

NICOLE MARIA MENDES CUENCA COTRIM

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
ESTUDO DA REMOÇÃO DE SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA
EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS APÓS TRATAMENTO EM BIORREATOR
ANAERÓBIO DE LEITO FIXO ORDENADO**



NICOLE MARIA MENDES CUENCA COTRIM

Desenvolvimento e validação de método analítico para estudo da remoção de sulfametoxazol e trimetoprima em águas residuárias após tratamento em biorreator anaeróbio de leito fixo ordenado

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para a obtenção do título Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes.

Araraquara
2016

Dedico este trabalho a todas as mulheres a que o sonho e o direito de ser foram reprimidos e aquelas que estão conquistando seu espaço na Ciência.

Este trabalho é o resultado de um esforço em conjunto, portanto agradeço...

Ao Prof. Dr. Paulo Clairmont pela oportunidade de trabalhar na área em que me reconheci, além de toda dedicação ao projeto e proporcionar meu aprendizado.

A Giovana, Bianca e Natália pelos esforços, dedicação e troca de experiências que construíram esse projeto.

A todos do Grupo Alquimia e das gestões Armada e Avante! do Diretório Acadêmico Waldemar Saffioti por todo o apoio necessário para minha permanência no curso e por todas as oportunidades de crescimento e aprendizado.

Aos meus avós Adirce e Antônio por permitir que eu me tornasse alguém que quebra as barreiras e estatísticas.

Aos meus pais pelo apoio e compreensão incondicional durante esses anos.

Aos meus irmãos Enrico e Antonella por me lembrarem sempre que a felicidade é simples.

A todos meus familiares pelo incentivo, compreensão e carinho.

Aos meus amigos Eduardo, Emirena, Giovanna, Jessyka e Natalia pelo companheirismo, desde o início, que deram leveza e alegria no cotidiano de graduação.

Aos meus veteranos Lilian Guevara e Raí Bueno por serem grandes exemplos e fomentarem meu ânimo para prosseguir.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

A ocorrência, o destino e os efeitos dos fármacos em matrizes ambientais foram estudadas recentemente. Destaca-se, dentre esses fármacos os antibióticos, sendo em esgotos, em águas de superfície e outras matrizes ambientais. Entre eles o sulfametoxazol (SMTX) e a trimetoprima (TMP) estão em concentrações nas grandezas de ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$. Nesse estudo foi desenvolvido e validado um método analítico, utilizando extração em fase sólida online e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas, para determinação dos fármacos sulfametoxazol e trimetoprima em amostras de esgoto lab-made. O método desenvolvido se mostrou eficiente na determinação dos compostos de interesse tendo em vista os parâmetros de validação: seletividade, precisão, limite de detecção e quantificação e linearidade. O método apresentou na faixa de concentração de 75 a 500 ng L^{-1} . A análise de variância foi aplicada para comprovar linearidade e a verificação da falta de ajuste do modelo matemático. Foram obtidos baixos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) iguais a 25 e 75 ng L^{-1} para ambos os analitos, respectivamente. A precisão intra-dia foi menor que 19% para ambos os compostos em todos os níveis de concentração. O método foi aplicado para determinação desses analitos em amostras de afluente e efluente para avaliação da eficiência de remoção após tratamento utilizando biorreator ABFSB.

Palavras-chave: Validação. SPE-online. Sulfametoxazol. Trimetoprima. Biorreator.

ABSTRACT

The occurrence, the destination and the effects of the drugs in environmental matrices has been studied recently. It points out, among these drugs, the antibiotics in sewers, surface waters and other environmental matrices. Amid them, the sulfamethoxazole (SMTX) and trimethoprim (TMP) are in the magnitude of ng L^{-1} and $\mu\text{g L}^{-1}$. In this study it was developed and validated an analytical method, using online extraction in solid phase and high efficiency liquid chromatography attached on a mass spectrometer, to determinate the drugs SMTX and TMP in samples of lab-made sewer. The developed method was effective to determine the compositions of interest, bearing in mind the parameters of validation: selectivity, precision, detection and quantification limit and linearity. The method showed 75 to 500 ng L^{-1} of concentration. The analyses of variance were applied to prove linearity and the lack of verification in adjust of the mathematical model. It was obtained low limits between 25 e 75 ng L^{-1} of detection (LD) and quantification (LQ) for both of the analytes, respectively. The intra-dia precision was lower than 19% for both of the compounds in all levels of concentration. The method was applied for the determination of these analytes in affluent and effluent samples for evaluating the removal after treatment using ABFSB reactor.

Key-words: Validation. SPE-online. Sulfamethoxazole. Trimethoprim. Biorreactor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Principais rotas de lançamento de fármacos no meio ambiente, adaptado de (2)...	12
Figura 3.1 Esquematização do reator ABFSB, retirado de (14).....	17
Figura 3.2 Reator ABSFB antes (a) e após inoculação (b).	18
Figura 3.3. Bomba adicional para carregamento da amostra no sistema de column switching e SPE online.	22
Figura 4.1 Acompanhamento da variação de pH do afluente e efluente do reator ABFSB durante o tempo de operação.....	26
Figura 4.2 Valores de DQO para afluente e efluente do reator ABFSB durante o tempo de operação.	27
Figura 4.3 Eficiência da remoção de matéria orgânica do reator ABFSB durante o tempo de operação.	28
Figura 4.4 Curva da cinética de remoção da matéria orgânica após tratamento com ABFSB.	28
Figura 4.5 Cromatograma de íon total (TIC) de uma amostra de esgoto lab-made (afluente) fortificado com padrões de 250 ng L ⁻¹ de SMTX (t _R =4,76 min) e TMP (t _R =4,92 min). ..	29
Figura 4.6 Cromatograma de íon total (TIC) de uma amostra de esgoto lab-made (afluente) fortificado com padrão de 250 ng L ⁻¹ de SMTX.....	30
Figura 4.7 Cromatograma de íon total (TIC) de uma amostra de esgoto lab-made (afluente) fortificado com padrão de 250 ng L ⁻¹ de TMP.....	30
Figura 4.8 Curva analítica para SMTX em afluente do reator ABFSB.....	31
Figura 4.9 Curva analítica para TMP em afluente do reator ABFSB.	32
Figura 4.10 Cromatograma do íon total (TIC) de uma amostra de afluente isenta dos analitos.	33
Figura 4.11 Curva da cinética de remoção do SMTX, em 200 ng L ⁻¹ , após tratamento com ABFSB.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Resumo das concentrações de SMTX e TMP detectados em matrizes ambientais, adaptado de (8).....	13
Tabela 3.1 Composição do esgoto lab-made.....	19
Tabela 3.2 Volume de TMP utilizado nas fortificações do afluente em diferentes concentrações estudadas.....	20
Tabela 3.3 Volume de SMTX utilizado nas fortificações do afluente em diferentes concentrações estudadas.....	20
Tabela 4.1 Parâmetros das equações das curvas analíticas para amostras de afluente e efluente do reator ABFSB.....	32
Tabela 4.2 Intervalo de precisão intra-dias obtidos nos níveis de concentração das curvas analíticas.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABFSB	Anaerobic Biorreactor Fixed-structured Bed
SMTX	Sulfametoaxol
TMP	Trimetoprima
LQ	Limite de Quantificação
LD	Limite de Detecção
ETE	Estação de Tratamento de Esgotos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
SPE	Solid Phase Extraction
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
MS	Espectrometria de Massas
LC	Cromatografia Líquida
GC	Cromatografia Gasosa
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
DQO	Demanda Química de Oxigênio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	16
3	MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1.	Reatores	17
3.2.	Esgoto lab-made	18
3.3.	Antibióticos	19
3.4.	Análises de Rotina	20
3.4.1.	Demanda Química de Oxigênio (DQO)	20
3.5.	Monitoramento da Remoção de Antibióticos	21
3.6.	Preparo de Amostra	21
3.7.	Separação Analítica	23
3.8.	Validação do Método	23
3.8.1.	Seletividade	23
3.8.2.	Calibração e Linearidade	24
3.8.3.	Limite de Detecção e Quantificação	24
3.8.4.	Precisão	24
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
4.1.	pH	26
4.2.	Remoção da matéria orgânica – Análise de DQO	27
4.3.	Validação	29
4.3.1.	Seletividade	29
4.3.2.	Calibração e Linearidade	30
4.3.3.	Limite de Quantificação e Detecção	33
4.3.4.	Precisão	33
4.4.	Avaliação da remoção dos antibióticos	34
4.4.1.	Remoção do SMTX	34
4.4.2.	Remoção da TMP	35
5	CONCLUSÃO	37
6	REFERÊNCIAS	38

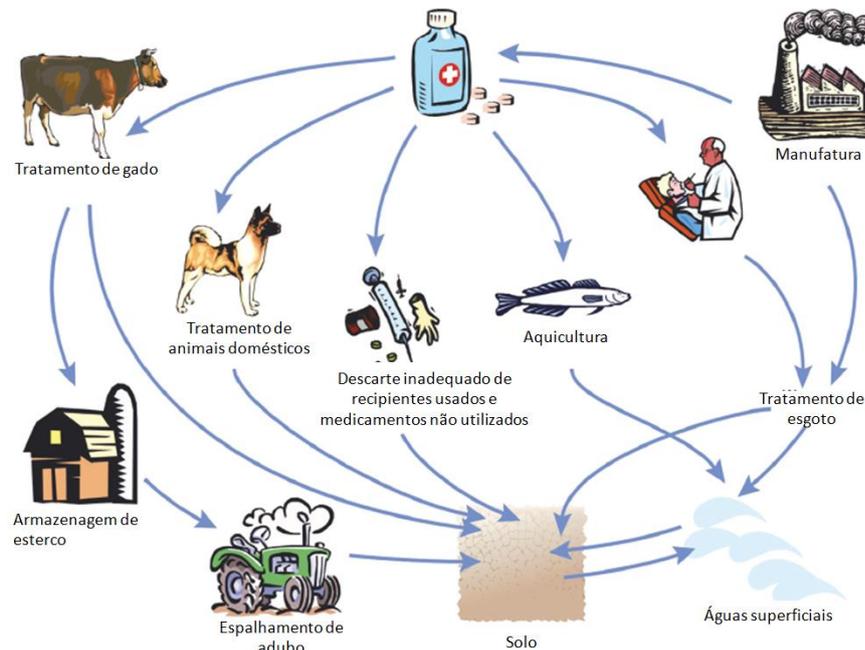
1 INTRODUÇÃO

A água é um recurso natural relacionado a todos os aspectos da civilização humana, desde o desenvolvimento agrícola e industrial até valores culturais e religiosos arraigados na sociedade. Assim, vê-se progressiva evolução nas exigências de qualidade da água que acompanham os avanços do conhecimento técnico e científico acerca do tratamento para preservação desta riqueza natural, de modo a se adequar aos padrões definidos pelos órgãos de saúde e agências reguladoras.

Com relação aos poluentes orgânicos, recentemente tem se dado grande destaque ao monitoramento de resíduos de medicamentos em matrizes ambientais, principalmente aquáticas, uma vez que sua presença tem sido relatada mundialmente em efluentes de Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs), em águas de superfície e até mesmo em solo e água potável (1).

Os resíduos de fármacos podem ter diversas vias de entrada no ambiente, como o lançamento direto de esgotos domésticos e efluentes rurais sem prévio tratamento ou mesmo tratado em cursos de água. Além disso, o efluente de indústrias farmacêuticas ou de farmácias de manipulação são outras importantes fontes para a entrada de fármacos no ambiente. A criação de peixes dispõe medicamentos diretamente no ambiente aquático, e o reaproveitamento do esterco animal para adubação bem como o descarte de medicamentos vencidos em aterro sanitários contribuem para a entrada desses fármacos no solo (2).

Figura 1.1 Principais rotas de lançamento de fármacos no meio ambiente, adaptado de (2).



No entanto, a maior parte dos fármacos que chega às ETEs é proveniente de excreção metabólica após prescrição na medicina humana ou veterinária, uma vez que a taxa de excreção da dose administrada varia de 40% a 90% sem sofrer qualquer reação de biotransformação. Esses resíduos então são, na maioria dos casos, submetidos a processos convencionais de tratamento (3).

A ocorrência de fármacos no meio ambiente pode causar efeitos adversos desregulação endócrina, ecotoxicidade, genotoxicidade, resistência microbiana (4) em organismos aquáticos e terrestres. De acordo com Halling-Sorensen et al. (5), alguns desses efeitos podem ser observados mesmo quando fármacos estão em concentrações na ordem de ng L^{-1} . No entanto, o destino e o comportamento dessas substâncias no ambiente aquático não estão totalmente elucidados.

Entre os gêneros de fármacos, os antibióticos são agentes quimioterapêuticos que inibem ou suprimem o crescimento de microorganismos, como fungos, bactérias e protozoários. Nesse sentido sua presença em matrizes ambientais tem sido largamente discutida pela contribuição na seleção de bactérias resistentes. Segundo Halling-Sorensen et al. (5), tal fato é favorecido mesmo em situações de baixas concentrações.

As sulfonamidas são uma classe de agentes antimicrobianos que são consideravelmente usadas em medicina humana e veterinária (6), principalmente no tratamento de infecções

urinárias, infecções no ouvido e bronquite (7). São estruturalmente análogas ao ácido p-amino benzóico (PABA). Desta forma, em seu mecanismo de ação, combatem as bactérias através da competição com o PABA evitando o seu uso pela bactéria na síntese de ácido fólico o qual por sua vez é essencial na realização da síntese de ácidos nucleicos pela bactéria.

Sulfametoxazol (SMTX) é um medicamento da classe das sulfonamidas, sendo largamente utilizada na terapêutica veterinária, pois apresenta um amplo espectro de ação e um custo relativamente baixo. Inibe competitivamente a enzima bacteriana diidropteroato sintetase impedindo a síntese de folato. É comum que os medicamentos a base de sulfonamidas consistam na associação de vários compostos e uma das combinações mais comuns é na proporção de 5:1 de trimetoprima e sulfametoxazol, duas substâncias com efeitos sinérgicos, e uma baixa probabilidade de resistência bacteriana. Trimetoprima (TMP) liga-se reversivelmente à enzima diidrofolato redutase bacteriana, inibindo a sua atividade e auxilia também inibição da síntese do folato (6).

Entre os mais de trinta antibióticos relatados por Kemper (5), SMTX e a TMP estão presentes com concentrações nas grandezas de ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$. De acordo com Miranda et al. constatou-se a resistência microbiana em uma espécie de *Aeromonas sp* isolada de ambientes aquáticos mesmo nesses baixos níveis de concentração. A Tabela 1.1 apresenta um resumo das concentrações médias desses fármacos detectados no meio ambiente.

Tabela 1.1 Resumo das concentrações de SMTX e TMP detectados em matrizes ambientais, adaptado de (8).

Substância	Concentrações médias no ambiente	Condições	Referência
Sulfametoxazol	30 a 85 ng L^{-1}	Água superficial/Alemanha	9
	300 a 1500 ng L^{-1}	Efluente de ETE/Alemanha	9
	0,0060 a 0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água natural/EUA	10
	410 ng L^{-1}	Água de subsolo/Alemanha	11
	0,40 $\mu\text{g L}^{-1}$	Efluente de ETE/Alemanha	12
	0,030 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água superficial/Alemanha	12
Trimetoprima	0,013 a 0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água natural/EUA	10
	0,32 a 0,66 $\mu\text{g L}^{-1}$	Efluente de ETE/Alemanha	12
	2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	Efluente de ETE/Alemanha	12
	0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água superficial/Alemanha	12

O cenário nacional quanto aos serviços de saneamento básico é deficiente, em que somente 55,2 % dos municípios brasileiros têm serviço de esgotamento sanitário por rede coletora (13), somado à ausência de regulamentação para presença de fármacos em águas residuárias. Além disso, as ETEs não foram projetadas para a remoção de fármacos e demais micropoluentes presentes no esgoto, dessa forma as ETEs contribuem para o ciclo de contaminação de matrizes ambientais com fármacos. Assim se faz necessário a busca por métodos eficazes de tratamento, onde esses poluentes podem ser mineralizados ou transformados em outros produtos que não causem efeitos adversos ao ambiente.

Biorreatores anaeróbios são utilizados em diversas ETEs das cidades do Estado de São Paulo, sendo essencial avaliar a possibilidade de remover de maneira eficiente fármacos. Esses biorreatores apresentam diversas configurações que variam de acordo com sua aplicação. Dentre elas, biorreator anaeróbio de leito fixo ordenado (ABFSB - Anaerobic Biorreactor Fixed-structured Bed) é uma configuração que vem ganhando destaque nos estudos do tratamento de águas residuárias. Este reator já foi aplicado com grande sucesso para remoção de metais em esgoto (14) e na remoção simultânea de sulfato em águas residuárias ricas em matéria orgânica (15).

A comunidade científica atual vem se empenhando no desenvolvimento de métodos analíticos suficientemente sensíveis para determinação desses compostos em diversas matrizes ambientais. Sendo que se destacam aquelas que empregam cromatografia líquida de alta eficiência (LC) ou cromatografia gasosa (GC) pela sua capacidade separação dos analitos em relação aos interferentes e artefatos da amostra. Associado a essa capacidade de separação, destaca-se o acoplamento com espectrômetros de massas (MS), detector que oferece seletividade, sensibilidade e rapidez para as análises. O acoplamento entre GC-MS e LC-MS ainda foi melhorado com o desenvolvimento de analisadores sequenciais (MS/MS), que aumentam ainda mais a seletividade das análises bem como sua confiabilidade.

Nos últimos anos tem se destacado o uso de sistemas de LC-MS/MS para determinação de fármacos em matrizes ambientais uma vez que essa técnica permite analisar compostos termolábéis que requerem etapas de derivatização para usar GC-MS/MS.

O esgoto por ser caracterizado como uma matriz complexa e conter substâncias que podem interferir na quantificação dos analitos de interesse requer uma etapa de pré-tratamento adequado das amostras para pré-concentrar e extrair estes compostos, encontrados frequentemente em concentrações muito baixas.

A etapa de tratamento da amostra se apresenta como essencial nas estratégias de desenvolvimento do método para garantir a qualidade dos dados, uma vez que tem como função isolar o analito de interesse presente na matriz, eliminar ou minimizar a interferência de outros componentes e concentrar o analito que pode estar em baixas concentrações. Influenciando dessa maneira da seletividade e sensibilidade do método.

A técnica de extração em fase sólida tem sido uma das ferramentas mais empregadas para a extração e pré-concentração de analitos presentes em matrizes complexas (8). No entanto, sua configuração offline convencional e manual, é um procedimento com muitas etapas e gasto de tempo elevado para preparo das amostras. Assim a configuração on-line supera essas limitações, mas se faz necessário equipamentos dedicados, arranjos de válvulas e bombas (7).

Para que o método analítico proposto e desenvolvido seja capaz de avaliar a eficiência do tratamento aplicado, bem como, auxiliar a avaliar novos tratamentos propostos para mitigar o impacto da presença de antibióticos em águas residuárias, é necessário garantir que as medidas executadas no mesmo transcrevam resultados confiáveis e interpretáveis ao que se aplica.

A validação de um método analítico se faz necessária para qualificar as medições químicas que fazem parte do desenvolvimento do método proposto, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade (16). Assim, um método é considerado validado se estiver de acordo com parâmetros estabelecidos por agências reguladoras, como ANVISA e INMETRO, que visam discutir e assegurar a credibilidade das medidas executadas, tais como seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação e precisão.

2 OBJETIVOS

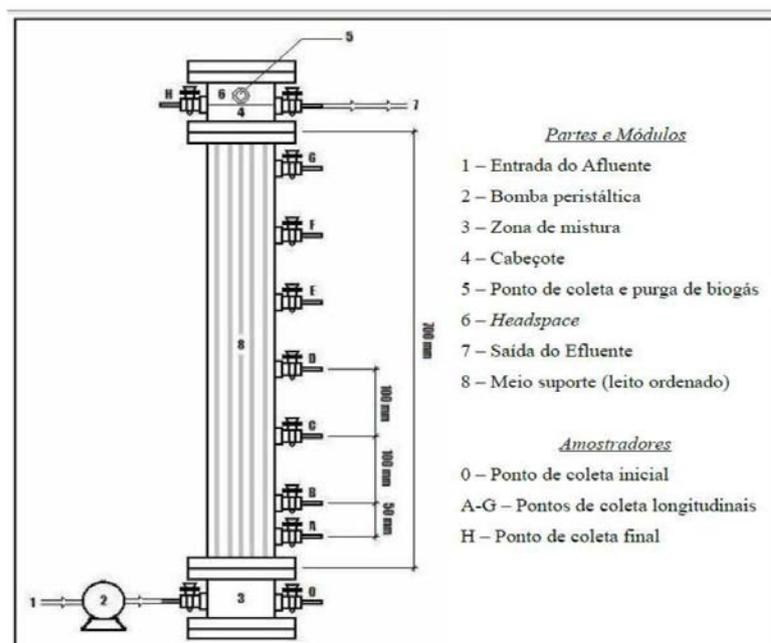
O objetivo deste trabalho é o de desenvolver e validar método analítico para determinação de SMTX e TMP em afluente e efluente de biorreator ABFSB usando LC-MS/MS.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reator

O reator anaeróbico de bancada AFBSB, o qual foi operado em um período total de 129 dias, é caracterizado por um volume total de 2,0 L, 60 cm de comprimento e 10 cm de diâmetro interno. Tais dimensões, bem como a configuração e estrutura do reator, encontram-se esboçadas na Figura 3.1 abaixo.

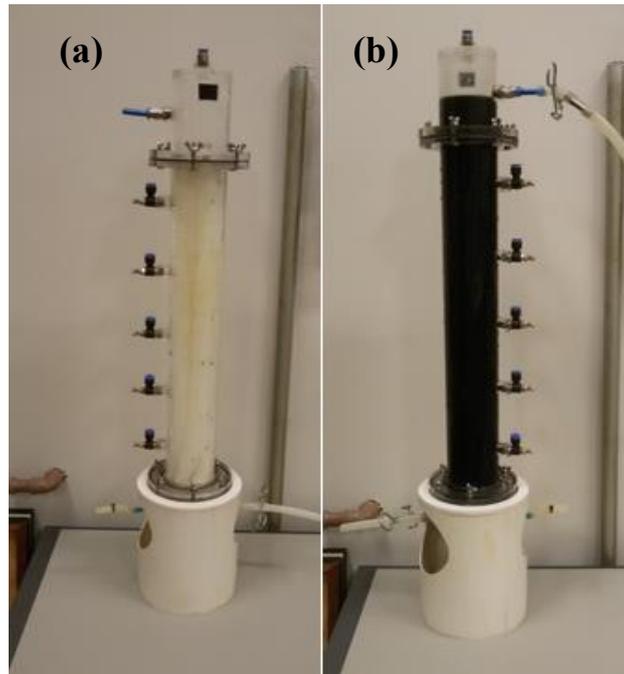
Figura 3.1 Esquemática do reator ABFSB, retirado de (14).



O meio suporte de inoculação utilizado foi espuma de poliuretano cortada em aparas, de 50 cm de comprimento e 2,0 cm de largura, presas a um anel metálico interno do reator. De modo que após o alojamento de 6 aparas, o volume útil total do reator ABFSB correspondesse a 1,4 L.

O lodo usado no processo de inoculação foi proveniente de um reator anaeróbico de manta de lodo e escoamento ascendente (UASB) usado para tratar águas residuárias de abatedouro de aves, isento de antibióticos. O lodo foi processado usando liquidificador, em seguida, foi introduzido contendo as aparas de poliuretano, mantendo em contato por cerca de 12 horas, para a imobilização dos microrganismos nos interstícios da espuma. A Figura 3.2 a seguir exhibe o reator ABFSB antes e após o processo de inoculação.

Figura 3.2 Reator ABSFB antes (a) e após inoculação (b).



O reator ABSFB foi mantido em temperatura controlada usando um banho-maria a 28°C. O tempo de detenção hidráulica (TDH) de 12 horas foi adotado, por meio do ajuste da vazão de bomba peristáltica.

3.2.Esgoto lab-made

O esgoto lab-made foi utilizado como substrato do consórcio microbiano presente no lodo, mimetizando o esgoto sanitário doméstico, com concentração média de demanda química de oxigênio (DQO) de 550 mg L⁻¹ de O₂ e composição conforme Camiloti et al.(15), cuja descrição é apresentada na Tabela 3.1 a seguir, após algumas adequações para correção do pH e DQO deste afluente.

Tabela 3.1 Composição do esgoto lab-made.

Componente	Concentração
Sacarose	72,8 mg L ⁻¹
Amido	148 mg L ⁻¹
Celulose	47,2 mg L ⁻¹
Extrato de carne	230 mg L ⁻¹
Óleo de soja	51,0 mg L ⁻¹
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)	728 mg L ⁻¹
Solução de sais (NaCl, MgCl ₂ , CaCl ₂)	1,00 mL L ⁻¹
Tensoativo	15,0 mg L ⁻¹

Esse esgoto lab-made foi usado para avaliar os parâmetros de validação do método.

3.3. Antibióticos

Estudaram-se os antibióticos SMTX e TMP, cujos padrões puros, com alta pureza (maior que 98%), se encontravam inicialmente na forma de pó (Sigma-Aldrich[®]). A partir dos quais foram preparadas duas soluções em metanol de cada antibiótico separadamente, obtendo-se concentrações de 600 mg L⁻¹ e 1000 mg L⁻¹ para a solução de TMP e SMTX, respectivamente.

Após se atingir o regime permanente no reator (momento em que a remoção da DQO ficou constante), o esgoto lab-made passou a ser fortificado com os antibióticos em concentrações que variam de 200 a 800 ng L⁻¹. Para isso foi realizada uma nova diluição das soluções anteriores, obtendo-se concentrações de 50 mg L⁻¹ e 20 mg L⁻¹ para a TMP e SMTX, respectivamente. Assim a cada concentração de antibiótico analisada usava-se um volume distinto de solução para fortificar o afluente, conforme descrito nas tabelas abaixo.

Tabela 3.2 Volume de TMP utilizado nas fortificações do afluente em diferentes concentrações estudadas.

Concentração TMP (ng L⁻¹)	Volume (μL L⁻¹)
200	28,0
400	56,0
800	112,0

Tabela 3.3 Volume de SMTX utilizado nas fortificações do afluente em diferentes concentrações estudadas.

Concentração SMTX (ng L⁻¹)	Volume (μL L⁻¹)
200	70,0
400	140,0
800	210,0

3.4. Análises de Rotina

Para acompanhar o regime do reator ABFSB, bem como garantir que suas condições não acometeriam o metabolismo dos microorganismos anaeróbios, as amostras de afluente e efluente foam analisadas conforme pH e demanda química de oxigênio (DQO) segundo o Standard Method for the Examination of Water and Wastewater (17).

3.4.1. Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A demanda química de oxigênio é definida como a quantidade de um oxidante necessária para reagir completamente com a amostra em condições controladas. Sendo a quantidade de oxidante consumida expressa em termos da sua equivalência de oxigênio, ou seja, em mg O₂ L⁻¹.

A análise das amostras foi realizada transferindo-se 2,5 mL das mesmas para tubos de ensaio (considerando diluições necessárias conforme intervalo da curva analítica), 1,0 mL da solução de digestão e 3,5 mL da solução concentrada de ácido sulfúrico. Trabalhando em duplicata e

preparando um branco substituindo o volume de amostra por água destilada, os tubos foram devidamente vedados e transferidos para digestor, previamente aquecido a 150 °C durante um período de 150 minutos.

Depois de completado o tempo de digestão os tubos foram resfriados para que fosse realizada a leitura no espectrofotômetro. A absorvância utilizada foi a obtida em 615 nm e o valor de absorvância de cada amostra nesse comprimento de onda foi utilizado para o cálculo da DQO.

Também é interessante que após a quantificação da matéria orgânica, em termos de DQO, calcule-se a eficiência de remoção da mesma, após tratamento com o reator ABSFB, utilizando a equação abaixo:

$$E (\%) = \frac{DQO_{afluente} - DQO_{efluente}}{DQO_{afluente}} \times 100$$

Onde E é a eficiência de remoção em porcentagem, $DQO_{afluente}$ é quantidade de matéria orgânica presente no afluente e $DQO_{efluente}$ é a quantidade de matéria orgânica presente no efluente após um TDH de 12 horas.

3.5. Monitoramento da Remoção de Antibióticos

O monitoramento da remoção dos antibióticos após tratamento com o reator ABFSB foi analisada usando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS), com extração por fase sólida online (SPE online-LC-MS/MS). Sendo necessária uma simples etapa de preparo da amostra com ajuste do pH da mesma para 3,0 a partir da adição de ácido fórmico 0,1%, seguido por filtração simples em membranas de 0,22 µm.

3.6. Preparo de Amostra

A extração em fase sólida (SPE) tem sido o método mais usado no preparo de amostras de matrizes ambientais, principalmente pelo pequeno volume de solvente necessário, sendo que a configuração online usando sistema de comutação de colunas (column-switching) se mostra muito

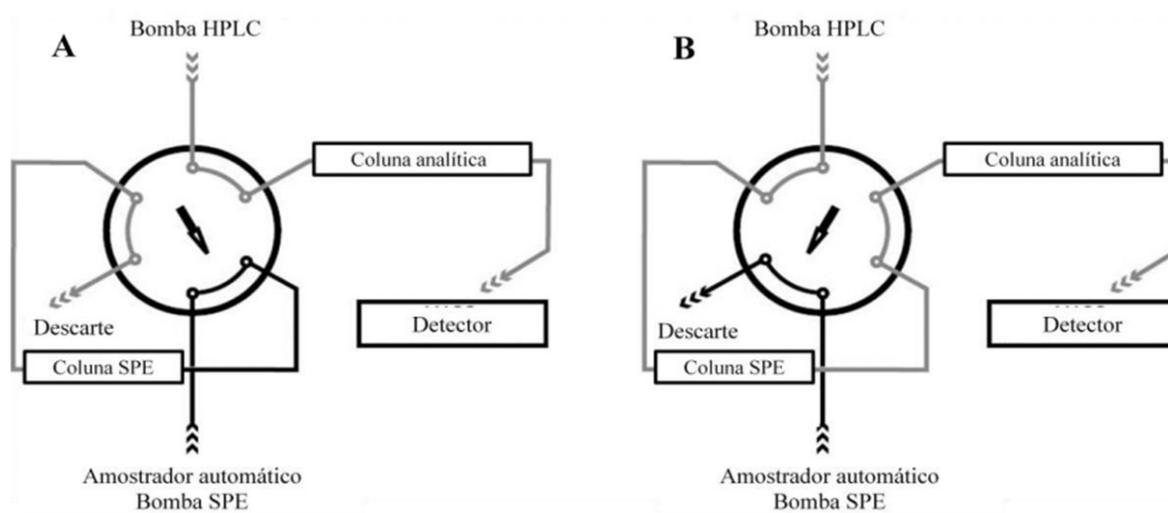
vantajosa devido à otimização das etapas e do tempo de processamento das amostras, porém faz-se necessário uso de arranjos de válvulas e uma bomba peristáltica.

O preparo de amostra online foi realizado com uma coluna de SPE Oasis HLB, composta por um copolímero poroso, o poli (divinil-benzeno-co-N-vinilpirrolidona), com uma capacidade de adsorção de compostos hidrofílicos e lipofílicos simultaneamente.

O sistema de comutação de colunas (column-switching) usado no preparo de amostra, que consiste de duas bombas de LC, sendo uma bomba (A) para carregamento da amostra e outra bomba (B) para eluição com gradiente. O column-switching foi realizado usando uma válvula de duas posições contendo seis portas e usado no modo backflush.

A amostra era introduzida um auto-amostrador, sendo injetados 100 μL da mesma, atingindo a coluna de SPE bombeado por uma fase aquosa presente na bomba 1. Ao mesmo tempo, em que a coluna analítica estava sendo condicionada pela fase móvel presente na bomba 2. Após 3,00 minutos, a válvula de column-switching muda de posição (A para B) permitindo que os analitos pré-concentrados na coluna de SPE fossem eluídos para a coluna analítica e o detector (MS/MS) no sentido oposto do qual foi carregado na etapa de carregamento da amostra. Tal sistema está representado na Figura 3.3 a seguir.

Figura 3.3. Bomba adicional para carregamento da amostra no sistema de column switching e SPE online.



3.7. Separação Analítica

A separação analítica foi feita usando um cromatógrafo a líquido Agilent 1200 contendo uma bomba quartenária, um amostrador automático ALS 1200 com capacidade de injeção de 0,1 a 100 μL , um compartimento termostaticado para a coluna analítica (coluna C18 - Agilent 50 x 2,1 mm x 2,7 mm). Uma bomba binária adicional foi usada para carregamento da amostra ao utilizar o sistema de comutação de colunas e SPE online.

O sistema contendo analisadores híbridos, sendo um quadrupolo e ion trap linear (QTRAP 3200) foi utilizado, tendo fonte turbo ion spray. Os parâmetros da fonte foram otimizados usando sistema de injeção em fluxo, sendo o curtain gas a 20 V, collision gas em nível médio, a temperatura da fonte de 650 $^{\circ}\text{C}$, ion spray voltage de 5500 V, e a pressão dos gases na fonte a 50 psi.

O QTRAP foi operado no modo positivo (ESI+) usando o modo SRM (selected reactions monitoring) em que três transições de SRM foram monitoradas para cada composto, sendo duas transições para fins de confirmação e uma para quantificação (a que apresentou maior intensidade).

A fase móvel foi constituída de água contendo 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), com vazão de 0,6 mL min^{-1} . O gradiente de separação e eluição teve como início 95% de A e 5% de B, após 3,5 min foi para 35% de A e 65% A permanecendo por 7 min, sendo modificado para 10% de A e 90%, retorno aos 13,3 min para 95% A e 5%B. A corrida cromatográfica teve um tempo de 13,3 min.

3.8. Validação do Método

Os parâmetros analíticos avaliados no presente trabalho foram: seletividade, linearidade, precisão, limite de quantificação e limite de detecção.

3.8.1. Seletividade

A seletividade foi obtida comparando a análise da matriz isenta dos analitos (SMTX e TMP) e da matriz fortificada com os mesmos. Os interferentes não podem eluir conjuntamente com analitos em estudo.

3.8.2. Calibração e Linearidade

A linearidade corresponde ao modelo matemático capaz de estabelecer proporcionalidade entre a resposta instrumental e a concentração da substância de interesse.

Portant, tal figura de mérito foi avaliada pela fortificação das matrizes de esgoto lab-made (afluente do reator ABFSB) e efluente do reator ABFSB com os analitos em 10 níveis de concentração diferentes (distribuídas entre a faixa de 75 ng L⁻¹ e 500 ng L⁻¹) e calculada usando o método dos mínimos quadrados. Padrões internos isotopicamente marcados foram usados para diminuir o efeito de matriz.

Os ajustes das curvas analíticas foram avaliados com base na análise de variância (ANOVA) e o modelo linear foi testado usando calibração ponderada.

3.8.3. Limite de Detecção e Quantificação

Limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito que pode ser detectada com grau de confiança estipulado. O LD foi definido pela injeção da amostra de esgoto lab-made fortificada, sendo a menor concentração que forneceu um sinal de três vezes maior do que o ruído da linha de base após a injeção de uma amostra em branco do equipamento.

O limite de quantificação (LQ) corresponde a menor concentração do analito que pode quantificada com precisão e exatidão. O LQ foi obtido pela injeção de amostra de esgoto lab-made fortificada, sendo a menor concentração que forneceu um sinal analítico dez vezes maior do que o ruído da linha de base e ainda com precisão inferior a 20%.

3.8.4. Precisão

A precisão representa a concordância dos resultados entre ensaios independentes de uma mesma amostra ou entre amostras semelhantes.

A precisão intra-dias foi avaliada em todos os níveis de concentração da curva analítica usando o esgoto lab-made isento dos analitos.

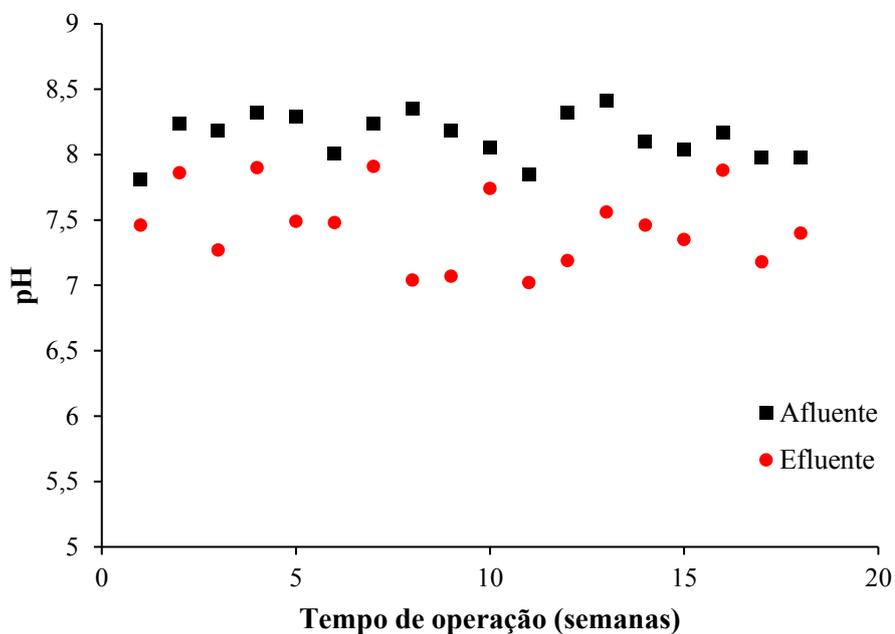
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. pH

A acidez é um importante parâmetro para a digestão anaeróbia, uma vez que a inibição do processo anaeróbio por ácidos graxos voláteis está associada ao pH. Deste modo os ácidos graxos voláteis devem estar em equilíbrio com a alcalinidade do meio e para a grande maioria das bactérias. O pH ótimo de crescimento se localiza na faixa entre 6,5 e 7,5, porém as variações máximas e mínimas estão entre pH de 4,0 a 9,0 (18).

Assim, na Figura 4.1 pode-se analisar a faixa de variação do pH do afluente e efluente do reator ABFSB durante sua operação, a qual correspondeu ao intervalo seguro sem promoção da falência do processo anaeróbio. Obteve-se, então, que a média de pH do afluente foi igual a $8,14 \pm 0,17$ e do efluente igual a $7,46 \pm 0,30$.

Figura 4.1 Acompanhamento da variação de pH do afluente e efluente do reator ABFSB durante o tempo de operação.

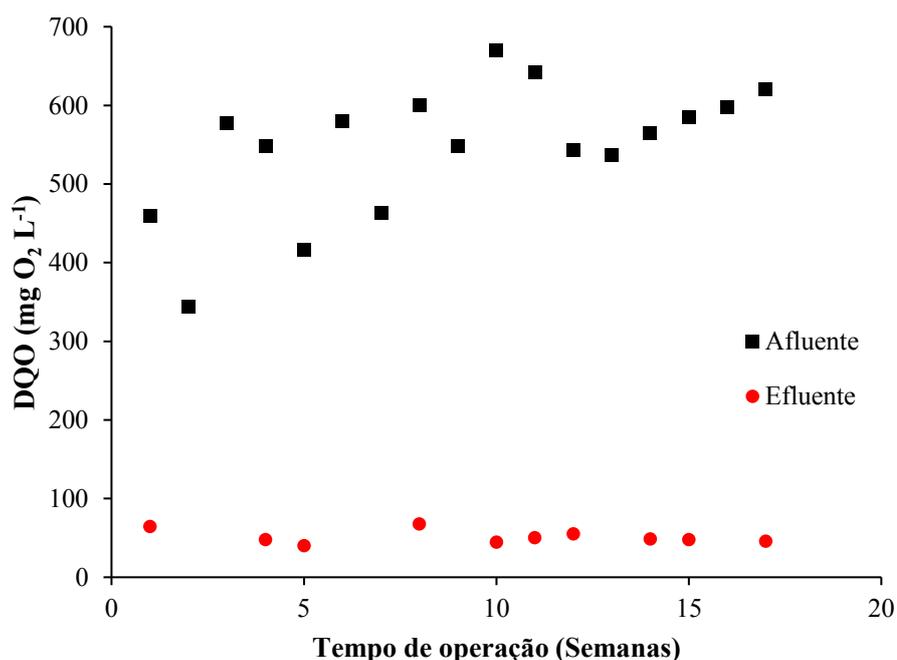


4.2. Remoção da matéria orgânica – Análise de DQO

Uma vez que o propósito de se realizar um tratamento de esgotos sanitários é utilizar um ou mais processos capazes de reduzir seu teor de impurezas de tal modo que os produtos finais possam ser reutilizados ou devolvidos ao meio ambiente, a análise da eficiência de remoção de matéria orgânica, em termos de DQO, certifica o desempenho do tratamento proposto pelo uso do reator ABFSB.

Com a aplicação do método colorimétrico descrito anteriormente obteve-se, ao longo das semanas de operação do reator, os valores descritos abaixo na Figura 4.2 de DQO para amostras de afluente e efluente.

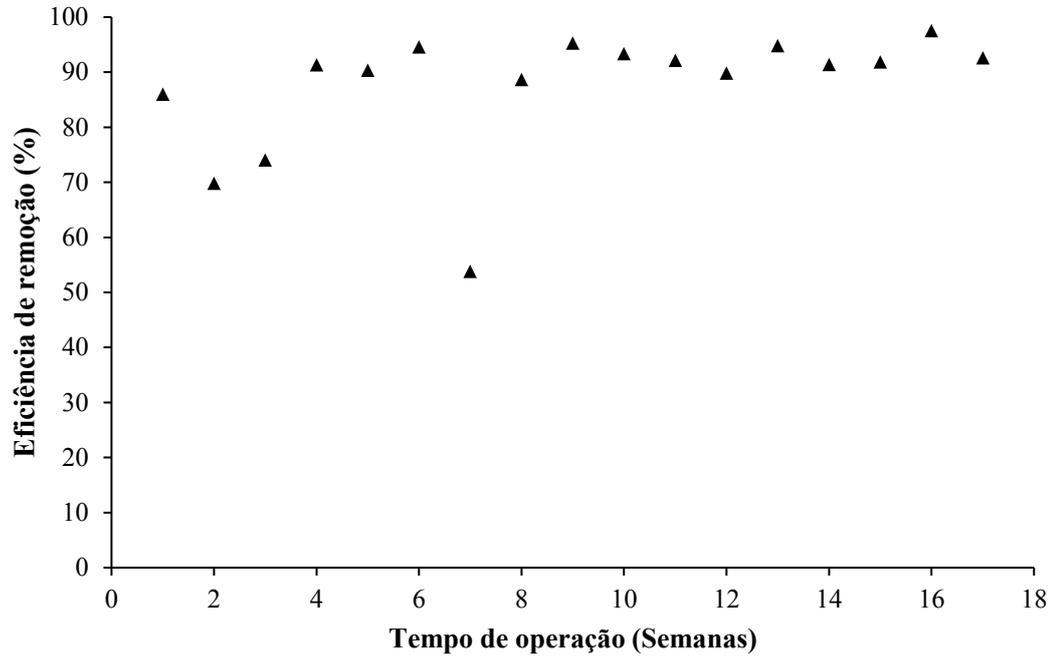
Figura 4.2 Valores de DQO para afluente e efluente do reator ABFSB durante o tempo de operação.



Dessa maneira a DQO do afluente apresentou média igual a $572 \pm 26,9$ mg O₂ L⁻¹, se aproximando da DQO teórica para esgoto doméstico. E a DQO do efluente apresentou média igual a $51,2 \pm 8,77$ mg O₂ L⁻¹.

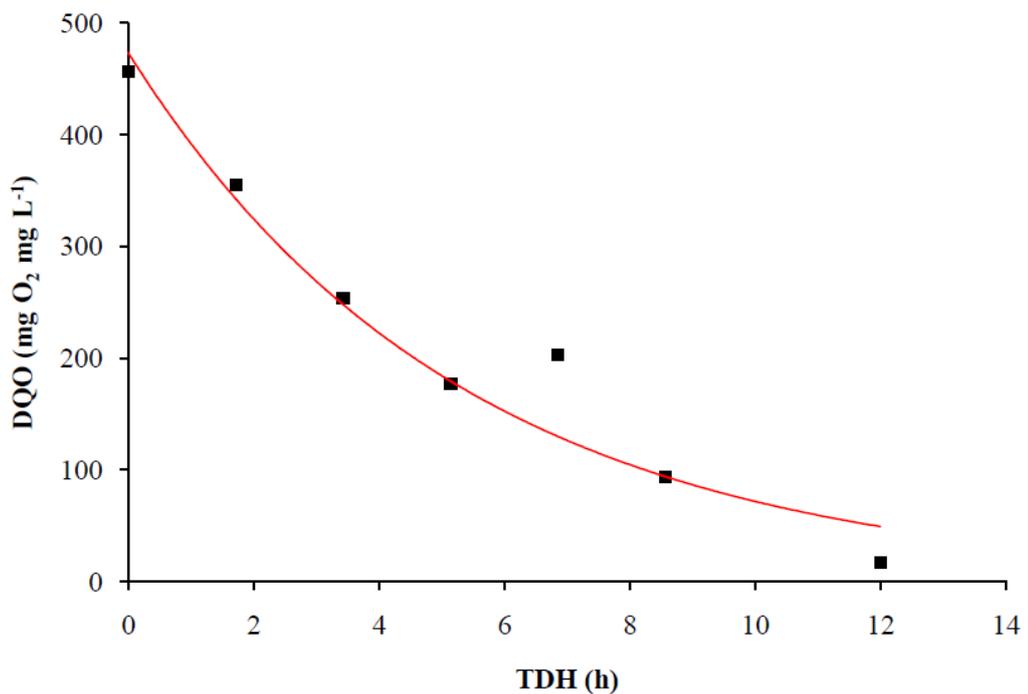
A fortificação do afluente com os antibióticos foi iniciada na 6^a semana de operação do reator e não apresentou interferência na eficiência da remoção da matéria orgânica, que se manteve em média igual a 87,5%, o que pode ser observado na Figura 4.3.

Figura 4.3 Eficiência da remoção de matéria orgânica do reator ABFSB durante o tempo de operação.



Com base na amostragem do afluente e dos pontos amostradores intermediários do reator, foi possível traçar o perfil cinético de remoção da matéria orgânica, o qual correspondeu a um modelo de primeira ordem (R^2 de 0,91), com constante cinética de remoção de $0,0947 \text{ h}^{-1}$. A Figura 4.4 apresenta remoção da DQO em função do TDH.

Figura 4.4 Curva da cinética de remoção da matéria orgânica após tratamento com ABFSB.



Uma vez que o LQ do método de DQO foi igual a 50 mg O₂ L⁻¹, considerou-se essa concentração como residual e assim foi possível representar o modelo cinético através da equação a seguir:

$$C_t = 50,0 + 420 \cdot e^{-0,0947 \cdot TDH}$$

4.3. Validação

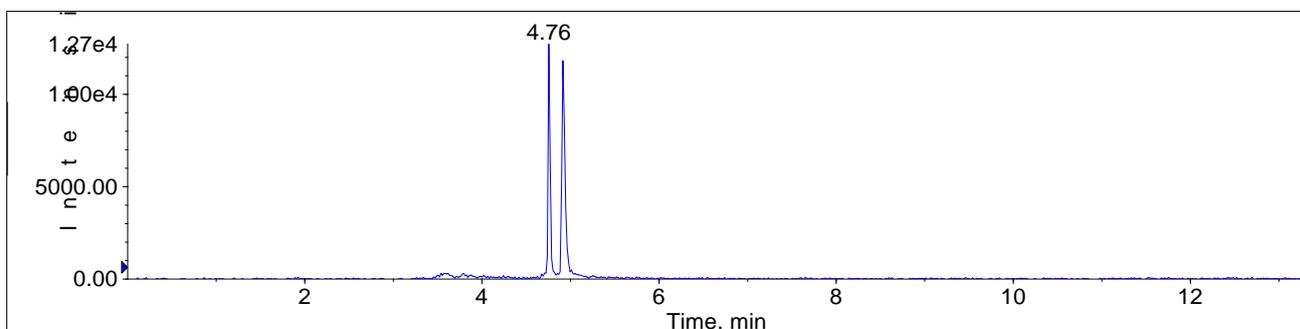
4.3.1. Seletividade

Segundo Ribani et al (16), a seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. De forma a garantir que o pico de resposta corresponda exclusivamente ao composto de interesse.

A técnica utilizada nesse trabalho para quantificação dos compostos mostrou-se altamente seletiva, ao usar SRM para analisar os compostos por MS/MS em alta resolução.

A seletividade é obtida também pelos tempos de retenção nos cromatogramas de íons das espécies protonadas dos padrões de ambos analitos. Para exemplificar a seletividade do método os cromatogramas dos compostos estudados são apresentados nas Figuras 4.5 a 4.7.

Figura 4.5 Cromatograma de íon total (TIC) de uma amostra de esgoto lab-made (afluente) fortificado com padrões de 250 ng L⁻¹ de SMTX (t_R=4,76 min) e TMP (t_R=4,92 min).



Conforme mostra a Figura 4.5, é possível observar a distinção entre os picos dos diferentes compostos, que tiveram uma separação com resolução de 1,5, permitindo separá-los com 99,3% de eficiência. Esse resultado é satisfatório já que os compostos apresentam alta similaridade estrutural e a pesar de uma pequena coeluição, a distinção entre as massas permite a quantificação destes compostos por MS/MS.

Figura 4.6 Cromatograma de íon total (TIC) de uma amostra de esgoto lab-made (afluente) fortificado com padrão de 250 ng L⁻¹ de SMTX.

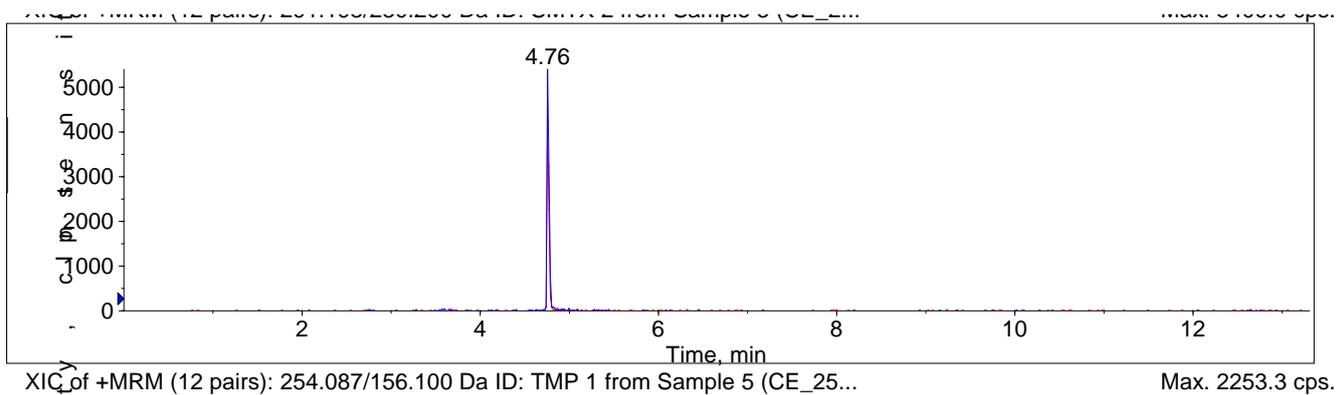
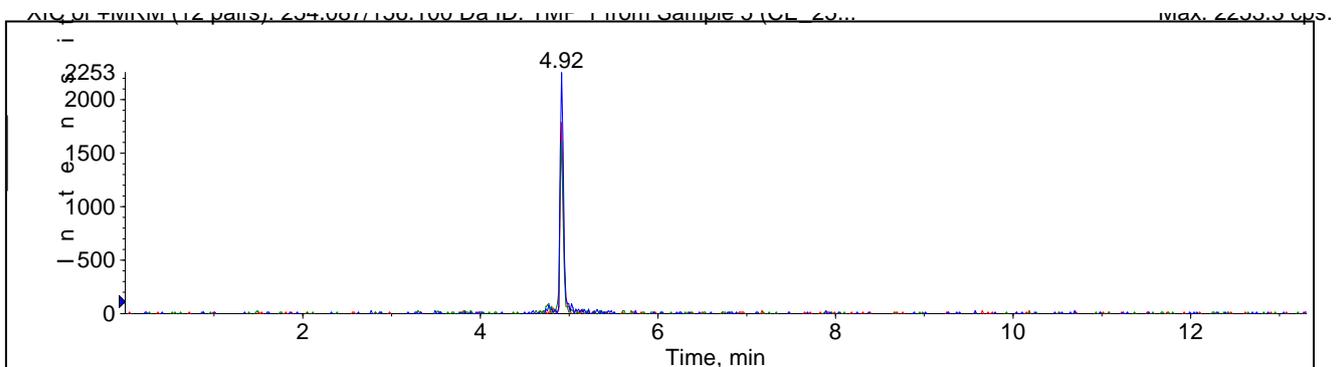


Figura 4.7 Cromatograma de íon total (TIC) de uma amostra de esgoto lab-made (afluente) fortificado com padrão de 250 ng L⁻¹ de TMP.

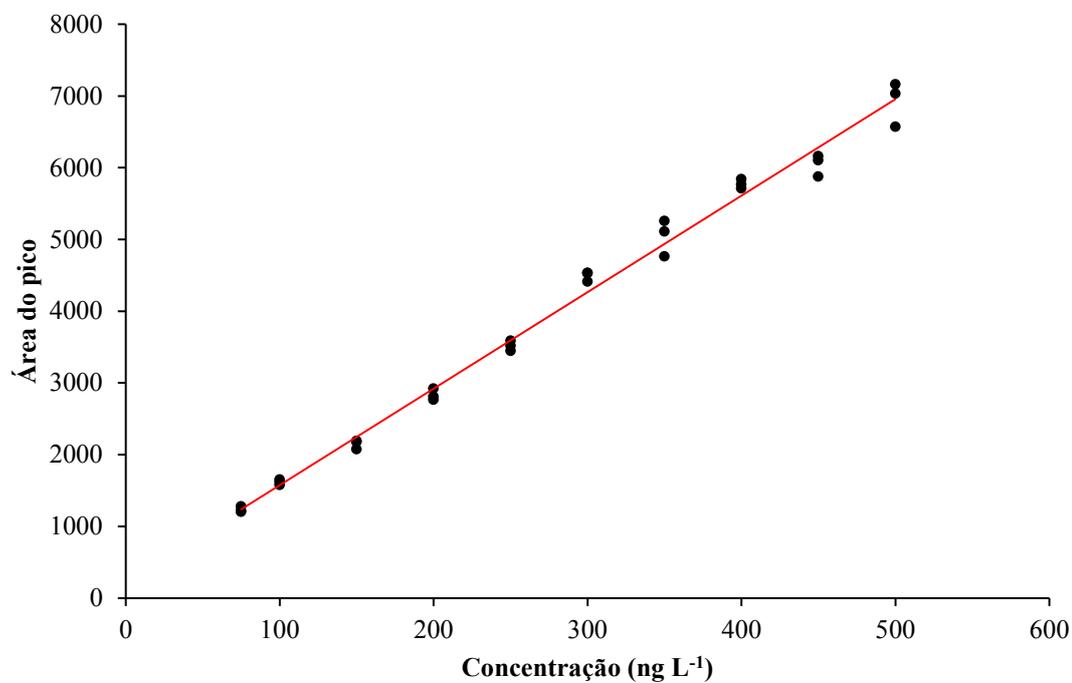


4.3.2. Calibração e Linearidade

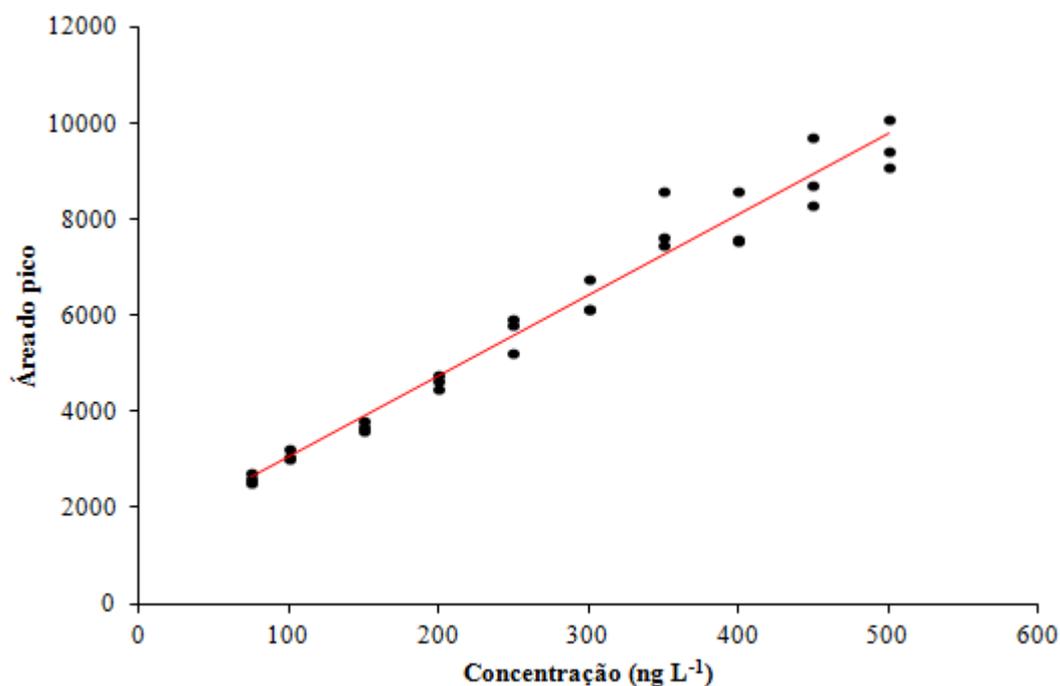
Neste trabalho, a padronização externa foi usada, já que apresenta os dados puros de área obtidos, para a quantificação dos compostos de interesse nas amostras de esgoto. Assim foram realizadas injeções de triplicatas dos padrões dos analitos nas concentrações de 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500 ng L⁻¹ em afluente e afluente do reator ABFSB, para obtenção das curvas analíticas, que foram calculadas pelo método dos mínimos quadrados.

Na Figura 4.5 abaixo ilustra-se a curva analítica que relaciona a concentração de SMTX em afluente com as áreas dos picos obtidos.

Figura 4.8 Curva analítica para SMTX em afluente do reator ABFSB.



O mesmo procedimento foi realizado também para TMP e na Figura 4.6 abaixo ilustra-se a curva analítica que relaciona a concentração de TMP em afluente com as áreas dos picos obtidos.

Figura 4.9 Curva analítica para TMP em afluente do reator ABFSB.

A linearidade foi avaliada com relação à falta de ajuste usando análise de variância. Houve falta de ajuste significativa, principalmente para as concentrações próximas ao LQ de ambos os analitos. Dessa maneira, foi necessário aplicar calibração ponderada, tendo como ponderação testadas $1/x$, $1/x^2$, $1/x^{0.5}$ e $1/y^2$ para determinar o melhor modelo.

O afluente do reator ABFSB tanto para SMTX quanto para TMP apresentaram como calibração ponderada $1/x$. Enquanto para o efluente desse reator teve como calibração ponderada SMTX $1/y^2$ e TMP $1/x^2$. A escolha dos fatores de ponderação foi baseada no menor erro relativo e também na menor soma dos resíduos devendo ser inferior a 15% no nível do LQ.

A Tabela abaixo reúne os parâmetros para construção e calibração do modelo linear da curva analítica para os antibióticos em afluente e efluente.

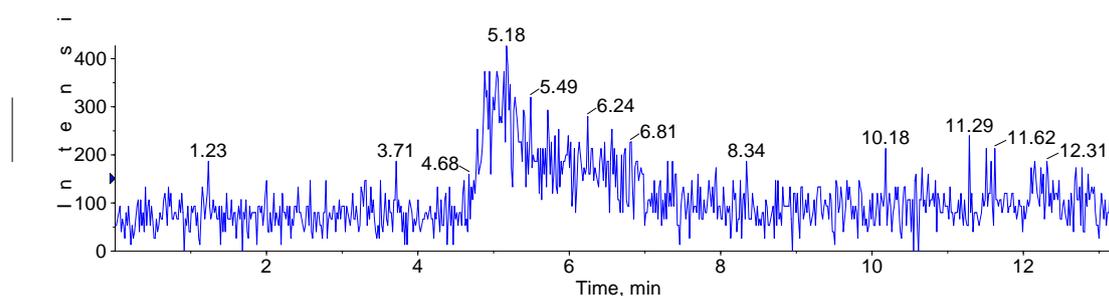
Tabela 4.1 Parâmetros das equações das curvas analíticas para amostras de afluente e efluente do reator ABFSB.

Matriz	Antibiótico	Ponderação	Inclinação	Intercepto
Afluente	SMTX	$1/x$	$1,62 \times 10^1$	$3,76 \times 10^3$
	TMP	$1/x$	$1,69 \times 10^1$	$1,37 \times 10^2$
Efluente	SMTX	$1/y^2$	$3,43 \times 10^1$	$7,41 \times 10^2$
	TMP	$1/x^2$	$1,19 \times 10^1$	$2,93 \times 10^3$

4.3.3. Limite de Quantificação e Detecção

Como descrito anteriormente, item 3.8.3, o LD e o LQ foram estipulados conforme a relação do sinal de uma amostra com o ruído do equipamento apresentado ao se injetar um branco, como mostra a Figura 4.10 a seguir.

Figura 4.10 Cromatograma do íon total (TIC) de uma amostra de afluente isenta dos analitos.



Dessa maneira os limites de detecção e quantificação do método obtidos para ambos os analitos foram iguais a 25 e 75 ng L⁻¹, respectivamente.

4.3.4. Precisão

Neste estudo, foram utilizados testes de repetibilidade para verificar a precisão do método. As amostras foram injetadas pelo mesmo analista, no mesmo instrumento, sem alteração das condições de análise, entre intervalo de tempo. A Tabela 4.2 mostra os intervalos da precisão intra-dias obtidas para os analitos nas amostras de afluente e efluente.

Tabela 4.2 Intervalo de precisão intra-dias obtidos nos níveis de concentração das curvas analíticas.

Matriz	Antibiótico	Precisão intra-dias (%)
Afluente	SMTX	0,77 a 6,9
	TMP	2,8 a 7,9
Efluente	SMTX	1,4 a 1,9
	TMP	1,1 a 5,0

De acordo com os critérios da ANVISA (19) para métodos bioanalíticos, a precisão deve admitir valores menores ou iguais a 20%. Assim por meio dos resultados obtidos indicam que a metodologia apresenta adequada repetibilidade, visto que os valores de precisão intra-dias avaliada foram de no máximo 7,9%.

4.4. Avaliação da remoção dos antibióticos

A adição dos antibióticos no afluente do reator ABFSB foi iniciada na 6ª semana, quando a remoção da matéria orgânica permaneceu constante, e então foram coletadas amostras após completar o TDH de 12 horas para analisar o comportamento da remoção após supostamente o antibiótico começar a ser detectado no efluente.

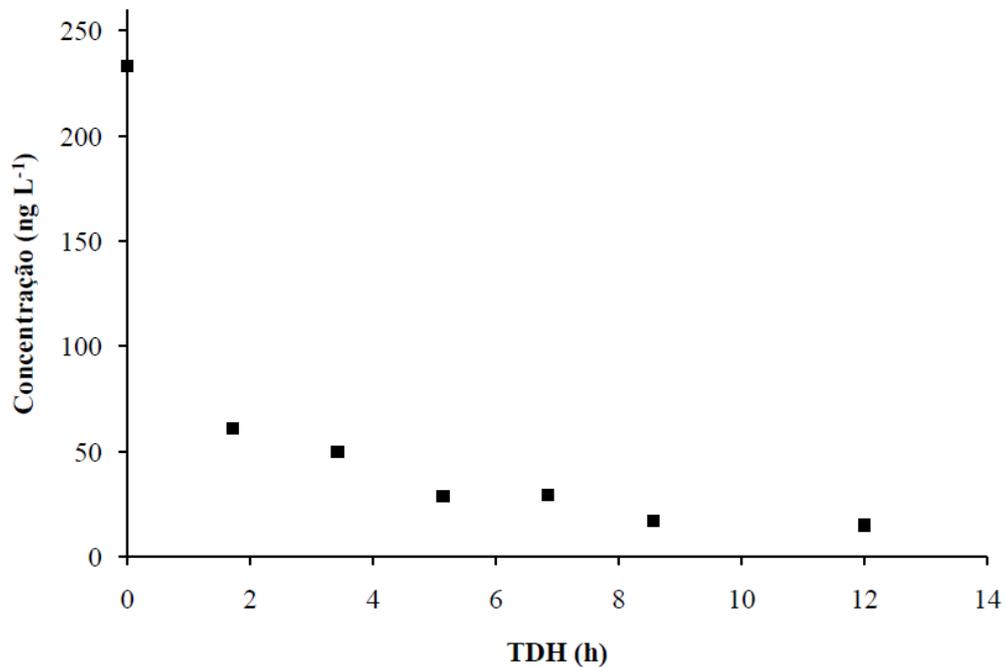
Em virtude de problemas relacionados ao equipamento de LC-MS/MS apenas foram completados os ensaios com os antibióticos nas concentrações de 200 ng L⁻¹.

4.4.1. Remoção do SMTX

A concentração média do SMTX no afluente foi igual de $259 \pm 22,1$ ng L⁻¹ e no efluente de $23,1 \pm 3,68$ ng L⁻¹, o que resulta em uma eficiência de remoção média de 81,6%. Ao analisar os valores, percebe-se que há uma variação significativa nas concentrações de afluente, isso se deve à degradação que ocorreu nas soluções estoque de SMTX e TMP, problemas esses já foram corrigidos para os próximos ensaios. Além de que devido essa concentração ser extremamente baixa, erros nos processos de pipetagem comprometem a concentração determinada no afluente e efluente.

Com base na amostragem do afluente e dos pontos amostradores intermediários do reator, foi possível traçar o perfil cinético de remoção do SMTX. A Figura 4.6 apresenta o modelo de melhor ajuste para a remoção do SMTX em função do TDH, o qual respondeu a um modelo de primeira ordem com ajuste de R² de 0,987 e constante cinética de remoção do antibiótico igual a 0,413 h⁻¹.

Figura 4.11 Curva da cinética de remoção do SMTX, em 200 ng L⁻¹, após tratamento com ABFSB.



Uma vez que o LDetecção do método de SPE online-LC-MS/MS foi igual a 25 ng L⁻¹, considerou-se essa concentração como residual e assim foi possível representar o modelo cinético através da equação a seguir:

$$C_t = 25,0 + 223 \cdot e^{-0,413 \cdot TDH}$$

Através desse modelo pode-se observar que há um grande decaimento da concentração do SMTX no primeiro ponto do reator, correspondente a TDH de 4h, permitindo reduzir o TDH e manter a remoção do antibiótico em um tempo reduzido de operação.

4.4.2. Remoção da TMP

A concentração média de TMP no afluente foi igual a 205 ± 8,53 ng L⁻¹, após solução da degradação das soluções em estoque do antibiótico.

Trabalhando na concentração de fortificação de 200 ng L⁻¹, a TMP está apresentando para esse reator uma remoção de 100%. Em virtude dessa alta eficiência de remoção, quando realizados os perfis cinéticos verificou-se que já no primeiro ponto do reator, que corresponde a TDH de 4 horas, não era possível quantificar a TMP conforme LQ. Dessa maneira, para essa

concentração não foi possível estipular a cinética de remoção. Sendo necessário acompanhar o perfil de remoção ao se aumentar a concentração no afluente para 400 e 800 ng L⁻¹, etapas futuras do presente projeto.

5 CONCLUSÃO

Foi desenvolvido e aplicado método analítico para determinação e monitoração de sulfametoxazol e trimetoprima, em afluente e efluente de biorreator anaeróbio de leito fixo ordenado. O método desenvolveu extração em fase sólida online e subsequente análise utilizando LC-MS/MS e sistema de column switching para análise direta.

O método mostrou-se eficiente na determinação dos analitos de interesse tendo em vista os parâmetros de validação: linearidade, seletividade, limite de detecção e quantificação e precisão. A fase do SPE HLB apresentou seletividade suficiente para pré-concentrar e extrair todos analitos presentes no esgoto lab-made. A etapa do preparo de amostra foi simplificada para ajuste de pH e filtração.

Dessa maneira o método foi aplicado para determinação dos compostos em amostras de efluente e afluente do reator ABFSB para avaliação da eficiência de remoção deste tratamento colocado sobre hipótese. Assim, foi verificado que o reator ABFSB apresentou considerável eficiência de remoção do SMTX e TMP trabalhando com o TDH de 12 horas na concentração de 200 ng L^{-1} , levando a uma eficiência média de 81,6% e 100%, respectivamente. Sendo tais resultados são satisfatórios quando comparado a outras tecnologias utilizadas em ETE.

Ainda pretende-se avaliar este tratamento quando a concentração de SMTX e TMP for aumentada a 400 e 800 ng L^{-1} , verificando se ocorre mudança na cinética de remoção ou se há inibição da atividade microbiana.

6 REFERÊNCIAS

1. KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecological Indicators**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2008.
2. BOXALL, A. B. A. et al. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: What Are The Big Questions? **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 9, 2012.
3. MELO, S. A. S.; TROVÓ, A. G.; BAUTITZ, I. R.; NOGUEIRA, R. F. P. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 188-197, 2009.
4. QUEIROZ, F. B. et al. Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disruptors in raw sewage and their behavior in UASB reactors operated at different hydraulic retention times. **Water Science and Technology**, v.66, n.12, p. 2562-2569,2012.
5. TAHAN, G. P. et al. RP-LC method for simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim content in veterinary drugs. **Eclética Química**, v. 40, n. 3, p. 32-41, 2015.
6. INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos analíticos, INMETRO. Rio de Janeiro, 2010.
7. LIMA GOMES, P. C. F.; TOMITA, I. N.; SANTOS-NETO, A. J.; ZAIAT, M. Rapid determination of 12 antibiotics and caffeine in sewage and bioreactor effluent by online column switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 8787-8801, 2015.
8. BILA, D. M., & DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.
9. HARTIG, C.; STORM, T.; JEKEL, M. Detection and identification of sulphonamide drugs in municipal waste water by liquid chromatography coupled with electrospray

- ionisation tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 854, n.163, p.163-173, 1999.
10. KOLPIN, D. W.; FURLOG, E. T.; MEYER, M. T.; THURMAN, E. M.; ZAUGG, S.D.; BARBER, L. B.; BUXTON, H. T. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999–2000: A National Reconnaissance. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 1202, p. 1202-1211, 2002.
 11. SACHER, F.; LANGE, F. T.; BRAUCH, H.; BLANKENHORN, I. Pharmaceuticals in groundwaters: Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. **Journal of Chromatography A**, v. 938, n.199, p. 199-210, 2001.
 12. HIRSCH, R.; TERNES, T.; HABERER, K.; KRATZ, K.-L.; Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **Science of The Total Environment**, v. 225, n. 109, p. 109-118, 1999.
 13. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) – Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2008.
 14. MOCKAITIS, G.; RODRIGUES, J. A. D.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Toxic effects of cadmium on anaerobic biomass: kinetic and metabolic implications. **Journal of Environmental Management**, v. 106, p. 75–84, 2012.
 15. CAMILOTI, P. R.; MOCKAITIS, G.; RODRIGUES, J. A. D.; DAMIANOVIC, M. H.R. Z.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Innovative anaerobic bioreactor with fixed structured bed (ABFSB) for simultaneous sulfate reduction and organicmatter removal. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 89, n. 7, p. 1044–1050, 2014.
 16. RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.; MELO, L.F.C. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Quimica Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

17. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th. ed. Washington, DC, USA: American Public Health Association, 1998.
18. PEREIRA, E. L.; CAMPOS, C. M. M.; MOTERANI, F. Efeitos do pH, acidez e alcalinidade na microbiota de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) tratando efluentes de suinocultura. **Ambi-Agua**, Taubaté, v. 4, n. 3, p. 157-168, 2009.
19. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para métodos analíticos e bioanalíticos, Resolução RE N° 899. 2003.
20. OLIVEIRA, C. A. Estudo e avaliação da remoção do antibiótico sulfametazina em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF). 55 f. Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2015.
21. RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, C. J. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. **Journal WPCF**, v. 5, p. 406-411, 1986.
22. ZAIAT, M. Desenvolvimento e análise de biorreatores anaeróbios contendo células imobilizadas para tratamento de águas residuárias: reator anaeróbio de leito fixo e reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais. 2003. 122 f. Tese (livre docência) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.
23. CATTONY, E. B.M. et. al. Remoção de etanol e benzeno em reator anaeróbio horizontal de leito fixo na presença de sulfato. **Engenharia Ambiental e Sanitária**, v.12, n.2, 2007.
24. BILA, D. M.; DEZZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v.30, p. 651-666, 2007.
25. RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. **Journal WPCF**, v. 58, p. 406-411, 1986.

26. HALLING-SORENSEN, B.; NIELSEN, S.N.; LANZKY, P.F.; INGERLEV, F.; LUTZHOFT, H.C.H.; JORGENSEN, S.E. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - A review. **Chemosphere**, v. 36, n. 2, p. 357-394, 1998.