulfatos e aminas orgânicas não foi capaz de melhorar esta separação (Castro, 2006). Utilizou-se metanol concomitantemente com acetonitrilo, optimizando a separação, com maior simetria de pico. Foi também demonstrado, que o metanol é bem adsorvido em sílica, promovendo uma fase estacionária homogénea; podendo ser este o mecanismo de melhora da simetria de picos. Foi alcançada uma boa simetria de pico com a fase móvel constituída por metanol, acetonitrilo, tampão fosfato (10 mM) (15:15:70, v/v/v, pH 3,0), e utilizando uma coluna C-18 com tamanho de partícula 10 μ m e 300 x 3,9 mm de diâmetro interno (Basci *et al.*, 1998). Encontra-se também descrita a técnica de HPLC acoplada a ionização por *electrospray* e espectrometria de massa na determinação de β -bloqueadores, incluindo o atenolol (Needham e Brown, 2000, Hernando *et al.*, 2004, Castro, 2006).

II - Materiais e Métodos

II. Materiais e Métodos

2.1. Equipamentos

As análises por HPLC foram realizadas em dois aparelhos com características diferentes, Agilent 1100 *system* e VWR HITACHI. O equipamento Agilent 1100 *system* (Agilent Technologies, Alemanha) está equipado com detectores UV e DAD, com um injetor manual Rheodyne 7725i e software HP Chemstation. O aparelho VWR HITACHI tem uma bomba L-2130 (Elite Lachrom), e é equipado com um *autosampler* L-2200 (Elite Lachrom) e com um detector UV L-2400 (Elite Lachrom). A coluna analítica utilizada foi uma coluna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB C₈ 4,6x15mm com 5 µm de partícula (Agilent, USA).

Sempre que foi necessário secar amostras em vácuo foi utilizado um evaporador rotativo Büchi R-200, um banho termostaticado Büchi B-490 e uma bomba de vácuo Büchi vac V'500. Os valores de pH foram obtidos num aparelho medidor de pH inoLab pH Level 1 da WTW. A condutividade eléctrica foi determinada utilizando um condutímetro Crison Micro CM 2202.

2.2. Reagentes e materiais

As características, grau de pureza e os fabricantes dos materiais e reagentes utilizados neste trabalho são apresentados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5 – Características e fabricantes dos materiais utilizados.

Material	Características	Fabricante
Filtro de membrana	Nylon, poro de 0,45µm 25mm de diâmetro	VWR Internacional (West Chester, PA, USA).
Colunas SPE	Sep-Pak [®] Vac (500mg, 3mL)	Waters Corporation (Milford , MA, USA)
	OASIS [®] HLB (200mg, 6mL)	Waters Corporation (Milford , MA, USA)
	LiChrolut [®] C ₁₈ (RP18) (500mg, 3mL)	Merk (Darmstadt, Alemanha)

Tabela 6 – Grau de pureza e fabricantes dos reagentes utilizados.

Reagente	Grau de Pureza (%)	Fabricante
Acetonitrilo	HPLC gradiente	Merck (Darmstadt, Germany)
Ácido fosfórico	85,0	J.M. Gomes dos Santos, Lda. (Odivelas Portugal)
Atenolol	98,0	Aldrich (Steinheim, Alemanha)
Metanol	HPLC gradiente	VWR (Lisboa, Portugal)
	p.a	Merck (Darmstadt, Germany)
Nitrato de cálcio tetra-hidratado	98,0	Fluka (Madrid, Espanha)
Fosfato de potássio di-hidrogenado	99,0	Panreac (Barcelona, Espanha)
Ácido bórico	99,8	Panreac (Barcelona, Espanha)
Molibdato de sódio di-hidratado	99,5	Riedel-de Haën (Seelze, Alemanha)
Sulfato de manganês (II) mono-hidratado	99,0	Riedel-de Haën (Seelze, Alemanha)
Nitrato de potássio	99,0	Panreac (Barcelona, Espanha)
Sulfato de magnésio hexa-hidratado	99,0	Riedel-de Haën (Seelze, Alemanha)
Sulfato de cobre (II) penta-hidratado	99,0	Scharlau (Barcelona, Espanha)
Etilenodiaminatetracetato (EDTA) de ferro (III) e sódio	99,0	Sigma (St.Quentin Fallavier, França)

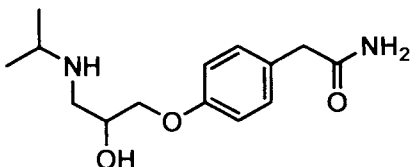
A água utilizada na preparação das soluções padrão e em diluições foi obtida através de um sistema de purificação de água Milli-Q (Simplicity® UV, Millipore Corp., França).

2.3. Fármaco Estudado (atenolol)

Neste trabalho, o composto que se pretendeu remover através de leitos construídos de macrófitas com fluxo sub-superficial foi o atenolol (um fármaco β -bloqueador).

Na Tabela 7 estão listadas algumas propriedades físico-químicas mais relevantes deste fármaco:

Tabela 7 – Propriedades físico-químicas relevantes do atenolol; adaptado de (Gros et al., 2006).

Nome comum	Atenolol
Nome IUPAC	2-[4-[2-hidroxi-3-(1-metiletilamino) propoxi]fenil]etanamida OU 2-(4-(2-hidroxi-3-isopropilamino) propoxi)fenil)acetamida
Número CAS	29122-68-7
Actividade farmacológica	(β-bloqueador) 90 % excretado sem alteração
Estrutura	
Massa molar (g mol ⁻¹)	266,34
Ponto de fusão (°C)	152,0
Constante de ionização, pK _a	9,6
Solubilidade em água (25 °C, mg L ⁻¹)	13 300
log K _{ow}	0,16

2.4. Procedimento Experimental

2.4.1. Métodos Analíticos

2.4.1.1. Caracterização das águas residuais

O efluente foi recolhido na ETAR de N.^a Sr.^a de Machede, um pequeno aglomerado populacional inserido num ambiente rural, pertencente ao distrito de Évora, e foi caracterizado pela determinação dos seguintes parâmetros de qualidade das águas residuais de acordo com os métodos APHA-AWWA-WPCF (APHA, 1998): sólidos

suspensos totais, pH e a carência química de oxigênio total e solúvel (CQO_t e CQO_s) de amostras filtradas através de filtros de 0,45µm.

2.4.1.2. Preparação das soluções-padrão de atenolol

Prepararam-se várias soluções padrão de atenolol com concentrações de 100 mgL⁻¹. Para tal, pesou-se rigorosamente cerca de 0,01 g de atenolol, dissolveu-se em 50 mL de água, transferiu-se para balões volumétricos de 100 mL e perfez-se com água desionizada. Estas soluções foram armazenadas refrigeradas (dentro de um frigorífico a uma temperatura de 4°C) e na escuridão, uma vez se degradam à temperatura ambiente e em exposição à luz.

2.4.1.3. Optimização das condições de quantificação espectrofotométrica

Para se obterem os melhores resultados na quantificação do composto em estudo, determinou-se o valor de comprimento de onda (c.d.o.) para o qual a sua absorvância apresentava um valor máximo. Para tal, utilizou-se uma solução padrão de atenolol com uma concentração de 10 mgL⁻¹.

2.4.1.4. Optimização do método de SPE

Para a optimização do método foram testadas várias colunas de SPE, fazendo passar por elas determinados volumes de amostras de água e efluente dopadas tendo em vista a quantificação do atenolol. As colunas utilizadas foram de fase reversa, uma polimérica (*Oasis*[®] *HLB*) e duas de sílica modificada (C₁₈) (*Waters Sep-Pak*[®] *Vac* e *Merck Lichrolut*[®] *RP18*).

Todas as colunas foram testadas utilizando duas condições de pH para a amostra, nomeadamente pH=12 (ajustado com NaOH) e sem qualquer ajuste de pH (pH ≈7-8).

Inicialmente, as colunas foram condicionadas com 10 mL de metanol, seguido de 10 mL de água *Milli-Q*.

Após as amostras serem filtradas com os filtros de 0,45µm, e sem deixar secar a coluna, foram percoladas lentamente através dos cartuchos. Depois disto fez-se passar 5,0

mL de água Milli-Q por algumas colunas para testar a influência do passo de lavagem na obtenção de melhores resultados de recuperação. As colunas foram posteriormente secas durante cerca de 15-20 minutos sob vácuo para remoção do excesso de água. O analito (atenolol) retido nas colunas foi eluído para um balão de fundo redondo com 5,0 mL de metanol. Após a eluição o metanol foi evaporado num rotavapor a 30°C até as amostras ficarem totalmente secas e em seguida foram redissolvidas com 1,0 mL de água Milli-Q.

2.4.1.5. *Quantificação do atenolol e validação do método analítico*

2.4.1.5.1. *Construção das rectas de calibração do atenolol*

As rectas de calibração do atenolol (concentração vs área do pico) foram construídas utilizando uma solução padrão de 100 mgL⁻¹ de atenolol a partir da qual se prepararam os padrões de diferentes concentrações através de diluição e usando água ultra pura (*Milli-Q*), tal como se pode observar na Tabela 8. Em seguida foram feitas três réplicas para cada solução padrão e cada solução foi injectada 5 vezes no equipamento de HPLC utilizando as condições de trabalho previamente optimizadas.

Tabela 8 – Soluções padrão de atenolol (mgL⁻¹) preparadas para construção das rectas de calibração.

Padrão	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
[atenolol] _{final} (mgL ⁻¹)	0,20	0,25	0,50	0,75	1,00	2,00	3,00	5,00	10,00	20,00	40,00	60,00

2.4.1.5.2. *Limites Instrumentais de detecção e quantificação*

Os limites de quantificação e de detecção instrumentais, do inglês (*IDL – Instrumental Detection Limit* e *IQL – Instrumental Quantification Limit*) utilizados para a análise cromatográfica neste trabalho foram determinados a partir das concentrações do analito que originam um sinal igual ao sinal do branco mais 3 vezes o desvio padrão e mais 10 vezes o desvio padrão, respectivamente (Miller e Miller, 2000).

Tendo em vista testar os possíveis efeitos negativos na performance da coluna LiChrolut C₁₈ devido ao uso de grandes volumes de amostra, foram feitos uma serie de testes utilizando variados volumes da solução (5, 50 e 100 mL) todas contendo a mesma quantidade de analito. O efeito da concentração de atenolol foi também investigado utilizando amostras de águas residuais dopadas com atenolol nas concentrações de 0,5; 1,5 e 2,5 mgL⁻¹, para o mesmo volume de amostra (5,0 mL) percolada através do cartucho de SPE. Foram feitas três análises em replicado (*n*=3) para cada volume de amostra percolada e cada concentração de atenolol. As recuperações absolutas de atenolol foram calculadas através da razão entre as áreas dos picos obtidas por HPLC das amostras pré-concentradas por SPE e dos respectivos padrões não extraídos. O limite de quantificação do método global (LOQ – *Limit of Quantification*) englobando todos os procedimentos analíticos utilizados neste estudo, foi calculado através da seguinte equação:

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

onde: IQL – *instrumental quantification limit*, é o limite de quantificação instrumental (mgL⁻¹), Rec (%) é a recuperação absoluta média do atenolol nas amostras de água residual por SPE e o C é o factor de concentração obtido por SPE (Vieno *et al.*, 2006).

Sempre que se obtiveram concentrações abaixo dos limites de quantificação instrumental para este composto, as amostras foram pré-concentradas através do método de SPE previamente otimizado.

2.4.1.5.3. Quantificação do atenolol por HPLC-DAD e HPLC-UV

Na quantificação do atenolol foram utilizados dois equipamentos de HPLC, um Agilent 1100 com detector DAD e detector UV, de injeção manual e um VWR-HITACHI com detector UV e equipado com *autosampler*. A coluna analítica utilizada foi uma coluna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB C₈ 4,6x15mm com 5 µm de partícula (Agilent, USA). O detector DAD funcionou no intervalo 200-500 nm (*step*: 2nm), e o perfil cromatográfico foi gravado a 230 nm, o que está de acordo com a bibliografia consultada (Andrisano *et al.*, 1999; Liu e Williams, 2007).

2.4.1.5.3.1. Condições utilizadas na quantificação do atenolol

A separação ocorreu em modo isocrático, e a fase móvel usada foi composta por um sistema binário de solventes: A - Acetonitrilo (ACN) e B – Água, na proporção 10:90 (v/v) e fluxo da fase móvel de $1,0 \text{ mLmin}^{-1}$. A água foi acidificada com 0,1 % (v/v) de ácido fosfórico (H_3PO_4). Todas as análises foram realizadas à temperatura ambiente e as injeções foram executadas manual e automaticamente, no equipamento Agilent 1100 e VWR - HITACHI, respectivamente. O volume de cada injeção foi de $20 \mu\text{L}$. Foram feitas três injeções em replicado para cada amostra previamente filtrada através de um filtro de $0,45 \mu\text{m}$.

2.4.1.5.4. *Validação do método analítico, reprodutibilidade, repetibilidade*

A repetibilidade e a reprodutibilidade dos métodos analíticos e dos métodos de quantificação na sua totalidade (procedimentos de extração por SPE e análise por HPLC) foram avaliadas através da medição das áreas dos picos cromatográficos, do perfil cromatográfico correspondentes ao atenolol.

Para a construção das rectas de calibração foram preparadas três soluções padrão para cada concentração utilizada, efectuaram-se no mínimo três injeções por HPLC-DAD e por HPLC-UV e foram obtidas no mínimo três réplicas para cada solução padrão. Os ensaios de SPE foram repetidos no mínimo três vezes para cada método e para cada coluna.

A repetibilidade dos sistemas HPLC-DAD e HPLC-UV foi testada através de seis injeções consecutivas em replicado da mesma solução padrão usando a mesma fase móvel e as mesmas condições de eluição, e foi avaliada como a dispersão (desvio padrão relativo) das áreas dos picos calculadas. A reprodutibilidade dos sistemas HPLC-DAD e HPLC-UV foi determinada efectuando a injeção de seis soluções padrão diferentes em dias diferentes usando sempre solvente recém preparado como fase móvel em cada dia, e foi avaliada como a dispersão ou desvio padrão relativo (% RSD) das áreas dos picos calculadas.

A reprodutibilidade do método analítico global foi determinada através da quantificação da remoção do atenolol em dias diferentes, de cinco soluções de efluente

dopadas com concentrações de atenolol ($0,5-2,5 \text{ mgL}^{-1}$) e diferentes volumes de amostra (5-100 mL), usando sempre em cada dia solvente recém preparado como fase móvel. A reprodutibilidade foi avaliada como a dispersão ou desvio padrão relativo (% RSD) das recuperações de atenolol.

Os resultados obtidos foram analisados através do método de análise de variância (ANOVA, factor único), para um nível de significância $P < 0,05$.

2.4.2. Remoção do atenolol pelos microcosmos de leitos construídos de macrófitas

2.4.2.1. Colheita e aclimatização da Planta (*Phragmites australis*)

Os rizomas da *Phragmites australis* com rebentos foram colhidos em zonas ambientais aquáticas no Alentejo, Portugal em Abril de 2007. Os rizomas foram cuidadosamente lavados de modo a serem removidas quaisquer partículas de solo/sedimentos agarradas às superfícies das plantas sendo posteriormente colocadas em vasos para aclimatização. As plantas requerem nutrientes para o seu crescimento e reprodução. Esses nutrientes são assimilados principalmente através do seu sistema radicular. Como estas plantas são muito produtivas, podem ser incorporadas na sua biomassa consideráveis quantidades de nutrientes (Brix, 1997). De modo a fornecer nutrientes às plantas, usou-se uma solução nutritiva de Hoagland modificada, gaseificada com arejamento forçado, adaptada de Fediuc e Erdei (2002) com o pH ajustado a 6.0 e com a seguinte composição química inicial: $2,5 \text{ mmolL}^{-1} \text{ K}^+$, $2 \text{ mmolL}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$, $2 \text{ mmolL}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$, $2 \text{ mmolL}^{-1} \text{ SO}_4^{2-}$, $2 \text{ mmolL}^{-1} \text{ NO}_3^-$, $0,5 \text{ mmolL}^{-1} \text{ H}_2\text{PO}_4^-$, $10 \text{ }\mu\text{molL}^{-1} \text{ Fe}^{3+}$, $10 \text{ }\mu\text{molL}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$, $1 \text{ }\mu\text{molL}^{-1} \text{ Mn}^{2+}$, $0,5 \text{ }\mu\text{molL}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$, $0,1 \text{ }\mu\text{molL}^{-1} \text{ MoO}_4^{2-}$.

Salienta-se o facto de que foi obtido um melhor crescimento dos rebentos da planta fazendo uma diluição de 10 % da solução inicial de Hoagland previamente preparada. A solução nutritiva foi repostada 2 vezes por semana.

O crescimento das plantas e dos seus rebentos (Figura 15) ocorreu numa estufa (Fitoclima, Portugal) a uma temperatura de 22°C , com 70 % de humidade relativa e com um ciclo de luminosidade/escurecimento de 12:12 h. A densidade de fluxo de fotão foi de $270 \text{ }\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$.

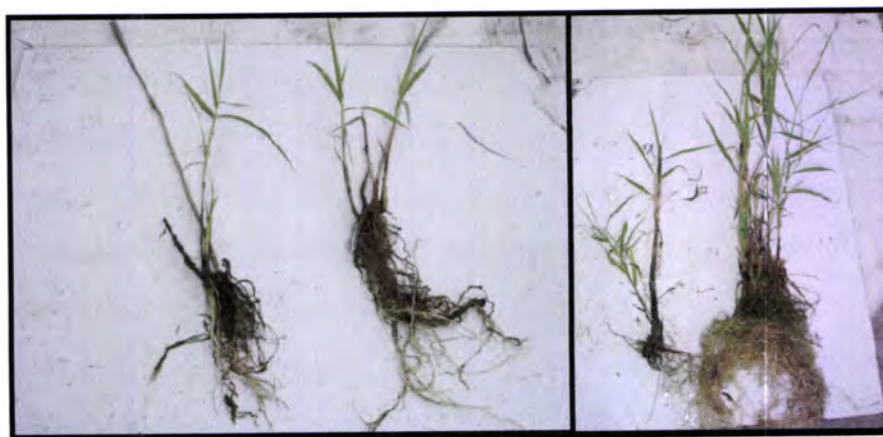


Figura 15 – Rebentos de plantas de *Phragmites australis* utilizadas nos ensaios.

Após 6 semanas, quando se desenvolveram novas raízes e folhas, foram seleccionados rebentos das plantas de tamanho significativo e uniforme e foram plantados em leitos de LECA numa estufa (Figura 16), onde permaneceram durante um período de aclimatização de aproximadamente um ano.



Figura 16 – Leitos de LECA plantados com *Phragmites australis*.

2.4.2.2. Estudos de conservação e estabilidade do atenolol

Os estudos de conservação e estabilidade iniciaram-se no dia 10 de Julho de 2008, com soluções de atenolol (10 e 50 mgL⁻¹), tendo sido recolhidas amostras após 0, 24, 48, 72, 144, 264, 432, 672 e 864 h.

2.4.2.2.1. *Ensaio Vidro vs Plástico*

Este ensaio consistiu no seguinte procedimento: Prepararam-se duas soluções padrão de atenolol com concentrações distintas (10 e 50 mgL^{-1}) e colocou-se igual volume de ambas (50 mL) em balões de vidro e recipientes de plástico tal como se pode visualizar na Figura 17.

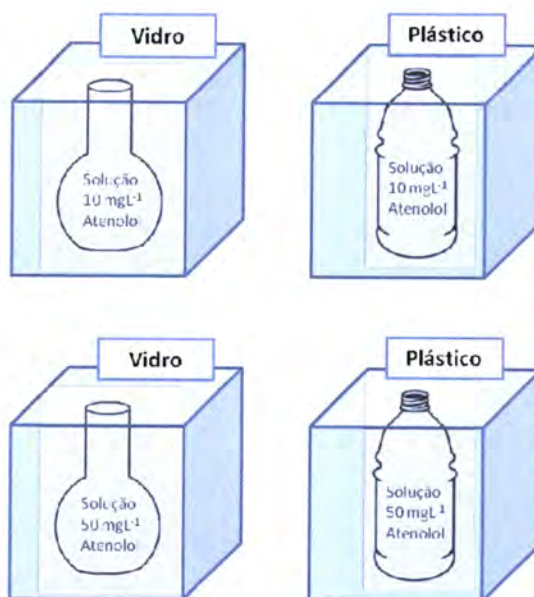


Figura 17 – Esquema dos ensaios (Vidro vs Plástico) para uma solução de atenolol 10 mgL^{-1} e 50 mgL^{-1}

Foram recolhidas amostras de 1 mL com um intervalo de 24 h , sendo que para tempos superiores as amostras foram recolhidas em instantes aleatórios. Após a recolha, as amostras foram imediatamente filtradas num filtro de $0,45 \mu\text{m}$ antes de serem injectadas no sistema cromatográfico e analisadas segundo as condições cromatográficas optimizadas previamente. Os ensaios decorreram à temperatura ambiente, na ausência de luminosidade e foram feitos em triplicado ($n=3$).

2.4.2.2.2. *Ensaio Frigorífico vs Congelador*

Com a realização deste ensaio pretendeu-se estudar qual o comportamento de soluções de diferentes concentrações do fármaco relativamente a diferentes temperaturas de manuseamento e armazenamento. Utilizou-se um volume igual das mesmas soluções preparadas para o estudo anterior e com as mesmas concentrações (10 e 50 mgL^{-1})

colocaram-se dois balões de 50 mL na refrigeração (dentro de um frigorífico a 4°C), e também soluções das duas concentrações no congelador (-17°C), mas desta feita em eppendorfs individuais de 1 mL, tendo como objectivo congelar as soluções e mantê-las armazenadas assim durante o tempo deste estudo, tal como se pode visualizar na Figura 18.

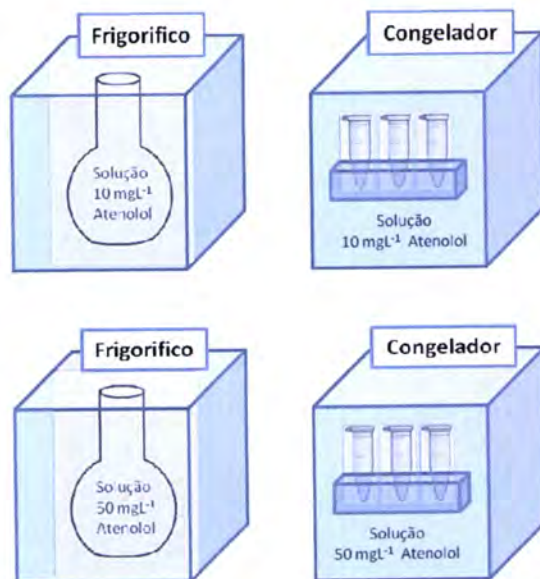


Figura 18 – Ensaio de conservação da solução atenolol (10 mgL⁻¹ e 50 mgL⁻¹) - Frigorífico vs Congelador

Foram recolhidas amostras de 1 mL das soluções que se encontravam refrigeradas no frigorífico, enquanto as amostras que se encontravam congeladas sendo individuais, foram retiradas do congelador até descongelarem totalmente. As amostras foram inicialmente recolhidas com um intervalo de 24 h, sendo que a partir das 72 h as amostras foram recolhidas em instantes aleatórios. Após a recolha foram imediatamente filtradas num filtro de 0,45 µm antes de serem injectadas no sistema cromatográfico e analisadas segundo as condições cromatográficas optimizadas.

O tempo de descongelamento das amostras foi o menor possível para evitar que o fármaco se degradasse, quer sob o efeito da luz, ou mesmo da temperatura, de modo a obter os melhores resultados possíveis.

Os ensaios decorreram obviamente na ausência de luminosidade uma vez que as soluções foram armazenadas na refrigeração (4°C) e na congelação (-17°C), o que implica ausência de luz e foram feitos em triplicado ($n=3$).

2.4.2.2.3. Ensaio Luminosidade vs Escuridão

Com a realização deste ensaio pretendeu-se assim estudar o efeito da fotoestabilidade do atenolol, ou seja qual o comportamento das soluções do fármaco quando se encontravam expostas à luminosidade ambiente. Para isso prepararam-se soluções de atenolol com as mesmas concentrações utilizadas nos estudos anteriores (10 e 50 mgL^{-1}) e colocaram-se em balões de 50 mL iguais volumes das diferentes soluções em exposição à luz e os outros ficaram totalmente isolados da luz ou de quaisquer outra fonte de luminosidade, tal como se pode visualizar na Figura 19.

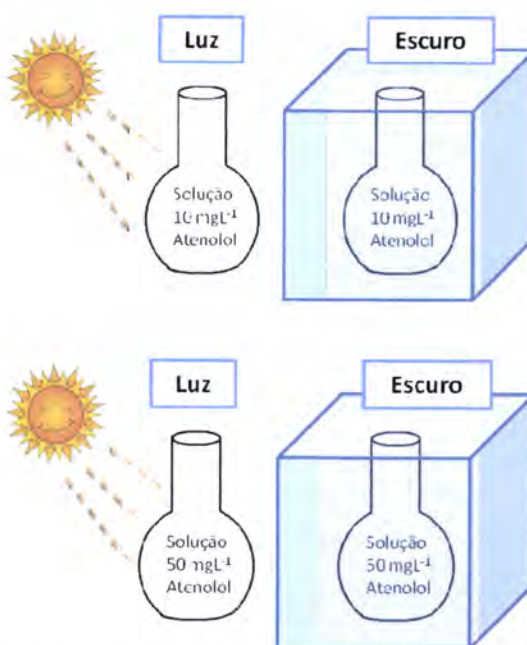


Figura 19 – Ensaio de Estabilidade da solução atenolol (10 mgL^{-1} e 50 mgL^{-1}) – Luminosidade vs Escuridão

Recolheram-se amostras de 1 mL das soluções com a ajuda de uma micro-seringa com um intervalo de 24 h , sendo que a partir das 72 h as amostras foram recolhidas em instantes aleatórios. Após a recolha as amostras foram imediatamente filtradas através de um filtro de $0,45 \mu\text{m}$ antes de serem injectadas no sistema cromatográfico e analisadas segundo as condições optimizadas. Os ensaios decorreram à temperatura ambiente e foram feitos em triplicado ($n=3$).

2.4.2.3. Estudos de adsorção da matriz de suporte (LECA)

2.4.2.3.1. Caracterização física e química da matriz de suporte

Para a caracterização físico-química da matriz de suporte determinaram-se as classes granulométricas, a porosidade do meio (volume de espaços vazios), a densidade aparente, o pH em água, o ponto de carga zero e a condutividade eléctrica.

A distribuição granulométrica do material foi efectuada recorrendo à técnica convencional de passagem *dry-sieving* ou seja passagem de uma amostra do material por uma coluna de crivos com malha cada vez mais apertada, por acção da gravidade e agitação mecânica (número de réplicas, $n=3$) (Day, 1965).

Os gráficos das distribuições das classes granulométricas dos materiais foram usados para estimar o d_{10} (tamanho efectivo das partículas) e o d_{60} . A uniformidade da distribuição do tamanho das partículas (coeficiente de uniformidade - U) foi calculada como a razão entre o d_{60} e o d_{10} . Desta forma quanto menor o coeficiente, mais uniforme é o material. Estes são os parâmetros que tradicionalmente são usados para efectuar a caracterização granulométrica de materiais. O tamanho efectivo das partículas (d_{10}) corresponde ao diâmetro (em mm) para o qual 10 % da amostra é mais fina que a medida desse diâmetro. O valor d_{60} corresponde ao diâmetro (em mm) para o qual 60 % da amostra é mais fina que a medida desse diâmetro.

A porosidade aparente (espaço vazio) do meio foi determinada pela quantidade de água necessária para saturar um volume conhecido do sólido (n° de replicas = 5) (Brix *et al.*, 2001; Fediuc e Erdei, 2002).

A densidade aparente foi determinada com base na razão entre o peso seco e o volume aparente do meio ($n=5$) (Brix *et al.*, 2001). A condutividade hidráulica foi medida tal como descrito por Cooper, (1996) ($n=5$).

O pH em água foi determinado por leitura potenciométrica de uma solução contendo 25 ml de água destilada e 10 g do material em pó a analisar, após agitação durante 30 minutos ($n = 4$) (McLean, 1982; Puchooa *et al.*, 1999). O ponto de carga zero foi determinado pelo método de titulação mássica ($n = 3$) (Noh e Schwarz, 1989; Zalac e Kallay, 1992).

A condutividade eléctrica foi determinada numa solução contendo 25 mL de água destilada e 10 gramas do material em pó a analisar, após agitação durante 30 minutos, utilizando a um condutivímetro Crison Micro CM 2202 (n = 4) (Puchooa *et al.*, 1999; Dordio *et al.*, 2009b).

A composição mineralógica do meio foi estudada por difracção de raios-X (XRD) através de um difractómetro avançado Bruker AXS-D₈ e com radiação CuK α e uma velocidade de 0,05°/s de 3 a 75°: 2 θ , após as amostras serem trituradas para que passassem num diâmetro de 106 μ m (Dordio *et al.*, 2009b)

2.4.2.3.2. *Preparação do meio de suporte (LECA 2/4)*

Neste estudo foi utilizada como matriz sólida de suporte na montagem dos ensaios, LECA com uma granulometria 2/4 (nome comercial Filtralite[®]NR 2-4) e fornecida pela empresa MaxitGroup Portugal. O material comercialmente disponível (LECA) apresenta quantidades consideráveis de partículas finas, deste modo foi necessário proceder, antes dos ensaios experimentais, à sua lavagem com água destilada, de modo a retirar-lhes o máximo de partículas finas possível. A LECA foi lavada várias vezes 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.

Uma vantagem que adveio da lavagem da LECA foi a diminuição das partículas finas em suspensão, o que facilita enormemente o passo de recolha das amostras, particularmente no passo de filtração através de um filtro de 0,45 μ m.

2.4.2.3.3. *Ensaio de remoção do atenolol através da LECA*

Com o objectivo de se determinar a eficiência de adsorção do material de suporte na remoção do fármaco da solução aquosa realizaram-se ensaios em que se colocaram em contacto amostras do meio filtrante (LECA), com soluções aquosas dopadas com diferentes concentrações de atenolol preparadas em água e efluente. Os ensaios foram realizados em descontínuo, à escala laboratorial e com 4 réplicas.

A razão entre o volume de solução (200 mL) e a massa do material (200 g) foram estabelecidas de modo a que correspondessem a uma taxa de inundação próxima de 100 %, pois esta seria a situação verificada num contexto de aplicação prática, numa estação de tratamento, situação que permitiria um contacto mais efectivo entre as soluções e o meio filtrante, e seria de esperar conseqüentemente 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 quadruplicado para cada concentração e a uma temperatura ambiente de aproximadamente 20°C.

2.4.2.3.3.1. Influência do tempo de contacto e concentração inicial na remoção do atenolol da água pela LECA

Foi então estudada a influência de certas condições experimentais, tais como o tempo de contacto, a concentração inicial do atenolol (a qual variou entre 1 mgL⁻¹ e 50 mgL⁻¹) na remoção de atenolol da água pela LECA.

As montagens dos ensaios para as diferentes concentrações do composto quando presente na água seguiram o seguinte procedimento:

Foi feita uma montagem experimental na qual se utilizaram 16 copos de 600 mL contendo o material de suporte e uma solução aquosa de atenolol em água. As concentrações testadas foram as seguintes: 1 mgL⁻¹, 10 mgL⁻¹, 35 mgL⁻¹, 50 mgL⁻¹.

A Figura 20 exemplifica a montagem simultânea dos ensaios de LECA 2/4 com a solução de atenolol para as várias concentrações. Os ensaios foram realizados em simultâneo e nas mesmas condições experimentais.

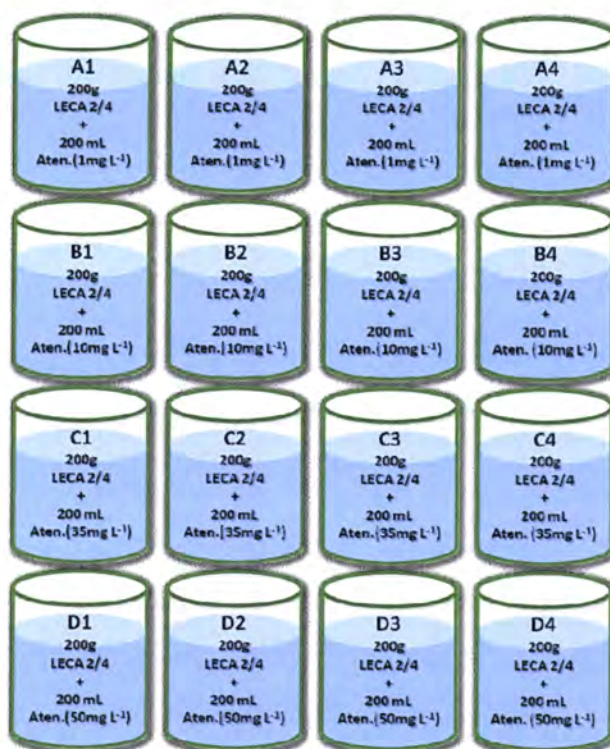


Figura 20 – Esquema da montagem dos ensaios da LECA 2/4 com atenolol. Os copos marcados com A, B, C e D correspondem às diferentes concentrações do fármaco e às réplicas dos ensaios em solução aquosa.

A determinação da quantidade de atenolol removida pela LECA foi feita recorrendo ao doseamento da concentração deste composto na solução em contacto com o meio de suporte. Recorreu-se, para tal, à recolha e filtração de amostras de 1 mL referentes a cada uma das soluções, e posterior injeção no HPLC, com registos dos valores das áreas dos picos obtidas e respectivas concentrações removidas do fármaco a cada 24 h. Para as amostras de concentração de 1 mgL⁻¹, utilizou-se o método de SPE optimizado para pré-concentrar as amostras a partir das 120 h.

A duração total dos ensaios foi de 216 h, pois verificou-se que passado esse tempo não se registava qualquer aumento da remoção dos compostos estudados. Deste modo, as recolhas das amostras foram efectuadas às 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 e 216 h, sendo a hora zero (t=0 h) quando se iniciava cada ensaio.

Para avaliar a influência da complexidade do meio líquido relativamente à eficiência do sistema, montaram-se novos ensaios de modo semelhante, para as mesmas concentrações do fármaco mas desta vez utilizando efluente em vez de água.

As montagens dos ensaios para as diferentes concentrações do composto em efluente seguiram o mesmo procedimento: foi feita uma montagem experimental na qual se utilizaram 16 copos de 600 mL contendo o material de suporte e uma solução de atenolol em efluente. As concentrações testadas foram as seguintes: 1 mgL^{-1} , 10 mgL^{-1} , 35 mgL^{-1} , 50 mgL^{-1} .

A Figura 21 exemplifica a montagem simultânea dos ensaios de LECA 2/4 com a solução de atenolol para as várias concentrações em efluente. Os ensaios foram realizados em simultâneo e nas mesmas condições experimentais.

A determinação da quantidade de atenolol removida pela LECA foi feita recorrendo ao doseamento da concentração deste composto na solução em contacto com o meio de suporte. Recorreu-se, para tal, à recolha e filtração de amostras de 1 mL referentes a cada uma das soluções, e posterior injeção no HPLC, com registos dos valores das áreas dos picos obtidas e respectivas concentrações removidas do fármaco a cada 24 h.

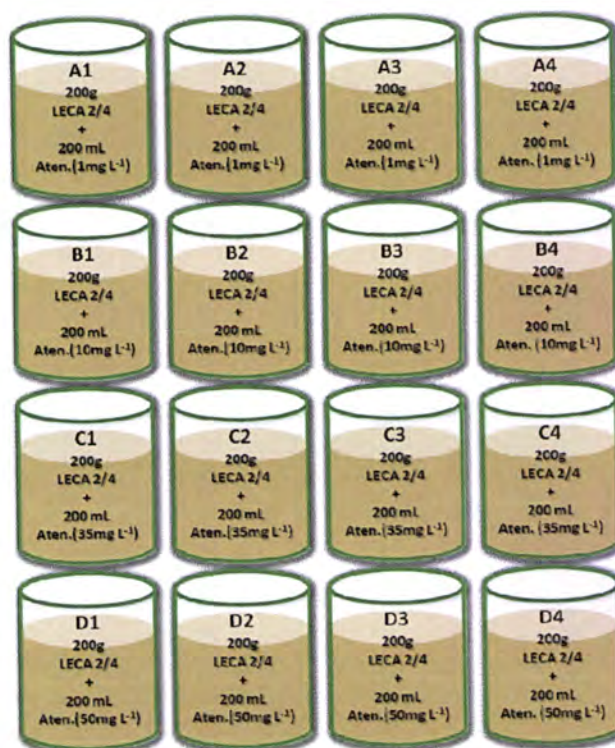


Figura 21 – Esquema da montagem dos ensaios da LECA 2/4 com atenolol. Os copos marcados com A correspondem às diferentes concentrações do fármaco em efluente e os copos marcados com B, C e D são as réplicas dos ensaios.

A duração total dos ensaios foi de 168 h, pois verificou-se que passado esse tempo não se registava qualquer aumento da remoção do composto estudado. Deste modo, as recolhas das amostras foram efectuadas às 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 168 h, sendo a hora zero aquela em que se iniciava cada ensaio. Para concentrações de 1 mgL^{-1} , utilizou-se o método de SPE otimizado para pré-concentrar as amostras.

2.4.2.4. Montagem e Optimização dos ensaios de SSFCW

Após se terem realizado alguns estudos prévios, procedeu-se então à montagem e optimização dos ensaios finais pretendidos. Foram construídos quatro 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 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 plantados 2 leitos com plantas jovens provenientes de rebentos de *Phragmites australis* (densidade das plantas = 20 plantas/m^2) e deixaram-se outros 2 não plantados.

Utilizaram-se também dois recipientes adicionais, que foram cheios com a solução de efluente dopado com atenolol e sem conter quaisquer tipos de plantas ou materiais de suporte. Os ensaios com estes dois recipientes tiveram como objectivo avaliar a biodegradação do atenolol em efluente (Figuras 22 e 23)

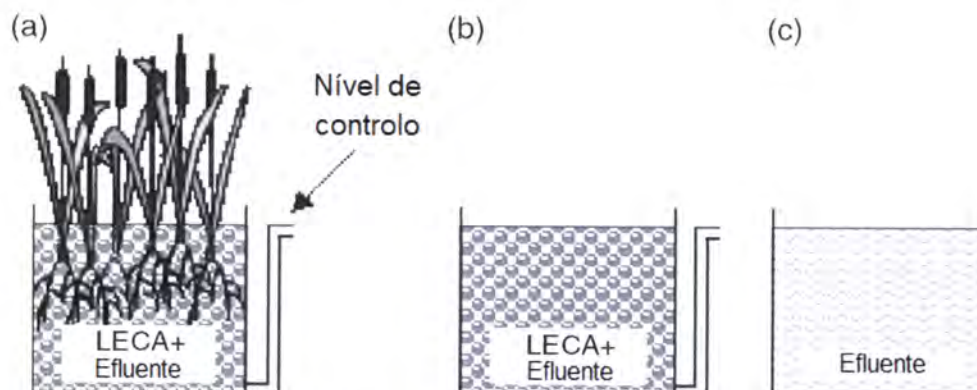


Figura 22 – Diagrama esquemático da montagem experimental usada nos ensaios de remoção do atenolol: (a) leitos plantados (com *Phragmites australis*); (b) leitos não plantados de LECA e (c) sistemas com apenas efluente.



Figura 23 – Leitos construídos de macrófitas de fluxo sub-superficial utilizados no trabalho

2.4.2.5. Operação dos microcosmos de leitos construídos de macrófitas e recolha de amostras

Todos os sistemas descritos no ponto anterior foram cheios com efluente dopado com atenolol. Esta solução utilizada nos ensaios foi preparada a partir de um efluente recolhido após a etapa de tratamento secundário numa ETAR que serve uma pequena comunidade rural de cerca de 400 habitantes. O processo de tratamento usado nesta ETAR inclui, gradagem, a sedimentação primária e o tratamento convencional de lamas activadas.

O efluente com que se preparou a solução utilizada na montagem do ensaio foi recolhido na ETAR e dopado com atenolol através da diluição de uma solução aquosa de atenolol (100 mgL^{-1}) que existia em stock, obtendo-se uma concentração final de $0,78 \text{ mgL}^{-1}$ de atenolol.

As experiências foram conduzidas em modo descontínuo (*batch mode*), mantendo-se a quantidade de solução inicial 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 atenolol em períodos de 6, 12 e 24 h no primeiro dia e posteriormente com um dia de periodicidade durante um

total de oito dias 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 até ao momento da sua análise, a qual foi sempre feita após 2 h 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.

III - Apresentação e Discussão de Resultados

III - Apresentação e Discussão de Resultados

3.1. Método analítico para detecção e quantificação do atenolol

3.1.1. Optimização das condições de quantificação espectrofotométrica

Segundo a bibliografia consultada, os valores óptimos de absorvância para o atenolol, estariam entre os c.d.o. de 200 e 275 nm (Andrisano *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2000; Konstantinou *et al.*, 2001). Com base nestas informações, obteve-se o espectro de absorção para uma solução de atenolol de 10 mgL^{-1} (Figura 24), varrendo o espectro electromagnético na zona do ultra-violeta, entre os c.d.o. de 190 e 400 nm. Utilizou-se uma concentração de 10 mgL^{-1} pelo facto de esta ser uma concentração bastante superior à concentração que se planeou testar nos ensaios de remoção finais (1 mgL^{-1}), e que proporciona um bom espectro de absorção.

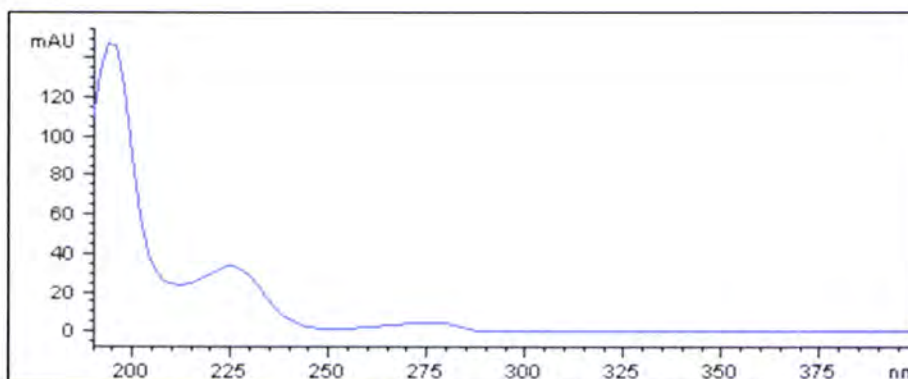


Figura 24 – Espectro de absorção de uma solução de atenolol com uma concentração de 10 mgL^{-1} .

3.1.2. Análise cromatográfica

A quantificação de fármacos tais como o atenolol é maioritariamente feita através de técnicas cromatográficas acopladas, tais como LC-ESI-MS; LC-ESI-MS *tandem* e GC-MS, devido aos baixos limites de quantificação que estas técnicas apresentam (ngL^{-1}) (Ternes *et al.*, 2001). Porém, o detector ESI-MS tem desvantagens associadas com a

ionização *electrospray* (ESI) a qual é altamente sensível a outros componentes presentes na matriz que podem induzir uma supressão de sinal (habitualmente) ou a um aumento de sinal, conduzindo a resultados erróneos (Gros *et al.*, 2006). A determinação de fármacos em amostras de água através de GC-MS requer sempre a derivatização da amostra. No caso dos β -bloqueadores é necessária uma derivatização a dois passos por silanização dos grupos hidroxilo e pela trifluoroacetilação das misturas secundárias amina. No caso da derivatização dos grupos hidroxilo não ser completa, o uso de GC-MS pode vir a tornar-se inapropriado para quantificação destes fármacos em amostras de água (Ternes *et al.*, 2001). Por outro lado as técnicas de HPLC-DAD e HPLC-UV quando acopladas com um método apropriado de concentração do analítico, podem constituir alternativas viáveis e mais baratas para a determinação e quantificação de compostos orgânicos vestigiais, tais como o atenolol. Neste trabalho foram desenvolvidos métodos de HPLC-DAD e HPLC-UV para avaliar a eficiência dos microcosmos de leitos construídos de macrófitas de fluxo sub-superficial (SSFCW) na remoção de atenolol de águas residuais contaminadas.

Para a optimização da separação cromatográfica foram feitas uma série de experiências preliminares testando diferentes fases como o metanol, acetonitrilo, ou misturas de metanol e acetonitrilo como solvente orgânico, e água com diferentes aditivos, tais como o ácido fórmico e o ácido fosfórico. As melhores condições de quantificação foram alcançadas usando uma separação isocrática com a fase móvel composta por 10:90 (v/v) de acetonitrilo: água acidificada com 0,1 % (v/v) de ácido fosfórico.

Tal como foi descrito, o perfil cromatográfico foi traçado a 230 nm que corresponde a um máximo de absorção para o atenolol. Após a injeção de soluções padrão do composto, segundo as condições já descritas, procedeu-se à sua identificação nos cromatogramas obtidos por HPLC-DAD e HPLC-UV, com base na comparação dos espectros obtidos *on-line* para cada pico com os espectros descritos para este composto na bibliografia, e na comparação dos tempos de retenção dos picos cromatográficos com os obtidos para as soluções padrão. Sempre que necessário foram também realizados estudos de co-eluição.

Nas Figuras 25, 26, 27 e 28 apresentam-se os respectivos cromatogramas obtidos para o atenolol por HPLC-DAD e HPLC-UV para soluções de diferentes concentrações (10 mgL^{-1} e 60 mgL^{-1}).

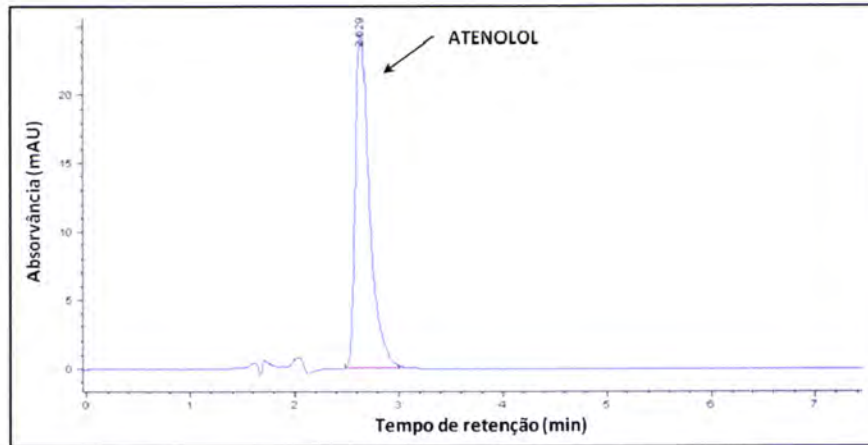


Figura 25 – Cromatograma obtido por HPLC – DAD para uma solução padrão de atenolol 10 mgL^{-1} . Coluna Zorbax-Eclipse XDB-C₈. Condições de eluição na coluna de HPLC: Modo Isocrático - Solvente A acetonitrilo; Solvente B água com ácido fosfórico (10:90 (v/v)).

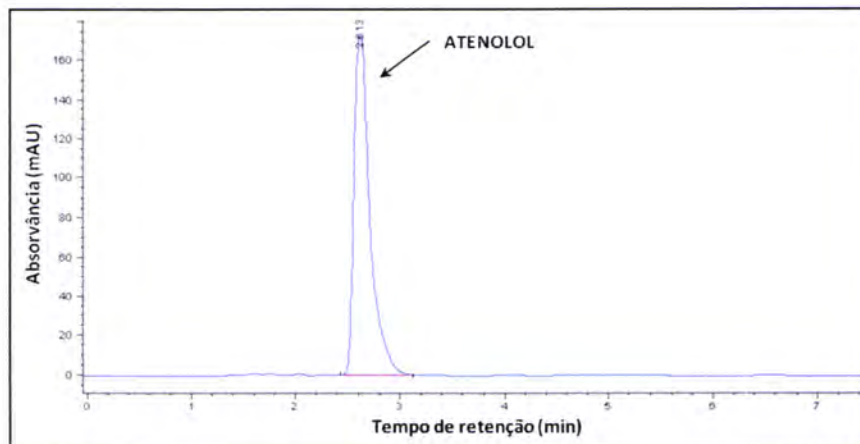


Figura 26 – Cromatograma obtido por HPLC – DAD para uma solução padrão de atenolol 60 mgL^{-1} . Coluna Zorbax-Eclipse XDB-C₈. Condições de eluição na coluna de HPLC: Modo Isocrático - Solvente A acetonitrilo; Solvente B água com ácido fosfórico (10:90 (v/v)).

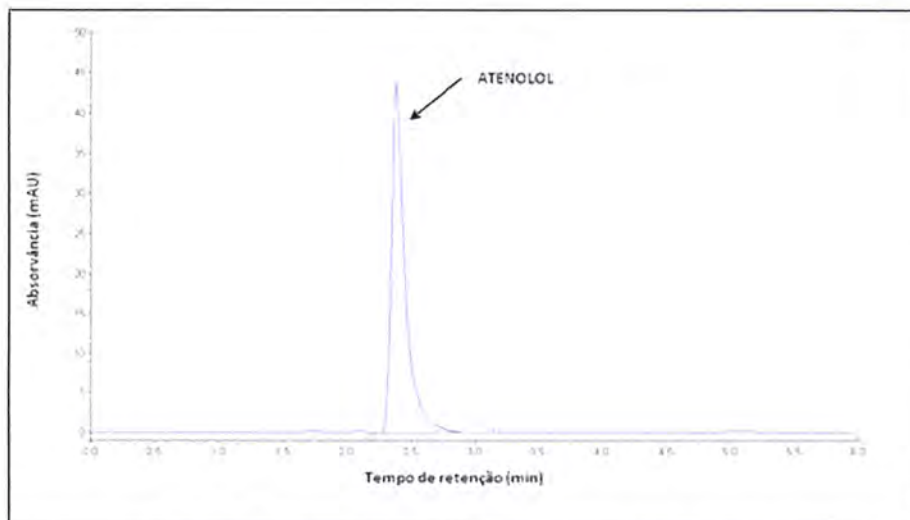


Figura 27 – Cromatograma obtido por HPLC – UV para uma solução padrão de atenolol 10mgL^{-1} . Coluna Zorbax-Eclipse XDB-C₈. Condições de eluição na coluna de HPLC: Modo Isocrático - Solvente A acetoneitrilo; Solvente B água com ácido fosfórico (10:90 (v/v)).

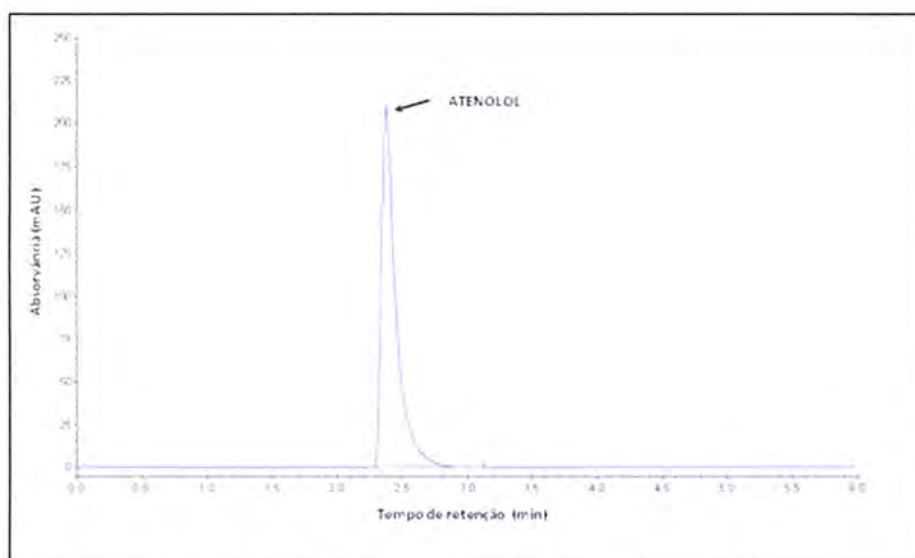


Figura 28 – Cromatograma obtido por HPLC – UV para uma solução padrão de atenolol 60mgL^{-1} . Coluna Zorbax-Eclipse XDB-C₈. Condições de eluição na coluna de HPLC: Modo Isocrático - Solvente A acetoneitrilo; Solvente B água com ácido fosfórico (10:90 (v/v)).

3.1.3. Quantificação do atenolol

Tendo como objectivo a quantificação do atenolol em diversas amostras, procedeu-se à construção das respectivas rectas de calibração (concentração vs área do pico) para o composto. Foram obtidas rectas em dois aparelhos de HPLC equipados com

detectores diferentes (DAD e UV, respectivamente), para as quais se determinaram os respectivos limites de detecção (LOD) e os limites de quantificação (LOQ) correspondentes a cada equipamento. Utilizaram-se para a quantificação do atenolol duas rectas de calibração, uma para concentrações altas e outra para concentrações baixas, sendo que os dados foram tratados utilizando-se a recta mais adequada, tendo em conta a gama de valores a que pertence cada concentração.

3.1.2.1. Rectas de Calibração

Recorrendo ao software Microsoft® Excel, obtiveram-se as equações das rectas de calibração para o equipamento HPLC da Agilent e para o equipamento HPLC da VWR, cujos parâmetros característicos se encontram nas Tabelas 9 e 10. A taxa de linearidade determinada para os padrões de atenolol foi muito boa ($R^2 > 0,99$);

Analisando as equações das rectas anteriormente apresentadas é possível concluir que sendo o coeficiente de determinação, ($R^2 > 0,99$) para todas elas então pode afirmar-se que 99 % do comportamento da área pode ser explicado pelo efeito da concentração de atenolol. Uma vez que se obtiveram boas rectas de calibração, com bons coeficientes de correlação para os dois equipamentos, isso indica que os valores obtidos para as concentrações determinadas a partir delas serão fiáveis.

Para a construção das rectas de calibração foram realizados no mínimo três réplicas de cada solução padrão, e cada solução foi analisada três vezes em cada um dos equipamentos, permitindo assim o tratamento estatístico dos resultados por análise de variância - ANOVA factor único e análise estatística das regressões (Microsoft® Excel, 2007). Os valores das áreas dos picos do atenolol nos cromatogramas, bem como o tratamento estatístico dos resultados, podem ser consultados no Anexo 2.

Apresentação e Discussão de Resultados

Tabela 9 – Rectas de calibração ($y = ax + b$), LOD e LOQ relativamente ao atenolol, para os dois equipamentos de HPLC – VALORES BAIXOS.

	Equipamentos	
	VWR	Agilent
Equação da recta	$y=134565x+13022$	$y=39,744x-5,0879$
a (intervalo de confiança ¹)	134565 (131518 – 137611)	39,7440 (0,0236 – 0,2472)
b (intervalo de confiança ¹)	13022 (6606 – 19438)	-5,0879 (0,0186 – 1,7609)
R ²	0,9994	0,9960

¹Limites inferior e superior do intervalo com 95 % de confiança (Estatística de regressão, Microsoft® Excel 2007)

Tabela 10 – Rectas de calibração ($y = ax + b$), LOD e LOQ relativamente ao atenolol, para os dois equipamentos de HPLC – VALORES ALTOS.

	Equipamentos	
	VWR	Agilent
Equação da recta	$y=109356x+71300$	$y=31,5410x-33,6890$
a (intervalo de confiança ¹)	109356 (106529 – 112183)	31,5410 (35,6205 – 42,7301)
b (intervalo de confiança ¹)	71300 (-7,6178 – 142607)	-33,6890 (-13,2115 – 1,7609)
R ²	0,9992	0,9993

¹Limites inferior e superior do intervalo com 95 % de confiança (Estatística da regressão Microsoft® Excel 2007)

3.1.2.2. *Parâmetros de validação do método para o HPLC-DAD e HPLC-UV*

O IDL e IQL das separações cromatográficas, calculados através do método de Miller e Miller (2000) a repetibilidade, a reprodutibilidade e o LOQ do método analítico desenvolvido para os equipamentos de HPLC foram calculados de acordo com Vieno *et al.* (2006) e são apresentados nas Tabelas 11 e 12.

Apresentação e Discussão de Resultados

Tabela 11 – Parâmetros de validação do método para o HPLC-DAD.

Gama de linearidade (mgL ⁻¹) (R ²)	Sistema HPLC-DAD				Método analítico completo	
	IQL (mgL ⁻¹)	IDL (mgL ⁻¹)	Repetibilidade %RSD	Reprodutibilidade %RSD	LOQ (mgL ⁻¹)	Reprodutibilidade %RSD
0,2-60 (0,99)	0,81	0,24	1,40	2,30	8,90E-3	3,35

IQL e IDL: limites de quantificação e detecção instrumentais (*instrumental quantification and detection limits*); LOQ: limite de quantificação (*limit of quantification*)

Tabela 12 – Parâmetros de validação do método para o HPLC-UV.

Gama de linearidade (mgL ⁻¹) (R ²)	Sistema HPLC-UV				Método analítico completo	
	IQL (mgL ⁻¹)	IDL (mgL ⁻¹)	Repetibilidade %RSD	Reprodutibilidade %RSD	LOQ (mgL ⁻¹)	Reprodutibilidade %RSD
0,2-60 (0,99)	0,30	0,09	1,52	2,51	3,40E-3	3,69

IQL e IDL: limites de quantificação e detecção instrumentais (*instrumental quantification and detection limits*); LOQ: limite de quantificação (*limit of quantification*)

Na realização deste trabalho foram utilizados dois equipamentos de HPLC com detectores diferentes (HPLC-UV e HPLC-DAD), sendo que um permite análises cromatográficas a comprimento de onda fixo e o segundo a comprimento de onda variável, além de fornecer o espectro UV-Vis *online* para cada pico. Uma vez que neste tipo de análises poderão existir dúvidas sobre a natureza dos picos obtidos nos cromatogramas foram utilizados os dois aparelhos recorrendo-se ao HPLC-DAD sempre que se pretendeu confirmar a identificação do pico do atenolol e a existência de outros compostos na amostra.

Além disso, o equipamento VWR uma vez que está equipado com um *autosampler* permite realizar análises mais rápidas, fiáveis e sem necessitar de estar sempre um operador presente para injectar as amostras.

3.2. Otimização do método de SPE

Tendo em vista a otimização de um método de SPE para a pré-concentração de atenolol em amostras de águas residuais foram testadas vários cartuchos SPE incluindo um polimérico (Oasis HLB[®]) da Waters e dois cartuchos apolares (Merck LiChrolut[®] C₁₈ e Waters Sep Pak[®] C₁₈). Utilizaram-se estas colunas uma vez que foram referenciadas em diversos estudos como apresentando elevadas recuperações em condições básicas (Gros *et al.*, 2006).

A eficiência dos diferentes cartuchos de SPE foi primeiramente comparada usando uma solução padrão de água dopada com atenolol numa concentração exacta e conhecida de 0,5 mgL⁻¹. Deste modo, a solução aplicou-se nas diferentes colunas de SPE, e avaliou-se a percentagem de recuperação obtida para cada coluna e cada método. O atenolol é um composto farmacêutico básico (pK_a= 9,6) o qual a valores de pH básicos deverá encontrar-se predominante na forma não protonada, aumentando a sua afinidade ao material de enchimento da coluna. Em 2006, Gros *et al.* testaram vários cartuchos de SPE para pré-concentrar um número de compostos farmacêuticos, incluindo o atenolol, e concluíram que a valores de pH baixos (pH=2) as recuperações de atenolol da coluna Oasis HLB[®] foram significativamente mais baixas do que as obtidas se não fosse feito qualquer ajuste no pH (pH neutro) (Gros *et al.*, 2006). Do mesmo modo Vieno *et al.* (2006), utilizando uma coluna Oasis HLB[®], evidenciaram nos seus estudos que as recuperações obtidas para o atenolol eram muito baixas para valores de pH baixos (pH=4.0). No entanto a pH=10, foram obtidas boas recuperações para o atenolol, o que evidencia uma melhor recuperação por SPE do fármaco a valores de pH mais elevados. Isto verificou-se uma vez que os β-bloqueadores são bases fracas, com valores de pK_a entre 9,2 e 9,7 e desta forma a valores de pH elevados eles encontram-se maioritariamente como compostos sem carga, sendo deste modo mais facilmente retidos pelo material de enchimento do cartucho (Vieno *et al.*, 2006).

Assim, foram testados dois valores de pH (ajustado a pH=12 e sem ajustes de pH (pH≅7)) para avaliar a eficiência de recuperação das diferentes colunas de SPE (Ternes *et al.*, 2001; Gros *et al.*, 2006).

Existem várias referências sugerindo que um passo de lavagem com água após a percolação da amostra através da coluna pode limpar alguns compostos interferentes que se encontrem na matriz e melhora as recuperações de fármacos nos métodos de pré-concentração por SPE. Este parâmetro foi também avaliado. O eluente utilizado na optimização do método de SPE foi o metanol.

A avaliação da eficiência das diferentes colunas de SPE foi efectuada com base na variação das áreas dos picos, correspondentes ao atenolol, nos cromatogramas obtidos pelos dois equipamentos de HPLC. A concentração de atenolol foi obtida por substituição dos valores da área do pico na equação das rectas de calibração atrás referidas.

Uma vez que se partiu de uma amostra dopada com $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de atenolol, o valor esperado de concentração após a aplicação da técnica de SPE foi de $2,5 \text{ mgL}^{-1}$, pois a amostra foi pré-concentrada cinco vezes, e verificou-se que se obtiveram boas taxas de recuperação para todas as colunas.

As taxas de recuperação foram calculadas com base nos valores médios das concentrações obtidas para as diferentes colunas de SPE de acordo com o seguinte:

$$\text{Taxa de recuperação} = \frac{\text{valor médio da concentração obtida por coluna}}{\text{valor da concentração real de atenolol}} \times 100$$

Os resultados obtidos através da utilização dos quatro métodos diferentes SPE testados encontram-se nas tabelas do anexo 3, sendo que os resultados finais são mostrados na Figura 29 e na Tabela 13.

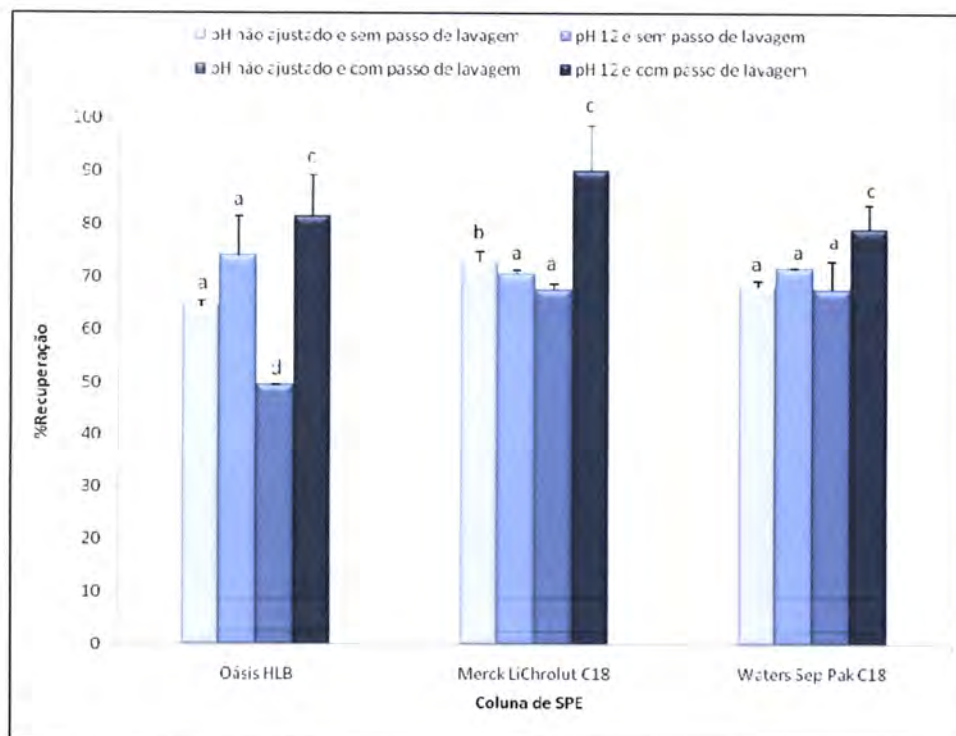


Figura 29 – Influência dos diferentes materiais constituintes das colunas de SPE, ajustes de pH (7 e 12) e do passo de lavagem na recuperação de atenolol a partir de amostras de água. As barras de erro verticais indicam \pm SD ($n=3$). O nível de significância $P < 0.05$ quando comparado com o padrão. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes.

Observando os resultados obtidos para as diferentes colunas verifica-se que não se verificou um aumento na recuperação por SPE quando o pH da amostra foi ajustado a doze relativamente à recuperação obtida para a amostra sem ajuste de pH ($\cong 7$). Contudo, observou-se um aumento significativo nas recuperações de atenolol, quando foi adicionado ao procedimento um passo adicional de lavagem, apenas nas amostras às quais o pH foi previamente ajustado a doze. Em condições óptimas, os três cartuchos testados não mostraram diferenças significativas em termos de recuperação de atenolol. Desta forma foram escolhidas as colunas Merck LiChrolut[®] C₁₈ para serem usadas neste estudo uma vez que são mais baratas.

Tendo como base os resultados obtidos em soluções de atenolol preparadas em água, a optimização do método de SPE em amostras de efluente dopadas com atenolol foi realizada utilizando as condições optimizadas (amostra a pH=12 e usando um passo de lavagem com 5 mL de água).

❖ Método SPE otimizado

As amostras foram filtradas num filtro PTFE de 0,45 µm e o seu pH foi ajustado a 12 antes de passarem através do cartucho. O cartucho foi condicionado com 10 mL de metanol, seguido de 10 mL de água *Milli-Q*. Sem deixar secar a coluna foram adicionados lentamente volumes de amostra com pH=12 (amostras recolhidas nos diversos ensaios). Lavou-se o cartucho com 5 mL de água *Milli-Q*. Seguidamente o cartucho foi seco através de vácuo durante 15-20 minutos. A eluição do atenolol foi executada com 5,0 mL de metanol. O metanol foi evaporado no rotavapor a 30°C e redissolveu-se a amostra num volume de 1,0 mL de água *Milli-Q* (Matamoros e Bayona, 2006; Dordio *et al.*, 2009c). Em seguida as amostras foram injectadas num equipamento de HPLC-DAD, e foram obtidos os respectivos cromatogramas.

Tabela 13 – Valores das percentagens de recuperação, desvio padrão e desvio padrão relativo, obtidos para os diferentes métodos e utilizando as diferentes colunas de SPE.

Colunas SPE	Recuperação ¹ (%) ± SD ² (RSD, %) ³			
	Método 1 ⁴	Método 2 ⁴	Método 3 ⁴	Método 4 ⁴
Oasis® HLB	73,91 ^a ± 7,66 (10,4)	64,37 ^b ± 1,13 (1,75)	81,45 ^e ± 7,80 (9,58)	49,57 ^f ± 0,09 (0,19)
LiChrolut® RP18	70,58 ^a ± 0,73 (1,04)	72,89 ^c ± 1,88 (2,58)	90,10 ^e ± 8,45 (9,36)	67,52 ^g ± 1,30 (1,92)
Waters Sep-Pak® Vac	71,50 ^a ± 0,13 (0,18)	68,28 ^d ± 0,90 (1,32)	79,05 ^e ± 4,61 (5,83)	67,53 ^g ± 5,43 (8,04)

¹ Os valores representam a média de três réplicas de cada extracção por SPE (três medidas cada). Médias com índices diferentes são significativamente diferentes (ANOVA, $P < 0.05$)

² Desvio-padrão dentro da população

³ Desvio-padrão relativo

⁴ Métodos: 1) pH 12 e sem passo de lavagem; 2) pH não ajustado e sem passo de lavagem; 3) pH 12 e com passo de lavagem; 4) pH não ajustado e com passo de lavagem

3.2.1. Influência do volume de amostra e da concentração na percentagem de recuperação do atenolol em amostras de águas residuais dopadas

Foram feitos uma série de ensaios de modo a ser testado o possível efeito de outros compostos presentes nas amostras de efluente nas recuperações de atenolol quando grandes volumes de águas residuais são percoladas através do cartucho LiChrolut®C₁₈,

variando os volumes das amostras mas mantendo a mesma quantidade de atenolol. Os dados apresentados na Tabela 14 provam que o aumento dos volumes por um factor de 100 não influenciou significativamente as recuperações de atenolol, todos os valores obtidos podem ser consultados no Anexo 4.

Tabela 14 - Influência do volume de amostra e concentração na taxa de recuperação do atenolol em águas residuais dopadas (média \pm desvio padrão, $n = 3$) obtidas utilizando cartuchos LiChrolut[®] C₁₈.

Concentração de atenolol (mgL ⁻¹)	% Recuperação		
	0,5	1,5	2,5
	83,85 ^a \pm 2,33	84,77 ^a \pm 1,93	85,59 ^a \pm 3,91
Volume (mL)	5	50	100
	85,59 ^a \pm 4,01	85,58 ^a \pm 3,78	83,26 ^a \pm 1,36

Médias com índices diferentes indicam valores significativamente diferentes (ANOVA, $P < 0.05$)

Para além disso, concentrações elevadas de atenolol nas amostras (até aos 2,5 mgL⁻¹) parecem não diminuir as recuperações do método SPE. Assim, o baixo limite de quantificação de todo o método analítico (0,009 mgL⁻¹, ver nas Tabela 11 e 12) em conjunto com a elevada reprodutibilidade do método analítico (RSD < 4 %, Tabelas 11 e 12) provam que o método analítico desenvolvido é adequado para a determinação do atenolol em águas residuais.

3.2.2. Tratamento Estatístico

A comparação entre os resultados obtidos nas colunas de extracção: Merck LiChrolut RP[®] C₁₈, Oasis[®] HLB e Waters SEP-PAK[®] VAC foi feita através de tratamento estatístico por análise de variância a factor único (*analysis of variance*, ANOVA Single Factor).

ANOVA factor único: Esta técnica estatística é utilizada para separar e avaliar diferentes causas de variação, testando as diferenças entre médias de amostras. Pode ser utilizada no caso de haver uma ou mais fontes de variação.

Neste trabalho, a ANOVA foi efectuada a um nível de significância $P < 0,05$, correspondente a um grau de confiança de 95 %.

As conclusões retiradas deste tipo de análise baseiam-se nos seguintes pressupostos:

- Se $F > F_{\text{critico}}$ => as médias são significativamente diferentes
- Se $F < F_{\text{critico}}$ => as médias não são significativamente diferentes

Na otimização dos métodos de pré-concentração do fármaco estudado foram sempre realizados no mínimo 3 replicados de cada extração por SPE, e para cada extracto, foram determinadas 3 vezes por HPLC as áreas do pico do atenolol. Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente (ANOVA- factor único, Microsoft Excel[®] 2007), para validar diferenças significativas entre os procedimentos aplicados, quando estas ocorreram.

3.3. Remoção do atenolol pelos microcosmos de leitos construídos de macrófitas

3.3.1. Estudos de Estabilidade e Conservação

Nos meios aquáticos, compostos orgânicos tais como os fármacos podem seguir vários percursos de degradação, tais como degradação biótica e abiótica (hidrólise, fotólise, etc.). A estabilidade ambiental dos fármacos é de considerável importância de modo a que se possa fazer uma previsão adequada do seu destino ambiental (Piram *et al.*, 2008).

Deste modo, realizaram-se previamente estudos da estabilidade e conservação do fármaco, os quais se revelaram de extrema importância para a montagem do ensaio final onde se quantificou a eficiência de remoção do atenolol em microcosmos de leitos construídos de macrófitas, uma vez que permitiram prever e estudar determinados comportamentos do fármaco em função de situações ambientais reais e distintas. Nesse contexto utilizaram-se soluções de concentrações relativamente elevadas (10 e 50 mgL⁻¹) uma vez que assim se torna mais fácil analisar a cinética de degradação do fármaco quando colocado sob várias condições. Os valores obtidos para os diferentes ensaios podem ser consultados no Anexo 5.

3.3.1.1. Ensaio vidro vs plástico

Através da realização deste ensaio pretendeu-se verificar qual a eficiência de adsorção de diferentes materiais (vidro e plástico) relativamente ao atenolol, quando estes se encontram em contacto com soluções de diferentes concentrações do fármaco em estudo. Estes resultados são muito importantes uma vez que os balões onde se prepararam e armazenaram as soluções são feitos de vidro, assim como os recipientes utilizados na montagem do ensaio final são feitos de plástico. Desta forma pretendeu-se verificar se os diferentes materiais iriam ou não ter capacidade de adsorver o fármaco presente na solução e de certo modo constituírem uma interferência relativamente aos resultados finais que se pretendem obter, reduzindo desta forma a fiabilidade e veracidade do estudo pretendido.

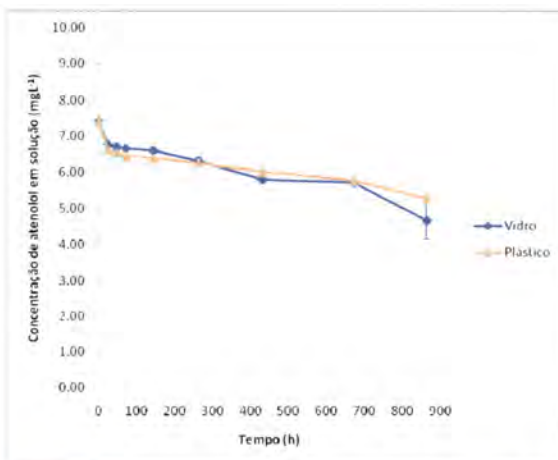


Figura 30 - Concentração de solução atenolol 10 mgL⁻¹ em contacto com vidro e plástico em função do tempo (h).

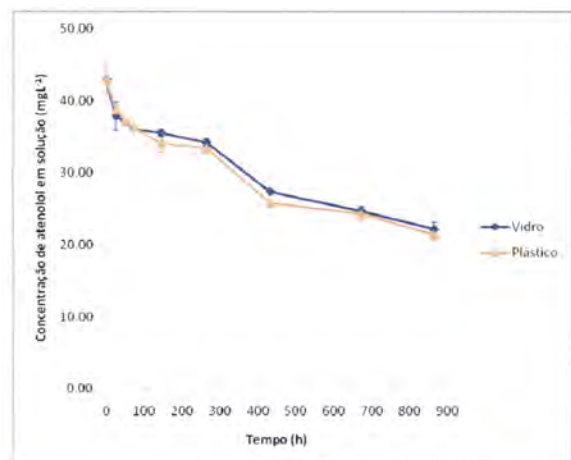


Figura 31 - Concentração de solução atenolol 50 mgL⁻¹ em contacto com vidro e plástico em função do tempo (h).

Da observação dos resultados obtidos (Figuras 30 e 31), verificou-se que de um modo geral o comportamento do atenolol em solução é semelhante nos dois casos, o que demonstra que o uso de recipientes de vidro ou plástico não altera a taxa de degradação do atenolol e isto é válido para as duas concentrações estudadas. Tal está de acordo com o trabalho efectuado por (Palmgren *et al.*, 2006), que estudaram a adsorção de fármacos em

diferentes tipos de recipientes nomeadamente vidro, polipropileno, poliestireno e membranas de policarbonato. Para o atenolol, foi verificado que o tipo de recipiente em que era transportado não afectava a sua concentração, estando isto relacionado com a elevada hidrofiliabilidade da molécula e também com o coeficiente de distribuição do composto, o que torna preferível a permanência do atenolol em solução, por oposição à sua adsorção ao vidro ou plástico (Palmgren *et al.*, 2006).

No entanto, o ligeiro decréscimo de concentração que se verifica no gráfico para o atenolol ao longo do tempo do ensaio para as duas concentrações, não deverá estar relacionado com o tipo de material onde se encontra armazenada a solução, mas com outro tipo de factores tais como a exposição à luz (fotodegradação) ou à temperatura a que a solução esteve sujeita (Ceresole *et al.*, 2006)

3.3.1.2. Ensaio luz vs escuridão

A fotoestabilidade dos fármacos constitui uma matéria importante e actual para investigação, pois do processo de fotodegradação pode resultar uma perda da potência do fármaco e também efeitos adversos que podem surgir devido à formação de produtos de degradação mais tóxicos (Andrisano *et al.*, 1999). Como consequência, várias farmacopeias prescrevem a protecção de vários fármacos e adjuvantes, da exposição à luz aquando da sua utilização e principalmente durante o seu armazenamento. O conhecimento das propriedades fotoquímicas e fotofísicas dos fármacos é assim essencial para assegurar a qualidade adequada do produto e também para prever a fototoxicidade do fármaco. Para este fim, foram propostas pela *International Conference on Harmonization* (ICH) directrizes específicas para os testes de fotoestabilidade dos fármacos (Andrisano *et al.*, 1999).

Algumas classes de fármacos têm sido investigadas quanto à sua fotoestabilidade e fototoxicidade (Andrisano *et al.*, 1999) contudo para alguns fármacos são apenas conhecidas informações limitadas e não foram feitos estudos específicos e confirmatórios. Desta forma, a falta de estudos detalhados sobre a fotoestabilidade dos fármacos β -bloqueadores chamou a atenção para esta classe de fármacos. A fotodecomposição do atenolol em soluções aquosas já foi anteriormente avaliada através

de um método selectivo de cromatografia líquida (LC), a qual provou ser bastante credível para um controlo de qualidade confiável de formulações comerciais (comprimidos). O estudo foi feito por Andrisano *et al.*, (1999) no qual foi avaliada a fotoestabilidade do atenolol em diferentes condições de pH (9; 7,4; e 4,0). Foram preparadas soluções de atenolol ($0,2 \text{ mgmL}^{-1}$), com diferentes valores de pH e foram expostas a radiações UV-A e UV-B durante 17 h, simulando assim radiações solares. Concluiu-se que a fotodegradação do atenolol tinha tendência a aumentar com a diminuição do pH, ou seja quanto mais ácido for o meio onde se encontra o composto mais este sofre fotodegradação.

A maioria dos estudos publicados tem sido realizada em água pura ou solventes. Contudo, sabe-se que os componentes das matrizes ambientais influenciam a fotodegradação dos micro-poluentes. Por exemplo, é sabido que a matéria orgânica dissolvida (e.g., os ácidos húmicos) actua como filtro interno em relação a alguns fármacos e como foto-sensibilizador em relação a outros (Andreozzi *et al.*, 2003). Os iões inorgânicos, como os nitritos e nitratos favorecem a produção de radicais livres capazes de oxidar os poluentes orgânicos. Deste modo, a fotólise indirecta pode ocorrer em matrizes ambientais e a aquisição de dados nessas matrizes é importante (Piram *et al.*, 2008).

A foto-transformação tem historicamente sido ignorada como processo para a remoção de químicos orgânicos do ambiente, em parte devido às dificuldades em entender as cinéticas de reacção e em relacioná-las com as condições ambientais naturais. Contudo, recentemente, a foto-transformação de ingredientes farmacêuticos activos tem atraído uma atenção crescente como um mecanismo potencialmente eficaz para a sua diminuição em águas naturais superficiais (Boreen *et al.*, 2003).

O atenolol é um composto relativamente estável a valores de pH elevados, sendo que a sua fotodegradação aumenta á medida que baixa o pH. A foto-reatividade do atenolol quando exposto a radiação do tipo UV-A e UV-B é assim bem conhecida (Andrisano *et al.*, 1999; Aryal e Skalko-Basnet, 2008) e vários produtos de degradação da molécula foram já identificados (Medana *et al.*, 2008), sendo o principal a 2-(4-hidroxifenil)acetamida (ver Figura 32) (Andrisano *et al.*, 1999).

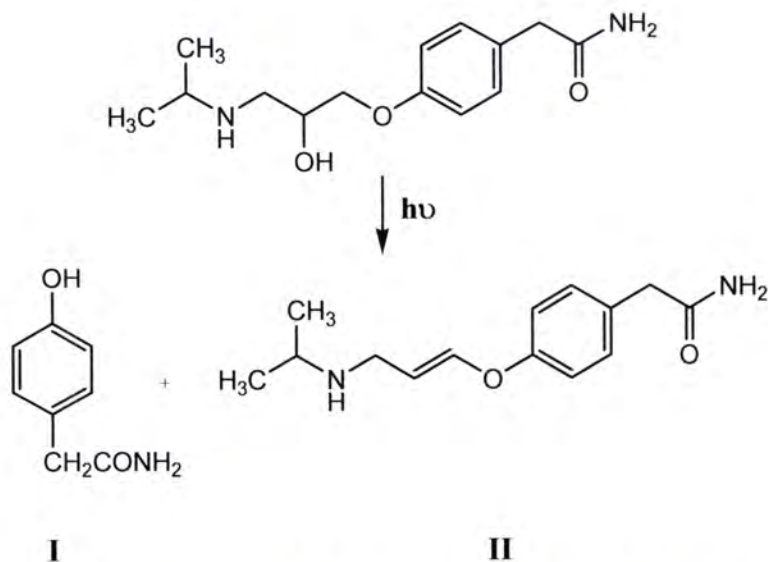


Figura 32 – Esquema da fotodegradação do atenolol a pH 7.4 (I = 2-(4-hidroxifenil)acetamida, II = produto hidrofóbico); adaptado de (Andrisano *et al.*, 1999).

Com o aumento do tempo de exposição das soluções à luz, aumenta também a taxa de produção dos produtos de degradação do atenolol e conseqüentemente verifica-se uma diminuição na concentração do mesmo. A cinética da foto-degradação é normalmente descrita como sendo de primeira ordem (Liu e Williams, 2007).

Após a realização dos ensaios para diferentes concentrações de atenolol, sob diferentes condições (luz e escuridão) obtiveram-se as seguintes evoluções da concentração de atenolol no tempo:

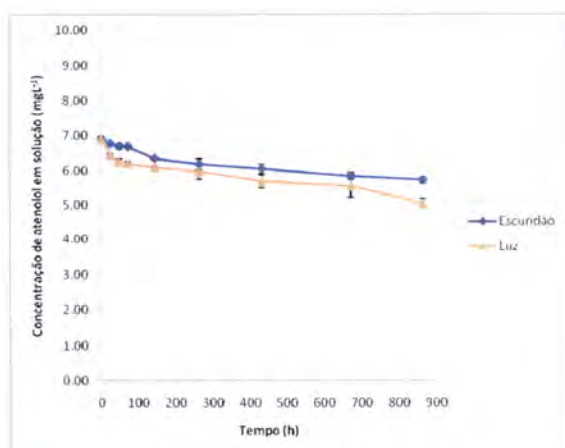


Figura 33 - Concentração de solução atenolol 10 mgL⁻¹ na luz e na escuridão em função do tempo.

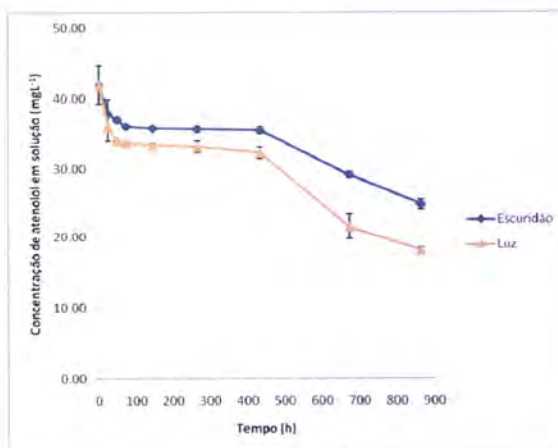


Figura 34 - Concentração de solução atenolol 50 mgL⁻¹ na luz e na escuridão em função do tempo.

Da observação dos resultados obtidos (Figuras 33 e 34) verificou-se que independentemente da concentração em solução, o atenolol se degrada mais rapidamente na presença de luz do que na escuridão, revelando assim a importância da fotodegradação.

Verificou-se também mais uma vez que o tipo de cinética de degradação do fármaco não é alterado pela concentração do analito, tendo-se verificado apenas que no caso das concentrações mais baixas existe uma tendência mais rápida para estabilização da concentração, que se começa a verificar logo a partir das 144 h. Deste modo, verifica-se também a partir dos gráficos que as soluções de concentrações mais altas, sofrem mais o efeito de foto-degradação do que as soluções de concentrações mais baixas.

Os valores obtidos para os ensaios na ausência de luz são comparáveis e estão de acordo com os obtidos para os ensaios de vidro *vs* plástico, que também foram realizados na ausência de exposição à luz.

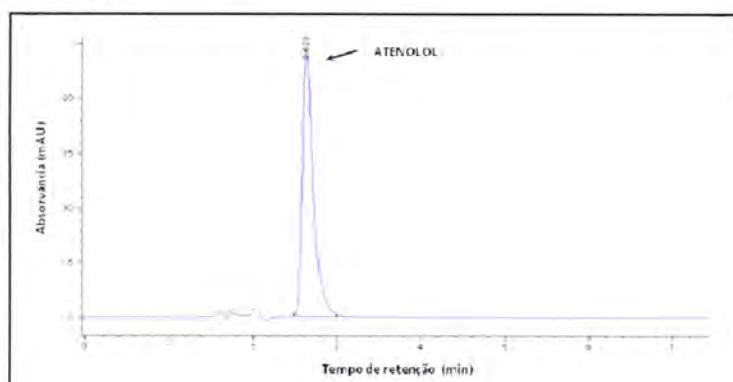


Figura 35 – Cromatograma obtido para uma solução de atenolol 10 mgL^{-1} por HPLC-DAD no dia 10/07/2008 (Início do ensaio).

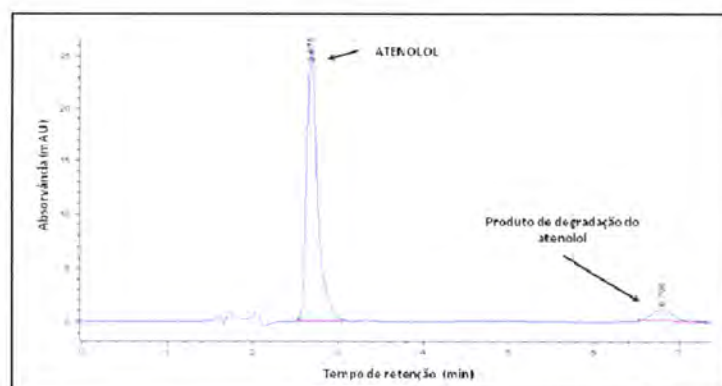


Figura 36 – Cromatograma obtido para uma solução de atenolol 10 mgL^{-1} por HPLC-DAD no dia 16/07/2008 (ao fim de 144 h).

Através dos cromatogramas obtidos para diferentes dias de duração do ensaio (Figuras 35 e 36), verificou-se que para um tempo inicial, aparece unicamente o pico do atenolol sem se visualizar qualquer outro pico, ou seja o composto ainda não tinha sofrido fotodegradação. No final do ensaio, e após a solução ter permanecido várias horas sobre a bancada sofrendo o efeito da luz, verifica-se através do cromatograma obtido a presença de um outro pico (t_r 6,796) para além do pico do atenolol. Isso significa que o composto sofreu fotodegradação, e que o 2º pico com t_r 6,796 poderá corresponder a um dos produtos de degradação do atenolol apresentados na Figura 32 o que de certa forma vem confirmar aquilo que estava inicialmente previsto. Deste modo a degradação foi indicada pela diminuição do valor esperado para a concentração de atenolol e pelo aumento do produto de degradação (Ceresole *et al.*, 2006).

No entanto para se poder confirmar a identificação deste produto de degradação serão necessários outros estudos utilizando técnicas de elucidação estrutural como por exemplo LC-MS *tandem* ou RMN.

Deste modo podemos concluir que o atenolol revelou-se foto-reactivo quando exposto a radiações, sendo deste modo adequado protegê-lo da luz, assim como as suas soluções, aquando do seu armazenamento ou manuseamento.

3.3.1.3. Ensaio frigorífico vs congelador

A instabilidade do atenolol em solução constitui um problema conhecido. Daqui resulta a dificuldade de produzir este medicamento na forma líquida (e.g. para o fabrico de xarope pediátrico). Os estudos também demonstram uma taxa de degradação dependente da temperatura (Foppa *et al.*, 2007).

Nas Figuras 37 e 38 observa-se a variação da concentração de atenolol para diferentes concentrações (10 e 50 mgL⁻¹) em função do tempo, sob diferentes condições de acondicionamento (frigorífico e congelador).

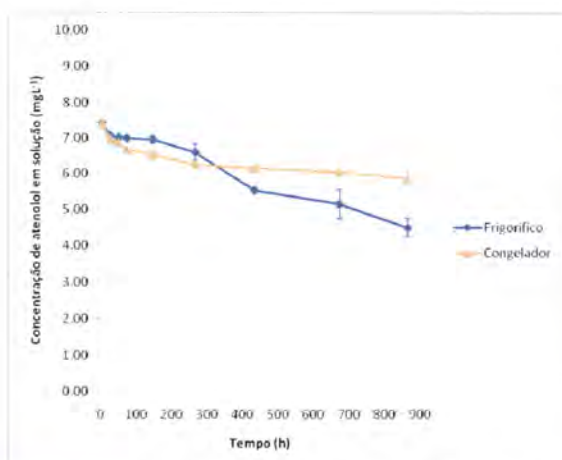


Figura 37 – Concentração de solução atenolol 10 mgL⁻¹ acondicionadas no frigorífico e no congelador em função do tempo (h).

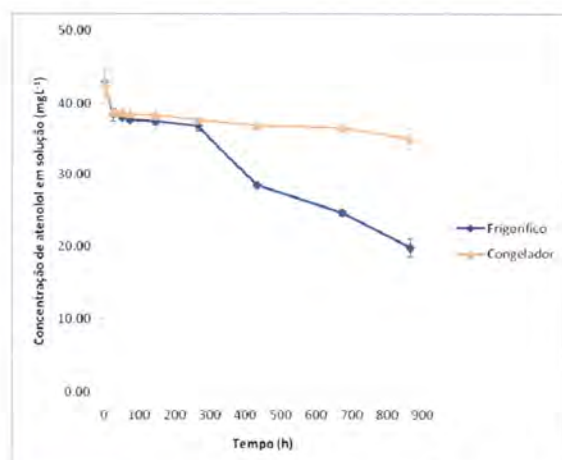


Figura 38 – Concentração de solução atenolol 50 mgL⁻¹ acondicionadas no frigorífico e no congelador em função do tempo (h).

Relativamente aos ensaios efectuados e tal como se pode visualizar através dos gráficos obtidos (Figuras 37 e 38), verificam-se grandes diferenças na taxa de degradação do atenolol consoante a temperatura a que as soluções foram armazenadas (4 °C para frigorífico e -17 °C para o congelador, aproximadamente). Para ambas as concentrações estudadas, a concentração de atenolol parece estabilizar logo a partir das 72 h para as soluções armazenadas no congelador. Até às 264 h parecem não se verificar grandes diferenças entre as duas temperaturas de armazenamento. A partir deste tempo, começa a verificar-se forte degradação nas soluções armazenadas no frigorífico, em especial na de concentração mais elevada, que no final do ensaio chega a atingir metade do valor inicial (Figura 38).

Uma conclusão importante a retirar destes estudos de estabilidade e conservação é a de que o factor temperatura parece ter bastante mais impacto na degradação do atenolol do que o factor luz. Para o armazenamento de soluções e medicamentos à base de atenolol por longos períodos, o congelador deverá ser o local escolhido (que acaba por aliar a condição “ausência de luz” à baixa temperatura). Relativamente ao tipo de recipientes em que se devem armazenar soluções contendo atenolol, a escolha poderá recair sobre materiais de vidro ou plástico, uma vez que este é um parâmetro que parece não afectar a taxa de degradação do fármaco.

3.3.2. Estudos de retenção do atenolol na matriz de suporte (LECA)

Como já foi referido, o presente trabalho tem como principal objectivo uma eventual utilização futura dos leitos construídos de macrófitas usando a LECA como matriz de suporte para a remoção de fármacos em ETARs.

No caso de existirem ETARs com alguns problemas ou limitações relativamente a colmatações e fluxos deficientes e na impossibilidade de serem introduzidas alterações estruturais nos LM-ESSH (leitos de macrófitas escoamento sub-superficial) já em funcionamento, uma das soluções apontadas pelas entidades gestoras, além da melhoria do tratamento primário, tem sido a substituição do meio de enchimento tradicional (Takagi *et al.*, 2006) por outro mais homogéneo, com maior superfície específica, que permita uma maior eficiência de tratamento para o volume de leito instalado. A utilização de argila expandida tem sido apontada como uma solução alternativa, tendo apresentado bons resultados (Vandevivere *et al.*, 1999; Daims *et al.*, 2001; Vaccaa *et al.*, 2005; Cortés *et al.*, 2006) em outros países com clima mediterrânico (e.g. Espanha, Itália, França e Egipto), acreditando-se que pode permitir aumentar a eficiência de tratamento nos sistemas que apresentam cargas orgânicas superiores às previstas em projecto ou, nos sistemas sem grande alteração das condições de afluência, pode reduzir o volume instalado para tratamento.

Por esta razão afigurou-se lógico tentar aproximar este estudo à realidade, uma vez que se procura um material capaz de remover o fármaco mas simultaneamente conseguir manter ao longo do tempo as boas condições de escoamento do efluente. Nessa situação não se deveriam utilizar nos filtros materiais excessivamente finos, com diâmetros muito reduzidos, não só porque estas partículas poderiam passar para a água tratada mas também porque iriam diminuir a condutividade hidráulica dos filtros.

A matriz de suporte está assim directamente relacionada com a dos principais processos responsáveis pela remoção dos poluentes: filtração, sorção, troca iónica, desenvolvimento microbiano e suporte das plantas. Desta forma torna-se fundamental o conhecimento das características dos materiais de suporte a serem utilizados nos leitos plantados, pois só assim se consegue obter uma optimização da sua performance (Caputo, 1996).

Neste estudo foi usada como matriz sólida de suporte a Argila Expandida (*Light Expanded Clay Aggregates* - LECA), com um grau granulométrico de 2/4 fornecida pela empresa Maxit Group Portugal. A LECA é obtida da expansão de grânulos de argila natural em fornos rotativos 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 (Johansson, 1997; Zhu *et al.*, 1997; Brix *et al.*, 2001). 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 Leitos Construídos de Macrófitas (Johansson, 1997; Zhu *et al.*, 1997; Brix *et al.*, 2001).

Tendo como referência os resultados previamente obtidos em estudos anteriores, após uma análise detalhada e comparação da eficiência de remoção dos diferentes materiais frequentemente utilizados, concluiu-se que a LECA 2/4 era a que apresentava melhores eficiências de remoção relativamente aos fármacos presentes em soluções aquosas (Dordio *et al.*, 2007; Dordio *et al.*, 2009b).

Os critérios de selecção da matriz de suporte utilizada foram então a sua eventual capacidade de retenção de compostos orgânicos, particularmente fármacos, através de fenómenos de sorção, troca iónica ou qualquer outro processo físico-químico, aliados a um baixo custo de aquisição. Essa capacidade de retenção irá depender de propriedades físicas e químicas do material escolhido (Dordio *et al.*, 2007; Dordio *et al.*, 2009b).

Pretende-se deste modo reforçar o papel deste tipo de material processado no tratamento de águas residuais aumentando a eficiência e reduzindo simultaneamente os custos de tratamento, condições estas que são muito importantes para a sua eventual utilização em ETARs.

3.3.2.1. Caracterização física e química da matriz sólida e da água residual

A LECA é uma mistura de vários minerais, apresentando deste modo uma composição mineralógica bastante complexa, sendo no entanto um material altamente poroso com poros de diversos tamanhos (Figura 39).

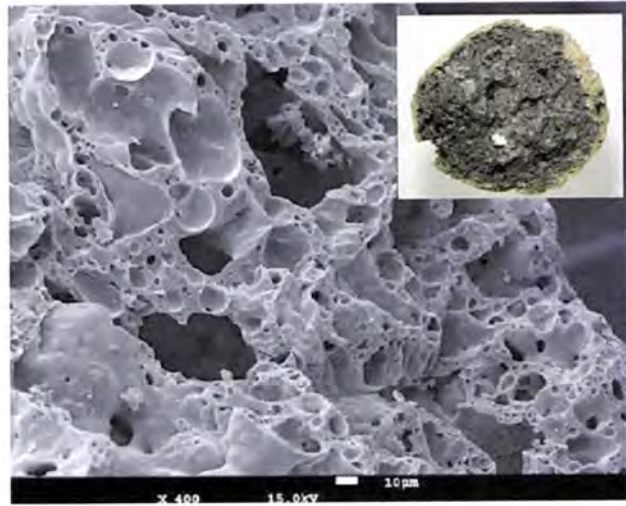


Figura 39 – Imagem da LECA obtida através de microscópio electrónico de varrimento (Dordio *et al.*, 2009b).

A LECA (2/4) usada nos ensaios era bastante uniforme em termos do tamanho das partículas com um valor de coeficiente de uniformidade ($U=1,38$) muito próximo da unidade e desta forma com a maioria das suas partículas (95 %) possuindo diâmetros compreendidos entre os 2,83-5,00 mm, valores estes que estão de acordo com as recomendações descritas no guia da EPA (Arias *et al.*, 2001) para o material de suporte a se utilizar nos leitos. A LECA apresentou uma alcalinidade pronunciada (pH em água de $9,01\pm 0,02$ e PCZ de $9,67\pm 0,03$), sendo que PCZ (ponto de carga zero) é o valor de pH no qual a carga média da partícula é zero. Estas características podem ser atribuídas à presença de componentes alcalinos tais como óxidos e carbonatos, tal como foi verificado numa caracterização mineralógica por difracção de raios-X (Dordio *et al.*, 2009b). A porosidade aparente (ou espaço vazio) da LECA é bastante elevada ($48\% \pm 1$), o que permite maiores áreas de contacto com as soluções e pode contribuir para a boa condutividade hidráulica medida ($7,7 \times 10^{-3} \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Dordio *et al.*, 2009b).

A água residual utilizada nos ensaios foi recolhida após a etapa de tratamento secundário numa ETAR de uma pequena comunidade rural. Foram avaliados alguns dos parâmetros mais comuns usados na caracterização da qualidade de águas residuais, sendo estes apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 – Propriedades físico-químicas (\pm SD, $n = 5$) do efluente utilizado nos ensaios.

Pâmetros	Efluente tratado
pH	8,06 \pm 0,05
SST (mgL ⁻¹)	47,00 \pm 3,00
CQO _t (mgL ⁻¹)	127,00 \pm 2,00
CQO _s (mgL ⁻¹)	76,00 \pm 2,00

A carga orgânica e os sólidos suspensos destas águas residuais foram de certa forma elevados aquando da recolha, mas ainda assim dentro dos limites legais de descarga nas correntes de água.

3.3.2.2. *Eficiência de remoção do fármaco atenolol pelo meio de suporte (LECA 2/4)*

A LECA 2/4 apresentou elevadas eficiências de remoção para alguns fármacos presentes em solução (Dordio *et al.*, 2007; Dordio *et al.*, 2009b).

Nos estudos de adsorção efectuados analisaram-se as influências de certas condições experimentais, e verificaram-se os efeitos de diferentes soluções iniciais de atenolol, preparadas em água e efluente, quando postas em contacto com o material de suporte durante um determinado tempo. Verificou-se assim a influência do tempo de contacto para as diferentes concentrações das soluções e conseqüentemente a eficiência de remoção do material de suporte (LECA) relativamente ao fármaco em estudo. Todos os valores obtidos nos ensaios podem ser consultados no Anexo 6.

3.3.2.2.1. *Eficiência de remoção do meio de suporte (LECA 2/4) quando em contacto com soluções de água dopadas com atenolol*

Apesar de o fármaco se encontrar presente no ambiente em concentrações muito baixas, o estudo da eficiência da remoção do meio filtrante foi feito com algumas concentrações que podem ser consideradas bastante elevadas a nível ambiental (35 e 50 mgL⁻¹), no entanto o objectivo deste estudo foi testar a capacidade da LECA para reter o fármaco o que justifica a utilização de concentrações mais elevadas.

O efeito do tempo de contacto e das concentrações iniciais na remoção do atenolol da água pela LECA pode ser visualizado na Figura 40.

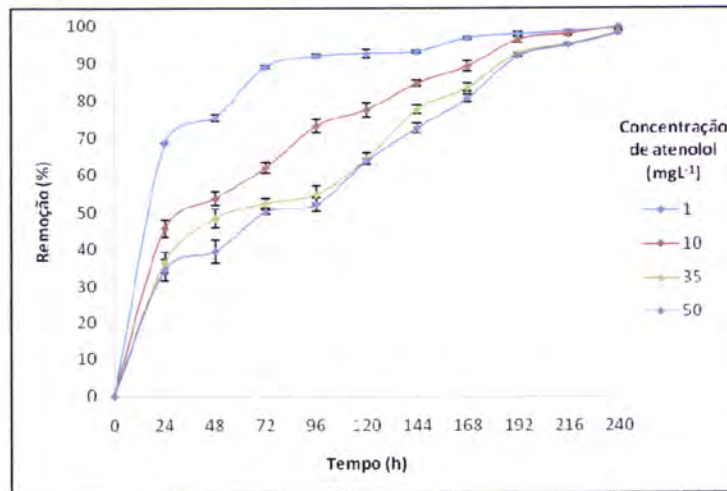


Figura 40 – Efeito do tempo de contacto e concentrações iniciais na eficiência de remoção de atenolol na água. Os pontos representam a média de 3 réplicas e as barras de erro representam os valores \pm SD

Analisando o gráfico, verifica-se que para todas as soluções de água dopadas com atenolol de diferentes concentrações (1, 10, 35, 50 mgL⁻¹) a eficiência das remoções é bastante elevada (próximas de 100 %) para todas elas. Salienta-se o facto de que a adsorção é um processo que não é completo, e a partir de um determinado tempo se atinge uma situação de equilíbrio, sendo que a partir desse instante a quantidade de atenolol adsorvido deixa de ser relevante. A solução de concentração mais baixa (1 mgL⁻¹) atinge o equilíbrio mais cedo que as restantes, cerca das 96 h. No entanto, para as restantes soluções de concentração mais alta, a adsorção do atenolol só atinge o equilíbrio perto das 196 h. Verifica-se também que a fase de remoção mais acentuada acontece nas primeiras 120 h para todas as concentrações. Pode-se também verificar a partir dos gráficos que para concentrações mais baixas evidencia-se um comportamento característico, com uma etapa inicial de remoção muito rápida (24 h), seguida de uma etapa de remoção mais lenta a partir de determinado tempo (120 h). Isto pode ser explicado com base na estrutura da LECA, uma vez que a fase de remoção mais rápida corresponderá à fase em que se dá a adsorção do composto na superfície externa do material e a segunda fase de remoção, que será mais lenta, deve-se aos fenómenos difusionais, através dos quais os compostos são adsorvidos no interior da estrutura dos grânulos da LECA (Teimão, 2005). Este comportamento pode ser visualizado com maior

ênfase a partir do gráfico obtido com especial destaque para a concentração de 1 mgL^{-1} , para a qual se verificou uma adsorção muito rápida durante as primeiras 24 h, seguida por uma adsorção mais lenta durante um longo período de tempo. Este comportamento não é tão evidente nos ensaios com concentrações mais elevadas, uma vez que nestas o gradiente de concentração é mais elevado e por conseguinte os fenómenos difusionais são mais rápidos (Teimão, 2005).

Poder-se-á indicar o período de contacto entre as 120 e as 144 h, como o tempo em que se atinge sensivelmente o equilíbrio para a adsorção do composto para as diferentes concentrações.

A partir desse tempo de contacto, embora ainda ocorra o fenómeno de adsorção e consequente remoção do fármaco, tal como se pode constatar através da Figura 40, o aumento de remoção deixa de ser significativo. No entanto para garantir de facto esse resultado, os ensaios foram prolongados até às 240 h (Teimão, 2005). Na Figura 41, apresenta-se o gráfico que relaciona a quantidade em miligrama de composto (atenolol) que foi removido por cada grama de LECA com o tempo no qual decorreram os ensaios (240 h).

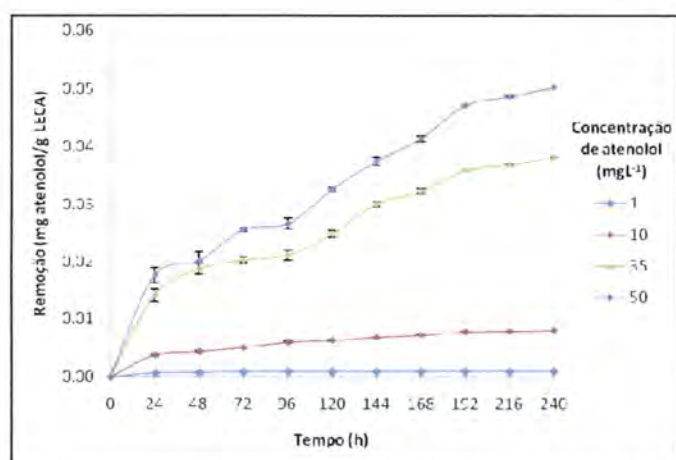


Figura 41 – Quantidades removidas de atenolol da água pela LECA 2/4, para concentrações iniciais de 1, 10, 35 e 50 mgL^{-1} em função do tempo de duração do ensaio. Os pontos representam a média de 3 réplicas e as barras de erro representam os valores \pm SD

Tal como se previa, verifica-se que para as soluções de concentrações de atenolol mais baixas, com particular destaque para a solução de 1 mgL^{-1} , se assiste a uma adsorção

inicial muito rápida e a partir das 48 h a quantidade do composto removido por cada grama de material estabiliza. É visível através das representações gráficas que quando a concentração inicial do composto é maior o equilíbrio é atingido mais tarde.

No entanto, para todas as concentrações estudadas, a capacidade adsorviva da LECA não se esgotou e obviamente remove maior quantidade de atenolol quando este se encontra na solução em concentrações mais elevadas, uma vez que as quantidades adsorvidas seguem uma linha de tendência crescente no gráfico.

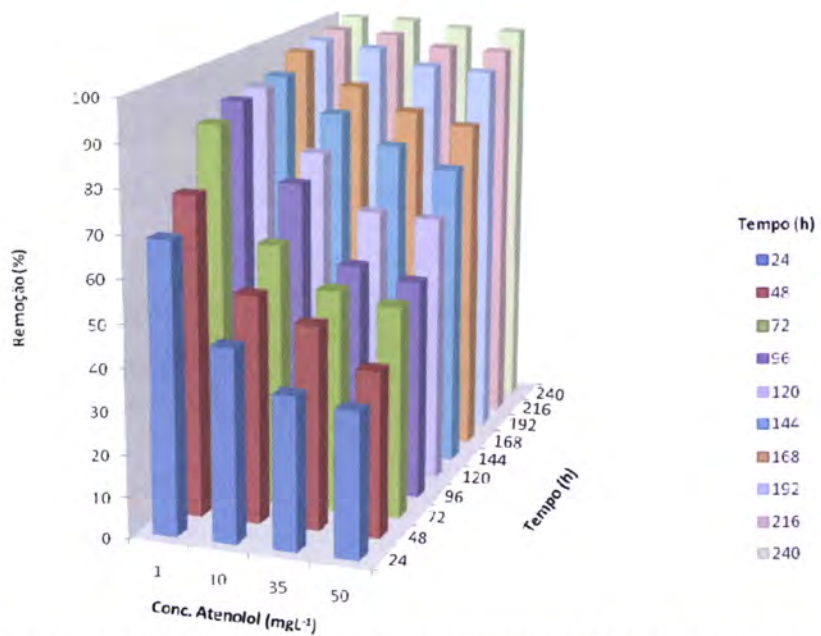


Figura 42 – Percentagens de Remoção de atenolol para diferentes concentrações (1, 10, 35, 50 mgL⁻¹) em função do tempo (h).

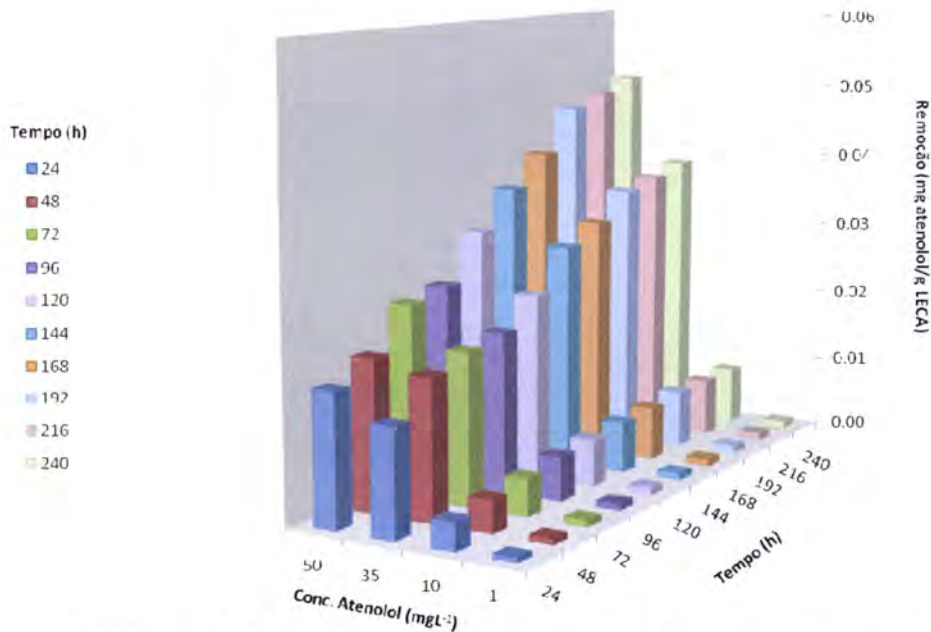


Figura 43 – Remoção de atenolol (mg atenolol/g de LECA) para diferentes concentrações (1, 10, 35, 50 mgL⁻¹) em função do tempo (h).

Nas Figuras 42 e 43 apresentam-se os gráficos que nos permitem verificar de outra perspectiva tudo o que foi aqui anteriormente descrito. Na Figura 42 apresenta-se o gráfico que relaciona as percentagens das remoções obtidas no final dos ensaios (240 h) com as diferentes concentrações do composto em estudo. Os resultados obtidos vieram confirmar a grande capacidade da LECA para a remoção do composto. Verifica-se que a solução de 1 mgL⁻¹ apresenta percentagens de remoção em função do tempo bastante superiores relativamente às outras concentrações em estudo. Isto não significa contudo uma maior capacidade de retenção do composto dado que as percentagens de remoção são quantidades relativas. Assim, para concentrações iniciais mais elevadas, menores percentagens de remoção correspondem mesmo assim a maiores quantidades removidas em absoluto (Dordio *et al.*, 2009a).

Após a realização deste estudo e através de comparações com resultados de estudos previamente realizados por Dordio *et al.* (2009a), nos quais se utilizavam as mesmas condições de realização e operação, concluiu-se que a LECA apresenta maior capacidade de adsorção do atenolol quando este se encontra em soluções de água do que o ácido clofibrico, o MCPA (4-cloro-2-metilfenoxiacético) uma vez que evidencia maiores percentagens de remoção deste composto presente em várias concentrações



relativamente aos outros dois compostos, em igual período de tempo. No entanto, para concentrações e tempos de contacto iguais, a LECA apresenta capacidades de remoção semelhantes para o atenolol, o ibuprofeno e para a carbamazepina, sendo que a carbamazepina é, ainda assim, o composto que é melhor adsorvido pela LECA (Dordio *et al.*, 2009b).

3.3.2.2.2. *Eficiência de remoção do meio de suporte (LECA 2/4) em contacto com efluente dopado com atenolol*

O efeito do tempo de contacto e das concentrações iniciais na remoção do atenolol do efluente pela LECA pode ser visualizado na Figura 44.

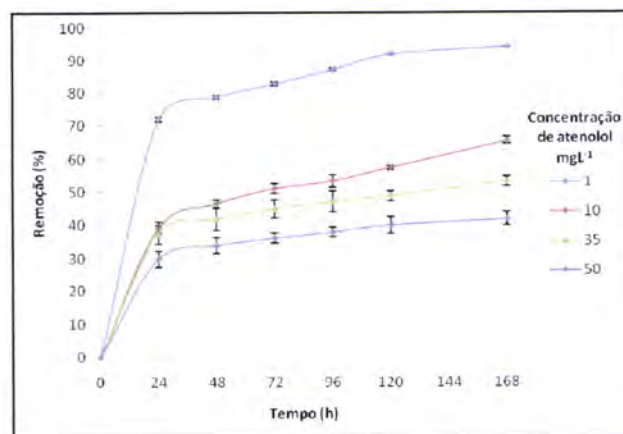


Figura 44 – Efeito do tempo de contacto e concentrações iniciais nas eficiências de remoção de atenolol no efluente pela LECA. Os pontos representam a média de 3 réplicas e as barras de erro representam os valores \pm SD.

Através da análise dos gráficos verifica-se que existem algumas diferenças importantes e relevantes na adsorção do composto por parte da LECA, relativamente ao caso descrito anteriormente, no qual se utilizaram soluções de água dopadas com atenolol.

Neste caso, constatou-se que, qualitativamente, o comportamento cinético da remoção do fármaco pela LECA em efluente não parece ser muito afectado pelas concentrações iniciais. Para todas as concentrações testadas a cinética é caracterizada por um passo inicial rápido que será maioritariamente devido à adsorção sobre a superfície da

LECA, através da qual a maioria do composto é removida nas primeiras 24 h. Subsequentemente, um processo mais lento é responsável pela remoção adicional de composto que estabiliza a concentrações de equilíbrio que rondam as 72-96 h de tempo de contacto (Dordio *et al.*, 2009a).

Este comportamento evidenciado também poderá ser explicado com base na estrutura da LECA, uma vez que a fase de remoção mais rápida corresponderá à fase em que se dá a adsorção do composto na superfície externa do material e a segunda fase de remoção, que será mais lenta, deve-se aos fenómenos difusionais, através dos quais os compostos são adsorvidos no interior da estrutura dos grânulos da LECA. No entanto, neste caso e contrariamente ao obtido para as soluções de água, nas quais a percentagem de remoção ia sempre crescendo, a partir das 144 h, assiste-se a uma estabilização acentuada, e uma ligeira diminuição na capacidade de remoção. Observa-se assim uma pequena redução na eficiência da LECA na remoção do fármaco no efluente em especial para as concentrações mais altas (Dordio *et al.*, 2007; Dordio *et al.*, 2009a).

Uma vez que o efluente apresenta uma composição diversificada e característica, essa diminuição da remoção poderá ser explicada provavelmente devido à redução das quantidades adsorvidas de atenolol devido ao aumento da solubilidade promovido pela matéria orgânica dissolvida do efluente (Dordio *et al.*, 2009b).

Além disso, o efluente contém na sua composição outros compostos orgânicos, nomeadamente outros fármacos que mesmo provavelmente em concentrações muito mais baixas, poderão fazer baixar a remoção do atenolol, uma vez que irão competir com o composto relativamente à adsorção na LECA, ficando assim maior quantidade de composto por remover na solução (Dordio *et al.*, 2009b).

Este comportamento pode ser visualizado com maior ênfase a partir do gráfico obtido, no qual se verificou uma remoção inicial do composto muito rápida num período de tempo relativamente pequeno e posteriormente a sua remoção estabilizou sensivelmente a partir das 24 h. Ainda assim obtiveram-se percentagens de remoção bastante elevadas o que prova que a LECA quando em contacto com efluente continua a remover a maior parte do composto presente na solução, para todas as concentrações. No efluente há ainda a considerar a possibilidade da biodegradação ter alguma contribuição para a remoção do atenolol.

Poder-se-á indicar o período de contacto entre as 24 e as 48 h, como o tempo em que se atinge o equilíbrio para a remoção do composto para as diferentes concentrações. A partir desse tempo de contacto, as remoções embora ainda ocorram tal como se pode constatar através da Figura 44, deixam de ser significativas. No entanto, para garantir efectivamente esse facto, os ensaios foram prolongados até às 168 h.

Na Figura 45, apresenta-se o gráfico que relaciona a quantidade em miligrama de composto (atenolol) que foi removido por cada grama de LECA com o tempo no qual decorreram os ensaios (168 h).

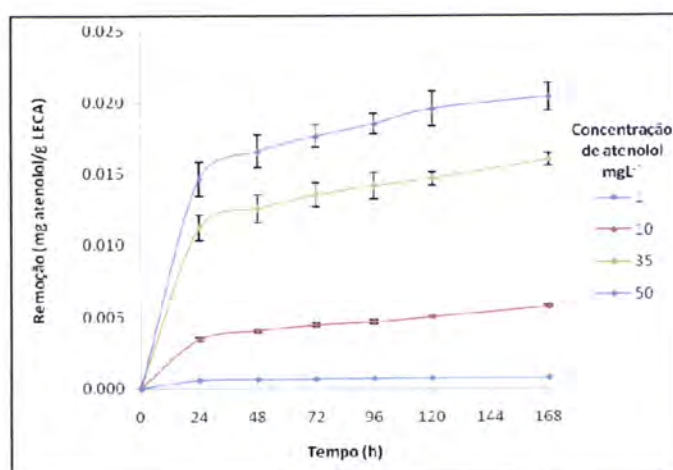


Figura 45 - Quantidades removidas de atenolol do efluente pela LECA 2/4, para concentrações iniciais de 1, 10, 35 e 50 mgL⁻¹. Os pontos representam a média de 3 réplicas e as barras de erro representam os valores \pm SD

Neste caso, tal como também se previa, verifica-se que para as soluções de concentrações mais baixas se assistiu a uma remoção inicial muito rápida, e a partir das 24 h, a quantidade do composto removido por cada grama de material estabiliza. No entanto, neste caso e contrariamente ao estudo em água, também se verifica esse comportamento para as concentrações de atenolol mais altas.

Através de comparações com resultados de estudos previamente realizados por Dordio *et al.* (2009a), nos quais se utilizavam as mesmas condições de realização e operação, concluiu-se que a LECA apresenta maior capacidade de adsorção do atenolol quando este se encontra em efluente do que o ácido clofibrico, o MCPA (4-cloro-2-metilfenoxiacético) e apresenta capacidades de adsorção semelhantes para o atenolol, o

ibuprofeno e para a carbamazepina, sendo que a carbamazepina é, tal como se previa, o composto que consegue ser melhor removido pela LECA. (Dordio *et al.*, 2009b). Tal como seria de esperar, a eficiência de remoção da LECA em efluente é ligeiramente inferior à apresentada em água, relativamente ao atenolol e a todos os outros compostos previamente estudados.

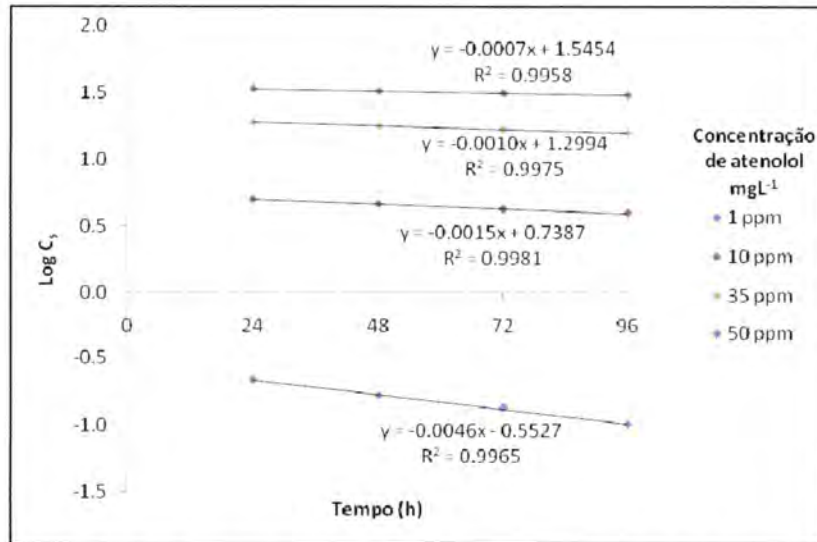


Figura 46 – Verificação de um perfil de cinética de 1ª ordem (entre as 6 e as 96 h) para os ensaios da LECA com efluente.

Através do gráfico da Figura 46 verificou-se que para todas as concentrações de atenolol estudadas, a remoção de atenolol seguiu uma cinética de 1ª ordem. Isto foi comprovado através dos valores elevados de R² obtidos com os ajustes lineares aos dados experimentais apresentados na figura.

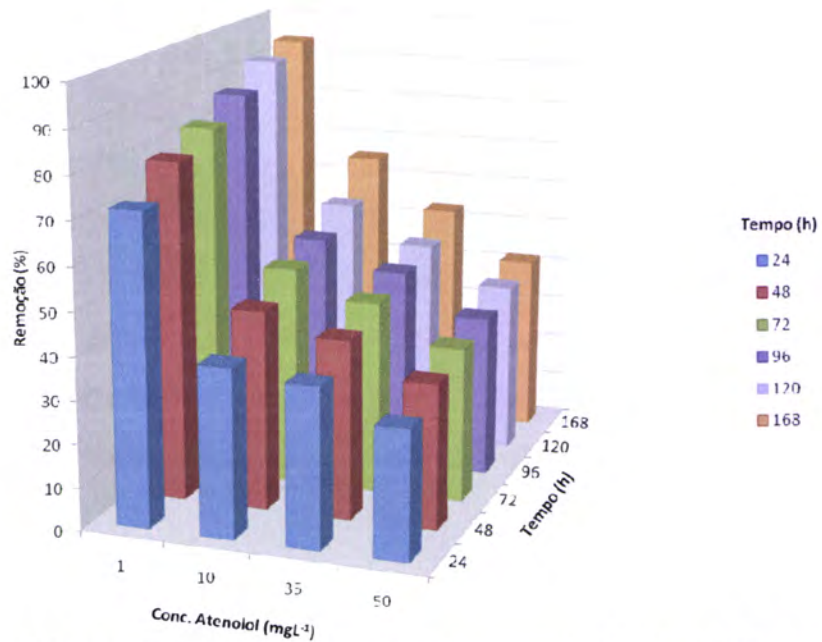


Figura 47 – Percentagens de Remoção de atenolol para diferentes concentrações (1, 10, 35, 50 mgL⁻¹) em função do tempo (h).

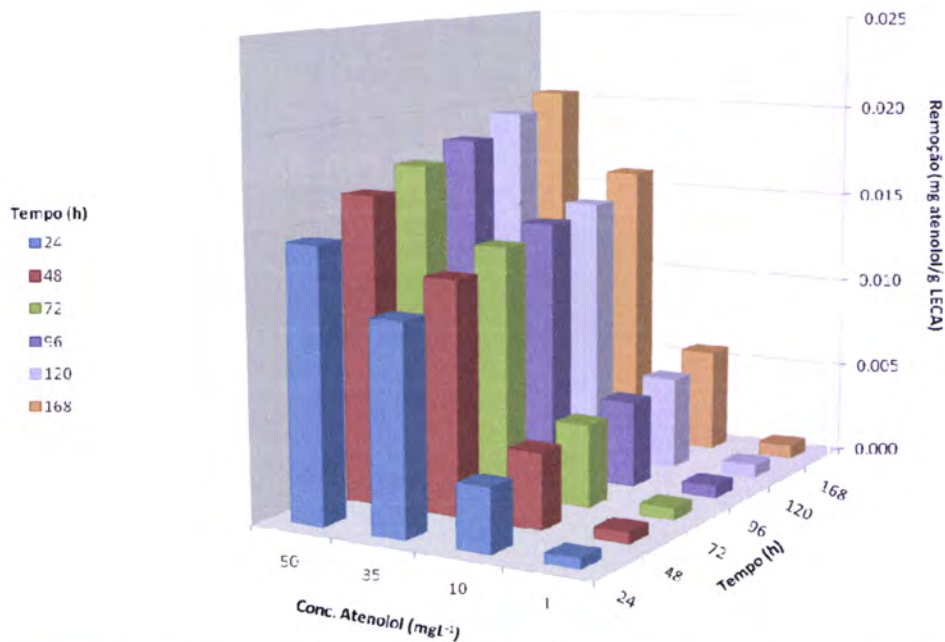


Figura 48 – Remoção de atenolol (mg atenolol/g de LECA) para diferentes concentrações (1, 10, 35, 50 mgL⁻¹) em função do tempo (h).

Na Figura 47, apresenta-se o gráfico que relaciona as percentagens das remoções obtidas até ao final dos ensaios (168 h) com as soluções de diferentes concentrações do composto em estudo. Verifica-se que a solução de 1 mgL⁻¹ apresenta percentagens de

remoção em função do tempo superiores relativamente às outras concentrações em estudo. Na Figura 48, contudo, comprova-se como as menores percentagens de remoção obtidas para concentrações iniciais de atenolol mais elevadas correspondem ainda assim a quantidades removidas muito elevadas, demonstrando deste modo a elevada capacidade de remoção da LECA.

Em função destes estudos concluiu-se que se está a fazer uma escolha acertada quando se utiliza a LECA como meio filtrante ou matriz de suporte em leitos construídos de macrófitas, uma vez que este material apresenta uma elevada capacidade de adsorção de compostos de origem farmacêutica, assim como uma capacidade tampão e uma boa permeabilidade hidráulica.

Deste modo fez todo o sentido utilizar este material na montagem e optimização dos ensaios finais, ou seja, dos microcosmos de leitos construídos de *Phragmites* experimentais, utilizados neste estudo.

3.3.3. Cinéticas de remoção do atenolol nos leitos

O efeito do tempo de contacto da presença de vegetação (*Phragmites*) na remoção de atenolol a partir de água residual dopada é apresentado na Figura 49 e comparado com os leitos de LECA não plantados. Na mesma figura, são também apresentadas as cinéticas de biodegradação do atenolol na água residual.

Em todos os ensaios as cinéticas foram caracterizadas através de um passo inicial rápido (as primeiras 6 h) devido maioritariamente à adsorção sobre a superfície da LECA (embora nos leitos plantados possa também ocorrer alguma adsorção nas raízes das plantas) através da qual mais de metade da quantidade inicial do atenolol é removido durante este curto período. Subsequentemente, um processo mais lento vai ser responsável pela remoção do resto do composto que falta ser removido. Nesta etapa, a remoção nos leitos de LECA não plantados é mais lenta que nos leitos plantados. No período entre as 48 e 96 h a remoção de atenolol estabiliza nos leitos plantados e após as 96 h, quase não é removido mais atenolol nesses leitos, no entanto continua a ser removido nos leitos não plantados até ao final do ensaio. Porém as quantidades de

atenolol removido nos leitos plantados às 96 h são mais elevadas do que as quantidades removidas nos leitos de LECA não plantados às 192 h (Figura 49).

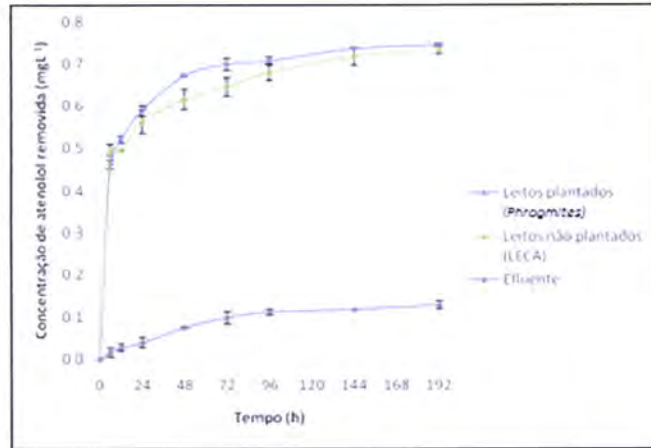


Figura 49 – Cinética de remoção do atenolol pelos leitos plantados com *Phragmites* e leitos não plantados (apenas LECA). Representação da cinética da biodegradação do atenolol somente no efluente. Os pontos representam a média de 3 réplicas e as barras de erro representam os valores \pm SD

O comportamento cinético observado no processo de sorção que ocorreu nos leitos de LECA não plantados possui similaridades com as observadas com outros compostos sorvidos no mesmo material, nomeadamente outros fármacos tais como o ácido clofibríco, ibuprofeno e a carbamazepina (Matamoros *et al.*, 2008a; Matamoros *et al.*, 2008b; Dordio *et al.*, 2009b;). Após o primeiro passo de 6 h, o processo seguiu uma cinética de primeira ordem, num período compreendido entre as 6 e as 96 h (ver Figura 50).

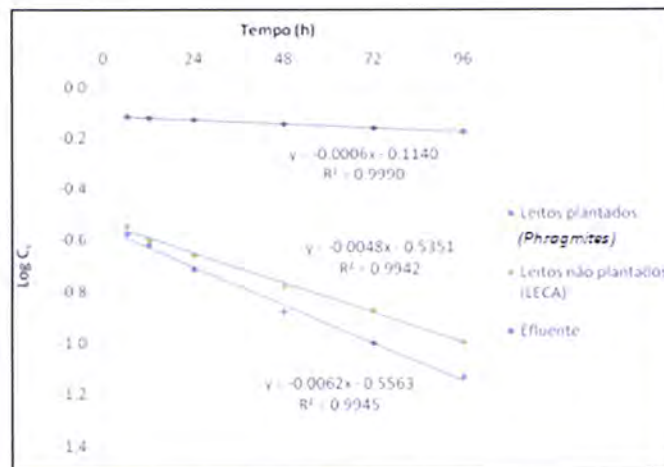


Figura 50 – Cinética da remoção do atenolol (log C vs Tempo (h)), até às 96 h.

No caso do atenolol, o processo segue um perfil semelhante pela evolução temporal das concentrações relativas removidas ($[\text{PhAC}]_t/[\text{PhAC}]_0$), para todas as concentrações iniciais do composto. Através da análise dos resultados da Figura 50, verificou-se que se obtiveram valores de R^2 bastante elevados para todos os sistemas com especial destaque para os leitos plantados com *Phragmites* o que de certa forma vem confirmar a existência de uma cinética de 1ª ordem.

Considerando o perfil da cinética da remoção do atenolol, pode obter-se apenas uma pequena vantagem em termos de percentagem de remoção, alargando o tempo de retenção das águas residuais dopadas com atenolol nos sistemas plantados para além das 96 h.

3.3.4. Eficiência de remoção do atenolol pelos sistemas microcosmos SSFCW

Os sistemas SSFCWs (*subsurface flow constructed wetlands*), tal como já foi anteriormente evidenciado constituem um processo de tratamento de águas residuais de reduzido custo e são utilizados de modo a providenciar um tratamento secundário ou terciário das águas residuais. Estes sistemas já foram utilizados com sucesso para remover alguns compostos orgânicos recalcitrantes de águas contaminadas, tais como pesticidas (Haberl *et al.*, 2003; Dordio *et al.*, 2007). No entanto, foram realizados poucos estudos recentemente focando a remoção de fármacos de águas residuais através de leitos construídos de macrófitas de fluxo sub superficial (Matamoros *et al.*, 2005; Matamoros *et al.*, 2008a; Matamoros *et al.*, 2008b).

Deste modo, pretendeu-se estudar a remoção do atenolol através destes sistemas e obter uma boa eficiência de remoção do fármaco. Mesmo tendo a consciência que a montagem e optimização do processo de remoção, ocorreu a uma pequena escala, o principal objectivo deste estudo está relacionado com uma futura utilização deste mesmo sistema mas a uma escala real e bem mais complexa. Deve-se salientar o facto de na remoção do fármaco através destes sistemas, quanto maior for o tempo de retenção, maior será o volume de efluente, ou seja maior será a área do sistema. Deverá assim existir um compromisso entre o custo de montagem e optimização das eficiências de remoção, e tempo de retenção do sistema.

Após a análise dos resultados obtidos no ensaio (anexo 7) concluiu-se que no período até às 96h foi removido cerca de 93 % de atenolol pelos sistemas plantados com *Phragmites*, não se tendo verificado para além deste período um aumento significativo de percentagem de remoção (95,45 % ao fim de 192 h, ver Figura 51). Assim, para a possível montagem de um sistema de leitos como o proposto para a remoção de atenolol, deverá ser escolhido um tempo de retenção de 96 h como ponto de partida para a optimização deste parâmetro de operação.

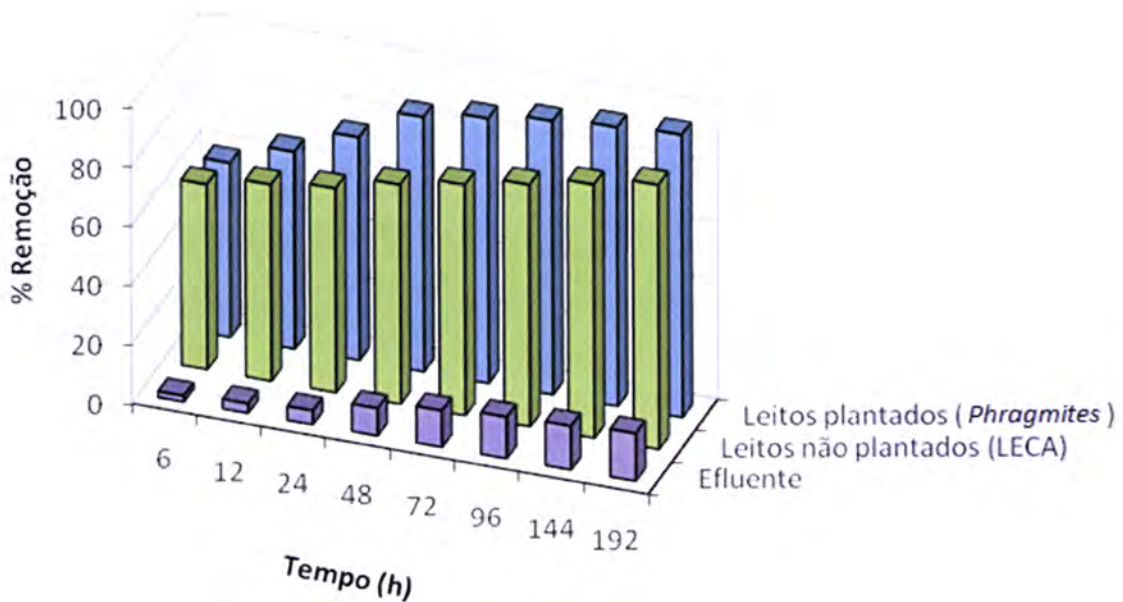


Figura 51 – Gráfico que relaciona a taxa de remoção do atenolol com a evolução temporal (h) do ensaio para o leito plantado com *Phragmites*, leito não plantado (LECA) e efluente.

Na Figura 51 verificou-se também uma ligeira diminuição da concentração de atenolol apenas no efluente não submetido a qualquer tratamento, o que pode ser indicativo da não muito elevada biodegradabilidade do atenolol pelos microrganismos presentes nessa água.

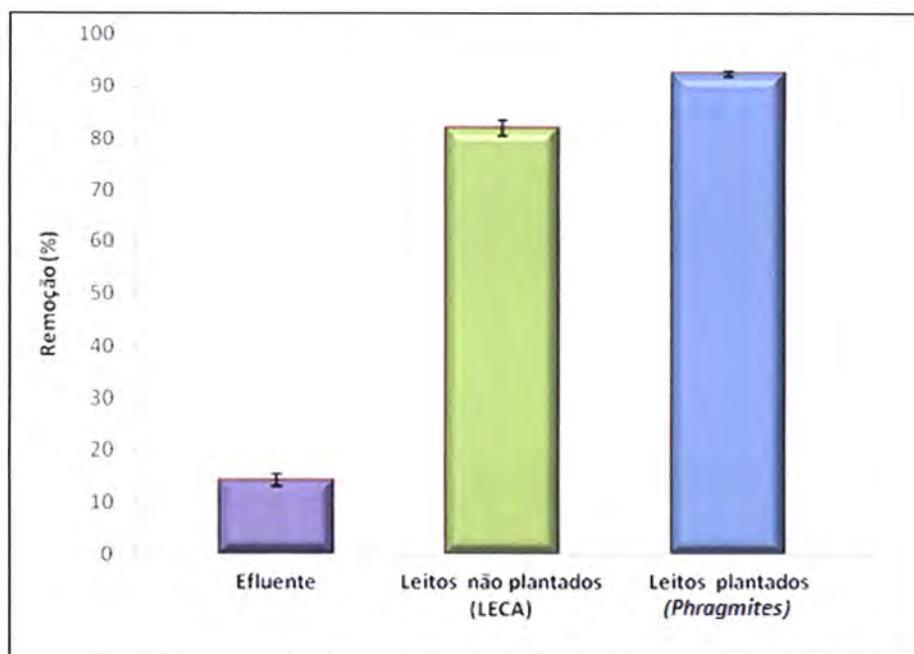


Figura 52 – Eficiências de remoção de atenolol nos leitos plantados com *Phragmites*, nos leitos de LECA e no efluente após 96 h de tempo de retenção.

Tal como pode ser observado a partir da Figura 52 e Tabela 16, a biodegradabilidade do atenolol é ligeiramente mais baixa do que a já anteriormente apresentada noutros estudos (Fent *et al.*, 2006; Nikolaou *et al.*, 2007; Maurer *et al.*, 2007).

Tabela 16 – Eficiências de remoção \pm SD ($n=3$) do atenolol nos ensaios com leitos plantados com *Phragmites*, em leitos não plantados de LECA e em efluente, após 96 h de tempo de retenção.

Sistema	Atenolol Removido (%)
Efluente	14,30 \pm 1,20
Leitos não plantados (LECA)	82,00 \pm 1,50
Leitos plantados (<i>Phragmites</i>)	92,50 \pm 0,60

Para o mesmo período de 96h, nos leitos não plantados de LECA, conseguiram alcançar-se elevadas eficiências de remoção (82 %), as quais são indicativas da forte capacidade de sorção deste material para o atenolol. As boas características de sorção da LECA foram já evidenciadas em outros fármacos tais como compostos ácidos como o ácido clofibrico e o ibuprofeno, assim como para a carbamazepina que é neutra e para a

qual a sorção na LECA é também elevada (Dordio *et al.*, 2009b). As interações electrostáticas no caso dos fármacos de origem ácida e as interações de Van der Waals no caso de compostos neutros são hipoteticamente responsáveis pelas afinidades destes compostos com a superfície da LECA. Porém considerando que tanto a LECA como o atenolol possuem natureza alcalina e ambos são positivamente carregados nas condições do pH de trabalho ($\text{pH} \cong 8$) a influência das interações electrostáticas não explica a forte sorção do atenolol na LECA. Provavelmente, para este composto o fenómeno de troca iónica pode ser responsável de alguma forma pela eficiência de remoção do atenolol pela LECA. Este mecanismo é conhecido como sendo responsável pela remoção de outros compostos orgânicos carregados, tais como os pesticidas, através de materiais argilosos (Gomez *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006).

A eficiência de remoção obtida pelos leitos plantados de LECA é tal como seria de esperar superior à observada para os leitos não plantados (Figura 52). Apesar da maioria do atenolol ficar retido na matriz sólida, a presença de plantas, tais como as *Phragmites* contribuem com uma eficiência adicional de 12-14 % em comparação com os leitos de apenas LECA. A contribuição das plantas é deste modo coerente com as contribuições apresentadas por outros autores (Vymazal *et al.*, 1998; Dordio *et al.*, 2007; Dordio *et al.*, 2009b)

Para além de outras vantagens de operação dos sistemas SSFCW atribuídos à presença de plantas, estes resultados demonstram também o importante papel desempenhado pela vegetação na remoção do atenolol a qual possibilita que a performance dos sistemas plantados supere as que possuem um simples filtro de LECA. (Vymazal *et al.*, 1998; Turgut, 2007; Dordio *et al.*, 2009a).

A performance global dos sistemas SSFCW, plantados com *Phragmites*, é largamente superior às apresentadas na remoção do atenolol pelos processos convencionais usados nas ETARs. Este tipo de sistemas está a ser cada vez mais usado como forma alternativa de tratamento terciário nas ETARs e os presentes resultados sugerem que pode ser uma solução eficiente e pouco dispendiosa para tratar águas residuais contaminadas por fármacos e seus metabolitos.

Existem também alguns estudos semelhantes ao realizado neste trabalho mas utilizando plantas diferentes (*Thyphas*), com o mesmo objectivo de remover fármacos de

efluentes. Nesses estudos verificou-se também que essas plantas apresentam uma capacidade de remoção ligeiramente superior à das *Phragmites*. Isto foi verificado particularmente para o fármaco em estudo, o atenolol. No entanto, salvaguarda-se a ideia de que um bom sistema SSFCW, deverá possuir na sua constituição ambas as plantas (*Thyphas e Phragmites*), pois assim conseguem-se maiores taxas de remoção de fármacos (Dordio *et al.*, 2009b; Dordio *et al.*, 2009a).

IV – Conclusões e Perspectivas Futuras

IV - Conclusões e Perspectivas Futuras

Os β -bloqueadores são um grupo de poluentes emergentes nos últimos anos, em todo o mundo. No entanto pouco se sabe sobre os efeitos destes compostos e dos seus produtos de degradação.

No presente estudo foi montado e testado um sistema de leitos construídos de macrófitas de fluxo sub-superficial, constituído por LECA e pela espécie de macrófita *Phragmites australis*, e foi feito um estudo relativamente à sua capacidade na remoção do atenolol num efluente. Este estudo proporciona um acesso ao potencial destes sistemas no tratamento das contaminações por fármacos.

Após pesquisa na literatura concluiu-se que os métodos mais utilizados na detecção e quantificação de fármacos são os métodos cromatográficos, com especial destaque para a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Em conjunto com um eficiente passo de pré-concentração por SPE, estabeleceu-se um método cromatográfico para detectar e quantificar o atenolol em água e em efluente.

Através da utilização da técnica analítica de HPLC-DAD e HPLC-UV, bastante disponível e pouco dispendiosa, conseguiu-se obter um método analítico com um LOQ muito baixo para os dois aparelhos utilizados, abaixo dos valores descritos na bibliografia para amostras ambientais e elevada reprodutibilidade (RSD <4 %).

Para a optimização do método foram testadas várias colunas de SPE: uma polimérica (Oasis[®] HLB) e duas de fase reversa (Waters Sep-Pak[®] Vac e Lichrolut[®] RP18). Embora as colunas testadas não tenham mostrado diferenças significativas em termos de recolha de atenolol, foram escolhidas as colunas Merck LiChrolut[®] RP18, por serem as que apresentam menores custos. Utilizando a melhor coluna, foram testadas várias alterações ao método de concentração dos fármacos por SPE tendo-se concluído que o melhor método era aquele em a amostra foi alcalinizada a pH=12, seguida de um passo de lavagem com 5 mL de água, e eluída com metanol.

Após a optimização do método de pré-concentração por SPE, foram feitos estudos de estabilidade e conservação de soluções de atenolol, tendo-se concluído que estas podem ser acondicionadas em recipientes de vidro ou de plástico, desde que estejam

devidamente protegidas da luz, uma vez que sofrem fotodegradação, e preferencialmente no congelador (-17°C).

Através da realização de estudos de sorção na matriz de suporte, foi possível demonstrar as boas propriedades de sorção da LECA na remoção de atenolol presente em soluções aquosas (água e efluente). Verificou-se alguma perda na eficiência de remoção para o efluente, uma vez que as quantidades de atenolol sorvidas são menores, provavelmente devido ao aumento da solubilidade promovido pela matéria orgânica dissolvida presente no efluente. As primeiras 24 h parecem ser a etapa mais importante em todo o processo de sorção. O equilíbrio é obtido geralmente entre as 72 e as 96h, e o comportamento cinético parece ser semelhante nas duas condições testadas.

Procedeu-se á montagem e optimização dos ensaios finais pretendidos. Foram construídos quatro leitos construídos de macrófitas de fluxo sub-superficial, cheios com LECA lavada e dois deles foram plantados com rebentos de *Phragmites australis*. Todos os sistemas foram cheios com efluente dopado com atenolol a $0,78 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A LECA usada como matriz sólida nos leitos testados, foi responsável pela maioria de remoção de atenolol das águas residuais, mas as plantas usadas contribuíram com uma percentagem de 12-14 % em relação à remoção total pelos sistemas plantados. Para além disso, as plantas abreviaram significativamente a cinéticas de remoção do atenolol, o que possibilitou que o tempo de retenção das águas residuais nos leitos plantados fosse reduzido para 96 h, em comparação com o tempo necessário muito mais longo para atingir a mesma eficiência de filtração nos leitos de LECA.

Deve-se salvaguardar que são necessários testes futuros usando sistemas em larga escala (quando a escala é aumentada pode perder-se alguma eficiência), para garantir o pleno sucesso dos estudos efectuados, porém, os resultados obtidos mostraram a elevada eficiência destes sistemas na remoção do atenolol e possivelmente de outros compostos orgânicos semelhantes provenientes das águas residuais. Verificou-se também que os resultados sugerem que os sistemas em larga escala de sistemas deste tipo podem ser constituir alternativas eficientes e pouco dispendiosas relativamente a outras tecnologias mais caras, tais como a ozonização ou biorreactores de membrana usadas como fase terciária de tratamento.

Um outro aspecto que requer uma posterior investigação é o risco potencial de toxicidade para o ecossistema aquático, devido às concentrações residuais que se encontram presentes nos efluentes de leitos plantados ou não plantados, após o tratamento. De facto, mesmo se uma larga percentagem de remoção for conseguida, isto não assegura níveis não tóxicos de fármacos nos efluentes tratados.

Este tipo de estudo também poderá ser realizado utilizando outros tipos de vegetação, outras classes de fármacos, outros tipos de efluente e outros tipos de matriz de suporte, permitindo assim alargar a aplicabilidade do método a situações reais, num futuro próximo.

Naturalmente, no terreno, sob condições reais, as performances dos leitos andarão muito longe dos resultados pretendidos. A interacção entre os vários componentes dos leitos construídos (matriz de suporte, plantas e microorganismos) assim como as diferentes composições de efluente (sazonais, populacionais, etc.) e condições ambientais irão influenciar o sistema. No entanto, salvaguarda-se a extrema importância deste estudo uma vez é visto como um primeiro passo na projecção, construção e optimização de sistemas naturais, preferencialmente com orçamentos relativamente baixos e que permitam a monitorização, quantificação e sobretudo a eliminação de compostos de origem farmacêutica.

V – Bibliografía

V - Bibliografia

- Abdel-Hamid, M. E. (2000). "Comparative LC-MS and HPLC analyses of selected antiepileptics and beta-blocking drugs." *Farmaco*, 55 (2), 136-145.
- Albuquerque, A. (2003). "Contribuição para o estudo da remoção de residuais de carbono em filtros biológicos de leito imerso e fluxo descendente." Doutorado, Universidade da Beira Interior, Covilhã.
- Almeida, C.; Rosário, P.; Serôdio, P.; Nogueira, J. M. F. (2004). "Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica." *Química*, 95, 69-77.
- Amaya-Chávez, A.; Martínez-Tabche, L.; López-López, E.; Galar-Martínez, E. (2006). "Methyl parathion toxicity to and removal efficiency by *Typha Latifolia* in water and artificial sediments." *Chemosphere*, 63, 1124-1129.
- Andreozzi, R. (2003). *Wastewater engineering: treatment, disposal and reuse*, 4ª Ed., McGrawHill, Nova Iorque, EUA.
- Andreozzi, R.; Raffaele, M.; Nicklas, P. (2003). "Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment." *Chemosphere*, 50 (10), 1319-1330.
- Andrisano, V.; Gotti, R.; Leoni, A.; Cavrini, V. (1999). "Photodegradation studies on Atenolol by liquid chromatography." *J. Pharmaceut. Biomed.*, 21 (4), 851-857.
- Anjos, J. A. S. A. (2003). "Avaliação da eficiência de uma zona alagadiça (wetland) no controle da poluição por metais pesados: o caso da Olumbum em Santo Amaro da Purificação." Doutorado, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, Brasil.
- APHA. (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20ª Ed., American Public Health Association, Washington DC, EUA.

- Ardrey, B. (2003). *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction.*, John Wiley & Sons Ltd., Londres, Reino Unido.
- Argekar, A. P.; Powar, S. G. (2000). "Simultaneous determination of atenolol and amlodipine in tablets by high performance thin-layer chromatography." *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 21, 1137-1142.
- Arias, C. A.; Del Bubba, M.; Brix, H. (2001). "Phosphorus removal by sands for use as media in subsurface flow constructed reed beds." *Water Res.*, 35 (5), 1159-1168.
- Aryal, S.; Skalko-Basnet, N. (2008). "Stability of amlodipine besylate and atenolol in multi-component tablets of mono-layer and bi-layer types." *Acta Pharmaceutica*, 58 (3), 299-308.
- Azevedo, D. A.; Lacorte, S.; Vinhas, T.; Viana, P.; Barceló, D. (2000). "Monitoring of priority pesticides and other organic pollutants in river water from Portugal by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry." *J. Chromatogr. A*, 879, 13-26.
- Baird, C. (1998). *Environmental Chemistry*, 2ª Ed., W.H. Freeman and Company, Nova Iorque, EUA.
- Bandeiras, R. (2006). "Avaliação do funcionamento hidráulico de unidades de tratamento de águas residuais." Relatório de estágio POCI 2010, Universidade da Beira Interior, Covilhã.
- Barbosa, A. (2008). "Idosos portugueses tomam "cocktails" de medicamentos." *Jornal Metro*, 752 (24-04-2008).
- Barrett, A. M.; Hull, R.; LeCount, D. J.; Squire, C. J.; Carter, J. (1970). "Alkanolamine derivatives." The Patent Office, Londres, Reino Unido.
- Barros, M.; Mesquita, M.; Silva, M.; Vieira, P. (1995). *Laboratórios de águas e resíduos.*, MARN/LNEC, Lisboa.

- Basci, N. E.; Temizer, A.; Bozkurt, A.; Isimer, A. (1998). "Optimization of mobile phase in the separation of beta-blockers by HPLC." *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 18 (4-5), 745-750.
- Bastian, R. K.; Benforado, J. (1983). "Waste Treatment: Doing What Comes Naturally." *Technol. Rev.*, 86 (2), 59-66.
- Bastian, R. K.; Hammer, D. A. (1993). "The Use of Constructed Wetlands for Wastewater Treatment and Recycling." In: *Constructed Wetlands for Water Quality Improvement*, CRC Press, Florida, EUA.
- Beausse, J. (2004). "Selected drugs in solid matrices: A review of environmental occurrence, determination and properties of principal substances." *Relatório. No. 26*, Energy Research Center of the Netherlands, Holanda.
- Belmouden, M.; Assabbane, A.; Ichou, Y. A. (2000). "Adsorption characteristics of a phenoxy acetic acid herbicide on activated carbon." *J. Environ. Monit.*, 2 (3), 257-260.
- Benner, J.; Salhi, E.; Ternes, T.; Von Gunten, U. (2008). "Ozonation of reverse osmosis concentrate: kinetics and efficiency of beta blocker oxidation." *Water Res.*, 42 (12), 3003-3012.
- Bila, D. M.; Dezotti, M. (2003). "Fármacos no meio ambiente." *Quim. Nova*, 26 (4), 523-530.
- Biotage (2006). "Analytical Sample Preparation Catalogue."
- Boreen, A. L.; Arnold, W. A.; McNeill, K. (2003). "Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment: A review." *Aquat. Sci.*, 65 (4), 320-341.
- Bose, D. S.; Narsaiah, A. V. (2005). "An efficient asymmetric synthesis of S-atenolol: using hydrolytic kinetic resolution." *Bioorg. Med. Chem.*, 13, 627-630.
- Boxall, A. B. A. (2004). "The environmental side effects of medication." *EMBO reports*, 5, 1110-1116.

- BP. (2000). *British Pharmacopoeia.*, British Pharmacopoeia Commission Secretariat, Londres, Reino Unido.
- Brix, H. (1997). "Do macrophytes play a role in constructed treatment wetlands?" *Water Sci. Technol.*, 35 (5), 11-17.
- Brix, H.; Arias, C. A.; Del, B. M. (2001). "Media selection for sustainable phosphorus removal in subsurface flow constructed wetlands." *Water Sci. Technol.*, 44 (11-12), 47-54.
- Burger, A.; Rollinger, J. M.; Lindner, W. (1999). "Fundamentals and predictions of resolution of enantiomer mixtures by crystallization in the example of phase diagrams of atenolol and atenolol hydrochloride salt." *Pharmazie*, 54, 47-51.
- Buser, H. R.; Muller, M. D. (1998). "Occurrence of the Pharmaceutical Drug Clofibric Acid and the Herbicide Mecoprop in Various Swiss Lakes and in the North Sea." *Environ. Sci. Technol.*, 32 (1), 188-192.
- Cabral, U. (2004). "Caracterização e optimização de sistemas de tratamento de águas residuais por leitos de macrófitas, no Distrito de Castelo Branco." Licenciatura, Escola Superior Agrária de Castelo Branco.
- Calheiros, C. S.; Rangel, A. O.; Castro, P. M. (2007). "Constructed wetland systems vegetated with different plants applied to the treatment of tannery wastewater." *Water Res.*, 41 (8), 1790-1798.
- Calheiros, C. S.; Rangel, A. O.; Castro, P. M. (2008). "The effects of tannery wastewater on the development of different plant species and chromium accumulation in *Phragmites australis*." *Arch. Environ. Contam Toxicol.*, 55 (3), 404-414.
- Caplar, V.; Mikotic-Mihun, Z.; Hofman, H.; Kajfez, F.; Nagl, A.; Blazevik, N. (1984). "Atenolol." In: *Analytical profile of drug substances and excipients*, K. Florey, ed., Academic Press, Nova Iorque, EUA, 1-25.

- Caputo, H. P. (1996). *Mecânica dos solos e suas aplicações*, 6ª Ed., LTC Editora, Rio de Janeiro, Brasil.
- Carballa, M.; Omil, F.; Lema, J. M.; Llombart, M.; Garcia-Jares, C.; Rodriguez, I.; Gomez, M.; Ternes, T. (2004). "Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant." *Water Res.*, 38 (12), 2918-2926.
- Carvalho, M. J. (2008). "ETAP's e piscinas biológicas: o mesmo conceito mas aplicações tão diferentes."
http://naturlink.sapo.pt/article.aspx?menuid=11&cid=5916&bl=1§ion=3&viewall=true#Go_3 (3-6-2009).
- Castiglioni, S.; Bagnati, R.; Fanelli, R.; Pomati, F.; Calamari, D.; Zuccato, E. (2006). "Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy." *Environ. Sci. Technol.*, 40 (1), 357-363.
- Castro, R. A. E. (2006). "Antagonistas adrenérgicos Beta 1: estrutura do atenolol." Doutoramento, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.
- Cerejeira, M. J.; Viana, P.; Batista, S.; Pereira, T.; Silva, E.; Valério, M. J. (2003). "Pesticides in Portuguese surface and ground waters." *Water Res.*, 37, 1055-1063.
- Ceresole, R.; Moyano, M. A.; Pizzorno, M. T.; Segall, A. I. (2006). "Validated reversed-phase HPLC method for the determination of atenolol in the presence of its major degradation product." *J. Liq. Chromatogr. R. T.*, 29 (20), 3008-3018.
- Clausen, L.; Fabricius, I. (2001). "Atrazine, isoproturon, mecoprop, 2,4-D, and bentazone adsorption onto iron oxides." *J. Environ. Qual.*, 30 (3), 858-869.
- Clausen, L.; Fabricius, I.; Madsen, L. (2001). "Adsorption of pesticides onto quartz, calcite, kaolinite, and alpha-alumina." *J. Environ. Qual.*, 30 (3), 846-857.
- Cleuvers, M. (2003). "Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects." *Toxicol. Lett.*, 142 (3), 185-194.

- Combourieu, B.; Inacio, J.; Delort, A. M.; Forano, C. (2001). "Differentiation of mobile and immobile pesticides on anionic clays by ^1H HR MAS NMR spectroscopy." *Chem. Commun. (Camb.)*, (21), 2214-2215.
- Cooper, P. F.; Findlater, B. C. (1990). *Constructed Wetlands in Water Pollution Control.*, Pergamon Press, Nova Iorque, EUA.
- 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, Reino Unido.
- Corregidor, J.; Parejo, A. (1999). *Plantas silvestres de la flora ibérica.*, Grijalbo, Barcelona, Espanha.
- Cortés, J.; Herrera, A.; Méndez, V.; Hernández, G.; Robles, J.; Rivera, E. (2006). "Uso de arcilla natural en el tratamiento del agua residual de la industria de celulosa."
- Coscolla, R. (1993). *Residuos de Plaguicidas en Alimentos Vegetales.*, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, Espanha.
- Costa, C. T. (1999). "Separation and identification of phenolic derivatives in plant extracts by novel analytical techniques." Doutoramento, American University.
- Dahlof, C.; Dimenas, E.; Kendall, M.; Wiklund, I. (1991). "Quality-of-life in cardiovascular diseases - Emphasis on beta-blocker treatment." *Circulation*, 84, 108-118.
- Daims, H.; Nielsen, J.; Nielsen, P.; Schleifer, K.; Wagner, M. (2001). "In situ characterization of Nitrospira-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants." *Appl. Environ. Microbiol.*, 67 (11), 5273-5284.
- Daughton, C. G.; Ternes, T. A. (1999). "Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?" *Environ. Health Perspect.*, 107 Suppl 6, 907-938.

- Davies, T. H.; Watson, J. T.; Jenkins, D. B. (1990). "Treat ability Assessment of Industrial Wastes By A Portable Wetland Unit." In: *Constructed Wetlands In Water Pollution Control*, WRc Swindon, Wiltshire, Reino Unido.
- Day, P. R. (1965). "Particle fractionation and particle-size analysis." In: *Methods of soil analysis*, C. A. Black, D. D. Evans, L. E. Ensminger, J. L. White, and F. E. Clark, eds., American Society of Agronomy, Madison WI, EUA, 545-567.
- Dean, J. R. (1998). "Solid phase extraction." In: *Extraction methods for environmental analysis*, John Wiley & Sons, West Sussex, Reino Unido, 35-61.
- Dias, V.; Inácio, M.; Pacheco, P.; Lopes, J.; Correia, P.; Soutinho, E. (2000). "Fito-ETAR's: Pressupostos teóricos de funcionamento e tipos." Associação portuguesa para estudos de saneamento básico.
- Dordio, A.; Pinto, J.; Dias, C. B.; Pinto, A. P.; Carvalho, A. J. P.; Teixeira, D. M. (2009a). "Atenolol removal in microcosm constructed wetlands." *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 89 (8-12), 835-848.
- Dordio, A. V.; Teimao, J.; Ramalho, I.; Carvalho, A. J.; Candeias, A. J. (2007). "Selection of a support matrix for the removal of some phenoxyacetic compounds in constructed wetlands systems." *Sci. Total Environ.*, 380 (1-3), 237-246.
- Dordio, A. V.; Candeias, A. J. E.; Pinto, A. P.; da Costa, C. T.; Carvalho, A. J. P. (2009b). "Preliminary media screening for application in the removal of clofibric acid, carbamazepine and ibuprofen by SSF-constructed wetlands." *Ecol. Eng.*, 35 (2), 290-302.
- Dordio, A. V.; Duarte, C.; Barreiros, M.; Carvalho, A. J.; Pinto, A. P.; da Costa, C. T. (2009c). "Toxicity and removal efficiency of pharmaceutical metabolite clofibric acid by *Typha* spp.--potential use for phytoremediation?" *Bioresour. Technol.*, 100 (3), 1156-1161.

Bibliografia

- 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 (17), 3595-3602.
- Duarte, S. (2002). "Estudo das potencialidades das zonas húmidas artificiais no tratamento de efluentes aquícolas." Licenciatura, Instituto Superior Técnico.
- Emilien, G.; Maloteaux, J. M. (1998). "Current therapeutic uses and potential of beta-adrenoceptor agonists and antagonists." *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 53, 389-404.
- EPA. (1993). "Subsurface flow constructed wetlands for wastewater treatment - A technology assessment." *Relatório. No. 832-R-93-008*, United States Environmental Protection Agency.
- Esplugas, S.; Bila, D. M.; Krause, L. G.; Dezotti, M. (2007). "Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents." *J. Hazard. Mater.*, 149 (3), 631-642.
- Etnier, C.; Guterstam, B. (1991). *Ecology Engineering for Wastewater Treatment*, 2ª Ed., CRC Press, Boksogen/Stensund Folk College, Suécia.
- Fediuc, E.; Erdei, L. (2002). "Physiological and biochemical aspects of cadmium toxicity and protective mechanisms induced in *Phragmites australis* and *Typha latifolia*." *J. Plant Physiol.*, 159 (3), 265-271.
- Fent, K.; Weston, A. A.; Caminada, D. (2006). "Ecotoxicology of human pharmaceuticals." *Aquat. Toxicol.*, 76 (2), 122-159.
- Ferrari, B.; Paxéus, N.; Lo Giudice, R.; Pollio, A.; Garric, J. (2003). "Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac." *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 55, 359-370.
- Filho, I. N.; Mullen, C. V.; Caramão, E. B. (2001). "Estudo de compostos orgânicos em lixiviado em aterros sanitários por EFS e CG/EM." *Quim. Nova*, 24 (4), 554-556.

- Foppa, T.; Murakami, F. S.; Silva, M. A. S. (2007). "Development, validation and stability study of pediatric atenolol syrup." *Pharmazie*, 62 (7), 519-521.
- Fritz, J. S. (1999). "SPE in the 1970s: Extraction of organic pollutants from water." In: *Analytical solid-phase extraction*, John Wiley & Sons, Nova Iorque, EUA, 15-27.
- Galvão, A.; Matos, J.; Rodrigues, J.; Heath, P. (2005). "Sustainable sewage solutions for small agglomerations." *Water Sci. Technol.*, 52 (12), 25-32.
- Giger, W. (2002). "Produits chimiques : Facteurs de risque pour l'environnement et la santé." *EAWAG News*, 53, 3-5.
- Gomes de Castro, A.; Duarte, A.; Santos, T. R. (2003). *O ambiente e a saúde.*, Instituto Piaget, Lisboa.
- Gomez, M.; Petrovic, M.; Fernandez-Alba, A.; Barcelo, D. (2006). "Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters." *J. Chromatogr. A*, 1114 (2), 224-233.
- Goodman, L. S.; Gilman, A. (2006). *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, 11ª Ed., McGrawHill, Nova Iorque, EUA.
- Gopal, B. (1999). "Natural and constructed wetlands for wastewater treatment: Potentials and problems." *Water Sci. Technol.*, 40 (3), 27-35.
- Gros, M.; Petrovic, 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*, 70, 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 (9), 2074-2083.

- Gubanov, I. A.; Kiseleva, K. V.; Novikov, V. S.; Tikhomirov, V. N. (2002). *The illustrated keys to plants of Middle Russia.*, KMK, Moscovo, Rússia.
- Haberl, R. (1999). "A chance to solve wastewater problems in developing countries." *Water Sci. Technol.*, 40 (3), 11-17.
- 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 (2), 109-124.
- Halling-Sorensen, B.; Nors, N. S.; Lanzky, P. F.; Ingerslev, F.; Holten Lutzhoft, H. C.; Jorgensen, S. E. (1998). "Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment--a review." *Chemosphere*, 36 (2), 357-393.
- Hammer, D. A. (1989). *Constructed Wetlands for Wastewater Treatment: Municipal, Industrial and Agricultural.*, CRC Press, Chelsea, Reino Unido.
- Hanai, T. (1999). *HPLC: A Practical Guide.*, Royal Society of Chemistry, Londres, Reino Unido.
- Hao, C., 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.
- Harborne, J. B.; Dey, P. M. (1993). *Methods in Plant Biochemistry.*, Academic Press Limited, San Diego CA, EUA.
- Heberer, T. (2002). "Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data." *Toxicol. Lett.*, 131 (1-2), 5-17.

- Heberer, T.; Reddersen, K.; Mechlinski, A. (2002). "From municipal sewage to drinking water: fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas." *Water Sci. Technol.*, 46 (3), 81-88.
- 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.
- Hernando, M. D.; Gomez, M. J.; Aguera, A.; Fernandez-Alba, A. R. (2007). "LC-MS analysis of basic pharmaceuticals (beta-blockers and anti-ulcer agents) in wastewater and surface water." *TRAC-Trend. Anal. Chem.*, 26 (6), 581-594.
- Hirsch, R.; Ternes, T. A.; Haberer, K.; Mehlich, A.; Ballwanz, F.; Kratz, K. L. (1998). "Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry." *J. Chromatogr. A*, 815 (2), 213-223.
- Husband, J. D.; Martin, C. D.; Johnson, K. D. (2000). "A Review of Constructed Wetland Treatment Technology for Industrial Wastewater Treatment." Lake Buena Vista FL, EUA.
- Iweme, A.; Raby, D.; Lesavre, J. (2005). *Épuration des eaux usées domestiques par filtres plantes de macrophytes - Guide pour la conception et la réalisation.*, Agence de l'eau, França.
- Johansson, L. (1997). "The use of LECA (Light Expanded Clay Aggregates) for the removal of phosphorus from wastewater." *Water Sci. Technol.*, 35 (5), 87-93.
- Jones, O. A.; Voulvoulis, N.; Lester, J. N. (2002). "Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals." *Water Res.*, 36 (20), 5013-5022.

Bibliografia

- Jorgensen, S. E.; Halling-Sorensen, B. (2000). "Drugs in the environment." *Chemosphere*, 40 (7), 691-699.
- Kadlec, R. H.; Knight, R. L. (1996). *Treatment wetlands.*, Lewis Publishers, Boca Raton FL, EUA.
- Kadlec, R. H.; Knight, R. L.; Vymazal, J.; Brix, H.; Cooper, P.; Haberl, R. (2000). "Constructed wetlands for pollution control: processes, performance, design and operation." *Relatório. No. 8*, International Water Association, Londres, Reino Unido.
- Kayser, K.; Kunst, S.; Fehr, G.; Voermanek, H. (2003). "Controlling a combined lagoon/reed bed system using the oxidation-reduction potential (ORP)." *Water Sci. Technol.*, 48, 167-174.
- 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 (5), 1013-1021.
- Kong, W. D.; Zhu, Y. G.; Liang, Y. C.; Zhang, J.; Smith, F. A.; Yang, M. (2007). "Uptake of oxytetracycline and its phytotoxicity to alfalfa (*Medicago sativa* L.)." *Environ. Pollut.*, 147 (1), 187-193.
- Konstantinou, I. K.; Zarkadis, A. K.; Albanis, T. A. (2001). "Photodegradation of selected herbicides in various natural waters and soils under environmental conditions." *J. Environ. Qual.*, 30 (1), 121-130.
- Korolkovas, A.; Brandao, D. C.; Rosito, F. (1993). "Ramipril, a new antagonist of angiotensin converting enzyme." *Arq Bras. Cardiol.*, 60 (2), 115-122.
- Kummerer, K.; Erbe, T.; Gartiser, S.; Brinker, L. (1998). "AOX-emissions from hospitals into municipal waste water." *Chemosphere*, 36 (11), 2437-2445.

- Kummerer, 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 (6-7), 957-969.
- Laber, J.; Haberl, R.; Perfler, R.; Langergraber, G. (2000). "Influence of Substrate Clogging on the Treatment Capacity of a Vertical-Flow Constructed Wetland System." Lake Buena Vista FL, EUA.
- Lacorte, S.; Viana, P.; Guillamon, M.; Tauler, R.; Vinhas, T.; Barcelo, D. (2001). "Main findings and conclusions of the implementation of Directive 76/464/CEE concerning the monitoring of organic pollutants in surface waters (Portugal, April 1999-May 2000)." *J. Environ. Monit.*, 3 (5), 475-482.
- Laganá, A.; Bacaloni, A.; De Leva, I.; Faberi, A.; Fago, G.; Marino, A. (2002). "Occurrence and determination of herbicides and their major transformation products in environmental waters." *Anal. Chim. Acta*, 462, 187-198.
- Larsen, T. A.; Lienert, J.; Joss, A.; Siegrist, H. (2004). "How to avoid pharmaceuticals in the aquatic environment." *J. Biotechnol.*, 113 (1-3), 295-304.
- Law, B.; Houghton, S. J.; Ballard, P. (1998). "An approach to the evaluation and comparison of reversed-phase high-performance liquid chromatography stationary phases." *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 17 (3), 443-453.
- Leite, F. S.; Pereira, V. A.; Omosako, C. O.; Carmona, M. J. C.; Auler Jr., J. O. C.; Santos, S. R. C. J. (2006). "A micromethod for the quantification of atenolol in plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. Therapeutic drug monitoring of two patients with severe coronary insufficiency before cardiac surgery." *Ther. Drug Monit.*, 28 (2), 237-244.
- Lens, P.; Zeeman, G.; Lettinga, G. (2001). "Decentralised sanitation and reuse: Concepts, systems and implementation." IWA Publishing.

- Li, H.; Sheng, G.; Teppen, B. J.; Johnston, C. T.; Boyd, S. A. (2003). "Sorption and Desorption of Pesticides by Clay Minerals and Humic Acid-Clay Complexes." *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 67, 122-131.
- Li, H.; Teppen, B. J.; Laird, D. A.; Johnston, C. T.; Boyd, S. A. (2006). "Effects of Increasing Potassium Chloride and Calcium Chloride Ionic Strength on Pesticide Sorption by Potassium and Calcium-Smectite." *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 70, 1889-1895.
- 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.
- Lindqvist, N.; Tuhkanen, T.; Kronberg, L. (2005). "Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters." *Water Res.*, 39 (11), 2219-2228.
- Liska, I. (2000). "Fifty years of solid-phase extraction in water analysis--historical development and overview." *J. Chromatogr. A*, 885 (1-2), 3-16.
- Liu, Q.; Williams, H. (2007). "Kinetics and degradation products for direct photolysis of beta-blockers in water." *Environ. Sci. Technol.*, 41 (3), 803-810.
- Lopez-Sendon, J.; Swedberg, K.; McMurray, J.; Tamargo, J.; Maggioni, A. R.; Dargie, H.; Tendra, M.; Waagstein, F.; Kjekshus, J.; Lechat, P.; Torp-Pedersen, C. (2005). "Expert consensus document on beta-adrenergic receptor blockers." *Revista Española de Cardiología*, 58, 65-90.
- 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.
- Mason, W. D.; Winer, N.; Kochak, G.; Cohen, I.; Bell, R. (1979). "Kinetics and absolute bioavailability of atenolol." *Clin. Pharmacol. Ther.*, 25 (4), 408-415.

- 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 (14), 5449-5454.
- Matamoros, V.; Bayona, J. M. (2006). "Elimination of pharmaceuticals and personal care products in subsurface flow constructed wetlands." *Environ. Sci. Technol.*, 40 (18), 5811-5816.
- Matamoros, V.; Puigagut, J.; Garcia, J.; Bayona, J. M. (2007). "Behavior of selected priority organic pollutants in horizontal subsurface flow constructed wetlands: a preliminary screening." *Chemosphere*, 69 (9), 1374-1380.
- Matamoros, V.; Garcia, J.; Bayona, J. M. (2008a). "Organic micropollutant removal in a full-scale surface flow constructed wetland fed with secondary effluent." *Water Res.*, 42 (3), 653-660.
- Matamoros, V.; Caselles-Osorio, A.; Garcia, J.; Bayona, J. M. (2008b). "Behaviour of pharmaceutical products and biodegradation intermediates in horizontal subsurface flow constructed wetland. A microcosm experiment." *Sci. Total Environ.*, 394 (1), 171-176.
- Maurer, M.; Escher, B. I.; Richle, P.; Schaffner, C.; Alder, A. C. (2007). "Elimination of beta-blockers in sewage treatment plants." *Water Res.*, 41 (7), 1614-1622.
- McEvoy, G. K. (1994). *AHFS Drug Information.*, American Society of Hospital Pharmacists, Bethesda MD, EUA.
- McLean, E. O. (1982). "Soil pH and lime requirement." In: *Methods of soil analysis*, A. L. Page, R. H. Miller, and D. R. Keeney, eds., American Society of Agronomy, Madison WI, EUA, 199-223.
- Medana, C.; Calza, P.; Carbone, F.; Pelizzetti, E.; Hidaka, H.; Baiocchi, C. (2008). "Characterization of atenolol transformation products on light-activated TiO₂ surface by high-performance liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry." *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22 (3), 301-313.

- Melo, S. A. S.; Trovó, A. G.; Bautitz, I. R.; Nogueira, R. F. P. (2009). "Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados." *Quim. Nova*, 32 (1), 188-197.
- Merck. (2006). "Specifications of LiChrolut® EN."
http://chrombook.merck.de/chrombook/ip_internet_v5-documents/out-chrombook/out-1-1-2-2-5-1.htm (5-6-2009).
- Metcalf, C. D.; Miao, X. S.; Koenig, B. G.; Struger, J. (2003a). "Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada." *Environ. Toxicol. Chem.*, 22 (12), 2881-2889.
- Metcalf, C. D.; Koenig, B. G.; Bennie, D. T.; Servos, M.; Ternes, T. A.; Hirsch, R. (2003b). "Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants." *Environ. Toxicol. Chem.*, 22 (12), 2872-2880.
- Miao, X. S.; Koenig, B. G.; Metcalfe, C. D. (2002). "Analysis of acidic drugs in the effluents of sewage treatment plants using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry." *J. Chromatogr. A*, 952 (1-2), 139-147.
- 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*, 4ª Ed., Prentice Hall, Harlow, Reino Unido.
- Modamio, P.; Lastra, C. F.; Montejo, O.; Marifio, E. L. (1996). "Development and validation of liquid chromatography methods for the quantitation of propranolol, metoprolol, atenolol, and bisoprolol: Application in solution stability studies." *Int. J. Pharm.*, 130, 137-140.
- 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.
- Moldoveanu, S. C.; David, V. (2002). "Sorbent extraction." In: *Sample preparation in chromatography - Journal of Chromatography Library, Vol. 65*, Elsevier, Amsterdam, Holanda, 341-373.
- Muller, M. B.; Zwiener, C.; Frimmel, F. H. (1999). "Sample cleanup and reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of polar aromatic compounds in groundwater samples from a former gas plant." *J. Chromatogr. A*, 862 (2), 137-145.
- Munson, B. L. (2002). "Myths & facts....about beta-blockers and hypertension." *Nursing.*, 32 (10), 84.
- Needham, S. R.; Brown, P. R. (2000). "The high performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry analysis of diverse basic pharmaceuticals on cyanopropyl and pentafluorophenylpropyl stationary phases." *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 23 (2-3), 597-605.
- Nikolaou, A.; Meric, S.; Fatta, D. (2007). "Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments." *Anal. Bioanal. Chem.*, 387 (4), 1225-1234.
- Njau, K. N.; Minja, R. J.; Katima, J. H. (2003). "Pumice soil: a potential wetland substrate for treatment of domestic wastewater." *Water Sci. Technol.*, 48 (5), 85-92.
- Noh, J. S.; Schwarz, J. A. (1989). "Estimation of the Point of Zero Charge of Simple Oxides by Mass Titration." *Journal of Colloid and Interface Science*, 130 (1), 157-164.
- Nunes, B. (2006). "Pharmaceutical drugs in the environment - change of the paradigm." *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde - Porto*, 3, 90-103.

- Olijnyk, D. P. (2008). "Avaliação da nitrificação e desnitrificação de esgoto doméstico empregando filtros plantados com macrófitas (*wetlands*) de fluxos vertical e horizontal – sistemas híbridos." Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.
- Oliveira, J. (1995). *A lagunagem em Portugal: Conceitos básicos e aplicações práticas.*, Edições Universitárias Lusófonas, Lisboa.
- Oliveira, J. M. (2008). "Estudo da Influência do Material de Enchimento na Remoção de Matéria Orgânica, Azoto e Sólidos em Leitões de Macrófitas do Tipo ESSH." Mestrado, Universidade Nova de Lisboa.
- Olson, H.; Betton, G.; Robinson, D.; Thomas, K.; Monro, A.; Kolaja, G.; Lilly, P.; Sanders, J.; Sipes, G.; Bracken, W.; Dorato, M.; Van, D. K.; Smith, P.; Berger, B.; Heller, A. (2000). "Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals." *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 32 (1), 56-67.
- Packer, J. L.; Werner, J. J.; Latch, D. E.; McNeill, K.; Arnold, W. A. (2003). "Photochemical Fate of Pharmaceuticals in the Environment: Naproxen, Diclofenac, Clofibrac Acid and Ibuprofen." *Aquat. Sci.*, 65, 342-351.
- 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 (1), 90-102.
- Palmgren, J. J.; Monkkonen, J.; Korjamo, T.; Hassinen, A.; Auriola, S. (2006). "Drug adsorption to plastic containers and retention of drugs in cultured cells under in vitro conditions." *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 64 (3), 369-378.
- Patel, Y. P.; Patil, S.; Bhoir, I. C.; Sundaresan, M. (1998). "Isocratic, simultaneous reversed-phase high-performance liquid chromatographic estimation of six drugs for combined hypertension therapy." *J. Chromatogr. A*, 828 (1-2), 283-286.

- Pawlak, Z.; Clark, B. J. (1992). "The assay and resolution of the beta-blocker atenolol from its related impurities in a tablet pharmaceutical dosage form." *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 10 (5), 329-334.
- Peres, T. B. (2002). "Noções básicas de cromatografia." *Biológico*, 64 (2), 227-229.
- Petrovic, M.; Gonzalez, S.; Barceló, D. (2003). "Analysis and Removal of Emerging Contaminants in Wastewater and Drinking Water." *TRAC-Trend. Anal. Chem.*, 22 (10), 685-696.
- Piram, A.; Salvador, A.; Verne, C.; Herbreteau, B.; Faure, R. (2008). "Photolysis of beta-blockers in environmental waters." *Chemosphere*, 73 (8), 1265-1271.
- Ponezi, A. N.; Duarte, M. C. T.; Claudino, M. C. (2006). "Fármacos em matrizes - Revisão."
- Puchooa, D.; Ponnusawmy, B.; Wan Chow Wah, Y. F. (1999). "An investigation on low cost, locally available substrates potentially suitable for use in the hardening of tissue-cultured plantlets." *Science and Technology - Research Journal*, 4, 127-143.
- 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.
- Radjenovic, J.; Petrovic, M.; Barcelo, D. (2007). "Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor." *Anal. Bioanal. Chem.*, 387 (4), 1365-1377.
- Radjenovic, J.; Perez, S.; Petrovic, M.; Barcelo, D. (2008). "Identification and structural characterization of biodegradation products of atenolol and glibenclamide by liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole time-of-flight and quadrupole ion trap mass spectrometry." *J. Chromatogr. A*, 1210 (2), 142-153.

Bibliografia

- Ramade, F. (1977). *Écotoxicologie.*, Masson.
- Randerson, P.; Jordan, G.; Williams, H. (2005). "The role of willow roots in sub-surface oxygenation of vegetation filter beds - mass spectrometer investigations." 159-165.
- Reddy, K. R.; Smith, W. H. (1987). *Aquatic Plants for Water Treatment and Resource Recovery.*, Magnolia Pub., Orlando FL, EUA.
- Reed, S. C.; Middlebrooks, E. J.; Crites, R. W. (1988). *Natural Systems for Waste Management.*, McGrawHill, Nova Iorque, EUA.
- Relvão, A. (1999). *Sistemas de tratamento de efluentes em aglomerados urbanos por leitos de macrófitas emergentes.*, Comissão Coordenação Desenvolvimento Regional do Centro, Coimbra.
- Reynolds, E.; Baron, R. B. (1996). "Hypertension in women and the elderly. Some puzzling and some expected findings of treatment studies." *Postgrad. Med.*, 100 (4), 58-70.
- Richardson, M. L.; Bowron, J. M. (1985). "The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment." *J. Pharm. Pharmacol.*, 37 (1), 1-12.
- Robards, K.; Antolovich, M. (1997). "Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids." *Analyst*, 122, 11R-34R.
- Rodriguez-Mozaz, S.; de Alda, M. J.; Barcelo, D. (2004). "Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry." *J. Chromatogr. A*, 1045 (1-2), 85-92.
- Rouge, N.; Cole, E. T.; Doelker, E.; Buri, P. (1998a). "Buoyancy and drug release patterns of floating minitablets containing pirtanide and atenolol as model drugs." *Pharm. Dev. Technol.*, 3 (1), 73-84.

- Rouge, N.; Allemann, E.; Gex-Fabry, M.; Balant, L.; Cole, E. T.; Buri, P.; Doelker, E. (1998b). "Comparative pharmacokinetic study of a floating multiple-unit capsule, a high-density multiple-unit capsule and an immediate-release tablet containing 25 mg atenolol." *Pharm. Acta Helv.*, 73 (2), 81-87.
- Rusznayk, A.; Szabo, G.; Pollak, B.; Vagany, V.; Palatinszky, M. (2007). "Diversity of reed (*Phragmites australis*) stem biofilm bacterial communities in two Hungarian soda lakes." *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 54 (4), 339-352.
- Sacher, F.; Lange, F. T.; Brauch, H. J.; Blankenhorn, I. (2001). "Pharmaceuticals in groundwaters analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Wurttemberg, Germany." *J. Chromatogr. A*, 938 (1-2), 199-210.
- Sanchez, L. (2007). "Medicamentos en el agua, los nuevos contaminantes." *Consumer Eroski*, 01-01-2007, 28-29.
- Sanderson, H.; Brain, R. A.; Johnson, D. J.; Wilson, C. J.; Solomon, K. R. (2004). "Toxicity classification and evaluation of four pharmaceuticals classes: antibiotics, antineoplastics, cardiovascular, and sex hormones." *Toxicology*, 203 (1-3), 27-40.
- Santos, T. C. R.; Rocha, J. C.; Barceló, D. (2000). "Determination of rice herbicides, their transformation products and clofibric acid using on-line solid phase extraction followed by liquid chromatography with diode array and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection." *J. Chromatogr. A*, 879, 3-12.
- Seitz, J. L. (1995). *Questões globais - uma introdução.*, Instituto Piaget, Lisboa.
- Serjeant, E. P.; Dempsey, B. (1979). *Ionization constants of organic acids in water.*, Pergamon Press, Oxford, Reino Unido.
- Sezerino, P. H.; Bento, A. P.; Gotardo, J. T.; Peters, M. R.; Olijnyk, D. P.; Queiroz, A. R. A.; Philippi, L. S. (2004). "Sistemas naturais para o tratamento descentralizado de esgotos nos municípios da Grande Florianópolis: Ferramenta para o desenvolvimento regional sustentável." Florianópolis, Brasil.

- Sezerino, P. H. (2006). "Potencialidade dos filtros plantados com macrófitas (*constructed wetlands*) no pós-tratamento de lagoas de estabilização sob condições de clima subtropical." Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.
- Snow, D. D.; Bartelt-Hunt, S. L.; Saunders, S. E.; Cassada, D. A. (2007). "Detection, Occurrence, and Fate of Emerging Contaminants in Agricultural Environments." *Water Environ. Res.*, 79 (10), 1061-1084.
- Snyder, S. A.; Adham, S.; Redding, A. M.; Cannon, F. S.; DeCarolis, J.; Oppenheimer, J.; Wert, E. C.; Yoon, Y. (2007). "Role of membranes and activated carbon in the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals." *Desalination*, 202 (1-3), 156-181.
- Snyder, S. A. (2008). "Occurrence, Treatment, and Toxicological Relevance of EDCs and Pharmaceuticals in Water." *Ozone: Sci. Eng.*, 30 (1), 65-69.
- Soetaert, K.; Hoffman, M.; Meire, P.; Starink, M.; Van Oevelen, D.; Van Regenmortel, S.; Cox, T. (2004). "Modeling growth and carbon allocation in two reed beds (*Phragmites australis*) in the Scheldt." *Aquat. Bot.*, 79, 211-234.
- 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 (1-3), 99-113.
- Stangroom, S. J.; MacLeod, C. L.; Lester, J. N. (1998). "Photosensitized Transformation of the Herbicide 4-Chloro-2-Methylphenoxy Acetic Acid (MCPA) in Water." *Water Res.*, 32 (3), 623-632.
- Steger-Hartmann, T.; Kummerer, K.; Hartmann, A. (1997). "Biological degradation of cyclophosphamide and its occurrence in sewage water." *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 36 (2), 174-179.

- Stumpf, M.; Ternes, T. A.; Wilken, R. D.; Rodrigues, S. V.; Baumann, W. (1999). "Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil." *Sci. Total Environ.*, 225 (1-2), 135-141.
- Takagi, T.; Ramachandran, C.; Bermejo, M.; Yamashita, S.; Yu, L. X.; Amidon, G. L. (2006). "A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan." *Mol. Pharm.*, 3 (6), 631-643.
- Teimão, J. (2005). "Eficiência de remoção de poluentes emergentes em estações de tratamento de águas convencionais." Licenciatura, Universidade de Évora.
- Teixeira, D. M. (2006). "Novos métodos para a extracção de compostos fenólicos de plantas da família *Moraceae*. *Maclura pomifera*, *Ficus carica* e *Ficus elastica*: uma contribuição para o seu estudo." Doutoramento, Universidade de Évora.
- Ternes, T.; Hirsch, R.; Mueller, J.; Haberer, K. (1998). "Methods for the determination of neutral drugs as well as betablockers and alpha2-sympathomimetics in aqueous matrices using GC/MS and LC/MS/MS." *Fresen. J. Anal. Chem.*, 362 (3), 329-340.
- Ternes, T.; Bonerz, M.; Schmidt, T. (2001). "Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry." *J. Chromatogr. A*, 938 (1-2), 175-185.
- Ternes, T. A.; Meisenheimer, M.; McDowell, D.; Sacher, F.; Brauch, H. J.; Haist-Gulde, B.; Preuss, G.; Wilme, U.; Zulei-Seibert, N. (2002). "Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment." *Environ. Sci. Technol.*, 36 (17), 3855-3863.
- Ternes, T. (2001). "Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples." *TRAC-Trend. Anal. Chem.*, 20 (8), 419-434.
- Thorstensen, C. W.; Lode, O.; Christiansen, A. L. (2000). "Development of a solid-phase extraction method for phenoxy acids and bentazone in water and comparison to a liquid-liquid extraction method." *J. Agric. Food Chem.*, 48 (12), 5829-5833.

- Thorstensen, C. W.; Lode, O.; Eklo, O. M.; Christiansen, A. (2001). "Sorption of bentazone, dichlorprop, MCPA, and propiconazole in reference soils from Norway." *J. Environ. Qual.*, 30 (6), 2046-2052.
- Tsao, R.; Deng, Z. (2004). "Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals." *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 812 (1-2), 85-99.
- Turgut, C. (2007). "The impact of pesticides toward parrotfeather when applied at the predicted environmental concentration." *Chemosphere*, 66 (3), 469-473.
- USP. (2000). *United States Pharmacopoeia Dispensing Information.*, United States Pharmacopoeial Convention, Easton, EUA.
- Vaccaa, G.; Wandb, H.; Nikolausza, M.; Kuschka, P.; Kästner, M. (2005). "Effect of plants and filter materials on bacteria removal in pilot-scale constructed wetlands." *Water Res.*, 39 (7), 1361-1373.
- Vandevivere, P.; Bianchi, R.; Verstraete, W. (1999). "Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: Review of emerging technologies." *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 72 (4), 289-302.
- Vieno, N. M.; Tuhkanen, T.; 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." *J. Chromatogr. A*, 1134 (1-2), 101-111.
- Vivo-Truyols, G.; Torres-Lapasio, J. R.; Garcia-Alvarez-Coque, M. C. (2000). "Complementary mobile-phase optimisation for resolution enhancement in high-performance liquid chromatography." *J. Chromatogr. A*, 876 (1-2), 17-35.
- Vree, T. B.; van der Ven, A. J.; Verwey-Van Wissen, C. P.; Van Ewijk-Beneken Kolmer EW; Swolfs, A. E.; van Galen, P. M.; Amatsdjais-Groenen, H. (1994). "Isolation, identification and determination of sulfamethoxazole and its known metabolites in

- human plasma and urine by high-performance liquid chromatography." *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, 658 (2), 327-340.
- Vymazal, J.; Brix, H.; Cooper, P. F.; Green, M. B.; Haberl, R. (1998). *Constructed wetlands for wastewater treatment in Europe.*, Backhuys Publishers, Leiden, Holanda.
- Wadworth, A. N.; Murdoch, D.; Brogden, R. N. (1991). "Atenolol. A reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic use in cardiovascular disorders." *Drugs*, 42 (3), 468-510.
- 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." *Anal. Chim. Acta*, 619 (1), 54-58.
- 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.
- WHO (1996). "MCPA in Drinking-Water - Background Document for Development of WHO Guidelines for Drinking-Water Quality." In: *Health Criteria and Other Supporting Information*, World Health Organization.
- Williams, J. B. (2002). "Phytoremediation in Wetland Ecosystems: Progress, Problems, and Potential." *Crit. Rev. Plant Sci.*, 21 (6), 607.
- Wood, B.; McAtamney, C. (1996). "Constructed wetlands for wastewater treatment: the use of laterite in the bed medium in phosphorus and heavy metal removal." *Hidrobiologica*, 340, 323-331.
- Yang, X.; Fukushima, T.; Santa, T.; Homma, H.; Imai, K. (1997). "Enantiomeric separation and sensitive detection of propranolol, metoprolol and atenolol derivatized with a fluorogenic reagent, 4-(N-chloroformylmethyl-N-

methyl)amino-7-N,N-dimethylaminosulf onyl-2,1, 3-benzoxadiazole (DBD-COCl), on cellulose chiral columns in the reversed-phase mode." *Analyst*, 122 (11), 1365-1369.

Zalac, S.; Kallay, N. (1992). "Application of Mass Titration to the Point of Zero Charge Determination." *Journal of Colloid and Interface Science*, 149 (1), 233-240.

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 (5), 103-108.

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 1 - Publicações/comunicações no âmbito deste trabalho

Atenolol removal in microcosm constructed wetlands

Ana Dordio^{ab}, José Pinto^a, Cristina Barrocas Dias^{ac}, Ana Paula Pinto^{ad},
Alfredo J. Palace Carvalho^{ac} and Dora Martins Teixeira^{ad*}

^aChemistry Department, University of Évora, Rua Romão Ramalho, 59, 7000-676 Évora, Portugal; ^bIMAR – Institute of Marine Research Consortium, Environmental Biogeochemistry Group, University of Évora, Rua Romão Ramalho, 59, 7000-676 Évora, Portugal; ^cCQE – Évora Chemistry Centre, University of Évora, Rua Romão Ramalho, 59, 7000-676 Évora, Portugal;

^dICAM – Institute of Mediterranean Agricultural Sciences, University of Évora, Herdade Experimental da Mitra, 7000-676 Évora, Portugal

(Received 31 July 2008; final version received 2 April 2009)

Microcosm constructed wetland systems established with a matrix of light expanded clay aggregates (LECA) and *Typha* spp. or *Phragmites australis* were used to evaluate their ability to remove atenolol from wastewater. Combined with an efficient SPE concentration step, the use of HPLC-DAD yielded an analytical method for atenolol quantification with very low LOQ (9 ng mL^{-1}) and high reproducibility (RSD < 4%). Overall removal efficiencies of 92.5% and 94.5% were achieved after a retention time of only 4 days with the microcosm systems planted with *Phragmites australis* and *Typha* spp., respectively. The removal kinetics was characterised by an initial fast step (removal of about 75% after just 24 h) which is mainly attributable to adsorption on the LECA matrix. Atenolol removal in LECA beds continues to increase in a steady pace up to the end of the assay (8 days) being nevertheless about 5–10% lower than those observed in the planted beds after the first 4 days. For the retention time of 4 days most of the atenolol is removed by the LECA matrix but an additional 12–14% of the overall removal efficiency can be attributed to the *Typha* and *Phragmites* plants, which is in agreement with other published reports. Despite the fact that further tests using larger-scale flowing systems are required to evaluate fully the atenolol behaviour in constructed wetlands, this study points to the possible application of these low-cost wastewater treatment systems to treat atenolol contaminated wastewater.

Keywords: pharmaceuticals; atenolol; subsurface flow constructed wetlands (SSFCWs); LECA; *Phragmites australis*; *Typha* spp.

1. Introduction

Contamination of aquatic systems with pharmaceutical residues has emerged recently as one of the key issues in environmental chemistry. Analytical techniques made available in the past few years have significantly lowered the detection and quantification limits for organic substances in environmental matrices. Thanks to these advances numerous monitoring studies have been conducted lately that revealed a wide range of pharmaceutical active compounds (PhACs) present in low amounts but in great diversity in water bodies [1–4].

*Corresponding author. Email: dmt@uevora.pt

In modern society, an ever increasing number of pharmaceuticals are used for the treatment and prevention of various diseases. Ingested drugs are only partially absorbed by the body. In addition to their increasingly high global consumption rates, this results in a wide variety of pharmaceuticals along with their metabolites being continuously introduced in domestic wastewaters. Studies have shown that PhACs are only partially removed by conventional wastewater treatment processes used in wastewater treatment plants (WWTPs) resulting in the discharge of contaminated effluent into the receiving water bodies [1,5,6].

β -blockers like atenolol are used in the treatment of high blood pressure as well as in recovery from heart attacks. In several studies, traces of these substances were detected in wastewaters, as well as in surface and groundwaters, indicating their incomplete removal in WWTPs [3,5–8]. Despite the low concentrations detected, those studies also show some damaging effects of these compounds on aquatic ecosystems [6,8].

With the aim of improving the efficiency of WWTPs in removing PhACs such as atenolol and others, optimisation of wastewater treatment processes has been attempted, e.g. by increasing sludge residence times. Some advanced technologies have also been evaluated such as advanced oxidative processes, activated carbon adsorption, membrane filtration and membrane bioreactors [1,9–13]. However, despite the sometimes high removal efficiencies attained, these processes are generally not cost-effective on a large scale [1]. Consequently, there is a growing need for new wastewater treatment systems for removing PhACs from waters that have higher efficiencies at reasonable costs of operation/maintenance.

Subsurface flow constructed wetland (SSFCW) systems are low cost wastewater treatment systems consisting of inundated vegetated beds, designed to emulate the well-known water depurative capacity of natural wetlands [14]. These systems are increasingly being used to provide a form of secondary or tertiary treatment for wastewaters. They have already been used with success to remove some organic recalcitrant compounds from contaminated waters such as pesticides, PAHs, organic solvents or explosives [15–17]. However, only a few studies have until now been conducted on the removal of pharmaceutical residues [18–23] probably due to the only recent awareness and concern with these water contaminants.

Wastewater depuration in SSFCWs is achieved by the concerted action between plant rhizomes, microorganisms and the support matrix components. SSFCWs' efficiency can be significantly improved by optimisation of the operation conditions. The performance of these systems is highly dependent on the solid matrix materials and the plant species chosen. When designing a SSFCW it is important to select a matrix with a high sorption capacity, which will depend on the physico-chemical properties of the material chosen. Previous studies have shown that light expanded clay aggregates (LECA) are able to remove, by sorption, other pharmaceuticals from water [23,24]. With respect to the vegetation, aquatic plants play a central role in the depuration mechanisms occurring in a SSFCW. They provide support for the growth of microorganisms and promote the removal of a variety of pollutants by adsorption on the roots, uptake or degradation [14,25]. The most commonly used emergent vegetation in SSFCWs includes macrophyte species such as the cattail (*Typha* spp.) and the common reed (*Phragmites australis*) [14,26,27].

The aim of the present work was to evaluate the efficiency of microcosm constructed wetland systems to remove atenolol from contaminated wastewater, using LECA as the solid matrix, and planted with *Phragmites australis* or *Typha* spp. plants.

For pre-concentration of the samples, a SPE (solid-phase extraction) method was developed and optimised using water and wastewater spiked with atenolol which was quantified using high performance liquid chromatography coupled with a diode array detector (HPLC-DAD) instrumentation.

2. Experimental

2.1 Atenolol removal by microcosm SSFCW systems

2.1.1 SSFCW microcosm assays setup

Nine SSFCW microcosms were built using PVC containers (0.6 m long \times 0.5 m wide \times 0.4 m deep) filled with washed LECA (2/4) with a depth of 0.3 m. Water level was maintained just below the LECA surface, corresponding to a flooding rate of approximately 100%. Three beds were planted with pre-grown reeds (density of 20 plants/m²), three beds were planted with pre-grown cattails (density of 20 plants/m²) and another three were left unplanted. In addition to the nine SSFCW microcosms, three additional vessels were used, filled only with the tested wastewater solutions and without any plants or solid media, for the purpose of assessing the biodegradation of atenolol in the wastewater alone (see Figure 1).

2.1.2 Physical and chemical characterisation of the support matrix

In this study, LECA with a granulometric grade of 2/4 (commercial name Filtralite[®] NR 2-4), that was used as the solid matrix for the SSFCW microcosms, was supplied by MaxitGroup Portugal.

The commercially available media contain considerable amounts of fine materials which were significantly reduced by washing the LECA material with Millipore water (Simplicity[®] UV, Millipore Corp.) until no further suspended materials were visible. The washed media were then air dried and used throughout this study.

The particle-size distribution on a weight basis was analysed in triplicate by the conventional dry-sieving technique [28]. Grain-size distribution plots were used to estimate d_{10} (effective grain size) and d_{60} , and the uniformity coefficient ($U = d_{60}/d_{10}$). The apparent porosity (void space) of the media was determined from the amount of water needed to

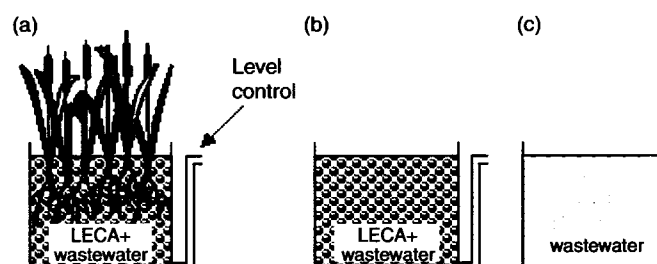


Figure 1. Schematic diagram of the experimental setup used in the atenolol removal assays; (a) the planted beds (with either *Phragmites* or *Typha*), (b) unplanted LECA beds and (c) the wastewater only systems. Three replicates of each system were constructed.

saturate a known volume of the solid [29,30]. Bulk density was determined based on the ratio between the dry weight and the bulk volume of the media [29]. Hydraulic conductivity was measured as described by Cooper [27]. All these measurements were replicated five times.

The mineralogical composition of the media was studied by X-ray diffraction (XRD) using a Bruker AXS-D8 Advance diffractometer with Cu K α radiation and a speed of 0.05 °/s, from 3 to 75°: 2 θ , after grinding the samples so as to pass a 106 μm sieve.

2.1.3 Plant collection and acclimation

Phragmites australis and *Typha* spp. rhizomes with shoots were collected in water streams in Alentejo, Portugal, during April 2007. The rhizomes were thoroughly washed to remove any soil/sediment particles attached to the plant surfaces and then were placed in vessels for acclimation. An aerated modified Hoagland nutrient solution was used, adapted from Fediuc and Erdei [31], having the following starting chemical composition, with pH adjusted to 6.0: 2.5 mmol L⁻¹ K⁺, 2 mmol L⁻¹ Mg²⁺, 2 mmol L⁻¹ Ca²⁺, 2 mmol L⁻¹ SO₄²⁻, 6 mmol L⁻¹ NO₃⁻, 0.5 mmol L⁻¹ H₂PO₄⁻, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Fe³⁺, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ H₃BO₃, 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Mn²⁺, 0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Cu²⁺, 0.1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ MoO₄²⁻. In the case of *Typha* this solution was used without any dilution, but in the case of *Phragmites* better shoot development was obtained with a dilution to 10% of the starting Hoagland solution. The nutrient solution was replaced twice every week.

Plants were grown in a growth chamber (Fitoclima, Portugal) at 22°C, with 70% of relative humidity and a light-dark cycle of 12:12 h. The photon flux density was 270 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. After 6 weeks, when new roots and leaves had developed, plants of uniform size were selected and planted in LECA beds, in a greenhouse, where they were set for a period of acclimation of approximately one year.

2.1.4 SSFCW microcosms operation and sample collection

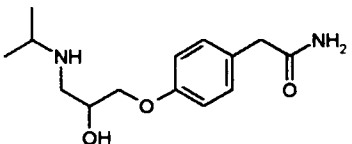
Both the SSFCW microcosms as well as the three additional empty vessels described in (2.1.1) were filled with wastewater spiked with atenolol at 0.78 $\mu\text{g mL}^{-1}$. This solution was prepared from a wastewater collected at a secondary treatment stage in a WWTP serving a small rural community population of ca. 400 inhabitants. The treatment processes used in this WWTP include screening, primary sedimentation and conventional activated sludge treatment. The wastewater collected at the WWTP was spiked with atenolol by dissolution of a stock aqueous solution of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of atenolol.

The systems were operated in a batch mode, i.e. with the initial load of the solution and without any solution flow during the assay.

During the assays, samples of atenolol solution were collected after the periods of 6, 12 and 24 hours for the first day and then with a daily periodicity for a total of 8 days of retention time. Collection of the liquid was made at half depth of the beds at random points on the beds surface. After collection, the samples were kept refrigerated until the time of analysis, which was always carried out within 2 hours from the time of collection.

Evapotranspiration in the beds was daily controlled and the water volumes lost through evapotranspiration were restored with distilled water.

Table 1. Relevant physical-chemical properties of atenolol [5].

Common name	Atenolol
IUPAC name	2-[4-[2-hydroxy-3-(1-methylethylamino)propoxy]phenyl]ethanamide OR 2-(4-(2-hydroxy-3-(isopropylamino)propoxy)phenyl)acetamide
CAS number	29122-68-7
Pharmacological class	β -Blocker 90% excreted unchanged
Structure	
Molecular weight (g mol ⁻¹)	266.34
Melting point (°C)	152.0
Ionisation constant, pKa	9.6
Water solubility (25°C) (mg L ⁻¹)	13,300
Log Kow	0.16

2.2 Reagents and materials

Atenolol ($\geq 98\%$ purity) was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Some of the most relevant physical-chemical properties of this pharmaceutical are listed in Table 1. HPLC gradient grade acetonitrile and methanol were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). All other high purity chemicals and solvents were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), Merck (Darmstadt, Germany) and Panreac Quimica SA (Barcelona, Spain), and were used without further purification. Ultra-pure water was obtained with a Milli-Q water purification system (Simplicity[®] UV, Millipore Corp., France).

The cartridges used for solid phase extraction were: LiChrolut[®] C₁₈ (500 mg, 3 mL) from Merck (Darmstadt, Germany), and Sep-Pak[®] Vac (500 mg, 3 mL) and Oasis[®] HLB (200 mg, 6 mL) from Waters Corporation (Milford, MA, USA). Filters with 0.45 μm nylon membrane were purchased from VWR International (West Chester, PA, USA).

2.3 Analytical methods

2.3.1 Wastewater characterisation

The collected WWTP effluent was characterised by the determination of the following wastewater quality parameters, according to the APHA-AWWA-WPCF methods [32]: total suspended solids (TSS), pH and total and soluble chemical oxygen demand (COD_t and COD_s) of samples filtered through 0.45 μm filters.

2.3.2 Solid phase extraction

Several SPE cartridges were tested with spiked water and wastewater for the extraction of atenolol: LiChrolut[®] C₁₈, Sep-Pak[®] Vac and Oasis[®] HLB (conditioned with 10.0 mL of

methanol and 10.0 mL of water). All columns were tested at two different sample pH conditions, namely pH = 12 (adjusted with NaOH) and without any pH adjustment (pH ~ 7–8). Three replicates were done for every test.

After sample filtration through 0.45 μm filters, the samples were percolated through the cartridges. Afterwards some cartridges were rinsed with 5.0 mL of Milli-Q water to test the influence of a washing step. The cartridges were then air dried for about 15 min under vacuum to remove excess water. The analyte (atenolol) retained in the columns was eluted with 5.0 mL of methanol. Following elution, the solutions were evaporated on a rotary evaporator at 30°C to dryness and redissolved with 1.0 mL of Milli-Q water.

The optimised SPE conditions used for the analysis of the remaining atenolol in the SSFCW microcosm assays were as follows: the samples were filtered through 0.45 μm filters and their pH adjusted to 12 before being percolated through LiChrolut® C₁₈. The cartridges were then rinsed with 5.0 mL of Milli-Q water and dried under vacuum conditions for 15 min after which the atenolol was eluted with 5.0 mL of methanol. Solutions were evaporated on a rotary evaporator at 30°C to dryness and redissolved with 1.0 mL of Milli-Q water. Three replicate analyses were done for each plant assay.

2.3.3 Quantification of atenolol and analytical method validation

Analysis was performed using HPLC equipment Agilent 1100 with a DAD detector (Agilent Technologies, Germany). The reversed phase analytical column used was a Zorbax Eclipse XDB-C₈ (4.6 mm \times 150 mm) with 5 μm particle size. The DAD detector was scanned from 200 to 500 nm, and the chromatographic profile was recorded at 230 nm.

The separation was performed in isocratic mode, and the mobile phase used was composed of 10:90 (v/v) acetonitrile:water, at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The water was acidified with 0.1% (v/v) phosphoric acid. All analyses were performed at room temperature and the injection volume was 20 μL . Three replicate injections were made for each sample previously filtered through a 0.45 μm filter.

Identification of the atenolol peak in the HPLC-DAD chromatogram was achieved by comparing the retention time and UV spectra of each sample with that of the corresponding atenolol reference and, whenever necessary, co-elution studies were performed. Calibration curves were constructed using a standard solution of 100.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of atenolol to prepare the standards of 0.20, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 2.0, 3.0 and 5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Three replicates were made for each standard solution, and each solution was injected five times. Instrumental quantification and detection limits (IQL and IDL) for the chromatographic measurement were determined as the analyte concentrations giving a signal equal to the blank signal plus 10 standard deviations, and plus three standard deviations, respectively [33]. The repeatability of the HPLC-DAD system was tested by performing six consecutive replicate injections of the same standard solution using the same mobile phase, and it was evaluated as the dispersion (relative standard deviation) of the measured peak areas. The reproducibility of the HPLC-DAD system was determined by performing injections of six different standard solutions in different days always using fresh solvent as the mobile phase each day, and it was evaluated as the dispersion (relative standard deviation) of the measured peak areas.

In order to test for possible negative effects on the LiChrolut® C₁₈ column's performance due to the use of large sample volumes, a series of trials were also performed using varying volumes of solution (5, 50 and 100 mL) all containing the same amount of the analyte. The effect of atenolol concentration was also investigated using wastewater

samples spiked with atenolol at concentration levels of 0.5, 1.5 and 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, for the same volume (5.0 mL) of sample percolated through the SPE column. Three replicate analyses were performed for each sample volume percolated and atenolol concentration level. Atenolol absolute recoveries were calculated as the ratio of the peak areas obtained by HPLC-DAD in the solid phase extracted sample and in the non-extracted standard. The average absolute recovery percentage obtained for the different volume assays was used to calculate the analytical method's LOQ.

Limits of quantification of the entire analytical methods (LOQ) were calculated following the equation [34]:

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

where IQL is the instrumental quantification limit ($\mu\text{g mL}^{-1}$), Rec (%) is the average absolute recovery of atenolol in wastewater samples and C is the concentration factor (100).

The reproducibility of the entire analytical method was determined by performing, in different days, quantification of atenolol recovered from five spiked wastewater solutions with different atenolol concentrations (0.5–2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and sample volumes (5–100 mL), always using fresh solvent as the mobile phase each day. Reproducibility was evaluated as the dispersion (relative standard deviation) of atenolol recoveries.

3. Results and discussion

3.1 Analytical method for the quantification of atenolol

3.1.1 Chromatographic analysis

The quantification of pharmaceuticals such as atenolol is mainly performed using chromatographic techniques like liquid chromatography coupled with a mass spectrometer using electrospray ionisation (LC-ESI-MS), LC-ESI-MS tandem and gas chromatography coupled with a mass spectrometer (GC-MS) because of the lower quantification limits that these techniques can achieve (ng L^{-1} range) [35]. However, the ESI-MS detector has a significant drawback associated with the ESI ionisation which is highly susceptible to other components in the matrix that may induce signal suppression (more often) or signal enhancement leading to erroneous results [5]. The determination of pharmaceuticals in water samples using GC-MS always requires sample derivatisation. In the β -blockers case, a two-step derivatisation by silylation of the hydroxy groups and trifluoroacetylation of the secondary amino moieties is needed. Since the derivatisation of the hydroxy groups can be incomplete, the use of GC-MS can become inappropriate for the quantification of those pharmaceuticals in water samples [35]. HPLC-DAD, when coupled with an appropriate method of analyte concentration, can be a suitable and less expensive alternative for the determination of trace organics such as atenolol. In this work, an HPLC-DAD method was developed to evaluate the efficiency of SSFCW microcosms to remove atenolol from contaminated wastewater. To optimise the chromatographic separation, a series of preliminary experiments were performed, testing different mobile phases consisting of methanol, acetonitrile or mixtures of methanol and acetonitrile as organic solvent and water with different additives, such as formic acid and phosphoric acid. The best quantification conditions were achieved using isocratic separation with the mobile phase composed by 10:90 (v/v) acetonitrile:water acidified with 0.1% (v/v) phosphoric acid. The linearity range ($R^2 > 0.99$) determined for the atenolol standards,

Table 2. Method validation parameters.

Linearity range ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (R^2)	LC-UV system				Entire analytical method	
	IQL ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	IDL ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Repeatability % RSD	Reproducibility % RSD	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Reproducibility % RSD
0.2–60 (0.991)	0.81	0.24	1.52	2.51	0.009	3.69

Notes: IDL and IQL: instrumental detection and quantification limits; LOQ: limit of quantification of the entire method.

the IDL and IQL of the chromatographic separations calculated according to Miller and Miller [33], the repeatability, the reproducibility and the LOQ of the analytical method developed for the HPLC-DAD equipment, calculated according to Vieno *et al.* [34], are presented in Table 2.

3.1.2 SPE method optimisation

In order to optimise a solid-phase extraction method for the pre-concentration of atenolol in wastewater samples, several SPE columns were tested, including one polymeric sorbent (Oasis HLB[®]) and two apolar cartridges (Merck LiChrolut[®] C₁₈ and Waters Sep Pak[®] C₁₈). The performance of the different SPE columns was compared first using water spiked with atenolol at a concentration level of $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Atenolol is a basic pharmaceutical compound ($\text{pK}_a = 9.6$) [5] and at basic pH values, it should be predominantly at the non protonated form, increasing its affinity to the SPE sorbent. In 2006, Gros *et al.* [5] tested several SPE columns to pre-concentrate a number of pharmaceutical compounds, including atenolol, and they concluded that at lower pH values ($\text{pH} = 2$) the recoveries of atenolol from an Oasis HLB[®] column were significantly lower than those obtained if no pH adjustment was done (neutral pH). However, in that work, the recoveries at more basic pH values of the sample were not evaluated. In our work, the efficiency of recovery of the different SPE columns was compared at pH 12 and without pH adjustment of the samples (pH about 7). There are several references [5,36] suggesting that a washing step with water, after the percolation of the sample through the cartridge, can clean up the matrix of some interfering compounds and improve the recoveries of the pharmaceuticals in SPE pre-concentration methods. This parameter was evaluated as well. The results obtained with the four different SPE methods tested are shown in Figure 2.

There was no improvement in the SPE recoveries when the sample pH was adjusted to 12. However, when an additional washing step was added to the procedure a significant improvement was observed in the atenolol recoveries, only on the samples where the pH had been previously adjusted to 12. For the optimal conditions, the three tested columns did not show significant differences in terms of atenolol recovery. Therefore, Merck LiChrolut[®] C₁₈ columns were chosen to be used throughout this study because they were less expensive.

SPE method validation was performed using the optimised conditions (sample at pH 12 and using a washing step with 5 mL of water) and wastewater samples spiked with atenolol. In order to test the possible detrimental effect on the atenolol recoveries when large volumes of wastewater were percolated through the LiChrolut[®] C₁₈, a series of SPE experiments were established, varying the sample volumes but maintaining the same

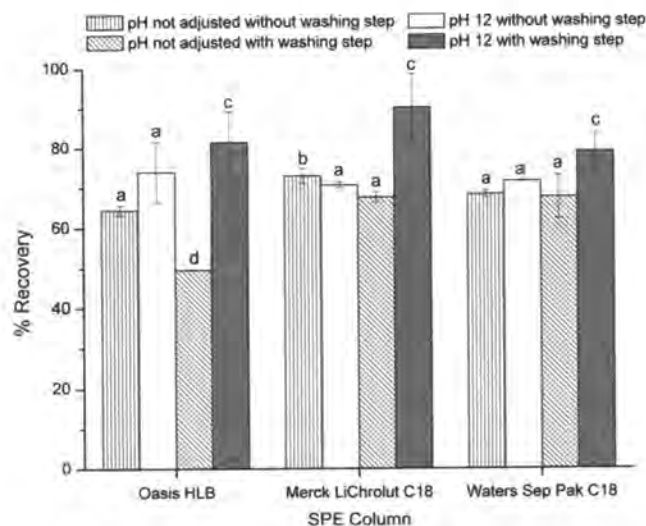


Figure 2. Influence of different SPE materials, pH adjustment (7 and 12), and wash step on the atenolol recovery from water samples. Vertical error bars indicate \pm SD ($n = 3$). ANOVA significant at $P < 0.05$ when compared with control. Different letters indicate significantly different values.

Table 3. Influence of sample volume and concentration on the atenolol recoveries from spiked wastewater (average \pm SD, $n = 3$) obtained using LiChrolut[®] C₁₈ cartridges. ANOVA significant at $P < 0.05$ when compared with control.

	% Recovery		
Atenolol concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.5	1.5	2.5
	83.85 ± 2.33	84.77 ± 1.93	85.59 ± 3.91
Volume (mL)	5	50	100
	85.59 ± 4.01	85.58 ± 3.75	83.26 ± 1.36

atenolol amount. Data presented in Table 3 prove that increasing volumes by a factor of 100 has negligible influence in the recoveries of atenolol. Additionally, higher concentrations of atenolol in the samples (up to $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) did not seem to decrease the recoveries of the SPE method.

Overall the low quantification limit of the entire analytical method (calculated according to Vieno [34] and found to be 9 ng mL^{-1} , see Table 2), along with the high reproducibility of the analytical method ($\text{RSD} < 4\%$, see Table 2) proved that the developed analytical method was suitable to be used in the determination of atenolol in wastewater.

3.2 Atenolol removal by SSFCW microcosms

3.2.1 Physical and chemical characterisation of solid matrix and wastewater

LECA (2/4) used in the assays was quite uniform in terms of particle size ($U = 1.38$) with most of its particles (95%) having diameters within 2.83–5.00 mm. LECA presented

a pronounced alkalinity (pH in water of 9.01 ± 0.02 and PZC of 9.67 ± 0.03). These characteristics may be attributed to the presence of alkaline components such as metal oxides and carbonates, as was verified in a media mineralogical characterisation by X-ray diffraction (data not shown). The apparent porosity (or void space) of LECA is quite large ($48\% \pm 1$), which may contribute to the good hydraulic conductivity measured ($7.7 \times 10^{-3} \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

The wastewater used in the assays was collected after a secondary treatment stage in a WWTP of a small rural community. Some of the most common parameters used to characterise wastewater quality were evaluated and are presented in Table 4. Organic load and suspended solids for this wastewater were, at the time of collection, somewhat high but still within the Portuguese legal limits for discharge into water streams.

Table 4. Physical and chemical properties (\pm SD, $n=5$) of the treated wastewater used in the assays.

Parameters	Treated wastewater
pH	8.06 ± 0.05
TSS (mg L^{-1})	47 ± 3
COD _i (mg L^{-1})	127 ± 2
COD _s (mg L^{-1})	76 ± 2

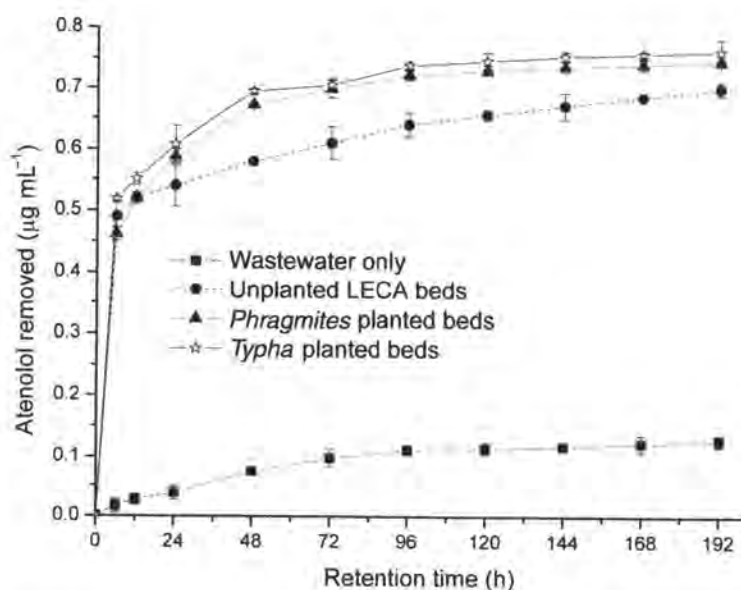


Figure 3. Kinetics of atenolol removal by the *Phragmites* and *Typha* planted beds as well as the unplanted LECA beds. Also depicted is the kinetics of atenolol biodegradation in the wastewater only. Vertical error bars indicate \pm SD ($n=3$).

3.2.2 Kinetics of atenolol removal

The effect of contact time and type of vegetation (*Phragmites* or *Typha*) in the removal of atenolol from spiked wastewater is shown in Figure 3 and compared with unplanted LECA beds. In the same figure, the kinetics of the biodegradation of atenolol in the wastewater (i.e. not in contact with planted or LECA beds) is also presented.

In every assay the kinetics are characterised by an initial fast step (first 6 hours) that is mostly due to adsorption over the LECA's surface (although, in the planted beds, some adsorption onto the plant's roots is likely to occur also) through which more than half the initial atenolol is removed within this short period. Subsequently, a slower process is responsible for additional compound removal. At this stage, removal in the unplanted LECA beds is slower than in planted ones. After 96 hours, almost no further atenolol is removed in planted beds while it continues to be removed in unplanted LECA beds until the end of the assays. However, the amounts of atenolol removed in the planted beds at 96 hours are higher than those removed in the unplanted LECA beds at 192 hours (see Figure 3).

The kinetic behaviour observed for the sorption process occurring in the unplanted LECA beds has similarities with that observed for other compounds sorbed on the same material, namely other PhACs such as clofibric acid, ibuprofen and carbamazepine [23,24]. After the first step of 6 hours, the process has been observed, in the period of 6 to 96 hours, to follow a first-order kinetics which fits the equation

$$\ln[\text{atenolol}](t) = -1.23 - 0.0077 \text{ h}^{-1}t \quad R^2 = 0.994 \quad (1)$$

In first-order kinetics the half-lives of the consumed species are independent of their initial concentrations for a given removal rate constant. For this process, therefore, a similar profile should be followed by the time evolution profile of relative concentrations removed ($[\text{PhAC}]_t/[\text{PhAC}]_0$) for all the initial concentrations of the compound.

Considering the profile of the atenolol removal kinetics, very little advantage can be obtained in terms of percent removal by extending beyond 96 hours the retention time of the atenolol spiked wastewater in the planted systems.

3.2.3 Atenolol removal efficiency by the SSFCW microcosms

Within the period up to 96 hours, as much as 93% and 95% of atenolol were removed by the *Phragmites* systems and the *Typha* systems, respectively. A decrease in atenolol concentration is also observed (Table 5) in the wastewater only, not submitted to any treatment, which may be indicative of the atenolol biodegradability by the microorganisms

Table 5. Removal efficiencies ± 1 SD ($n=3$) of atenolol in SSFCW microcosm assays as well as in the unplanted LECA beds and in the wastewater only, after 96 h of retention time.

System	Atenolol removed (%)
Wastewater only	14.3 \pm 1.2
Unplanted LECA beds	82.0 \pm 1.5
<i>Phragmites</i> planted beds	92.5 \pm 0.6
<i>Typha</i> planted beds	94.5 \pm 1.1

present in the wastewater. As can be observed, the biodegradability of atenolol is rather low, as has already been reported in other studies [1,4,6].

For the same period of 96 hours, the unplanted LECA beds were able to achieve high removal efficiencies (82%, Table 5) that are indicative of the strong sorption capacity of this material towards atenolol. The good sorbent characteristics of LECA have already been reported for other pharmaceuticals such as the acidic compounds clofibric acid and ibuprofen as well as the neutral carbamazepine for which the sorption by LECA is also high [24]. Electrostatic interactions for the case of the acidic pharmaceuticals and van der Waals interactions for the case of the neutral compounds have been hypothesised as being responsible for the affinities of these compounds towards LECA's surface. However, considering that both LECA and atenolol have alkaline nature and both are positively charged at working pH conditions (pH ~ 8) the influence of electrostatic interactions does not explain the strong sorption of atenolol onto LECA. Probably, for this compound, ion exchange phenomena may be responsible to some extent for the efficiency of atenolol removal by LECA. This mechanism is known to be responsible for the removal into clay materials of other charged organic compounds such as some pesticides [37–39].

Enhanced efficiency is achieved by the planted LECA beds in comparison with that observed for the unplanted beds (Table 5). Even though most atenolol is retained at the solid matrix, the presence of the plants, either *Typha* or *Phragmites*, contributes with additional 12–14% efficiency in comparison with that due to the LECA material alone. This contribution by the plants is consistent with the contributions reported by other authors [14]. In addition to other benefits for the SSFCW system operation which derive from the presence of plants [14,25,27], these results demonstrate the equally important and active role played by the vegetation in the removal of atenolol, which enables the performance of planted systems to surpass that of a simpler LECA filter setup.

The comparison between the performance attained with *Phragmites* and *Typha* planted beds seems to suggest that the latter species is somewhat more efficient than the former one. However, it should be noted that although both *Typha* and *Phragmites* plants were planted in the beds at the same time, it was observed (by visual inspection) that during the acclimation period aerial parts of *Typha* were slightly more grown than were those of *Phragmites*. Also, probably due to a more developed aerial part, the transpiration rate of *Typha* was higher than for *Phragmites* (data not shown) which may have contributed to the slightly higher efficiency of the *Typha*.

The overall performance of these SSFCW systems, either planted with *Typha* or *Phragmites*, is largely superior to that reported for atenolol removal by the conventional processes used in WWTP [1,3,4]. This type of system is being increasingly used as an alternative form of tertiary treatment stage in WWTPs and the present results suggest that it may be an efficient and cost-effective solution to deal with contamination of wastewaters by pharmaceuticals.

4. Conclusion

In the present study, two types of LECA-based SSFCW microcosm planted with two different macrophyte species, *Typha* and *Phragmites*, were tested for their atenolol removal capabilities from wastewaters. The study provides an assessment of the potential of these systems to deal with pharmaceutical contamination.

A chromatographic method of analysis was established to measure atenolol in wastewater. Combined with an efficient SPE concentration step, the use of the widely available and inexpensive DAD detector yielded an analytical method with very low LOQ (9 ng mL^{-1}) and high reproducibility ($\text{RSD} < 4\%$).

The material LECA, used as solid matrix in the tested microcosms, was responsible for most of atenolol removal from the wastewater, but both plant species used did contribute with an additional 12–14% to the overall removal by the planted systems. In addition, plants significantly increased the rate of atenolol removal, which enables retention time of the wastewater in the planted beds to be reduced to 96 hours in comparison to the much longer times needed to attain the same efficiency in a LECA filter bed. Although *Typha* presented a slightly higher efficiency than *Phragmites*, this may be related to the more advanced stage of development of the former species at the beginning of the assays.

Further tests are still required for assessing the impact on performance caused by more realistic conditions such as the removal during a longer time period with several cycles of loading in a microcosm wetland. Differences in changing from a discontinuous feed (batch mode), such as is used in this work, over to a continuous mode of feed and also a possible decrease in performance when going to a full scale wetland should also be evaluated. Nevertheless, the studied microcosms showed the high efficiency of these systems in removing atenolol and possibly other similar organic compounds from wastewaters and suggest that larger scale SSFCW systems may be efficient and cost-effective alternatives to other high-cost technologies, such as ozonisation or membrane bioreactors, to be used as a tertiary treatment stage.

Another aspect requiring further research is the potential risk of toxicity for the aquatic ecosystems by the residual concentrations still present in the effluents of the planted or the unplanted beds, after the treatment. In fact, even if large percentage removals are attained that does not ensure non toxic levels of the pharmaceuticals in the treated effluent.

References

- [1] K. Fent, A.A. Weston, and D. Caminada, *Aquat. Toxicol.* **76**, 122 (2006).
- [2] C.G. Daughton and T.A. Ternes, *Environ. Health Perspect.* **107**, 907 (1999).
- [3] M.D. Hernando, M.J. Gómez, A. Agüera, and A.R. Fernández-Alba, *Trac-Trends Anal. Chem.* **26**, 581 (2007).
- [4] A. Nikolaou, S. Meric, and D. Fatta, *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 1225 (2007).
- [5] M. Gros, M. Petrovic, and D. Barceló, *Talanta* **70**, 678 (2006).
- [6] M. Maurer, B.I. Escher, P. Richle, C. Schaffner, and A.C. Alder, *Water Res.* **41**, 1614 (2007).
- [7] P.M. Palmer, L.R. Wilson, P. O'Keefe, R. Sheridan, T. King, and C.Y. Chen, *Sci. Total Environ.* **394**, 90 (2008).
- [8] S.A. Snyder, *Ozone: Science & Engineering* **30**, 65 (2008).
- [9] S.D. Kim, J. Cho, I.S. Kim, B.J. Vanderford, and S.A. Snyder, *Water Res.* **41**, 1013 (2007).
- [10] S. Esplugas, D.M. Bila, L.G. Krause, and M. Dezotti, *J. Hazard. Mater.* **149**, 631 (2007).
- [11] S.A. Snyder, S. Adham, A.M. Redding, F.S. Cannon, J. DeCarolis, J. Oppenheimer, E.C. Wert, and Y. Yoon, *Desalination* **202**, 156 (2007).
- [12] J. Benner, E. Salhi, T. Ternes, and U. von Gunten, *Water Res.* **42**, 3003 (2008).
- [13] J. Radjenovic, M. Petrovic, and D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 1365 (2007).
- [14] J. Vymazal, H. Brix, P.F. Cooper, M.B. Green, and R. Haberl, *Constructed Wetlands for Wastewater Treatment in Europe* (Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, 1998).

- [15] J.B. Williams, *Crit. Rev. Plant Sci.* **21**, 607 (2002).
- [16] R. Haberl, S. Grego, G. Langergraber, R.H. Kadlec, A.R. Cicalini, S. Martins-Dias, J.M. Novais, S. Aubert, A. Gerth, H. Thomas, and A. Hebner, *J. Soil Sediment* **3**, 109 (2003).
- [17] J.K. Grove and O.R. Stein, *Water Res.* **39**, 4040 (2005).
- [18] B. Gross, J. Montgomery-Brown, A. Naumann, and M. Reinhard, *Environ. Toxicol. Chem.* **23**, 2074 (2004).
- [19] V. Matamoros, J. García, and J.M. Bayona, *Environ. Sci. Technol.* **39**, 5449 (2005).
- [20] V. Matamoros, J. Puigagut, J. García, and J.M. Bayona, *Chemosphere* **69**, 1374 (2007).
- [21] V. Matamoros, A. Caselles-Osorio, J. García, and J.M. Bayona, *Sci. Total Environ.* **394**, 171 (2008).
- [22] V. Matamoros, J. García, and J.M. Bayona, *Water Res.* **42**, 653 (2008).
- [23] A.V. Dordio, J. Teimão, I. Ramalho, A.J.P. Carvalho, and A.J.E. Candeias, *Sci. Total Environ.* **380**, 237 (2007).
- [24] A.V. Dordio, A.J.E. Candeias, A.P. Pinto, C.T. Costa, and A.J.P. Carvalho, *Ecol. Eng.* **35**, 290 (2009).
- [25] H. Brix, *Water Sci. Technol.* **35**, 11 (1997).
- [26] C. Turgut, *Chemosphere* **66**, 469 (2007).
- [27] P.F. Cooper, G.D. Job, M.B. Green, and R.B.E. Shutes, *Reed Beds and Constructed Wetlands for Wastewater Treatment* (WRc Publications, Medmenham, Marlow, UK, 1996).
- [28] P.R. Day, in *Methods of Soil Analysis*, edited by C.A. Black, D.D. Evans, L.E. Ensminger, J.L. White, and F.E. Clark (American Society of Agronomy, Madison, WI, USA, 1965), pp. 545–567.
- [29] H. Brix, C.A. Arias, and M. del Bubba, *Water Sci. Technol.* **44**, 47 (2001).
- [30] M. del Bubba, C.A. Arias, and H. Brix, *Water Res.* **37**, 3390 (2003).
- [31] E. Fediuc and L. Erdei, *J. Plant Physiol.* **159**, 265 (2002).
- [32] L.S. Clescerl, A.E. Greenberg, and A.D. Eaton, editors, *Standard Methods for the Examination of Water, and Wastewater*, 20th ed. (American Public Health Association, Washington, DC, USA, 1998).
- [33] J.N. Miller and J.C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4th ed (Prentice Hall, Harlow, UK, 2000).
- [34] N.M. Vieno, T. Tuhkanen, and L. Kronberg, *J. Chromatogr. A* **1134**, 101 (2006).
- [35] T.A. Ternes, *Trac-Trends Anal. Chem.* **20**, 419 (2001).
- [36] M.J. Gómez, M. Petrovic, A.R. Fernández-Alba, and D. Barceló, *J. Chromatogr. A* **1114**, 224 (2006).
- [37] H. Li, G.Y. Sheng, B.J. Teppen, C.T. Johnston, and S.A. Boyd, *Soil Sci. Soc. Am. J.* **67**, 122 (2003).
- [38] H. Li, B.J. Teppen, D.A. Laird, C.T. Johnston, and S.A. Boyd, *Soil Sci. Soc. Am. J.* **70**, 1889 (2006).
- [39] I. Pavlovic, C. Barriga, M.C. Hermosin, J. Cornejo, and M.A. Ulibarri, *Appl. Clay Sci.* **30**, 125 (2005).



REMOVAL OF THE β -BLOCKER ATENOLOL FROM WATERS USING A LECA BED PLANTED WITH *PHRAGMITES AUSTRALIS*



Alfredo Carvalho^{1,3}; Ana Dordio¹; Cristina Teixeira da Costa^{1,3}; Dora Teixeira^{1,2}; José Pinto¹

¹ Department of Chemistry; ² Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas; ³ Centro de Química de Évora, University of Évora, Rua Romão Ramalho 59, 7000-671 Évora, Portugal.

Introduction

In the modern society, an ever-increasing number of pharmaceutical active compounds (PhAC) is used for the treatment and prevention of various diseases. Ingested drugs are only partially absorbed by the organisms and studies have shown that the excreted compounds are only partially removed in the sewage treatment plants (STP) [1]. β -Blockers are used in treatment of high blood pressure (hypertension) as well as in patients recovering from heart attacks, in several studies they were detected in surface water thus indicating a wide distribution of these substances in STP. Despite the low concentrations detected (ng/L - μ g/L) these studies have shown damaging effects of these compounds on the aquatic ecosystems [2].

Subsurface flow constructed wetlands systems (SSFW) are low cost wastewater treatment systems usually used to remove a form of secondary or tertiary treatment for wastewater. Detention in SSFW is derived by the concerted action between plant rhizomes, macroorganisms and the support matrix components. SSFW efficiency can be significantly improved by optimization of the operation conditions which is achieved by careful selection of the support matrix, plants and macroorganisms used.

The aim of the present work was to evaluate the efficiency of a sub-macrocosm using light expanded clay aggregates (LECA) as the substrate and planted with *Phragmites australis* plants, to remove atenolol from contaminated water. The wastewater samples were collected from a STP located in a small village of Alentejo (Portugal). Assays were performed using wastewater spiked with atenolol to evaluate both the capacity of plants and the removal rates at concentrations near environmental levels. Different sample preparation methods were tested. Using several SPE columns, the quantification of atenolol was achieved using HPLC-DAD with a reversed phase column and for concentrations below quantification limit of HPLC-DAD, APIClon Trap LC-MS-MS in the positive mode was used [3,4].

Atenolol Properties

Characteristic	Atenolol
EMFAC name	2-[[2-(4-chlorophenyl)ethyl]amino]ethanol propylmethanesulfonate (3-[[2-(4-chlorophenyl)ethyl]amino]propylmethanesulfonate)
CAS number	25534-02-8
Pharmacological action	Cardiovascular (beta-blockers) Hypertension treatment
Structure	<chem>CN(CCCS(=O)(=O)C)CCOC1=CC=C(Cl)C=C1</chem>
Water-soluble form	Yes
Water-soluble salt	Yes
Water-soluble form pKa	9.6
Water-soluble form pKb	3.80
log P (owt)	3.11

Support matrix

Light Expanded Clay Aggregates (LECA) are light weight aggregates manufactured by mixing selected clay aggregates through rotary kilns at 1200°C producing spheres (100 - 400 μ m ϕ) ceramic pellets. Supplied by M&G Group (Portugal).

Phragmites australis

Experimental

Atenolol quantification

- SPE method optimization**
 - Sample dissolved through DMSO in PHE as extraction solvent.
 - 100 μ L of eluent, 100 μ L of water, 25 μ L of 10% trifluoroacetic acid were used to remove the atenolol from the cartridge.
 - 100 μ L of water was used to wash the cartridge.
 - 100 μ L of 10% trifluoroacetic acid in water was used to wash the cartridge.
 - 100 μ L of 10% trifluoroacetic acid in water was used to wash the cartridge.
 - 100 μ L of 10% trifluoroacetic acid in water was used to wash the cartridge.
- HPLC-DAD analysis**
 - Agilent 1100 HPLC system with diode array detector (DAD) and UV-Vis detector.
 - Column: Synergi B-Basic, 150 \times 4.6 mm, 5 μ m, 150 \times 4.6 mm, 5 μ m.
 - Mobile phase: 10% trifluoroacetic acid in water with 5% acetonitrile.
 - Flow rate: 0.2 mL/min.
 - Detection: 220 nm.
 - Injection volume: 20 μ L.
 - Flow rate: 1.0 mL/min.
 - Injection volume: 20 μ L.
- LC-MS-MS analysis**
 - Agilent 1100 HPLC system with diode array detector (DAD) and UV-Vis detector.
 - Column: Synergi B-Basic, 150 \times 4.6 mm, 5 μ m, 150 \times 4.6 mm, 5 μ m.
 - Mobile phase: 10% trifluoroacetic acid in water with 5% acetonitrile.
 - Flow rate: 0.2 mL/min.
 - Detection: 220 nm.
 - Injection volume: 20 μ L.
 - Flow rate: 1.0 mL/min.
 - Injection volume: 20 μ L.

Results and discussion

Atenolol quantification

Method	R ²	LOD (μ g/L)	LOQ (μ g/L)
HPLC-DAD	0.990	242.4	808.1
LC-MS-MS	0.995	0.78	1.4

Adjustment of pH to high values (pH = 12) shows clear improvement in recoveries in all columns using the most appropriate pH conditions, an additional wash step with less of water gives a further improvement in performance. Energy conditions used, better recoveries were obtained with the Merck Lichrolut C18 columns.

Efficiency of atenolol removal

Figure 1 - Removal of atenolol over the planted and unplanted beds over time in the wastewater data.

SPE Method Optimization

Figure 2 - Influence of pH adjustment on recoveries by the different SPE columns (at pH 12).

Figure 3 - Influence of the wash step recovery by the different SPE columns (at pH 12).

High recoveries of atenolol (> 95%) are obtained with C18 coated with Phragmites rhizomes. The LECA substrate alone is responsible for much of atenolol removal by sorption, but the plants do give an additional contribution. In an initial step, most of atenolol is removed within the first 24 hours, followed by a slower stage where further stable removal occurs over a longer period (up to 70h). Given high removal of atenolol observed in the wastewater data (> 10%), but the removal does not show significant increase over time.

CW microcosms description

- Microcosms constructed using selected plant species and support matrix:
 - 3 x planted bed
 - 2 x unplanted bed
 - 2 x substrate only
- Support matrix: Phragmites (planted) and Merck Lichrolut C18.
- Support matrix: Phragmites (planted) and Merck Lichrolut C18.
- Support matrix: Phragmites (planted) and Merck Lichrolut C18.
- Support matrix: Phragmites (planted) and Merck Lichrolut C18.
- Support matrix: Phragmites (planted) and Merck Lichrolut C18.
- Support matrix: Phragmites (planted) and Merck Lichrolut C18.
- Support matrix: Phragmites (planted) and Merck Lichrolut C18.
- Support matrix: Phragmites (planted) and Merck Lichrolut C18.
- Support matrix: Phragmites (planted) and Merck Lichrolut C18.
- Support matrix: Phragmites (planted) and Merck Lichrolut C18.

Conclusion

- The optimal conditions in SPE sample preparation were achieved using a Merck Lichrolut C18 column, with sample pH adjustment of 12 and with a wash step prior to the final elution.
- The microcosms assays show that constructed wetlands may have high removal performances for pharmaceuticals such as atenolol.
- The overall efficiency of the system is higher than any of its individual components considered separately.
- Constructed wetlands should be considered as a potential solution for pharmaceutical removal from wastewaters.

References

- Lee J., Wailes J. M., and Cantowell C. Aquatic toxicology 75 (2): 176-209.
- Prasad M., Ecker M., Röhre F., Schulze C., and Nöbel A.C., Water Research 43 (14): 422-2009.
- Costa M., Almeida M., and Pinto J. O. Talanta 52(4): 99-104.
- Almeida M., Costa M., Pinto J. O., and Pinto J. O. Talanta 52(4): 99-104.

Carvalho, A.; Dordio, A.; Costa, C.T.; Teixeira, D.; Pinto, J. (2008). "Removal of the β -blocker atenolol from waters using a LECA bed planted with *Phragmites australis*." Comunicação em poster. 35th International Symposium on Environmental Analytical Chemistry, 22-26 Junho, Gdańsk, Polónia.

Anexo 2 - Rectas de calibração do padrão atenolol

- Valores baixos

Tabela A 1 – Valores de área do pico obtidos por injeção em HPLC-DAD para o traçado da recta de calibração para valores baixos do padrão atenolol.

Concentração (mgL ⁻¹)	Área do pico (mAU x min)							
	0,20	0,25	0,50	0,75	1,00	2,00	3,00	5,00
Réplica 1	6,40	8,99	10,96	20,11	28,64	76,37	108,60	196,25
	6,10	9,02	11,93	20,14	29,68	77,63	109,19	195,74
	5,51	8,96	12,24	18,80	29,59	75,99	109,62	197,66
Réplica 2	6,00	8,79	11,50	19,67	27,69	75,74	113,66	190,71
	6,01	8,89	10,36	19,75	26,86	74,66	113,78	198,48
	6,32	9,20	10,54	19,94	25,92	75,62	113,06	197,02
Réplica 3	6,08	9,01	12,45	19,19	28,40	75,42	113,65	196,22
	6,05	8,93	12,50	19,80	29,54	74,63	114,53	196,67
	6,03	9,09	12,49	19,68	29,30	75,74	114,38	197,21
Média	6,06	8,99	11,66	19,68	28,40	75,76	112,27	196,22

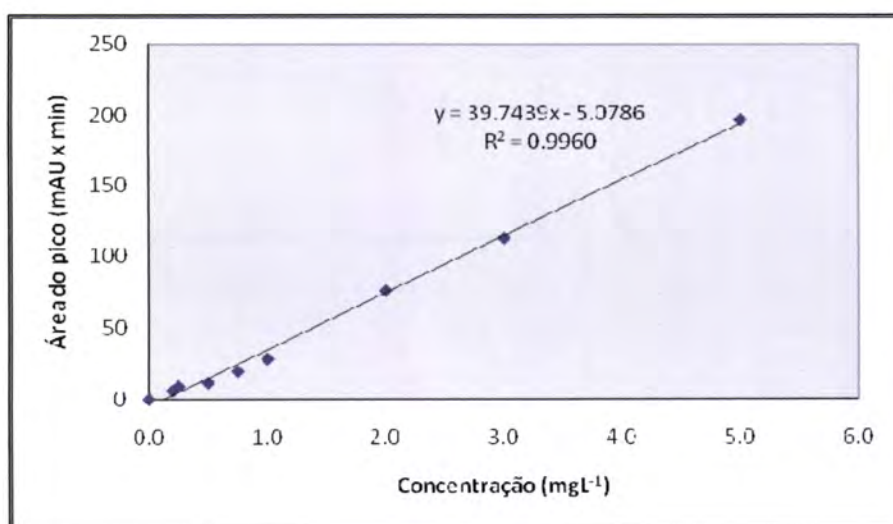


Figura A 1 - Recta de calibração para valores baixos do padrão atenolol e utilizada nas análises HPLC-DAD.

Tabela A 2 – Análise de regressão para a recta de calibração para valores baixos do padrão atenolol utilizada nas análises HPLC-DAD.

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,9980
Quadrado de R	0,9960
Quadrado de R ajustado	0,9954
Erro-padrão	0,1122
Observações	9

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	21,9058	21,9058	1741,5844	1,1832E-09
Residual	7	0,0880	0,0126		
Total	8	21,9939			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95 % inferior</i>	<i>95 % superior</i>	<i>Inferior 95,0 %</i>	<i>Superior 95,0 %</i>
Interceptar	0,1329	0,0483	2,7504	0,0285	0,0186	0,2472	0,0186	0,2472
Variável X 1	0,0251	0,0006	41,7323	1,1832E-09	0,0236	0,0265	0,0236	0,0265

Tabela A 3 – Valores de área do pico obtidos por injeção em HPLC-UV para o traçado da recta de calibração para valores baixos do padrão atenolol.

Concentração (mgL⁻¹)	Área do pico (mAU x min)							
	0,20	0,25	0,50	0,75	1,00	2,00	3,00	5,00
Réplica 1	46334	46819	86941	115533	145191	280915	416690	686353
	45735	50722	89224	114063	148660	280767	416800	688780
	44376	50047	86733	113958	147195	280632	415159	689909
Réplica 2	43811	49161	89299	113446	149592	281310	416386	678907
	43309	47760	86619	113853	150107	281675	413666	684414
	43774	48008	89554	114828	149423	282387	414376	682438
Réplica 3	44879	48889	87993	113985	148923	280564	415643	685321
	44321	48334	86332	115922	148123	281009	415987	685885
	44890	49554	86093	114745	149003	281047	415217	685600
Média	44713,00	48901,80	87763,20	114170,60	148149,00	281059,80	415740,20	685672,60

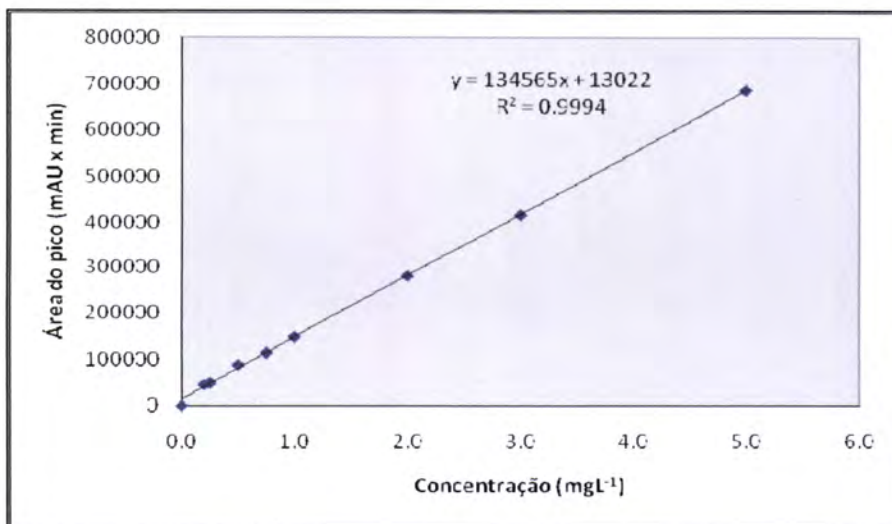


Figura A 2 – Recta de calibração para valores baixos do padrão atenolol e utilizada nas análises HPLC-UV.

Tabela A 4 – Análise de regressão para a recta de calibração para valores baixos do padrão atenolol utilizada nas análises HPLC-UV.

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,9997
Quadrado de R	0,9994
Quadrado de R ajustado	0,9993
Erro-padrão	6042,5743
Observações	9

ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	3,9826E+11	3,9826E+11	10907,3745	1,9449E-12
Residual	7	255588932,3688	36512704,6241		
Total	8	3,9851E+11			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95 % inferior	95 % superior	Inferior 95,0 %	Superior 95,0 %
Interceptar	13022,0772	2713,4249	4,7991	0,0020	6605,8470	19438,3075	6605,8470	19438,3075
Variável X 1	134564,6854	1288,4601	104,4384	1,9449E-12	131517,9613	137611,4095	131517,9613	137611,4095

- **Valores altos**

Tabela A 5 – Valores de área do pico obtidos por injeção em HPLC-DAD para o traçado da recta de calibração para valores altos do padrão atenolol.

Concentração (mgL ⁻¹)	Área do pico (mAU x min)							
	0,20	0,50	1,00	5,00	10,00	20,00	40,00	60,00
Réplica 1	49,32	58,74	66,55	196,25	323,31	695,58	1337,34	1749,19
	41,39	68,19	78,97	199,74	345,98	733,60	1452,84	1953,96
	36,12	42,22	71,97	192,66	350,99	688,50	1344,06	1940,45
Réplica 2	35,84	44,63	53,86	206,17	350,86	662,87	1253,84	1796,55
	42,65	28,63	100,08	190,71	343,94	627,86	1249,09	2002,54
	36,54	43,09	63,89	211,95	370,43	676,45	1299,04	2071,43
Réplica 3	51,79	59,30	88,17	198,48	409,92	654,97	1302,45	1852,79
	52,20	60,72	82,61	197,02	372,69	720,66	1381,11	1950,40
	48,08	60,84	58,45	223,01	418,89	702,24	1217,88	1911,58
Média	43,77	51,82	73,84	201,78	365,22	684,75	1315,29	1914,32

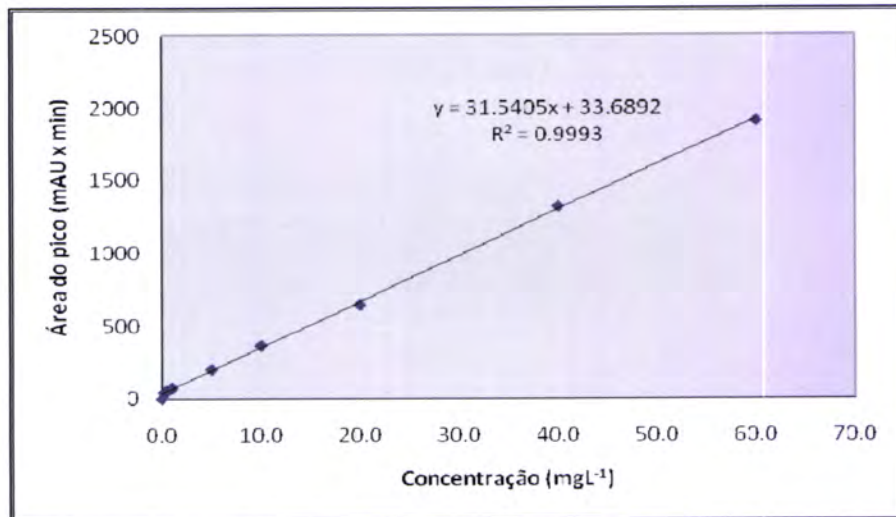


Figura A 3 – Recta de calibração para valores altos do padrão atenolol e utilizada nas análises HPLC-DAD.

Tabela A 6 – Análise de regressão para a recta de calibração para valores altos do padrão atenolol utilizada nas análises HPLC-DAD.

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,9997
Quadrado de R	0,9993
Quadrado de R ajustado	0,9993
Erro-padrão	18,4521
Observações	9

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	3631002,2601	3631002,2601	10664,3901	2,1043E-12
Residual	7	2383,3539	340,4791		
Total	8	3633385,6140			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95 % inferior</i>	<i>95 % superior</i>	<i>Inferior 95,0 %</i>	<i>Superior 95,0 %</i>
Interceptar	33,6892	7,7040	4,3729	0,0033	15,4721	51,9062	15,4721	51,9062
Variável X 1	31,5405	0,3054	103,2685	2,1043E-12	30,8183	32,2627	30,8183	32,2627

Tabela A 7 – Valores de área do pico obtidos por injeção em HPLC-UV para o traçado da recta de calibração para valores altos do padrão atenolol.

Concentração (mgL⁻¹)	Área do pico (MAU x min)							
	0,20	0,50	1,00	5,00	10,00	20,00	40,00	60,00
Réplica 1	46819	86215	150340	648333	1298612	2283339	4483339	6570638
	50722	85691	149254	646816	1304752	2268516	4468516	6577772
	50047	87357	147641	648436	1309238	2278880	4478880	6545752
Réplica 2	49161	84918	148406	647969	1303992	2280135	4480135	6610496
	47760	85588	150164	646054	1299653	2275962	4475962	6564066
	47998	86941	145191	686353	1305392	2285529	4486874	6573188
Réplica 3	49194	89224	148660	688780	1303128	2268740	4493275	6562280
	49002	86733	147195	689909	1307754	2274415	4482109	6611176
	49100	89299	149592	678907	1298799	2283287	4499992	6569899
Média	48901,80	86858,50	148655,00	666597,10	1303249,40	2277366,40	4485340,00	6573744,80

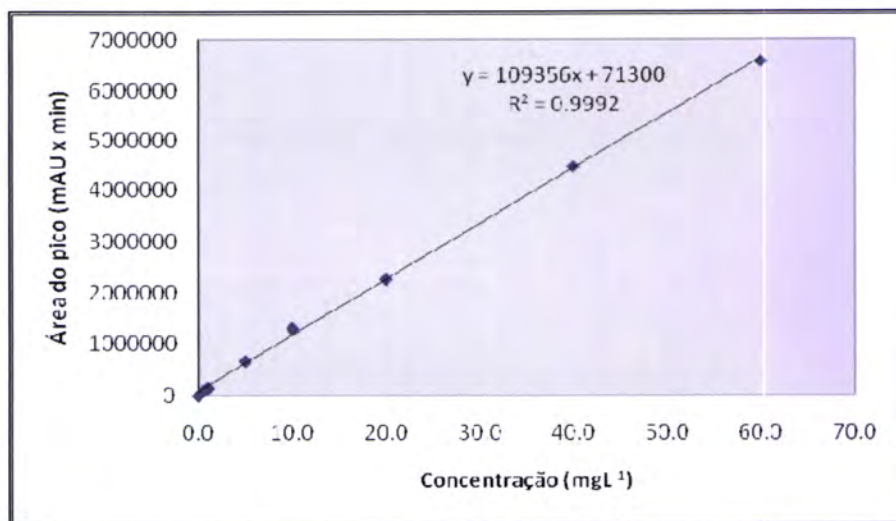


Figura A4 – Recta de calibração para valores altos do padrão atenolol e utilizada nas análises HPLC-UV.

Tabela A 8 – Análise de regressão para a recta de calibração para valores baixos do padrão atenolol utilizada nas análises HPLC-UV.

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,9996
Quadrado de R	0,9992
Quadrado de R ajustado	0,9990
Erro-padrão	72227,2309
Observações	9

ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	4,3649E+13	4,3649E+13	8367,1088	4,9162E-12
Residual	7	36517410189,6021	5216772884,2289		
Total	8	4,3686E+13			

	Coeficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95 % inferior	95 % superior	Inferior 95,0 %	Superior 95,0 %
Interceptar	71299,6731	30155,8655	2,3644	0,0500	-7,6178	142606,9641	-7,6178	142606,9641
Variável X 1	109356,3712	1195,5187	91,4719	4,9162E-12	106529,419	112183,3238	106529,4186	112183,3238

Anexo 3 - Estudos de otimização de SPE

- Método 1 – pH 12 e sem passo de lavagem

Tabela A 9 – Método 1, Coluna Oasis® HLB.

Réplicas	Áreas (mAUxmin)	Concentração de atenolol (mgL ⁻¹)	Recuperação (%)
1	55,4049	1,5604	62,4144
	55,2267	1,5558	62,2324
	58,0127	1,6269	65,0767
Média 1	56,2147	1,5810	65,0767
2	74,2598	2,0416	81,6639
	85,6511	2,3323	93,2936
	71,3571	1,9675	78,7004
Média 2	77,0893	2,1138	78,7004
3	71,3901	1,9684	78,7342
	68,4313	1,8928	75,7134
	72,0916	1,9863	79,4504
Média 3	70,6377	1,9491	77,9660
Média final	67,7390	1,8752	73,9144
Desvio-padrão	10,6879	0,2728	7,6624

Tabela A 10 – Método 1, Coluna Merck® Lichrolut RP-18.

Réplicas	Áreas (mAUxmin)	Concentração de atenolol (mgL ⁻¹)	Recuperação (%)
1	63,5522	1,7683	70,7322
	59,3632	1,6614	66,4555
	65,7832	1,8252	73,0099
Média 1	62,8995	1,7516	70,0659
2	66,6056	1,8462	73,8496
	61,9471	1,7273	69,0935
	62,5206	1,7420	69,6791
Média 2	63,9132	1,7775	71,1008
3	78,8749	2,1594	86,3756
	79,1468	2,1663	86,6532
	80,5286	2,2016	88,0639
Média 3	79,5168	2,1758	87,0309
Média final	67,4762	1,8685	70,5833
Desvio-padrão	9,3151	0,2378	0,7318

Anexos

Tabela A 11 – Método 1, Coluna Waters® Sep Pack Vac.

Réplicas	Áreas (mAUxmin)	Concentração de atenolol (mgL ⁻¹)	Recuperação (%)
1	65,1603	1,8093	72,3739
	61,9829	1,7283	69,1301
	65,4982	1,8180	72,7189
Média 1	64,2138	1,7852	71,4076
2	65,3595	1,8144	72,5774
	63,0892	1,7565	70,2595
	64,7349	1,7985	71,9397
Média 2	64,3945	1,7898	71,5922
3	83,7662	2,2842	91,3693
	81,5562	2,2278	89,1130
	88,3592	2,4015	96,0584
Média 3	84,5606	2,3045	92,1802
Média final	69,8286	1,9285	71,4999
Desvio-padrão	0,1278	0,0033	0,1305

Tabela A 12 – ANOVA, Método 1.

Anova: factor único

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna OASIS® HLB	3	221,7432	73,9144	58,7131
Coluna Merck® LiChrolut RP-18	2	141,1666	70,5833	0,5355
Coluna Waters® Sep Pack Vac	2	142,9998	71,4999	0,0170

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	14,9879	2	7,4940	0,2541	0,7873	6,9443
Dentro de grupos	117,9787	4	29,4947			
Total	132,9666	6				

- **Método 2 – pH não ajustado e sem passo de lavagem**

Tabela A 13 – Método 2, Coluna Oasis® HLB.

Réplicas	Áreas (mAUxmin)	Concentração de atenolol (mgL ⁻¹)	Recuperação (%)
1	55,1832	1,5590	63,4727
	57,2791	1,6127	65,6609
	58,3417	1,6400	66,7703
	56,3002	1,5876	64,6388
Média 1	56,7761	1,5998	65,1357
2	56,0291	1,5807	64,3558
	56,3299	1,5884	64,6699
	57,2856	1,6129	65,6677
Média 2	56,5482	1,5940	64,8978
3	53,1813	1,5076	61,3825
	56,6699	1,5971	65,0248
	54,5508	1,5427	62,8123
Média 3	54,8006	1,5491	63,0732
Média final	56,0416	1,5829	64,3689
Desvio-padrão	1,0808	0,0382	1,1284

Tabela A 14 – Método 2, Coluna Merck® Lichrolut RP-18.

Réplicas	Áreas (mAUxmin)	Concentração de atenolol (mgL ⁻¹)	Recuperação (%)
1	76,4779	2,1050	85,7059
	77,2466	2,1247	86,5084
	80,5645	2,2098	89,9726
Média 1	78,0964	2,1465	86,1072
2	55,8195	1,5753	64,1370
	60,0609	1,6840	68,5653
	65,7887	1,8309	74,5456
Média 2	60,5564	1,6967	71,5555
3	55,4439	1,5656	63,7448
	64,6533	1,8018	73,3601
	66,2937	1,8439	75,0728
Média 3	62,1303	1,7371	74,2164
Média final	66,9277	1,8601	72,8859
Desvio-padrão	9,7043	0,2489	1,8816

Anexos

Tabela A 15 – Método 2, Coluna Waters® Sep Pack.

Réplicas	Áreas (mAUxmin)	Concentração de atenolol (mgL ⁻¹)	Recuperação (%)
1	58,5306	1,6448	66,9676
	60,2091	1,6878	68,7200
	59,3511	1,6658	67,8242
Média 1	59,3636	1,6662	67,8373
2	59,3857	1,6667	67,8604
	58,5073	1,6442	66,9432
	59,9245	1,6805	68,4229
Média 2	59,2725	1,6638	67,6830
3	62,0024	1,7338	70,5923
	60,8397	1,7040	69,3784
	59,5003	1,6697	67,9800
Média 3	60,7808	1,7025	69,3169
Média final	59,8056	1,6775	68,2791
Desvio-padrão	0,8457	0,0217	0,9021

Tabela A 16 – ANOVA, Método 2.

Anova: factor único

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna OASIS® HLB	3	193,1066	64,3689	1,2733
Coluna Merck® LiChrolut RP-18	2	145,7719	72,8859	3,5404
Coluna Waters® Sep Pack Vac	3	204,8372	68,2791	0,8138

ANOVA

Fonte de variação	SQ	Gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	87,5236	2	43,7618	28,3633	0,0019	5,7861
Dentro de grupos	7,7145	5	1,5429			
Total	95,2381	7				

- **Método 3 – pH 12 e com passo de lavagem**

Tabela A 17 – Método 3, Coluna Oasis® HLB.

Réplicas	Áreas (mAUxmin)	Concentração de atenolol (mgL ⁻¹)	Recuperação (%)
1	65,3798	1,8150	72,5980
	68,4205	1,8926	75,7024
	67,5345	1,8699	74,7979
Média 1	67,1116	1,8592	74,3661
2	63,1696	1,7585	70,3416
	75,7792	2,0804	83,2151
	69,8385	1,9288	77,1501
Média 2	69,5957	1,9226	80,1826
3	77,6508	2,1281	85,1258
	83,2312	2,2706	90,8231
	85,8502	2,3374	93,4969
Média 3	82,2441	2,2454	89,8153
Média final	72,1420	1,9875	81,4546
Desvio-padrão	8,1152	0,2071	7,8027

Tabela A 18 – Método 3, Coluna Merck® Lichrolut RP-18.

Réplicas	Áreas (mAUxmin)	Concentração de atenolol (mgL ⁻¹)	Recuperação (%)
1	70,8508	1,9546	78,1836
	78,2374	2,1431	85,7248
	79,7793	2,1825	87,2990
Média 1	76,2892	2,0934	86,5119
2	69,3979	1,9175	76,7002
	74,8904	2,0577	82,3077
	78,5679	2,1516	86,0622
Média 2	74,2854	2,0423	84,1850
3	91,5193	2,4821	99,2846
	99,4463	2,6844	107,3775
	92,6016	2,5097	100,3896
Média 3	94,5224	2,5588	99,8371
Média final	80,5332	2,2017	90,1780
Desvio-padrão	11,1505	0,2846	8,4456

Anexos

Tabela A 19 – Método 3, Coluna Waters® Sep Pack Vac.

Réplicas	Áreas (mAUxmin)	Concentração de atenolol (mgL ⁻¹)	Recuperação (%)
1	67,1358	1,8598	74,3908
	67,4734	1,8684	74,7354
	66,9205	1,8543	74,1710
Média 1	67,1765	1,8608	74,4324
2	70,1489	1,9367	77,4670
	71,9478	1,9826	79,3035
	73,0892	2,0117	80,4688
Média 2	71,7287	1,9770	79,0798
3	74,1467	2,0387	81,5484
	74,6127	2,0506	82,0242
	79,8579	2,1845	87,3792
Média 3	76,2058	2,0913	83,6506
Média final	71,2944	1,9659	79,0543
Desvio-padrão	4,5147	0,1152	4,6092

Tabela A 20 – ANOVA, Método 3.

Anova: factor único

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna OASIS® HLB	3	244,3639	81,4546	60,8828
Coluna Merck® LiChrolut RP-18	3	270,5339	90,1780	71,3277
Coluna Waters® Sep Pack Vac	3	237,1628	79,0543	21,2444

ANOVA

Fonte de variação	SQ	Gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	205,5954	2	102,7977	2,0097	0,2148	5,1433
Dentro de grupos	306,9098	6	51,1516			
Total	512,5052	8				

- **Método 4 – pH não ajustado e com passo de lavagem**

Tabela A 21 – Método 4, Coluna Oasis® HLB.

Réplicas	Áreas (mAUxmin)	Concentração de atenolol (mgL ⁻¹)	Recuperação (%)
1	46,1735	1,3279	50,9975
	40,1839	1,1743	45,0988
	48,1445	1,3785	52,9385
Média 1	44,8340	1,2936	49,6783
2	42,2935	1,2284	54,3456
	36,3887	1,0770	47,6467
	35,4329	1,0525	46,5623
Média 2	38,0384	1,1193	49,5182
3	31,8260	0,9600	42,4704
	44,1399	1,2758	56,4402
	38,1498	1,1222	49,6446
Média 3	38,0386	1,1193	49,5184
Média final	40,3036	1,1774	49,5716
Desvio-padrão	3,9234	0,1006	0,0924

Tabela A 22 – Método 4, Coluna Merck® Lichrolut RP-18.

Réplicas	Áreas (mAUxmin)	Concentração de atenolol (mgL ⁻¹)	Recuperação (%)
1	53,9249	1,5267	67,5411
	52,9969	1,5029	66,4884
	55,2504	1,5607	69,0449
Média 1	54,0574	1,5301	67,6914
2	57,8371	1,6270	71,9795
	50,0205	1,4266	63,1117
	57,0264	1,6062	71,0597
Média 2	54,9613	1,5533	68,7169
3	50,8864	1,4488	64,0940
	55,2513	1,5607	69,0459
	51,9365	1,4757	65,2853
Média 3	52,6914	1,4951	66,1418
Média final	53,9034	1,5261	67,5167
Desvio-padrão	1,1428	0,0293	1,2965

Anexos

Tabela A 23 – Método 4, Coluna Waters® Sep Pack Vac.

Réplicas	Áreas (mAUxmin)	Concentração de atenolol (mgL ⁻¹)	Recuperação (%)
1	54,9529	1,5531	68,7074
	67,0135	1,8623	82,3899
	56,3442	1,5887	70,2858
Média 1	59,4369	1,6680	73,7944
2	50,2837	1,4333	63,4103
	51,9410	1,4758	65,2905
	50,3214	1,4343	63,4531
Média 2	50,8487	1,4478	64,0513
3	51,2935	1,4592	64,5558
	46,3759	1,3331	58,9769
	51,0484	1,4529	64,2778
Média 3	49,5726	1,4151	64,4168
Média final	53,2861	1,5103	67,4208
Desvio-padrão	5,3648	0,1376	5,5227

Tabela A 24 – ANOVA, Método 4.

Anova: factor único

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna OASIS® HLB	3	148,7149	49,5716	0,0085
Coluna Merck® LiChrolut RP-18	3	202,5501	67,5167	1,6808
Coluna Waters® Sep Pack Vac	3	202,5829	67,5276	29,4542

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	644,4444	2	322,2222	31,0391	0,0007	5,1433
Dentro de grupos	62,2871	6	10,3812			
Total	706,7314	8				

Anexo 4 - Validação do método analítico

- Efeito da concentração da amostra

Tabela A 25 – Validação do método analítico – Efeito da concentração da amostra (0,5 µg mL⁻¹).

Réplicas	Áreas (mAUxmin)	Concentração de atenolol (mgL ⁻¹)	Recuperação (%)
1	76321	0,4339	84,6537
	73530	0,4130	86,7770
	74072	0,4171	82,6097
Média 1	74641	0,4213	83,5954
2	72129	0,4026	83,4189
	76898	0,4382	80,5178
	74570	0,4208	87,6385
Média 2	74532	0,4210	83,5487
3	74280	0,4186	84,1625
	74845	0,4229	83,7295
	72053	0,4020	84,5731
Média 3	73726	0,4192	84,2177
Média final	74359,7000	0,4192	83,8485
Desvio-padrão	1561,1490	0,0110	2,3310

Tabela A 26 – Validação do método analítico – Efeito da concentração da amostra (1,5 µg mL⁻¹).

Réplicas	Áreas (mAUxmin)	Concentração de atenolol (mgL ⁻¹)	Recuperação (%)
1	244396	1,6887	84,4333
	245225	1,6948	84,7424
	243133	1,6792	83,9616
Média 1	244287	1,6874	84,6643
2	246218	1,6592	82,9622
	245659	1,6981	84,9046
	240455	1,7023	85,1133
Média 2	244765	1,6843	84,7769
3	242886	1,6554	82,7708
	243056	1,6787	83,9331
	239943	1,6774	83,8696
Média 3	241889	1,6699	83,5533
Média final	244080,9697	1,6815	84,7700
Desvio-padrão	2191,7010	0,0163	1,9300

Tabela A 27 – Validação do método analítico – Efeito da concentração da amostra (2,5 µg mL⁻¹).

Réplicas	Áreas (mAUxmin)	Concentração de atenolol (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
1	295490	2,0701	82,8044
	296853	2,0056	80,2252
	292515	2,0479	81,9160
Média 1	294663	2,0376	81,8874
2	292253	2,0459	81,8377
	296481	2,0775	83,1003
	316424	2,2264	89,0558
Média 2	301559	2,1177	84,4499
3	318057	2,2386	89,5434
	313609	2,2054	88,2151
	317482	2,2343	89,3717
Média 3	315887	2,2176	89,1287
Média final	303240,4444	2,1280	85,5947
Desvio-padrão	12814,6996	0,0957	3,9091

Tabela A 28 – Validação do método analítico – Efeito da concentração da amostra: Comparação entre 0,5 e 1,5 µg mL⁻¹ (ANOVA factor único).

Anova: factor único

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
0,5 µg mL ⁻¹	9	167,6970	83,8485	0,1281
1,5 µg mL ⁻¹	9	169,5400	84,7700	4,9298

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	0,8491	1	0,8491	0,3358	0,6209	18,5128
Dentro de grupos	5,0579	2	2,5290			
Total	5,9070	3				

Anexos

Tabela A 29 – Validação do método analítico – Efeito da concentração da amostra: Comparação entre 0,5 e 2,5 µg mL⁻¹ (ANOVA factor único).

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
0,5 µg mL ⁻¹	9	167,6970	83,8485	0,1281
2,5 µg mL ⁻¹	9	171,1894	85,5947	26,1794

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	3,0491	1	3,0491	0,2318	0,6777	18,5128
Dentro de grupos	26,3075	2	13,1538			
Total	29,3566	3				

Tabela A 30 – Validação do método analítico – Efeito da concentração da amostra: Comparação entre 2,5 e 1,5 µg mL⁻¹ (ANOVA factor único).

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
2,5 µg mL ⁻¹	9	171,1894	85,5947	26,1794
1,5 µg mL ⁻¹	9	169,5400	84,7700	4,9298

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,6801	1	0,6801	0,0437	0,8537	18,5128
Dentro de grupos	31,1092	2	15,5546			
Total	31,7893	3				

- **Efeito do volume da amostra**

Tabela A 31 – Validação do método analítico – Efeito do volume da amostra (5 mL).

Réplicas	Áreas (mAUxmin)	Concentração de atenolol (mgL ⁻¹)	Recuperação (%)
1	293490	2,0552	82,8044
	296853	2,0803	80,2252
	292515	2,0479	81,9160
Média 1	294665	2,0632	81,6485
2	292253	2,0459	81,8377
	296481	2,0775	83,1003
	293490	2,0552	89,0558
Média 2	294998	2,0589	82,9411
3	296853	2,0803	89,5434
	292515	2,0479	88,2151
	292253	2,0459	89,3717
Média 3	294532	2,0654	84,6054
Média final	294078,1111	2,0596	85,5947
Desvio-padrão	2043,7201	0,0153	4,0137

Tabela A 32 – Validação do método analítico – Efeito do volume da amostra (50 mL).

Réplicas	Áreas (mAUxmin)	Concentração de atenolol (mgL ⁻¹)	Recuperação (%)
1	293490	2,0552	82,2071
	296853	2,0803	83,2114
	292515	2,0479	81,9160
Média 1	294286	2,0611	82,4448
2	292253	2,0459	81,8377
	296481	2,0775	83,1003
	316424	2,2264	89,0558
Média 2	297472	2,0849	83,3961
3	318057	2,2386	89,5434
	319609	2,2502	90,0069
	317482	2,2343	89,3717
Média 3	303175	2,1274	85,0992
Média final	304796,0001	2,1396	85,5834
Desvio-padrão	12548,0576	0,0937	3,7771

Tabela A 33 – Validação do método analítico – Efeito do volume da amostra (100 mL).

Réplicas	Áreas (mAUxmin)	Concentração de atenolol (mgL ⁻¹)	Recuperação (%)
1	302922	2,1256	85,0237
	298611	2,0934	83,7364
	292862	2,0505	82,0196
Média 1	298131	2,0898	
2	290537	2,0331	81,3253
	296375	2,0767	83,0687
	296375	2,0767	83,0687
Média 2	296544	2,0780	
3	297042	2,0817	83,2678
	300097	2,1045	84,1801
	303871	2,1327	85,3071
Média 3	297578	2,0857	
Média final	297632,4444	2,0861	83,2565
Desvio-padrão	4337,9720	0,0324	1,3579

Tabela A 34 – Validação do método analítico – Efeito do volume da amostra: Comparação entre 5 e 50 mL (ANOVA factor único).

Anova: factor único

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
5 mL	9	855,9468	85,5947	15,2813
50 mL	9	770,2502	85,5834	14,0411

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	0,0006	1,0000	0,0006	4,1283E-05	0,9949	4,4513
Dentro de grupos	249,8603	17,0000	14,6977			
Total	249,8609	18,0000				

Anexos

Tabela A 35 – Validação do método analítico – Efeito do volume da amostra: Comparação entre 5 e 100 mL (ANOVA factor único).

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
5 mL	9	855,9468	85,5947	15,2813
100 mL	9	832,5649	83,2565	1,8438

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	27,3357	1	27,3357	3,1925	0,0908	4,4139
Dentro de grupos	154,1263	18	8,5626			
Total	181,4620	19				

Tabela A 36 – Validação do método analítico – Efeito do volume da amostra: Comparação entre 50 e 100 mL (ANOVA factor único).

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
50 mL	9	770,2502	85,5834	14,0411
100 mL	9	832,5649	83,2565	1,8438

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	25,6469	1	25,6469	3,3818	0,0835	4,4513
Dentro de grupos	128,9233	17	7,5837			
Total	154,5701	18				

Anexo 5 - Ensaio de estabilidade e conservação do atenolol

• Vidro vs plástico

Tabela A 37 – Valores medidos para a concentração de atenolol em função do material de armazenamento (média;n=9).

Concentração (mgL ⁻¹) Tempo (h)		Concentração média (mgL ⁻¹) (SD) ¹			
		Vidro		Plástico	
		10	50	10	50
0	7,42 (0,17)	42,93 (1,84)	7,42 (0,17)	42,93 (1,84)	
24	6,77 (0,03)	37,88 (2,02)	6,63 (0,05)	38,87 (0,55)	
48	6,68 (0,10)	37,01 (0,10)	6,53 (0,03)	37,26 (0,08)	
72	6,64 (0,06)	36,06 (0,20)	6,44 (0,08)	36,27 (0,34)	
144	6,58 (0,08)	35,48 (0,48)	6,37 (0,03)	34,06 (1,30)	
264	6,30 (0,10)	34,15 (0,15)	6,24 (0,13)	33,39 (0,82)	
432	5,80 (0,03)	27,43 (0,11)	6,02 (0,03)	25,82 (0,16)	
672	5,71 (0,08)	24,73 (1,13)	5,78 (0,32)	24,35 (0,97)	
864	4,67 (0,51)	22,19 (0,97)	5,29 (0,38)	21,44 (0,79)	

¹ Desvio-padrão

• Frigorífico vs congelador

Tabela A 38 – Valores medidos para a concentração de atenolol em função da temperatura de armazenamento (média;n=9).

Concentração (mgL ⁻¹) Tempo (h)		Concentração média (mgL ⁻¹) (SD) ¹			
		Frigorífico		Congelador	
		10	50	10	50
0	7,42 (0,17)	42,93 (1,84)	7,42 (0,17)	42,93 (1,84)	
24	7,07 (0,02)	38,38 (0,94)	6,95 (0,10)	38,85 (0,20)	
48	7,02 (0,01)	37,95 (0,05)	6,88 (0,04)	38,69 (0,03)	
72	6,99 (0,06)	37,61 (0,03)	6,68 (0,01)	38,53 (0,07)	
144	6,96 (0,11)	37,41 (0,52)	6,55 (0,19)	38,33 (0,30)	
264	6,62 (0,23)	36,83 (0,73)	6,26 (0,07)	37,69 (0,22)	
432	5,52 (0,05)	28,44 (0,08)	6,15 (0,03)	36,88 (0,08)	
672	5,15 (0,40)	24,69 (0,34)	6,04 (0,14)	36,54 (0,14)	
864	4,50 (0,26)	19,76 (1,33)	5,86 (0,22)	35,03 (1,50)	

¹ Desvio-padrão

- **Luz vs escuridão**

Tabela A 39 – Valores medidos para a concentração de atenolol em função da exposição à luz (média;n=9).

Concentração (mgL ⁻¹) Tempo (h)	Concentração média (mgL ⁻¹) (SD) ¹			
	Luz		Escuridão	
	10	50	10	50
0	6,90 (0,08)	41,94 (2,77)	6,90 (0,08)	41,94 (2,77)
24	6,45 (0,03)	35,95 (2,01)	6,77 (0,04)	37,88 (1,97)
48	6,25 (0,09)	33,93 (0,08)	6,69 (0,08)	37,02 (0,24)
72	6,21 (0,06)	33,65 (0,17)	6,68 (0,05)	36,02 (0,28)
144	6,10 (0,03)	33,29 (0,21)	6,35 (0,01)	35,74 (0,23)
264	5,97 (0,23)	33,09 (0,82)	6,18 (0,15)	35,63 (0,36)
432	5,68 (0,20)	32,24 (0,80)	6,05 (0,14)	35,46 (0,46)
672	5,55 (0,34)	21,52 (0,30)	5,84 (0,11)	29,11 (0,49)
864	5,02 (0,13)	18,08 (0,29)	5,71 (0,08)	24,71 (0,70)

¹ Desvio-padrão



Anexo 6 - Ensaio de avaliação da capacidade de remoção de atenolol pela LECA

• Ensaio em solução aquosa contendo atenolol

Tabela A 40 – Valores de concentração e de percentagem de atenolol removido, em solução aquosa, obtidos para a LECA para os vários tempos de retenção estudados (média; $n=9$).

Tempo de exposição (h)	Resultados	Concentração inicial de atenolol (mg L^{-1})			
		1	10	35	50
24	Atenolol removido (mg g^{-1} LECA)	6,75E-04	3,64E-03	1,41E-02	1,76E-02
	Desvio Padrão	2,78E-06	1,87E-04	1,11E-03	1,45E-03
	Atenolol removido (%)	68,55	45,66	36,39	34,33
	Desvio Padrão	0,28	2,34	2,86	2,84
48	Atenolol removido (mg g^{-1} LECA)	7,43E-04	4,28E-03	1,87E-02	2,01E-02
	Desvio Padrão	9,58E-06	1,50E-04	9,74E-04	1,60E-03
	Atenolol removido (%)	75,44	53,66	48,28	39,26
	Desvio Padrão	0,97	1,88	2,51	3,13
72	Atenolol removido (mg g^{-1} LECA)	8,76E-04	4,93E-03	2,03E-02	2,56E-02
	Desvio Padrão	3,23E-06	1,15E-04	5,10E-04	3,26E-04
	Atenolol removido (%)	88,90	61,82	52,36	49,96
	Desvio Padrão	0,33	1,44	1,32	0,64
96	Atenolol removido (mg g^{-1} LECA)	9,05E-04	5,83E-03	2,12E-02	2,66E-02
	Desvio Padrão	5,25E-06	1,39E-04	9,02E-04	9,26E-04
	Atenolol removido (%)	91,82	73,09	54,72	52,02
	Desvio Padrão	0,53	1,74	2,33	1,81
120	Atenolol removido (mg g^{-1} LECA)	9,12E-04	6,19E-03	2,49E-02	3,26E-02
	Desvio Padrão	1,11E-05	1,60E-04	6,12E-04	3,20E-04
	Atenolol removido (%)	92,58	77,58	64,18	63,60
	Desvio Padrão	1,12	2,00	1,58	0,62
144	Atenolol removido (mg g^{-1} LECA)	9,17E-04	6,74E-03	3,01E-02	3,74E-02
	Desvio Padrão	4,49E-06	6,01E-05	4,19E-04	6,85E-04
	Atenolol removido (%)	93,10	84,59	77,66	72,63
	Desvio Padrão	0,46	0,75	1,08	1,34
168	Atenolol removido (mg g^{-1} LECA)	9,54E-04	7,10E-03	3,23E-02	4,13E-02
	Desvio Padrão	4,24E-06	1,04E-04	4,24E-04	4,44E-04
	Atenolol removido (%)	96,80	89,10	83,48	80,74
	Desvio Padrão	0,43	1,31	1,10	0,87
192	Atenolol removido (mg g^{-1} LECA)	9,63E-04	7,68E-03	3,59E-02	4,70E-02
	Desvio Padrão	5,27E-06	7,97E-05	7,97E-05	1,18E-04
	Atenolol removido (%)	97,76	96,35	92,60	91,89
	Desvio Padrão	0,53	1,00	0,21	0,23
216	Atenolol removido (mg g^{-1} LECA)	9,70E-04	7,81E-03	3,69E-02	4,86E-02
	Desvio Padrão	5,27E-06	4,76E-05	1,31E-04	1,15E-04
	Atenolol removido (%)	98,50	97,92	95,19	94,86
	Desvio Padrão	0,54	0,60	0,34	0,23
240	Atenolol removido (mg g^{-1} LECA)	9,85E-04	7,95E-03	3,81E-02	5,02E-02
	Desvio Padrão	4,70E-07	4,61E-05	9,78E-05	4,28E-05
	Atenolol removido (%)	99,95	99,74	98,30	98,11
	Desvio Padrão	0,05	0,58	0,25	0,08

• **Ensaio com efluente doméstico contendo atenolol**

Tabela A 41 – Valores de concentração e de percentagem de atenolol removido, em efluente, obtidos para a LECA para os vários tempos de retenção estudados (média; $n=9$).

Tempo de exposição (h)	Resultados	Concentração inicial de atenolol (mg L^{-1})			
		1	10	35	50
24	Atenolol removido (mg g^{-1} LECA)	5,62E-04	3,41E-03	1,12E-02	1,46E-02
	Desvio Padrão	5,02E-06	1,57E-04	8,83E-04	1,22E-03
	Atenolol removido (%)	71,95	39,18	37,19	29,81
	Desvio Padrão	0,64	1,80	2,94	2,49
48	Atenolol removido (mg g^{-1} LECA)	6,14E-04	4,05E-03	1,25E-02	1,66E-02
	Desvio Padrão	3,87E-06	1,06E-04	9,74E-04	1,17E-03
	Atenolol removido (%)	78,72	46,46	41,70	33,85
	Desvio Padrão	0,50	1,22	3,24	2,40
72	Atenolol removido (mg g^{-1} LECA)	6,45E-04	4,44E-03	1,35E-02	1,77E-02
	Desvio Padrão	4,41E-06	1,36E-04	8,16E-04	7,77E-04
	Atenolol removido (%)	82,70	50,97	44,89	36,09
	Desvio Padrão	0,56	1,56	2,72	1,59
96	Atenolol removido (mg g^{-1} LECA)	6,79E-04	4,65E-03	1,41E-02	1,85E-02
	Desvio Padrão	3,86E-06	1,65E-04	9,37E-04	6,98E-04
	Atenolol removido (%)	87,00	53,35	46,97	37,84
	Desvio Padrão	0,50	1,89	3,12	1,43
120	Atenolol removido (mg g^{-1} LECA)	7,17E-04	5,01E-03	1,46E-02	1,96E-02
	Desvio Padrão	1,49E-06	5,21E-05	4,76E-04	1,22E-03
	Atenolol removido (%)	91,89	57,49	48,73	39,99
	Desvio Padrão	0,19	0,60	1,58	2,49
168	Atenolol removido (mg g^{-1} LECA)	7,35E-04	5,70E-03	1,60E-02	2,04E-02
	Desvio Padrão	8,14E-07	9,27E-05	4,67E-04	9,84E-04
	Atenolol removido (mg g^{-1} LECA)	94,17	65,38	53,19	41,70
	Desvio Padrão	0,10	1,06	1,55	2,01

Anexo 7 - Eficiência de remoção do atenolol em LCMs

Tabela A 42 – Valores de concentração e de percentagem de atenolol removido ao longo do tempo para uma concentração inicial de 1 mg L^{-1} , para os leitos com plantas e sem plantas para a época valores indicam a média; $n=9$).

Tempo de exposição (h)	Resultados	LCMs		
		<i>Phragmites</i>	LECA	Efluente
6	Atenolol removido (mg L^{-1})	0,46	0,49	0,02
	Desvio Padrão	1,04E-02	1,32E-02	1,04E-02
	Atenolol removido (%)	59,11	62,79	2,06
	Desvio Padrão	2,94	0,75	1,33
12	Atenolol removido (mg L^{-1})	0,52	0,49	0,03
	Desvio Padrão	8,53E-03	2,51E-03	8,53E-03
	Atenolol removido (%)	66,63	66,63	3,37
	Desvio Padrão	1,47	1,20	1,09
24	Atenolol removido (mg L^{-1})	0,59	0,56	0,04
	Desvio Padrão	1,20E-02	2,84E-02	1,20E-02
	Atenolol removido (%)	75,31	69,19	4,84
	Desvio Padrão	1,43	3,36	1,54
48	Atenolol removido (mg L^{-1})	0,67	0,61	0,07
	Desvio Padrão	2,83E-03	2,39E-02	2,83E-03
	Atenolol removido (%)	86,12	74,32	9,49
	Desvio Padrão	0,45	2,47	0,36
72	Atenolol removido (mg L^{-1})	0,70	0,65	0,10
	Desvio Padrão	1,45E-02	2,24E-02	1,45E-02
	Atenolol removido (%)	89,51	78,16	12,56
	Desvio Padrão	1,69	6,64	1,86
96	Atenolol removido (mg L^{-1})	0,71	0,68	0,11
	Desvio Padrão	7,77E-03	1,99E-02	7,77E-03
	Atenolol removido (%)	92,49	82,01	14,27
	Desvio Padrão	1,02	2,13	1,00
144	Atenolol removido (mg L^{-1})	0,74	0,72	0,12
	Desvio Padrão	6,25E-04	2,17E-02	6,25E-04
	Atenolol removido (%)	94,27	85,97	15,02
	Desvio Padrão	0,62	2,17	0,08
192	Atenolol removido (mg L^{-1})	0,74	0,73	0,13
	Desvio Padrão	4,39E-03	1,14E-02	9,39E-03
	Atenolol removido (%)	95,45	89,70	16,34
	Desvio Padrão	0,46	1,14	1,20