



7, 8 e 9  
Março 2018  
ÉVORA  
Évora Hotel

GESTÃO DOS  
RECURSOS HÍDRICOS:  
NOVOS  
DESAFIOS

## DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS EM AMOSTRAS DE ÁGUA NO NORDESTE DO BRASIL

Análise de cinco fármacos em amostras de água do Rio Anil na Ilha de São Luís, MA, Brasil

**Rogério Luís Nascimento de Jesus<sup>1</sup>; Marta dos Santos Diniz<sup>2</sup>; Lanna Karinny Silva<sup>3</sup>; Jean Carlo Ferreira Goiabeira<sup>4</sup>; Adriana das Mercês Pereira Ferreira<sup>5</sup>; Natilene Mesquita Brito<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Mestrando em Química, Instituto Federal de Educação, ciência e tecnologia do Maranhão, rogerioluiss@gmail.com

<sup>2</sup>Mestranda em Química, Instituto Federal de Educação, ciência e tecnologia do Maranhão, marta.diniz@acad.ifma.edu.br

<sup>3</sup>Engenheira Química, Instituto Federal de Educação, ciência e tecnologia do Maranhão, lanna@ifma.edu.br

<sup>4</sup>Mestrando em Química, Instituto Federal de Educação, ciência e tecnologia do Maranhão, jcgoiabeira@hotmail.com

<sup>5</sup>Mestranda em Química, Instituto Federal de ciência e tecnologia do Maranhão, drika.mpf@hotmail.com

<sup>6</sup>Profª. Drª em Química, Instituto Federal de ciência e tecnologia do Maranhão, natilene.brito@ifma.edu.br

### Resumo

Os antibióticos são substâncias utilizados mundialmente para inibir o crescimento de microrganismos patogênicos no corpo humano ou animal, e também como promotores de crescimento. O uso indiscriminado dos antibióticos vem causando grande impactos devido à possibilidade de surgimento de cepas altamente resistentes aos antibióticos convencionais e na ocorrência de casos fatais de infecções hospitalares, sendo as fluoroquinolonas umas das principais classes de antibióticos usados no trato de infecções do sistema respiratório, digestivo e urinário de humanos e animais por sua ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os representantes mais conhecidos desta classe de fármacos são o ciprofloxacino, norfloxacino, enrofloxacino, sarafloxacino e levofloxacino. Contudo essas substâncias estão presentes nas matrizes ambientais em baixas concentrações, a nível de  $\mu\text{g L}^{-1}$  e são persistentes no meio ambiente de forma ativa e não são removidas nas estações de tratamento de esgotos, tornando-se provável a ingestão de água contaminada, sendo de extrema importância a análises de fármacos em matrizes ambientais para avaliação dos mesmos em distintos ecossistemas, principalmente em águas superficiais. Neste trabalho, foi aplicada a técnica de microextração dispersiva líquido - líquido (DLLME) e posterior análise por HPLC para detectar a presença dos cinco antibióticos citados da classe dos fluoroquinolonas no Rio Anil, localizado em São Luís no Maranhão, Brasil.

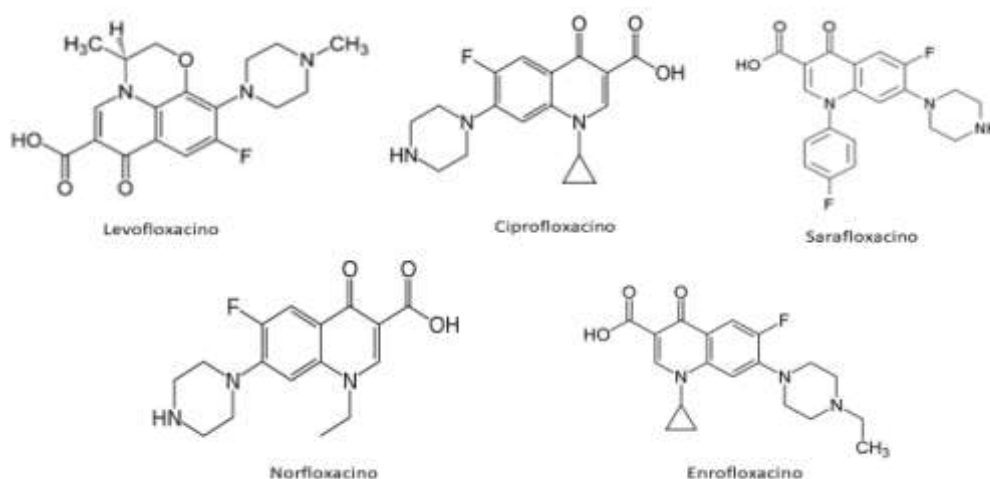
**Palavras-chave:** Fármacos, Antibióticos, Água e Microextração.

**Tema:** 8 - Qualidade da água e dos ecossistemas

## 1 INTRODUÇÃO

Vários contaminantes são encontrados em águas de rios, gerados por processos industriais, aumento populacional, falta de saneamento básico (Oliveira, 2015). As substâncias encontradas relacionam-se com suas respectivas fontes de poluição, tal como o esgoto doméstico para os antibióticos (Bila, 2003). No entanto não são desconsideradas as possíveis fontes como o esgoto hospitalar, esgotos rurais e de indústrias farmacêuticas (Heberer, 2002).

Os antibióticos são substâncias naturais ou sintéticas que tem ação bactericida e bacteriostática, sendo classificadas de acordo como a estrutura de base (Walsh, 2003). Estas substâncias são utilizadas com frequência para potencializar a produção de suínos, aves, bovinos e na aquicultura, o que diversifica este poluente nas matrizes ambientais (Bila, 2003). Neste trabalho, foram estudados potentes antibacterianos usados amplamente em seres humanos e na pecuária, denominados antibióticos fluoroquinolônicos. Em função disso, estes compostos têm se distribuído no meio ambiente, oriundos de efluentes domésticos e resíduos da pecuária, pois também podem ser usados como fertilizantes (Nikolaou, 2007). Os antibióticos têm sido encontrados em várias investigações, de acordo com Hart et al., (1998), onde afirma que encontrou cerca de 3 a 87 g L<sup>-1</sup> da fluoroquinolona ciprofloxacino em efluentes hospitalares.



**Figura 1.** Estruturas moleculares das fluoroquinolonas CIPRO, LEVO, NORF, ENRO E SARA.

Fonte: Adaptado de Silveira, 2006.

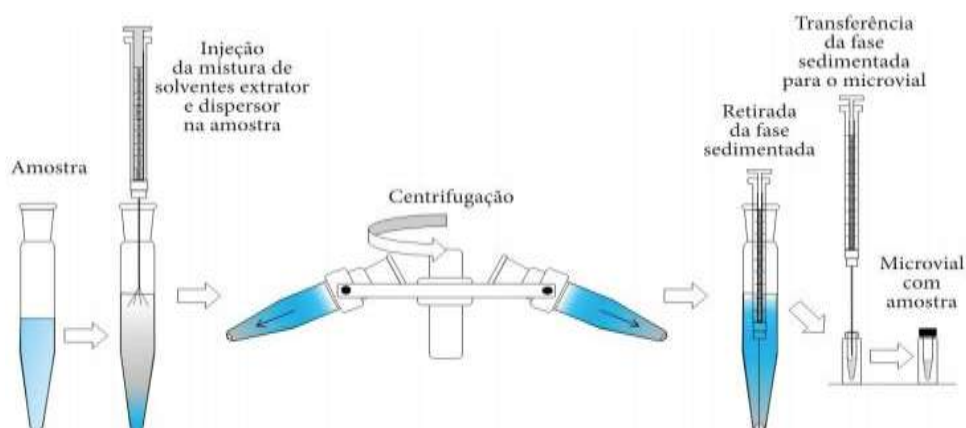
A presença desses compostos no meio ambiente pode gerar impactos negativos em seres aquáticos, terrestres e em qualquer nível de hierarquia biológica (Fent, 1996). A resistência aos antibióticos acontece principalmente pela seleção de cepas bacterianas em ambientes que ocorrem concentrações desses compostos, como por exemplo, no intestino humano, onde o indivíduo é submetido a tratamento com altas dosagens e isso gera uma liberação de organismos resistentes nas fezes, juntamente com antibióticos (Kümmerer, 2009). Esses

microrganismos, presentes nos excretos e dejetos, em conjunto com os produtos de degradação, acabam sendo lançados na pia, podendo alcançar os ambientes aquáticos (Kümmerer, 2010). Atualmente, têm-se intensificado o monitoramento de fármacos em águas superficiais, uma vez que este recurso hídrico passa por vários processos de tratamento para torna-se potável e atender a portaria nº 2914/2011, cujos parâmetros microbiológicos, físicos e químicos estejam condizentes com o padrão de potabilidade e não ofereça risco a saúde de quem a consome (Brasil, 2011).

A análise de fármacos em matrizes ambientais é imprescindível para a avaliação dos mesmos em diferentes ecossistemas. Antes da determinação analítica, os fármacos devem ser submetidos a um processo de preparo de amostra, uma etapa extremamente importante para a obtenção de resultados confiáveis e que consiste em extrair o analito de interesse para que o efeito da matriz seja minimizado e ocorra uma melhora nos limites de detecção e quantificação (Nováková; Vlčková, 2009).

As técnicas mais tradicionais para extração são a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida. No entanto, essas técnicas possuem desvantagens, como uso de grande volume de solvente durante o preparo da amostra (Alpendurada, 2000). Outros métodos de pré-tratamento como extração assistida por microondas (MAE) e extração em fluido supercrítico (SFE) têm sido desenvolvidos. As principais limitações destes métodos incluem extração demorada, baixos fatores de enriquecimento, tediosa operação, e as grandes quantidades de solventes orgânicos tóxicos utilizados (Yan et al, 2011).

Uma das técnicas que atraem especial atenção é a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), que foi introduzida em 2006 por Rezaee et al., para a pré-concentração dos analitos orgânicos de matrizes aquosas. Este método baseia-se em um sistema de solventes, em que se injeta o solvente extrator e dispersor na amostra aquosa por meio de uma microseringa. A solução é agitada e forma uma solução turva no tubo de ensaio. Logo após o estado de equilíbrio é alcançado, a mistura é centrifugada e a fase sedimentada contendo o analito é recolhida. Em seguida, injeta-se o volume desejado da fase sedimentada utilizando a microseringa no sistema cromatográfico para análise posterior (Mahugo-Santana, 2011), como mostrado na Figura 2.



**Figura 2.** Diagrama simplificado demonstrando as etapas da DLLME.

Fonte: adaptado de Martins et al., (2012).

Uma das vantagens da DLLME é a capacidade de concentração dos analitos. Essa concentração é dada pelo fator de enriquecimento, onde  $C_{hplc}$  é a concentração final após a microextração que será injetado no sistema cromatográfico. As demais vantagens do método DLLME são a simplicidade de operação, rapidez, baixo custo, alta recuperação, alto fator de enriquecimento, possibilidade de um grande número de amostras a ser extraída em paralelo e perspectiva de ampla aplicação na análise de traços. (Lima, et al., 2013). Isso possibilita a aplicabilidade no estado do Maranhão.

A falta de saneamento básico e o desenvolvimento da pecuária são fatores responsáveis pelo aumento do consumo de fármacos e posterior descarte nos corpos d'água sem tratamento que faz referência a realidade da cidade de São Luís por possuir baixas condições de coleta e tratamento de efluentes urbanos. Diante disso, a relação de monitoramento e estudo destes poluentes nos diferentes compartimentos ambientais do estado que são imprescindíveis para uma gestão sustentável das atividades econômicas, garantia da qualidade de vida da população e preservação da biodiversidade.

Portanto, o objetivo da pesquisa foi determinar as concentrações de antibióticos das classes de fluoroquinolonas no rio Anil, localizado na cidade de São Luís, no Maranhão, Brasil.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

O sistema cromatográfico de CL usado pertencente à marca Shimadzu® LC 20AT Prominence, do modelo DGU-20A5R com duas bombas de alta pressão acopladas a um detector de fluorescência, modelo RF-20A também da Shimadzu®. Para o controle do equipamento e obtenção dos dados, foi feito o uso de um microcomputador e do software LCsolution® da Shimadzu.

Para a medição do pH e Temperatura foi utilizado o multiparâmetro Fisher Scientific Accculmet AP72. Para a medição de condutividade e sólidos totais foi utilizado o multiparâmetro Fisher Scientific Accculmet AP75. O Oxigênio Dissolvido utilizou-se o Oxímetro Hanna HI 9146.

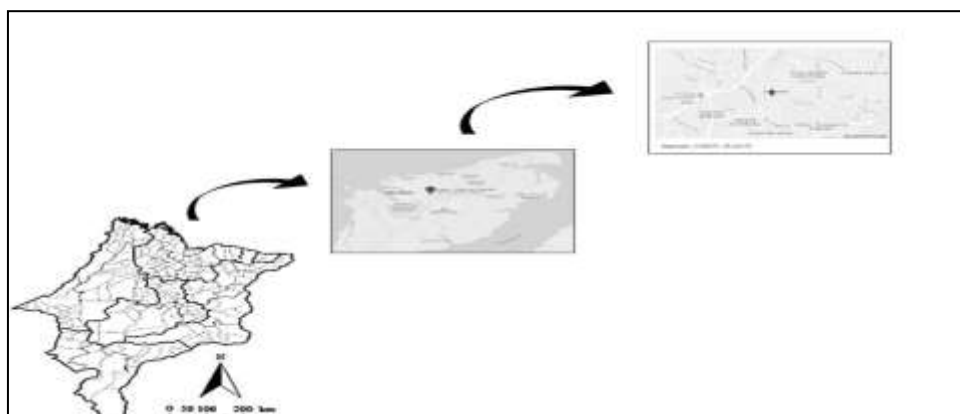
Os padrões utilizados foram cedidos pelo GEA do IFMA, ambos da Sigma Aldrich®, com pureza mínima de 98%, tendo sido adquiridos em estado sólido, sob forma de pó ou de pequenos cristais amarelados.

Deve-se ressaltar que todas as vidrarias utilizadas para manuseio dos padrões, reagentes, solventes e soluções foram previamente lavadas com solução de Extran® alcalino 5% e depois enxaguados com água Milli Q e ambientados com o solvente apropriado, respectivamente.

### 2.1 Locais de coleta

O local da coleta foi determinado no rio Anil, exatamente no ponto Oásis (-2.549270, -44.232179), como descrito na Figura 3, sendo baseado nas características apresentadas

pela cidade de São Luís em relação a poluição dos recursos hídricos, associado a falta de saneamento básico e esgoto doméstico não tratado lançados diretamente no rio.



**Figura 3.** Mapa do ponto de coleta

## 2.2 Preparo das soluções

Partindo dos compostos sólidos dos padrões dos antibacterianos fluoroquinolônicos em estudo, foram preparadas soluções estoque de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de cada analito. Os analitos foram diluídos em metanol e em acetonitrila.

Para o preparo das soluções de trabalho, partiu-se primeiramente da mistura de alíquotas iguais das diferentes soluções padrão e em seguida, diluiu-se esta mistura com a fase móvel escolhida para análise.

## 2.3 Curva analítica

Cada curva analítica foi construída através da relação entre o sinal analítico e a concentração da substância de interesse. Os valores dessa razão foram utilizados para obter a equação da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. O coeficiente de correlação foi utilizado para avaliar e estimar a significância dos coeficientes da equação da reta e  $R^2$  que representa uma medida descritiva da qualidade do ajuste do modelo (Brito et al., 2003; Lima et al., 2013). O Quadro 1 mostra as respectivas equações da reta utilizadas e os coeficientes de correlação lineares obtidos no estudo.



7, 8 e 9  
Março 2018  
ÉVORA  
Évora Hotel

GESTÃO DOS  
RECURSOS HÍDRICOS:  
NOVOS  
DESAFIOS

**Quadro 1.** Curva analítica e coeficiente de correlação dos analitos de estudo.

Compostos	Curva analítica	Coeficiente de correlação
Levofloxacino	$Y=1725,6X-4391,5$	0,9981
Norfloxacino	$Y=13560X-105432$	0,9975
Ciprofloxacino	$Y=6830X-48370$	0,9997
Enrofloxacino	$Y=22036X+92211$	0,9997
Sarafloxacino	$Y=7358,9X+8332,2$	0,9961

De acordo com Brito et al., (2003), um valor de  $R^2$  maior que 0,9995 é requerido para considerar um modelo linear.

## **2.4 Protocolo DLLME para análises de compostos Fluoroquinolônicos.**

### **2.4.1 Preparo da amostra**

Foi utilizado o cartucho da marca Oásis HLB®. As amostras foram extraídas pelo seguinte procedimento:

Condicionamento do cartucho: 2,5 x 2 mL de diclorometano + 2,5 x 2 mL de metanol + 3 x 3 mL de ácido fosfórico. Com pH 3.

Adição da amostra: 200 mL com pH 3 e acidificada com ácido fosfórico.

Lavagem do cartucho: 3 x 3 mL de solução pH 2 a 3 de Ácido fosfórico a 5% de metanol.

Eluição dos analitos: 3 x 2 mL de metanol a 2% de ácido fórmico.

Secagem do cartucho: Nitrogênio a 0,1 mL

Reconstituição: 1 mL da fase móvel (30% de metanol/70% tampão fosfato).

### **2.4.2 Condições de análise cromatográficas**

A coluna utilizada foi a Luna C18, Phenomenex® (250 x 4,6 mm; 5 µm). A fase móvel usada foi metanol e tampão fosfato ( $\text{NaHPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  0,04 M e pH 3 com  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a 85%). Comprimento de onda de excitação e emissão (280 e 450 nm). A fase móvel foi analisada de forma gradiente como mostrado na Quadro 2.



7, 8 e 9  
Março 2018  
ÉVORA  
Évora Hotel

GESTÃO DOS  
RECURSOS HÍDRICOS:  
NOVOS  
DESAFIOS

**Quadro 2.** Análise modo gradiente.

$\Delta$ Tempo (min)	Solvente metanol (%)	Tampão fosfato (%)
0-7,5	20	80
7,5-9	25	75
9-25	35	65
25-28	20	80

## 2.5 Determinação de Fluoroquinolonas em amostras reais

As amostras de água do rio Anil, foram coletadas em frascos âmbar com volume de 1L, sendo um monitoramento de 36 horas, com periodicidade de 1 hora para os parâmetros físico-químicos e 6h para análise de antibióticos, onde as últimas foram acondicionadas em caixa térmica devidamente isoladas e transportadas para o laboratório do IFMA, onde foram estocadas na geladeira a 2°C, para posterior acidificação com  $H_3PO_4$  até chegar em pH 3 e filtradas a vácuo com filtro de membrana 0,22  $\mu m$  de nitrocelulose (Millipore) e guardadas a 4°C antes da extração., sendo analisadas em maio de 2017 (Mompelat et al., 2013).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físico-químicos analisados (Quadro 3) para água superficial do rio Anil foram pH, Oxigênio dissolvido, Condutividade elétrica, Sólidos Totais Dissolvidos, Temperatura e Sólidos Totais em Suspensão de acordo com o CONAMA 357/2005 e 430/2011.

**Quadro 3.** Resultado dos Parâmetros Físico-Químicos

Horário	pH	OD mg L <sup>-1</sup>	C.E. $\mu S\ cm^{-1}$	TDS ppm	T °C	TSS (Mg L <sup>-1</sup> )
09:00-14:00	5,71	3,01	268,67	133,75	28,72	9,90
15:00-20:00	5,95	2,44	295,33	147,33	28,70	7,73
21:00-02:00	6,05	3,17	249,17	124,67	28,07	3,20
03:00-08:00	6,10	3,79	608,50	302,83	28,30	2,53
09:00-14:00	5,63	4,11	392,33	196,50	28,92	1,07
15:00-20:00	5,85	3,37	516,50	250,67	29,08	3,00

O princípio básico da medição de pH é a determinação da atividade dos íons Hidrogênio por uma medida potenciométrica, onde o método é praticamente isento de interferentes, dado que a temperatura da amostra no potencial do eletrodo é compensada no próprio aparelho (Weaver, 2007). Neste monitoramento, foi encontrado valores que não condizem com os definidos pela portaria 357/05 que variam entre 6 a 9, sendo a menor média obtida



no valor de 5,71 e a maior 6,10. O oxigênio dissolvido na água está associado a diversas variáveis tais como temperatura, salinidade, interferência antrópica e atividade de microrganismos (Holanda, 2017). Contudo o CONAMA cita valores diferenciados para água doce de classe I, II e III, sendo estes em qualquer amostra, não inferior a  $6 \text{ mgL}^{-1}$ ,  $5 \text{ mgL}^{-1}$  e  $4 \text{ mgL}^{-1}$ , respectivamente (Brasil, 2005). No entanto alguns resultados obtidos não se enquadram nos valores da resolução, uma vez que as médias variam de 2,44 a 4,11. A Condutividade elétrica é medida através da capacidade dos materiais de conduzirem ou transmitirem corrente elétrica na água, pois esta mediação é influenciada por fatores como os tipos de íons e a temperatura, uma vez que não existe legislação de limite superior deve-se observar as variações que associam-se à contaminação de efluentes industriais, sendo expressa quantitativamente neste trabalho por microSiemens por centímetro ( $\mu\text{S/cm}$ ). De acordo com Gasparotto, (2011) as amostras muito contaminadas por esgotos podem variar de 100 a 10.000 ( $\mu\text{S/cm}$ ). Contudo os valores obtidos variam entre as médias de 249,17 e 608,50 e certificam a contaminação. A presença de sólidos na água pode ter origens naturais, quanto antrópicas, estas partículas têm diâmetro inferior a  $10^{-3} \mu\text{m}$  e pode causar impactos negativos a vida aquática (Bergaya, 2006; Nogueira, 2015). Os valores para água doce de classe II são de limite máximo  $500 \text{ mg L}^{-1}$  (Brasil, 2005). O maior valor obtido nas análises é de 302,83 para sólidos totais dissolvido, visto que se enquadra na resolução. Embora o CONAMA 357/05 não defina valores, a temperatura duma água deverá ser, no inverno superior à temperatura do ar, e inferior no verão. Além de ter um efeito tóxico direto, a temperatura afeta a solubilidade e a toxicidade de muitos outros parâmetros. Geralmente, os sólidos dissolvem-se melhor a quente, enquanto os gases preferem águas mais frias para se dissolverem (Silva, 2002). O aumento da temperatura é associado ao lançamento de esgoto, apesar de valores médios obtidos de  $28,63^{\circ}\text{C}$ , a portaria 430/11, estabelece que os poluentes devem ser lançados nos corpos d'água, com temperatura inferior a  $40^{\circ}\text{C}$ , e variação do corpo receptor não ultrapasse a  $3^{\circ}\text{C}$ . Os resultados encontrados para o parâmetro sólidos totais em suspensão (TSS) apresentaram médias com valores baixos 1,07 a 9,90 contemplado por condições climáticas que condizem com a coleta e análise, uma vez que valores elevados podem causar impactos negativos a vida aquática, pois retém bactérias e resíduos orgânicos no fundo do rio.

### 3.2 Determinação de antibióticos em amostras reais

Os resultados dos antibióticos analisados do grupo das fluoroquinolonas (Quadro 4) para água do rio Anil, ponto oásis foram Levofloxacino, Norfloxacino, Ciprofloxacino, Enrofloxacino e Sarafloxacino sem valores de referência, pela ausência de portaria que regulamente as concentrações dessas substâncias no meio ambiente.





7, 8 e 9  
Março 2018  
ÉVORA  
Évora Hotel

GESTÃO DOS  
RECURSOS HÍDRICOS:  
NOVOS  
DESAFIOS

**Quadro 4.** Resultado das análises dos antibióticos em amostras reais

Coleta	Compostos (ng. L <sup>-1</sup> )				
	Levo	Norf	Cipro	Enro	Sara
09:00-14:00	*	40	48,8	*	*
15:00-20:00	*	10	*	*	*
21:00-02:00	*	67,7	112,6	*	*
03:00-08:00	*	10,6	*	*	*
09:00-14:00	21,6	*	11,4	*	*
15:00-20:00	100,6	*	49,9	*	*

\* corresponde a concentrações não detectadas.

As concentrações foram obtidas usando a equação da reta e demonstram que os resultados possuem coerência e linearidade, tendo em vista que o método possui um bom coeficiente de correção. Em função disso, é notável que no ponto de coleta foram encontradas concentrações dos antibióticos levofloxacino, norfloxacino e ciprofloxacino na ordem de ng L<sup>-1</sup>, sendo o enrofloxacino e sarafloxacino não detectados.

#### 4 CONCLUSÃO

Diante dos resultados, associa-se que a água dos rios pode ser contaminada em função da falta de esgoto tratado, saneamento básico e coleta de resíduos sem periodicidade. Em função disso, nota-se que a qualidade da água é importante para o bem-estar e saúde populacional. Portanto, é importante a análise quantitativa e qualitativa e a comparação com parâmetros pré-estabelecidos, visto que, neste trabalho foram encontrados variáveis físico-químicas que não atendem a legislação vigente e antibióticos presente na água, justificado pela falta de estrutura e real situação do rio Anil, situado na cidade de São Luís no Maranhão, Brasil.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bergaya, F., & Lagaly, G. (2006). General introduction: clays, clay minerals, and clay science. *Developments in clay science*, 1, 1-18.
- Bila, D. M., & Dezotti, M. (2003). Fármacos no meio ambiente. *Química Nova*, 26(4), 523-530.
- Brasil, & Ministério da Saúde. (2011). Portaria No 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. *Diário Oficial da União*.

BRASIL, C. (2005). Resolução. 357, de 17 de março de 2005. *Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA*, 357.

BRASIL, C. (2011). Resolução CONAMA n. 430, DE 13 DE MAIO DE 2011. *Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução*, (357).

Brito, N. M., JUNIOR, O. P. D. A., Polese, L., & Ribeiro, M. L. (2003). Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 13.

de Fatima Alpendurada, M. (2000). Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 889(1-2), 3-14.

de Holanda, V. P. D., Soares, T. R., Veras, R. S., de Oliveira Alencar, I. F., & de Moraes Sales, R. J. (2017). Análise do déficit e da concentração de oxigênio dissolvido em trecho do rio Piranhas-Açu, sujeito a lançamento de efluentes, mediante a utilização do modelo de Streeter-Phelps simplificado. *Revista Tecnologia*, 38(1), 55-66.

Fent, K. (1996). Ecotoxicology of organotin compounds. *Critical reviews in toxicology*, 26(1), 3-117.

Gasparotto, F. A. (2011). *Avaliação ecotoxicológica e microbiológica da água de nascentes urbanas no município de Piracicaba-SP* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

Guimarães, D. O., Momesso, L. D. S., & Pupo, M. T. (2010). Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, 33(3), 667-679.

Hartmann, A., Alder, A. C., Koller, T., & Widmer, R. M. (1998). Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(3), 377-382.

Heberer, T. (2002). Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *Journal of Hydrology*, 266(3-4), 175-189.

Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment—a review—part II. *Chemosphere*, 75(4), 435-441.

Kümmerer, K. (2010). Pharmaceuticals in the environment. *Annual review of environment and resources*, 35, 57-75.

Lima, D. L., Silva, C. P., Otero, M., & Esteves, V. I. (2013). Low cost methodology for estrogens monitoring in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC with fluorescence detection. *Talanta*, 115, 980-985.

Mahugo-Santana, C., Sosa-Ferrera, Z., Torres-Padrón, M. E., & Santana-Rodríguez, J. J. (2011). Application of new approaches to liquid-phase microextraction for the determination of emerging pollutants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(5), 731-748.

Martins, M. L., Primel, E. G., Caldas, S. S., Prestes, O. D., Adaime, M. B., & Zanella, R. (2012). Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME) fundamentos e aplicações.

Mompelat, S., Jaffrézic, A., Jardé, E., & Le Bot, B. (2013). Storage of natural water samples and preservation techniques for pharmaceutical quantification. *Talanta*, 109, 31-45.



Nikolaou, A., Meric, S., & Fatta, D. (2007). Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 387(4), 1225-1234.

Nováková, L., & Vlčková, H. (2009). A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation. *Analytica Chimica Acta*, 656(1-2), 8-35.

Oliveira, R., Quadros, R., Harter, F., & Weymar, G. (2015). Uma abordagem analítica do problema da dispersão de contaminantes em rios e canais. *Proceeding Series of the Brazilian Society of Computational and Applied Mathematics*, 3(1).

Rezaee, M., Assadi, Y., Hosseini, M. R. M., Aghaee, E., Ahmadi, F., & Berijani, S. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1116(1-2), 1-9.

Silva, A. C. (2002). Tratamento do percolado de aterro sanitário e avaliação da toxicidade do efluente bruto e tratado. *Rio de Janeiro: COPPE/UFRJ. Dissertação de Mestrado*, 126p.

Silveira, G. P., Nome, F., Gesser, J. C., & Terenzi, M. M. S. H. (2006). Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. *Química Nova*, 29(4), 844.

Walsh, C. (2003). *Antibiotics: actions, origins, resistance*. American Society for Microbiology (ASM).

WEAVER, J. MC.; CAVE, L.; TALMA, A. (2007). Siep. Groundwatersampling. WaterResearchCommissionReport No. TT, 303(7).

Yan, H., Wang, H., Qin, X., Liu, B., & Du, J. (2011). Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for determination of fluoroquinolones in pharmaceutical wastewater. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 54(1), 53-57.